

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut an der
Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie
Direktor: Prof. Dr. Dr. Kai Zacharowski

**Einfluss erythrozytärer Mikropartikel
auf das Wachstum der Kolonkarzinomzelllinie
HCT-116**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Fabian Thies

aus Hamburg

Frankfurt am Main, 2021

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referentin:	PD Dr. Dania Fischer
Korreferent/in:	Prof. Dr. Ivan Dikic
Tag der mündlichen Prüfung:	07.09.2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis.....	8
Tabellenverzeichnis.....	8
Zusammenfassung.....	9
Abstract.....	11
1 Einleitung.....	13
1.1 Transfusionen und Malignome	13
1.1.1 Studien zum Einfluss perioperativer Transfusionen auf Patienten mit Malignomen.....	14
1.1.2 Studien zum Malignomrisiko bei malignomfreien Transfundierten	18
1.1.3 Studien im Tiermodell.....	21
1.2 Extrazelluläre Vesikel und erythrozytäre Mikropartikel	22
1.2.1 Klassifikation	22
1.2.2 Aufbau, Inhalt und Produktion	23
1.2.3 Biologische Aktivitäten.....	26
1.2.4 Methodik.....	28
1.2.4.1 Isolierungsmethoden	28
1.2.4.2 Quantifizierungsmethoden.....	29
1.3 Potenzielle Mechanismen zum Zusammenhang von Transfusionen und Malignomen.....	30
1.3.1 Transfusion-related immunomodulation	31
1.3.2 Induktion oder Übertragung von Krebs.....	34
1.3.3 Nebenwirkungen von Transfusionen	36
1.3.4 Extrazelluläre Vesikel	37
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit.....	38
2 Material.....	39
2.1 Zelllinie	39
2.2 Zellkulturmedien	39
2.3 Labormaterial, Chemikalien und Kits.....	40
2.4 Puffer und Antikörper für SDS-PAGE und Western Blotting.....	44
2.5 Geräte und Software	45
3 Methoden	47
3.1 Zellkultur.....	47
3.1.1 Splitten der Zellen	47

3.1.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen	47
3.1.3 Zellzählung	48
3.2 Isolierung und Lagerung erythrozytärer Mikropartikel	49
3.2.1 Ultrazentrifugation	49
3.2.2 Größenausschlusschromatographie.....	50
3.3 Quantifizierung erythrozytärer Mikropartikel	51
3.3.1 Durchflusszytometrie	51
3.3.2 Nanopartikel-Tracking-Analyse	54
3.4 Eisenkonzentrationsbestimmung.....	54
3.4 Zellkulturassays.....	56
3.4.1 Zellviabilität.....	56
3.4.2 Migration und Invasion	58
3.4.3 Langzeitproliferation	60
3.4.4 Proteinbiochemische Methoden	63
3.4.4.1 Herstellung von Zelllysaten	64
3.4.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung	64
3.4.4.3 SDS-PAGE.....	66
3.4.4.4 Western Blots	67
4 Ergebnisse	69
4.1 Isolierung und Quantifizierung erythrozytärer Mikropartikel.....	70
4.1.1 Isolierung via Größenausschlusschromatographie.....	70
4.1.2 Vergleich der Isolierungsmethoden	71
4.1.3 Vergleich der Quantifizierungsmethoden.....	72
4.2 Zellkulturassays.....	74
4.2.1 Zellviabilität.....	74
4.2.2 Migration und Invasion	75
4.2.3 Langzeitproliferation	77
4.2.4 Proteinsynthese.....	79
5 Diskussion	82
5.1 Isolierung erythrozytärer Mikropartikel via Größenausschlusschromatographie.....	82
5.2 Quantifizierung erythrozytärer Mikropartikel via Durchflusszytometrie und Nanopartikel-Tracking-Analyse	84
5.3 Einfluss der Isolierungsmethode auf die biologische Aktivität erythrozytärer Mikropartikel	86

5.4 Einfluss erythrozytärer Mikropartikel auf die Kolonkarzinomzelllinie HCT-116.....	87
6 Literaturverzeichnis	91
7 Danksagung	105
8 Schriftliche Erklärung	106

Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
BCA	Bicinchoninic acid (Bicinchoninsäure)
BSA	Bovines Serumalbumin
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
CD	Cluster of Differentiation
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
dH ₂ O	Deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EK	Erythrozytenkonzentrat
EV	Extrazellulärer Vesikel
FCS	Fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FSC	Forward scatter (Vorwärtsstreuung)
HDL	High Density Lipoprotein
HHV8	Humanes Herpesvirus 8
HR	Hazard Ratio
HTLV	Humanes T-lymphotropes Virus
IL	Interleukin
KI	Konfidenzintervall
LPS	Lipopolysaccharid
MP	Mikropartikel
mRNA	Messenger ribonucleic acid (messenger-Ribonukleinsäure)
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NP40	Nonident P40
NTA	Nanopartikel-Tracking-Analyse
OR	Odds Ratio
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)

PBS-T	PBS mit 0,1 % Tween-20
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PE	Phycoerythrin
P-GSK-3 β	Phospho-Glykogensynthase-Kinase 3 β
PS	Phosphatidylserin
RFU	Relative fluorescence units (relative Fluoreszenzeinheiten)
RMPs	Red blood cell-derived microparticles (erythrozytäre Mikropartikel)
RR	Relatives Risiko
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SEC	Size exclusion chromatography (Größenausschlusschromatographie)
SSC	Side scatter (Seitwärtsstreuung)
TGF	Transforming growth factor (transformierender Wachstumsfaktor)
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIM	Transfusion-related immunomodulation
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UZ	Ultrazentrifugation
WST-1	Water-soluble tetrazolium-1 (wasserlösliches Tetrazolium-1)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Durchflusszytometrie erythrozytärer Mikropartikel.....	53
Abbildung 2: Aufbau des Migrations- und Invasionsassays	59
Abbildung 3: Gating von HCT-116-Zellen im Langzeitproliferationsassay.....	62
Abbildung 4: Fluoreszenzintensitäten im Langzeitproliferationsassay.....	63
Abbildung 5: Konzentration erythrozytärer Mikropartikel, Protein und Eisen in Größenausschlusschromatographie-Isolaten	71
Abbildung 6: Partikelgrößenverteilung in Isolaten erythrozytärer Mikropartikel in der Nanopartikel-Tracking-Analyse	73
Abbildung 7: Einfluss erythrozytärer Mikropartikel auf die Viabilität von HCT-116-Zellen.....	75
Abbildung 8: Einfluss erythrozytärer Mikropartikel auf die Migration von HCT-116-Zellen.....	76
Abbildung 9: Einfluss erythrozytärer Mikropartikel auf die Invasion von HCT-116-Zellen.....	77
Abbildung 10: Einfluss erythrozytärer Mikropartikel auf die Langzeitproliferation von HCT-116-Zellen.....	79
Abbildung 11: Repräsentative Western Blots der untersuchten Proteine	80
Abbildung 12: Einfluss erythrozytärer Mikropartikel auf die Proteinsynthese von HCT-116-Zellen.....	81

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Meta-Analysen zu Transfusionen und Tumorchirurgie	14
Tabelle 2: Verwendete kommerzielle Medien.....	39
Tabelle 3: Verwendete Zusätze für Zellkulturmedien	39
Tabelle 4: Verwendete zusammengesetzte Zellkulturmedien	40
Tabelle 5: Verwendetes Labormaterial.....	40
Tabelle 6: Verwendete Chemikalien.....	42
Tabelle 7: Verwendete kommerzielle Kits	43
Tabelle 8: Verwendete Puffer für SDS-PAGE und Western Blotting	44
Tabelle 9: Verwendete Antikörper für Western Blotting.....	45
Tabelle 10: Verwendete Geräte.....	45
Tabelle 11: Verwendete Software	46
Tabelle 12: Standardreihe zur Eisenkonzentrationsbestimmung.....	55
Tabelle 13: Standardreihe zur Proteinkonzentrationsbestimmung	65

Zusammenfassung

In Deutschland werden jährlich gut drei Millionen Erythrozytenkonzentrate (EKs) transfundiert. Moderne Herstellungsmethoden und molekulare Diagnoseverfahren konnten die Sicherheit von Blutprodukten im Laufe der Jahre weiter verbessern. Wie bei jedem Medikament kann es nichtsdestotrotz bei der Therapie mit EKs zu Nebenwirkungen kommen. Dazu gehören unter anderem allergische Reaktionen, hämolytische und nicht hämolytische Transfusionsreaktionen, Übertragungen von Infektionskrankheiten und Eisenüberladung. Es werden weitere Nebenwirkungen postuliert, deren Zusammenhang mit Hämotherapie allerdings hinsichtlich einer möglichen Kausalität noch nicht abschließend untersucht wurde. Im Hinblick auf Malignompatienten zeigen retrospektive Untersuchungen eine deutliche Assoziation von Transfusionen und ungünstigem Behandlungsausgang. Diese Beobachtung könnte kausal oder durch Störfaktoren wie den medizinischen Umständen einer Transfusion oder patienteneigener Risikofaktoren erklärt werden. Während randomisierte Studien zur Überprüfung einer Kausalität sich aus ethischen Gründen verbieten, wurden mögliche Mechanismen aufgedeckt, die diese Assoziation erklären könnten. Dazu gehört unter anderem die *transfusion-related immunomodulation* (TRIM), an der auch erythrozytäre Mikropartikel (*red blood cell-derived microparticles*, RMPs) beteiligt sein könnten.

RMPs sind extrazelluläre Vesikel (EVs), die von Erythrozyten bei der Apoptose und bei Einwirken verschiedener Stressoren gebildet werden. Bei der Prozessierung und Lagerung von EKs akkumulieren RMPs in unphysiologischer Menge, und möglicherweise sind diese RMPs anders als jene, die *in vivo* gebildet werden. Ob RMPs direkte Effekte auf Malignomzellen haben, wurde noch nicht untersucht.

Das Forschungsgebiet rund um EVs ist relativ jung, weshalb noch keine echten Goldstandards bei Isolierung und Quantifizierung vorliegen. Während bei den RMPs hierfür am häufigsten Ultrazentrifugation (UZ) und Durchflusszytometrie verwendet werden, haben beide Methoden gewisse Einschränkungen. Mit der Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) liegt

ein Verfahren vor, das sich bei anderen EVs als effektive Alternative zur UZ gezeigt hat und das zudem die Eigenschaften und biologischen Aktivitäten der empfindlichen EVs möglicherweise besser erhält.

Ziel dieser Arbeit war es, im Zellkulturmodell zu untersuchen, ob RMPs aus EKs möglicherweise einen Einfluss auf Viabilität, Migration und Invasion maligner Zellen haben. Hierzu wurde die Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 genutzt. Zudem sollte mit der SEC eine alternative Isolierungsmethode für RMPs etabliert werden und ein möglicher Einfluss der Isolierungsmethode auf die biologische Aktivität der RMPs untersucht werden.

Insgesamt zeigte sich in den *in vitro*-Untersuchungen ein geringer Effekt von RMPs auf die Viabilität, Migration und Invasion von HCT-116-Zellen und dies auch nur in sehr hohen Konzentrationen, die in der Hämotherapie eines Patienten vermutlich nie erreicht werden. Es gilt, diese Beobachtungen in weiterführenden *in vivo*-Studien (zum Beispiel in Tiermodellen) zu verifizieren.

Die SEC zeigte sich als gut geeignet zur Isolierung von RMPs im Hinblick auf die RMP-Ausbeute und die Auftrennung der RMPs von Proteinen. Die RMPs, die via SEC isoliert wurden, hatten im Gegensatz zu RMPs, die via UZ isoliert wurden, keinen Einfluss auf die Viabilität von HCT-116-Zellen.

Die primäre Quantifizierungsmethode für RMPs war die Durchflusszytometrie, welche bei der Untersuchung kleiner EVs einige Einschränkungen hat, da die Auflösungsgrenze im Bereich der EV-Größe liegt. Ein Vergleich mit einer für EVs ausgelegten Technik, der Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA), zeigte, dass der Großteil der in den RMP-Isolaten enthaltenen Partikel in der Durchflusszytometrie nicht erkannt wird. Dieses Ergebnis könnte durch eine mangelhafte Sensitivität der Durchflusszytometrie, aber auch durch die Unspezifität der NTA erklärt werden. Es wurde in der NTA keine Färbung verwendet, daher konnten auch andere EVs und Partikel wie Lipoproteine mitgezählt werden.

Abstract

A good three million erythrocyte concentrates are transfused in Germany every year. Modern manufacturing methods and molecular diagnostic procedures were able to improve the security of blood products through the years. Nevertheless, as with every other medication, there are side effects of a therapy with erythrocyte concentrates. These include, inter alia, allergic reactions, hemolytic and non-hemolytic transfusion reactions, transmission of infectious diseases and iron overload. Other side effects are postulated, but their relation to hemotherapy has not been conclusively investigated concerning a possible causality. Regarding malignant tumor patients, retrospective studies show significant associations of transfusions and adverse outcome. This observation could be explained by confounders like the medical circumstances of a transfusion or the patients risk factors. While randomized studies for confirmation of a causality forbid for ethical reasons, some mechanisms have been revealed that could explain this association. These include transfusion-related immunomodulation (TRIM), that red blood cell-derived microparticles (RMPs) could be involved in.

RMPs are extracellular vesicles (EVs) that are produced by erythrocytes during apoptosis and under the influence of various stressors. During processing and storage of erythrocyte concentrates, RMPs accumulate in an unphysiological quantity, and those RMPs are possibly different than those produced *in vivo*. It has not been investigated yet if RMPs have direct effects on malignant cells.

The research area around EVs is relatively young, which is why there is no real gold standard for isolation and quantification. While ultracentrifugation and flow cytometry are mostly used for RMPs, both methods have certain limitations. Size exclusion chromatography (SEC) is a method that has been shown to be an effective alternative to ultracentrifugation for other EVs and it possibly preserves the properties and biological activities of the sensitive EVs better.

The aim of this study was to investigate in cell culture if RMPs isolated from erythrocyte concentrates possibly have an influence on viability, migration and invasion of malignant cells. To this, the colorectal cancer cell line HCT-116 has

been used. Also, the SEC should be established as an alternative isolation method for RMPs and a possible influence of the isolation method on the biological activity of RMPs should be assessed.

Overall, the *in vitro* investigations showed a low influence of RMPs on viability, migration and invasion of HCT-116 cells, but only in very high concentrations that are probably never reached in the hemotherapy of a patient. These observations should be verified in further *in vivo* studies (for example in animal models).

It appeared that SEC works well for RMP isolation concerning RMP yield and separation of RMPs from proteins. The RMPs isolated via SEC had no influence on the viability of HCT-116 cells in contrast to those isolated via ultracentrifugation.

The primary method of quantification was flow cytometry, which has some limitations studying small EVs like RMPs, as the resolution limit is in the range of the EV size. A comparison to a method designed for EVs, nanoparticle-tracking-analysis (NTA), showed, that most particles in the RMP isolates were not detected in flow cytometry. This result could be explained by insufficient sensitivity of flow cytometry, but also by non-specificity of NTA. There were not used any dyes in NTA, so also other EVs and particles like lipoproteins could have been counted.

1 Einleitung

In Deutschland werden jährlich gut drei Millionen Erythrozytenkonzentrate (EKs) transfundiert,¹ in den USA mehr als zehn Millionen.² Ein genaues Verständnis der Nutzen und Risiken dieser Therapie betrifft also eine große Anzahl an Patienten. Durch moderne Herstellungsmethoden und molekulare Diagnoseverfahren sind Transfusionen heutzutage wahrscheinlich sicherer denn je, es zeigen sich wie bei jedem Medikament jedoch auch unerwünschte Nebenwirkungen und mögliche Risiken. Des Weiteren wird zunehmend deutlich, dass Transfusionen oftmals überflüssig sind. So zeigen Studien in vielen Bereichen, dass restriktive den traditionell praktizierten liberalen Transfusionstriggern nicht unterlegen sind und dass restriktive Transfusionstrigger die Anzahl der notwendigen Transfusionen effektiv senken können.^{3,4}

In dieser Arbeit sind mit Transfusionen, wenn nicht explizit anders dargestellt, immer Transfusionen von EKs gemeint.

1.1 Transfusionen und Malignome

Ein besonders häufig transfundiertes Patientenkollektiv stellen Malignompatienten dar. Tumorblutungen, Tumoranämie durch funktionellen Eisenmangel oder Knochenmarkbeteiligung sowie Operationen und Chemotherapien sind einige der Gründe hierfür.^{5,6} Es gibt jedoch seit langem eine kontroverse Diskussion darüber, ob Transfusionen gerade bei Malignompatienten zu unerwünschten Verläufen beitragen können. Grund hierfür sind vor allem zahlreiche retrospektive Studien, die eine Assoziation zwischen perioperativen Transfusionen und ungünstigem Behandlungsergebnis bei Malignompatienten zeigen.⁷ Zunächst soll ein Überblick über diese Studien verschafft werden. Später wird auf mögliche Mechanismen eingegangen, die an einem kausalen Zusammenhang beteiligt sein könnten (siehe 1.3 Potenzielle Mechanismen zum Zusammenhang von Transfusionen und Malignomen).

1.1.1 Studien zum Einfluss perioperativer Transfusionen auf Patienten mit Malignomen

Besonders früh erkannt und oft bestätigt wurde der Zusammenhang zwischen perioperativer Transfusion und ungünstiger Prognose in retrospektiven Studien zum kolorektalen Karzinom.^{8,9} Weitere Malignome, bei denen in Meta-Analysen ähnliche Beobachtungen gemacht wurden, sind beispielsweise das Prostatakarzinom,¹⁰ das Nierenkarzinom,¹⁰ das Magenkarzinom,¹¹ das Lungenkarzinom,¹² das Ösophaguskarzinom,¹³ das hepatozelluläre Karzinom¹⁴, das Pankreaskarzinom¹⁵ und Brustkrebs.¹⁶ Petrelli et al. zeigten diesen Zusammenhang in einer übergreifenden Meta-Analyse, bei der alle nicht-metastasierten Malignome eingeschlossen wurden.¹⁷ Ebenso verhält es sich bei der Lebermetastasenchirurgie beim kolorektalen Karzinom.¹⁸ Ein Überblick dieser Meta-Analysen zu perioperativen Transfusionen und Tumorchirurgie findet sich in Tabelle 1.

Tabelle 1: Meta-Analysen zu Transfusionen und Tumorchirurgie

Studie	Tumor (Eingriff)	n	Outcome
Acheson et al. ⁸	Kolorektales Karzinom (jeder Eingriff)	20.795	Krebsspezifische Mortalität: OR 1,71, 95 %-KI 1,43 – 2,05, p < 0,001 Gesamt mortalität: OR 1,72, 95 %-KI 1,55 – 1,91, p < 0,001
Soubra et al. ¹⁰	Prostatakarzinom (radikale Prostatektomie)	28.854	Krebsspezifische Mortalität: HR 1,609, 95 %-KI 1,235 – 2,097, p = 0,0004 Gesamt mortalität: HR 1,121, 95 %-KI 1,006 – 1,251, p = 0,0394
	Harnblasenkarzinom (radikale Zystektomie)	5.462	Krebsspezifische Mortalität: HR 1,047, 95 %-KI 0,917 – 1,195, p = 0,4962

			Gesamt mortalität: HR 1,095, 95 %-KI 0,998 – 1,200, p = 0,0547
	Nierenkarzinom (radikale Nephrektomie oder Nierenteilresektion)	14.379	Krebsspezifische Mortalität: HR 1,365, 95 %-KI 1,167 – 1,597, p = 0,0001 Gesamt mortalität: HR 1,402, 95 %-KI 1,273 – 1,544, p < 0,0001
Sun et al. ¹¹	Magenkarzinom (kurative Resektion)	9.120	Krebsspezifische Mortalität: OR 2,57, 95 % KI 1,24 – 5,34, p = 0,011 Gesamt mortalität: OR 2,17, 95 % KI 1,72 – 2,74; p < 0,001
Wang et al. ¹²	Lungenkarzinom (jeder Lungeneingriff)	6.474	Gesamt mortalität: HR 1,42, 95 %-KI, 1,20 – 1,69, p < 0,001
Boshier et al. ¹³	Ösophagus- und Kardiakarzinom (Ösophagektomie)	4.190	Gesamt mortalität: HR 1,49, 95 %-KI 1,26 – 1,76, p < 0,001
Liu et al. ¹⁴	Hepatozelluläres Karzinom (jede Resektion)	5.635	Kürzeres 5-Jahresüberleben: OR 1,60, 95 %-KI, 1,47 – 1,73, p < 0,001 Tumorrezidiv innerhalb von 5 Jahren: OR 1,16, 95 %-KI, 1,08 – 1,24, p < 0,001
Mavros et al. ¹⁵	Pankreas-, Ampullen- und distales Gallengangskarzinom (kurative Pankreas-Chirurgie)	3.646	Verkürztes Gesamtüberleben: OR 2,43, 95 %-KI 1,90 – 3,10, p < 0,05
Nadeem et al. ¹⁶	Brustkrebs (jede Resektion)	7.384	Gesamtüberleben: OR 0,79, 95 %-KI 0,72 – 0,86, p = 0,001

Petrelli et al. ¹⁷	Nicht-metastasierte Malignome (jeder chirurgische Eingriff)	184.190	Gesamtmortalität: HR 1,50, 95 %-KI 1,42 – 1,57, p < 0,01 Rezidiv HR 1,36, 95 %-KI 1,26 – 1,46, p < 0,01
Lyu et al. ¹⁸	Lebermetastasen beim kolorektalen Karzinom (Leberresektion)	10.621	Gesamtmortalität: OR 4,13, 95 %-KI 1,96 – 8,72, p < 0,001

Abk.: HR = Hazard Ratio, KI = Konfidenzintervall, n = Anzahl der eingeschlossenen Patienten, OR = Odds Ratio.

Bei anderen Tumorentitäten, für die keine Meta-Analysen verfügbar sind, zeigen sich teils widersprüchliche Ergebnisse, zum Beispiel beim High-Grade Weichteilsarkom der Extremitäten. In einer Studie von Heslin et al. mit 232 Patienten zeigten sich hier perioperative Transfusionen in der Multivarianzanalyse nicht als unabhängiger Risikofaktor für Lokalrezidiv, Fernmetastasen oder Tumormortalität.¹⁹ Eine Studie von Rosenberg et al. mit 156 Patienten zeigte hingegen ein niedrigeres 5-Jahresüberleben (63 % vs. 85 %, p = 0,0035) und niedrigeres krankheitsfreies 5-Jahresüberleben (48 % vs. 70 %, p = 0,007) nach perioperativer Transfusion.²⁰

Auch beim Urothelkarzinom der Blase zeigten einige Studien einen negativen Einfluss von perioperativen Transfusionen.²¹ Die in Tabelle 1 beschriebene Meta-Analyse von Soubra et al. zeigte jedoch keine erhöhte Gesamtmortalität oder krebsspezifische Mortalität.¹⁰

Grundsätzliches Problem aller klinischen Studien und damit auch ihrer Meta-Analysen in diesem Kontext ist, dass sie beobachtend sind. Eine Anpassung an Störfaktoren ist daher nicht möglich. Dadurch kann ein bedeutendes Selektions-Bias bestehen. Es könnten möglicherweise die medizinischen Umstände einer Transfusion verantwortlich für den ungünstigen Verlauf sein. Mögliche Störfaktoren wie fortgeschrittenes Tumorstadium, größerer Blutverlust, schwerere operative Bedingungen oder höheres Alter sind in der Regel sowohl

mit einer höheren Transfusionswahrscheinlichkeit als auch mit einem ungünstigen Behandlungsergebnis assoziiert.

Von manchen Autoren wird argumentiert, dass aufgrund der über viele Malignome konsistenten Beobachtung und vergleichsweise starken Assoziation als wahrscheinlich anzunehmen ist, dass Transfusionen zu dieser Assoziation kausal beitragen. Dabei wird sich teils auf die Bradford-Hill-Kriterien berufen, die eine kritische Prüfung von Kausalitäten in der Medizin ermöglichen sollen, auch wenn keine randomisierten Studien vorliegen.^{8,22}

Ein Beweis der Kausalität zwischen perioperativer Transfusion und ungünstigem Behandlungsergebnis ist durch diese Studien aber letztendlich nicht möglich. Notwendig wären randomisierte kontrollierte Studien, die sich aus ethischen Gründen verbieten.

Da Blutprodukte bei Malignompatienten ebenfalls häufig im Rahmen einer Chemotherapie notwendig werden, könnte auch hier vermutet werden, dass Transfusionen ein Prädiktor für negativen Behandlungsergebnis sind. Tatsächlich zeigten zum Beispiel Cannas et al. in einer monozentrischen, retrospektiven Studie mit 1.067 Patienten mit akuter myeloischer Leukämie, dass Transfusionen von EKs während der Induktionschemotherapie mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert waren (10,8 Monate vs. 18,8 Monate, $p = 0,02$).²³

Vergleichbare Studien zu Malignomen und Transfusionen außerhalb des chirurgischen Kontextes sind jedoch schwer zu finden. Dies könnte unter anderem daran liegen, dass Tumoroperationen eine einfach zu untersuchende Plattform darstellen, da zum Beispiel das Patientenkollektiv durch ein bestimmtes Ereignis (die Operation) definiert werden kann. Die operative Phase hat jedoch auch eine besondere Bedeutung für den gesamten Verlauf einer malignen Erkrankung. Einerseits ist es oftmals der einzig kurative Ansatz, andererseits wirken in dieser Phase viele Stressoren auf den Körper des Patienten ein, die den Behandlungsergebnis negativ beeinflussen können. Dazu gehören das chirurgische Trauma, die Freisetzung von Kortikosteroiden und Katecholaminen und es kommt oft zum Einsatz von Narkose- und Schmerzmitteln,

Volumentherapien und maschineller Beatmung.²⁴ Möglicherweise werden in der perioperativen Phase durch chirurgische Faktoren wie Tumormanipulation oder Verletzung von Tumorgefäßen auch maligne Zellen in den Blut- oder Lymphstrom ausgeschwemmt.

So zeigten Miyazono et al. in einer Studie mit 57 Magenkarzinom-Patienten über den Nachweis von messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) des Carcinoembryonalen Antigens (CEA), einem Tumormarker dieses Karzinoms, dass nach der Resektion signifikant häufiger Tumorzellen im Blut des Patienten nachgewiesen werden können. Zudem zeigte sich in dieser Studie ein signifikanter Zusammenhang von CEA-Positivität zu Rezidiv und Lebermetastasen im Follow-Up.²⁵

Möglicherweise wurde der Zusammenhang zwischen Transfusionen und ungünstiger Prognose bei Malignompatienten also vor allem deshalb in der perioperativen Phase aufgezeigt, da diese besonders vulnerabel für Faktoren ist, die Tumorstadium verstärken oder die Metastasierung von malignen Zellen erleichtern.

1.1.2 Studien zum Malignomrisiko bei malignomfreien Transfundenen

Weitere wichtige Erkenntnisse zu diesem Thema finden sich in Studien, die das Malignomrisiko bei Transfundenen auswerten, die bis dahin malignomfrei waren.

Ein Beispiel ist eine große skandinavische Studie von Hjalgrim et al. mit computerisierten Daten dänischer und schwedischer Blutbanken. Ausgewertet wurden 888.843 malignomfreie Patienten, die nach 1968 eine Transfusion erhalten haben. Im Folgenden wurde ermittelt, ob Patienten dieser Kohorte nach der Transfusion ein Malignom diagnostiziert bekommen haben. Im Vergleich zur Inzidenzrate der dänischen und schwedischen Normalbevölkerung war das Risiko nach Transfusion mit einer standardisierten Inzidenzrate von 1,45 (95 %-Konfidenzintervall [KI] 1,44 – 1,46) tatsächlich höher, insbesondere in den ersten sechs Monaten nach der Transfusion (standardisierte Inzidenzrate 5,36, 95 %-KI 5,29 – 5,43). Die Autoren der Studie vermuten allerdings, dass die Transfusion

eher einen Prädiktor als eine Ursache darstellt, da viele Störfaktoren das Ergebnis verzerrt haben könnten. So geht zum Beispiel eine Transfusion in der Regel mit einer Hospitalisierung einher, welche selbst ein Risikofaktor für eine zukünftige Malignomdiagnose ist. Zudem kann ein unerkannter Tumor, der erst nach der Transfusion diagnostiziert wird, zur Transfusionspflichtigkeit beisteuern. Auch steuern Noxen wie Alkohol und Tabak gleichzeitig zum Malignomrisiko bei und erhöhen das Risiko, eine Transfusion zu benötigen.²⁶

Eine andere Studie der gleichen Arbeitsgruppe beleuchtet diesen Zusammenhang aus einer anderen Perspektive. Hier wurde ausgewertet, ob das Blut von Spendern, die nach der Spende ein Malignom diagnostiziert bekamen, zu einem erhöhten Malignomrisiko im Empfänger führte. Die untersuchten Patienten wurden ebenfalls nach 1968 in Skandinavien transfundiert. Es wurden 354.094 Transfundierte analysiert. Davon erhielten 12.012 (~3,4 %) Blutprodukte von Spendern, bei denen in den darauffolgenden fünf Jahren ein Malignom diagnostiziert wurde. Die Transfusion von Blut präkanzeröser Spender führte im Vergleich zum Blut von Spendern ohne nachfolgende Malignomdiagnose nicht zu einer erhöhten Malignomrate beim Empfänger (angepasstes relatives Risiko [RR] 1,00, 95 %-KI 0,94 – 1,07).²⁷

Eine Studie von Yang et al. aus dem Vereinigten Königreich untersuchte prospektiv 1,3 Millionen malignomfreie Frauen nach Einführung der Routinetestung von Blutspendern auf Hepatitis C. Es sollte daher keine Verzerrung durch Transfusions-assoziierte Hepatitis C-Infektionen und dadurch erhöhtes Risiko fürs hepatozelluläre Karzinom vorliegen. Es wurde ein Vergleich des Risikos einer Diagnose der zehn häufigsten Malignome sowie des hepatozellulären Karzinoms zwischen transfundierten und nicht transfundierten Frauen durchgeführt. Die Frauen, die eine Transfusion erhielten, hatten in den ersten fünf Jahren nach Transfusion ein erhöhtes Risiko für neun der elf untersuchten Malignome. Dieses Ergebnis führen die Autoren auf Störfaktoren wie das erhöhte Risiko für Transfusionspflicht durch ein vorbestehendes, unerkanntes Malignom zurück. Im Beobachtungszeitraum von fünf Jahren oder länger war nur noch das Risiko für das hepatozelluläre Karzinom (RR 2,43, 95

%-KI 1,34 – 4,41, $p = 0,04$) und das Non-Hodgkin-Lymphom (NHL, RR 1,69, 95 %-KI 1,14 – 2,44, $p = 0,05$) erhöht. Aufgrund dieses erhöhten Langzeitrisikos vermuten die Autoren, dass EKs etwas Karzinogenes enthalten, worauf nicht getestet wird.²⁸

Zwei US-amerikanische Studien zum Auftreten des NHL nach Transfusion zeigen widersprüchliche Ergebnisse.^{29,30} Cerhan et al. untersuchten die möglichen Risikofaktoren von 759 Patienten mit NHL-Diagnose im Vergleich zu 589 durch Gruppen-Matching ausgewählten Kontrollen und fanden eine Assoziation zwischen vorangehender Transfusion und NHL-Diagnose (Odds Ratio [OR] 1,26, 95 %-KI 0,91 – 1,73).²⁹ Im Gegensatz dazu kamen Chow und Holly in einem sehr ähnlichen Studienaufbau mit 1.591 NHL-Patienten und 2.515 Kontrollen zu dem Ergebnis, dass vorangehende allogene Transfusionen nicht mit erhöhtem NHL-Risiko assoziiert sind (OR 1,0, 95 %-KI 0,84 – 1,2).³⁰

Eine Fall-Kontroll-Studie aus den USA untersuchte, ob Transfusionen einer Malignomdiagnose 552.951 älterer Patienten im Vergleich zu 100.000 durch Gruppen-Matching ausgewählten Kontrollen häufiger vorausgingen. Es zeigte sich ein erhöhtes Risiko für jegliche Malignomdiagnose nach Transfusionen, die innerhalb eines Jahres vor Diagnose durchgeführt wurden (OR 2,05, 95 %-KI 1,95 – 2,16) und für zahlreiche einzelne Malignome. Transfusionen, die in Zeiträumen weiter zuvor verabreicht wurden (13 – 30 Monate oder 31 – 48 Monate), waren nicht mit erhöhtem Malignomrisiko assoziiert. Die Autoren vermuten daher auch hier den Einfluss des Störfaktors eines vorbestehenden Malignoms, das zur Transfusionspflichtigkeit beiträgt.³¹

Zusammenfassend sind auch diese Studien mit großen Einschränkungen zu interpretieren. Aufgrund der genannten Störfaktoren ist aus diesen Studien nicht zu schließen, dass Transfusionen bei malignomfreien Patienten kausal zu einem erhöhten Malignomrisiko beitragen.

1.1.3 Studien im Tiermodell

Einige Studien im Tiermodell wurden durchgeführt, um den möglichen Effekt von Transfusionen auf Malignome mit möglichst wenig Störfaktoren untersuchen zu können.

Atzil et al. beobachteten in zwei Maustumormodellen (metastasierter Brustkrebs und Leukämie), dass die Transfusion von EKs einen unabhängigen Risikofaktor für Tumorprogress darstellt. In beiden Tumormodellen zeigte sich zudem, dass nicht die Rest-Leukozyten oder löslichen Faktoren im zellfreien Überstand des EKs, sondern die transfundierten Erythrozyten den hier untersuchten Effekt verursachten. Im Brustkrebsmodell gab es zudem eine Abhängigkeit des untersuchten Effekts von der Lagerungsdauer der EKs mit einem signifikant stärkeren Effekt ab dem neunten Lagerungstag. In einem weiteren Ansatz im Brustkrebsmodell untersuchten sie, wie sich die Effekte einer Transfusion auf den Tumor in einem chirurgischen Kontext verhalten, simuliert durch Durchführung einer Laparotomie mit definiertem Blutverlust. Während die Operation allein einen Risikofaktor für Tumorprogress darstellte, wirkte die Transfusion sowohl bei operierten als auch bei nicht operierten Mäusen als Verstärker für den Tumorprogress. Der Effekt war zudem signifikant stärker bei den operierten Mäusen.³²

Jin et al. untersuchten in einem Mausmodell mit einer randomisierten, verblindeten Studie den Einfluss der Transfusion von allogenen, syngenen und autologen EKs auf das Wachstum eines Sarkoms auf dem Rücken der Mäuse. Dieses wurde dort zehn Tage vor Transfusion eingeimpft und danach über 14 Tage täglich gemessen. Der Vergleich der Steigung des Tumorgroße zeigte, dass allogene Transfusion gegenüber syngenen und autologen Transfusionen zu signifikant stärkerem Wachstum führte, während Letztere sich untereinander nicht unterschieden.³³

Zhang et al. untersuchten in einem Melanom-Mausmodell mit Lungenmetastasen den Effekt der Transfusion von leukoreduziertem Vollblut auf die Metastasen im Vergleich zur Kontrolle (physiologische Kochsalzlösung). Es zeigte sich im

Vergleich zur Kontrolle ein höheres Lungengewicht am 21. Tag nach Transfusion sowohl bei 15 Tage gelagertem als auch bei frischem Blut, was auf verstärkte Lungenmetastasierung des Melanoms zurückgeführt wurde. Die Transfusion von 15 Tage gelagertem Blut führte im Vergleich zur Kontrolle und zur Transfusion von frischem Blut zudem zu mehr Metastasen auf der Lungenoberfläche und verstärkter Expression verschiedener Tumormarker in der Immunhistochemie und Western Blotting des Lungengewebes.³⁴

Die genannten Tiermodell-Studien bestätigen das Ergebnis der Beobachtungsstudien, dass Transfusionen bei Vorliegen eines Malignoms mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind. Zudem liefern sie Hinweise auf mögliche kausale Zusammenhänge und beteiligte Faktoren.

1.2 Extrazelluläre Vesikel und erythrozytäre Mikropartikel

Extrazelluläre Vesikel (EVs) sind membran-umhüllte Sphären, die von zahlreichen Zellen gebildet werden können. Sie stellen ein erst in den letzten zwei bis drei Jahrzehnten intensiver beforschtes extrazelluläres Kompartiment dar, dessen Bedeutung vielleicht lange unterschätzt wurde. Während sie früher als funktionsloser Zellüberrest abgetan wurden, da sie unter anderem bei der Apoptose entstehen, ist inzwischen bekannt, dass die Bildung von EVs ein regulierter Prozess ist.^{35,36} Sie sind vermutlich an vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt, tragen biologisch aktive Substanzen und können an der Zell-Zell-Kommunikation beteiligt sein.

1.2.1 Klassifikation

EVs werden nach ihrer Größe und Entstehung grundsätzlich in drei Kategorien klassifiziert. Es gibt Exosomen (30 – 100 nm), Mikrovesikel bzw. Mikropartikel (MPs, 100 – 1.000 nm) und Apoptosekörper (1.000 – 5.000 nm).³⁷ Die Grenzen der Größen werden mitunter leicht unterschiedlich angegeben.³⁷⁻⁴⁰ Exosomen entstehen aus dem endosomalen Kompartiment und werden aus multivesikulären Körpern (*multivesicular bodies*) per Exozytose aus der Zelle ausgeschleust. Mikrovesikel bzw. MPs entstehen durch Ausknospung aus der

Plasmamembran. Apoptosekörper entstehen durch Blasenbildung aus apoptotischen Zellen.

Die Terminologie in der Literatur ist trotz Versuchen der Standardisierung noch uneinheitlich.³⁹ Der Ausdruck „Mikrovesikel“ wird von manchen Autoren gegenüber „Mikropartikel“ für EVs mit 100 – 1.000 nm bevorzugt, da es sich um membranumhüllte Vesikel handelt, nicht um solide Partikel. Dennoch wurde bei vielen Zellarten traditionell eher der Ausdruck „Mikropartikel“ verwendet und hat sich bereits in der Literatur gefestigt, beispielsweise bei endothelialen Mikropartikeln oder thrombozytären Mikropartikeln.³⁹ Da dieser Umstand auch für die MPs erythrozytärer Herkunft zutrifft, wird in dieser Arbeit der Ausdruck „Mikropartikel“ verwendet. Erythrozytäre Mikropartikel (*red blood cell derived-microparticles*, RMPs) haben typischerweise eine Größe zwischen 100 und 300 nm.⁴¹ Im Vergleich zu anderen MPs werden RMPs als eher klein und homogen beschrieben, von manchen Autoren werden mittlere Größen um 150 nm angegeben.^{38,42}

Im Folgenden wird, soweit möglich und sinnvoll, allgemein über EVs berichtet. Im Detail wird aber vor allem der Stand der Forschung bezüglich MPs und RMPs dargestellt, um die es in dieser Arbeit geht.

1.2.2 Aufbau, Inhalt und Produktion

EVs sind umhüllt von einer Phospholipiddoppelschicht. Je nach zellulärer Herkunft enthalten ihre Membranen verschiedene Antigene, die als Marker verwendet werden können. Gemeinsame Eigenschaft von fast allen Unterformen ist die Expression des negativ geladenen Phospholipids Phosphatidylserin (PS) in der Außenseite der Membran.³⁹ Daher werden als Marker für EVs oft PS-Marker wie Annexin V oder Lactadherin verwendet.⁴³ Es wurde jedoch am Beispiel von thrombozytären MPs bereits gezeigt, dass es auch PS-negative EVs gibt.⁴⁴

EVs können verschiedene Moleküle mit potenzieller biologischer Aktivität transportieren, darunter Proteine, mRNA, microRNA und Lipide. Größe, Aufbau

und Inhalt von EVs sind abhängig von deren zellulärer Herkunft. EVs sind aber nicht einfach nur eine kleinere Version ihrer Herkunftszelle, weshalb anzunehmen ist, dass die Entstehung der Vesikel komplexer ist als ein Zerfall der Mutterzelle. Tatsächlich werden MPs der meisten Zellen nur unter bestimmten Umständen wie Apoptose, Zellaktivierung oder dem Einwirken von Scherkräften gebildet,⁴⁵ bei MPs von Tumorzellen und Exosomen scheint die Bildung aber teils konstitutiv aktiv zu sein.^{46,47}

RMPs bestehen aus Hämoglobin, Lipiden und Proteinen. Ihre Lipide liegen in der Form von Stomatin-spezifischen Lipid Rafts vor.⁴⁸ Die Zusammensetzung der RMPs ist zwar ähnlich zum intakten Erythrozyten, weist aber einige Unterschiede auf. So ist der Anteil an Phosphatidsäure 10-fach höher und der Anteil von Phosphatidylethanolamin etwas geringer in RMP-Membranen als in Erythrozyten-Membranen. RMPs fehlt das Zytoskelettprotein Spektrin und ihr Membranproteingehalt ist nur halb so groß wie bei intakten Erythrozyten. Die Menge des Enzyms Acetylcholinesterase ist doppelt so hoch wie in Erythrozyten.⁴⁹ RMPs exprimieren zudem bestimmte Blutgruppenantigene.⁵⁰

Für die Produktion von MPs gibt es inzwischen ein Modell. Dabei steigt bei Zellaktivierung der intrazelluläre Calciumgehalt, wodurch das Enzym Flippase gehemmt wird und die Enzyme Floppase und Scramblase aktiviert werden. Flippase erhält normalerweise die Phospholipidasymmetrie der Plasmamembran, indem es negativ geladene Phospholipide (vor allem PS) auf der Innenseite der Membran hält. Floppase und Scramblase arbeiten ihr entgegen, indem sie negative Phospholipide nach außen befördern bzw. in beide Richtungen bewegen, so dass die Membranasymmetrie aufgelöst wird. Zudem aktiviert Calcium Proteasen, die Membran- von Zytoskelettproteinen trennen. Die Membran wird weniger stabil und MPs können ausknospen.^{51,52} Die Bildung von MPs kann künstlich durch Calcium oder ATP-Depletion induziert werden.^{49,53} Auch die Bildung von Exosomen aus multivesikulären Körpern ist inzwischen gut charakterisiert.⁵⁴

Bei Erythrozyten scheint die Bildung von MPs Teil des natürlichen

Alterungsprozesses zu sein. Es wird geschätzt, dass ein Erythrozyt im Laufe seines im Durchschnitt 120 Tage langen Lebens etwa 20 % seines Volumens durch Bildung von circa 230 MPs verliert.⁵⁵ Mögliche physiologische Funktionen dieses Abscherens von MPs sind die Entfernung schädlicher Inhalte wie denaturiertem Hämoglobin oder des Membranangriffskomplexes des Komplementsystems, oder aber die Markierung gealterter Erythrozyten zur Phagozytose durch Entfernen von Proteinen wie *Cluster of Differentiation* (CD)47 aus deren Membran.³⁸ *In vivo* werden RMPs schnell durch das retikuloendotheliale System entfernt.^{56,57}

Ein Umstand, bei dem mehr RMPs gebildet werden als *in vivo*, ist die Prozessierung und Lagerung von Erythrozyten in EKs.^{42,58} Die verstärkte Bildung von RMPs in EKs ist Teil des sogenannten Lagerungsschadens (*storage lesion*). Dies ist ein komplexes Phänomen, das über ATP-Depletion, pH-Ansäuerung, Störungen im Energiemetabolismus und oxidativen Stress in vermehrter Apoptose der Erythrozyten, RMP-Produktion und Freisetzung von Hämoglobin mündet.^{45,59} So steigt die Konzentration von RMPs in EKs von Tag 5 bis Tag 50 etwa 20-fach an.⁴² Es gibt Anlass zur Vermutung, dass diese RMPs, die unter Zellstress entstehen, sich in ihrer Zusammensetzung von denen unterscheiden, die physiologisch im Blut entstehen.⁶⁰ Dass die Umstände der Entstehung den Aufbau der RMPs beeinflussen, wurde bereits an anderer Stelle gezeigt. So enthalten RMPs aus gelagerten EKs im Vergleich zu RMPs, die per Calcium-Induktion generiert werden, mehr von dem Lipid Raft-assoziierten Protein Stomatin und weniger von dem Protein Flotillin-2.⁵³

Die RMP-Produktion scheint zudem bei zahlreichen Pathologien erhöht zu sein. So kommt es zum Beispiel bei Arteriosklerose,⁶¹ Myokardinfarkt,⁶² Sichelzellanämie⁶³ und Malaria³ zu erhöhten RMP-Konzentrationen im Blut. Ob hierbei die RMPs nur eine Konsequenz dieser Krankheiten sind, oder ob sie auch dazu beitragen, ist noch weitgehend ungeklärt.

1.2.3 Biologische Aktivitäten

Immer mehr biologische Aktivitäten von EVs, insbesondere von Exosomen und MPs, werden bekannt. Durch Aufnahme in andere Zellen können EVs Überträger von biologisch aktiven Molekülen und von Zellmembranen sein. Diese Übertragung aktiver Moleküle auf andere Zellen stellt eine neuartige Form der Zell-Zell-Kommunikation dar, die in der konventionellen Vorstellung nur über lösliche Faktoren oder direkten Zell-Zell-Kontakt möglich war.³⁹ Für MPs, die von Tumorzellen stammen, wurde gezeigt, dass sie auf diese Weise onkogene Eigenschaften zwischen Zellen übertragen können. So zeigten Antonyak et al., dass MPs einer Brustkrebszelllinie und einer Gliomzelllinie typische Tumoreigenschaften wie verlängertes Überleben in nicht entarteten Zelllinien hervorrufen können.⁶⁴ Giusti et al. zeigten, dass Tumor-MPs aus einer Ovarialkarzinomzelllinie die Invasivität und Mobilität von Endothelzellen fördern.⁶⁵ Skog et al. zeigten, dass Exosomen aus Glioblastomzelllinien von Endothelzellen in Endosomen-artigen Zellorganellen aufgenommen werden und dass die von ihnen übertragene mRNA in den Empfängerzellen translatiert wird.⁶⁶ Al-Nedawi et al. zeigten, dass die Übertragung des mutierten Wachstumsfaktorrezeptors *epidermal growth factor receptor variant III* zwischen unterschiedlichen Glioblastomzelllinien über deren MPs erfolgen kann. Diese Übertragung führte tatsächlich zu einer Aktivierung des hiervon betroffenen Stoffwechselwegs. Hemmen ließ sich die Übertragung durch die gleichzeitige Inkubation der MPs mit Annexin V,⁶⁷ was die Vermutung anderer Autoren unterstützt, dass die Aufnahme von MPs in Zellen abhängig von PS ist.⁶⁸

Gut untersucht sind auch die biologischen Aktivitäten von EVs aus Blut und Blutprodukten. So fördern RMPs die Blutgerinnung über das extrinsische und das intrinsische System und die Aktivierung von Plättchen,^{58,69-71} können über Protein C aber auch antikoagulatorisch wirken.⁷² Eine wichtige Eigenschaft scheint in diesem Kontext die Präsentation von PS zu sein, da Gerinnungskomplexe von negativ geladenen Oberflächen abhängig sind, wie sie zum Beispiel auf aktivierten Thrombozyten vorhanden sind. Ähnliche pro- und antikoagulatorische Effekte wurden auch bei thrombozytären MPs nachgewiesen.⁷³

RMPs können *in vitro* die Bioverfügbarkeit des gefäßwirksamen Stickstoffmonoxids etwa 1.000-fach schneller senken als Erythrozyten und könnten damit die Vasoregulation beeinflussen, in dem sie die Endothel-abhängige Vasodilatation hemmen.⁷⁴

Für RMPs wurden zudem zahlreiche immunmodulatorische Aktivitäten nachgewiesen, die sowohl pro-inflammatorische als auch immunsupprimierende Effekte umfassen.

So erhöhen RMPs inkubiert auf Vollblut die Konzentration von Interleukin (IL)-1 β und IL-6.⁷⁰

Ebenso wie bei den Effekten auf die Koagulation ist auch bei den Effekten auf das Immunsystem ihre PS-Expression bedeutsam, da diese ein klassisches „eat me“-Signal für phagozytierende Zellen ist. Bekannt ist, dass die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen oder dendritische Zellen eine lokale Immunsuppression auslöst, bei der es zur Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 und des transformierenden Wachstumsfaktors (*transforming growth factor*, TGF)- β kommt und die Sekretion inflammatorischer Zytokine wie IL-12, IL-1 β , IL-6 und Tumornekrosefaktor (TNF) inhibiert wird.⁷⁵

Eine *in vitro*-Studie von Sadallah et al. zeigte, dass die Phagozytose von RMPs durch Makrophagen eben diese anti-inflammatorische Reaktion mit Inhibition der Zymosan A- und Lipopolysaccharid (LPS)-aktivierten TNF- α - und IL-8-Ausschüttung hervorruft.⁷⁶

Eine Studie von Danesh et al. zeigte, dass RMPs über die Interaktion mit Monozyten eine T-Zell-Aktivierung und eine Veränderung des Zytokinmusters auslösen können.⁷⁷ Demgegenüber zeigten jedoch Muszynski et al., dass der Überstand aus EKs die Monozytenfunktion hemmt, auch wenn die EVs entfernt wurden, und dass die EVs alleine keine hemmende Wirkung auf Monozyten haben.⁷⁸

Eine Studie im Mausmodell von Belizaire et al. zeigte, dass die Transfusion von MPs aus murinen EKs unter Reanimationsbedingungen zu veränderter Lungenhistologie und pulmonaler Akkumulation von Neutrophilen führt. Zudem führte die Transfusion dieser MPs in gesunden Mäuse zur Aktivierung neutrophiler Granulozyten. Die Behandlung humaner Neutrophiler mit MPs aus

humanen EKs führte ebenfalls zu deren Aktivierung und verstärkter Superoxid-Produktion.⁷⁹

1.2.4 Methodik

Die Analyse von EVs wie den RMPs bringt einige Schwierigkeiten mit sich, oftmals basierend auf deren Größe. Zahlreiche Methoden werden zur Isolierung und Quantifizierung verwendet. Viele Autoren konnten zeigen, dass EVs verschiedener Zellen sehr empfindlich auf Faktoren in der Präanalytik und Analytik reagieren, was eine Standardisierung zur besseren Vergleichbarkeit von Studien dringend notwendig macht.^{43,80-82}

1.2.4.1 Isolierungsmethoden

Ein echter Goldstandard zur Isolierung von EVs existiert bisher nicht. Mit Abstand am häufigsten wird jedoch die Ultrazentrifugation (UZ) verwendet, weshalb sie als Standardmethode angesehen werden kann.^{43,83} Dabei muss das Verfahren an die Eigenschaften der zu isolierenden EVs angepasst werden. Bei der Isolierung von EVs aus Blut oder EKs werden in der Regel zunächst in ein oder zwei konventionellen Zentrifugationsschritten die Zellen und Zellschrott sedimentiert und der Überstand dann ultrazentrifugiert, um die EVs zu sedimentieren.⁸⁰ Während große MPs mit niedrigeren Zentrifugationsgeschwindigkeiten (10.000 - 20.000 x g) sedimentiert werden können, müssen für kleinere MPs oder Exosomen deutlich höhere Geschwindigkeiten (100.000 – 200.000 x g) verwendet werden werden.⁸³ Teils wird die UZ um einen Saccharose-Dichtegradienten erweitert, um eine bessere Trennung der EVs von Proteinen und Protein-Aggregaten zu ermöglichen. Bei der Isolation aus Blut ist jedoch auch bei Verwendung eines solchen Gradienten die Verunreinigung mit High Density Lipoproteinen (HDL) möglich, da diese, trotz ihrer geringeren Größe (~10 nm), eine Überlappung in der Dichte mit EVs haben.⁸² Dieses Problem ist möglicherweise mit einem Iodixanol-Gradienten weniger bedeutsam.⁸³

Es gibt Hinweise, dass die UZ aufgrund ihrer hohen Scherkräfte die biophysischen Eigenschaften und biologischen Aktivitäten der empfindlichen EVs verändert oder zur Verklumpung von EVs führt.⁸⁴ Böing et al. haben für thrombozytäre MPs die Isolierung per Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) etabliert, welche besser erhaltene und von Lipoproteinen wie HDL getrennte MPs gewinnt.⁸⁵ Mol et al. zeigten am Beispiel von Kardiomyozyten-Vorläuferzellen, dass deren MPs isoliert per SEC im direkten Vergleich zur UZ eine höhere biologische Aktivität aufweisen.⁸⁶ Vorteil der SEC ist auch ihr vergleichsweise geringer zeitlicher Aufwand.^{85,86}

Ein anderes, weniger verwendetes Verfahren nutzt magnetische oder nicht-magnetische Beads mit gekoppelten Antikörpern als Immunoaffinitätsisolierung. Ein Vorteil könnte hier sein, dass nicht nach der Größe, sondern nach den Oberflächenmarkern isoliert wird. So können beispielsweise aus biologischen Flüssigkeiten wie Blut die EVs einer bestimmten Zellart isoliert werden, anstatt die EVs verschiedener Zellarten, die eine ähnliche Größe haben.⁸³

1.2.4.2 Quantifizierungsmethoden

Auch bei der Quantifizierung von EVs gibt es keine Standardisierung, obwohl Versuche in dieser Hinsicht unternommen wurden.^{43,82} Verfahren, die zur Quantifizierung, Größeneinschätzung und Visualisierung eingesetzt werden, umfassen Durchflusszytometrie, dynamische Lichtstreuung, Elektronenmikroskopie, *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*, Atomkraftmikroskopie und Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA).⁸⁷

Die am häufigsten verwendete Technik ist die Durchflusszytometrie.⁸⁷ Das Hauptproblem bei dieser Technik, die zur Analyse von Zellen entwickelt wurde, ist die Größe der EVs. Je nach Einstellungen und verwendetem Durchflusszytometer ist unterhalb von etwa 200 – 300 nm keine Unterscheidung der EVs vom Hintergrundrauschen mehr möglich.^{39,87} Diese Untergrenze kann durch Fluoreszenzfärbungen etwas erweitert werden, die genaue Einschätzung der Größe der Partikel ist aber nicht möglich.⁸⁷ Häufig werden dabei Annexin V oder ein anderer PS-Marker wie Lactadherin verwendet.⁴³ Bei RMPs wird

zumeist ein Antikörper gegen CD235a (Glykophorin A) als Marker für ihre erythrozytäre Herkunft verwendet, in der Regel als duale Färbung.⁸⁰ Bei den Einschränkungen der Durchflusszytometrie ist besonders wichtig, dass standardisiert vorgegangen wird. Dafür wird die Verwendung von Kalibrierungsbeads wie Megamix und Quantifizierungsbeads bekannter Konzentration empfohlen.^{82,88} Im Vergleich zu anderen Techniken ist das Verfahren günstig, effektiv und breit verfügbar. Die Ergebnisse sollten jedoch immer mit Vorsicht interpretiert werden.

Aufwändige Techniken wie Elektronenmikroskopie und Atomkraftmikroskopie sind in der Analyse von EVs zum Beispiel zur Charakterisierung der Morphologie und Größe sehr gut geeignet, aber können nur sehr begrenzt zur Quantifizierung eingesetzt werden.^{43,82}

Nanopartikel-Tracking-Analyse, welche spezifisch für kleine EVs entwickelt wurde, kann effektiv und präzise zur Quantifizierung und Größeneinschätzung von EVs eingesetzt werden, ist jedoch noch nicht so breit verfügbar. Auch solche neuen Methoden sind nicht ohne Einschränkungen. Bei der NTA muss die Software präzise eingestellt werden, um eine standardisierte Analyse zu ermöglichen.^{43,82} Bei der Analyse aus Blutprodukten mittels NTA können Lipoproteine und Proteinkomplexe kaum von EVs ähnlicher Größe unterschieden werden.⁸² Diesem Umstand könnte möglicherweise mit der Verwendung von Fluoreszenzfärbungen begegnet werden.⁴³ Ein weiteres Problem ist, dass eine Überlagerung kleinerer EVs durch größere EVs in der gleichen Probe möglich ist.⁴³

1.3 Potenzielle Mechanismen zum Zusammenhang von Transfusionen und Malignomen

EKs sollten idealerweise nur gesunde Erythrozyten in einer stabilisierenden Pufferlösung enthalten, da Zweck der Transfusion eine Verbesserung des Sauerstofftransports durch Anhebung des Hämoglobin-Werts ist. In der Realität enthalten EKs als biologisches Produkt jedoch zusätzlich viele biologisch aktive

Faktoren wie Rest-Leukozyten, apoptotische Zellen, freies Hämoglobin, Eisen und andere lösliche Substanzen sowie extrazelluläre Vesikel verschiedener Zellreihen. Es ergeben sich daher zahlreiche potenzielle Mechanismen, welche zu einem möglichen Zusammenhang zwischen Transfusionen und Malignomen beitragen könnten.

1.3.1 Transfusion-related immunomodulation

Bei der Betrachtung des Zusammenhangs zwischen Transfusionen und ungünstiger Prognose bei Malignompatienten steht schon seit langem die immunmodulierende Wirkung von EKs im Vordergrund, welche man als *transfusion-related immunomodulation* (TRIM) bezeichnet.^{89,90} Grundsätzlich wird hierbei angenommen, dass bestimmte Faktoren im EK Einfluss auf das Immunsystem des Empfängers nehmen, wodurch EKs sowohl immunsupprimierende als auch pro-inflammatorische Effekte haben. Bei einer Immunsuppression, die sich hieraus ergeben könnte, würde ein maligner Tumor vom Immunsystem weniger an Wachstum und Invasion gehindert werden, weshalb dies ein plausibler Erklärungsansatz für die beobachteten unerwünschten Effekte von Transfusionen auf Malignompatienten wäre. Des Weiteren wäre zu erwarten, dass dies Infektionen erleichtert, welche bei Malignompatienten ohnehin häufiger auftreten und schwerer verlaufen können.

Entdeckt wurde das Phänomen der TRIM im Kontext der frühen Zeit der Nierentransplantation, als wirkungsvolle Immunsuppressiva noch nicht verfügbar waren. Bei den häufig transfusionspflichtigen Niereninsuffizienten stellte man bereits in den 1970er Jahren fest, dass transfundierte Patienten ein besseres Graftüberleben bei einer darauffolgenden Nierentransplantation hatten.^{91,92} Gantt stellte 1981 die Vermutung auf, dass diese immunsupprimierende Wirkung, die bei Nierentransplantationen erwünscht sein kann, bei Malignompatienten zur unerwünschten Immuntoleranz gegenüber dem Krebs führen könnte.⁹³ 1988 zeigten Tartter et al. mit einer prospektiven Beobachtungsstudie, dass perioperative Transfusionen ein unabhängiger Risikofaktor für infektiöse Komplikationen bei Patienten mit kolorektalem Karzinom sind.⁹ Weitere Studien bestätigten diese Beobachtungen. So zeigte zum Beispiel eine retrospektive

Analyse von 24.230 Patienten mit kolorektalem Karzinom aus dem Staat New York, die zwischen 2004 und 2011 operiert wurden, dass perioperative Transfusionen mit höherem Risiko für Sepsis assoziiert sind (8,2 % vs. 2,3 %, $p < 0,0001$). In dieser Studie zeigten sich zudem sowohl Transfusionen als auch Sepsis als Risikofaktor für Gesamtmortalität, und das gemeinsame Vorliegen von Sepsis und Transfusionen hatte einen additiven Effekt auf die Gesamtmortalität.⁹⁴

Inzwischen sind zahlreiche mögliche Mechanismen identifiziert, die TRIM erklären könnten.

Eine mögliche Ursache für TRIM sind residuale Leukozyten. Heute werden EKs zwar standardmäßig leukodepletiert, um Leukozyten nahezu vollständig zu entfernen. Es wurde jedoch gezeigt, dass trotz Leukodepletion noch eine kleine Zahl an Leukozyten in EKs verbleibt.⁹⁵ Außerdem wurde *in vitro* gezeigt, dass der Überstand aus leukodepletierten EKs noch immunmodulierende Eigenschaften hat.^{96,97}

So zeigten Baumgartner et al., dass der Überstand aus nicht-leukodepletierten EKs eine pro-inflammatorische, LPS-induzierte Zytokin-Antwort mit einer verstärkten Sekretion von IL-1 β , TNF- α und IL-6 durch mononukleären Zellen hervorrufen kann. Der Effekt auf IL-1 β und IL-6 war dabei stärker, je länger das EK gelagert wurde. Es wurden zudem die Überstände aus gealterten EKs (Tag 42 nach Entnahme) mit oder ohne Leukoreduktion verglichen. Die Leukoreduktion verminderte dabei signifikant die IL-1 β -Sekretion, nicht aber die Produktion von TNF- α oder IL-6.⁹⁶

Eine andere Studie von Baumgartner et al. zeigte, dass sowohl der Überstand aus leukodepletierten als auch aus nicht-leukodepletierten EKs regulatorische T-Zellen induzieren kann, wenn er auf peripheren mononukleären Zellen inkubiert wird.⁹⁷

Eine Studie von Patel et al. untersuchte den Effekt des Überstandes aus EKs auf die Freisetzung LPS-induzierter Zytokine (TNF- α , IL-6, IL-8) aus Vollblut sowie die Ubiquitin-Konzentration im Überstand im Verlauf der Lagerung. Es zeigte sich dabei ein linearer Anstieg der Ubiquitin-Konzentration über die Lagerungsdauer (bis Tag 42), der mit einem immunmodulierenden Effekt des Überstands auf

Vollblut korrelierte (TNF- α -Inhibition über Stimulierung der IL-8-Produktion). Die Autoren nehmen an, dass die Ubiquitin-Konzentration im EK aufgrund der schieren Masse der Erythrozyten unabhängig von einer Leukoreduktion ist, und vermuten daher, dass Ubiquitin an TRIM beteiligt sein könnte.⁹⁸

Die bereits erwähnte Studie von Zhang et al., die eine verstärkte Lungenmetastasierung in einem Melanom-Mausmodell nach Transfusion von leukoreduziertem Vollblut feststellte (siehe 1.1.3 Studien im Tiermodell), untersuchte zusätzlich die mögliche Beteiligung extrazellulären Ubiquitins an TRIM und vermehrtem Tumorwachstum. *In vitro* verstärkte extrazelluläres Ubiquitin hier signifikant die Proliferation und Invasion und senkte die Apoptose-Rate von Melanomzellen. Es wurde zudem der Ubiquitin-Gehalt der EKs im Verlauf der Lagerung bestimmt und eine positive Korrelation der Konzentration zur Lagerungszeit bestätigt. Im Folgenden wurden analog zur Studie mit Transfusionen im Melanom-Mausmodell zwei Interventionsgruppen mit frischem Vollblut und einer von zwei zugesetzten Ubiquitin-Konzentrationen durchgeführt, die dem Gehalt von einer Einheit bzw. zehn Einheiten 15 Tage gelagertem Vollblut entsprechen. Im Vergleich zur Kontrolle und frischem Vollblut führte Ubiquitin beider Konzentration zur verstärkten Tumormarkerexpression im *post mortem* untersuchten Lungengewebe an Tag 21 nach Behandlung, wie auch schon für 15 Tage gelagertes Vollblut gezeigt wurde. In einem weiteren Mausmodell mit Fluoreszenz-markierten Melanomzellen führte reines Ubiquitin der beiden Konzentrationen bereits einen Tag nach Behandlung im Vergleich zu einer Ubiquitin-freien Kontrolle zu einer verstärkten Migration von Tumorzellen in die Lunge. Dies wurde sowohl durch den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der *enhanced green fluorescent protein* – positiven Melanomzellen als auch durch den Vergleich der Tumormarker-Expression gezeigt. Des Weiteren führten beide Ubiquitin-Behandlungen zu einem verringerten Überleben der Mäuse. Untersuchungen aus peripherem Blut der Mäuse zeigten zudem signifikante Veränderungen der Immunzellen sowohl nach Transfusion mit 15 Tage gelagertem leukoreduziertem Vollblut als auch nach Behandlung mit frischem leukoreduziertem Vollblut, welches mit Ubiquitin versetzt wurde. Die Autoren vermuten daher eine Beteiligung von Ubiquitin an der vermehrten Metastasierung des Melanoms in die Lunge, welche auf TRIM zurückzuführen sein könnte.³⁴

Ein weiterer Mechanismus für TRIM ergibt sich aus der Akkumulation von Lyso-Phosphatidylcholinen in EKs, welche *in vitro* die Oxidase-Aktivität neutrophiler Granulozyten verstärken⁹⁹ sowie Natürliche Killer-T-Zellen aktivieren können.¹⁰⁰ Zudem könnten RMPs aufgrund ihrer zahlreichen immunmodulierenden Aktivitäten an TRIM beteiligt sein (siehe 1.2.3 Biologische Aktivitäten).

Es bieten sich also einige Mechanismen, die zu TRIM beitragen könnten. Möglicherweise ist TRIM zumindest zum Teil kausal an der schlechteren Prognose von Malignompatienten nach Transfusionen beteiligt. Auch die Assoziation von Transfusionen und höherem Risiko einer Malignomdiagnose wäre durch TRIM miterklärbar (siehe 1.1.2 Studien zum Malignomrisiko bei malignomfreien). Der tatsächliche klinische Einfluss des Phänomens TRIM in diesen Zusammenhängen bleibt derzeit aber noch unklar, da die meisten Studien in Tiermodellen oder *in vitro* durchgeführt wurden.⁹⁰

1.3.2 Induktion oder Übertragung von Krebs

Weitere Erklärungsansätze für die Ergebnisse der Studien, die eine Assoziation von Transfusion und höherem Risiko einer Malignomdiagnose zeigen, sind zum einen die hämatogene Transmission maligner Zellen und zum anderen die Induktion von Krebs durch Übertragung karzinogener Viren.

Menschen mit malignen Erkrankungen werden von der Blutspende ausgeschlossen, da eine hämatogene Übertragung maligner Zellen vermieden werden soll. Es bleibt aber die Möglichkeit, dass ein Spender eine unerkannte maligne Erkrankung und im Blut zirkulierende entarteten Zellen hat. Das Immunsystem ist im Normalfall äußerst effektiv in der Beseitigung körperfremder Zellen. Während es also zwar theoretisch möglich ist, dass maligne Zellen im Rahmen einer Transfusion übertragen werden, ist es nahezu ausgeschlossen, dass das Malignom sich dann im Empfänger manifestieren kann. Eine hämatogene Transmission von Malignomen wurde noch nie im Rahmen einer Transfusion, jedoch in anderem Kontext im Rahmen von Einzelfällen beschrieben, beispielsweise von einer Schwangeren auf den Fötus¹⁰¹ oder von

einem operierten Malignompatienten auf den Chirurgen im Rahmen einer Nadelstichverletzung.¹⁰²

Zudem gibt es Situationen, in denen das Immunsystem fremde, per Transfusion übertragene benigne Zellen über lange Zeit toleriert. Ein Beispiel dafür ist der Transfusions-assoziierte Mikrochimerismus. Dieses Phänomen tritt insbesondere bei Traumapatienten auf, die kurz nach einer massiven Blutung transfundiert werden. Es kommt dabei zum langfristigen Einnisten und Überleben von Spender-Leukozyten im Empfänger, da anscheinend das Immunsystem in dieser kritischen Phase eine mehr oder weniger dauerhafte Toleranz gegenüber den fremden Zellen entwickelt. Ob dies Konsequenzen für den Patienten hat, ist noch unklar.¹⁰³

Dass eine Übertragung von malignen Zellen zu einem erhöhten Malignomrisiko nach Transfusion beiträgt, erscheint insgesamt eher unwahrscheinlich.

Die Übertragung karzinogener Viren durch Transfusionen hingegen ist ein Mechanismus, der nicht nur als bewiesen gilt, sondern dem durch Routinetestungen, wie beispielsweise auf Hepatitisviren, bereits begegnet wird. Eine Vielzahl an humanpathogenen Viren wurde identifiziert, die bei Infektion das Risiko erhöhen, dass betroffene Zellen entarten. Dazu gehören unter anderem das Humane T-lymphotrope Virus 1 (HTLV-1, adulte T-Zellleukämie), die Hepatitis-Viren B und C (hepatozelluläres Karzinom), Humanes Herpesvirus 8 (HHV8, Kaposi-Sarkom), Epstein-Barr-Virus (Burkitt-Lymphom, nasopharyngeales Karzinom) und Humanes Papillomavirus (Zervixkarzinom).¹⁰⁴ Blutspender werden heute zwar routinemäßig auf die Hepatitisviren B und C und das Humane Immundefizienz-Virus getestet, aber eine Testung auf viele andere onkogene Viren, die nachweislich über Transfusionen übertragen werden können, findet routinemäßig nicht statt.

In vielen Ländern mit hohem Einkommen und niedriger Prävalenz wird inzwischen auch auf HTLV-1 getestet, gerade in Hochprävalenzregionen fehlt aber noch ein Screening.¹⁰⁵

Das Epstein-Barr-Virus kann per Transfusion übertragen werden und verursacht normalerweise nur leichte Erkrankungen, ist aber bei immunsupprimierten Patienten auch mit malignen Erkrankungen assoziiert.^{106,107}

Eine Untersuchung von Hladik et al. in Uganda, einem Endemiegebiet für HHV8, zeigte, dass das Virus über Transfusionen übertragbar ist.¹⁰⁸ Die Bedeutung der Möglichkeit der Übertragung von HHV8 in Ländern mit niedriger Prävalenz wie Deutschland (Seropositivenrate 1 – 3 %) ist noch unklar.¹⁰⁶

Dem Risiko, aufgrund von einer Transfusion-assoziierten Virusinfektion ein erhöhtes Malignomrisiko zu entwickeln, wird durch Routinetestung der Blutspender in der modernen Transfusionsmedizin wahrscheinlich effektiv begegnet. Da jedoch auf einige karzinogene Viren nicht getestet wird, könnten diese weiterhin durch Transfusionen übertragen werden. Zudem ist nicht ausgeschlossen, dass (noch) unbekannte Viren oder andere Mikroorganismen über EKs übertragen werden könnten, welche unerwünschte Auswirkungen im Empfänger haben.

1.3.3 Nebenwirkungen von Transfusionen

Malignompatienten unterliegen ebenso wie Patienten ohne Malignome den üblichen Nebenwirkungen von Transfusionen. Allgemeine Nebenwirkungen bei der Transfusion verschiedener Blutprodukte umfassen allergische Reaktionen, hämolytische Sofort- und Spätreaktionen bei Inkompatibilitäten von Blutgruppenantigenen, febrile nicht hämolytische Transfusionsreaktionen, transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz, transfusionsassoziierte akute Volumenbelastung, Übertragung von Infektionskrankheiten, Eisenüberladung und Weitere, die in ihrer Gesamtheit zu einer signifikanten Morbidität nach Transfusion beitragen.¹⁰⁹ Durch Verbesserungen im Bereich der Transfusionsmedizin sind Blutprodukte in Industrienationen heute wahrscheinlich sicherer denn je. Schwere Transfusionszwischenfälle, die beispielsweise aufgrund einer Verwechslung eintreten, sind durch zahlreiche Sicherungsmechanismen sehr selten geworden. Die Zahl der jährlichen Todesfälle, die das Paul-Ehrlich-Institut in Deutschland kausal auf eine Transfusion zurückführt, bewegt sich im einstelligen bis niedrigen zweistelligen Bereich.¹ Es kommt seit Einführung der Routinescreenings von Blutspendern auf HIV, HCV und HBV in Deutschland nur noch in Einzelfällen zu Übertragungen dieser Viren durch Blutprodukte.¹ Zudem hat sich wie bereits erwähnt die

Leukodepletion von EKs etabliert, weshalb auch die zelluläre Reinheit der Transfusionen gestiegen ist. Es gibt diesbezüglich jedoch eine kontroverse Diskussion darüber, ob diese wirklich notwendig und wirtschaftlich sinnvoll ist.¹¹⁰

EKs enthalten mit 200 – 250 mg eine große Menge Eisen.¹¹¹ Da der Körper nur eine begrenzte Menge Eisen aufnehmen und abgeben kann, haben Transfusionen daher insbesondere bei chronisch Transfusionspflichtigen auch das Risiko einer Eisenüberladung, während diese Nebenwirkung bei kurzzeitig Transfundierten wenig wahrscheinlich ist.¹¹¹ Ein komplexer Einfluss von Eisen auf Malignomzellen in experimentellen Studien und die Ergebnisse von Beobachtungsstudien zeigen jedoch, dass Eisen möglicherweise an der Entstehung, dem Wachstum und der Metastasierung von Malignomen beteiligt ist.¹¹²

1.3.4 Extrazelluläre Vesikel

Da RMPs in EKs im Laufe der Lagerung in hohen Konzentrationen akkumulieren, wird vermutet, dass sie insbesondere bei der Transfusion älterer EKs einen Anteil an Nebenwirkungen haben können. Die Studienlage zu gealterten EKs ist nicht eindeutig, es überwiegt jedoch Evidenz, dass gealterte EKs (bis Tag 42) ebenso sicher wie frische EKs sind. Es gibt aber Hinweise, dass bestimmte Patientengruppen wie kritisch kranke Kinder oder Traumapatienten anfälliger für schwere Nebenwirkungen durch gealterte EKs sind.¹¹³

Die bisher entdeckten biologischen Aktivitäten von RMPs umfassen vor allem Effekte auf Koagulation, Immunsystem und Vasoregulation (siehe 1.2.3 Biologische Aktivitäten). Diese Aktivitäten könnten sich negativ auf den Transfundierten auswirken. EKs enthalten jedoch nicht nur EVs erythrozytärer Herkunft.⁵⁹ So können auch MPs thrombozytärer Herkunft in EKs verbleiben, welche ebenso an Nebenwirkungen beteiligt sein könnten.⁷³ So beeinflussen sie ebenfalls die Blutgerinnung und sind möglicherweise an der erhöhten Inzidenz von venösen Thrombosen und Embolien nach Transfusion von Thrombozytenkonzentraten bei Malignompatienten beteiligt.^{73,114} Thrombozytäre MPs haben außerdem immunmodulierende Eigenschaften, die zu TRIM

beitragen könnten.^{45,73} In einem zerebralen Ischämie-Modell der Ratte wurde zudem gezeigt, dass thrombozytäre MPs über den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor die Angiogenese induzieren können.¹¹⁵ Für das Wachstum solider Tumore ist die Blutversorgung oft ein limitierender Faktor, weshalb ein ähnlicher Effekt in der Tumorumgebung für dessen Wachstum vorteilhaft wäre.

Denkbar, aber noch nicht erforscht, wären auch direkte zelluläre Effekte von EVs aus EKs auf maligne Zellen. Dafür kämen aufgrund ihrer Akkumulierung über die Lagerungszeit der EKs primär RMPs in Frage, welche in anderem Kontext (zum Beispiel durch Aufnahme durch Immunzellen) tatsächlich zelluläre Reaktionen hervorrufen können.⁷⁶

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Zusammenfassend gibt es eine Assoziation von Transfusionen und ungünstiger Prognose bei vielen Malignomen, insbesondere beim kolorektalen Karzinom. Ob diese kausal durch den Inhalt der EKs oder aber durch die Umstände der Transfusion bedingt ist, kann man zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht sagen. Mit der zunehmenden Beforschung der EVs zeigt sich, dass sie ein in der konventionellen Zellbiologie bisher weitgehend unbeachtetes Kompartiment darstellen, das zwar scheinbar Einfluss auf zahlreiche physiologische und pathophysiologische Prozesse haben kann, dessen Bedeutung in den meisten Bereichen aber noch unklar ist. Die RMPs, die man in EKs vorfindet, akkumulieren in diesen in unphysiologischer Weise und unterscheiden sich möglicherweise von denen, die *in vivo* entstehen. In vorherigen Studien zeigten sie zahlreiche biologische Aktivitäten, weswegen auch eine Beteiligung an einer möglichen Kausalität zwischen Transfusionen und Malignomwachstum nicht ausgeschlossen werden kann. Während unter anderem durch eine mögliche Beteiligung der RMPs an TRIM bereits ein Mechanismus hierfür postuliert wurde, wurden die direkten Effekte auf maligne Zellen noch nicht untersucht.

In dieser Arbeit sollen daher *in vitro* die direkten zellulären Effekte von RMPs auf die humane Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 untersucht werden. Zudem soll mithilfe zwei verschiedener Isolierungsmethoden verglichen werden, ob die Art

der Isolierung sich auf mögliche biologische Aktivitäten auswirkt, wie es schon für EVs anderer zellulärer Herkunft gezeigt wurde. Dafür soll neben der bereits etablierten UZ die SEC für die Isolierung von RMPs angepasst werden.

2 Material

2.1 Zelllinie

Die verwendeten HCT-116-Zellen stammen vom Leibniz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Die HCT-116-Zelllinie ist eine menschliche, adhärent wachsende Kolonkarzinomzelllinie.

2.2 Zellkulturmedien

Tabelle 2: Verwendete kommerzielle Medien

Medium	Hersteller
DMEM mit Phenolrot	Thermo Fisher Scientific
DMEM ohne Phenolrot	Thermo Fisher Scientific

Abk.: DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle Medium*.

Tabelle 3: Verwendete Zusätze für Zellkulturmedien

Zusatz	Hersteller
FCS	Thermo Fisher Scientific
Exosomen-depletiertes FCS	Thermo Fisher Scientific
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich
L-Glutamin 200 mM	Thermo Fisher Scientific

Abk.: FCS = *fetales Kälberserum*.

Tabelle 4: Verwendete zusammengesetzte Zellkulturmedien

Medium	Zusammensetzung
Kulturmedium	DMEM mit Phenolrot 10 % FCS 100 U / ml Penicillin 100 µg / ml Streptomycin
Assaymedium	DMEM ohne Phenolrot 10 % Exosomen-depletiertes FCS 100 U / ml Penicillin 100 µg / ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin
Einfriermedium 1	DMEM mit Phenolrot 100 U / ml Penicillin 100 µg / ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 40 % FCS
Einfriermedium 2	DMEM mit Phenolrot 100 U / ml Penicillin 100 µg / ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 20 % DMSO

Alle Prozentangaben entsprechen Volumenprozenten. Die zusammengesetzten Zellkulturmedien wurden bei 4° C gelagert. Abk.: DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMSO = Dimethylsulfoxid, FCS = fetales Kälberserum.

2.3 Labormaterial, Chemikalien und Kits

Tabelle 5: Verwendetes Labormaterial

Bezeichnung	Typ	Hersteller
6-Well-Mikrotiterplatte für Zellkultur	Cellstar®, transparent, flacher Boden, steril	Greiner Bio-One

96-Well-Mikrotiterplatte für Fluoreszenzmessungen	Schwarz, flacher Boden, steril	Corning
96-Well-Mikrotiterplatte für Zellkultur	Transparent, flacher Boden, steril	Corning
Blotting-Filterpapier		Bio-Rad
Blotting-Schwamm		Bio-Rad
Chromatographie-Säule	Poly-Prep®	Bio-Rad
Dreiwegehahn	Discofix®-3	Braun
Durchflusszytometrie-Röhrchen	Falcon® 5 ml	Corning
Einwegpipetten	2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Greiner Bio-One
Filter für 1,5 ml Reaktionsgefäße	Ultrafree-MC, GV 0,22 µm, 0,5 ml	Merck Millipore
Gefrierbehälter	Nalgene® Mr. Frosty®	Thermo Fisher Scientific
Glaswaren (Messzylinder, Bechergläser, Flaschen) und Kunststoff-Messzylinder		Duran, Vitlab, Fisherbrand
Kryoröhrchen	Nalgene®, 2 ml	Thermo Fisher Scientific
Neubauer Improved Einweg-Zählkammer	C-Chip	Science Service
Nitrozellulosemembran	Pierce, 0,45 µm	Thermo Fisher Scientific
Pipettenspitzen	10 µl, 200 µl, 1.000 µl, 5.000 µl	Starlab
Polycarbonatmembran-Zellkultureinsätze für 24-Well-Mikrotiterplatten	Transwell®, Membran mit 8 µm-Poren	Corning
Reaktionsgefäße groß	Cellstar® 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One
Reaktionsgefäße klein	0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt
Reservoir aus Polystyrol	StarTub PS	Starlab

Spacer für UZ	OptiSeal	Beckman Coulter
Spritzen	BD Plastipak™ Spritzen mit BD Luer-Lok™-Ansatz, 50 ml	BD
Transfusionssystem	Sangofix®	Braun
Ultrazentrifugationsröhrchen	OptiSeal 8,9 ml, Polypropylen	Beckman Coulter
Verschlussfolie	Parafilm „M“	American National Can
Zellkulturflasche	Cellstar® 75 cm ²	Greiner Bio-One
Zellschaber	28 cm, steril	Greiner Bio-One
Zentrifugenröhrchen mit Membran	Amicon Ultracel-PL 15 ml, 3 kDa	Merck Millipore
Zentrifugenröhrchen schwarz	LightSafe 50 ml	Sigma-Aldrich

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
4–20 % Mini-PROTEAN® TGX™ Gradientengele	Bio-Rad
Accutase	Sigma-Aldrich
Annexin V APC	BD
Annexin V-Bindungspuffer	BD
Anti-CD235a, BV421 Maus Anti-Mensch	BD
Beschichtungspuffer	Trevigen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Calcein-AM	Bio Trend
CFSE	Thermo Fisher Scientific
cOmplete™ Mini Proteasehemmer-Cocktail	Roche
DMSO	AppliChem
PBS	Thermo Fisher Scientific
Ethanol vergällt, ≥ 99,8 %	Carl Roth
Formaldehyd	Sigma-Aldrich
Glycerol	Carl Roth

Glycin	VWR
Matrigel® Basalmembran-Mix	BD
Megamix-Plus SSC-Kalibrierungsbeads	Stago
Methanol	Carl Roth
MP-Quantifizierungsbeads	Stago
NewBlot™ Nitro Stripping Buffer	LI-COR
NP-40	Sigma-Aldrich
Odyssey Blocking Buffer	LI-COR
PhosSTOP™ Phosphatasehemmer	Roche
Precision Plus Protein™ Proteinstandard	Bio-Rad
SDS	Sigma-Aldrich
Sepharose CL-2B	GE Healthcare
Tris-base	Sigma
Tris-HCl	Carl Roth
Trypanblau	VWR
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma
Tween 20	Biochemica
WST-1	Roche
Zelldissoziationslösung	Trevigen
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

Abk.: Calcein-AM = Calcein-Acetoxymethylester, CD = Cluster of Differentiation, CFSE = Carboxyfluoresceinsuccinimidylester, DMSO = Dimethylsulfoxid, PBS = phosphatgepufferte Salzlösung, EDTA = Ethylendiamintetraacetat, NP40 = Nonident P40, SDS = Natriumdodecylsulfat, SSC = Seitwärtsstreuung, Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan, WST-1 = wasserlösliches Tetrazolium-1.

Tabelle 7: Verwendete kommerzielle Kits

Bezeichnung	Inhalt	Hersteller
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	BCA Reagens A BCA Reagens B Standard-BSA [2 µg / µl]	Thermo Fisher Scientific

QuantiChrom™ Assay Kit	Iron	Reagens A Reagens B Reagens C Eisenstandard (Fe ²⁺) [10 mg / dl]	BioAssay Systems
---------------------------	------	--	------------------

Abk.: BCA = Bicinchoninsäure, BSA = bovines Serumalbumin.

2.4 Puffer und Antikörper für SDS-PAGE und Western Blotting

Tabelle 8: Verwendete Puffer für SDS-PAGE und Western Blotting

Puffer	Zusammensetzung
SDS-Lysepuffer	55,5 mM Tris-HCl pH 6,8 2,2 % SDS 9 % (v/v) Glycerol 1 x PhosSTOP 1 x cOmplete Mini
Laufpuffer für SDS-PAGE	25 mM Tris-base 192 mM Glycin 1 % (m/v) SDS
Transferpuffer für Western Blot	25 mM Tris-base 192 mM Glycin 20 % Methanol
5 x Lämmli-Puffer	250 mM Tris-HCl pH 6,8 5 mM EDTA 50 % Glycerol 10 % SDS 0,05 % Bromphenolblau 10 % β-Mercaptoethanol

Abk.: EDTA = Ethylendiamintetraacetat, PAGE = Polyacrylamidgelelektrophorese, SDS = Natriumdodecylsulfat, Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan.

Tabelle 9: Verwendete Antikörper für Western Blotting

Primär- & Sekundärantikörper	Hersteller	Verwendete Verdünnung
GSK-3 β <i>800 CW donkey anti-goat</i>	Santa Cruz <i>LI-COR</i>	1:1.000 <i>1:10.000</i>
P-GSK-3 β <i>680 RD donkey anti-goat</i>	Santa Cruz <i>LI-COR</i>	1:500 <i>1:10.000</i>
PCNA <i>800 CW donkey anti-mouse</i>	Abcam <i>LI-COR</i>	1:1.000 <i>1:20.000</i>
β -Aktin <i>800 CW donkey anti-mouse</i>	Santa Cruz <i>LI-COR</i>	1:1.000 <i>1:10.000</i>

Abk.: PCNA = proliferating cell nuclear antigen, (P)-GSK-3 β = (Phospho)-Glykogensynthase-Kinase 3.

2.5 Geräte und Software

Tabelle 10: Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	VX-95	Systec
Brutschränke	Heracell 150i CO2 Incubator	Thermo Fisher Scientific
Durchflusszytometer	FACSCanto™ II	BD
Elektrophorese-Stromversorgung	Consort EV231	Sigma-Aldrich
Feinwaage	TE212	Sartorius
Heiz-Thermoschüttler	MHR 13	Biotech
Inverses Labormikroskop	DM IL LED	Leica
Magnetrührer	RCT Basic	IKA Werke
Mikroplattenlesegerät	Infinite M200 Pro	Tecan
Nanopartikelgrößen-Analysator	NS500	Nanosight
Pipettierhelfer	Accu-jet® pro	Brand

Reagenzglasschüttler	Vortex-Genie 2	VWR
Rollschüttler	SRT9D	Stuart
Sicherheitswerkbank	Herasafe KS15	Thermo Fisher Scientific
Tischzentrifugen	Galaxy Mini MyFuge Mini	VWR Benchmark
Ultraschall-Homogenisator	Sonopuls HD2070	Bandelin
Ultrazentrifuge	Sorvall OTD Combi	Thermo Fisher Scientific
Ultrazentrifugen-Rotor	T-1270 Rotor	Thermo Fisher Scientific
Wasserdeionisieranlage	Milli-Q Advantage A10	Merck Millipore
Western Blot- und Elektrophorese-Kammer	Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad
Western Blot-Bildgebungssystem	Odyssey CLx Modell-Nummer 9140	LI-COR
Zentrifugen	5810R 5417R 5424R Heraeus Multifuge 1S-R	Eppendorf Eppendorf Eppendorf Thermo Fisher Scientific

Tabelle 11: Verwendete Software

Bezeichnung	Einsatz
NanoSight NTA 3.2	Nanopartikel-Tracking-Analyse
FACS Diva FCS Express 4 Flow Research Edition	Durchflusszytometrie
GraphPad Prism 8/9	Statistik und Graphiken
Image Studio Lite 5.2	Western Blots
Tecan i-control 2.0	Mikroplattenlesegerät

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Zum Wachsen in Kultur oder während der Zellkulturassays wurden die HCT-116-Zellen bei 37° C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Zur Kultivierung wurden Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)-basierte Kulturmedien mit fetalem Kälberserum (FCS) verwendet. Für die Zusammensetzung der verwendeten Kultur-, Assay- und Einfriermedien siehe Tabelle 4. In der Zellkultur verwendete Medien, phosphatgepufferte Salzlösung (*phosphate-buffered saline*, PBS), Trypsin und Accutase wurden vor Verwendung im Wasserbad auf 37° C aufgewärmt.

3.1.1 Splitten der Zellen

Zum Splitten der Zellen wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Nach Entfernen der PBS wurden 3 ml Trypsin auf die Zellen gegeben und die Kulturflasche bei 37° C in den Brutschrank gegeben, um die adhärenen Zellen vom Boden abzulösen. Nach 5 – 10 Minuten wurde lichtmikroskopisch überprüft, ob die Zellen vollständig abgelöst waren. Dies wurde sonst durch leichtes Klopfen an die Seitenwand der Kulturflasche erwirkt. Durch Zugabe von 7 ml Kulturmedium wurde die Reaktion gestoppt. Ein bestimmter Anteil der Zellsuspension wurde in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit Medium auf 20 ml aufgefüllt. Dabei wurden die Zelllinien etwa alle 2 bis 3 Tage im Verhältnis 1:2,5 bis 1:10 gesplittet, um eine konstante Zellzahl zu erhalten und eine übermäßige Konfluenz zu verhindern.

3.1.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Vor Einfrieren der Zellen wurde zunächst lichtmikroskopisch deren Viabilität überprüft. Es erfolgte dann nach Entfernen des Mediums ein Waschschriff mit 10 ml PBS in der Zellkulturflasche. Dann erfolgte ein Trypsinieren der Zellen wie bei der Kultivierung (siehe 3.1.1 Splitten der Zellen), welches durch Zugabe von Medium gestoppt wurde. Nun wurden die abgelösten Zellen, suspendiert in

Medium, aus der Zellkulturflasche entnommen und gewaschen. Dies erfolgte durch eine Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 500 x g für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 10 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (Raumtemperatur, 500 x g, 5 Minuten). Der Überstand wurde entfernt, die Zellen wurden in 800 µl Einfriermedium 1 resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Dann wurden 800 µl Einfriermedium 2 hinzugefügt und das Kryoröhrchen im Gefrierbehälter zügig in den -80° C Ultratiefkühlschrank gestellt. Nach 24 Stunden wurde das Kryoröhrchen aus dem Gefrierbehälter entnommen und weiter bei -80° C gelagert. In der Regel wurden 2,5 – 5 x 10⁶ Zellen / ml eingefroren.

Zum Auftauen von Zellen wurde das entsprechende Kryoröhrchen im Brutschrank bei 37° C aufgetaut. Sobald wie möglich wurden der Zellsuspension 10 ml 37° C warmes Kulturmedium hinzugefügt und dann bei Raumtemperatur mit 500 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation wie eben beschrieben. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in 20 ml Kulturmedium resuspendiert und zur Kultivierung in eine Zellkulturflasche überführt.

3.1.3 Zellzählung

Um Zellkulturassays mit definierten Zellzahlen durchführen zu können, wurden die kultivierten Zellen zunächst mithilfe von Neubauer improved-Zählkammern manuell ausgezählt. Dafür wurde eine 10 µl große Stichprobe der vorbereiteten, abgelösten Zellsuspension entnommen und zur Viabilitätsbestimmung mit 40 µl Trypanblau versetzt.

Tote Zellen werden durch Trypanblau blau gefärbt. Viable Zellen werden nicht gefärbt, da es nicht durch ihre Membran gelangt.

10 µl der gefärbten Zellsuspension wurden in die Zählkammer gegeben und anschließend wurden bei 100x absoluter Vergrößerung die viablen Zellen in den vier Eckquadranten der Zählkammer ausgezählt und die Werte gemittelt. Da jeder Eckquadrant ein Volumen von 0,1 µl umfasste und eine 1:5-Verdünnung

vorgenommen wurde, musste das Ergebnis noch mit 5×10^4 multipliziert werden, um die Zellzahl pro Milliliter zu ermitteln.

3.2 Isolierung und Lagerung erythrozytärer Mikropartikel

Die RMPs wurden aus EKs isoliert. Diese wurden vom Deutsches Rotes Kreuz-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen (Frankfurt, Deutschland) beschafft. Die Isolierung fand am 42. Tag nach Entnahme der EKs statt. Isolierte RMPs wurden in Aliquots bei -80°C gelagert und für folgende Versuche nur einmal wieder aufgetaut.

3.2.1 Ultrazentrifugation

Die primäre Isolierungsmethode war die UZ. Grundprinzip bei einer Zentrifugation ist das Auftrennen in Suspension befindlicher Moleküle nach ihrer Massenträgheit. Die bei der Zentrifugation erzeugte Zentrifugalkraft ist bei biologischen Verfahren meist ein Vielfaches der Erdbeschleunigung g ($9,81 \text{ m/s}^2$). Durch höhere G-Zahlen können auch Bestandteile niedrigerer Dichte sedimentiert werden. Im Kontext der Isolierung von EVs aus biologischen Flüssigkeiten wie Blut werden in der Regel zunächst geringe G-Zahlen eingesetzt, um ganze Zellen zu entfernen, dann größere G-Zahlen zur Entfernung von Zellschrott, und anschließend erheblich größere G-Zahlen bzw. ein oder mehrere Ultrazentrifugationsschritte zur Sedimentierung der EVs. Die bei der UZ gewählten G-Zahlen müssen dabei an die Eigenschaften der zu isolierenden EVs angepasst werden. Ein anderer Ausdruck für eine solche mehrschrittige Zentrifugation zur Auftrennung einer Suspension in verschiedene Fraktionen ist Differenzialzentrifugation.⁸³

Die Zentrifugationsschritte fanden alle bei 4°C statt. Alle Schritte zwischen den Zentrifugationen wurden unter der Sicherheitswerkbank und auf Eis durchgeführt. Zunächst wurde das EK mit einem Transfusionssystem und einer 50 ml Spritze unter leichtem Sog auf mehrere 50 ml fassende Zentrifugenröhrchen aufgeteilt. Anschließend wurde eine Zentrifugation mit $500 \times g$ für 15 Minuten durchgeführt, um die Erythrozyten zu sedimentieren. Der

Überstand wurde gesammelt und bei 4.600 x g für 20 Minuten zentrifugiert, um verbliebene Zellen und Zellschrott zu sedimentieren. Der Überstand wurde erneut gesammelt und bei 100.000 x g für 90 Minuten ultrazentrifugiert. Das Pellet enthielt die RMPs. Zum Waschen wurde das Pellet nach Entfernen des Überstandes in PBS resuspendiert und erneut bei 100.000 x g für 90 Minuten ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet mit den gewaschenen RMPs wurde in 1,6 ml PBS resuspendiert und in acht Aliquots à 200 µl aufgeteilt. Sieben Aliquots wurden direkt bei -80° C eingefroren und gelagert. Das achte Aliquot wurde markiert, auf Eis gelegt und unmittelbar nach der Isolierung zur Quantifizierung verwendet.

3.2.2 Größenausschlusschromatographie

Das Prinzip der SEC ist das Trennen gelöster Moleküle nach ihrer Größe. Bei einer SEC fließen die Moleküle in Lösung der Schwerkraft folgend durch eine stationäre Phase mit porösen Polymeren. Je kleiner die Moleküle sind, desto besser können sie in die Poren eindringen, und werden so länger zurückgehalten. Größere Moleküle eluieren daher schneller als kleinere. Bei einer SEC kann man durch das Auffangen des Eluats in verschiedenen Fraktionen so eine Aufteilung der Probe nach Größe erreichen, bei der in frühen Fraktionen die größeren und in späten Fraktionen die kleineren Moleküle sind.¹¹⁶

Zur Vorbereitung der SEC wurde eine Chromatographie-Säule mit 10 ml Sepharose CL-2B gefüllt und mit 20 ml PBS gewaschen. Kurz vor dem vollständigen Einziehen des PBS wurde die Säule bis zum Auftragen der Probe verschlossen, um ein Austrocknen der Sepharose zu verhindern. Zur Isolierung von RMPs aus EKs wurden zunächst die ersten zwei Zentrifugationsschritte analog der UZ vorgenommen (500 x g für 15 Minuten bei 4° C, um die Erythrozyten zu entfernen, und 4.600 x g für 20 Minuten bei 4° C, um den verbliebenen Zellschrott zu entfernen, siehe 3.2.1 Ultrazentrifugation). Anschließend wurde der Überstand weiter auf ein Zielvolumen von 0,5 – 2 ml konzentriert, indem er in Zentrifugenröhrchen mit einer 3 kDa Membran bei 4.000 x g für 40 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Das Konzentrat wurde erhalten, das Filtrat wurde verworfen. Das Konzentrat wurde nun auf die

Chromatographie-Säule aufgetragen und mit PBS eluiert. Das Isolat wurde in 13 Fraktionen aufgefangen, wobei die erste Fraktion 1,5 ml, alle folgenden Fraktionen 1 ml umfassten. Die SEC wurde bei Raumtemperatur unter der Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Fraktionen wurden direkt auf Eis gelegt und vor Quantifizierung und Lagerung aliquotiert.

3.3 Quantifizierung erythrozytärer Mikropartikel

3.3.1 Durchflusszytometrie

Bei der Analyse von RMPs wurde die Durchflusszytometrie als primäre Quantifizierungsmethode verwendet. Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Charakterisierung und Quantifizierung von Zellen anhand von Eigenschaften wie Größe, Granularität oder Oberflächenmarkern. Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen in Suspension mittels eines Hüllstroms einzeln in rechtem Winkel an einem Laser vorbeigebracht und abgetastet. Die entstehende Lichtstreuung wird dabei in engem Winkel zum Laser als Vorwärtsstreulicht bzw. Vorwärtsstreuung (*forward scatter*, FSC) und senkrecht zum Laser als Seitwärtsstreulicht bzw. Seitwärtsstreuung (*side scatter*, SSC) erfasst. Das Vorwärtsstreulicht ist vor allem abhängig von der Zellgröße, aber auch von der Form. Das Seitwärtsstreulicht ist abhängig von der Lichtstreuung im Zellinneren, also grob gesagt von der Granularität der Zelle. Zudem können, ebenfalls senkrecht zum Laser, Fluoreszenzsignale erfasst werden, die es beispielsweise durch den Gebrauch von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern erlauben, Zellen genauer zu klassifizieren. Der Einsatz von mehreren Fluoreszenzsignalen verschiedener Spektren ist möglich, die Überlappung der Spektren muss dabei jedoch bedacht und gegebenenfalls kompensiert werden.¹¹⁷ In der Analyse wird je nach Fragestellung mit verschiedenen Charakteristika der Lichtstreuungs- oder Fluoreszenzsignale gearbeitet. So steht ein „-A“ nach SSC oder FSC für „*area*“, das Areal unter der Kurve des Zytometriesignals, das durch die Zellen entsteht. Im Gegensatz dazu ist auch die Verwendung der Breite (*width*, -W) oder des Maximums (*height*, -H) der Signale möglich.

Alle Arbeitsschritte wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 4° C oder auf Eis durchgeführt. Es wurde mit einem BD FACSCanto™ II-Durchflusszytometer gearbeitet. Vor der eigentlichen Messung wurden immer Megamix-Plus SSC-Kalibrierungsbeads eingesetzt (siehe Abbildung 1). Dies sind fluoreszente Kügelchen, welche bei auf Seitwärtsstreulicht optimierten Durchflusszytometern wie dem BD FACSCanto™ II den theoretischen Größenbereich von MPs abdecken sollen (0,1 – 1 µm). Dabei wird das Seitwärtsstreulicht als größenabhängiger Parameter verwendet.¹¹⁸ Nach Akklimatisierung der Kalibrierungsbeads auf Raumtemperatur wurden sie zehn Sekunden auf einem Reagenzglasschüttler durchmischt. Unmittelbar vor der Analyse wurden 250 µl der Beads in einem Durchflusszytometrie-Röhrchen erneut kurz durchmischt. Zur Markierung der RMPs wurde eine doppelte Fluoreszenzfärbung vorgenommen (siehe Abbildung 1). Ein Antikörper gegen das Oberflächenantigen CD235a (Glykophorin A) wurde als Marker für die erythrozytäre Herkunft verwendet. Annexin V wurde als Marker für EVs benutzt (Bindung von PS). Die RMP-Proben wurden im Verhältnis 1:30 mit PBS verdünnt. Für jede zu quantifizierende Probe wurden 2 µl Anti-CD235a, 10 µl Annexin V und 8 µl Annexin V-Bindungspuffer gemischt und in Reaktionsgefäßen mit 0,22 µm-Filter zentrifugiert (12.000 x g für 4 Minuten). Es wurden 20 µl Filtrat zur Färbung mit 30 µl 1:30-verdünnter Probe und 50 µl Annexin V-Bindungspuffer gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur und bei Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden 400 µl Annexin V-Bindungspuffer und 30 µl MP-Quantifizierungsbeads hinzugefügt und die Probe zytometrisch analysiert. Die Messungszeit war dabei auf 2 Minuten eingestellt. Nur RMPs mit beiden Markern wurden gezählt. Mithilfe der Quantifizierungsbeads definierter Konzentration und folgender Formel konnte die Konzentration der RMPs berechnet werden. Anschließend wurde mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

$$\frac{RMPs}{\mu l} = \text{gezählte RMPs} \times \frac{c[\text{Quantifizierungsbeads}]}{\text{gezählte Quantifizierungsbeads}}$$

Dabei wurde zur Reduktion des Pipettierfehlers die gleiche Pipette für die Quantifizierungsbeads wie für die RMP-Probe verwendet. Die Quantifizierungsbeads wurden vor der Verwendung 30 Minuten auf Raumtemperatur akklimatisiert und zehn Sekunden auf dem Reagenzglasschüttler durchmischt.

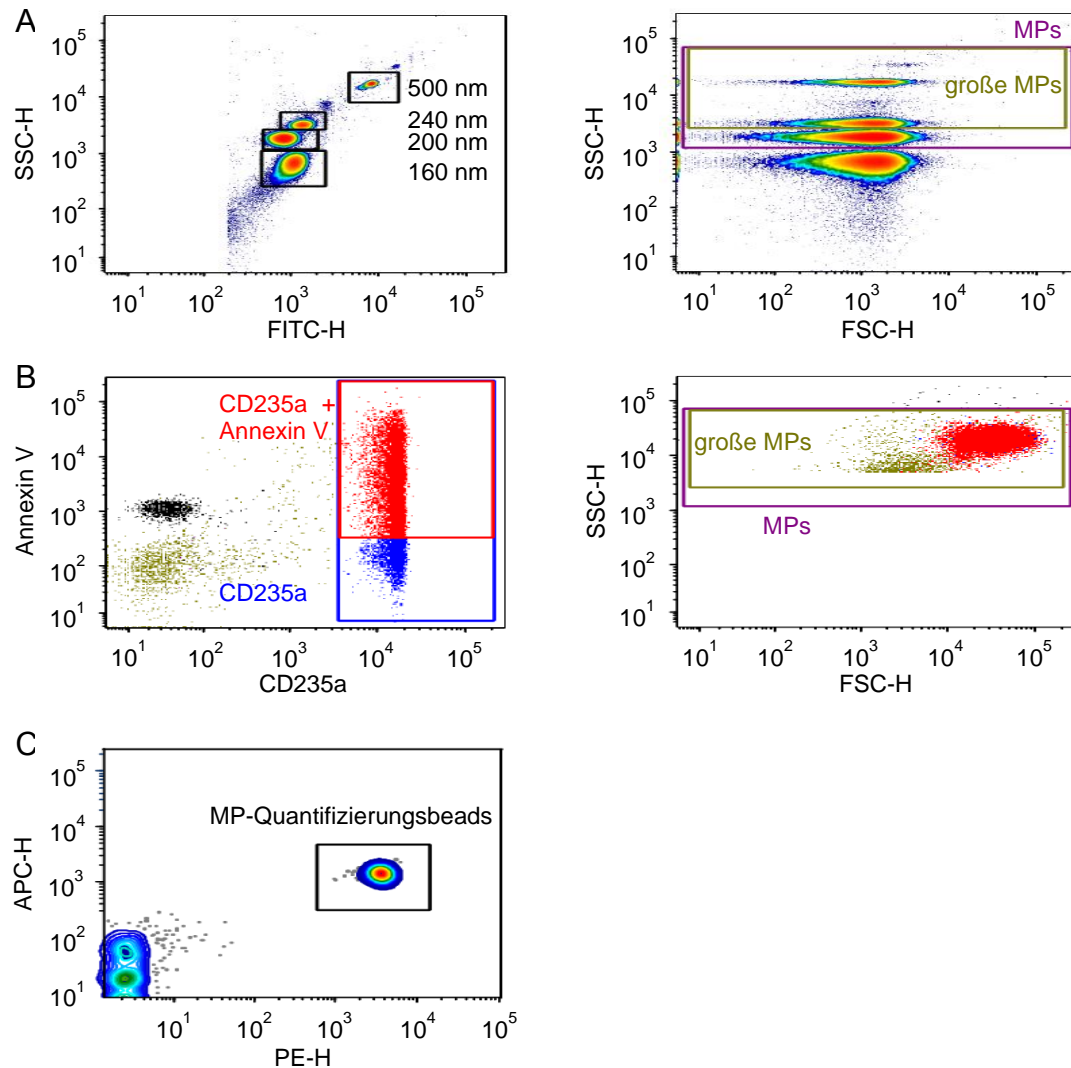


Abbildung 1: Durchflusszytometrie erythrozytärer Mikropartikel

Zur Kalibrierung des BD FACSCanto™ II zur Messung von RMPs wurden Megamix SSC-Kalibrierungsbeads eingesetzt (A). Die RMPs wurden mit Anti-CD235a als erythrozytärer Marker und Annexin V als MP-Marker gefärbt (B). Nur doppelt positive MPs wurde gezählt. Es wurden MP-Quantifizierungsbeads benutzt, um die RMP-Konzentration zu errechnen (C). Abk.: APC = Allophycocyanin, CD = Cluster of Differentiation, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, FSC = Vorwärtsstreuung, MP = Mikropartikel, PE = Phycoerythrin, RMPs = erythrozytäre Mikropartikel, SSC = Seitwärtsstreuung.

Für jede Probe wurden Triplikate benutzt und die RMP-Konzentration gemittelt. Zudem wurden mehrere Kontrollen analysiert, um das Hintergrundrauschen als solches zu erkennen und als mögliches falsch-positives Ereignis bei der RMP-Quantifizierung auszuschließen (30 µl Quantifizierungsbeads + 500 µl Annexin V-Bindungspuffer; 500 µl Annexin V-Bindungspuffer; 30 µl ungefärbte RMP-Probe + 500 µl Annexin V-Bindungspuffer). Die RMPs wurden als Negativkontrolle nach der Messung zudem lysiert. Dafür wurden der Probe 20 µl 20 % Nonident P40 (NP40) hinzugegeben, kurz auf dem Reagenzglasschüttler durchmischt und erneut gemessen. Dies sorgte dafür, dass alle positiven Ereignisse verschwanden.

3.3.2 Nanopartikel-Tracking-Analyse

NTA ist eine Technik, die auf Basis von Lichtstreuung und der brownischen Molekularbewegung die Konzentration und Größe von kleinen Partikeln (~ 10 – 1.000 nm) wie EVs in Suspension ermittelt.¹¹⁹ Die Partikel werden durch einen Laser beleuchtet und die Lichtstreuung wird durch ein Mikroskop aufgenommen. Die NTA-Software verfolgt die brownische Molekularbewegung der einzelnen Partikel und errechnet mithilfe der Stokes-Einstein-Gleichung deren Durchmesser.^{120,121}

Zur Quantifizierung von RMPs mittels NTA wurden diese 1:500 in PBS verdünnt und nach Herstellerangaben an einem NanoSight NS500 analysiert. Dabei wurden für alle Messungen die gleichen Kameraeinstellungen vorgenommen (*camera level 12, camera gain 1,5*). Die Temperatur wurde auf 28° C eingestellt. Es wurden bei jeder RMP-Probe sechs Videos à 30 Sekunden aufgenommen. Mit den NanoSight NTA 3.2 Software-Einstellungen *threshold 28* und *gain 1,5* wurden Konzentration und Größenverteilung der Partikel bestimmt. Die Konzentrationen aus den sechs Aufnahmen wurden jeweils gemittelt.

3.4 Eisenkonzentrationsbestimmung

Um die Eisenkonzentration von RMP-Isolaten zu bestimmen, wurde ein kommerzielles Kit (siehe Tabelle 7) verwendet. Dieses basiert auf einem

Chromogen im Arbeitsreagens, welches mit Fe^{2+} einen blauen Komplex bildet. Fe^{3+} wird zur Bestimmung des Gesamteisens zu Fe^{2+} reduziert. Die Eisenkonzentration ist im Bereich von 27 – 1.000 $\mu\text{g} / \text{dl}$ linear proportional zur Absorption bei 590 nm.¹²²

Die Eisenkonzentrationsbestimmung fand bei Raumtemperatur statt. Bei jeder Messung wurde eine Standardreihe mitgemessen, um eine Standardkurve erstellen und die Konzentration der Proben errechnen zu können. Hierfür wurde der Eisenstandard aus dem Kit mit einer Konzentration von 10 mg / dl zunächst 1:10 mit deionisiertem Wasser (dH_2O) vorverdünnt, so dass die Konzentration des vorverdünnten Eisenstandards bei 1.000 $\mu\text{g} / \text{dl}$ lag. Die Standardreihe wurde für jeden Versuch frisch angesetzt (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Standardreihe zur Eisenkonzentrationsbestimmung

	dH₂O [μl]	Vorverdünnter Eisenstandard [μl]*	Eisenkonzentration [$\mu\text{g} / \text{dl}$]
A	0	50	1.000
B	10	40	800
C	20	30	600
D	30	20	400
E	35	15	300
F	40	10	200
G	45	5	100
H	50	0	0

*Die Zusammensetzung der Standardreihe erfolgte nach Herstellerangaben.¹²²
Abk.: dH₂O = deionisiertes Wasser. *Der vorverdünnte Eisenstandard hatte eine Konzentration von 1.000 $\mu\text{g} / \text{dl}$.*

Das Arbeitsreagens wurde für jede Messung frisch aus 20 Teilen Reagens A, 1 Teil Reagens B und 1 Teil Reagens C angesetzt. Es wurden Duplikate à 25 μl der Proben und Standards auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit 100 μl Arbeitsreagens für 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für jede Probe wurde eine entsprechende Blankprobe verwendet, bei der statt 100 μl

Arbeitsreagens 100 µl Reagens A inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurde am Mikroplattenlesegerät die Absorption bei 590 nm gemessen. Die Mittelwerte der Duplikate wurden gebildet, die Blankproben wurden von den entsprechenden Proben abgezogen und anschließend wurde mithilfe der Standardkurve die Konzentration der Proben errechnet. Es wurde die Eisenkonzentration von acht RMP-Isolaten bestimmt, die via UZ gewonnen wurden (n=8), und von drei RMP-Isolaten, die via SEC gewonnen wurden (n=3).

3.4 Zellkulturassays

Zur Untersuchung der Effekte von RMPs auf verschiedene biologische Eigenschaften der Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 wurden Zellkulturassays durchgeführt. Die in PBS suspendierten und bei -80° C gelagerten RMPs wurden vor der Behandlung immer langsam auf Eis aufgetaut. Die Zellen wurden dann je nach Versuchsaufbau in verschiedenen Konzentrationen unterschiedlich lange mit den RMPs inkubiert. Die Versuche fanden alle auf Mikrotiterplatten verschiedener Größe statt, und es gab immer eine Lösemittelkontrolle, bei der die Zellen der Kontrollgruppe unter den gleichen Bedingungen (gleiche Zellzahl, gleiches Medium, gleiche Mikrotiterplatte und Behandlungszeit) mit dem gleichen Volumen PBS wie die Behandlungsgruppe mit RMPs inkubiert wurden. Das verwendete DMEM-Assaymedium war in allen Assays ab dem Zeitpunkt des Ausplattierens frei von Phenolrot, um eine Interaktion mit nachfolgenden photometrischen bzw. durchflusszytometrischen Messungen zu vermeiden. Zudem enthielt das DMEM-Assaymedium Exosomen-depletiertes FCS (siehe Tabelle 4).

In allen Zellkulturassays wurden RMPs verwendet, die mit der Standardmethode (UZ) isoliert wurden. Beim Viabilitätsassay wurden vergleichend sowohl RMPs aus UZ und SEC verwendet.

3.4.1 Zellviabilität

Zur Untersuchung des Einflusses der RMPs auf die Zellviabilität der HCT-116-Zellen wurde ein Zellkulturassay mit wasserlöslichem Tetrazolium-1 (water-

soluble tetrazolium-1, WST-1) durchgeführt. Dies ist ein leicht rötlicher Farbstoff, der durch ein intaktes mitochondriales Succinat-Tetrazolium Dehydrogenase System in das dunkelrote Formazan umgewandelt wird. Dieses wiederum kann durch die Messung der Absorption bei 420 – 480 nm quantifiziert werden. Die Absorption korreliert mit der Menge vitaler Zellen in der Probe. Das WST-1-Assay bietet somit eine Möglichkeit, die Zellproliferation durch die Messung der Zellviabilität zu untersuchen.¹²³

Die HCT-116-Zellen wurden für diesen Versuch für jede Behandlungs- und die Kontrollgruppe in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen / ml in Triplikaten in 100 μ l Assaymedium auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium erneuert und die Zellen wurden dabei zusätzlich mit ihren RMP-Behandlungen oder PBS beimpft. Es wurden fünf RMP-Konzentrationen verwendet ($0,5 \times 10^6$ RMPs / ml, 1×10^6 RMPs / ml, 5×10^6 RMPs / ml, 10×10^6 RMPs / ml, 50×10^6 RMPs / ml). Zudem wurde bei jedem Versuch eine Blank-Probe ohne Zellen mit 100 μ l Assaymedium beimpft. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37° C im Brutschrank wurde die Viabilität bestimmt. Dafür wurden 10 μ l WST-1 Reagens pro Well hinzugefügt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37° C wurde am Mikroplattenlesegerät die Absorption bei 450 nm und bei der Referenzwellenlänge 620 nm gemessen. Die Absorption der Referenzwellenlänge wurde subtrahiert und die Mittelwerte der Triplikate wurden bestimmt. Anschließend wurde bei allen Mittelwerten der Mittelwert der Blank-Probe subtrahiert. Es wurde anschließend auf die Lösemittelkontrolle PBS normiert, so dass diese als 100 % definiert und die Behandlungsgruppen in Relation dazu angegeben wurden.

Es wurden fünf voneinander unabhängige Experimente mit RMPs durchgeführt, die per UZ isoliert wurden (n=5). Zudem wurden drei unabhängige Experimente mit RMPs durchgeführt, die per SEC isoliert wurden (n=3). Für die Experimente mit RMPs, die via SEC isoliert wurden, wurden die Fraktionen 2 und 3 1:1 gepoolt.

Zur statistischen Analyse wurde ein Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple Comparisons-Test durchgeführt. Dabei wurde jede RMP-Behandlungsgruppe mit der Lösemittelkontrolle verglichen.

3.4.2 Migration und Invasion

Zur Untersuchung der Effekte von RMPs auf Migration und Invasion der HCT-116-Zellen wurde ein Zellkulturassay mit speziellen Einsätze für Mikrotiterplatten verwendet, die am Boden aus einer 10 µm dicken Membran mit 8 µm großen Poren bestehen. Zellen können diese Membran bei Vorliegen eines chemotaktischen Lockstoffs, für den ein Gradient von dem Einsatz in das darunter liegende Well vorliegen muss, durchwandern. Als Migrationsreiz wird häufig Serum wie FCS genutzt. Solche Systeme bezeichnet man nach ihrem Erstbeschreiber als Boyden-Kammern.¹²⁴

Für das Invasionsassay wurden vor der Ausplattierung der Zellen die Einsätze mit extrazellulärer Matrix beschichtet, welche ein Migrationshindernis im Sinne einer Basalmembran darstellte, das nur von invasiv wachsenden Zellen überschritten werden konnte. Dafür wurde Matrigel® Basalmembran-Matrix mit einem Beschichtungspuffer auf eine Konzentration von 300 µg / ml verdünnt. 100 µl der verdünnten Matrix wurden auf die Einsätze aufgetragen und 2 Stunden bei 37° C im Brutschrank inkubiert, wodurch sich eine dünne Schicht der Matrix oberhalb der Membran absetzte. Die überstehende Flüssigkeit wurde entfernt.

Die HCT-116-Zellen wurden vor dem Ausplattieren zunächst für 24 Stunden in Zellkulturflaschen „gehungert“, also in DMEM ohne Serum kultiviert. Anschließend wurden 1×10^5 Zellen / Einsatz in 100 µl serumfreiem Assaymedium ausplattiert. In den Wells unterhalb der Membran waren 600 µl Assaymedium mit 0 % (kein Serumgradient), 10 % oder 20 % Exosomen-depletiertem FCS. Die Zellen wurden bei jeder Serumbedingung mit 5×10^6 RMPs / ml oder PBS des gleichen Volumens behandelt. Zudem wurde eine weitere Bedingung getestet, bei der 10 % FCS im Well noch 5×10^6 RMPs / ml hinzugefügt wurden, während im Einsatz eine PBS-Behandlung eingesetzt wurde. Nur beim Invasionsassay wurde außerdem noch eine Bedingung mit 20

% FCS im Well plus 5×10^6 RMPs / ml getestet. Der schematische Versuchsaufbau des Migrations- und Invasionsassays ist in Abbildung 2 dargestellt.

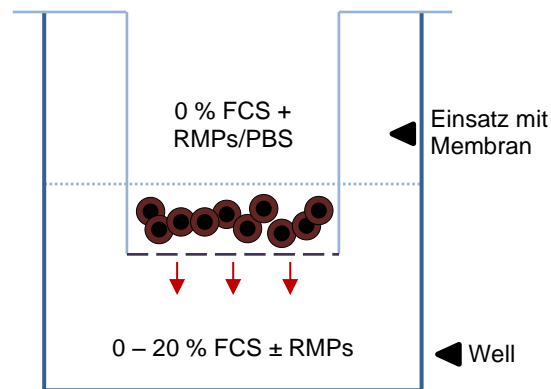


Abbildung 2: Aufbau des Migrations- und Invasionsassays

Dargestellt ist der schematische Aufbau des Migrations- und Invasionsassays. Die HCT-116-Zellen wurden in einem Einsatz für Mikrotiterplatten ausplattiert, der am Boden aus einer Membran bestand. Über diese konnten die Zellen einem FCS-Gradienten folgend in das darunter liegende Well migrieren. Die Zellen wurden bei verschiedenen FCS-Gradienten mit 5×10^6 RMPs / ml oder der Lösemittelkontrolle (PBS) behandelt. Zudem wurden Bedingungen getestet, bei denen dem FCS im Well 5×10^6 RMPs / ml hinzugefügt wurden. Abk.: FCS = fetales Kälberserum, PBS = phosphatgepufferte Salzlösung, RMPs = erythrozytäre Mikropartikel.

Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen, die zur Unterseite der Membran gewandert waren, gleichzeitig davon abgelöst und zur Quantifizierung mit Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM) gefärbt.

Calcein-AM ist ein Acetoxy-methylester des grünlichen Fluoreszenzfarbstoff Calcein. Calcein-AM kann die Zellmembran lebender Zellen passieren und wird in deren Innerem durch Esterasen in Calcein umgewandelt. Ohne die Acetoxy-methyl-Gruppe kann es Calciumionen komplexieren, was zur grünen Fluoreszenz führt, weshalb Calcein-AM als Marker für viable Zellen eingesetzt wird.¹²⁵

Zunächst wurde das Medium aus den Einsätzen und Wells abgesaugt und diese jeweils zwei Mal mit PBS gewaschen. Calcein-AM wurde in einer Konzentration von 5 mg / ml in Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgelöst. Von dieser Calcein-AM-Lösung wurden dann 1,2 µl mit 1 ml Zelldissoziationslösung vermischt. Von der entstehenden Färbe- und Dissoziationslösung wurden nun 350 µl in die Wells gegeben, so dass die Unterseite der Membran der Einsätze hierzu Kontakt hatte. Luftblasen zwischen Membran und Lösung wurden durch vorsichtiges Klopfen entfernt. Die Mikrotiterplatten wurden für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Dann wurde leicht auf die Seiten der Platten geklopft und für weitere 30 Minuten inkubiert. Nach Entfernen der Einsätze wurden dann von der Suspension in den Wells je Duplikate à 100 µl in eine schwarze 96-Well-Mikrotiterplatte überführt. Zudem wurde eine Blankprobe aus 100 µl zellfreier Färbe- und Dissoziationslösung eingefügt. Die Intensität der Fluoreszenzsignale wurde im Mikroplattenlesegerät bei 485 nm Exzitation und 520 nm Emission gemessen. Nach Bildung der Mittelwerte der Intensitäten wurde die Intensität der Blankprobe abgezogen.

Es wurden je fünf unabhängige Experimente für Migration und Invasion durchgeführt (n=5). Zur statistischen Analyse wurde zunächst ein Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt, um auf Normalverteilung zu prüfen. Im Folgenden wurde für jede getestete Bedingung entweder ein ungepaarter T-Test gemacht, wenn eine Normalverteilung vorlag, oder ein Mann-Whitney-Test, wenn keine Normalverteilung vorlag. Es wurde jede RMP-Behandlungsgruppe mit der korrespondierenden Lösemittelkontrolle verglichen.

3.4.3 Langzeitproliferation

Um Effekte der RMPs auf die Proliferation der HCT-116-Zellen über längere Zeit zu untersuchen, wurde ein Zellkulturassay auf Basis einer Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE)-Färbung und Durchflusszytometrie verwendet. CFSE bindet im Zellinneren kovalent an Aminogruppen von Proteinen und fluoresziert nach Einwirkung zellulärer Esterasen. Bei jeder Zellteilung entstehen zwei beinahe identische Tochterzellen, und so wird auch CFSE in etwa gleich auf die entstehenden Tochterzellen verteilt. Untersucht man die Zellen per

Durchflusszytometrie, sinkt also die Intensität des Fluoreszenzsignals ebenso, wie sich die CFSE-Konzentration mit jeder Zellteilung halbiert. Bei einer erfolgreichen Färbung entsteht ein starkes Fluoreszenzsignal mit individuellem Peak der Intensität, das sich nach bis zu zehn Generationen noch von der intrinsischen Zellfluoreszenz abhebt, weshalb die CFSE-Färbung für die Untersuchung der Langzeitproliferation von Zellen *in vitro* und *in vivo* geeignet ist.¹²⁶

Alle Arbeitsschritte mit CFSE oder CFSE-gefärbten Zellen wurden unter Lichtschutz durchgeführt. Am Tag null wurde ein Vorrat von 2×10^6 HCT-116-Zellen mit $5 \mu\text{M}$ CFSE in 2 ml PBS gefärbt (20 Minuten bei Raumtemperatur). Die gefärbten Zellen wurden dann per Zentrifugation sedimentiert ($500 \times g$ für 5 Minuten bei Raumtemperatur), der Überstand verworfen und die Zellen gewaschen (Resuspension in 2 ml PBS, $500 \times g$ für 5 Minuten bei Raumtemperatur). Die gefärbten und gewaschenen Zellen wurden dann auf einer 24-Well-Mikrotiterplatte in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen / ml in 1 ml Assaymedium ausplattiert. Es wurden vier Wells benutzt, je zwei für Tag zwei und Tag vier. Je eines der Wells von Tag zwei und vier wurde mit 5×10^6 RMPs / ml oder mit PBS behandelt.

Es wurden 5×10^5 von den gefärbten Zellen und 5×10^5 ungefärbte Zellen zur späteren Analyse separat fixiert. Hierfür wurden gewaschene, sedimentierte Zellen in $300 \mu\text{l}$ 2 % Formaldehyd in PBS (v/v) resuspendiert, in Durchflusszytometrie-Röhrchen überführt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit PBS gewaschen, in PBS resuspendiert und bis zur durchflusszytometrischen Messung bei 4°C gelagert. Die Röhrchen wurden mit Parafilm abgedichtet.

Die ausplattierten und behandelten Zellen wurden bei 37°C unter Lichtschutz im Brutschrank inkubiert. Am Tag zwei und Tag vier wurden die Zellen aus den entsprechenden Wells abgelöst. Zur Ablösung wurden das Medium aspiriert und $0,5 \text{ ml}$ Accutase pro Well auf die Zellen gegeben. Nach etwa 5-minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen durch Klopfen auf die Seite der Mikrotiterplatte unter mikroskopischer Kontrolle abgelöst. Anschließend wurden sie in Durchflusszytometrie-Röhrchen überführt, mit 2 ml PBS gewaschen und

fixiert. Am Tag vier erfolgte nach Fixierung der letzten Zellen die durchflusszytometrische Analyse aller fixierten Proben. Das Gating wurde basierend auf SSC-A und FSC-A durchgeführt (siehe Abbildung 3).

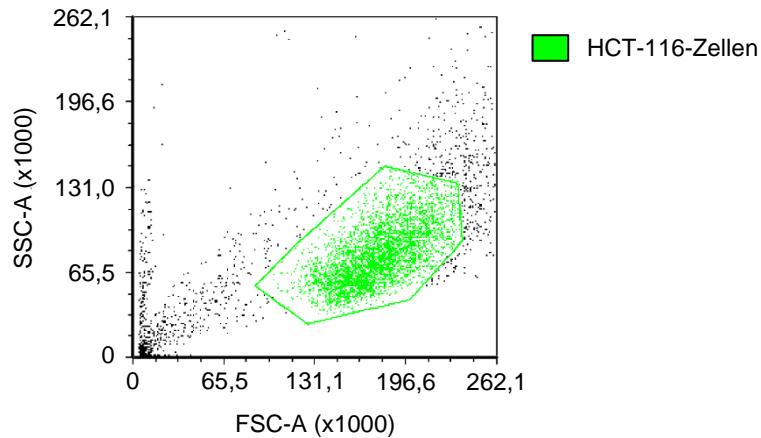


Abbildung 3: Gating von HCT-116-Zellen im Langzeitproliferationsassay

Dargestellt ist der Dot-Blot einer repräsentativen durchflusszytometrischen Messung von HCT-116-Zellen und deren Gating im Langzeitproliferationsassay basierend auf SSC-A- und FSC-A-Signalen. Abk.: FSC = Vorwärtsstreuung, SSC = Seitwärtsstreuung.

Die Intensität der CFSE-Färbung wurde im Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC)-Kanal gemessen. Die an Tag null fixierten ungefärbten Zellen wurden als Negativkontrolle analysiert. Eine Herausforderung bei Zellfärbungen mit Mitteln wie CFSE ist, eine möglichst homogene Färbung aller Zellen zu erreichen. Dies wird manchmal erschwert, wenn Zellen beim Färbeprozess an der Wand des Röhrchens oberhalb des Flüssigkeitsspiegels der Färbelösung hängen, und damit zwar keinen Kontakt zum Farbstoff haben, aber später wieder in den Vorrat für gefärbte Zellen gelangen.¹²⁷ Diese Zellen können dann als nicht oder schwach gefärbte Ereignisse in der Durchflusszytometrie-Messung auftauchen.

In der durchflusszytometrischen Analyse wurde ein Marker auf der Skala der CFSE-Intensität benutzt, der nur die gefärbten Zellen erfasste. Dafür wurde die Negativkontrolle als Referenz benutzt, da bei dieser das Signal im CFSE-Kanal der basalen, intrinsischen Fluoreszenz der Zellen entspricht. So wurden Zellen, bei denen die Färbung nicht erfolgreich war, aus der Analyse ausgeschlossen (siehe Abbildung 4).

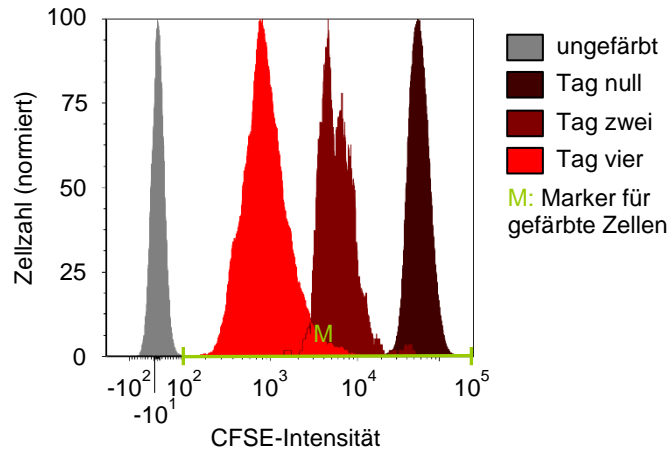


Abbildung 4: Fluoreszenzintensitäten im Langzeitproliferationsassay

Dargestellt ist der Verlauf der CFSE-Fluoreszenzintensität von HCT-116-Zellen im Langzeitproliferationsassay als Überlagerung von vier Einzelmessungen (Tag null bis vier in Rottönen von rechts nach links sowie in grau ungefärbte Zellen als Negativkontrolle) eines repräsentativen Versuchs. Mit jeder Zellteilung sinkt die Intensität der Färbung, da die CFSE-Konzentration in der individuellen Zelle halbiert wird. Der Marker (grün) zur Auswertung der medianen Intensitäten wurde so platziert, dass ungefärbte Zellen ausgeschlossen werden. Die Zellzahlen sind hier der Übersicht halber jeweils auf ihr eigenes Maximum normiert. Abk.: CFSE = Carboxyfluoresceinsuccinimidylester.

Die mediane Fluoreszenzintensität der markierten (gefärbten) HCT-116-Zellen wurde ermittelt. Zur statistischen Analyse wurde zunächst ein Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt, um auf Normalverteilung zu prüfen. Für Tag zwei lag keine Normalverteilung vor, und es folgte daher ein Mann-Whitney-Test. Für Tag vier lag eine Normalverteilung vor, weshalb ein ungepaarter T-Test folgte. Die RMP-Behandlung an Tag zwei und Tag vier wurde mit der korrespondierenden Lösemittelkontrolle verglichen. Es wurden fünf unabhängige Experimente durchgeführt (n=5).

3.4.4 Proteinbiochemische Methoden

Um die Effekte von RMPs auf die Proteinsynthese von HCT-116-Zellen zu untersuchen, wurde der Proteingehalt von mit RMPs behandelten Zellen mit dem der Lösemittelkontrolle verglichen.

Um entsprechende Vergleichsgruppen zu generieren wurden $7,5 \times 10^5$ Zellen / Well in 2 ml Assaymedium auf einer 6-Well-Mikrotiterplatte ausplattiert. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C wurde das Medium erneuert und eine Behandlung mit zwei RMP-Konzentrationen (5×10^6 RMPs / ml oder 10×10^6 RMPs / ml) oder mit PBS des gleichen Volumens durchgeführt. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation bei 37°C wurden die Zellen mit Zellschabern von dem Boden der Wells abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in 1,5 ml fassende Reaktionsgefäße überführt und mit $500 \times g$ für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden in 1 ml PBS resuspendiert und gewaschen (Zentrifugation mit $500 \times g$ für 5 Minuten bei Raumtemperatur). Die Zellpellets wurden anschließend lysiert.

3.4.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Lyse der Zellen wurde Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS)-Lysepuffer (siehe Tabelle 8) eingesetzt. Zu jedem Zellpellet wurden 50 μl des Lysepuffers gegeben und das Zelllysate dann mittels Ultraschall homogenisiert. Die Lyse fand auf Eis statt.

3.4.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Bevor weitere Proteinanalytik erfolgen konnte, musste die Proteinkonzentration der Zelllysate bestimmt werden. Dies erfolgte durch ein Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid*, BCA)-basiertes Assay mit einem kommerziellen Kit (siehe Tabelle 7). Die Methode basiert auf einer Kombination aus der Biuret-Reaktion (Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine im alkalischen Milieu) und der photometrischen Messung von Cu^{1+} durch BCA. Zwei Moleküle BCA chelatieren ein Kupferion, was zu einem Komplex mit violetter Farbe führt, dessen Absorption bei 562 nm bei steigenden Proteinkonzentrationen zwischen 20 – 2.000 $\mu\text{g} / \text{ml}$ nahezu linear ist.¹²⁸

Es wurde bei jeder Konzentrationsbestimmung eine Standardreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA)-Standard bekannter Konzentration mitgemessen, um eine

Eichkurve zu erstellen, anhand derer die Proteinkonzentration der Proben errechnet werden konnte. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA angesetzt (siehe Tabelle 13). Das verwendete Standard-BSA hatte eine Konzentration von 2 µg / µl. Da im Folgenden die Zelllysate mit SDS-Lysepuffer verdünnt wurden, wurde auch das BSA für die Standardkurve hiermit verdünnt. Die Standardreihe wurde nach Herstellerangaben bei Raumtemperatur gelagert und mehrmals verwendet.

Tabelle 13: Standardreihe zur Proteinkonzentrationsbestimmung

	SDS-Lysepuffer [µl]	BSA [µl]	BSA-Konzentration [µg / µl]
A	0	300*	2
B	125	375*	1,5
C	325	325*	1
D	175	175 aus B	0,75
E	325	325 aus C	0,5
F	325	325 aus E	0,25
G	325	325 aus F	0,125
H	400	100 aus G	0,025
I	400	0	0

Die Zusammensetzung der Standardreihe erfolgte nach Herstellerangaben.¹²⁸

*Abk.: BSA = bovines Serumalbumin, SDS = Natriumdodecylsulfat. *Vom Standard-BSA mit einer Konzentration von 2 µg / µl.*

Auf Basis von Erfahrungswerten und Vorversuchen wurden die Zelllysate mit SDS-Lysepuffer verdünnt, bevor ihre Konzentration bestimmt wurde. Für das BCA-Assay der HCT-116-Zellen wurden je 10 µl 1:20 verdünnter Zelllysate und 10 µl der neun Albuminstandards in Duplikaten auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Es wurden pro Well 200 µl des Arbeitsreagens des Kits hinzugefügt, welches aus 50 Teilen Reagens A und 1 Teil Reagens B bestand und für jedes Experiment frisch angesetzt wurde. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37° C wurde die Absorption bei 562 nm im Mikroplattenlesegerät gemessen. Mithilfe der Eichkurve wurde aus den Mittelwerten der Duplikate die Proteinkonzentration errechnet.

Nach derselben Methode wurde auch die Proteinkonzentration von drei RMP-Isolaten bestimmt, die via SEC gewonnen wurden (n=3). Die RMPs wurden im Unterschied zu den HCT-116-Zellen jedoch nicht pelletiert, mit SDS-Lysepuffer versetzt und mittels Ultraschall-Homogenisator lysiert, sondern lediglich mit SDS-Lysepuffer verdünnt. Basierend auf vorherigen Experimenten und Erfahrungswerten wurde eine 1:20-Verdünnung aller Fraktionen mit SDS-Lysepuffer vorgenommen.

3.4.4.3 SDS-PAGE

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine aus einem Proteingemisch in einem Gel nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt, um anschließend zum Beispiel per Western Blotting genauer charakterisiert werden zu können. Erstmals beschrieben wurde die Methode von Lämmli 1970.¹²⁹ Durch den Einsatz von SDS und eines Reduktionsmittels wie β -Mercaptoethanol können die Proteine vollständig entfaltet werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine hängt daher praktisch nur noch von ihrer Molekülmasse ab. Kleinere Proteine laufen dabei schneller durchs Gel. Im Gel befinden sich Poren, deren Größe abhängig von der Polyacrylamid-Konzentration ist. Je höher die Konzentration, desto kleiner sind die Poren und desto langsamer laufen die Proteine. So kann die Konzentration auf die Größe der zu untersuchenden Proteine angepasst werden. Alternativ zu klassischen Gelen mit fester Konzentration sind Gradientengele, die zur simultanen Untersuchung von Proteinen eines größeren Spektrums geeignet sind.

Für die SDS-PAGE wurden vorgefertigte Gradientengele (4 – 20 %) mit zehn Taschen verwendet, in die je ein Volumen von 30 μ l gegeben wurde. Es wurden 50 μ g Protein pro Geltasche aufgetragen. 50 μ g lysierter Erythrozyten aus EKs wurden als Negativkontrolle verwendet. Die Erythrozyten wurden ebenfalls mit SDS-Lysepuffer nach der zuvor beschriebenen Methode lysiert (siehe 3.4.4.1 Herstellung von Zelllysaten).

Die Verdünnung der Proben erfolgte auf Basis der ermittelten Proteinkonzentrationen (siehe 3.4.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung) mit SDS-Lysepuffer. Vor dem Auftragen der Proben wurden vier Teile der Proben mit einem Teil 5 x Lämmli-Puffer (siehe Tabelle 8) gemischt und für 5 Minuten bei 95° C aufgekocht. Nachdem die Gele in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt wurden, wurde die Kammern mit Laufpuffer aufgefüllt (siehe Tabelle 8), so dass die Gele vollständig bedeckt waren. Der Kamm, der die Geltaschen bedeckte, wurde entfernt. Die Taschen wurden durch Pipettieren mit Laufpuffer ausgespült und anschließend mit den Proben gefüllt. In die erste und letzte Tasche wurden je 3 µl Protein-Standard als Marker der Molekülmasse verwendet. Zunächst wurden die Proben bei 90 V für 10 Minuten gesammelt und anschließend bei 120 V für 90 Minuten getrennt, so dass die Lauffront gerade noch am unteren Ende des Gels war, ohne herauszulaufen. Die Kammer wurde dabei durch ein Kühlpack gekühlt.

3.4.4.4 Western Blots

Durch Western Blotting können durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine mithilfe eines senkrecht zum Gel stehenden elektrischen Feldes auf eine Membran transferiert werden. Towbin et al. beschrieben 1979 erstmals die heute vorzugsweise verwendete Variante des Western Blottings mit Übertragung auf Nitrozellulosemembranen.¹³⁰ Auf der Membran sind die Proteine in ihrer Auftrennung wie im Gel fixiert und können anschließend mit spezifischen Antikörpern markiert werden. Dafür muss die Membran zunächst mit Proteinen, die von den Antikörpern nicht erkannt werden, geblockt werden. Dafür wird zum Beispiel BSA oder Milchpulver verwendet. Nach Inkubation mit einem sogenannten Primärantikörper gegen das zu untersuchende Protein wird die Membran gewaschen, um unspezifisch gebundene Primärantikörper zu entfernen. Anschließend wird die Membran mit einem Sekundärantikörper inkubiert. Dieser bindet den Primärantikörper und vermittelt eine Farbreaktion, zum Beispiel durch ein gekoppeltes Enzym. Durch Messung der Membran an einem Bildgebungssystem kann festgestellt werden, ob und wie stark die Farbreaktion verschiedener Banden ausfällt. Somit sind qualitative und semi-quantitative Aussagen über die Proteinkonzentrationen möglich.

Das per SDS-PAGE gewonnene Gel wurde aus der Apparatur ausgebaut und die Lauffront wurde abgetrennt. Nun wurde ein „Blotting-Sandwich“ nach Herstellerangaben zusammengesetzt.¹³¹ Auf das Gel wurde eine Nitrozellulosemembran gleicher Größe aufgelegt. Es wurden je 3 Lagen Filterpapier unter das Gel und über die Membran gelegt. Je ein Schwamm wurden unter und über die äußeren Filterpapiere gelegt und das entstehende Blotting-Sandwich in eine Kassette eingelegt, welche verschlossen in die Blotting-Apparatur eingefügt wurde. Da die Blotting-Apparatur Platz für zwei Kassetten hat, wurden immer zwei solcher Kassetten verwendet. Wenn nur ein Blot durchgeführt wurde, wurde eine leere, zweite Kassette als Gegenstück benutzt. Die Kammer wurde mit Transferpuffer (siehe Tabelle 8) aufgefüllt, so dass die Kassetten vollständig bedeckt waren. Das Western Blotting wurde bei 90 V für 90 Minuten durchgeführt. Es wurde ein Kühlpack zur Kühlung verwendet.

Die Apparatur wurde auseinandergebaut und die Nitrozellulosemembran wurde in ein lichtgeschütztes 50 ml Röhrchen überführt. Außer zum Messen am Bildgebungsgerät verblieben die Membranen immer in den Röhrchen und wurden dort mit Antikörpern und Puffern inkubiert und gewaschen. Zum Blocken wurden 10 ml *Blocking Buffer* dazu gegeben und das Röhrchen eine Stunde bei Raumtemperatur auf der Schüttelplatte durchmischt. Nach dem Blocken konnten die Antikörper verwendet werden.

Es wurden nacheinander drei verschiedene Primärantikörper mit jeweiligen Sekundärantikörpern verwendet. Zudem wurde zuletzt β -Aktin als Ladekontrolle benutzt, um einen eventuellen systematischen Fehler bei der Auswertung zu auszugleichen, der auf der unregelmäßigen Beladung der Membran basieren würde. β -Aktin ist in allen Zellen gleich ausgeprägt und daher als Ladekontrolle geeignet.

Die Primärantikörper wurden alle bei einem Volumen von 10 ml bei 4° C über Nacht inkubiert. Zwischen Primär- und Sekundärantikörper wurde vier Mal mit 10 ml PBS mit 0,1 % Tween-20 (PBS-T) gewaschen. Die Sekundärantikörper

wurden bei einem Volumen von 10 ml bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Nach Inkubation der Sekundärantikörper wurde die Membran dreimal mit 10 ml PBS-T und einmal mit 10 ml PBS gewaschen (5 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Rollschüttler). Eine Übersicht der vier verwendeten Primärantikörper, ihren korrespondierenden Sekundärantikörpern und den jeweils benutzten Verdünnungen findet sich in Tabelle 9.

Nach der Messung am Bildgebungssystem und vor der Inkubation mit dem nächsten Primärantikörper wurden die Membranen immer „gestrippt“, also von allen Antikörpern befreit. Zum Strippen der Membranen wurden 10 ml *Stripping Buffer* auf die Membranen gegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur auf den Rollschüttler gelegt. Es folgten drei Waschschrte mit 10 ml PBS-T und ein abschließender Waschschrte mit 10 ml PBS auf dem Rollschüttler (je 5 Minuten bei Raumtemperatur).

Die gemessenen Intensitäten wurden zunächst zur Ladekontrolle normiert. Die RMP-Behandlungsgruppen wurden dann zur korrespondierenden Lösemittelkontrolle normiert und ein Kruskal-Wallis-Test wurde durchgeführt. Die RMP-Behandlung beider Konzentrationen wurde mit der Lösemittelkontrolle verglichen. Es wurden vier unabhängige Experimente (n=4) durchgeführt.

Zur Lagerung bei 4° C wurden die lichtgeschützten Röhrchen vollständig mit PBS aufgefüllt, um ein Austrocknen der Membran zu verhindern.

4 Ergebnisse

Wenn Ergebnisse mit einem Streuungsmaß angegeben werden, ist hiermit immer die Standardabweichung gemeint.

4.1 Isolierung und Quantifizierung erythrozytärer Mikropartikel

4.1.1 Isolierung via Größenausschlusschromatographie

Als primäre Isolierungsmethode für RMPs wurde die UZ gewählt, da sie die am häufigsten verwendete und am besten definierte Methode für diese EVs war.⁴² Es gibt aber Hinweise, dass die hohen Scherkräfte bei der UZ die Eigenschaften der RMPs verändern.⁸⁴ Zudem wurde für EVs anderer zellulärer Herkunft bereits gezeigt, dass mit der SEC eine effektive Isolationsmethode vorhanden ist, die möglicherweise die biophysischen Eigenschaften und biologischen Aktivitäten der EVs besser erhält.^{85,86} Daher war es ein Ziel dieser Arbeit, die SEC als Alternative zur UZ auf die RMP-Isolierung anzupassen. Nicht dargestellte Vorversuche führten zu der beschriebenen Methode, bei der die RMPs in Fraktion 2 und 3 konzentriert werden (siehe 3.2.2 Größenausschlusschromatographie). Es wurden bei drei SEC-Isolaten (Fraktion 1-13) jeweils der Eisen- und Proteingehalt zusätzlich zur RMP-Konzentration (durchflusszytometrisch) bestimmt, um einerseits zu überprüfen, wie effektiv die Methode in der Auftrennung der RMPs von kontaminierendem Protein ist. Die Eisenkonzentration wurde zudem bestimmt, da dieses selbst einen komplexen Einfluss auf das Wachstum maligner Zellen haben kann.¹¹² Eine vergleichende Darstellung ist in Abbildung 5 zu sehen.

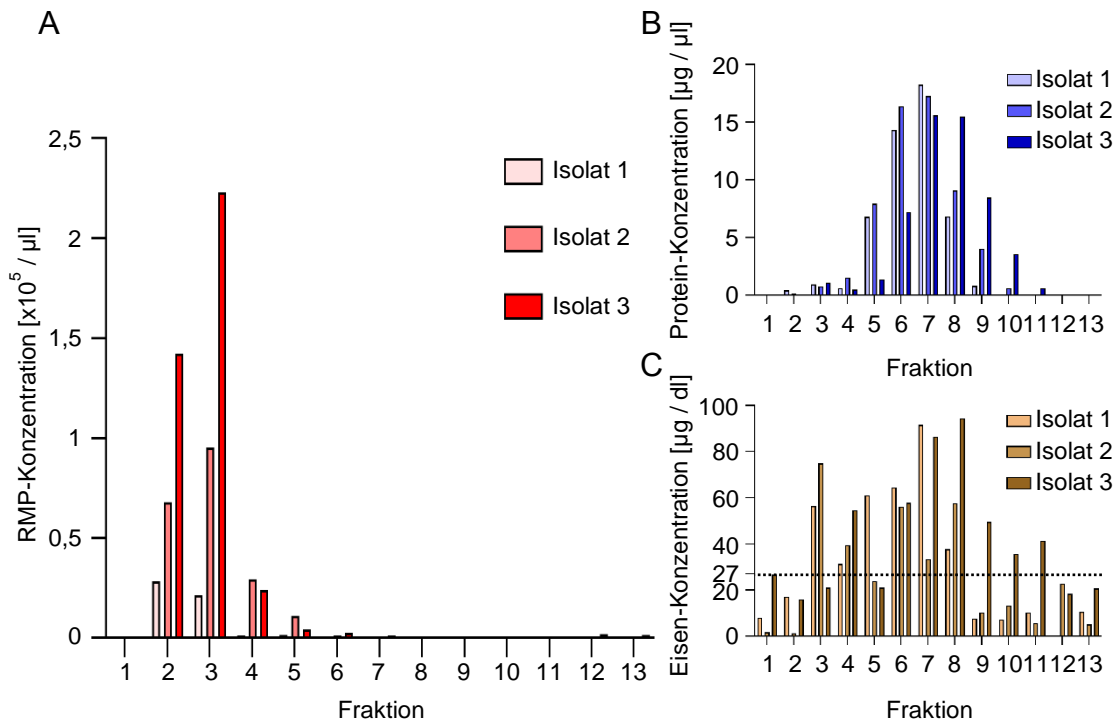


Abbildung 5: Konzentration erythrozytärer Mikropartikel, Protein und Eisen in Größenausschlusschromatographie-Isolaten

Dargestellt ist die Konzentration von RMPs (A), Protein (B) und Eisen (C) in drei via SEC aufgetrennten Isolaten. Zunächst wurde durch mehrere Zentrifugationsschritte der Überstand aus Erythrozytenkonzentraten gewonnen und dann auf eine Chromatographiesäule mit Sepharose überführt. Das Eluat der SEC wurde in 13 Fraktionen aufgefangen, von denen in Fraktion 2 und 3 die RMPs konzentriert werden sollten. Hinweis zu (C): Der Hersteller des Kits zur Eisenbestimmung gibt einen Arbeitsbereich von 27 – 1.000 $\mu\text{g} / \text{dl}$ an, weshalb die Werte unterhalb von 27 $\mu\text{g} / \text{dl}$ mit Vorsicht zu interpretieren sind (gestrichelte Linie). Abk.: RMPs = erythrozytäre Mikropartikel, SEC = Größenausschlusschromatographie.

4.1.2 Vergleich der Isolierungsmethoden

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit RMPs aus 31 EKs (n=31) via UZ isoliert, und RMPs aus fünf EKs (n=5) wurden via SEC isoliert. Die Konzentration der RMPs zeigte eine hohe Variabilität zwischen den verschiedenen EKs, was mit bisherigen Ergebnissen der Forschung übereinstimmt.⁴² Messungen mittels

Durchflusszytometrie der via UZ gewonnen RMP-Isolate ergaben eine mittlere Konzentration von $1,3 \times 10^5 \pm 2,0 \times 10^5$ RMPs / μl . Die niedrigste Konzentration war $5,3 \times 10^2$ RMPs / μl , die höchste Konzentration war $7,8 \times 10^5$ RMPs / μl .

Die mittlere Konzentration der RMP-Isolate, die via SEC gewonnen wurden, war $8,7 \times 10^4 \pm 5,2 \times 10^4$ RMPs / μl (gepoolte Konzentration aus Fraktion 2 und 3). Die RMP-Konzentration war in via UZ gewonnen Isolaten also höher. Durch die zwischen den Isolierungsmethoden unterschiedliche Aliquotierung war der Verdünnungsfaktor bei der SEC jedoch auch etwas höher. So lagen bei der UZ 1,6 ml des Isolats vor (acht Aliquots à 200 μl), bei der SEC 2 ml (Fraktion 2 und 3 à 1 ml).

Die mittlere Eisenkonzentration von acht gemessenen RMP-Isolaten, die via UZ gewonnen wurden, lag bei $18,5 \pm 13,4$ μg / dl (n=8). Die mittlere Eisenkonzentration der drei via SEC gewonnenen RMP-Isolate, die auch in Abbildung 5 dargestellt sind, lag bei $31,3 \pm 10,9$ μg / dl (n=3).

4.1.3 Vergleich der Quantifizierungsmethoden

Die primäre Methode zur Quantifizierung von RMPs war die Durchflusszytometrie mit Einsatz von Fluoreszenzfärbungen, Kalibrierungs- und Quantifizierungsbeads, da sie die am häufigsten verwendete Methode war.⁸⁷ Die Methode hat jedoch ernste Limitationen im Bereich kleiner MPs (untere Auflösungsgrenze 200 – 300 nm),^{39,87} welche auch bei den RMPs zu erwarten waren (Durchmesser 100 – 300 nm).^{38,41} Eine alternative Methode, mit der neben der Konzentration auch eine hochauflösende Größenverteilung von EVs ermittelt werden kann, stellt die NTA dar. Um die primäre Quantifizierungsmethode zu validieren, wurden vier Proben (n=4) daher sowohl per Durchflusszytometrie als auch per NTA gemessen. Da bei der NTA keine spezifischen Antikörper verwendet wurden, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die gemessenen Partikel EVs erythrozytärer oder anderer zellulärer Herkunft waren, oder ob es andere Partikel ähnlicher Größe, wie zum Beispiel Lipoproteine waren.⁴³ Ein Überblick über die Größenverteilung der Partikel der vier NTA-Messungen ist in Abbildung 6 dargestellt.

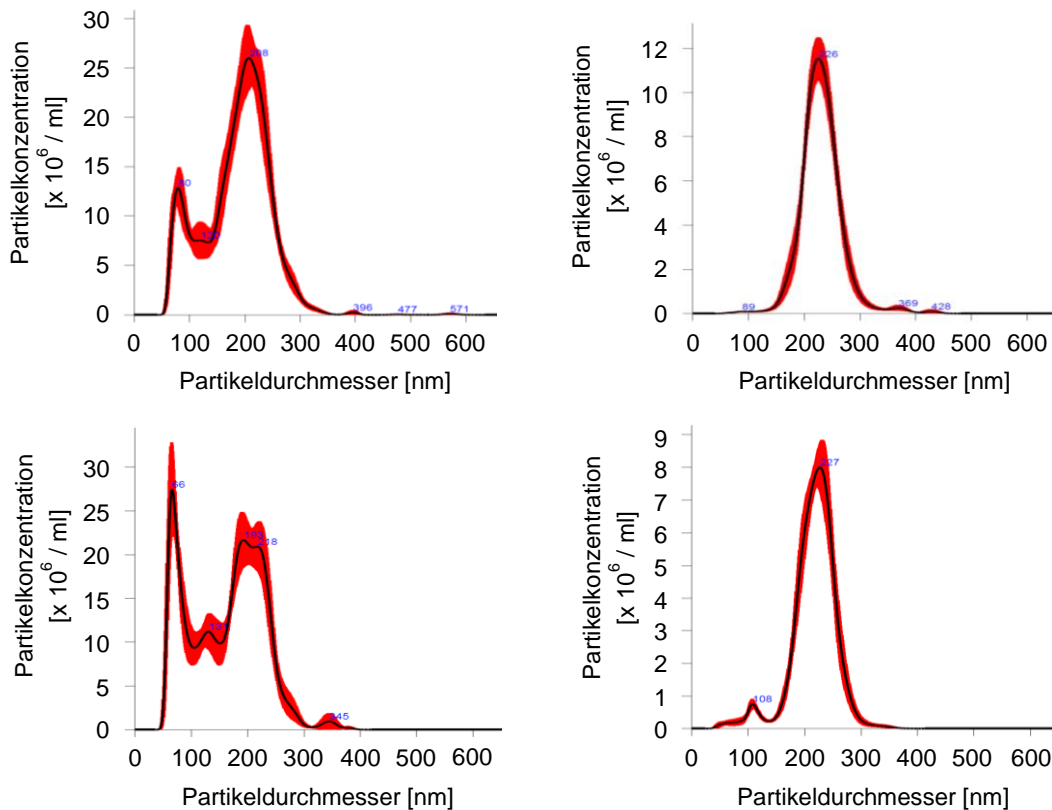


Abbildung 6: Partikelgrößenverteilung in Isolaten erythrozytärer Mikropartikel in der Nanopartikel-Tracking-Analyse

Dargestellt ist die Größenverteilung der Partikel, die in vier NTA-Messungen aus RMP-Isolaten bestimmt wurden. Jeder Graph repräsentiert ein RMP-Isolat, das in sechs Videos à 30 Sekunden von der NTA-Software analysiert wurde. Da keine spezifischen Färbungen verwendet wurden, kann nicht zwischen RMPs, anderen EVs oder anderen Partikeln wie Lipoproteinen unterschieden werden. Zu beachten: Die Graphen wurden von der NTA-Software automatisch generiert und haben daher teils unterschiedlich skalierte Y-Achsen. Abk.: NTA = Nanopartikel-Tracking-Analyse, RMPs = erythrozytäre Mikropartikel.

Die mittlere Partikelgröße der via NTA gemessenen Proben war 201,6 nm. Die mittlere Konzentration war in der NTA-Messung $9,8 \times 10^8 \pm 6,1 \times 10^8$ Partikel / μl . In der Durchflusszytometrie dieser vier Proben war die mittlere Konzentration $1,5 \times 10^4 \pm 1,7 \times 10^4$ RMPs / μl . Somit wurden bei der NTA-Messung erheblich mehr Partikel detektiert als bei der Durchflusszytometrie-Messung.

4.2 Zellkulturassays

4.2.1 Zellviabilität

Zur Untersuchung der Effekte von RMPs auf die Viabilität von HCT-116-Zellen wurden diese für 48 Stunden mit $0,5 - 50 \times 10^6$ RMPs / ml oder der Lösemittelkontrolle (PBS) inkubiert. Im Anschluss wurde mit einem WST-1-basierten Assay die Viabilität der Zellen bestimmt. Fünf unabhängige Experimente wurden mit RMPs durchgeführt, die via UZ isoliert wurden (n=5), und drei unabhängige Experimente wurden mit RMPs durchgeführt, die via SEC isoliert wurden (n=3).

Die Inkubation mit den beiden höchsten RMP-Konzentrationen (10×10^6 RMPs / ml und 50×10^6 RMPs / ml) führte bei via UZ isolierten RMPs zu einer signifikant erhöhten Viabilität der HCT-116-Zellen im Vergleich zur Kontrolle. So betrug die mittlere Viabilität normiert auf die Kontrolle bei 10×10^6 RMPs / ml $117,3 \pm 4,4 \%$, $p = 0,0139$. Bei 50×10^6 RMPs / ml war die mittlere Viabilität $143,7 \pm 7,3 \%$, $p = 0,0001$. Die drei niedrigeren Konzentrationen ($0,5 - 5 \times 10^6$ RMPs / ml) hatten keinen signifikanten Effekt auf die Viabilität der HCT-116-Zellen. Keine der fünf inkubierten Konzentrationen von RMPs, die via SEC isoliert wurden, hatte einen signifikanten Effekt auf die Viabilität der HCT-116-Zellen. Abbildung 7 zeigt eine Übersicht über die Ergebnisse des Viabilitätsassays.

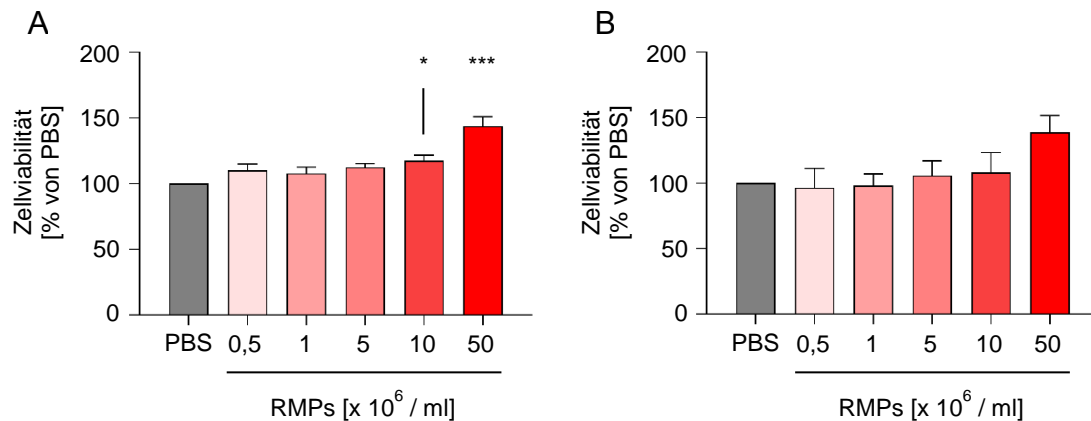


Abbildung 7: Einfluss erythrozytärer Mikropartikel auf die Viabilität von HCT-116-Zellen

Dargestellt sind die Ergebnisse des Zellviabilitätsassays mit RMPs, die via Ultrazentrifugation (A) oder Größenausschlusschromatographie (B) gewonnen wurden. Die HCT-116-Zellen wurden über 48 Stunden mit RMPs fünf verschiedener Konzentrationen oder der Lösemittelkontrolle (PBS) inkubiert. Mittels WST-1 wurde anschließend ihre Zellviabilität gemessen. Abk.: PBS = phosphatgepufferte Salzlösung, RMPs = erythrozytäre Mikropartikel, WST-1 = wasserlösliches Tetrazolium-1. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$

4.2.2 Migration und Invasion

Zur Untersuchung der Effekte von RMPs auf die Migration und Invasion von HCT-116-Zellen wurde ein Zellkulturassay mit speziellen Einsätzen für Mikrotiterplatten verwendet, bei dem die Zellen durch eine Membran migrieren konnten. Fürs Invasionsassay wurde die Membran vorher mit extrazellulärer Matrix als Hindernis beschichtet. Nach einer Behandlung der Zellen mit 5×10^6 RMPs / ml unter verschiedenen Medienbedingungen (verschiedene FCS-Konzentrationen im Well unterhalb der Membran als Migrationsreiz) über 24 Stunden wurde Calcein-AM-basiert gemessen, wie viele Zellen migriert waren. Zudem wurden Assaybedingungen getestet, bei denen 5×10^6 RMPs / ml nicht auf die Zellen inkubiert, sondern im Well unterhalb der Membran dem FCS zugesetzt wurden. Es wurden jeweils fünf unabhängige Experimente für Migration und Invasion durchgeführt (n=5).

Die Inkubation mit RMPs führte zu einer signifikant stärkeren Migration von HCT-116-Zellen im Vergleich zur Kontrolle, wenn 20 % FCS im Well waren ($2,8 \times 10^4 \pm 3,3 \times 10^3$ relative fluorescence units [RFU] gegenüber $1,8 \times 10^4 \pm 5,0 \times 10^3$ RFU, $p = 0,0062$). Keine der anderen getesteten Assaybedingungen hatte einen signifikanten Effekt auf die Migration der Zellen. Eine Übersicht der Ergebnisse des Migrationsassays findet sich in Abbildung 8.

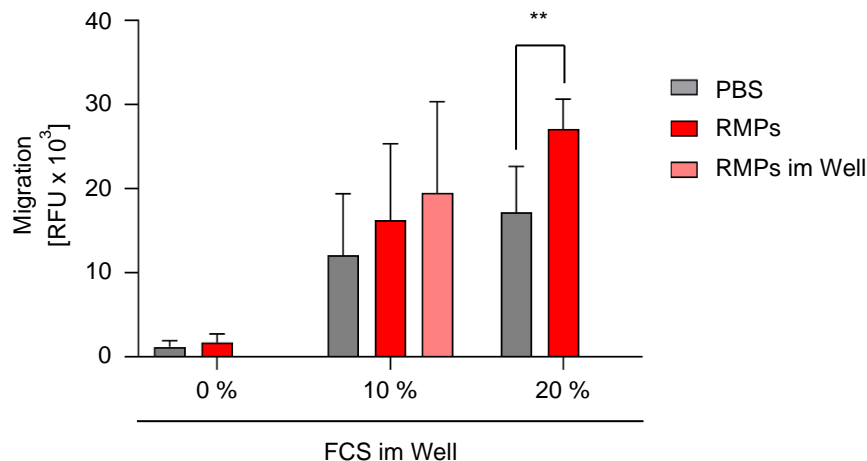


Abbildung 8: Einfluss erythrozytärer Mikropartikel auf die Migration von HCT-116-Zellen

Dargestellt sind die Ergebnisse des Migrationsassays. Die HCT-116-Zellen wurden in FCS-freien Einsätzen für Mikrotiterplatten über 24 Stunden mit 5×10^6 RMPs / ml oder der Lösemittelkontrolle (PBS) inkubiert und konnten verschiedenen FCS-Gradienten (0 – 20 % FCS im Well) folgend über eine Membran in das darunter liegende Well migrieren. Zudem wurde eine Bedingung getestet, bei der 10 % FCS im Well 5×10^6 RMPs / ml zugesetzt wurden (hellrot). Die Anzahl der migrierten Zellen wurde mittels Calcein-Acetoxy-methylester bestimmt. Abk.: FCS = fetales Kälberserum, PBS = phosphatgepufferte Salzlösung, RFU = relative Fluoreszenzeinheiten, RMPs = erythrozytäre Mikropartikel. $**p \leq 0,01$

Die Behandlung mit 5×10^6 RMPs / ml führte zu einer signifikant stärkeren Invasion der HCT-116-Zellen im Vergleich zur Kontrolle, wenn der FCS-Gehalt im Well bei 0 % lag, und damit kein FCS-Gradient bestand ($3,8 \times 10^3 \pm 9,9 \times 10^2$ RFU vs. $2,4 \times 10^3 \pm 4,6 \times 10^2$ RFU, $p = 0,02$). Unter keiner der anderen getesteten

Assaybedingungen hatten RMPs einen signifikanten Effekt auf die Invasion der Zellen. Eine Übersicht der Ergebnisse des Invasionsassays findet sich in Abbildung 9.

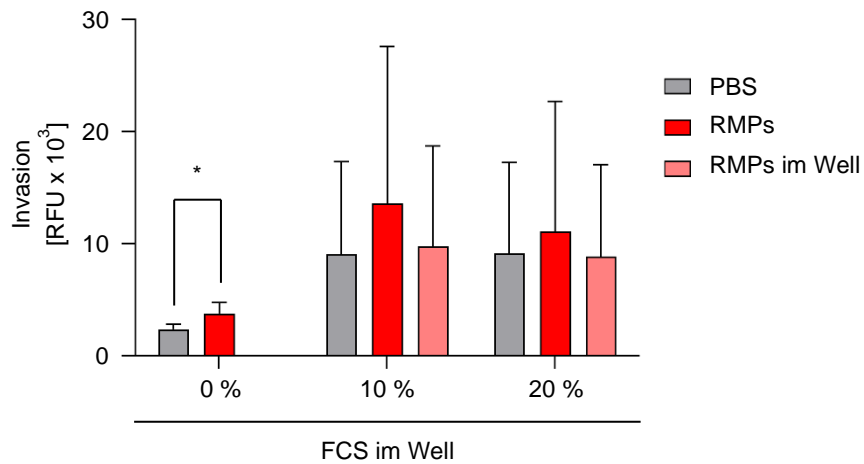


Abbildung 9: Einfluss erythrozytärer Mikropartikel auf die Invasion von HCT-116-Zellen

Dargestellt sind die Ergebnisse des Invasionsassays. Die HCT-116-Zellen wurden in FCS-freien Einsätzen für Mikrotiterplatten über 24 Stunden mit 5×10^6 RMPs / ml oder der Lösemittelkontrolle (PBS) inkubiert und konnten verschiedenen FCS-Gradienten (0 – 20 % FCS im Well) folgend über eine mit extrazellulärer Matrix beschichtete Membran in das darunter liegende Well migrieren. Es wurden zudem Bedingungen getestet, bei der 10 % bzw. 20 % FCS im Well 5×10^6 RMPs / ml zugesetzt wurden (hellrot). Die Anzahl der migrierten Zellen wurde mittels Calcein-Acetoxy-methylester bestimmt. Abk.: FCS = fetales Kälberserum, PBS = phosphatgepufferte Salzlösung, RFU = relative fluorescence units, RMPs = erythrozytäre Mikropartikel. * $p \leq 0,05$

4.2.3 Langzeitproliferation

Zur Untersuchung möglicher Effekte von RMPs auf die Proliferation von HCT-116-Zellen über eine längere Zeitspanne wurde ein Zellkulturassay basierend auf einer CFSE-Färbung durchgeführt. Die Zellen wurden zwei oder vier Tage mit 5×10^6 RMPs / ml oder der Lösemittelkontrolle inkubiert. Anschließend wurde die Intensität der CFSE-Färbung via Durchflusszytometrie gemessen. Eine

niedrigere mediane CFSE-Intensität der HCT-116-Zellen entspricht einer verstärkten Proliferation, da die CFSE-Konzentration in der Zelle mit jeder Zellteilung halbiert wird. Es wurden fünf unabhängige Experimente durchgeführt (n=5). Das Ergebnis eines repräsentativen Versuchs von Tag vier ist in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** dargestellt.

Dargestellt ist eine Überlappung der CFSE-Fluoreszenzsignale von mit 5×10^6 RMPs / ml oder Lösemittelkontrolle (PBS) behandelten HCT-116-Zellen eines repräsentativen Versuchs von Tag vier im Langzeitproliferationsassay. Da die CFSE-Konzentration sich in der individuellen Zelle mit jeder Zellteilung halbiert, entspricht eine niedrigere mediane Intensität einer verstärkten Proliferation. Abk.: CFSE = Carboxyfluoresceinsuccinimidylester, PBS = phosphatgepufferte Salzlösung, RMPs = erythrozytäre Mikropartikel.

Es gab keinen signifikanten Effekt der RMPs auf die Langzeitproliferation der HCT-116-Zellen im Vergleich zur Lösemittelkontrolle. So war an Tag zwei die mediane Intensität mit RMP behandelter Zellen $4919,1 \pm 1435,5$ und die der Lösemittelkontrolle $6038,0 \pm 1818,7$ ($p = 0,0952$). An Tag vier war die mediane Intensität mit RMP behandelter Zellen $600,8 \pm 176,6$ und die der Lösemittelkontrolle $899,3 \pm 279,3$ ($p = 0,0780$). Eine Übersicht der Ergebnisse des Langzeitproliferationsassays findet sich in Abbildung 10.

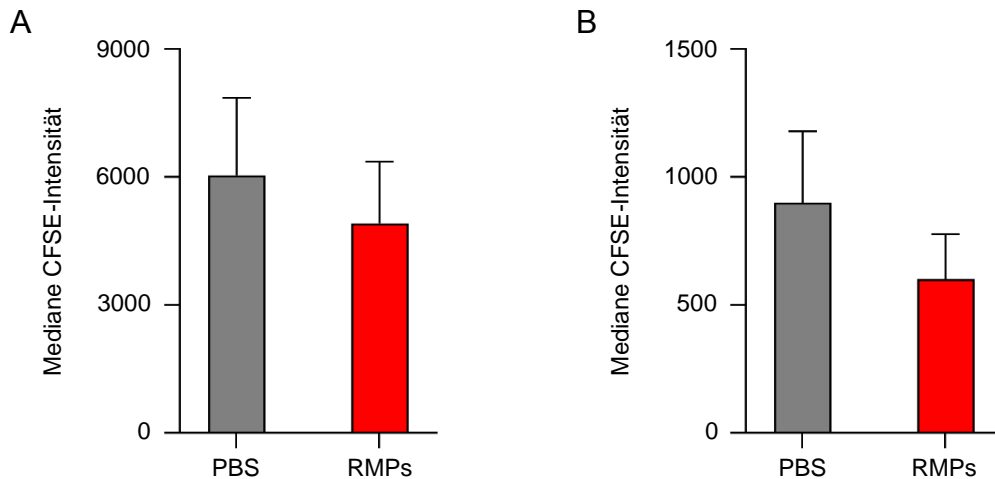


Abbildung 10: Einfluss erythrozytärer Mikropartikel auf die Langzeitproliferation von HCT-116-Zellen

Dargestellt sind die Ergebnisse des Langzeitproliferationsassays. Mit CFSE gefärbte HCT-116-Zellen wurden mit 5×10^6 RMPs / ml oder der Lösemittelkontrolle (PBS) inkubiert. An Tag zwei (A) und vier (B) wurde jeweils durchflusszytometrisch die mediane Intensität der Färbung bestimmt. Da die CFSE-Konzentration mit jeder Zellteilung in der individuellen Zelle halbiert wird, entspricht eine niedrigere mediane Intensität einer verstärkten Proliferation. Beachte: Die Y-Achsen sind unterschiedlich skaliert, da die Intensität an Tag zwei erheblich größer ist als an Tag vier. Abk.: CFSE = Carboxyfluoresceinsuccinimidylester, PBS = phosphatgepufferte Salzlösung, RMPs = erythrozytäre Mikropartikel.

4.2.4 Proteinsynthese

Um den Einfluss von RMPs auf die Proteinsynthese von P-GSK-3 β , GSK-3 β und PCNA zu untersuchen, wurden die Zellen für 24 Stunden mit 5×10^6 oder 10×10^6 RMPs / ml oder der Lösemittelkontrolle (PBS) inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot die Proteinkonzentration der drei Proteine bestimmt. Anschließend erfolgte noch die Bestimmung der β -Aktin-Konzentration als Ladekontrolle.

Die untersuchte Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK-3 β) ist an einer Vielzahl zellulärer Signalwege beteiligt. Die ebenfalls untersuchte phosphorylierte Variante Phospho-GSK-3 β (P-GSK-3 β) stellt eine deaktivierte Form des Enzyms

dar. Ein möglicher Einfluss der RMPs auf die GSK-3 β wurde untersucht, da sie neben der Beteiligung an zahlreichen Pathologien wie neurologischen, psychiatrischen und entzündlichen Erkrankungen auch an Malignomen beteiligt ist.¹³² Beim kolorektalen Karzinom vermittelt die GSK-3 β eine vermehrte Proliferation, Migration und Invasion über Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs.¹³³

Das untersuchte *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) hat als DNA-umgebendes Ringprotein eine zentrale Funktion bei wichtigen zellulären Vorgängen wie DNA-Reparatur- und Replikation und beim Zellzyklus. Über Interaktionen und Modifikationen ist es an pathologischen Prozessen wie maligner Entartung beteiligt.¹³⁴ So wurde beim kolorektalen Karzinom eine Assoziation von vermehrter Proliferation und Invasivität zu verstärkter PCNA-Expression hergestellt.¹³⁵

Es wurden vier unabhängige Experimente (n=4) durchgeführt. Repräsentative Western Blots der vier Proteine sind in Abbildung 11 dargestellt.

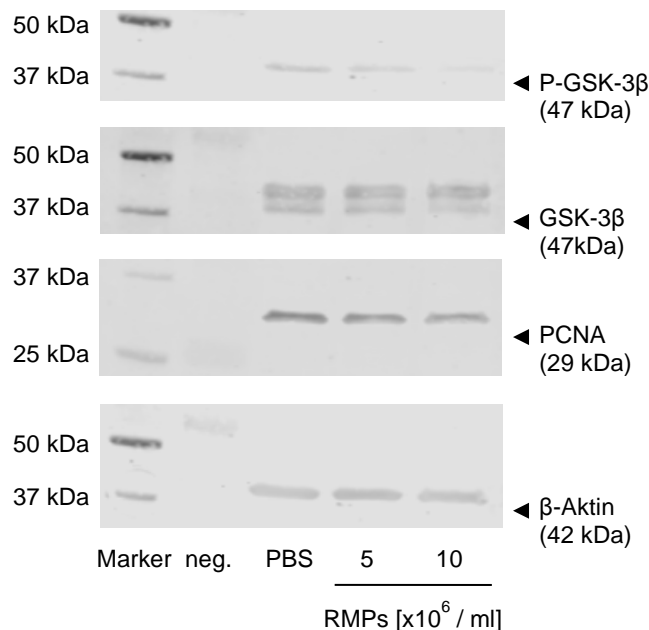


Abbildung 11: Repräsentative Western Blots der untersuchten Proteine

Dargestellt sind repräsentative Western Blots der drei untersuchten Proteine P-GSK-3 β , GSK-3 β und PCNA sowie der Ladekontrolle β -Aktin. Im zugehörigen Zellkulturassay wurden HCT-116-Zellen für 24 Stunden mit 5×10^6 oder 10×10^6 RMPs / ml oder der Lösemittelkontrolle (PBS) inkubiert und anschließend deren

relative Proteinkonzentration mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blotting bestimmt. Ein mitgeführter Proteinstandard diente als Marker für die Größe der Proteine. Als Negativkontrolle der Primärantikörper dienten lysierte Erythrozyten. Abk.: neg. = Negativkontrolle, PBS = phosphatgepufferte Salzlösung, (P)-GSK-3 β = (Phospho)-Glykogensynthase-Kinase 3 β , PCNA = proliferating cell nuclear antigen, RMPs = erythrozytäre Mikropartikel.

Es zeigte sich kein signifikanter Effekt der RMPs auf die Proteinsynthese der genannten Proteine im Vergleich zur Lösemittelkontrolle (siehe Abbildung 12).

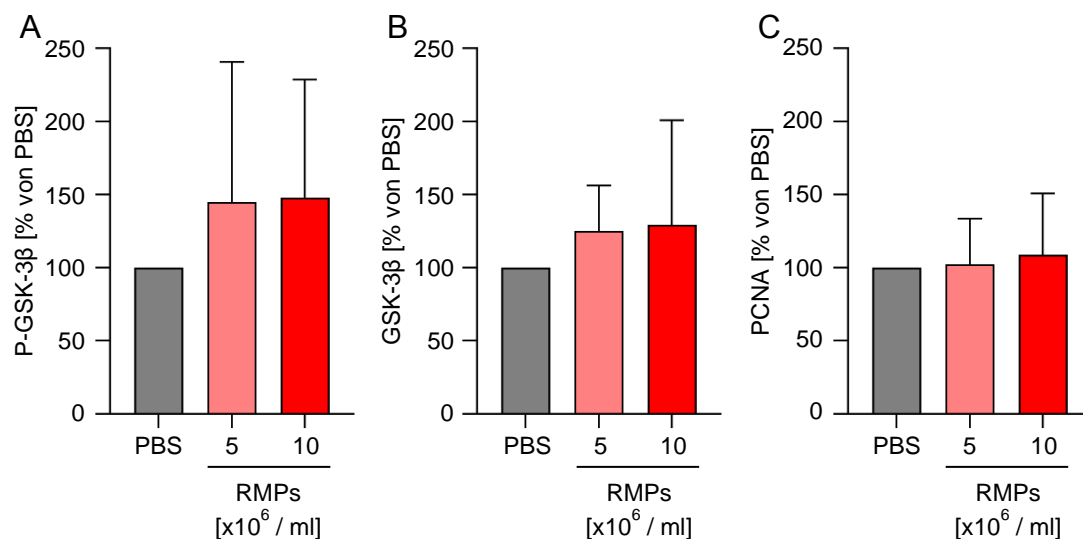


Abbildung 12: Einfluss erythrozytärer Mikropartikel auf die Proteinsynthese von HCT-116-Zellen

Dargestellt sind die Ergebnisse der Western Blots der Proteine P-GSK-3 β (A), GSK-3 β (B) und PCNA (C). Die HCT-116-Zellen wurden für 24 Stunden mit 5×10^6 oder 10×10^6 RMPs / ml oder der Lösemittelkontrolle (PBS) inkubiert und anschließend deren relative Proteinkonzentration mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blotting bestimmt. Die am Bildgebungssystem gemessenen Intensitäten wurden auf die Ladekontrolle β -Aktin normiert. Abk.: (P)-GSK-3 β = (Phospho)-Glykogensynthase-Kinase 3 β , PBS = phosphatgepufferte Salzlösung, PCNA = proliferating cell nuclear antigen, RMPs = erythrozytäre Mikropartikel.

5 Diskussion

5.1 Isolierung erythrozytärer Mikropartikel via Größenausschlusschromatographie

Ein Ziel dieser Arbeit war es, eine zur UZ alternative Methode zur Isolierung von RMPs anzupassen. Hierfür wurde die SEC gewählt, da sie scheinbar schonender für die empfindlichen EVs ist und daher ihre biophysischen und biologischen Eigenschaften besser erhält.^{85,86} Zudem ist sie verhältnismäßig unkompliziert, kostengünstig und breit verfügbar, da keine teuren Geräte wie Ultrazentrifugen notwendig sind. Nicht dargestellte Vorversuche führten zu dem Ergebnis, dass die RMPs, die per Durchflusszytometrie quantifiziert werden können, schon nach gut 1,5 ml Eluat die Chromatographie-Säule passieren. Daher wurde zur Isolierung von RMPs die in 3.2.2 Größenausschlusschromatographie dargestellte Methode gewählt, bei der zunächst 1,5 ml Eluat (am ehesten aus der Chromatographie-Säule laufendes PBS vom vorherigen Waschvorgang) in Fraktion 1 gesammelt werden, und dann 12 weitere Fraktionen à 1 ml aufgefangen werden. Fraktion 2 und 3 wurden dann als RMP-Isolat definiert und für nachfolgende Versuche 1:1 gepoolt. In Abbildung 5 sind die RMP-, Protein- und Eisenkonzentrationen der 13 Fraktionen von drei SEC-Isolierungen vergleichend gegenübergestellt.

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu bedenken, dass eine idealisierte SEC zwar mit einer scharfen Auftrennung von Teilchen nach ihrer Größe einhergehen müsste, in der Realität aber eine gewisse Unschärfe entstehen kann. Dies liegt zum Beispiel daran, dass nicht alle Teilchen der aufzutrennenden Lösung (hier 0,5 – 2 ml vorkonzentrierter, zellfreier EK-Überstand) genau zeitgleich in die Chromatographie-Säule eintreten können. Außerdem ist ein vorsichtiges Aufträufeln mit PBS auf die Säule notwendig, sobald die aufzutrennende Lösung beinahe vollständig eingezogen ist, um ein Austrocknen zu verhindern. Dies kann durch Verwirbelungen der noch nicht eingezogenen Lösung zu einer Unschärfe führen.

Wie aus Abbildung 5 ersichtlich wird, werden die RMPs mit dieser Methode effektiv in den Fraktionen 2 und 3 konzentriert. Kleine Mengen eluieren zudem noch in Fraktion 4 und 5, was durch unterschiedlich große RMPs und die genannte Unschärfe erklärt werden kann. Auch bei der SEC zeigt sich, dass die RMP-Konzentration interindividuell stark schwankt.⁴²

Es kam zu einer relativ scharfen Trennung der RMPs von kontaminierenden Proteinen, welche hauptsächlich in späteren Fraktionen eluieren. Diese Beobachtung ist vergleichbar mit den Ergebnissen von Böing et al., die eine SEC-Isolierung für thrombozytäre MPs entwickelt haben.⁸⁵ Ein Vergleich zur Proteinkonzentration in UZ-Isolaten wurde in dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt.

Das ebenfalls bestimmte Eisen, das möglicherweise auch zelluläre Effekte von RMP-Isolaten miterklären könnte,¹¹² wird im Gegensatz zu den Proteinen nicht so scharf von den RMPs getrennt. Die Verteilung des Eisens wird wesentlich dadurch bestimmt, dass freies Eisen als gelöstes Teilchen in der Chromatographie mit dem Lösemittel frei eluieren kann. Es liegt jedoch auch gebunden an Hämoglobin vor, was die ungleiche Verteilung miterklären könnte. Die Eisenkonzentration der RMP-Isolate ist bei beiden Isolierungsmethoden vergleichbar (UZ: $18,5 \pm 13,4 \mu\text{g} / \text{dl}$, $n=8$; SEC: $31,3 \pm 10,9 \mu\text{g} / \text{dl}$, $n=3$).

Die RMP-Konzentrationen aller SEC-Aufreinigungen (gepoolte Fraktionen 2 und 3) waren etwas niedriger als die Konzentrationen der UZ-Aufreinigungen (SEC: $8,7 \times 10^4 \pm 5,2 \times 10^4 \text{ RMPs} / \mu\text{l}$; UZ: $1,3 \times 10^5 \pm 2,0 \times 10^5 \text{ RMPs} / \mu\text{l}$). Dabei sollte jedoch bedacht werden, dass der Verdünnungsfaktor durch die Aliquotierung bei der UZ und die Fraktionsvolumina bei der SEC ein anderer ist. So liegen von diesen RMP-Konzentrationen bei der SEC 2 ml vor (Fraktion 2 und 3 à 1 ml), bei der UZ 1,6 ml (acht Aliquots à 200 μl). Die mittlere Gesamtausbeute an RMPs beträgt nach Herausrechnen des Verdünnungsfaktors $1,7 \times 10^8 \text{ RMPs}$ bei der SEC und $2,0 \times 10^8 \text{ RMPs}$ bei der UZ, und ist daher durchaus vergleichbar.

Wie bereits erwähnt, geht bei der SEC eine gewisse Menge RMPs in Fraktion 4 und 5 verloren. Optimierungen der Methode könnten die Ausschöpfung vermutlich erhöhen. Eventuell wäre hierfür eine stärkere Vorkonzentrierung des aufgebrauchten EK-Überstands sinnvoll, damit durch dessen geringeres Volumen weniger Unschärfe bei der SEC entsteht. Eventuell sollte in der „RMP-Fraktion“ auch noch ein gewisses Volumen aus Fraktion 4 aufgefangen werden, da die hier auftretenden RMPs vermutlich vor allem zu Beginn eluieren. Dabei muss auch in zukünftigen Experimenten auf eine Balance zwischen Trennung von Kontaminanten und hoher RMP-Ausbeute geachtet werden.

Zusammenfassend scheint die SEC als effektive Methode zur RMP-Isolierung aus EKs gut geeignet zu sein. Bezüglich des methodischen Aufwands und der Auftrennung der RMPs von Proteinen ist das Verfahren der konventionellen UZ wahrscheinlich sogar überlegen. Ein direkter Vergleich eines halbierten EKs mit simultaner Isolierung via UZ und SEC mit anschließender genauer Charakterisierung der RMPs mit mehreren Verfahren wie NTA und Durchflusszytometrie sowie eine vergleichende Messung kontaminierender Proteine sind empfehlenswert, um die Eignung der Methode weiterführend zu prüfen. Optimierungen könnten zudem die RMP-Ausbeute erhöhen.

5.2 Quantifizierung erythrozytärer Mikropartikel via Durchflusszytometrie und Nanopartikel-Tracking-Analyse

RMPs wurden in dieser Arbeit hauptsächlich via Durchflusszytometrie mit doppelter Fluoreszenzfärbung quantifiziert, da es die meistbenutzte Methode ist. Aufgrund der großen Einschränkung bei der Erkennung kleinerer EVs steht die Durchflusszytometrie im Kontext von EVs aber durchaus in Kritik. Da von RMPs zudem bekannt ist, dass sie eher kleine EVs sind,⁴¹ ist zu vermuten, dass die Durchflusszytometrie auch bei RMPs an ihre Grenzen stoßen kann. Daher wurden vier RMP-Isolate vergleichend via NTA und Durchflusszytometrie analysiert wurden.

Die Konzentration der gemessenen Partikel in der NTA war um mehrere

Größenordnungen höher als in der Durchflusszytometrie (NTA: $9,8 \times 10^8 \pm 6,1 \times 10^8$ Partikel / μl ; Durchflusszytometrie: $1,5 \times 10^4 \pm 1,7 \times 10^4$ RMPs / μl). Bewusst wurde hier bei der NTA keine Angabe in der Einheit [RMPs / μl], sondern [Partikel / μl] gemacht. Es wurde nämlich keine spezifische Färbung für RMPs verwendet wie in der Durchflusszytometrie, sondern die Gesamtheit aller Partikel im Größenspektrum von Exosomen und MPs analysiert. Die Ergebnisse sind daher schwer zu vergleichen.

Die höhere Konzentration in der NTA kann mehrere Gründe haben. Zum einen werden in der NTA neben RMPs auch EVs anderer zellulärer Herkunft als Partikel gemessen, die sich ebenfalls in EKs befinden und aufgrund ihrer ähnlichen Eigenschaften mitisoliert werden.⁵⁹ Zudem können in der NTA Proteine bzw. Proteinkomplexe oder Lipoproteine ähnlicher Größe wie MPs als Partikel gemessen werden.^{43,82}

Umgekehrt könnte die Antikörperfärbung in der Durchflusszytometrie zu spezifisch sein und daher RMPs aufgrund von ungenügender CD235a- bzw. PS-Expression oder mangelnder Affinität der Antikörper fälschlicherweise nicht erfassen, wodurch die Konzentration in der Durchflusszytometrie falsch-niedrig ausfallen würden. Das Dogma, dass alle EVs immer PS exprimieren, wurde für thrombozytäre MPs bereits widerlegt.⁴⁴ Die Prämisse, dass nur doppelt gefärbte MPs als RMPs gezählt werden, könnte also auch hier zu spezifisch gewesen sein. Ein weiterer Erklärungsansatz wäre, dass die Durchflusszytometrie einen Großteil der RMPs aufgrund ihrer Größe nicht erfassen kann. Dies würde zu der Größenverteilung der Partikel in der NTA passen, die in Abbildung 6 zu sehen ist. Die mittlere Partikelgröße war in den vier Isolierungen 201,6 nm. Damit wäre möglicherweise ein Großteil der RMPs zu klein zur Analyse via Durchflusszytometrie, deren Auflösungsuntergrenze bei etwa 200 nm liegt.⁸²

Für die weiterführende Charakterisierung von RMPs via NTA wäre der Einsatz von Fluoreszenzfärbungen sinnvoll, um das Problem mangelnder Spezifität der nativen NTA auszuschalten.

Die Beforschung von EVs wie den RMPs führt zahlreiche methodische Herausforderungen und ungelöste Probleme mit sich, die zum Teil mit deren Größe zusammenhängen. So ist auch die Durchflusszytometrie, wenngleich sie die meistverwendete Methode hierfür darstellt, wahrscheinlich nicht ideal für die Quantifizierung von RMPs geeignet. Dies macht ein kritisches Hinterfragen aller stromabwärts erfolgten Experimente notwendig.

5.3 Einfluss der Isolierungsmethode auf die biologische Aktivität erythrozytärer Mikropartikel

In dieser Arbeit wurden RMPs via UZ und SEC isoliert. Während die UZ als Standardmethode der Isolierung diverser EVs sowie von RMPs angesehen werden kann, liegen Erkenntnisse vor, dass die Methode die Eigenschaften der EVs verändern kann.⁸⁴⁻⁸⁶ Mol et al. zeigten, dass via SEC isolierte EVs von Kardiomyozyten-Vorläuferzellen eine höhere Funktionalität haben.⁸⁶ Ein Ziel der Arbeit war es daher zu untersuchen, ob die Isolierungsmethoden UZ und SEC die biologische Aktivität von RMPs verändern. Dies wurde im Viabilitätsassay untersucht. Tatsächlich hatten hier RMPs, die via UZ isoliert wurden, in hohen Konzentrationen (10×10^6 und 50×10^6 RMPs / ml) einen signifikanten Effekt auf die Viabilität von HCT-116-Zellen, während via SEC isolierte RMPs keinen signifikanten Effekt hatten (siehe 4.2.1 Zellviabilität). Die Isolierungsmethode scheint also tatsächlich einen Einfluss auf die Aktivität der RMPs zu haben.

Die Ergebnisse sind aber mit zwei Einschränkungen zu interpretieren. Zum einen wurde nicht die gleiche Anzahl an Experimenten durchgeführt ($n=5$ für UZ, $n=3$ für SEC). Insbesondere bei der sehr niedrigen Zahl von Versuchen, die mit via SEC isolierten RMPs durchgeführt wurden, kann der Zufall einen größeren Einfluss gehabt haben, was auch zu den größeren Standardabweichungen zwischen den Experimenten passt (siehe Abbildung 7). Zudem wurde kein direkter Vergleich durchgeführt. Idealerweise sollten EKs vor der Isolierung von RMPs halbiert werden, dann sollte eine Hälfte via SEC und eine Hälfte via UZ verarbeitet werden. Anschließend sollten Zellkulturassays mit RMPs durchgeführt werden, die mittels der zwei Methoden aus dem gleichen EK isoliert

wurden. Dieser höhere methodische Aufwand würde einen verlässlicheren, direkten Vergleich bedeuten.

Wodurch die unterschiedlichen biologischen Aktivitäten erklärt werden können, muss ebenso noch aufgeklärt werden. Möglicherweise wurden die via UZ isolierten RMPs aufgrund der hohen Scherkräfte zu Konglomeraten verklumpt⁸⁴ oder anderweitig verändert worden.

Möglicherweise sind auch die Kontaminanten der Isolierungen für die Unterschiede der Ergebnisse mitverantwortlich. Es wurde in anderen Arbeiten gezeigt, dass Proteine bzw. Lipoproteine bei der UZ als Kontamination mitisoliert werden,⁸² während die SEC zur Trennung von solchen Kontaminanten besser geeignet zu sein scheint.⁸⁵ In dieser Arbeit wurde für die SEC bestätigt, dass sie effektiv RMPs von Proteinen trennt. Da die Eisenkonzentrationen der SEC- und UZ-Isolate ähnlich niedrig sind, ist es eher unwahrscheinlich, dass Eisen für die unterschiedlichen Effekte auf die Zellviabilität verantwortlich ist.

Zusammenfassend ist die Frage, ob die Isolierungsmethode einen Einfluss auf die biologischen Aktivitäten von RMPs hat, vorläufig und beschränkt auf ein Viabilitätsassay der Kolonkarzinomzelllinie HCT-116, mit ja zu beantworten. Dabei muss jedoch unter anderem die Möglichkeit bedacht werden, dass kontaminierende Proteine für die Effekte mitverantwortlich sind. Der methodisch aufwändigere Vergleich eines in zwei Hälften aufgetrennten EKs (für UZ und SEC) und Studien, die die Kontaminanten der Isolate genauer charakterisieren, könnten diese Frage mit höherer Sicherheit beantworten.

5.4 Einfluss erythrozytärer Mikropartikel auf die Kolonkarzinomzelllinie HCT-116

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass via UZ isolierte RMPs in hohen Konzentration (10×10^6 RMPs / ml oder 50×10^6 RMPs / ml) signifikant die Viabilität von HCT-116-Zellen erhöhen, während niedrige bis mittlere Konzentrationen ($0,5 \times 10^6$, 1×10^6 oder 5×10^6 RMPs / ml) keinen Einfluss auf die Viabilität haben. RMPs mittlerer Konzentration (5×10^6 RMPs / ml) verstärken

unter bestimmten Umständen (bei jeweils einer von vier bzw. fünf getesteten Bedingungen) die Migration und Invasion von HCT-116-Zellen. RMPs mittlerer Konzentration (5×10^6 RMPs / ml) haben keinen signifikanten Effekt auf die Langzeitproliferation (über zwei bzw. vier Tage) von HCT-116-Zellen. RMPs mittlerer bis hoher Konzentration (5×10^6 oder 10×10^6 RMPs / ml) verändern die Proteinsynthese von P-GSK-3 β , GSK-3 β und PCNA durch HCT-116-Zellen nicht signifikant. Ein Einfluss auf mit diesen Proteinen verknüpften Signalwegen scheint daher keine Erklärung für die beobachteten Effekte der RMPs auf Viabilität, Migration und Invasion zu sein.

Zellkulturassays wie in dieser Arbeit untersuchen ausschließlich die direkte Interaktion zwischen Zellen und potenziellen Effektoren wie den RMPs. Dabei können zwar wichtige Hinweise auf biologische Prozesse gewonnen werden, wie sie auch *in vivo* ablaufen könnten, aber die Ergebnisse sind mit Einschränkungen zu interpretieren. Es fehlen wichtige Aspekte eines vollständigen biologischen Systems. In dem Kontext eines Patienten mit kolorektalem Karzinom wären beispielsweise Blut- und Lymphgefäße als Versorgungssystem und potenzieller Metastasierungsweg von Interesse, zudem das Immunsystem, die Tumormikroumgebung und die Vielzahl an löslichen Faktoren, die lokal und systemisch mit den malignen Zellen und auch mit den RMPs interagieren könnten. Von den RMPs sind bereits immunmodulatorische Effekte bekannt, die möglicherweise an TRIM beteiligt sind und damit indirekt das Tumorwachstum beeinflussen könnten (siehe 1.2.3 Biologische Aktivitäten).

Eine weitere Einschränkung bei der Interpretation der Ergebnisse entsteht aus den gewählten Konzentrationen. Die in diesem Abschnitt als „hoch“ beschriebenen Konzentrationen (10×10^6 RMPs / ml und 50×10^6 RMPs / ml) sind ausgehend von einer vereinfachten Schätzung in der Realität wahrscheinlich unerreichbar. Die mittlere Ausbeute der via UZ gewonnenen RMP-Isolate in dieser Arbeit war $2,0 \times 10^8$ RMPs (siehe 4.1.2 Vergleich der Isolierungsmethoden). Es wurden in dieser Arbeit keine Daten über die RMP-Konzentrationen der verwendeten EKs oder den möglichen Verlust von RMPs im Isolierungsprozess ermittelt. Um eine konservative Schätzung vorzunehmen, sei

daher angenommen, dass ein durchschnittliches EK an Tag 42 $2,0 \times 10^8$ RMPs enthält. Ausgehend von einem 70 kg schweren Mann mit einem Blutvolumen von 5.000 ml wären somit etwa 240 bzw. 1200 EKs notwendig, bei denen die Lagerungszeit ausgereizt wurde (Tag 42 nach Blutspende), um eine Blutkonzentration von 10×10^6 bzw. 50×10^6 RMPs / ml zu erreichen. Für alle Zellkulturversuche abseits vom Viabilitätsassay wurde daher die mittlere Konzentration von 5×10^6 RMPs / ml als Standard gewählt, wenngleich auch eine Transfusion von etwa 120 EKs unrealistisch ist. Andererseits gilt zu bedenken, dass bei der UZ mit einem größeren Verlust von RMPs zu rechnen ist. So war bei einer Studie von Rubin et al. die RMP-Menge in EKs 15-fach höher als in Isolaten, die hieraus via UZ gewonnen wurden.⁸⁰

Zur Untersuchung des Einflusses auf die Proteinsynthese wurde erneut die höhere Konzentration von 10×10^6 RMPs / ml aufgegriffen, um mögliche Mechanismen für die verstärkte Viabilität bei dieser Konzentration zu untersuchen.

Im Kontext von RMPs ist auch wichtig zu bedenken, dass diese zwar in EKs weit über physiologische Konzentrationen hinaus akkumulieren, dabei jedoch *in vivo* wahrscheinlich schnell abgebaut werden.^{56,57} Es ist nicht bekannt, in welcher Konzentration sie nach einer Transfusion tatsächlich bei einem Malignom ankommen.

Die Eisenkonzentration ist bei den Isolaten der UZ mit $18,5 \pm 13,4 \mu\text{g} / \text{dl}$ relativ niedrig. Sie befindet sich im Durchschnitt sogar unter dem eigentlichen Arbeitsbereich des Assays und unter dem Referenzbereich von Serum-Eisen. Eisen als Kontamination der RMP-Isolate könnte aber dennoch zu den Ergebnissen beigetragen haben, da Eisen im Kontext von Malignomwachstum zahlreiche Effekte haben kann.¹¹²

Was zudem bei der Interpretation der Ergebnisse bedacht werden sollte, ist ein gewisses Selektions-Bias bei den verwendeten RMP-Isolierungen für die Zellkulturassays. Wie bereits erwähnt, ist die RMP-Konzentration großen Schwankungen zwischen den Isolierungen ausgesetzt.⁴² Es wurden RMPs aus 31 EKs via UZ und fünf EKs via SEC isoliert, bei vielen Isolaten war die

Konzentration bei der gewählten Verdünnung bzw. Aliquotierung aber zu gering, um die RMP-Konzentrationen für die Zellkulturassays zu erreichen. Daher wurden vor allem RMPs aus Isolierungen verwendet, die vergleichsweise hohe RMP-Konzentrationen hatten. Es ist nicht auszuschließen, dass RMPs aus Isolaten mit höherer Konzentration andere biologische Effekte haben als RMPs aus Isolaten geringerer Konzentration. Es wird vermutet, dass die RMP-Bildung in EKs Teil des Lagerungsschadens der Erythrozyten ist.^{45,59} Somit ist plausibel, dass RMPs aus Isolaten hoher Konzentration von besonders gestressten Erythrozyten abgeschnürt werden, was ihre biologischen Eigenschaften verändern könnte.

Mögliche Maßnahmen, um auch RMPs aus Isolierungen mit niedrigerer RMP-Menge verwenden zu können, wären unter anderem eine Erhöhung der Ausschöpfung durch Verfahrensoptimierungen, ein niedrigeres Aliquotierungsvolumen oder ein Pooling mehrerer RMP-Isolierungen. Letztere Maßnahme würde auch interindividuelle Unterschiede der RMPs bei den biologischen Eigenschaften als verzerrenden Faktor ausschalten und dem Umstand gerecht werden, dass in der Realität eine Mehrfachtransfusion auch mit der Vereinigung der EKs und deren RMPs mehrerer Spender im Empfänger einhergeht.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass via UZ isolierte RMPs die Zellviabilität, Migration und Invasion von HCT-116-Kolonkarzinomzellen verstärken können. Aufgrund der gewählten hohen RMP-Konzentrationen, der Möglichkeit von Effekten durch Kontaminanten und der Tatsache, dass in Zellkultur gearbeitet wurde, ist hiervon jedoch nicht abzuleiten, dass RMPs bei Transfusionen *in vivo* das Wachstum von Malignomen fördern.

6 Literaturverzeichnis

1. Funk MB, Heiden M, Müller S, et al. 2020. Hämovigilanz-Bericht des Paul-Ehrlich-Instituts 2018: Auswertung der Meldungen von Reaktionen und Zwischenfällen nach § 63i AMG. www.pei.de/haemovigilanzbericht.
2. Jones JM, Sapiano MRP, Savinkina AA, et al. Slowing decline in blood collection and transfusion in the United States - 2017. *Transfusion*. 2020;60 Suppl 2:S1-S9. doi:10.1111/trf.15604.
3. Carson JL, Guyatt G, Heddle NM, et al. Clinical Practice Guidelines From the AABB: Red Blood Cell Transfusion Thresholds and Storage. *JAMA*. 2016;316(19):2025-2035. doi:10.1001/jama.2016.9185.
4. The Lancet Haematology. Updates on blood transfusion guidelines. *The Lancet Haematology*. 2016;3(12):e547. doi:10.1016/S2352-3026(16)30172-7.
5. Gilreath JA, Stenehjem DD, Rodgers GM. Diagnosis and treatment of cancer-related anemia. *Am J Hematol*. 2014;89(2):203-212. doi:10.1002/ajh.23628.
6. Dicato M, Plawny L, Diederich M. Anemia in cancer. *Ann Oncol*. 2010;21 Suppl 7:vii167-72. doi:10.1093/annonc/mdq284.
7. Goubran HA, Elemetry M, Radosevich M, Seghatchian J, El-Ekiaby M, Burnouf T. Impact of Transfusion on Cancer Growth and Outcome. *Cancer Growth Metastasis*. 2016;9:1-8. doi:10.4137/CGM.S32797.
8. Acheson AG, Brookes MJ, Spahn DR. Effects of allogeneic red blood cell transfusions on clinical outcomes in patients undergoing colorectal cancer surgery: a systematic review and meta-analysis. *Ann Surg*. 2012;256(2):235-244. doi:10.1097/SLA.0b013e31825b35d5.
9. Tartter PI. Blood transfusion and infectious complications following colorectal cancer surgery. *Br J Surg*. 1988;75(8):789-792. doi:10.1002/bjs.1800750822.
10. Soubra A, Zabell JR, Adejoro O, Konety BR. Effect of perioperative blood transfusion on mortality for major urologic malignancies. *Clin Genitourin Cancer*. 2015;13(3):e173-81. doi:10.1016/j.clgc.2014.12.006.

11. Sun C, Wang Y, Yao HS, Hu ZQ. Allogeneic blood transfusion and the prognosis of gastric cancer patients: systematic review and meta-analysis. *Int J Surg*. 2015;13:102-110. doi:10.1016/j.ijso.2014.11.044.
12. Wang T, Luo L, Huang H, et al. Perioperative blood transfusion is associated with worse clinical outcomes in resected lung cancer. *Ann Thorac Surg*. 2014;97(5):1827-1837. doi:10.1016/j.athoracsur.2013.12.044.
13. Boshier PR, Ziff C, Adam ME, Fehervari M, Markar SR, Hanna GB. Effect of perioperative blood transfusion on the long-term survival of patients undergoing esophagectomy for esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Dis Esophagus*. 2018;31(4). doi:10.1093/dote/dox134.
14. Liu L, Wang Z, Jiang S, et al. Perioperative allogeneic blood transfusion is associated with worse clinical outcomes for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8(5):e64261. doi:10.1371/journal.pone.0064261.
15. Mavros MN, Xu L, Maqsood H, et al. Perioperative Blood Transfusion and the Prognosis of Pancreatic Cancer Surgery: Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Surg Oncol*. 2015;22(13):4382-4391. doi:10.1245/s10434-015-4823-6.
16. Nadeem R, Turkman B, Cha M. Impact of Perioperative Blood Transfusion on Survival Among Women With Breast Cancer. *Am J Ther*. 2018;25(5):e599-e600. doi:10.1097/MJT.0000000000000611.
17. Petrelli F, Ghidini M, Ghidini A, et al. Red blood cell transfusions and the survival in patients with cancer undergoing curative surgery: a systematic review and meta-analysis. *Surg Today*. 2021. doi:10.1007/s00595-020-02192-3.
18. Lyu X, Qiao W, Li D, Leng Y. Impact of perioperative blood transfusion on clinical outcomes in patients with colorectal liver metastasis after hepatectomy: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(25):41740-41748. doi:10.18632/oncotarget.16771.
19. Heslin MJ, Gaynor JJ, Newman E, et al. Effect of perioperative blood transfusion on recurrence and survival in 232 primary high-grade extremity sarcoma patients. *Ann Surg Oncol*. 1994;1(3):189-197. doi:10.1007/BF02303523.

20. Rosenberg SA, Seipp CA, White DE, Wesley R. Perioperative blood transfusions are associated with increased rates of recurrence and decreased survival in patients with high-grade soft-tissue sarcomas of the extremities. *J Clin Oncol.* 1985;3(5):698-709. doi:10.1200/JCO.1985.3.5.698.
21. Abel EJ, Linder BJ, Bauman TM, et al. Perioperative blood transfusion and radical cystectomy: does timing of transfusion affect bladder cancer mortality? *Eur Urol.* 2014;66(6):1139-1147. doi:10.1016/j.eururo.2014.08.051.
22. Hill AB. The Environment and Disease: Association or Causation? *Proc R Soc Med.* 1965;58(5):295-300.
23. Cannas G, Fattoum J, Raba M, et al. Transfusion dependency at diagnosis and transfusion intensity during initial chemotherapy are associated with poorer outcomes in adult acute myeloid leukemia. *Ann Hematol.* 2015;94(11):1797-1806. doi:10.1007/s00277-015-2456-2.
24. Horowitz M, Neeman E, Sharon E, Ben-Eliyahu S. Exploiting the critical perioperative period to improve long-term cancer outcomes. *Nat Rev Clin Oncol.* 2015;12(4):213-226. doi:10.1038/nrclinonc.2014.224.
25. Miyazono F, Natsugoe S, Takao S, et al. Surgical maneuvers enhance molecular detection of circulating tumor cells during gastric cancer surgery. *Ann Surg.* 2001;233(2):189-194. doi:10.1097/00000658-200102000-00007.
26. Hjalgrim H, Edgren G, Rostgaard K, et al. Cancer incidence in blood transfusion recipients. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(24):1864-1874. doi:10.1093/jnci/djm248.
27. Edgren G, Hjalgrim H, Reilly M, et al. Risk of cancer after blood transfusion from donors with subclinical cancer: a retrospective cohort study. *The Lancet.* 2007;369(9574):1724-1730. doi:10.1016/S0140-6736(07)60779-X.
28. Yang TO, Cairns BJ, Reeves GK, Green J, Beral V. Cancer risk among 21st century blood transfusion recipients. *Ann Oncol.* 2017;28(2):393-399. doi:10.1093/annonc/mdw555.
29. Cerhan JR, Engels EA, Cozen W, et al. Blood transfusion, anesthesia, surgery and risk of non-Hodgkin lymphoma in a population-based case-control study. *Int J Cancer.* 2008;123(4):888-894. doi:10.1002/ijc.23561.

30. Chow EJ, Holly EA. Blood transfusions as a risk factor for non-Hodgkin's lymphoma in the San Francisco Bay Area: a population-based study. *Am J Epidemiol.* 2002;155(8):725-731. doi:10.1093/aje/155.8.725.
31. Riedl R, Engels EA, Warren JL, Berghold A, Ricker W, Pfeiffer RM. Blood transfusions and the subsequent risk of cancers in the United States elderly. *Transfusion.* 2013;53(10):2198-2206. doi:10.1111/trf.12071.
32. Atzil S, Arad M, Glasner A, et al. Blood transfusion promotes cancer progression: a critical role for aged erythrocytes. *Anesthesiology.* 2008;109(6):989-997. doi:10.1097/ALN.0b013e31818ddb72.
33. Lin H-S, Samy RN, Lum J, Dorie MJ, Terris DJ. Effect of blood transfusion in an experimental sarcoma model. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002;128(3):308-312. doi:10.1001/archotol.128.3.308.
34. Zhang J, Chen S, Yan Y, et al. Extracellular Ubiquitin is the Causal Link between Stored Blood Transfusion Therapy and Tumor Progression in a Melanoma Mouse Model. *J Cancer.* 2019;10(12):2822-2835. doi:10.7150/jca.31360.
35. Minciocchi VR, Freeman MR, Di Vizio D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin Cell Dev Biol.* 2015;40:41-51. doi:10.1016/j.semcdb.2015.02.010.
36. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* 2009;19(2):43-51. doi:10.1016/j.tcb.2008.11.003.
37. Kaczmarek M, Grosicki M, Bulat K, et al. Temporal sequence of the human RBCs' vesiculation observed in nano-scale with application of AFM and complementary techniques. *Nanomedicine.* 2020;28:102221. doi:10.1016/j.nano.2020.102221.
38. Said AS, Doctor A. Influence of red blood cell-derived microparticles upon vasoregulation. *Blood Transfus.* 2017;15(6):522-534. doi:10.2450/2017.0353-16.
39. György B, Szabó TG, Pásztói M, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(16):2667-2688. doi:10.1007/s00018-011-0689-3.
40. Thangaraju K, Neerukonda SN, Katneni U, Buehler PW. Extracellular Vesicles from Red Blood Cells and Their Evolving Roles in Health,

- Coagulopathy and Therapy. *Int J Mol Sci.* 2020;22(1).
doi:10.3390/ijms22010153.
41. Westerman M, Porter JB. Red blood cell-derived microparticles: An overview. *Blood Cells Mol Dis.* 2016;59:134-139.
doi:10.1016/j.bcmd.2016.04.003.
42. Rubin O, Crettaz D, Canellini G, Tissot J-D, Lion N. Microparticles in stored red blood cells: an approach using flow cytometry and proteomic tools. *Vox Sang.* 2008;95(4):288-297. doi:10.1111/j.1423-0410.2008.01101.x.
43. Yuana Y, Bertina RM, Osanto S. Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles. *Thromb Haemost.* 2011;105(3):396-408.
doi:10.1160/TH10-09-0595.
44. Connor DE, Exner T, Ma DDF, Joseph JE. The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb Haemost.* 2010;103(5):1044-1052.
doi:10.1160/TH09-09-0644.
45. Kriebardis A, Antonelou M, Stamoulis K, Papassideri I. Cell-derived microparticles in stored blood products: innocent-bystanders or effective mediators of post-transfusion reactions? *Blood Transfus.* 2012;10 Suppl 2:s25-38. doi:10.2450/2012.006S.
46. Smalley DM, Sheman NE, Nelson K, Theodorescu D. Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer. *J Proteome Res.* 2008;7(5):2088-2096. doi:10.1021/pr700775x.
47. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(8):581-593.
doi:10.1038/nri2567.
48. Salzer U, Hinterdorfer P, Hunger U, Borken C, Prohaska R. Ca(++)-dependent vesicle release from erythrocytes involves stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII), and sorcin. *Blood.* 2002;99(7):2569-2577.
doi:10.1182/blood.v99.7.2569.
49. Lutz HU, Liu SC, Palek J. Release of spectrin-free vesicles from human erythrocytes during ATP depletion. I. Characterization of spectrin-free vesicles. *J Cell Biol.* 1977;73(3):548-560. doi:10.1083/jcb.73.3.548.

50. Canellini G, Rubin O, Delobel J, Crettaz D, Lion N, Tissot J-D. Red blood cell microparticles and blood group antigens: an analysis by flow cytometry. *Blood Transfus.* 2012;10 Suppl 2:s39-45. doi:10.2450/2012.007S.
51. Rubin O, Canellini G, Delobel J, Lion N, Tissot J-D. Red blood cell microparticles: clinical relevance. *Transfus Med Hemother.* 2012;39(5):342-347. doi:10.1159/000342228.
52. Manno S, Takakuwa Y, Mohandas N. Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(4):1943-1948. doi:10.1073/pnas.042688399.
53. Salzer U, Zhu R, Lutten M, et al. Vesicles generated during storage of red cells are rich in the lipid raft marker stomatin. *Transfusion.* 2008;48(3):451-462. doi:10.1111/j.1537-2995.2007.01549.x.
54. Hurley JH, Boura E, Carlson L-A, Różycki B. Membrane budding. *Cell.* 2010;143(6):875-887. doi:10.1016/j.cell.2010.11.030.
55. Bosch FH, Werre JM, Schipper L, et al. Determinants of red blood cell deformability in relation to cell age. *Eur J Haematol.* 1994;52(1):35-41. doi:10.1111/j.1600-0609.1994.tb01282.x.
56. Bocci V, Pessina GP, Paulesu L. Studies of factors regulating the ageing of human erythrocytes--III. Metabolism and fate of erythrocytic vesicles. *Int J Biochem.* 1980;11(2):139-142. doi:10.1016/0020-711x(80)90246-3.
57. Greenwalt TJ. The how and why of exocytic vesicles. *Transfusion.* 2006;46(1):143-152. doi:10.1111/j.1537-2995.2006.00692.x.
58. Bouchard BA, Orfeo T, Keith HN, et al. Microparticles formed during storage of red blood cell units support thrombin generation. *J Trauma Acute Care Surg.* 2018;84(4):598-605. doi:10.1097/TA.0000000000001759.
59. Almizraq RJ, Seghatchian J, Acker JP. Extracellular vesicles in transfusion-related immunomodulation and the role of blood component manufacturing. *Transfus Apher Sci.* 2016;55(3):281-291. doi:10.1016/j.transci.2016.10.018.
60. Piccin A, van Schilfgaarde M, Smith O. The importance of studying red blood cells microparticles. *Blood Transfus.* 2015;13(2):172-173. doi:10.2450/2014.0276-14.

61. Li K-Y, Zheng L, Wang Q, Hu Y-W. Characteristics of erythrocyte-derived microvesicles and its relation with atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2016;255:140-144. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.10.043.
62. Giannopoulos G, Oudatzis G, Paterakis G, et al. Red blood cell and platelet microparticles in myocardial infarction patients treated with primary angioplasty. *Int J Cardiol*. 2014;176(1):145-150. doi:10.1016/j.ijcard.2014.07.022.
63. Olatunya OS, Lanaro C, Longhini AL, et al. Red blood cells microparticles are associated with hemolysis markers and may contribute to clinical events among sickle cell disease patients. *Ann Hematol*. 2019;98(11):2507-2521. doi:10.1007/s00277-019-03792-x.
64. Antonyak MA, Li B, Boroughs LK, et al. Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(12):4852-4857. doi:10.1073/pnas.1017667108.
65. Giusti I, D'Ascenzo S, Millimaggi D, et al. Cathepsin B mediates the pH-dependent proinvasive activity of tumor-shed microvesicles. *Neoplasia*. 2008;10(5):481-488. doi:10.1593/neo.08178.
66. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*. 2008;10(12):1470-1476. doi:10.1038/ncb1800.
67. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol*. 2008;10(5):619-624. doi:10.1038/ncb1725.
68. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*. 2005;106(5):1604-1611. doi:10.1182/blood-2004-03-1095.
69. Noubouossie DF, Henderson MW, Mooberry M, et al. Red blood cell microvesicles activate the contact system, leading to factor IX activation via 2 independent pathways. *Blood*. 2020;135(10):755-765. doi:10.1182/blood.2019001643.

70. Fischer D, Büssow J, Meybohm P, et al. Microparticles from stored red blood cells enhance procoagulant and proinflammatory activity. *Transfusion*. 2017;57(11):2701-2711. doi:10.1111/trf.14268.
71. Rubin O, Delobel J, Prudent M, et al. Red blood cell-derived microparticles isolated from blood units initiate and propagate thrombin generation. *Transfusion*. 2013;53(8):1744-1754. doi:10.1111/trf.12008.
72. Koshlar RL, Somajo S, Norström E, Dahlbäck B. Erythrocyte-derived microparticles supporting activated protein C-mediated regulation of blood coagulation. *PLoS One*. 2014;9(8):e104200. doi:10.1371/journal.pone.0104200.
73. Burnouf T, Goubran HA, Chou M-L, Devos D, Radosevic M. Platelet microparticles: detection and assessment of their paradoxical functional roles in disease and regenerative medicine. *Blood Rev*. 2014;28(4):155-166. doi:10.1016/j.blre.2014.04.002.
74. Liu C, Zhao W, Christ GJ, Gladwin MT, Kim-Shapiro DB. Nitric oxide scavenging by red cell microparticles. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:1164-1173. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.09.002.
75. Saas P, Angelot F, Bardiaux L, Seilles E, Garnache-Ottou F, Perruche S. Phosphatidylserine-expressing cell by-products in transfusion: A pro-inflammatory or an anti-inflammatory effect? *Transfus Clin Biol*. 2012;19(3):90-97. doi:10.1016/j.tracli.2012.02.002.
76. Sadallah S, Eken C, Schifferli JA. Erythrocyte-derived ectosomes have immunosuppressive properties. *J Leukoc Biol*. 2008;84(5):1316-1325. doi:10.1189/jlb.0108013.
77. Danesh A, Inglis HC, Jackman RP, et al. Exosomes from red blood cell units bind to monocytes and induce proinflammatory cytokines, boosting T-cell responses in vitro. *Blood*. 2014;123(5):687-696. doi:10.1182/blood-2013-10-530469.
78. Muszynski JA, Bale J, Nateri J, et al. Supernatants from stored red blood cell (RBC) units, but not RBC-derived microvesicles, suppress monocyte function in vitro. *Transfusion*. 2015;55(8):1937-1945. doi:10.1111/trf.13084.
79. Belizaire RM, Prakash PS, Richter JR, et al. Microparticles from stored red blood cells activate neutrophils and cause lung injury after hemorrhage and

- resuscitation. *J Am Coll Surg*. 2012;214(4):648-55; discussion 656-7. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2011.12.032.
80. Rubin O, Crettaz D, Tissot J-D, Lion N. Pre-analytical and methodological challenges in red blood cell microparticle proteomics. *Talanta*. 2010;82(1):1-8. doi:10.1016/j.talanta.2010.04.025.
81. Jayachandran M, Miller VM, Heit JA, Owen WG. Methodology for isolation, identification and characterization of microvesicles in peripheral blood. *J Immunol Methods*. 2012;375(1-2):207-214. doi:10.1016/j.jim.2011.10.012.
82. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*. 2013;2. doi:10.3402/jev.v2i0.20360.
83. Szatanek R, Baran J, Siedlar M, Baj-Krzyworzeka M. Isolation of extracellular vesicles: Determining the correct approach (Review). *Int J Mol Med*. 2015;36(1):11-17. doi:10.3892/ijmm.2015.2194.
84. Linares R, Tan S, Gounou C, Arraud N, Brisson AR. High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:29509. doi:10.3402/jev.v4.29509.
85. Böing AN, van der Pol E, Grootemaat AE, Coumans FAW, Sturk A, Nieuwland R. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J Extracell Vesicles*. 2014;3. doi:10.3402/jev.v3.23430.
86. Mol EA, Goumans M-J, Doevendans PA, Sluijter JPG, Vader P. Higher functionality of extracellular vesicles isolated using size-exclusion chromatography compared to ultracentrifugation. *Nanomedicine*. 2017;13(6):2061-2065. doi:10.1016/j.nano.2017.03.011.
87. Tissot J-D, Canellini G, Rubin O, et al. Blood microvesicles: From proteomics to physiology. *Translational Proteomics*. 2013;1(1):38-52. doi:10.1016/j.trprot.2013.04.004.
88. Xiong Z, Oriss TB, Cavaretta JP, Rosengart MR, Lee JS. Red cell microparticle enumeration: validation of a flow cytometric approach. *Vox Sang*. 2012;103(1):42-48. doi:10.1111/j.1423-0410.2011.01577.x.
89. Goubran H, Sheridan D, Radosevic J, Burnouf T, Seghatchian J. Transfusion-related immunomodulation and cancer. *Transfus Apher Sci*. 2017;56(3):336-340. doi:10.1016/j.transci.2017.05.019.

90. Vamvakas EC, Blajchman MA. Transfusion-related immunomodulation (TRIM): an update. *Blood Rev.* 2007;21(6):327-348. doi:10.1016/j.blre.2007.07.003.
91. Opelz G, Sengar DP, Mickey MR, Terasaki PI. Effect of blood transfusions on subsequent kidney transplants. *Transplant Proc.* 1973;5(1):253-259.
92. Opelz G, Terasaki PI. Improvement of kidney-graft survival with increased numbers of blood transfusions. *N Engl J Med.* 1978;299(15):799-803. doi:10.1056/NEJM197810122991503.
93. Gantt CL. Red blood cells for cancer patients. *The Lancet.* 1981;2(8242):363. doi:10.1016/s0140-6736(81)90673-5.
94. Aquina CT, Blumberg N, Becerra AZ, et al. Association Among Blood Transfusion, Sepsis, and Decreased Long-term Survival After Colon Cancer Resection. *Ann Surg.* 2017;266(2):311-317. doi:10.1097/SLA.0000000000001990.
95. Seghatchian J. Universal leucodepletion: an overview of some unresolved issues and the highlights of lessons learned. *Transfusion and Apheresis Science.* 2003;29(2):105-117. doi:10.1016/S1473-0502(03)00112-5.
96. Baumgartner JM, Nydam TL, Clarke JH, Banerjee A, Silliman CC, McCarter MD. Red blood cell supernatant potentiates LPS-induced proinflammatory cytokine response from peripheral blood mononuclear cells. *J Interferon Cytokine Res.* 2009;29(6):333-338. doi:10.1089/jir.2008.0072.
97. Baumgartner JM, Silliman CC, Moore EE, Banerjee A, McCarter MD. Stored red blood cell transfusion induces regulatory T cells. *J Am Coll Surg.* 2009;208(1):110-119. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2008.08.012.
98. Patel MB, Proctor KG, Majetschak M. Extracellular ubiquitin increases in packed red blood cell units during storage. *J Surg Res.* 2006;135(2):226-232. doi:10.1016/j.jss.2006.04.037.
99. Silliman CC, Clay KL, Thurman GW, Johnson CA, Ambruso DR. Partial characterization of lipids that develop during the routine storage of blood and prime the neutrophil NADPH oxidase. *J Lab Clin Med.* 1994;124(5):684-694.
100. Fox LM, Cox DG, Lockridge JL, et al. Recognition of lyso-phospholipids by human natural killer T lymphocytes. *PLoS Biol.* 2009;7(10):e1000228. doi:10.1371/journal.pbio.1000228.

101. Carosella ED, Dausset J, Rouas-Freiss N. Transplacental transmission of natural-killer-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 1999;341(25):1937. doi:10.1056/nejm199912163412514.
102. Gärtner HV, Seidl C, Luckenbach C, et al. Genetic analysis of a sarcoma accidentally transplanted from a patient to a surgeon. *N Engl J Med.* 1996;335(20):1494-1496. doi:10.1056/NEJM199611143352004.
103. Utter GH, Reed WF, Lee T-H, Busch MP. Transfusion-associated microchimerism. *Vox Sang.* 2007;93(3):188-195. doi:10.1111/j.1423-0410.2007.00954.x.
104. Chen Y, Williams V, Filippova M, Filippov V, Duerksen-Hughes P. Viral carcinogenesis: factors inducing DNA damage and virus integration. *Cancers (Basel).* 2014;6(4):2155-2186. doi:10.3390/cancers6042155.
105. Murphy EL. Infection with human T-lymphotropic virus types-1 and -2 (HTLV-1 and -2): Implications for blood transfusion safety. *Transfus Clin Biol.* 2016;23(1):13-19. doi:10.1016/j.tracli.2015.12.001.
106. Kühn. Transfusion-Associated Infections with Cytomegalovirus and Other Human Herpesviruses. *Infusionsther Transfusionsmed.* 2000;27(3):138-143. doi:10.1159/000025258.
107. Alfieri C, Tanner J, Carpentier L, et al. Epstein-Barr virus transmission from a blood donor to an organ transplant recipient with recovery of the same virus strain from the recipient's blood and oropharynx. *Blood.* 1996;87(2):812-817. doi:10.1182/blood.V87.2.812.bloodjournal872812.
108. Hladik W, Dollard SC, Mermin J, et al. Transmission of human herpesvirus 8 by blood transfusion. *N Engl J Med.* 2006;355(13):1331-1338. doi:10.1056/NEJMoa055009.
109. Michels G. Transfusionsmedizin. In: Michels G, Kochanek M, eds. *Repetitorium Internistische Intensivmedizin.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2017:135-152.
110. Simancas-Racines D, Osorio D, Martí-Carvajal AJ, Arevalo-Rodriguez I. Leukoreduction for the prevention of adverse reactions from allogeneic blood transfusion. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;(12):CD009745. doi:10.1002/14651858.CD009745.pub2.

111. Jabbour E, Kantarjian HM, Koller C, Taher A. Red blood cell transfusions and iron overload in the treatment of patients with myelodysplastic syndromes. *Cancer*. 2008;112(5):1089-1095. doi:10.1002/cncr.23280.
112. Torti SV, Manz DH, Paul BT, Blanchette-Farra N, Torti FM. Iron and Cancer. *Annu Rev Nutr*. 2018;38:97-125. doi:10.1146/annurev-nutr-082117-051732.
113. Jy W, Ricci M, Shariatmadar S, Gomez-Marin O, Horstman LH, Ahn YS. Microparticles in stored red blood cells as potential mediators of transfusion complications. *Transfusion*. 2011;51(4):886-893. doi:10.1111/j.1537-2995.2011.03099.x.
114. Khorana AA, Francis CW, Blumberg N, Culakova E, Refaai MA, Lyman GH. Blood transfusions, thrombosis, and mortality in hospitalized patients with cancer. *Arch Intern Med*. 2008;168(21):2377-2381. doi:10.1001/archinte.168.21.2377.
115. Hayon Y, Dashevsky O, Shai E, Brill A, Varon D, Leker RR. Platelet microparticles induce angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia. *Curr Neurovasc Res*. 2012;9(3):185-192. doi:10.2174/156720212801619018.
116. Size Exclusion Chromatography - Principles and Methods. GE Healthcare.
<https://cdn.cytivalifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=11639> Zugriff: 03.03.2021.
117. Rothe G. Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. In: Sack U, Tárnok A, Rothe G, eds. *Zelluläre Diagnostik*. Basel: KARGER; 2006:27-70.
118. Megamix-Plus SSC. BioCytex.
https://search.cosmobio.co.jp/cosmo_search_p/search_gate2/docs/BCT_/7803.20131129.pdf Zugriff: 03.03.2021.
119. Bachurski D, Schuldner M, Nguyen P-H, et al. Extracellular vesicle measurements with nanoparticle tracking analysis - An accuracy and repeatability comparison between NanoSight NS300 and ZetaView. *J Extracell Vesicles*. 2019;8(1):1596016. doi:10.1080/20013078.2019.1596016.

120. Vestad B, Llorente A, Neurauter A, et al. Size and concentration analyses of extracellular vesicles by nanoparticle tracking analysis: a variation study. *J Extracell Vesicles*. 2017;6(1):1344087. doi:10.1080/20013078.2017.1344087.
121. Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine*. 2011;7(6):780-788. doi:10.1016/j.nano.2011.04.003.
122. QuantiChrom Iron Assay Kit (DIFE-250). BioAssay Systems. <https://www.bioassaysys.com/datasheet/DIFE.pdf> Zugriff 16.03.2021.
123. Cell Proliferation Reagent WST-1. Roche. Version 17. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/Bulletin/1/cellprorobul.pdf> Zugriff: 18.02.2021.
124. Guy J-B, Espenel S, Vallard A, et al. Evaluation of the Cell Invasion and Migration Process: A Comparison of the Video Microscope-based Scratch Wound Assay and the Boyden Chamber Assay. *J Vis Exp*. 2017;(129). doi:10.3791/56337.
125. Uggeri J, Gatti R, Belletti S, et al. Calcein-AM is a detector of intracellular oxidative activity. *Histochem Cell Biol*. 2004;122(5):499-505. doi:10.1007/s00418-004-0712-y.
126. Lyons AB. Divided we stand: tracking cell proliferation with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunol Cell Biol*. 1999;77(6):509-515. doi:10.1046/j.1440-1711.1999.00864.x.
127. Tario JD, Humphrey K, Bantly AD, Muirhead KA, Moore JS, Wallace PK. Optimized staining and proliferation modeling methods for cell division monitoring using cell tracking dyes. *J Vis Exp*. 2012;(70):e4287. doi:10.3791/4287.
128. Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Thermo Fisher Scientific. Revision B.0. https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf Zugriff: 19.02.2021.

129. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685.
doi:10.1038/227680a0.
130. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(9):4350-4354.
doi:10.1073/pnas.76.9.4350.
131. Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell. Bio-Rad. <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1703930.pdf> Zugriff: 19.02.2021.
132. Beurel E, Grieco SF, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther*. 2015;148:114-131.
doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.016.
133. Chen J-S, Huang J-Q, Luo B, et al. PIK3CD induces cell growth and invasion by activating AKT/GSK-3 β / β -catenin signaling in colorectal cancer. *Cancer Sci*. 2019;110(3):997-1011. doi:10.1111/cas.13931.
134. Stoimenov I, Helleday T. PCNA on the crossroad of cancer. *Biochem Soc Trans*. 2009;37(Pt 3):605-613. doi:10.1042/BST0370605.
135. Yue S-Q, Yang Y-L, Dou K-F, Li K-Z. Expression of PCNA and CD44mRNA in colorectal cancer with venous invasion and its relationship to liver metastasis. *World J Gastroenterol*. 2003;9(12):2863-2865.
doi:10.3748/wjg.v9.i12.2863.

7 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei PD Dr. med. Dania Fischer für die ausgezeichnete Betreuung dieser Dissertation und Dr. Jessica Roos für ihre Unterstützung und wissenschaftliche Supervision.

Ich danke zudem meinen Kolleginnen Camilla Brat und Nadine Hellmuth für die großartige Zusammenarbeit.

Großer Dank geht auch an all meine langjährigen Freundinnen und Freunde für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und für Momente der Zerstreuung.

Der größte Dank gilt meinen Eltern Gerd und Annekatriin für deren stetige Unterstützung in jeder Lebensphase. Ich danke ihnen und meiner Schwester Maje sowie meinem Bruder Clemens für den familiären Rückhalt, ohne den das Schreiben dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

8 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Einfluss erythrozytärer Mikropartikel auf das Wachstum der Kolonkarzinomzelllinie HCT-116

in der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie unter Betreuung und Anleitung von PD Dr. Dania Fischer mit Unterstützung durch Dr. Jessica Roos ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)