

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin

Auswirkung ischämischer Fernkonditionierung auf Apoptose und  
Aufnahme Extrazellulärer Vesikel in immortalisierten Kardiomyozyten

In a u g u r a l D i s s e r t a t i o n  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Morten Gaida  
aus Heide

2021

# DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT  
DUISBURG  
ESSEN

*Offen im Denken*

ub | universitäts  
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

**DOI:** 10.17185/duepublico/75223

**URN:** urn:nbn:de:hbz:464-20220126-082443-2



Dieses Werk kann unter einer Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell - Keine Bearbeitungen 4.0 Lizenz (CC BY-NC-ND 4.0) genutzt werden.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer  
1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. U. Frey  
2. Gutachter: Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. U. Hendgen-Cotta

Tag der mündlichen Prüfung: 24. November 2021

Ergebnisse dieser Doktorarbeit wurden bereits präsentiert und publiziert:

Abel, F., Murke, F., Gaida, M., Garnier, N., Ochsenfarth, C., Theiss, C., Thielmann, M., Kleinbongard, P., Giebel, B., Peters, J., & Frey, U. H. (2020): Extracellular vesicles isolated from patients undergoing remote ischemic preconditioning decrease hypoxia-evoked apoptosis of cardiomyoblasts after isoflurane but not propofol exposure. *PLoS one*, 15(2), e0228948

Gaida, M., Giebel, B., Ochsenfarth, C., Thielmann, M., Kottenberg, E., Heusch, G., Kleinbongard, P., Engler, A., Peters, J., & Frey, U. H. (2017): Auswirkung ischämischer Fernkonditionierung auf Apoptose und Aufnahme extrazellulärer Vesikel in immortalisierten Kardiomyozyten. Poster-Präsentation, 16. Tag der Forschung, 17. November 2017, Essen, Universitätsklinikum Essen

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>6</b>
1.1. Aufbau und Funktion des Herzens .....	6
1.2. Myokardiale Ischämie & Reperfusionsschäden .....	6
1.3. Kardioprotektion durch RIPC und volatile Anästhetika .....	7
1.4. Extrazelluläre Vesikel und ihre kardiale Bedeutung .....	9
1.5. Gegenstand dieser Arbeit .....	12
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>13</b>
2.1. Material .....	13
2.1.1. Geräte.....	13
2.1.2. Inkubationskammer.....	14
2.1.3. Gasmische und volatile Anästhetika.....	14
2.1.4. Überwachung der Versuchsbedingungen .....	14
2.1.5. Reagenzien, Kits und Chemikalien.....	16
2.1.6. Medien .....	16
2.1.7. Zelllinie .....	17
2.1.8. Biologisches Material .....	17
2.1.9. Verbrauchsmaterialien .....	19
2.1.10. Software .....	19
2.2. Methoden .....	20
2.2.1. Zellkultur.....	20
2.2.2. Anreicherung Extrazellulärer Vesikel.....	20
2.2.3. Quantifizierung und Aufbereitung Extrazellulärer Vesikel .....	22
2.2.4. Endotoxin Testung.....	23
2.2.5. EV-Labeling und Fluoreszenzmikroskopie.....	25
2.2.6. Konditionierung mit Gasmischen .....	29
2.2.7. Caspase 3/7-Aktivitätsmessung.....	29
2.2.8. Statistische Methode.....	35
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
3.1. Konzentration Extrazellulärer Vesikel.....	36
3.2. Aufnahme Extrazellulärer Vesikel in H9c2-Zellen .....	37
3.3. Caspase 3/7-Aktivität unter Hypoxie-Bedingungen und Serumdeprivation.....	40
3.3.1. Hypoxie und Caspase-Aktivität.....	41
3.3.2. Serumentzug und Caspase-Aktivität unter Normoxie .....	42

3.3.3.	Caspase-Aktivität nach Normoxie versus Hypoxie und Serumentzug .....	43
3.3.4.	Caspase-Aktivität nach Serumentzug .....	44
3.4.	Einfluss RIPC angereicherter EVs auf Apoptose in H9c2-Zellen .....	45
3.5.	Einfluss von Isofluran und EVs .....	47
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>48</b>
4.1.	EV-Konzentrationsanstieg nach RIPC.....	48
4.2.	Aufnahmeversuche zur Etablierung der Konzentration und Inkubationsdauer .....	49
4.3.	Einfluss von EVs auf Apoptose.....	51
4.4.	Perspektive für die Zukunft.....	55
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>56</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>57</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>64</b>
7.1.	Abbildungsverzeichnis .....	64
7.2.	Tabellenverzeichnis .....	65
7.3.	Abkürzungsverzeichnis .....	66
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>67</b>

## **1. Einleitung**

### **1.1. Aufbau und Funktion des Herzens**

Kontraktile Einheit des Herzens ist das Myokard, ein funktioneller Zusammenschluss quergestreifter Muskelzellen. Sie werden über das kardiale Reizleitungssystem zur periodischen Kontraktionsarbeit synchron erregt. Dadurch wird Blut aus dem rechten Ventrikel in den Lungenkreislauf und anschließend zum linken Herzen bewegt. Der linke Ventrikel pumpt Blut in den Körperkreislauf. Gleichzeitig findet ein venöser Rücktransport zum rechten Herzen statt. Durch diesen Kreislauf wird die Versorgung des Körpergewebes mit Blutbestandteilen wie Sauerstoff und Stoffwechselfsubstraten sowie der Abtransport verschiedener Stoffwechselendprodukte erreicht.

Voraussetzung für diese lebenswichtige Funktion des Herzens ist die kontinuierliche Versorgung des Myokards mit Sauerstoff und Substraten über die Herzkranzgefäße. Verschiedene pathophysiologische Prozesse können durch Reduktion der Perfusion dieser arteriellen Gefäße eine Erniedrigung des arteriellen O<sub>2</sub>-Gehaltes (Hypoxie) und der Gewebedurchblutung (Ischämie) zur Folge haben. Dies führt zu einem Missverhältnis zwischen kardialem Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot. Kardiale Kompensationsmechanismen wie die Steigerung der Herzfrequenz, der kardialen Schlagkraft sowie der O<sub>2</sub>-Utilisation können nur bis zu einem gewissen Grad das Gleichgewicht in der Versorgung des Myokards gewährleisten (Hall, 2016).

### **1.2. Myokardiale Ischämie & Reperfusionsschäden**

Mit 17,5 Millionen Toten im Jahr 2012 sind kardiovaskuläre Erkrankungen (CVDs = cardiovascular diseases) nach Daten der WHO die führende Todesursache weltweit (WHO 2014). CVDs können über einen langen Zeitraum progressiv in eine chronische Herzinsuffizienz münden oder akut als Myokardinfarkt (MI), also dem Untergang von Myokardgewebe durch lokalisierte Durchblutungsstörung, auftreten. Die beim MI auftretende akute ischämische Unterversorgung der Herzmuskulatur durch den Verschluss von Herzkranzgefäßen führt zu einem Mangel an Sauerstoff und Substraten, die für die normale

Herztätigkeit unablässig sind. Durch ein Absterben des Muskelgewebes sind Morbidität und der Tod mögliche Folgen.

Therapeutisches Ziel ist es daher, bei koronararterieller Okklusion eine Reperfusion des betroffenen Gewebes, beispielsweise durch medikamentöse Thrombolyse, perkutane koronare Interventionen (PCI) oder koronararteriellen-bypass Operationen (coronary artery bypass grafting = CABG) zu erreichen. Die Reperfusion kann jedoch zu eigenständigen Prozessen der Gewebeschädigung führen (Ferrari et al., 2017; Hausenloy & Yellon, 2013). Oxidativer Stress und ein Überangebot an Calcium kann zu kontraktile Dysfunktion des Myokards (myokardiales Stunning) führen (Kloner et al., 1998). Weitere Mechanismen sind kardiale Arrhythmien (Hearse & Tosaki, 1987) sowie mikrovaskuläre und endotheliale Dysfunktionen (Granger, 1999). Die Pathomechanismen der Ischämie/Reperfusionsschäden weisen unter anderem bei Patienten im Rahmen von koronararteriellen-Bypass Operationen eine hohe klinische Relevanz auf (Verma et al., 2002). Ziel eines CABG-Eingriffs ist es, bei Patienten mit Myokardinfarkt eine stenosierte Koronararterie mittels autologem Gefäßtransplantat (venös oder arteriell) zu umgehen und das poststenotische Gewebe zu revaskularisieren. Dieses Verfahren kann die klinische Prognose bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit verbessern (Alexander & Smith, 2016). Allerdings wird eine kardiale Schädigung durch Reperfusion im Rahmen von CABG ebenfalls diskutiert (Thielmann et al., 2005).

### **1.3. Kardioprotektion durch RIPC und volatile Anästhetika**

Obwohl eine zügige Reperfusion eine Strategie der Kardioprotektion darstellt, kann die Reperfusion selbst Myokardschädigungen hervorrufen (Heusch, 2015). Ein Manöver, welches perioperativ myokardiale Schäden der Ischämie/Reperfusion (I/R) am Herzen reduzieren könnte, ist die ischämische Fern-Präkonditionierung (Remote Ischemic Preconditioning = RIPC) (Heusch, 2013). Die RIPC ist ein Oberbegriff für einen Effekt, bei dem durch kurze Episoden nicht letaler Ischämien und Reperfusionen an einer ischämierobusten Körperstelle, möglicherweise ein Schutz gegen eine nachfolgende und länger andauernde potentiell tödliche I/R-Phase in vulnerabilem Gewebe wie dem Herzen induziert wird (Albrecht, 2016).

Der erste Hinweis auf einen kardioprotektiven Effekt einer ischämischen Konditionierung des Herzens wurde erstmals vor über 30 Jahren von Murry und Reimer im Tiermodell demonstriert. Die Koronargefäße von Hunden wurden in 4 Zyklen abwechselnd 5 Minuten okkludiert und 5 Minuten reperfundiert. Nach einer Ischämiephase von 40 Minuten zeigte sich eine Reduktion der Infarktgröße um 25 %, im Gegensatz zur Kontrollgruppe ohne intermittierende Koronarokklusionen (Murry et al., 1986). Seitdem wurde das Phänomen in verschiedenen tierexperimentellen Ansätzen überzeugend nachgewiesen (Przyklenk et al., 1993; Zhao et al., 2003). Auch eine Fernkonditionierung durch wiederholte ischämische Phasen der Nierenarterien (Gho et al., 1996) oder in der Skelettmuskulatur (Birnbaum et al., 1997) wies einen kardioprotektiven Effekt im Tiermodell auf.

Nach der erstmaligen Übertragung der ischämischen Fernkonditionierung beim Menschen durch Hausenloy et al. (2007), zeigten verschiedene klinische Studien Hinweise einer protektiven Wirkung durch eine Verbesserung der Gesamtprognose sowie Senkung von Troponin und CK-MB (Kleinbongard et al., 2018; Le Page et al., 2015; Thielmann et al., 2013), welche kardiale Marker der Herzschädigung darstellen (Basit & Huecker, 2019). Die RIPC-Technik scheint adaptive Reaktionen zu induzieren, welche die Fähigkeit des Herzens einer länger anhaltenden Ischämie standzuhalten beträchtlich erhöht (Kleinbongard et al., 2017). In der klinischen Praxis kann eine Fern-Konditionierung durch wiederholtes suprasystolisches Aufpumpen und wieder Ablassen einer Blutdruckmanschette am Arm präoperativ durchgeführt werden (Thielmann et al., 2010).

Jedoch zeigen sich die Daten zur Effektivität der RIPC im Rahmen von CABG-Operationen und einem Infarktgeschehen in verfügbaren Studien widersprüchlich: Es konnte gezeigt werden, dass nach aortokoronaren Bypass-Operationen mit vorrangegangener RIPC sowohl die postoperative kardiale Serum-Troponin-Konzentration vermindert (Thielmann et al., 2010) als auch die Prognose von Patienten (Kottenberg et al., 2012; Thielmann et al., 2013) verbessert war. Im Gegensatz dazu, konnten jedoch zwei multizentrische Phase III Studien („ERICCA“, „RIPHeart“) keinen Hinweis bezüglich eines kardioprotektiven Effekts der RIPC bestätigen (Hausenloy et al., 2015; Meybohm et al., 2015). Jedoch wurde in beiden letzteren Studien bei 90 % der Patienten während der Operation

Propofol als Anästhetikum verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass eine Fern-Präkonditionierung mit Senkung der Konzentration des kardialen Markers Troponin I nur unter Isoflurannarkose nachweisbar ist, nicht aber unter Propofol-Anästhesie (Kottenberg et al. 2012; Kottenberg et al., 2014). Darüber hinaus konnte eine Meta-Analyse klinischer Studien mit einem Patientenkollektiv von insgesamt 2996 Personen nach einer Herzoperation unter volatilen Anästhetika im Vergleich zu einer totalen intravenösen Anästhesie (TIVA) mit Propofol eine Reduktion der postoperativen Letalität von 2,6 % auf 1,3 % nachweisen (Landoni et al., 2013).

Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass volatile Anästhetika für einen kardioprotektiven Effekt durch ischämische Fern-Präkonditionierung erforderlich sein könnten (Kottenberg et al., 2012; Thielmann et al., 2013). Dies scheint insbesondere bei Patienten mit hohem perioperativen Ischämierisiko zu gelten (Zaugg et al., 2014). Propofol hingegen scheint den RIPC-Effekt über einen noch zu entschlüsselnden Mechanismus offenbar außer Kraft zu setzen (Bautin et al., 2014; Heusch, 2013; Zangrillo et al., 2015).

#### **1.4. Extrazelluläre Vesikel und ihre kardiale Bedeutung**

Die Effektivität der eigenständigen RIPC in Verbindung mit einer Selektion der Narkoseart wird durch bislang vorliegende Studien unterstrichen. Jedoch sind die genauen Mechanismen der ischämischen Präkonditionierung (IPC), insbesondere auf molekularer Ebene, noch nicht grundlegend bekannt. Diskutiert werden unter anderem neuronale, aber auch humorale Faktoren (Heusch, 2015; Kleinbongard et al., 2017; Rassaf et al., 2014). Als Kandidaten einer humoralen Zell-Zell-Kommunikation scheinen auch Extrazelluläre Vesikel (EV) im Sinne eines Transfers protektiver RIPC-Effekte auf das Myokard eine Rolle zu spielen (Gircz et al., 2014; Vicencio et al., 2015).

Die Bezeichnung „Extrazelluläre Vesikel“ (EV) ist ein Oberbegriff für verschiedene 40 nm bis mehrere Mikrometer große membrangebundene Strukturen, die vermutlich von allen Organismen und Zelltypen über verschiedene Wege sezerniert werden. Die wohl bekanntesten Vertreter hiervon sind Mikrovesikel und Exosomen. Exosomen haben eine Größe von circa 70 bis 150 nm und werden durch den intrazellulären Zusammenschluss

von intraluminalen Vesikeln, welche im Reifungsprozess von Endosomen entstehen, zu multivesikulären Körpern (MVC = multivesicular bodies) gebildet. Durch die Verschmelzung von MVC und Zell-Plasmamembran werden sie in die extrazelluläre Umgebung sezerniert und interagieren anschließend gezielt mit verschiedensten Zelltypen. Mikrovesikel sind EVs mit einer Größe von 100 bis 1000 nm und werden durch ein nach außen Stülpen der Plasmamembran freigesetzt (Lener et al., 2015). Extrazelluläre Vesikel können je nach Ursprungsgewebe als Transporter für verschiedenste Lipide, Proteine sowie Mikro-RNA fungieren (Lawson et al., 2016; Raposo & Stoorvogel, 2013).

Der Begriff „Exosomen“ wird häufig uneinheitlich als Synonym für Extrazelluläre Vesikel verwendet, auch wenn ein Beweis des Ursprungs jener Vesikel häufig nicht klar ist. Auch fehlen größtenteils spezifische und einheitliche Isolations- und Detektionsprotokolle, welche vor allem Exosomen und Mikrovesikel nach ihrer Größe, Struktur und Proteinzusammensetzung klar unterscheiden (Colombo et al., 2014; Gould & Raposo, 2013; Sluijter et al., 2018). Daher wird in der vorliegenden Arbeit - wie im EV-Forschungsbereich mittlerweile üblich - der Begriff „Extrazelluläre Vesikel“ bevorzugt (van der Pol et al., 2016). Hierdurch sind auch Exosomen integriert und eine Ausgrenzung anderer möglicher Vesikel in der heterogenen Gruppe der EVs kann terminologisch vermieden werden.

Das Verständnis der pathophysiologischen Bedeutung von EVs ist bisher noch in ihren Anfängen. Jedoch scheint die Signalübertragung durch EVs, neben schon weitreichend erforschten Molekülen wie zum Beispiel Hormonen, Wachstumsfaktoren und Chemokinen, eine weitere komplexe Form der direkten Zell-Zell-Kommunikation darzustellen und in essentielle physiologische und pathophysiologische Prozesse involviert zu sein (van der Pol et al., 2016; Yáñez-Mó et al., 2015). Neben Hinweisen bezüglich eines Effekts in der Anti-Tumor-Therapie (Kosaka et al., 2013), bei Entzündungen (Robbins et al., 2016) oder als mögliche Kandidaten für die Immunisierung gegen Krankheitserreger (Roy et al., 2011), erlangten Extrazelluläre Vesikel auch im kardiovaskulären Bereich Beachtung (Davidson et al., 2017; Lawson et al., 2016; Lener et al., 2015; Xu et al., 2017). EVs aus dem Kulturmedium mesenchymaler Stammzellen reduzierten die kardiale Infarktgröße und steigerten die myokardiale Kapillardichte nach einer

Ischämie/Reperfusionphase im Mausmodell (Lai et al., 2010) sowie bei Schweinen (Timmers et al., 2011). In einem Review von Yellon und Davidson wurde angenommen, dass EVs auch eine Komponente humoraler Mechanismen der ischämischen Fern-Präkonditionierung sind (Yellon & Davidson, 2014). Giricz et al. (2014) bestätigten diese Annahme eindrücklich, indem sie erstmalig zeigten, dass EVs nach IPC für einen kardioprotektiven Effekt notwendig sind: I/R-exponierte Rattenherzen erhielten im Langendorff-Modell Extrazelluläre Vesikel, welche nach IPC (3 x 5 min Ischämie/Reperfusion) gewonnen wurden und eine erhöhte Konzentration aufwiesen. Hier zeigte sich eine Reduktion der Infarktgröße gegenüber Kontrollen ohne IPC-EVs. Bei gesunden Probanden konnte ein Anstieg plasmatischer EV-Konzentrationen nach 3 x 5-minütiger RIPC gezeigt werden. Diese humanen EVs wurden isoliert und vermittelten einen kardioprotektiven Effekt an Rattenherzen (in vivo) und Kardiomyozyten (Vicencio et al., 2015).

## **1.5. Gegenstand dieser Arbeit**

Die Schädigung des Myokards durch Ischämie und Reperfusion stellt im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen und ihrer Behandlung eine große prognostische Bedrohung für Patienten dar (Kleinbongard et al., 2018). Auch sind CVDs allgemein aufgrund ihrer weltweiten Häufigkeit in Morbidität und Mortalität eine hohe finanzielle Belastung von Gesundheitssystemen (Walker et al., 2018). Daher ist es von großer Bedeutung, mögliche protektive Strategien wie die ischämische Fern-Präkonditionierung auf humoraler Ebene zu verstehen, um in der Zukunft weitere gezielte Behandlungskonzepte zu entwickeln.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit soll daher sein, den Einfluss humaner EVs koronar-kranker Patienten nach RIPC auf die Apoptose von Kardiomyozyten unter simulierten ischämischen Bedingungen zu untersuchen. Vicencio et al. (2015) konnten bereits einen Anstieg humaner Plasma-EVs sowie einen möglichen kardioprotektiven Effekt nach Behandlung mit nach RIPC isolierten EVs bei Kardiomyozyten unter Ischämie/Reperfusionsbedingungen zeigen. Daher sollen zunächst jene Erkenntnisse bei immortalisierten Kardiomyozyten (H9c2) nachvollzogen werden. Zusätzlich wollen wir testen, ob eine Isofluranexposition von H9c2-Zellen einen alleinigen schützenden Einfluss vermittelt, beziehungsweise diesen in Kombination mit einer EV-Behandlung verändert. Schließlich soll eine mögliche Aufnahme Extrazellulärer Vesikel durch Kardiomyozyten untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte

Zentrifugen	Centrifuge 5804 R Centrifuge 5424 R	Eppendorf, Hamburg, DE
Wasserbad	Inkubations-/Inaktivierungsbad 1003	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, DE
Mikroskope	Axio Vert.A1 Zeiss Axio Observer.Z1+Apotome	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Vortex	VV3 S040 Reax 2000	VWR, Pennsylvania, USA Heidolph, Schwabach, DE
Thermocycler	ThermoMixer C	Eppendorf, Hamburg, DE
Inkubationskammer	Modular Incubator Chamber	Billups-Rothenberg Inc., Del Mar, USA
Thermometer	Thermalert Model TH 8	Physitemp, Clifton, USA
Narkosegasmonitor	Dräger Vamos	Dräger, Lübeck, DE
Narkosegasfilter	NovaSorb	Novamed, Elmsford, USA
Mikroplattenleser	TriStar2 LB 942 Multimode Reader	Berthold Technologies, Bad Wildbad, DE
Brutschrank	Heracell 150i, CO <sub>2</sub> Incubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Multipipette	Multipipette E3	Eppendorf, Hamburg, DE
Autoklav	Systec VX-65	Systec Lab, Linden, DE
Vibrationsschüttler	IKA Vibrax VXR S6	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE
Inkubator	Heratherm IMC 18	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, DE
Nanopartikel Tracking-Analysator	ZetaView®	Particle Metrix GmbH, Meerbusch, DE

### **2.1.2. Inkubationskammer**

Die Behandlung der Zellen mit hypoxischem beziehungsweise normoxischem Gas sowie Isofluran erfolgte in einer Billups-Rothenberg Kammer (MIC-101, Billups-Rothenberg Inc., Del Mar, USA). Diese verfügt über Ein- und Auslassventile. Die Zuführung und Ableitung der Gasgemische erfolgte über eine eigens konstruierte Leitung aus Mehrweg-Narkosegasschläuchen (Dräger, Lübeck, DE). Den ableitenden Schläuchen schließt sich ein NovaSorb Narkosegasfilter (Nova Med, Düsseldorf, DE) an. Die Ein- und Auslassventile wurden mittels Gummistopfen gasdicht verschlossen.

### **2.1.3. Gasgemische und volatile Anästhetika**

Verwendet wurden normoxische (5 % CO<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub>, 74 % Stickstoff) sowie hypoxische (5 % CO<sub>2</sub>, 1 % O<sub>2</sub>, 94 % Stickstoff) Gasgemische. Das normoxische Gas war in 50 L Flaschen, das hypoxische Gas in 15 L Flaschen abgefüllt (Air Liquide, Düsseldorf, DE). Über einen Druckminderer (Messer Industriegase GmbH, Bad Soden, DE) mit nachgeschaltetem Schwebekörper-Durchflussmesser (Dräger, Lübeck, DE) konnte der Volumenstrom des Gases kontrolliert werden. Eine Anreicherung des einströmenden Gases mit Isofluran (AbbVie, Ludwigshafen, DE) wurde über einen Narkosemittelverdampfer (Dräger, Lübeck, DE) reguliert.

### **2.1.4. Überwachung der Versuchsbedingungen**

Um gleichbleibende Versuchsbedingungen bei jeder Spülung mit verschiedenen Gasgemischen innerhalb der Inkubationskammer zu gewährleisten, wurde die Temperatur, CO<sub>2</sub>- und Isofluran-Konzentration überwacht und konstant gehalten.

Die Temperatur wurde durch ein digitales Thermometer (Thermalert Model TH-8, Clifton, USA) erfasst, dessen Messsonde innerhalb des ableitenden Schlauchs eingebracht und bis direkt vor das Auslassventil der Inkubationskammer vorgeschoben wurde.

Eine mit metallisierter Plastikfolie (W. Söhngen GmbH, Taunusstein, DE) ausgekleidete verschließbare Kiste (Eigenkonstruktion) diente zur Wärme- und Lichtisolation der

Kammer. Das einströmende Gas wurde zusätzlich durch einen im zuführenden Schenkel platzierten beheizten Widerstandsdraht erwärmt (Eigenkonstruktion). Die Wärme des Widerstandsdrahts wurde durch ein Netzteil erzeugt.

Die CO<sub>2</sub>- und Isofluran-Konzentration wurde durch einen volatilen Anästhesiemittel-Monitor (Dräger Vamos, Dräger, Lübeck, DE) erfasst. Platziert wurde die Messsonde im Auslassventil der Inkubationskammer.

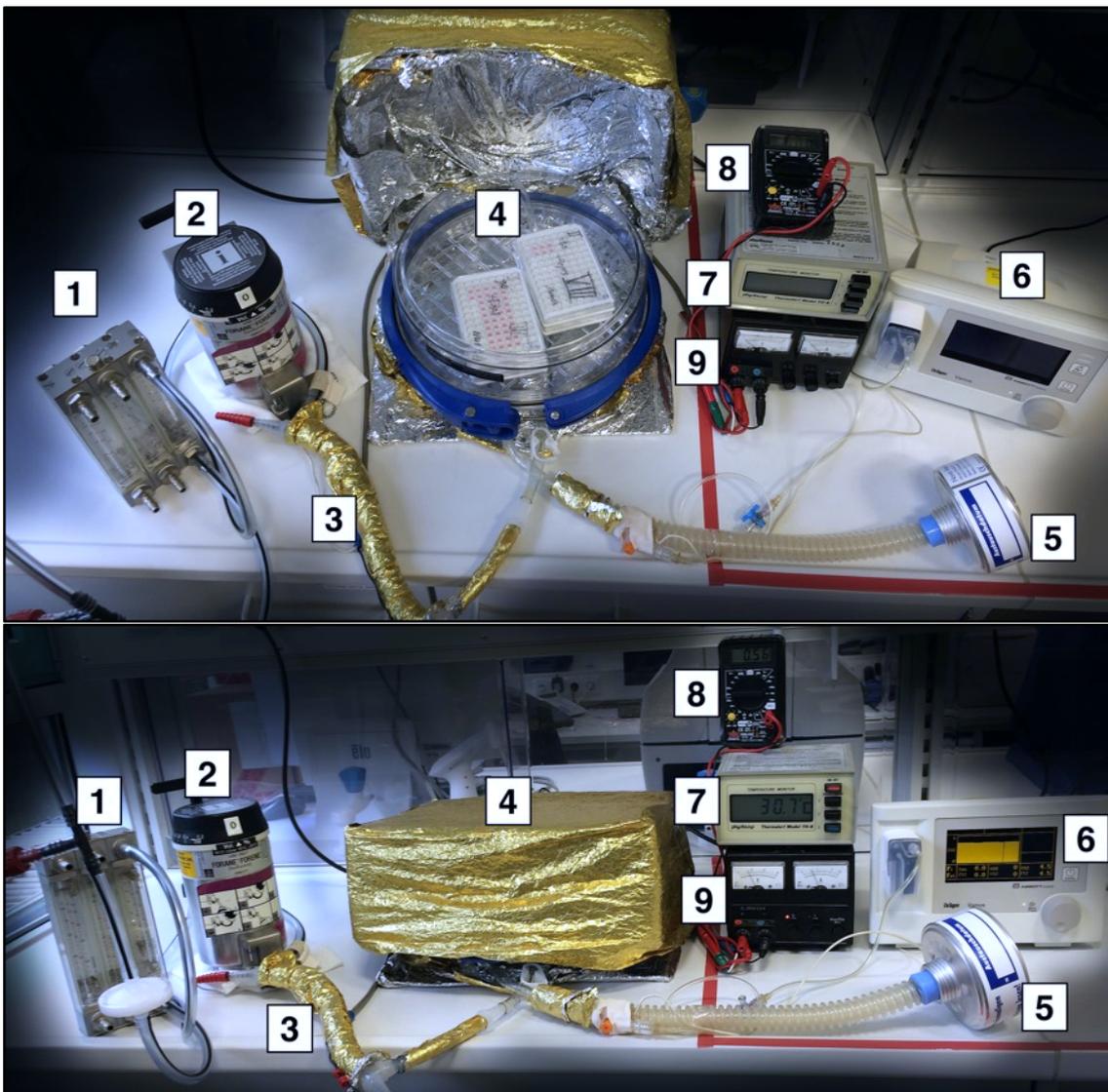


Abbildung 1: Versuchsaufbau im Labor: Gasflasche mit Gasdruckregler (Nicht dargestellt), 1. Durchflussmesser mit Schwebekörper, 2. Isofluran-Verdampfer, 3. Isolierter Heizleiterdraht, 4. Inkubationskammer, 5. Narkosegasfilter, 6. Monitor (CO<sub>2</sub>- & Isofluran-Messung), 7. Digitales Thermometer, 8. Spannungsmesser, 9. Netzgerät

## 2.1.5. Reagenzien, Kits und Chemikalien

Tabelle 2: Liste der Reagenzien, Kits und Chemikalien

Alexa Fluor 488 Phalloidin	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
BODIPY® TR Ceramide	Invitrogen, Carlsbad, USA
Caspase-Glo 3/7 Substrate & Buffer	Promega, Madison, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, DE
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
Essigsäure 20 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
ExoQuick™ Exosome Precipitation Solution	System Biosciences, Palo Alto, USA
HEPES Buffer Solution (1M)	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
Isofluran	AbbVie, Ludwigshafen, DE
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
NaCl 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Paraformaldehyde 16 % (PFA)	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA
PD SpinTrap™ G-25	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Pierce™ LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI	Invitrogen, Carlsbad, USA
Triton X-100 (10 %)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, DE
TrypleLE Express	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA

## 2.1.6. Medien

Als Standardmedium (im Weiteren "DMEM(+)-FCS") für die Zellkultur wurde DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit einem 4,5 g/L D-Glukose-Gehalt verwendet (Life Technologies Corporation, Paisley, UK). Ergänzt wurde dieses durch eine 10 % Beimengung fetalem Kälberserums (Fetal calf serum = FCS) (Biochrom AG, Berlin, DE). Zellen, welche einem Serumentzug ausgesetzt wurden, erhielten ein Medium bestehend aus DMEM mit 4,5 g/L D-Glukose ohne den Zusatz von FCS (im Weiteren "DMEM(-)-FCS").

### 2.1.7. Zelllinie

Für die Versuche wurden Zellen vom Typ H9c2(2-1) (LGC Standards GmbH, Wesel, DE) verwendet. Hierbei handelt es sich um embryonale Myoblasten, welche als Subklon aus dem Herzgewebe der embryonalen BDIX Ratte isoliert wurden. In ihrer Morphologie präsentieren sich die H9c2-Zellen als große spindelförmige Zellen, die flach mit Adhärenz zum Flaschenboden wachsen. Sie weisen trotz ihres kardialen Ursprungs Eigenschaften von Skelettmuskulatur auf (Kimes & Brandt, 1976). Jedoch konnten auch für Zellen kardialen Ursprungs typische Charakteristika gezeigt werden, wie das Vorliegen von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen, dessen langsame Inaktivierungsdauer sowie Sensitivität gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker und  $\beta$ -Agonist Herzmuskelzellen ähneln (Hescheler et al., 1991).

### 2.1.8. Biologisches Material

Nach der Zustimmung der örtlichen Ethikkommission sowie dem schriftlichen Einverständnis der Probanden, wurden am Universitätsklinikum Essen 10 Patienten in eine prospektive, randomisierte, doppelblinde, placebokontrollierte Studie eingeschlossen (ClinicalTrials.gov NCT01406678). Die Patienten unterzogen sich einer elektiven isolierten CABG.

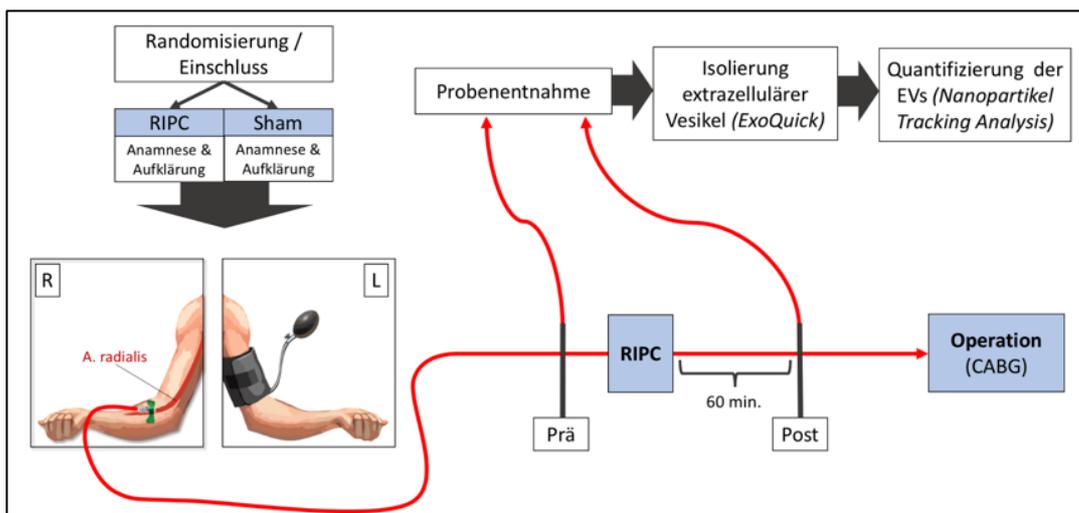


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Probengewinnung. Randomisierung und Blutentnahme zur Serumgewinnung aus der A. radialis vor sowie nach RIPC. Anschließende EV-Anreicherung und Quantifizierung.

Nach der Narkoseeinleitung und vor dem operativen Eingriff wurde bei Patienten entweder eine RIPC (n = 5) oder keine RIPC (Sham-Gruppe, n = 5) angewandt. Die RIPC erfolgte mit 3 Zyklen einer 5-minütigen Ischämie und einer 5-minütigen Reperfusion, welche mittels Blutdruckmanschette am linken Oberarm durchgeführt wurde. In der Sham-Gruppe wurde die Blutdruckmanschette in dem entsprechenden Zeitraum von 30 Minuten nicht aufgepumpt. Zur Probengewinnung wurde dem Patientenkollektiv vor und 60 Minuten nach der RIPC (bzw. Sham) Blut aus der rechten A. radialis entnommen. Nachdem das Blut geronnen war, wurde es für 10 Minuten zentrifugiert (2000 x g) und anschließend bei -80 °C gelagert.

Weitere Details bezüglich der Probengewinnung (Frey et al., 2018) und des Studienprotokolls (Thielmann et al., 2013) wurden bereits publiziert. Die Auswahl der 10 Patienten bzw. der ihnen zugeordneten Serumproben erfolgte zufällig und nach der Menge des noch verfügbaren biologischen Materials.

### 2.1.9. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Liste der Verbrauchsmaterialien

8-Well Chamber Slide (Lab-Tek II)	Nunc (Thermo Fisher Scientific)
96-Well Zellkultur Microplatten	Greiner Bio-One
DNA LoBind Tubes	Eppendorf
Exosome Spin Columns (MW 3000)	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)
Pipettenspitzen Glas	Sarstedt Greiner Bio-One
Pipettenspitzen Kunststoff	Brand GmbH
Reaktionsgefäße	Eppendorf Greiner Bio-One
Zellkulturflaschen Cellstar 550 ml	Greiner Bio-One

### 2.1.10. Software

Tabelle 4: Verwendete Software

Office für Mac	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
GraphPad Prism 8 für Mac	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
Zeiss Zen für Windows	Zeiss, Oberkochen, DE
ICE Operating Software für den TriStar2 LB 942 Multimode Reader	Berthold Technologies, Bad Wildbad, DE
ZetaView® Software	Particle Metrix GmbH, Meerbusch, DE

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Zellkultur**

Wenn nicht anders angegeben, stammen die Methoden der Zellkultur aus dem Buch "Zell- und Gewebekultur" von Gerhard Gstraunthaler und Toni Lindl (2013). Jegliche Zellkulturarbeiten wurden unter einer Reinraumbank zur Gewährleistung der nötigen Sterilität durchgeführt.

Nach Gefrierlagerung in Stickstoff erfolgte die Kultivierung der H9c2-Zellen in einem wassergesättigten Brutschrank (Heracell 150i, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) unter 21 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C. Es kamen 550 ml Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 175 cm<sup>2</sup> (Cellstar, Greiner Bio-One) zum Einsatz. Die Herstellung des für die Zellkultur verwendeten Standardmediums (DMEM(+))FCS) erfolgte wie in 2.1.6 beschrieben. Auf eine antibiotische Behandlung wurde verzichtet.

Die Zellkulturflaschen wurden regelmäßig auf Kontamination und auf Konfluenz der Zellen mikroskopisch überprüft. Bevor der Zellrasen vollständige Konfluenz erreichte, das heißt 80-90 % der Wachstumsfläche der Zellkulturflasche bedeckte, wurden die Zellen im Verhältnis von 1:2 bis 1:5 aufgeteilt. Eine Aufteilung war in der Regel alle 3-4 Tage erforderlich. Für die Experimente wurden Zellen aus den Passagen 12 bis 24 verwendet.

Die Zellen wurden für die Versuche in einer Neubauer-Zählkammer (Lo-Laboroptik, Lancing, UK) ausgezählt. Anschließend wurden 1,6 x 10<sup>4</sup> Zellen in 200 µl (DMEM) pro Well in 8-Well Chamber Slides (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) für die Aufnahmeversuche fluoreszenzmarkierter EVs (siehe Kapitel 2.2.5.) ausgesät. Für alle anderen Versuche (siehe Kapitel 2.2.7) wurden pro Well 8 x 10<sup>3</sup> Zellen in 100 µl Zellkulturmedium (DMEM) auf 96-Well Platten (Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE) kultiviert. Nach dem Aussäen der Zellen wurden die Zellkulturplatten einen Tag vor jedem Versuch für eine Dauer von 12 bis 24 Stunden inkubiert, um Zelladhärenz zu gewährleisten.

### **2.2.2. Anreicherung Extrazellulärer Vesikel**

Für die Anreicherung von Extrazellulären Vesikeln aus Patientenserum (Probengewinnung beschrieben in Kapitel 2.1.8) wurde das ExoQuick™ Exosome Precipitation Solution

Kit der Firma System Biosciences verwendet. Es ermöglicht durch Präzipitation eine Anreicherung von Exosomen und anderen EVs mit Größen zwischen 30 und 200 nm (System Biosciences, 2016). Jede Patientenprobe enthielt 400 µl Serum als Ausgangsmenge und wurde auf Eis von ihrer Aufbewahrungstemperatur (-80 °C) langsam aufgetaut.

Der erste Schritt bestand darin, Zellen und Zelltrümmer von den Proben zu entfernen. Hierfür wurden sie mit 3000 x g für 3 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in DNA LoBind Tubes (Eppendorf, Hamburg, DE) übertragen. Diese wurden abermals mit 3000 x g für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in neue DNA LoBind Tubes übertragen. Die Zellpellets wurden nach beiden Zentrifugationsvorgängen verworfen.

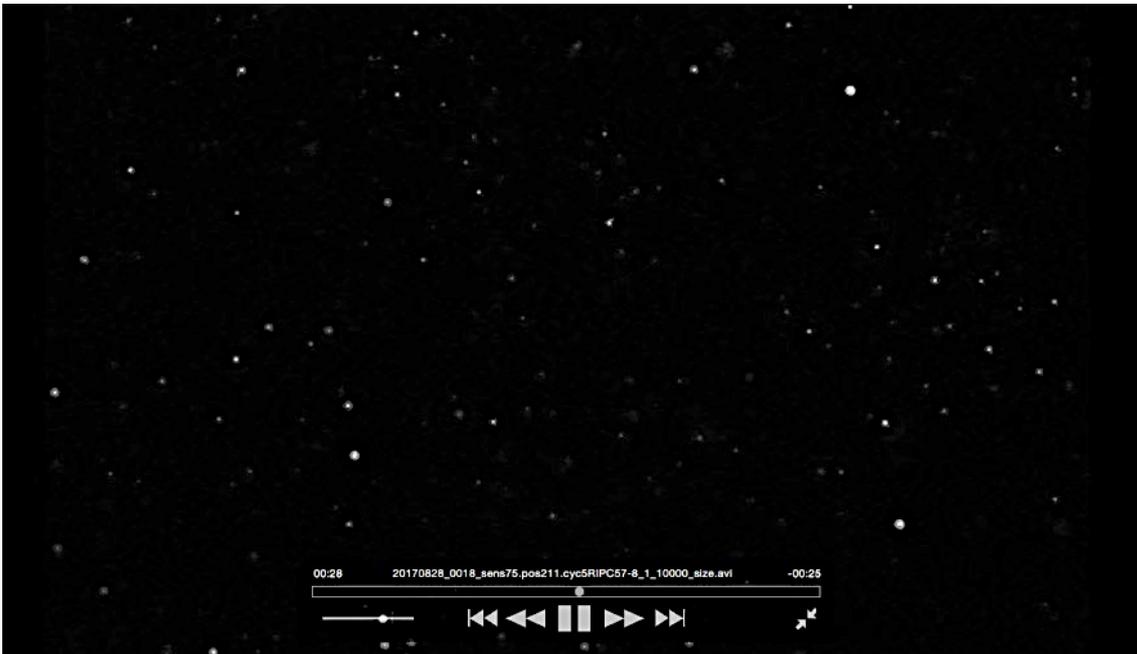
Es wurden 400 µl NaCl/HEPES (Verhältnis von 1:100) mit 400 µl ExoQuick™ Exosome Precipitation Solution (System Biosciences, Palo Alto, USA) in DNA LoBind Tubes vermengt und zu jeder Probe gegeben. Nach Durchmischung folgte eine Lagerung der Proben über Nacht für maximal 18 Stunden bei 4 °C im Kühlschrank.

Am nächsten Tag wurden die Proben mit 1500 x g für 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden entfernt und die EV-Pellets in 200 µL HEPES/NaCl resuspendiert. Danach wurden die Proben für 10 Sekunden mit einem Vortex durchmischt und 5 Minuten stehen gelassen. Um das Pellet aufzulösen, wurde die Flüssigkeit über dem Pellet wiederholt auf und ab pipettiert.

Zur Entfernung der Polymere der ExoQuick™ Precipitation Solution von den EV-Proben wurden PD SpinTrap™ G-25 Columns verwendet. Zunächst wurden die Columns zur Entfernung der Aufbewahrungslösung mit 800 x g für eine Minute zentrifugiert. Es wurde insgesamt fünfmal 400 µl HEPES/NaCl auf die Columns gegeben und jeweils mit 800 x g für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde nach jeder Zentrifugation verworfen und die Columns in neuen Collection Tubes platziert. Von jeder EV-Probe wurden 180 µl auf eine Column pipettiert und mit 800 x g für 2 Minuten zentrifugiert. Das Eluat wurde bis zur EV-Quantifizierung (Kapitel 2.2.3) bei -80 °C gelagert.

### 2.2.3. Quantifizierung und Aufbereitung Extrazellulärer Vesikel

Für die Quantifizierung und Konzentrationsbestimmung der angereicherten Extrazellulären Vesikel wurde der Nanopartikel Tracking-Analysator (NTA) ZetaView® (Particle Metrix GmbH, Meerbusch, DE) verwendet. Mit dem NTA lassen sich Zetapotentiale, Konzentrationen sowie die Größe in Proben enthaltener Nanopartikel bestimmen. Die sich gemäß der brownischen Molekularbewegung folgenden Nanopartikel werden über ein Laser-Streulicht-Mikroskop erfasst. Aus diesen mikroskopischen Aufnahmen ermittelt das NTA die Zetapotentiale, Konzentrationen sowie die Größe der in den Proben enthaltenen Nanopartikel (Particle Metrix, 2017).



*Abbildung 3: ZetaView Partikelmessung: Standbild einer Videoaufnahme während mikroskopischer Partikelmessung. Die Aufnahmen wurden je Probe an 11 Position für 5 Zyklen erzeugt.*

Um eine Signalüberlagerung der Partikel in den verschiedenen Messfenstern zu vermeiden, wurden die Proben zunächst 1:1000 mit 0,9 % NaCl verdünnt. Nach Eingabe der Probe in den NTA wurden die Proben an 11 verschiedenen Positionen jeweils fünfmal gemessen. Der Größenbereich von Interesse (region of interest, ROI) wurde auf eine Partikelgröße zwischen 70 und 150 nm festgelegt. Von allen 11 Positionen und 5 Zyklen

wurde der Mittelwert gemessener Nanopartikel berechnet. Hieraus ließ sich unter Beachtung des Verdünnungsfaktors (1:1000) die Konzentration der in der ROI befindlichen Nanopartikel in den Proben bestimmen.

Für die EV-Samples, die in den Aufnahmeexperimenten (siehe 2.2.5.) Verwendung fanden, wurde eine Konzentration von  $5,7 \times 10^{10}$  part/ml in der ROI gemessen und sie wurden aus 60 Minuten nach RIPC abgenommenem Patientenserum (siehe 2.1.8) angereichert. EV-Samples, die in den Versuchen des Kapitels 2.2.7. Verwendung fanden, wiesen EV-Konzentrationen in der ROI zwischen  $9,4 \times 10^{10}$  part/ml und  $5,1 \times 10^{11}$  part/ml auf.

Alle EV-Samples wurden mit NaCl/HEPES (Verhältnis von 1:100) auf eine einheitliche Konzentration von  $1 \times 10^{11}$  part/ml verdünnt.

#### **2.2.4. Endotoxin Testung**

Die EV-Proben (Anreicherung in Kapitel 2.2.2) wurden mithilfe des Pierce™ LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) auf Kontamination mit Endotoxinen gramnegativer Bakterien untersucht, da diese die zelluläre Signalweiterleitung beeinflussen können (Vicencio et al., 2015). Ausschließlich EV-Proben mit Endotoxinkonzentrationen  $< 0,1$  EU/ml wurden für die Versuche verwendet.

Die Aktivierung des Faktor-C Proenzym des modifizierten Limulus-Amöbozyten-Lysates (LAL) wird durch bakterielle Endotoxine katalysiert. Das aktivierte Proenzym katalysiert wiederum die Spaltung von p-Nitroanilinen (Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA) des chromogenen Substrates. Die p-Nitroaniline können photometrisch gemessen werden. Ihre Aktivierungsrate ist proportional zur Endotoxin-Konzentration der zu testenden Probe (Thermo Fisher Scientific, 2013). Die Testung erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll.

Zunächst wurde eine 96-Well Zellkultur Multiplatte (Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE) auf einem beheizbaren Schüttler (ThermoMixer C, Eppendorf, Hamburg, DE) 10 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  vorgewärmt. Jedes EV-Sample wurde mit NaCl/HEPES verdünnt (Verhältnis 1:100). Hiervon wurden jeweils  $50\ \mu\text{l}$  in zwei Wells (zur Doppelbestimmung) der 96-Well Multiplatte übertragen. Von einer mit endotoxinfreiem Wasser sequentiell

verdünnten Endotoxin-Stammlösung (Ursprung: E. Coli) wurden jeweils 50 µl in den vier Konzentrationen 1,0 EU/ml, 0,5 EU/ml, 0,25 EU/ml und 0,1 EU/ml in zwei Wells auf die Multiplatte übertragen. Als Leerproben wurden 50 µl endotoxinfreies Wasser in zwei Wells gegeben. Die Multiplatte wurde mit den Proben 5 Minuten bei 37 °C erwärmt. Danach wurde in jedes Well 50 µl des LAL gegeben, für 10 Sekunden auf niedriger Stufe geschüttelt und bei 37 °C für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 100 µl des chromogenen Substrates in jedes Well gegeben. Die Multiplatte wurde erneut für 10 Sekunden geschüttelt und für 6 Minuten bei 37 °C inkubiert. Der letzte Schritt bestand darin 50 µl einer 25 % Essigsäurelösung in jedes Well zu geben, um die Reaktionen des Substrates zu stoppen.

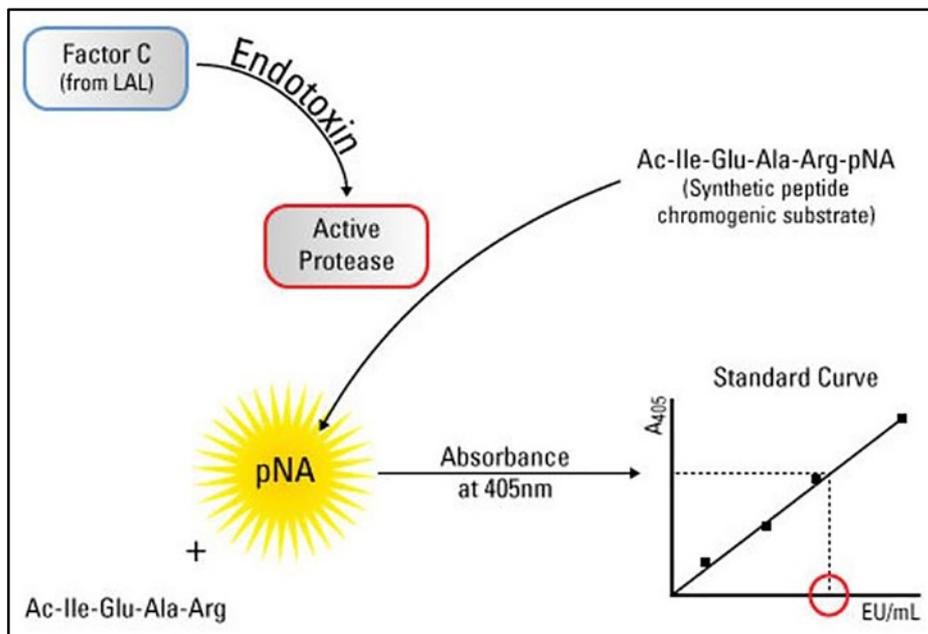


Abbildung 4: Reaktionsprinzip des Pierce™ LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit. Die Aktivierung des Faktor-C Proenzym wird durch Endotoxine katalysiert. Eine Folgeaktivierung von pNA resultiert in der Produktion eines messbaren Lichtsignals (Thermo Fisher Scientific, 2013).

Die photometrische Messung erfolgte mittels Mikroplattenleser (TriStar2 LB 942 Multimode Reader, Berthold Technologies, Bad Wildbad, DE) im 405 bis 410 nm Bereich. Von jedem gemessenen Wert der zu testenden Proben und Stammlösungen wurde der Durchschnittswert der Leerproben subtrahiert. Eine Standardkurve wurde aus den korrigierten Absorptionswerten versus der vier Konzentrationen der Stammlösung erstellt.

Diese konnte verwendet werden, um die Endotoxin-Konzentration der einzelnen EV-Proben zu bestimmen. Die gemessenen Absorptionswerte aller EV-Proben ergaben Konzentrationen von unter 0,08 EU/ml (höchster gemessener Wert).

### **2.2.5. EV-Labeling und Fluoreszenzmikroskopie**

Als Vorlage für die Versuchsetablierung diente das Herstellerprotokoll "Labeling exosomal RNA and membrane components using fluorescent dyes" der Firma Invitrogen, welches unseren Versuchsbedingungen angepasst wurde (Invitrogen, 2013). Alle Versuchsschritte wurden in einer lichtarmen Umgebung durchgeführt.

#### **Fluoreszenzmarkierung Extrazellulärer Vesikel**

Vor den Aufnahmeexperimenten wurden die EVs mit BODIPY® TR Ceramide der Firma Invitrogen markiert. Hierbei handelt es sich um einen roten, fluoreszierenden Zellfarbstoff, dessen Emissionslicht (Absorptions- und Emissionswellenlängen: ~589/617 nm) mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden kann. BODIPY® TR Ceramide wird aus D-Erythro-Sphingosin hergestellt und besitzt daher die gleichen stereochemischen Eigenschaften wie Sphingolipide. Der Farbstoff kann zusätzlich zur Membran von EVs potentiell den Golgi-Apparat sowie die Zellmembran markieren (Invitrogen, 2013; Laulagnier et al., 2005).

Für die Herstellung einer 1 mM Bodipy-Stammlösung (im Weiteren "Bodipy") wurden 250 µg lyophilisiertes BODIPY® TR Ceramide in 350 µl DMSO gelöst. Die Stammlösung wurde bei -20 °C gelagert.

Die bei -80 °C gelagerten angereicherten EVs wurden langsam bei 25 °C im Wasserbad aufgetaut und gevortext. Hiervon wurden 10 µl entnommen und mit 90 µl PBS verdünnt, was einem Verhältnis von 1:10 entsprach. Nach Zugabe von 1 µl Bodipy wurden die EVs kurz gevortext und 20 Minuten bei 37 °C lichtgeschützt inkubiert.

Um ungebundenes Bodipy aus den EV-Samples zu entfernen, wurden Exosome Spin Columns (MW 3000, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Auf die zuvor mit PBS rehydrierten Columns wurden 100 µl der inkubierten EVs vorsichtig aufgetragen und bei 750 RPM

für 2 Minuten zentrifugiert. Das Eluat wurde anschließend bis zur Färbung maximal eine Stunde im Kühlschrank bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

### **Inkubation der H9c2-Zellen mit fluoreszenzmarkierten EVs**

Die gefärbten EVs wurden zunächst mit DMEM(+)-FCS auf Konzentrationen von  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^7$  und  $1 \times 10^9$  part/ml (Ausgangskonzentration nach der Anreicherung in 2.2.2:  $5,7 \times 10^{10}$  part/ml) mit DMEM(+)-FCS verdünnt.

Danach wurde das Medium in den Wells der 8-Well Chamber Slides vorsichtig mit einer Glaspipette abgesaugt und nach dem folgenden Schema ersetzt: Jedes der vier Chamber Slides erhielt in drei Wells jeweils 90 µl EVs mit Konzentrationen von  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^7$  und  $1 \times 10^9$  part/ml. Zwei Wells der Chamber Slides erhielten als Kontrolle jeweils 90 µl der ungefärbten EVs. Darauf folgte eine Inkubation der Slides für 1, 3, 6 und 18 Stunden.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen fixiert. Hierfür wurde zunächst das Medium der Chamber Slides mit einer Glaspipette abgesaugt. In jedes Well wurden 150 µl PBS gegeben und die Slides für 3 Minuten auf einem Vibrationsschüttler bei niedriger Rotation (100 bis 150 RPM) gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und der Waschvorgang ein weiteres Mal wiederholt. Als Fixierungslösung diente 4 % PFA (verdünnt mit PBS). Davon wurden 150 µl in jedes Well gegeben und die Slides für 20 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Danach wurde das PFA abgesaugt und die Wells abermals mit PBS wie oben beschrieben einmal gewaschen.

Um die Zellmembran der H9c2-Zellen zu permeabilisieren, wurde Triton X-100 verwendet. In jedes Well wurden 150 µl der 0,1 % Triton X-100 Solution (verdünnt mit PBS) gegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Wells dreimal mit PBS gewaschen und nachfolgend mit jeweils 150 µl PBS für mindestens 20 Minuten belassen.

Die Darstellung der F-Aktin-Unterklasse des Zytoskeletts der H9c2-Zellen erfolgte mittels Alexa Fluor™ 488 Phalloidin. Phalloidine sind bitykliche Peptide, welche von dem *Amanita phalloides* Pilz isoliert wurden und kompetitiv an F-Aktin binden. Als Konjugat

mit dem Alexa Fluor 488 Farbstoff ist es fluoreszenzmikroskopisch darstellbar (Absorptions-/Emissionslichtmaxima  $\sim 496/520$  nm) (Invitrogen, 2010).

Das Alexa Fluor™ 488 Phalloidin Konjugat wurde mit 1,5 ml zu einer Stammlösung (im Weiteren "Alexa Fluor") mit einer Stoffmenge von 6,6  $\mu\text{M}$  gelöst und konnte bei  $-20$  °C gelagert werden. Zur Färbung des F-Aktins der H9c2-Zellen wurde Alexa Fluor im Verhältnis von 1:20 mit PBS verdünnt und davon 100  $\mu\text{l}$  in jedes Well gegeben. Es folgte eine Inkubation von 20 Minuten in Dunkelheit. Anschließend wurden alle Wells mit PBS einmal gewaschen.

Die Wells der 8-Well Chamber Slides sind Kammern, welche durch Plastikwände voneinander getrennt sind. Diese Plastikrahmen wurden vorsichtig von den Slides gelöst, sodass nur noch die Slides mit den fixierten Zellen verbleiben (die einzelnen Felder fixierter Zellen werden weiterhin als Wells bezeichnet).

Der letzte Schritt bestand darin, die fixierten Zellen mit ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI auf dem Slide einzubetten. Der darin enthaltene blau fluoreszierende Farbstoff 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) ist in der Lage nach Permeabilisierung der Zellmembran an AT-Regionen der DNA zu binden, sodass der Zellkern unter einem Fluoreszenzmikroskop in Blaufärbung darstellbar wird (Absorptions-/Emissionslichtmaxima  $\sim 500/460$  nm) (Invitrogen 2006, Invitrogen 2014).

Auf jedes Well fixierter Zellen wurde ein Tropfen von dem Mountant aufgetragen und auf jedes Slide ein Deckglas gelegt. So verblieben die Slides für 24 Stunden in Dunkelheit bis zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung am Folgetag.

### **Fluoreszenzmikroskopie**

In freundlicher Zusammenarbeit dem Institut für Experimentelle Immunologie und Bildgebung (IMCES) der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Bildanalyse der EV-Aufnahmeexperimente. Hierfür wurde das invertierte Epifluoreszenzmikroskop Zeiss Axio Observer.Z1 verwendet. Es verfügt über eine Metall-Halogenid HXP-120 Lampe und eine leistungsstarke LED (Colibri), welche in den Wellenlängenbereichen 365 nm, 470 nm, 555 nm und 625 nm anregend

wirkt. Die digitale Darstellung sowie Bearbeitung der Bilder erfolgten mit Hilfe der Software Zeiss Zen.

Nach Einbringung der Slides in das Mikroskop, wurden diese im Live Image Modus zunächst fokussiert und nach Zellkernen abgesucht. Lag ein Zellkern isoliert mit einem gewissen Abstand zu umliegenden Zellkernen, erfolgte die Aufnahme aller Emissionslichter der Fluoreszenzfarbstoffe Alexa Fluor 488, DAPI und Bodipy als Einzelaufnahmen, welche in einer Gesamtdarstellung kombiniert dargestellt werden konnten. Von jedem Well wurden insgesamt sieben Kombinationsbilder von verschiedenen Positionen des jeweiligen Wells erstellt.

Um bei der Bildbearbeitung mittels Zeiss Zen eine Vergleichbarkeit aller Bilder zu erreichen, wurden zunächst von jenem Well die Aufnahmen als Referenz verwendet, in dem die Zellen 6 Stunden mit einer EV-Konzentration von  $1 \times 10^9$  part/ml inkubiert wurden. An den Aufnahmen wurden mittels Histogramm Tonwertkorrekturen für eine gute Kontrastierung und Farbdarstellung vorgenommen. Diese Einstellungen wurden anschließend auf die Tonwertkorrekturen aller anderen Aufnahmen als Standardeinstellung übertragen.

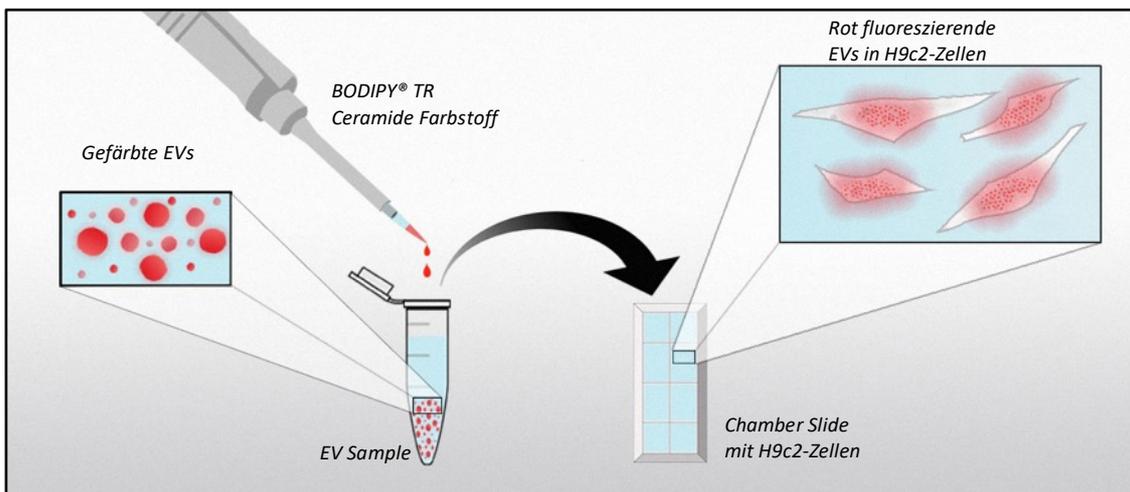


Abbildung 5: Prinzip des EV-Aufnahmeexperiments. Die Zellen werden mit EVs inkubiert, die mit einem roten Fluorochrome markiert wurden. Es wird eine Endozytose und fluoreszenzmikroskopische Darstellbarkeit rot fluoreszierender EVs erwartet. (Eigene Darstellung)

### **2.2.6. Konditionierung mit Gasgemischen**

H9c2-Zellen wurden in einer hypoxischen oder normoxischen Atmosphäre behandelt. Dieser wurde wahlweise Isofluran beigemischt. Das hier verwendete experimentelle Prinzip wurde bereits beschrieben (Klenke et al., 2016) und den hier etablierten Versuchsbedingungen angepasst.

#### **Inkubation unter Hypoxie und Normoxie**

Für eine Behandlung der H9c2-Zellen unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen, wurden 96-Well-Platten zunächst in einer bei 37 °C vorgewärmten Billups-Rothenberg-Kammer platziert. Es erfolgte eine Spülung der Kammer mit normoxischem oder hypoxischem Gas für 20 Minuten mit einem Flow von 5 L/min. Danach wurde je nach der für das jeweilige Experiment spezifischen Inkubationszeit die Kammer gasdicht bei 37 °C im Brutschrank platziert.

#### **Isofluran-Konditionierung**

Zunächst wurde eine bei 37 °C vorgewärmte Billups-Rothenberg-Kammer mit 4 % Isofluran angereichertem normoxischem Gas bei einem Flow von 8 L/min für 5 min vorgesättigt und gasdicht verschlossen für 30 min in den Brutschrank gestellt. Ziel war es, die Absorption des Isofluran durch das Kammermaterial während der eigentlichen Isofluran-Behandlung zu reduzieren. Zur Isofluran-Konditionierung wurden auf 96-Well-Platten ausgesäte H9c2-Zellen in der vorgesättigten Billups-Rothenberg-Kammer platziert. Es folgte eine Spülung der Kammer mit 2 % Isofluran bei einem Flow von 5 L/min für 5 min. Die Kammer wurde für eine 25-minütige Inkubationszeit gasdicht verschlossen im Brutschrank platziert.

### **2.2.7. Caspase 3/7-Aktivitätsmessung**

Um die Apoptose Aktivität der H9c2 Zellen in verschiedenen Experimenten zu messen, verwendeten wir das Caspase Glo 3/7-Assay der Firma Promega. Dieses Lumineszenz-Assay erlaubt die Messung der zellulären Caspase-3 und -7 Aktivität (Promega, 2015).

Die Caspasen-3 und -7 gehören zur Familie der Cysteinproteasen und spielen Schlüsselrollen in der Initiierung und Kontrolle der Apoptose Kaskade (Thornberry et al., 1997). Diese streng regulierten Enzyme liegen als inaktive Zymogene im Zytoplasma vor. Sie können durch Autoaktivierung und Proteolyse durch andere Caspasen und Proteinasen aktiviert werden. Sie schneiden dann an den Aspartatresten von Proteinen im Zuge der Apoptose (Bredesen, 2000).

Die Gabe des Caspase-Glo® 3/7 initiiert die Lyse von Zellen, gefolgt von einer Spaltung des Reagenz durch die Caspasen. Diese Reaktion resultiert in der Erzeugung eines Lumineszenz-Signals. Die Stärke des Lumineszenz-Signals ist proportional zu der Caspase 3/7 Aktivität gemessener Proben (Promega, 2015).

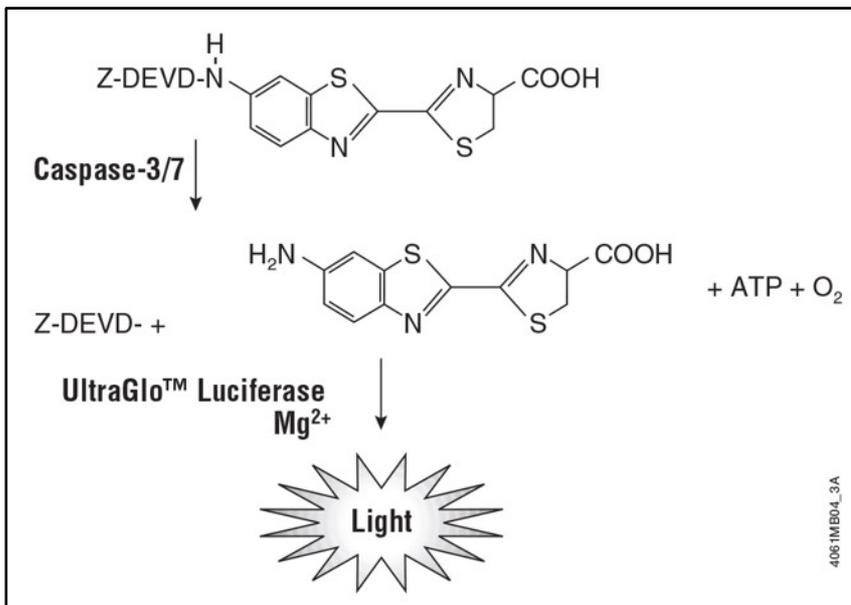


Abbildung 6: Caspase-Glo Reaktionsprinzip. Die Caspasen-3/7 spalten DEVD von dem Caspase-Glo Substrat. Dies resultiert in der Freisetzung von Luciferinen, die durch eine Luciferase Reaktion messbares Licht ausstrahlen (Promega, 2015).

Eine Stunde vor jeder geplanten Verwendung des Assays wurde der Caspase-Glo® 3/7-Buffer und das Caspase-Glo®-Substrat von -20 °C (Aufbewahrungstemperatur) auf Raumtemperatur erwärmt. Für die Herstellung eines gebrauchsfertigen Caspase-Glo-3/7-Reagenz (im Weiteren: Caspase-Reagenz) wurde der Buffer mit dem lyophilisierten Substrat vermischt, bis das Substrat vollständig gelöst war.

Bei allen Experimenten, bei denen das Caspase Glo 3/7-Assay zum Einsatz kam (Kapitel: 2.2.7), wurden zwei Kontrollprobenarten vorbereitet: Die Erste war eine Nullkontrolle bestehend aus 100 µl DMEM(+)-FCS ohne Zellen. Ihr Messwert stellt die Hintergrund-Lumineszenz des Zellkulturmediums dar und wurde von den Messwerten aller Proben eines jeden Experiments abgezogen. Die Zweite war eine Negativkontrolle, welche sich aus unbehandelten H9c2-Zellen, 90 µl DMEM(+)-FCS und 10 µl der EV-Trägersubstanz (NaCl/HEPES im Verhältnis von 1:100) zusammensetzte. Das Lumineszenz-Signal der Negativkontrolle stellt die basale Caspase-Aktivität der jeweiligen Zellkultur dar. Beide Kontrollprobenarten wurden parallel zu jenen Proben vorbereitet, die für alle folgenden Experimente entsprechend behandelte H9C2-Zellen und Medien enthielten.

Nullkontrolle	Caspase Glo 3/7-Reagenz + Medium (ohne Zellen)
Negativkontrolle	Caspase Glo 3/7-Reagenz + Medium + H9c2-Zellen
Behandelte Proben	Caspase Glo 3/7-Reagenz + Medium + behandelte H9c2-Zellen

*Tabelle 5: Zusammensetzung der Probenarten des Caspase Glo 3/7-Assays. Es wurden zwei Kontrollprobenarten, sowie die experimentenspezifisch behandelten Proben vorbereitet.*

Für die Durchführung des Caspase-Glo Assays wurden 100 µl des Caspase-Reagenz auf die 100 µl der Proben (Verhältnis von 1:1) jedes Wells der 96-Well-Platten gegeben. Das Volumen betrug nun insgesamt 200 µl pro Well. Für eine Durchmischung des Caspase-Reagenz mit den Proben wurden die Platten verdeckt für 30 Sekunden bei 400 RPM auf einem Vibrationsschüttler platziert. Es folgte eine im folgenden Abschnitt definierte Inkubationszeit von 30 Minuten bei einer konstanten Raumtemperatur von 19 °C im Inkubator (Heratherm IMC 18, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, DE). Direkt im Anschluss erfolgte die Messung der Caspase 3/7-Aktivität als mittleres Lumineszenz-Signal in Relative Light Units (RLU) mittels TriStar2 LB 942 Multimode Reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, DE).

### **Bestimmung des Caspase-Glo Signaloptimums im Zeitverlauf**

Um die optimale Inkubationszeit mit dem Caspase-Reagenz zu ermitteln, welche die maximale Lumineszenz-Signalstärke des Caspase-Glo-3/7-Assays in der Zellkultur aufweist,

wurden H9c2-Zellen mit zwei unterschiedlichen Medien kultiviert: DMEM(+)-FCS sowie DMEM(-)-FCS. Die Zellkulturplatten wurden in vorgewärmten Billups-Rothenberg-Kammern platziert und wahlweise mit einem normoxischen (mit DMEM(+)-FCS kultivierte Zellen) oder einem hypoxischen (mit DMEM(-)-FCS kultivierte Zellen) Gasgemisch gespült. Danach verblieben die Kammern über einen Zeitraum von 18 Stunden bei 37 °C gasdicht verschlossen im Inkubator.

Die Lumineszenz-Messung erfolgte direkt nach Gabe des Caspase-Reagenz alle 5 Minuten über einen Zeitraum von 2 Stunden und 45 Minuten. Die Ergebnisse der Lumineszenz-Messungen beider Behandlungsgruppen sind in Abbildung 7 dargestellt.

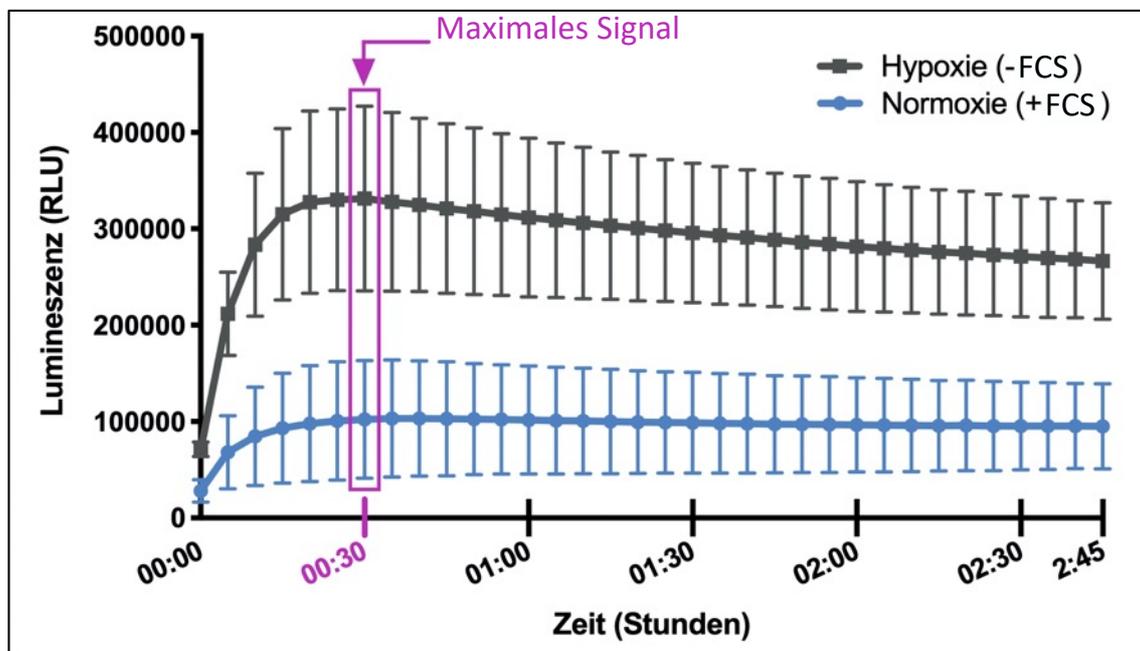


Abbildung 7: Caspase-Aktivität (Lumineszenz-Signal, RLU) über einen Zeitraum von 165 Minuten. Das Maximum der Lumineszenz-Messung war nach 30 Minuten erreicht.

Das stärkste Lumineszenz-Signal (Maximum) wurde bei der „Hypoxie (-FCS)“-Gruppe nach 30 Minuten ( $M = 331435$  RLU) gemessen. Die Inkubationszeit mit dem Caspase-Reagenz wurde daher für folgende Caspase-Glo Assays auf 30 Minuten festgelegt.

## Normoxie vs. Ischämie im Zeitverlauf

H9c2-Zellen wurden auf 96-Well-Platten im Standardmedium ausgesät und 24 Stunden kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für 4, 8 und 12 Stunden entweder mit DMEM(+)-FCS oder mit DMEM(-)-FCS inkubiert und in diesem Zeitraum jeweils zusätzlich mit normoxischem Gas oder hypoxischem Gas behandelt. Es folgte eine Auswertung durch Caspase 3/7-Aktivitätsmessung. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt.

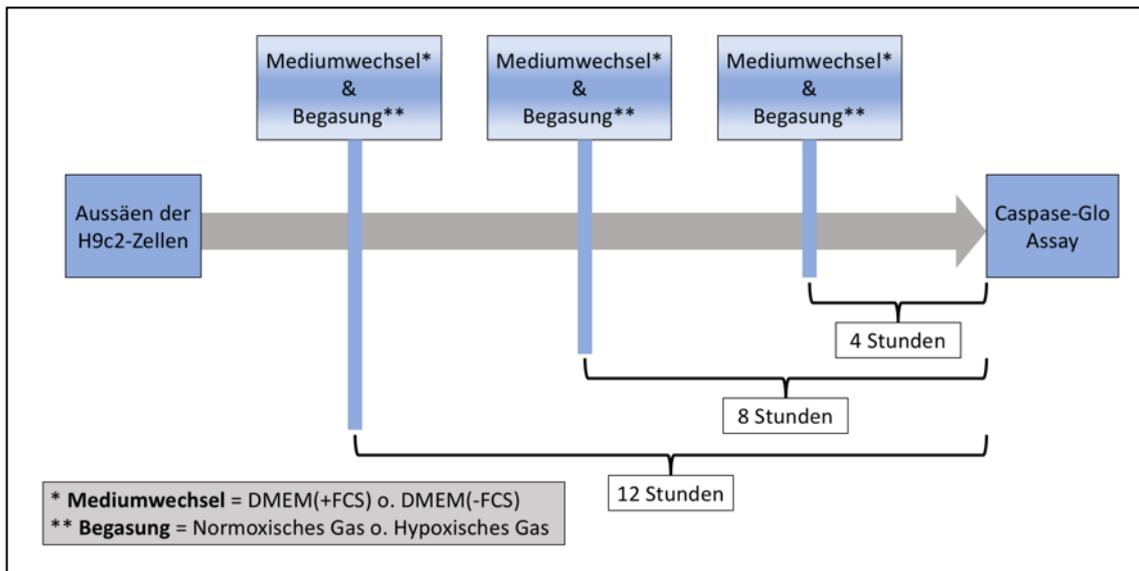


Abbildung 8: Versuchsablauf: H9c2-Zellen wurden für 4, 8 und 12 Stunden mit DMEM(+FCS) bzw. DMEM(-FCS) und normoxischem bzw. hypoxischem Gas behandelt.

## EV-Behandlung unter Serumentzug

Zunächst wurden H9c2-Zellen im 96-Well-Platten-Format in einer Billups-Rothenberg Kammer platziert und die Kammer mit 2 % Isofluran oder ohne Isofluran (normoxisches Gasgemisch) gespült. Anschließend wurde ein „Wash-out“ der Kammern durch eine 15-minütige Spülung der Kammern mit normoxischem Gas durchgeführt.

Die angereicherten Extrazellulären Vesikel (siehe Kapitel 2.2.2) wurden in einem Verhältnis von 1:10 mit DMEM(+)-FCS auf  $1 \times 10^9$  part/ml verdünnt. Hiervon wurden nach Absaugen des Mediums aus den Wells 100  $\mu$ l EV-Samples aller 4 RIPC/Sham-Zeitpunkte

(1. Pre RIPC, 2. Post RIPC & 3. Pre Sham, 4. Post Sham) auf die H9c2-Zellen gegeben und für 6 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen für 4 Stunden DMEM(+)-FCS und normoxischem Gas oder DMEM(-)-FCS (Serumentzug) und hypoxischem Gas ausgesetzt. Zum Schluss erfolgte die Durchführung des Caspase-Glo Assays. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 9 schematisch dargestellt.

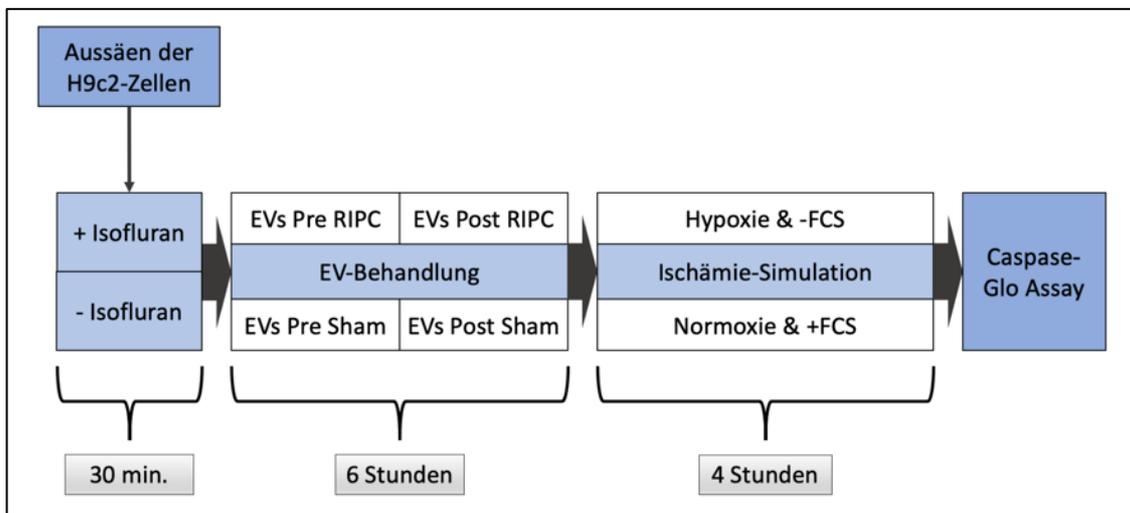


Abbildung 9: Versuchsablauf der EV-Behandlung unter Serumentzug.

### EV-Behandlung mit Ischämie nach Isofluran-Exposition

Alle H9c2-Zellen erhielten zunächst eine 30-minütige 2 % Isofluran-Behandlung, gefolgt von einer 15-minütigen „Wash-out“-Phase mit normoxischem Gas. Es folgte eine Inkubation mit EVs für 6 Stunden sowie eine Normoxie/DMEM(+)-FCS bzw. Hypoxie/DMEM(-)-FCS Behandlung für 18 Stunden.

Das Medium aller Wells wurde durch 100 µl Standardmedium (DMEM(+)-FCS) ersetzt und die Zellen nach einer Behandlung mit normoxischen Gas für 6 Stunden gasdicht im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Auswertung der Caspase 3/7-Aktivität.

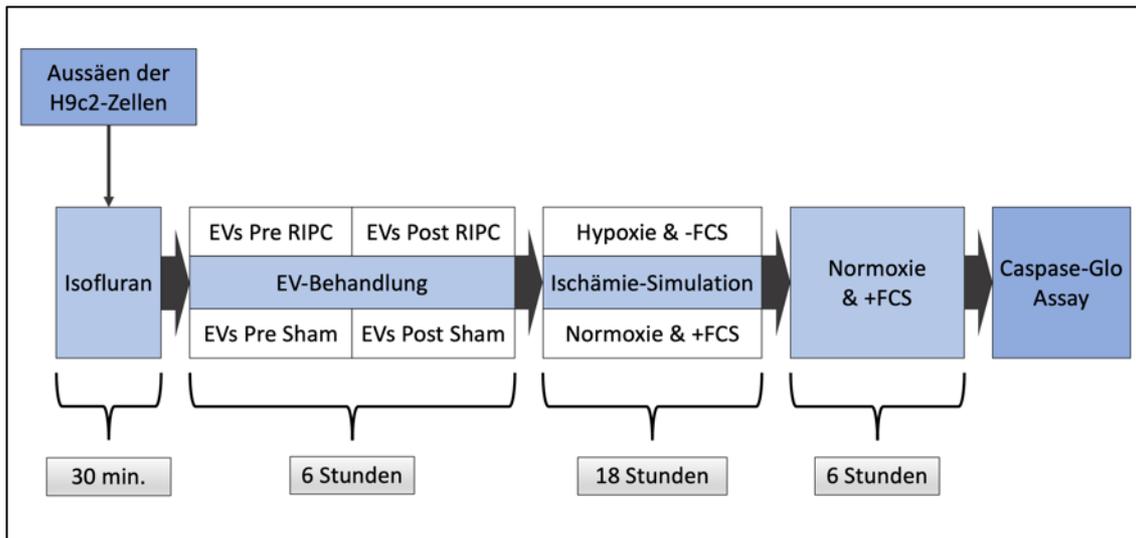


Abbildung 10: Versuchsablauf der EV-Behandlung unter Ischämie mit Isofluran-Präkonditionierung.

### 2.2.8. Statistische Methode

Die Ergebnisse sind, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. Beim Vergleich von zwei Gruppen wurde der ungepaarte Students t-Test zur Detektion statistisch signifikanter Unterschiede verwendet, bei Mehrgruppenvergleichen kam die Analysis of Variance (ANOVA) zur Anwendung. Für die Assoziation zwischen den Isolationsgruppen Extrazellulärer Vesikel und eine mögliche Be-gasung mit Isofluran wurde die Two-Way-ANOVA angewandt. Zusätzlich fand die Errech-nung des Fold Changes bei der Nanopartikel-Konzentrationen vor und nach RIPC/Sham Verwendung. Für statistische Signifikanz von Unterschieden wurde ein p-Wert von  $<0,05$  angesehen. Die statistischen Analysen erfolgten mittels der Software GraphPad Prism 8.0.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Konzentration Extrazellulärer Vesikel

Extrazelluläre Vesikel, welche bei Versuchen im H9c2-Zellmodell Verwendung fanden, wurden aus dem Patientenserum von insgesamt 10 Patienten angereichert. Bei dem ersten Patientenkollektiv, bestehend aus 5 Patienten, wurde vor und 60 Minuten nach der RIPC arterielles Probenmaterial entnommen. Die Materialgewinnung erfolgte bei dem zweiten Kollektiv (ebenfalls 5 Patienten) vor und 60 Minuten nach Sham. Nach der EV-Anreicherung untersuchten wir die EV-Konzentration (gemessen als Nanopartikel (70-150 nm)/ml) des genannten Probenmaterials.

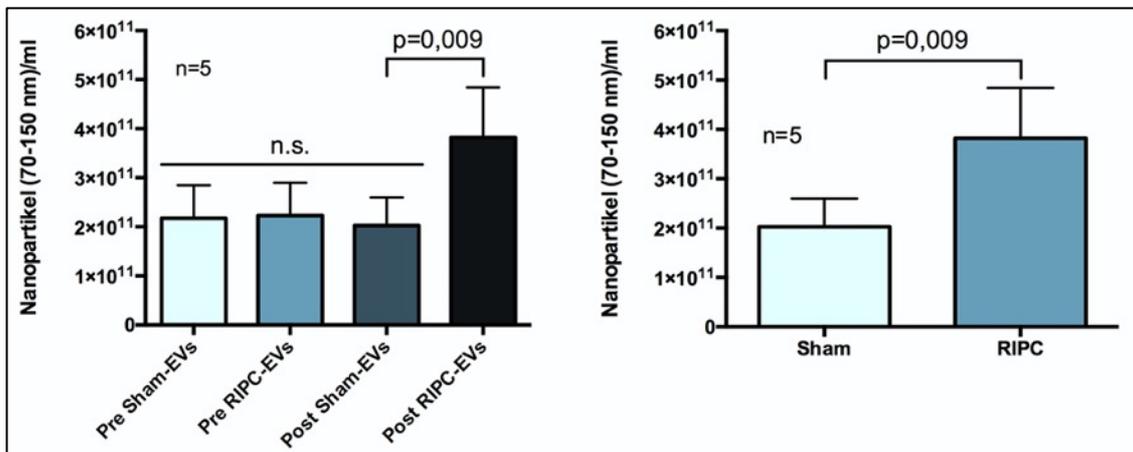


Abbildung 11: Konzentrationen Extrazellulärer Vesikel arterieller Proben von Patienten vor und nach RIPC (Remote ischemic preconditioning) Manöver bzw. nach Sham, gemessen als Nanopartikel (70-150)/ml mit Nanopartikel Tracking-Analysator (NTA). Die Balken zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts.

Vor (pre-) und nach (post) Sham-EVs sowie pre RIPC-EVs zeigten untereinander keinen signifikanten Unterschied bezüglich ihrer Nanopartikelkonzentration (ANOVA:  $p=0,8751$ ). Jedoch wiesen die Proben der post RIPC-Patienten eine signifikant höhere Konzentration von Nanopartikeln gegenüber post Sham auf ( $p=0,009$ ). Jedoch wiesen die Proben der post RIPC-Patienten eine signifikant höhere Konzentration von Nanopartikeln gegenüber post Sham auf (t Test, ungepaart:  $p=0,009$ ).

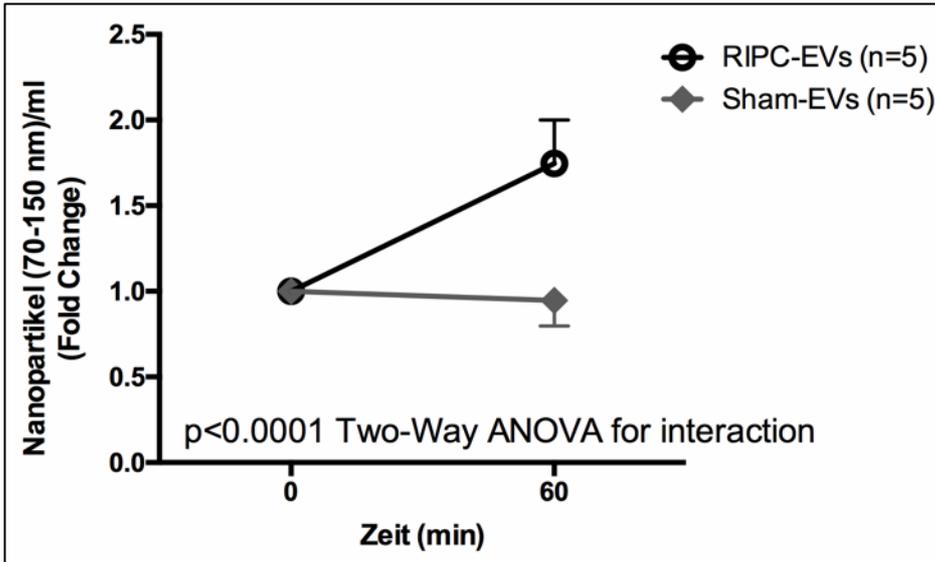


Abbildung 12: Fold Change der EV-Konzentration vor und 60 Minuten nach RIPC- bzw. Sham-Manöver. Es werden Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes gezeigt.

Die EV-Konzentrationen der beiden Patientenkollektive vor und 60 Minuten nach RIPC beziehungsweise Sham wurden als Fold Change im zeitlichen Verlauf analysiert. Bei den Patienten der RIPC-Gruppe kam es nach 60 Minuten zu einem mittleren 1,75-fachen Anstieg der EV-Konzentration (Two-Way ANOVA des Fold Change:  $p < 0,0001$ ). Im Gegensatz dazu konnte eine signifikante Veränderung in der Sham-Gruppe nicht nachgewiesen werden (Fold Change post Sham 0,95-fach gegenüber pre Sham).

### 3.2. Aufnahme Extrazellulärer Vesikel in H9c2-Zellen

Zur Untersuchung einer möglichen Aufnahmekinetik Extrazellulärer Vesikel in H9c2-Zellen wurden Extrazelluläre Vesikel mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff BODIPY TR Ceramide der Firma Invitrogen markiert. H9c2-Zellen wurden sodann mit den gefärbten Vesikeln in drei Konzentrationen ( $1 \times 10^5$  part/ml,  $1 \times 10^7$  part/ml und  $1 \times 10^9$  part/ml) für 1, 3, 6 und 18 Stunden inkubiert und schließlich auf einem Objektträger fixiert. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie und ist in Abbildung 13 dargestellt. Das stärkste rote Fluoreszenzsignal intrazellulär vorliegender EVs ist bei einer Konzentration von  $1 \times 10^9$  part/ml nach allen vier Inkubationszeiträumen erkennbar. Bei einer Konzentration von  $1 \times 10^9$  part/ml ist zudem eine Zunahme des Fluoreszenzsignals im

zeitlichen Verlauf erkennbar, wobei bei genannter Konzentration das Signal nach 18 Stunden diffus über den intrazellulären Raum hinaus (extrazellulär) erkennbar scheint. Eine Behandlung mit EV-Konzentrationen von  $1 \times 10^5$  und  $1 \times 10^7$  part/ml führten zu allen Zeitpunkten zu keinem klar erkennbaren Unterschied in der Signalstärke. Die hier gezeigten immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden nach der Versuchsetablierung repräsentativ im selben Versuchsdurchlauf erstellt.

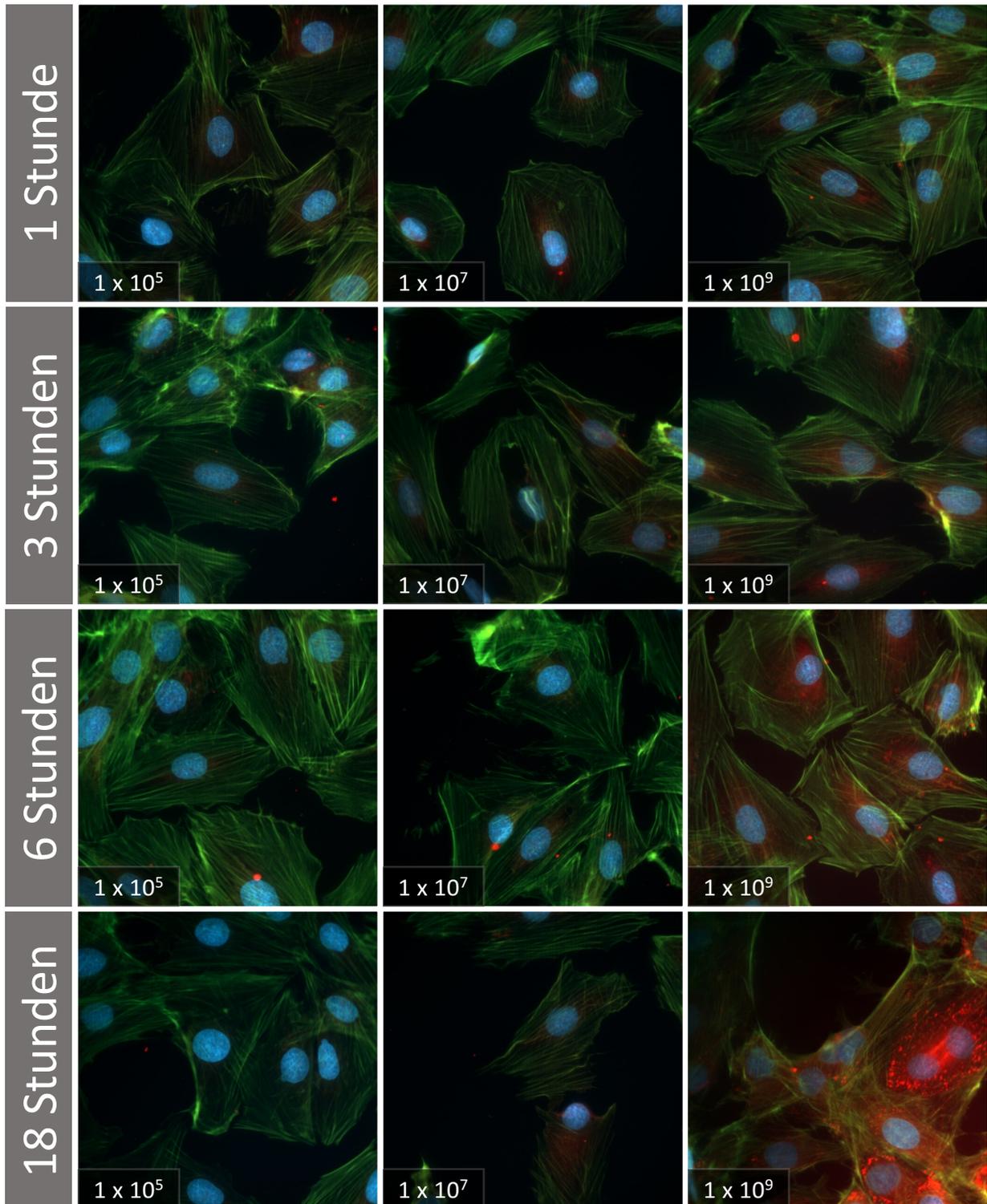


Abbildung 13: Zusammenhang zwischen EV-Konzentration und -Inkubationsdauer in H9c2-Zellen in der Fluoreszenz-mikroskopie. Als rot fluoreszierend erkennbar sind intrazellulär liegende EVs. Grün gefärbt sind F-Aktin-Unterklassen des Zytoskeletts durch Alexa Fluor 488 Phalloidin. Die Zellkerne sind hier als Blaufärbung (DAPI) erkennbar.

### 3.3. Caspase 3/7-Aktivität unter Hypoxie-Bedingungen und Serumdeprivation

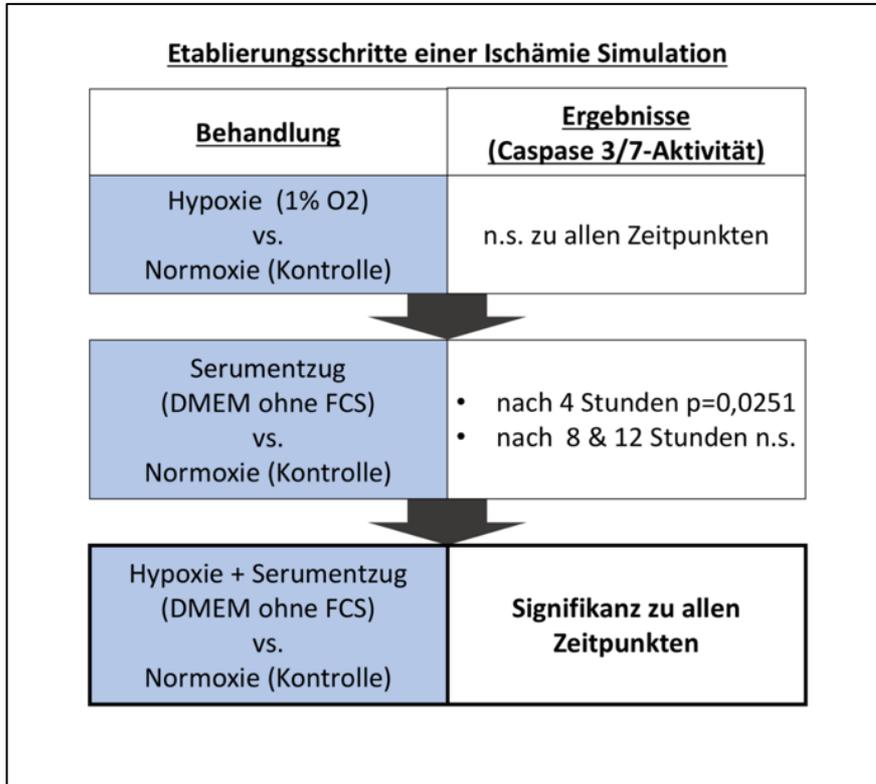


Abbildung 14: Etablierungsschritte für eine Ischämie Simulation im H9c2 Zellmodell.

Zur Etablierung einer geeigneten Ischämie-Simulation im Zellmodell wurden mögliche Gegenspieler der Zellviabilität geprüft: eine Behandlung mit hypoxischem Gas, eine Serumdeprivation des Zellkulturmediums (DMEM ohne FCS) sowie eine Kombination beider Behandlungen (Hypoxie + DMEM ohne FCS). Als Marker der Apoptose in H9c2 Zellen erfolgte die Messung der Caspase 3/7-Aktivität, die Schlüsselenzyme der Apoptose-Kaskade darstellen. Eine Skizzierung der aufeinander aufbauenden Etablierungsreihe ist in Abbildung 14 illustriert.

### 3.3.1. Hypoxie und Caspase-Aktivität

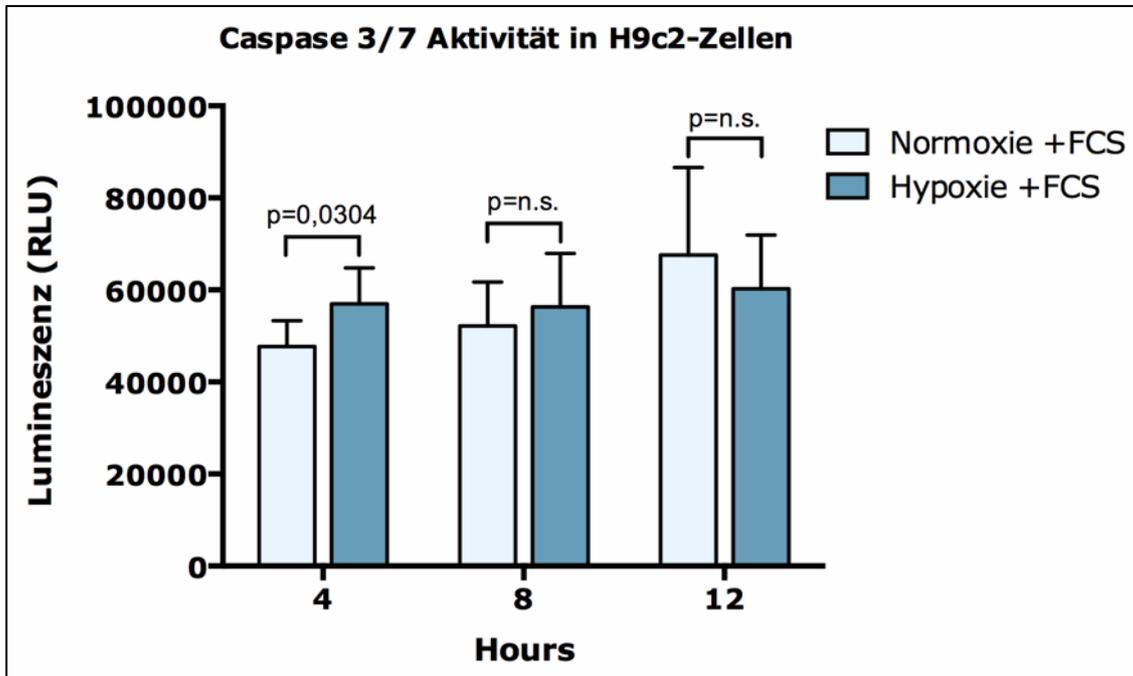


Abbildung 15: Caspase 3/7-Aktivität (RLU) in H9c2-Zellen nach 4, 8 und 12 Stunden Hypoxie bzw. Normoxie. Die Balken zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts.

Zunächst wurde der Einfluss einer Hypoxie-Behandlung (1 % O<sub>2</sub>) im Vergleich zu einer Normoxie-Kontrolle (21 % O<sub>2</sub>) untersucht. Gemessen wurde die Apoptose, beziehungsweise Caspase 3/7-Aktivität, in H9c2-Zellen nach einer 4, 8 und 12 stündigen hypoxischen Begasung. Wie oben beschrieben, erfolgte die Messung der Caspase 3/7-Aktivität als Lumineszenz-Signal in Relative Light Units (RLU). Wie in Abbildung 15 erkennbar, ergibt sich ein signifikanter Unterschied in der Caspase 3/7-Aktivität nach 4 Stunden hypoxischer Begasung ( $p=0,0304$ ). Dieser Effekt relativierte sich jedoch nach 8 Stunden ( $p=0,2953$ ) und 12 Stunden ( $p=0,7123$ ). Die Messung erfolgte in drei unabhängigen Versuchswiederholungen jeweils in Doppelbestimmungen. Dies gilt, soweit nicht anders angegeben, analog für alle weiteren hier beschriebenen Caspase 3/7-Messungen.

### 3.3.2. Serumentzug und Caspase-Aktivität unter Normoxie

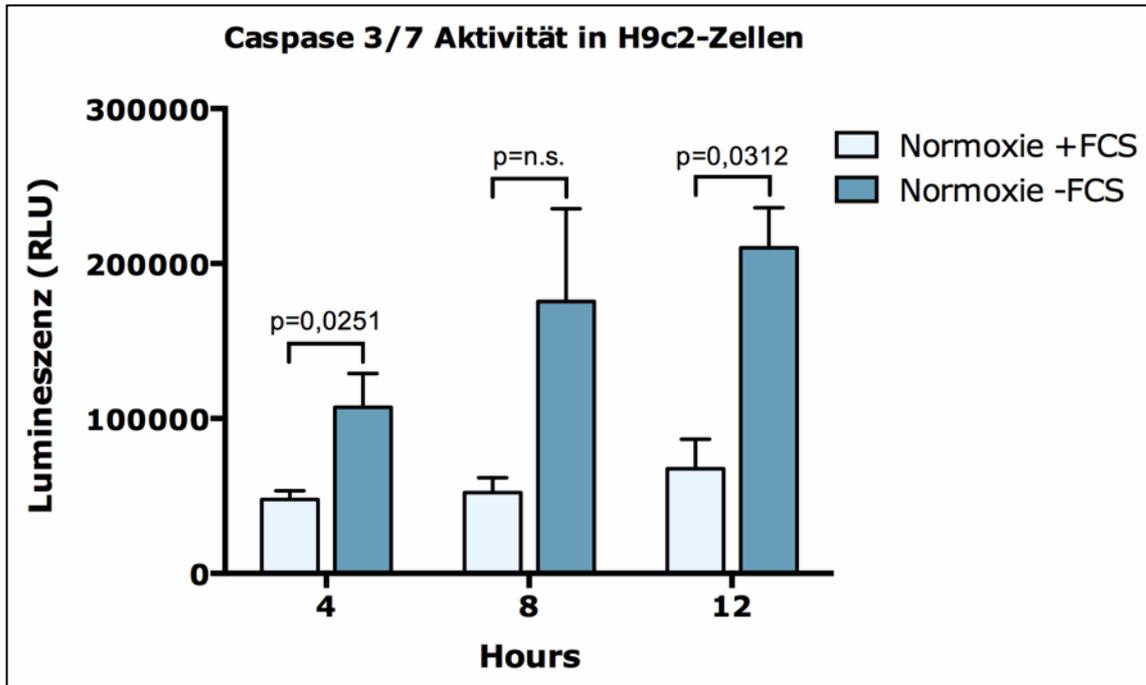


Abbildung 16: Caspase 3/7-Aktivität (RLU) in H9c2-Zellen nach 4, 8 und 12 stündiger Kultivierung in DMEM ohne FCS (Serumentzug) und unter normoxischen Bedingungen. Die Balken zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts.

Es folgte eine Untersuchung der Caspase 3/7-Aktivität in H9c2-Zellen, welche unter Serumentzug (DMEM ohne FCS) kultiviert wurden gegenüber im Standardmedium (DMEM + FCS) kultivierter Zellen. Beide Gruppen erhielten für die angegebenen Zeiträume eine normoxische Begasung. Es war ein signifikanter Unterschied nach 4 Stunden ( $p=0,0251$ ) und nach 12 Stunden ( $p=0,0312$ ) erkennbar, nicht aber nach 8 Stunden ( $p=0,0512$ ) (siehe Abbildung 16).

### 3.3.3. Caspase-Aktivität nach Normoxie versus Hypoxie und Serumentzug

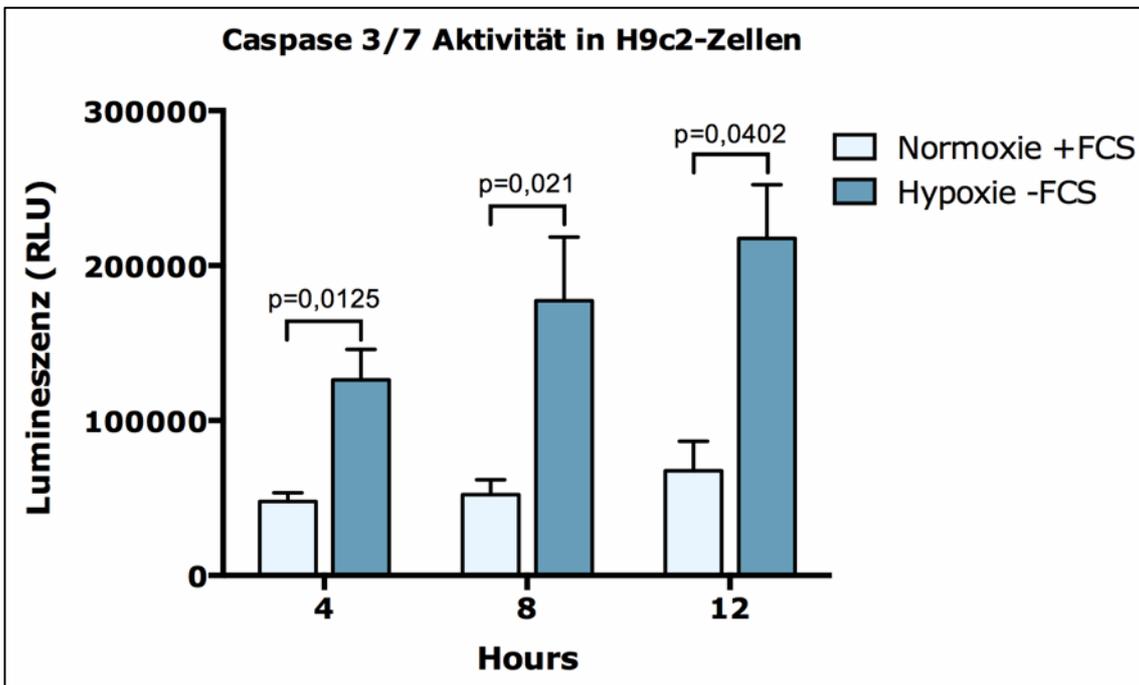


Abbildung 17: Caspase 3/7-Aktivität (RLU) in H9c2-Zellen nach 4, 8 und 12 stündiger Kultivierung in DMEM ohne FCS (Serumentzug) und hypoxischer Begasung. Die Balken zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass ein Serumentzug eine verstärkte Caspase 3/7-Aktivität aufwies als die alleinige Hypoxie-Behandlung, erfolgte eine Kultivierung von H9c2-Zellen mit serumdepriviertem Medium (DMEM ohne FCS) und einer zusätzlichen hypoxischen Begasung. Die Kombination aus Serumentzug und Hypoxie weist gegenüber normal kultivierten Zellen (Standardmedium + Normoxie) zu allen Zeitpunkten eine signifikant höhere Caspase 3/7-Aktivität auf ( $p=0,0125$  nach 4 Stunden;  $p=0,021$  nach 8 Stunden;  $p=0,0402$  nach 12 Stunden) (siehe Abbildung 17).

### 3.3.4. Caspase-Aktivität nach Serumentzug

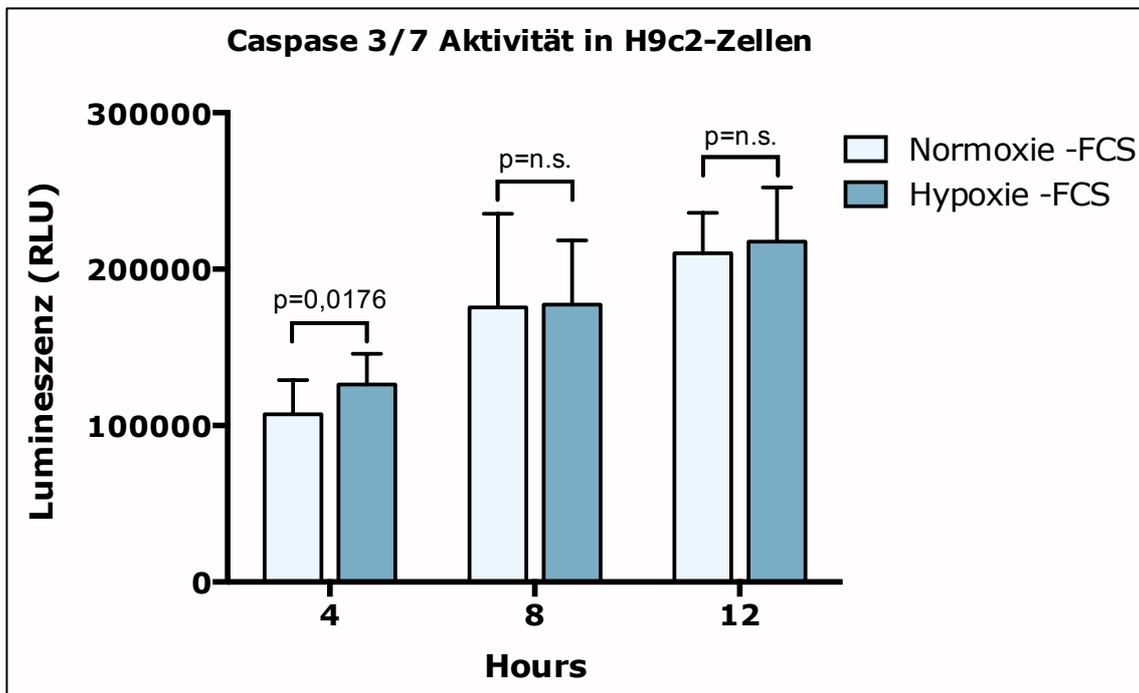


Abbildung 18: Caspase 3/7-Aktivität (RLU) in H9c2-Zellen nach 4, 8 und 12 stündiger Kultivierung in DMEM ohne FCS (Serumentzug) unter hypoxischer bzw. normoxischer Begasung. Die Balken zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts.

Vergleicht man die Caspase 3/7-Aktivität von H9c2-Zellen, welche in DMEM ohne FCS (Serumentzug) kultiviert und entweder mit Normoxie oder Hypoxie behandelt wurden, wiesen die mit hypoxischem Gas behandelten Zellen nach 4 Stunden eine signifikant höhere Apoptose Aktivität auf ( $p=0,0176$ ). Dieser Effekt relativierte sich jedoch zu den Zeitpunkten nach 8 und 12 Stunden (siehe Abbildung 18).

Zur Anwendung einer geeigneten Ischämie-Simulation entschieden wir uns daher für eine Kultivierung der Zellen mit einem Medium ohne FCS (Serumentzug) und einer Begasung mit hypoxischem Gas für 4 Stunden, da hier der deutlichste Effekt auf die Apoptose beziehungsweise Caspase 3/7-Aktivität erkennbar war. Die Kombinierte Behandlung einer Hypoxiebehandlung und einem Serumentzug wird im Weiteren unter „Ischämie“ zusammengefasst.

### 3.4. Einfluss RIPC angereicherter EVs auf Apoptose in H9c2-Zellen

Wir untersuchten den Einfluss Extrazellulärer Vesikel auf die Caspase 3/7-Aktivität in H9c2-Zellen. Es wurden EVs verwendet, welche aus dem Patientenserum vor und 60 Minuten nach RIPC Manöver (pre RIPC und post RIPC) sowie vor und 60 Minuten nach Sham (pre Sham und post Sham) angereichert wurden. Nach der Behandlung durch Extrazelluläre Vesikel wurden die Zellen für 6 Stunden mit Normoxie und dem Standardmedium behandelt beziehungsweise einer Ischämie (DMEM ohne FCS sowie Hypoxie) ausgesetzt.

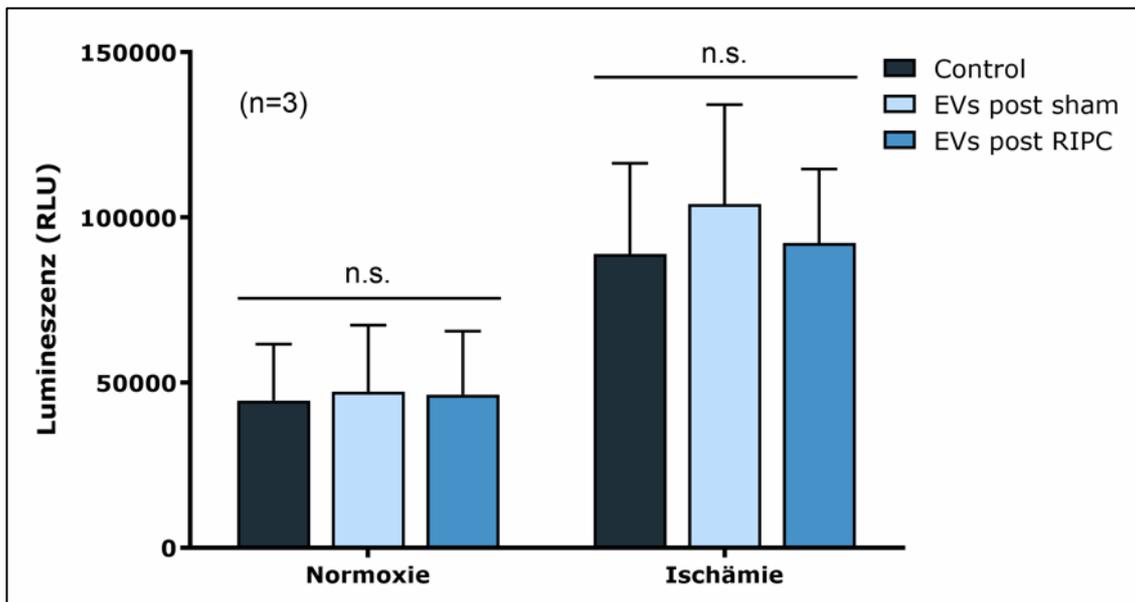


Abbildung 19: Caspase 3/7-Aktivität (RLU) in H9c2 Zellen nach einer Behandlung durch post RIPC- bzw. post Sham-EVs. Die hier als Ischämie angegebenen Zellen wurden hypoxischem Gas & einem Serumentzug ausgesetzt. Control-Zellen erhielten Hepes (EV Aufbewahrungslösung). Die Balken zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Caspase 3/7-Aktivität zwischen post RIPC-EVs und post Sham-EVs behandelter H9c2-Zellen. Eine Reduktion der Apoptose konnte weder unter normoxischen noch ischämischen Bedingungen beobachtet werden.

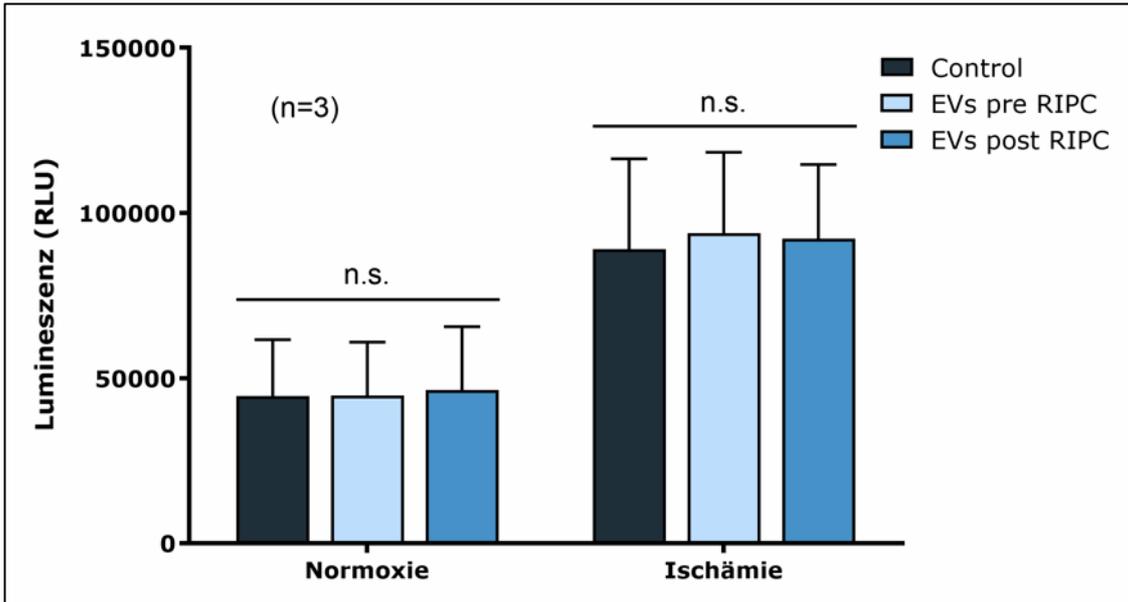


Abbildung 20: Caspase 3/7-Aktivität (RLU) in H9c2 Zellen nach Inkubation mit pre und post RIPC-EVs. Die hier als Ischämie angegebenen Zellen wurden hypoxischem Gas & einem Serumentzug ausgesetzt. Control-Zellen erhielten Hepes (EV Aufbewahrungslösung). Die Balken zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts.

EVs von RIPC-Patienten, welche vor und nach einem RIPC Manöver angereichert wurden, zeigten keine Reduktion der Caspase 3/7-Aktivität. Dies war weder unter Normoxie noch unter Ischämie der Fall.

### 3.5. Einfluss von Isofluran und EVs

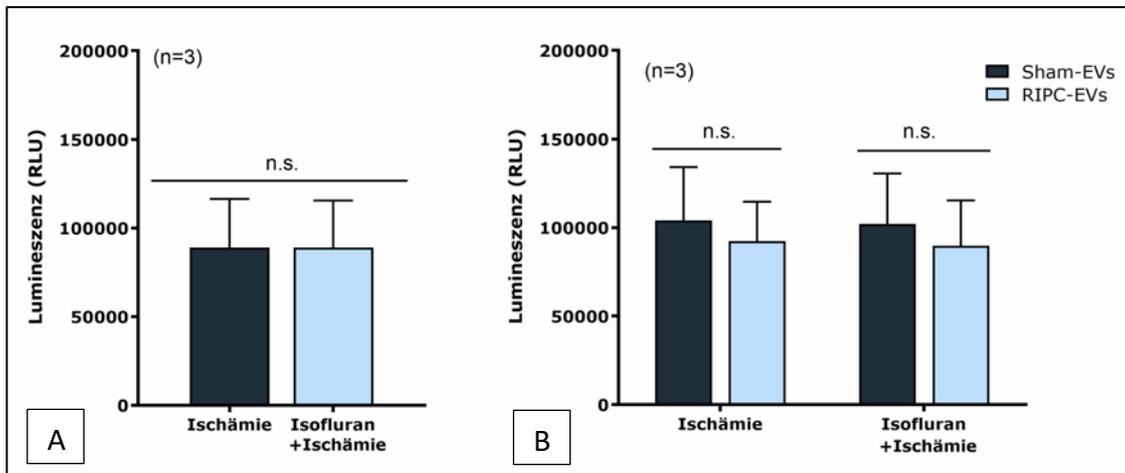


Abbildung 21: A.&B.: Caspase 3/7-Aktivität (RLU) in H9c2 Zellen nach Isofluran-Konditionierung unter Ischämiebedingungen (Hypoxie und DMEM(-)FCS). B: Zusätzliche Behandlung mit EV (post RIPC bzw. Sham). Die Balken zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts.

Wir untersuchten den Einfluss einer Isofluran-Konditionierung und einer kombinierten Behandlung mit RIPC-EVs auf die Apoptose Aktivität in H9c2-Zellen. Eine alleinige Konditionierung mit Isofluran zeigte keine Reduktion der Caspase 3/7-Aktivität in H9c2-Zellen unter Ischämie gegenüber Zellen ohne Isofluran-Konditionierung (siehe Abbildung 21 A).

Bei Zellen, die mit Isofluran konditioniert wurden und anschließend post RIPC angereicherte EVs erhielten, zeigte sich kein Unterschied gegenüber einer Behandlung mit post Sham-EVs unter Ischämiebedingungen (siehe Abbildung 21 B).

#### **4. Diskussion**

Extrazelluläre Vesikel sind vielversprechende humorale Faktoren unterschiedlicher physiologischer und pathophysiologischer Prozesse sowie neuere Kandidaten der Zell-Zell-Kommunikation. Insbesondere ihre potentielle Bedeutung als diagnostisches und therapeutisches Werkzeug hat in den vergangenen Jahren großes Interesse in der EV-Forschung angeregt (Shah et al., 2018). Nach ersten Hinweisen, dass EVs, welche nach ischämischer Konditionierung isoliert bzw. angereichert werden, für einen kardioprotektiven Effekt nötig sind (Giricz et al., 2014), geben die Untersuchungen von Vicencio et al. (2015) den Ausgangspunkt dieser Arbeit. Denn hier wird (1) ein signifikanter EV-Konzentrationsanstieg nach einer 3 x 5 minütigen RIPC bei gesunden Probanden gezeigt sowie (2) eine signifikante Reduktion des Zelltods von HL-1 Kardiomyozyten und primär isolierten Kardiomyozyten adulter Ratten nach Behandlung mit EVs, welche nach RIPC aus dem Serum gesunder Probanden isoliert wurden.

##### **4.1. EV-Konzentrationsanstieg nach RIPC**

Um die genannten Ergebnisse von Vicencio et al. nachvollziehen zu können, bestand der erste Schritt darin, einen möglichen Konzentrationsanstieg Extrazellulärer Vesikel nach RIPC auch in den von uns verwendeten 10 Patienten-Serumproben nachzuweisen. Es zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Konzentrationsanstieg Extrazellulärer Vesikel post RIPC in Relation zu pre RIPC, nicht aber nach Sham. Die EV-Konzentration post RIPC ist vergleichbar mit Messwerten genannter Autoren (Vicencio et al., 2015). Die vorliegenden Daten sind stimmig mit bereits veröffentlichten Daten unserer Arbeitsgruppe bezüglich eines EV-Anstiegs in venösem Blut nach RIPC bei CABG-Patienten (Frey et al., 2018). Die erneute Überprüfung eines EV-Anstiegs war nötig, um bei Folgeversuchen mit eben jenen Proben sinnvoll zu verfahren und in der Ergebnisinterpretation logisch argumentieren zu können. Auch handelt es sich bei den hier verwendeten Proben um arteriell - nicht venös - gewonnenes Material, bei dem ein EV-Anstieg noch nachzuweisen war.

Ein EV-Konzentrationsanstieg lässt vermuten, dass durch das RIPC-Manöver Mechanismen ausgelöst werden, welche die Sezernierung Extrazellulärer Vesikel steigern. Die

Serumproben, aus denen EVs angereichert wurden, stammen von Patienten, welche sich im Rahmen einer klinischen Studie (Thielmann et al., 2013) einer CABG-Operation unterzogen haben und präoperativ bezüglich einer RIPC oder Sham randomisiert wurden. Bei den Patienten, welche eine RIPC erhielten, war die Prognose postoperativ verbessert. Die gefundenen Veränderungen der EV-Konzentration im zeitlichen Verlauf geben zu der Vermutung Anlass, dass der kardioprotektive Effekt der RIPC durch eine erhöhte EV-Konzentration ausgelöst wird.

Die bei ihrer Entdeckung entstandene Annahme, dass EVs nur eine Form der Entsorgung zellulärer Abfallprodukte darstellen (Chargaff & West, 1946), ist mittlerweile längst überholt (Valadi et al., 2007). Als mögliches Transportvehikel verschiedenster Moleküle, wie beispielsweise kardioprotektiver Mikro-RNA (Wang et al., 2015) und heat shock Proteine (Gupta & Knowlton, 2007), könnten EVs auf indirektem Wege, insbesondere in erhöhter Konzentration, für die Einleitung einer zellprotektiven Kaskade ursächlich sein.

#### **4.2. Aufnahmeversuche zur Etablierung der Konzentration und Inkubationsdauer**

Nachdem EVs nach extrazellulär freigesetzt werden, interagieren sie über verschiedene Mechanismen mit anderen Zellen. Zum einen ist eine Zell-Zell-Interaktion durch direkte Liganden-Rezeptor-Interaktion möglich (Vicencio et al., 2015). Zum anderen können EVs mit zellulären Plasmamembranen fusionieren oder durch Endozytose zelluläre Mechanismen aktivieren. Da viele sekretierte Proteine zelluläre Plasmamembranen nicht ohne weiteres überqueren, können EVs für die genannten Mechanismen als Transportvehikel fungieren (Lai et al., 2010). Verschiedene Proteine sind als Fracht von EVs als Komponenten kardioprotektiver Prozesse identifiziert worden (Cai et al., 2012; Yellon & Davidson, 2014). Daher ist die Überlegung naheliegend, dass eine EV-Aufnahme in den Intrazellularraum von Nöten ist, um eine entsprechende Kaskade in Gang zu setzen.

Bevor wir eine mögliche Protektion durch EVs in Kardiomyozyten nachweisen wollten, sollte daher zunächst eine Aufnahme der EVs durch H9c2-Kardiomyozyten visualisiert werden. Hierfür wurden H9c2-Zellen mit Fluoreszenzmarkierten EVs in drei verschiedenen Konzentrationen unterschiedlich lang inkubiert (siehe hierfür Kapitel 2.2.5.).

Vicencio et al. (2015) geben keine genaue EV-Konzentration je Milliliter an (ausschließlich Exosomen/Well), welche für einen herzzellschützenden Effekt nötig sind. Uns erschien die Versuchsdurchführung mit physiologischen EV-Konzentrationen nach RPC-Verfahren am sinnvollsten. Jedoch wählten wir zunächst die unterschiedlichen Konzentrationen unter Berücksichtigung des verfügbaren biologischen Materials angereicherter EVs.

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung deutet darauf hin, dass eine Aufnahme von EVs in den Intrazellularraum von H9c2-Zellen stattfindet. Dabei scheint insbesondere die EV-Konzentration die entscheidende Komponente der Aufnahmemenge zu sein, da bei der höchsten untersuchten Konzentration von  $1 \times 10^9$  part/ml zu jedem Zeitpunkt eine gut erkennbare Signalstärke vorlag. Grund hierfür könnte sein, dass eine Interaktion durch EV-Aufnahme erst bei höherer extrazellulärer Verfügbarkeit erreicht wird. Die zeitliche Komponente der EV-Exposition ist vermutlich von sekundärer Relevanz, da bei einer Behandlung mit geringeren EV-Konzentrationen trotz prolongierter Inkubationszeit keine deutliche Signalverstärkung intrazellulär erkennbar war. Es ist jedoch anzunehmen, dass eine verlängerte Inkubation mit EVs zu einer effektiveren Protektion führen könnte.

Um eine ausreichende Aufnahme in mit EVs behandelte H9c2-Zellen in unseren Experimenten zu gewährleisten, etablierten wir daher, ausgehend von den hier vorliegenden Erkenntnissen, die Kombination aus einer 6-stündigen Inkubationszeit und einer Konzentration von  $10^9$  part/ml Extrazellulärer Vesikel. Dieses Prinzip wurde in den unter Kapitel 2.2.7 beschriebenen Experimenten angewandt.

Andere Autoren konnten ebenfalls mittels Fluoreszenzmarkierung Exosomen bzw. Extrazelluläre Vesikel im Intrazellularraum nachweisen (Minghua et al., 2018; Wang et al., 2015). Daher gehen wir davon aus, dass es sich bei dem rot-fluoreszierenden Signal um an EVs gebundene Farbpartikel handelt. Jedoch bindet der von uns verwendete Fluoreszenzfarbstoff laut Herstellerangaben potentiell auch an anderen zellulären Strukturen, wie beispielsweise dem endoplasmatischen Retikulum (Invitrogen, 2013). Da die Zellmembran wie oben beschrieben permeabilisiert wurde, kann ein positives Signal die EV-

Aufnahme durch Endozytose nicht belegen. Die entsprechenden Farbstoffe könnten nach Permeabilisierung EV-unabhängig in den intrazellulären Raum gelangt sein.

Sollte der Fluoreszenzfarbstoff EV-gebunden von den H9c2-Zellen aufgenommen worden sein, beweist dies nicht, dass eine Kardioprotektion durch Endozytose vermittelt wird. Beispielsweise wären Liganden-Rezeptor-Interaktionen (Hoshino et al., 2015) oder die Fusion mit Plasmamembranen (Maas et al., 2017) mögliche Mechanismen zur Initiierung kardioprotektiver Kaskaden. Interessant wäre die Visualisierung einer EV-Aufnahme durch die von uns verwendeten H9c2-Zellen mittels Echtzeit-Fluoreszenzmikroskopie und Einzelteilchenverfolgung, wie von Tian et al. (2014) beschrieben.

Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurden durch zwei Untersucher nach dem Vier-Augen-Prinzip ausgewertet, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch subjektive Präferenzen zu minimieren. Die in 3.2 gezeigte Bildauswahl erfolgte möglichst repräsentativ für die jeweilige EV-Konzentration und Inkubationsdauer. Anzumerken ist jedoch, dass zahlreiche Zellen deutlich geringere oder keine roten Fluoreszenzsignale in ihren jeweiligen Slides aufwiesen. Somit erfolgte die Auswertung nicht ohne Bias. Eine Lösung wäre die Quantifizierung der Signalstärke pro Bildausschnitt für den gesamten Slide. Anschließend könnte eine automatisierte Auswahl eines Bereichs erfolgen, der die durchschnittliche Signalstärke des entsprechenden Slides am ehesten repräsentiert.

### **4.3. Einfluss von EVs auf Apoptose**

Zunächst galt es, eine geeignete Ischämiesimulation im Zellmodell zu etablieren. Hierfür verwendeten wir H9c2-Kardiomyozyten. Zum einen haben wir langjährige Erfahrung im Umgang mit dieser Zellkultur, zum anderen werden H9c2-Zellen in zahlreichen Arbeiten als geeigneter Ersatz menschlicher Kardiomyozyten mit ähnlichen Eigenschaften beschrieben (Neary et al., 2014). Eine Substitution mit isolierten Rattenherzzellen *in vitro* ist aus ethischen Aspekten geboten, da die Experimente im Rahmen dieser Arbeit noch als frühe Etablierungsschritte für eine eventuelle modifizierte Anwendung *in vivo* anzusehen sind.

Eine alleinige Hypoxiebehandlung führte zu keiner signifikanten Veränderung der Apoptose im Sinne einer Erhöhung der Caspase 3/7-Aktivität, was durch andere Arbeiten ebenfalls gezeigt wird (Long et al., 1997; Malhotra & Brosius, 1999). Das Schaffen einer hypoxischen Umgebung durch Begasung des Zellmediums wird von anderen Autoren als etabliert beschrieben (Place et al., 2017). Da jedoch erst das Einwirken verschiedener Faktoren wie Nährstoff- und Sauerstoffmangel im Organismus zu einer Ischämie und dem konsekutiven Zelltod führen, wurde daher eine Kombination aus Hypoxie und Serumdeprivation (Ischämie) gewählt. Wie Bonavita et al. (2003) bereits beschreibt, führte dies zu einer signifikanten Erhöhung der Apoptose-Aktivität (siehe 3.3.). Dies stellt eine geeignete Ausgangslage dar, um den Einfluss von EVs auf die Apoptose unter Ischämiebedingungen zu untersuchen.

Die Inkubation der H9c2-Zellen mit post-RIPC angereicherten Extrazellulären Vesikeln führte zu keiner Reduktion der Apoptoseraten. Dies war weder unter normoxischen noch unter ischämischen Bedingungen der Fall. Eine Annahme wäre, dass nach RIPC angereicherte EVs keinen herzzellschützenden Effekt aufweisen können. Dies stünde jedoch im Gegensatz zu den positiven Ergebnissen von Vicencio et al. (2015), die eine Kardioprotektion durch EVs vermuten lassen. Mögliche Ursachen könnten Unterschiede in der Methodik sein:

Vicencio et al. (2015) wiesen verschiedene Markerproteine (beispielsweise HSP70) im isolierten bzw. angereicherten EV-Material nach, welche mit einer Kardioprotektion in Zusammenhang gebracht werden (Efthymiou et al., 2004; Giricz et al., 2014). Eine Proteomanalyse des angereicherten EV-Materials war jedoch nicht Teil dieser Arbeit. Auch werden neben Proteinen auch verschiedene Subgruppen von miRNAs (z.B. miRNA-144) als EV-gebundene Vermittler der Kardioprotektion diskutiert (Li et al., 2014). Eine Identifikation und Quantifizierung verschiedener EV-Markerproteine, zum Beispiel CD63, CD9, CD81 (Davidson et al., 2018; Lötvall et al., 2014) und Mikro-RNAs in unserem Material, könnten neben einem reinen EV-Anstieg Hinweise für protektives Potential nach RIPC durch eine Veränderung des EV-Transportguts offenlegen.

Wir verwendeten H9c2-Zellen zum einen aus o.g. Gründen und zum anderen, da diese im Gegensatz zu den von Vicencio et al. (2015) verwendeten HL-1-Zellen in Bezug auf ihr

Energiestoffwechsellmuster und ihre Sensitivität gegenüber oxidativem Stress bessere Übereinstimmung mit primären Kardiomyozyten aufweisen (Kuznetsov et al., 2015). So könnte es sein, dass die Schädigung der H9c2-Zellen durch Ischämie und Reperfusion gravierender ausfiel als bei HL-1 Zellen, sodass eine Protektion durch EVs ineffektiv blieb, beziehungsweise sich mit zellschädigenden Mechanismen ausglich. Jedoch ist zu erwähnen, dass andere Autoren durchaus Hinweis für eine Protektion von H9c2-Zellen durch EVs zeigen können (Wang et al., 2015).

Zwar konnten wir keinen herzzellschützenden Effekt durch EVs in dieser Arbeit nachweisen, indessen zeigt unsere Arbeitsgruppe, dass bei gleichem Versuchsablauf eine Reduktion apoptotischer Zellen erreicht werden kann (Abel et al., 2020). Die hier erfolgte Messung der Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie nach Annexin V/7-AAD Färbung stand uns bei der Datenerhebung für diese Arbeit noch nicht zur Verfügung. Die Messung der Caspase als zentraler Baustein der durch oxidativen Stress ausgelösten Apoptosekaskade ist durchaus als sinnvoll zu bewerten (Mulay et al., 2016), jedoch stellte es scheinbar kein geeignetes Verfahren zur Apoptosemessung in unserem Versuchsablauf dar. Zur genaueren Überprüfung hierfür wäre eine Erweiterung der Versuchswiederholungen sinnvoll.

Wir bringen den Anstieg der EVs aufgrund des zeitlichen Zusammenhangs mit der RIPC in Verbindung. Jedoch ist das Ursprungsgewebe der von uns angereicherten EVs nicht klar. Das von Extrazellulären Vesikeln transportierte Material, ihr Zielgewebe und somit ihre Funktion ist als vielfältig zu betrachten. So werden auch pathogene und zellschädigende Eigenschaften verschiedener EVs diskutiert (Barile et al., 2017). So könnten bestimmte Exosomen bei der Zell-Zell-Kommunikation in der Entwicklung von Atherosklerose (Huber & Holvoet, 2015), Kardiomyopathien (Halkein et al., 2013) und Entzündungen myokardialen Gewebes (Gambim et al., 2007) eine Rolle spielen. Daher sollte auch die Möglichkeit schädigender Einflüsse der von uns angereicherten EVs in Betracht gezogen werden.

Es ist noch nicht geklärt, ob EVs in der von uns gewählten Größenordnung (häufig als Exosomen bezeichnet (Yáñez-Mó et al., 2015)) im Zuge der RIPC für eine Kardioprotektion ursächlich sind. Die deutlich größeren Mikrovesikel, welche ebenfalls nach RIPC

isoliert werden können, haben ebenfalls das Potential eine I/R-Schädigung in Form der Infarktgröße in Rattenherzen (Ma et al., 2015) und Apoptoserate von Kardiomyozyten (Wang et al., 2016) zu reduzieren. Die Unterschiede der verwendeten EV-Fraktionen durch uneinheitliche Isolationsprotokolle werden in der EV-Forschung von vielen Autoren bis dato als problematisch bewertet und verschiedene Verfahren werden geprüft sowie vorgeschlagen (Cheng et al., 2019; Li et al., 2017). Eine Verbesserung und Vereinheitlichung der Isolationsprotokolle zur besseren Vergleichbarkeit auch in Hinblick auf eventuelle klinische Anwendbarkeit sollte daher in Zukunft weiter angestrebt werden. Schließlich sollte auch kein alleiniger Fokus auf diese neueren Formen der Zell-Zell-Kommunikation im Rahmen der Protektion durch RIPC liegen. Wie eingangs bereits erwähnt, untersuchen zahlreiche Arbeitsgruppen viele weitere potentiell protektive humorale als auch neuronale Mechanismen (Kleinbongard et al., 2017).

Es sollte der Einfluss einer Isoflurankonditionierung im Zusammenhang mit einer EV-Inkubation untersucht werden. Weder die alleinige Konditionierung mit Isofluran noch die Kombination dieser mit einer EV-Behandlung der H9c2-Zellen führte zu einer Reduktion der Apoptose. Somit ist anzunehmen, dass Isofluran keinen protektiven Effekt aufweisen kann. Der oben beschriebene ausbleibende protektive Effekt der EVs unter Ischämiebedingungen kann vermutlich durch eine Konditionierung mit volatilen Anästhetika nicht im Sinne einer Apoptosereduktion verändert werden. Dies bestätigen ähnliche Experimente unserer Arbeitsgruppe, bei denen EVs zwar protektiv sind, jedoch keine Veränderung durch eine Isofluranbehandlung erkennbar ist (Abel et al., 2020). Plausibel wäre daher, dass EVs und ihr Transportgut einen alleinigen schützenden Effekt im Rahmen der RIPC haben und Isofluran diesen nicht verstärkt. Zwar zeigen klinische Daten, dass RIPC in Kombination mit volatilen Anästhetika im Gegensatz zu Propofol durchaus in einer Reduktion von Herzenzymen (Kottenberg et al., 2014) und Letalität (Landoni et al., 2013) resultieren kann. Jedoch argumentieren Autoren einer Metaanalyse 15 randomisierter Studien, dass Inhalationsnarkosen die Kardioprotektion durch RIPC abschwächen (Zhou et al., 2013).

#### **4.4. Perspektive für die Zukunft**

Eine Protektion von Herzzellen durch Extrazelluläre Vesikel konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Jedoch sprechen die Daten verschiedener Autoren für eine Kardioprotektion durch EVs. Diese häufig aus Zell- und Tiermodellen resultierenden Ergebnisse besitzen keine externe Validität, da sie nicht unmittelbar auf den menschlichen Organismus übertragbar sind. Eine therapeutische Anwendung von EVs erfordert einheitliche und reproduzierbare Protokolle zur Anreicherung sowie Purifizierung von EV-Proben. Auch die Bestimmung einer therapeutischen Wirkkonzentration wäre zielführend. Schon jetzt finden EVs als Therapeutika im Rahmen klinischer Studien Anwendung (Sluijter et al., 2018). Weiterführende EV-Forschung für ein besseres Verständnis der genauen Mechanismen ihrer therapeutischen Wirkkraft könnte einen weiteren therapeutischen Pfeiler zur Reduktion von Morbidität und Mortalität durch koronare Herzkrankheit sein.

## 5. Zusammenfassung

Die ischämische Fern-Präkonditionierung (RIPC) ist ein Verfahren, welches das Herz vor Ischämie-/Reperfusionsschäden schützen kann. Als mögliche kardioprotektive Faktoren der Zellkommunikation werden Extrazelluläre Vesikel (EVs) diskutiert. Die genauen Mechanismen hierbei sind noch unzureichend geklärt. Es stellt sich die Frage, ob EVs nach RIPC von Kardiomyozyten aufgenommen werden und die Apoptose-Aktivität nach Ischämie reduzieren.

Daher wurde bei Patienten im Rahmen einer Bypass-Operation vor und nach RIPC arterielles Blut abgenommen und daraus EVs angereichert. Ratten-Kardiomyozyten (H9c2) wurden mit gefärbten EVs in verschiedenen Konzentrationen inkubiert und im Zeitverlauf fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Weiterhin wurden EV-behandelte Kardiomyozyten einer Ischämie ausgesetzt und anschließend die Apoptose-Aktivität (Caspase Assay) gemessen. Die Fluoreszenzmikroskopie zeigte eine vermehrte Aufnahme von EVs, je höher die Konzentration und Inkubationsdauer mit EVs war. Mit EVs behandelte H9c2-Zellen zeigten gegenüber unbehandelten Zellen keine signifikante Verminderung der Caspase-Aktivität.

Zwar lässt die Aufnahme der EVs auf eine Zellinteraktion schließen, allerdings konnte der vermutete kardioprotektive Effekt in Form einer Apoptosereduktion in dem vorliegenden Versuchsaufbau nicht nachgewiesen werden, weshalb dieser in zukünftigen Projekten weiter untersucht werden sollte.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abel, F., Murke, F., Gaida, M., Garnier, N., Ochsenfarth, C., Theiss, C., Thielmann, M., Kleinbongard, P., Giebel, B., Peters, J., & Frey, U. H. (2020): Extracellular vesicles isolated from patients undergoing remote ischemic preconditioning decrease hypoxia-evoked apoptosis of cardiomyoblasts after isoflurane but not propofol exposure. *PLoS one*. 15(2), e0228948.
2. Albrecht, M. (2016): Ischämische Fernkonditionierung zur Kardioprotektion: Mechanismen und klinische Bedeutung. *Z Herz- Thorax- Gefäßchir.* 30(4), 266–270.
3. Alexander, J. H., & Smith, P. K. (2016): Coronary-Artery Bypass Grafting. *N. Engl. J. Med.* 374(20), 1954–1964.
4. Barile, L., Moccetti, T., Marbán, E., & Vassalli, G. (2017): Roles of exosomes in cardioprotection. *Eur. Heart J.* 38(18), 1372–1379.
5. Basit, H., & Huecker, M. R. (2019): Myocardial infarction serum markers. *StatPearls*.
6. Bautin, A. E., Galagudza, M. M., Datsenko, S. V., Tashkhanov, D. M., Marichev, A. O., Bakanov, A., Malaia, E., Naïmushin, A. V., Rubinchik, V. E., & Gordeev, M. L. (2014): Effects of remote ischemic preconditioning on perioperative period in elective aortic valve replacement. *Anesteziologiya i reanimatologiya*, (3), 11–17.
7. Birnbaum, Y., Hale, S. L., & Kloner, R. A. (1997): Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation*, 96(5), 1641–1646.
8. Bonavita, F., Stefanelli, C., Giordano, E., Columbaro, M., Facchini, A., Bonafè, F., Caldarera, C. M., & Guarnieri, C. (2003): H9c2 cardiac myoblasts undergo apoptosis in a model of ischemia consisting of serum deprivation and hypoxia: inhibition by PMA. *FEBS Lett*, 536(1-3), 85–91.
9. Bredesen, D. E. (2000): Apoptosis: Overview and transduction pathways. *J. Neurotrauma* 17(10), 801–810.
10. Cai, Z. P., Parajuli, N., Zheng, X., & Becker, L. (2012): Remote ischemic preconditioning confers late protection against myocardial ischemia-reperfusion injury in mice by upregulating interleukin-10. *Basic Res Cardiol.* 107(4), 277.
11. Chargaff, E., & West, R. (1946): The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J. Biol. Chem.* 166(1), 189–97.
12. Cheng, H., Fang, H., Xu, R. D., Fu, M. Q., Chen, L., Song, X. Y., Qian, J. Y., Zou, Y. Z., Ma, J. Y., & Ge, J. B. (2019): Development of a rinsing separation method for exosome isolation and comparison to conventional methods. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 23(12), 5074–5083.
13. Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014): Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of Exosomes and other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30(1), 255–289.
14. Davidson, S. M., Riquelme, J. A., Zheng, Y., Vicencio, J. M., Lavandero, S., & Yellon, D. M. (2018): Endothelial cells release cardioprotective exosomes that may contribute to ischaemic preconditioning. *Sci. Rep.* 8(1), 15885.
15. Davidson, S. M., Takov, K., & Yellon, D. M. (2017): Exosomes and cardiovascular protection. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 31(1), 77–86.
16. Efthymiou, C. A., Mocanu, M. M., de Bellerocche, J., Wells, D. J., Latchmann, D. S., & Yellon, D. M. (2004): Heat shock protein 27 protects the heart against myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.* 99(6), 392–394.

17. Ferrari, R., Balla, C., Malagù, M., Guardigli, G., Morciano, G., Bertini, M., Biscaglia, S., & Campo, G. (2017): Reperfusion damage – A story of success, failure and hope. *Circ. J.* 81(2), 131–141.
18. Frey, U. H., Klaassen, M., Ochsenfarth, C., Murke, F., Thielmann, M., Kottenberg, E., Kleinbongard, P., Klenke, S., Engler, A., Heusch, G., Giebel, B., & Peters, J. (2018): Remote ischaemic preconditioning increases serum extracellular vesicle concentrations with altered micro-RNA signature in CABG patients. *Acta. Anaesthesiol. Scand.* 63(4), 483–492.
19. Gambim, M. H., de Oliveira do Carmo, A., Marti, L., Veríssimo-Filho, S., Lopes, L. R., & Janiszewski, M. (2007): Platelet-derived exosomes induce endothelial cell apoptosis through peroxynitrite generation: Experimental evidence for a novel mechanism of septic vascular dysfunction. *Crit. Care* 11(5), R107.
20. Gho, B. C. G., Schoemaker, R. G., Van den Doel, M. A., Duncker, D. J., & Verdouw, P. D. (1996): Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation* 94(9), 2193–2200.
21. Giricz, Z., Varga, Z. V., Baranyai, T., Sipos, P., Pálóczi, K., Kittel, Á., Buzás, E. I., & Ferdinandy, P. (2014): Cardioprotection by remote ischemic preconditioning of the rat heart is mediated by extracellular vesicles. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 68, 75–78.
22. Gould, S. J., & Raposo, G. (2013): As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* 2, 10.3402/jev.v2i0.20389.
23. Granger, D. N. (1999): Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation* 6(3), 167–78.
24. Gstraunthaler, G.G., Toni Lindl, T.L. (2013). *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. 7th Ed. Heidelberg: Springer-Verlag.
25. Gupta, S., & Knowlton, A. A. (2007): HSP60 trafficking in adult cardiac myocytes: Role of the exosomal pathway. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 292(6), H3052–H3056.
26. Halkein, J., Tabruyn, S. P., Ricke-Hoch, M., Haghikia, A., Nguyen, N. Q., Scherr, M., Castermans, K., Malvaux, L., Lambert, V., Thiry, M., Sliwa, K., Noel, A., Martial, J. A., Hilfiker-Kleiner, D., & Struman, I. (2013): MicroRNA-146a is a therapeutic target and biomarker for peripartum cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* 123(5), 2143–2154.
27. Hall, J. E. (2016): *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. 13th Ed. Heidelberg: Springer-Verlag.
28. Hausenloy, D. J., Candilio, L., Evans, R., Ariti, C., Jenkins, D. P., Kolvekar, S., Knight, R., Kunst, G., Laing, C., Nicholas, J., Pepper, J., Robertson, S., Xenou, M., Clayton, T., Yellon, D. M., & ERICCA Trial Investigators (2015): Remote ischemic preconditioning and outcomes of cardiac surgery. *New Engl. J. Med. Orig.* 373, 1408–17.
29. Hausenloy, Derek J., & Yellon, D. M. (2013): Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J. Clin. Invest.* 123(1), 92–100.
30. Hausenloy, D. J., Mwamure, P. K., Venugopal, V., Harris, J., Barnard, M., Grundy, E., Ashley, E., Vichare, S., Di Salvo, C., Kolvekar, S., Hayward, M., Keogh, B., MacAllister, R. J., & Yellon, D. M. (2007): Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial. *Lancet* 370(9587), 575–579.
31. Hearse, D. J., & Tosaki, A. (1987): Free radicals and reperfusion-induced arrhythmias: protection by spin trap agent PBN in the rat heart. *Circ. Res.* 60(3), 375–83.
32. Hescheler, J., Meyer, R., Plant, S., Krautwurst, D., Rosenthal, W., & Schultz, G. (1991): Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circ. Res.* 69, 1476–1486.

33. Heusch, G. (2013): Cardioprotection: Chances and challenges of its translation to the clinic. *Lancet* 381(9861), 166–175.
34. Heusch, G. (2015): Molecular basis of cardioprotection signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ. Res.* 16(4), 674–699.
35. Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T. L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soplop, N., Uryu, K., Pharmed, L., King, T., Bojmar, L., Davies, A. E., Ararso, Y., Zhang, T., Lyden, D. (2015): Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527(7578), 329–335.
36. Huber, H. J., & Holvoet, P. (2015): Exosomes: Emerging roles in communication between blood cells and vascular tissues during atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 26(5), 412–419.
37. Invitrogen (2006): DAPI Nucleic Acid Stain [Benutzerhandbuch]. Abgerufen von: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp01306.pdf>
38. Invitrogen (2010): Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies [Online-Publikation]. Abgerufen von: <https://www.thermofisher.com/us/en/home/references/molecular-probes-the-handbook.html>
39. Invitrogen (2013): Labeling exosomal RNA and membrane components using fluorescent dyes [Benutzerhandbuch]. Abgerufen von: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/Exosome Tracing\\_App Note.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/Exosome Tracing_App Note.pdf)
40. Kimes, B. W., & Brandt, B. L. (1976): Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp. Cell Res.* 98(2), 367–381.
41. Kleinbongard, P., Peters, J., Jakob, H., Heusch, G., & Thielmann, M. (2018): Persistent survival benefit from remote ischemic pre-conditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *J. Am. Coll. Cardiol.* 71(2), 252–254.
42. Kleinbongard, P., Skyschally, A., & Heusch, G. (2017): Cardioprotection by remote ischemic conditioning and its signal transduction. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 469(2), 159–181.
43. Klenke, S., Renckhoff, K., Engler, A., Peters, J., & Frey, U. H. (2016): Easy-to-use strategy for reference gene selection in quantitative real-time PCR experiments. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 389(12), 1353–1366.
44. Kloner, R. A., Bolli, R., Marban, E., Reinlib, L., & Braunwald, E. (1998): Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation* 97(18), 1848–67.
45. Kosaka, N., Takeshita, F., Yoshioka, Y., Hagiwara, K., Katsuda, T., Ono, M., & Ochiya, T. (2013): Exosomal tumor-suppressive microRNAs as novel cancer therapy: "exocure" is another choice for cancer treatment. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65(3), 376–82.
46. Kottenberg, E., Thielmann, M., Bergmann, L., Heine, T., Jakob, H., Heusch, G., & Peters, J. (2012): Protection by remote ischemic preconditioning during coronary artery bypass graft surgery with isoflurane but not propofol - A clinical trial. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 56(1), 30–38.
47. Kottenberg, E., Musiolik, J., Thielmann, M., Jakob, H., Peters, J., & Heusch, G. (2014): Interference of propofol with signal transducer and activator of transcription 5 activation and cardioprotection by remote ischemic preconditioning during coronary artery bypass grafting. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 147(1), 376–382.
48. Kuznetsov, A. V., Javadov, S., Sickinger, S., Frotschnig, S., & Grimm, M. (2015): H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation. *Biochim Biophys Acta.* 1853(2), 276–284.

49. Lai, R. C., Arslan, F., Lee, M. M., Sze, N. S., Choo, A., Chen, T. S., Salto-Tellez, M., Timmers, L., Lee, C. N., El Oakley, R. M., Pasterkamp, G., de Kleijn, D. P., & Lim, S. K. (2010): Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* 4(3), 214–222.
50. Landoni, G., Greco, T., Biondi-Zoccai, G., Nigro Neto, C., Febres, D., Pintaudi, M., ... Zangrillo, A. (2013): Anaesthetic drugs and survival: a Bayesian network meta-analysis of randomized trials in cardiac surgery. *Br. J. Anaesth.* 111(6), 886–896.
51. Laulagnier, K., Vincent-schneider, H., Hamdi, S., Subra, C., Lankar, D., & Record, M. (2005): Characterization of exosome subpopulations from RBL-2H3 cells using fluorescent lipids 35, 116–121.
52. Lawson, C., Vicencio, J. M., Yellon, D. M., & Davidson, S. M. (2016): Microvesicles and exosomes: New players in metabolic and cardiovascular disease. *J. Endocrinol.* 228(2), R57–R71.
53. Le Page, S., Bejan-Angoulvant, T., Angoulvant, D., & Prunier, F. (2015): Remote ischemic conditioning and cardioprotection: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Basic Res. Cardiol.* 110(2), 11.
54. Lener, T., Gimona, M., Aigner, L., Börger, V., Buzas, E., Camussi, G., Chaput, N., Chatterjee, D., Court, F. A., Del Portillo, H. A., O'Driscoll, L., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Felderhoff-Mueser, U., Fraile, L., Gho, Y. S., Görgens, A., Gupta, R. C., Hendrix, A., Hermann, D. M., ... Giebel, B. (2015): Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper. *J. Extracell. Vesicles.* 4, 30087.
55. Li, J., Rohailla, S., Gelber, N., Rutka, J., Sabah, N., Gladstone, R. A., Wei, C., Hu, P., Kharbanda, R. K., & Redington, A. N. (2014): MicroRNA-144 is a circulating effector of remote ischemic preconditioning. *Basic Res. Cardiol.* 109(5), 423.
56. Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J., & Gao, Z. (2017): Progress in exosome isolation techniques. *Theranostics.* 7(3), 789–804.
57. Long, X., Boluyt, M. O., Hipolito, M. L., Lundberg, M. S., Zheng, J. S., O'Neill, L., Cirielli, C., Lakatta, E. G., & Crow, M. T. (1997): P53 and the hypoxia-induced apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J. Clin. Invest.* 99(11), 2635–2643.
58. Lötvall, J., Hill, A. F., Hochberg, F., Buzás, E. I., Di Vizio, D., Gardiner, C., Gho, Y. S., Kurochkin, I. V., Mathivanan, S., Quesenberry, P., Sahoo, S., Tahara, H., Wauben, M. H., Witwer, K. W., & Théry, C. (2014): Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J. Extracell. Vesicles* 3(1), 1–6.
59. Ma, F., Liu, H., Shen, Y., Zhang, Y., & Pan, S. (2015): Platelet-derived microvesicles are involved in cardio-protective effects of remote preconditioning. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8(9), 10832.
60. Maas, S. L. N., Breakefield, X. O., & Weaver, A. M. (2017): Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol.* 27(3), 172–188.
61. Malhotra, R., & Brosius, F. C. (1999): Glucose uptake and glycolysis reduce hypoxia-induced apoptosis in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 274(18), 12567–12575.
62. Meybohm, P., Bein, B., Brosteanu, O., Cremer, J., Gruenewald, M., Stoppe, C., Coburn, M., Schaelte, G., Böning, A., Niemann, B., Roesner, J., Kletzin, F., Strouhal, U., Reyher, C., Laufenberg-Feldmann, R., Ferner, M., Brandes, I. F., Bauer, M., Stehr, S. N., Kortgen, A., ... RIPHeart Study Collaborators (2015): A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery. *N. Engl. J. Med.* 373(15), 1397–1407.

63. Minghua, W., Zhijian, G., Chahua, H., Qiang, L., Minxuan, X., Luqiao, W., Weifang, Z., Peng, L., Biming, Z., Lingling, Y., Zhenzhen, W., Jianqing, X., Huihui, B., Xiaozhong, W., & Xiaoshu, C. (2018): Plasma exosomes induced by remote ischaemic preconditioning attenuate myocardial ischaemia/reperfusion injury by transferring miR-24. *Cell Death Dis.* 9(3), 320.
64. Mulay, S. R., Desai, J., Kumar, S. V., Eberhard, J. N., Thomasova, D., Romoli, S., Anders, H.-J. (2016): Caspases: the executioners of apoptosis. *Nat. Commun.* 7(Pt 1), 10274.
65. Murry, C. E., Jennings, R. B., & Reimer, K. A. (1986): Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74(5), 1124–36.
66. Neary, M. T., Ng, K. E., Ludtmann, M. H., Hall, A. R., Piotrowska, I., Ong, S. B., Hausenloy, D. J., Mohun, T. J., Abramov, A. Y., & Breckenridge, R. A. (2014): Hypoxia signaling controls postnatal changes in cardiac mitochondrial morphology and function. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 74(100), 340–352.
67. Particle Metrix (2017): ZetaView® Nanopartikel Tracking Analysator [Broschüre]. Abgerufen von: [https://www.particle-metrix.de/fileadmin/pdf/PMX\\_ZetaView\\_0714\\_DE.pdf](https://www.particle-metrix.de/fileadmin/pdf/PMX_ZetaView_0714_DE.pdf)
68. Place, T. L., Domann, F. E., & Case, A. J. (2017): Limitations of oxygen delivery to cells in culture: An underappreciated problem in basic and translational research. *Free Radic. Biol.* 113, 311–322.
69. Promega (2015): Caspase-Glo® 3/7 Assay®: Instructions for Use of Products G8090, G8091, G8092 and G8093 [Benutzerhandbuch]. Abgerufen von: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/caspase-glo-3-7-assay-protocol.pdf>
70. Przyklenk, K., Bauer, B., Ovize, M., Kloner, R. A., & Whittaker, P. (1993): Regional ischemic “preconditioning” protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* 87(3), 893–899.
71. Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013): Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200(4), 373–83.
72. Rassaf, T., Totzeck, M., Hendgen-cotta, U. B., Shiva, S., Heusch, G., & Kelm, M. (2014): Circulating Nitrite Contributes to Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning. *Circ. Res.* 114, 1601–1610.
73. Robbins, P. D., Dorronsoro, A., & Booker, C. N. (2016): Regulation of chronic inflammatory and immune processes by extracellular vesicles. *J. Clin. Invest. American Society for Clinical Investigation.* 126(4), 1173–1180.
74. Roy, K., Hamilton, D. J., Munson, G. P., & Fleckenstein, J. M. (2011): Outer membrane vesicles induce immune responses to virulence proteins and protect against colonization by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin. Vaccine Immunol.* 18(11), 1803–8.
75. Shah, R., Patel, T., & Freedman, J. E. (2018): Circulating extracellular vesicles in human disease. *N. Engl. J. Med.* 379(10), 958–966.
76. Sluijter, J., Davidson, S. M., Boulanger, C. M., Buzás, E. I., de Kleijn, D., Engel, F. B., Giricz, Z., Hausenloy, D. J., Kishore, R., Lecour, S., Leor, J., Madonna, R., Perrino, C., Prunier, F., Sahoo, S., Schiffelers, R. M., Schulz, R., Van Laake, L. W., Ytrehus, K., & Ferdinandy, P. (2018): Extracellular vesicles in diagnostics and therapy of the ischaemic heart: Position Paper from the Working Group on Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc. Res.* 114(1), 19–34.
77. Verma, S., Fedak, P. W., Weisel, R. D., Butany, J., Rao, V., Maitland, A., Li, R. K., Dhillon, B., & Yau, T. M. (2002): Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation* 105(20), 2332–2336.

78. System Biosciences (2006): ExoQuick™ Exosome Precipitation Solution [Benutzerhandbuch]. Abgerufen von: [https://www.systembio.com/downloads/MANUAL\\_EXOQXXA-1.pdf](https://www.systembio.com/downloads/MANUAL_EXOQXXA-1.pdf)
79. Thermo Fisher Scientific (2013): Pierce® LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation [Benutzerhandbuch]. Abgerufen von: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0016039\\_2162445\\_Pierce\\_LAL\\_Chromo\\_Endotox\\_Quant\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0016039_2162445_Pierce_LAL_Chromo_Endotox_Quant_UG.pdf)
80. Thielmann, M., Kottenberg, E., Boengler, K., Raffelsieper, C., & Neuhaeuser, M. (2010): Remote ischemic preconditioning reduces myocardial injury after coronary artery bypass surgery with crystalloid cardioplegic arrest. *Basic Res Cardiol.* 105, 657–664.
81. Thielmann, M., Kottenberg, E., Kleinbongard, P., Wendt, D., Gedik, N., Pasa, S., Price, V., Tsagakis, K., Neuhäuser, M., Peters, J., Jakob, H., & Heusch, G. (2013): Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: A single-centre randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet* 382(9892), 597–604.
82. Thielmann, M., Massoudy, P., Schmermund, A., Neuhäuser, M., Marggraf, G., Kamler, M., Herold, U., Aleksic, I., Mann, K., Haude, M., Heusch, G., Erbel, R., & Jakob, H. (2005): Diagnostic discrimination between graft-related and non-graft-related perioperative myocardial infarction with cardiac troponin I after coronary artery bypass surgery. *Eur. Heart J.*, 26(22), 2440–2447.
83. Thornberry, N. A., Rano, T. A., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V. M., Nordstrom, P. A., Roy, S., Vaillancourt, J. P., Chapman, K. T., & Nicholson, D. W. (1997): A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272(29), 17907–17911.
84. Tian, T., Zhu, Y. L., Zhou, Y. Y., Liang, G. F., Wang, Y. Y., Hu, F. H., & Xiao, Z. D. (2014): Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *J. Biol. Chem.* 289(32), 22258–22267.
85. Timmers, L., Lim, S. K., Hoefler, I. E., Arslan, F., Lai, R. C., van Oorschot, A. A., Goumans, M. J., Strijder, C., Sze, S. K., Choo, A., Piek, J. J., Doevendans, P. A., Pasterkamp, G., & de Kleijn, D. P. (2011): Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Res.*, 6(3), 206–214.
86. Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007): Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9(6), 654–659.
87. van der Pol, E., Böing, A. N., Gool, E. L., & Nieuwland, R. (2016): Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *J. Thromb. Haemost.* 14(1), 48–56.
88. Vicencio, J. M., Yellon, D. M., Sivaraman, V., Das, D., Boi-Doku, C., Arjun, S., Zheng, Y., Riquelme, J. A., Kearney, J., Sharma, V., Multhoff, G., Hall, A. R., & Davidson, S. M. (2015): Plasma exosomes protect the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *J. Am. Coll. Cardiol.* 65(15), 1525–1536.
89. Walker, I. F., Garbe, F., Wright, J., Newell, I., Athiraman, N., Khan, N., & Elsey, H. (2018): The Economic Costs of Cardiovascular Disease, Diabetes Mellitus, and Associated Complications in South Asia: A Systematic Review. *Value Heal. Reg. Issues* 15, 12–26.
90. Wang, Y. L., Liu, M., Shang, M., Wang, Y., Zhang, Q., Wang, S. X., Wei, S., Zhang, K. W., Liu, C., Wu, Y. N., Song, J. Q., & Liu, Y. X. (2016): Effects of circulating microvesicles derived from myocardial ischemic preconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi = Chinese journal of applied physiology*, 32(2), 97–101.

91. Wang, Y., Zhang, L., Li, Y., Chen, L., Wang, X., Guo, W., Zhang, X., Qin, G., He, S. H., Zimmerman, A., Liu, Y., Kim, I. M., Weintraub, N. L., & Tang, Y. (2015): Exosomes/microvesicles from induced pluripotent stem cells deliver cardioprotective miRNAs and prevent cardiomyocyte apoptosis in the ischemic myocardium. *Int. J. Cardiol.* 192, 61–69.
92. WHO (2014). Global status report on noncommunicable diseases 2014. [Online-Publikation] Abgerufen von: <https://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014/en/>
93. Xu, J. Y., Chen, G. H., & Yang, Y. J. (2017): Exosomes: A rising star in falling hearts. *Front. Physiol.* 8, 494.
94. Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., Gursel, M., ... De Wever, O. (2015): Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles* 4(1), 27066.
95. Yellon, D. M., & Davidson, S. M. (2014): Exosomes nanoparticles involved in cardioprotection? *Circ. Res.* 114(2), 325–332.
96. Zangrillo, A., Musu, M., Greco, T., Di Prima, A. L., Matteazzi, A., Testa, V., Nardelli, P., Febres, D., Monaco, F., Calabrò, M. G., Ma, J., Finco, G., & Landoni, G. (2015): Additive Effect on Survival of Anaesthetic Cardiac Protection and Remote Ischemic Preconditioning in Cardiac Surgery: A Bayesian Network Meta-Analysis of Randomized Trials. *PLoS One* 10(7), e0134264.
97. Zaugg, M., Lucchinetti, E., Behmanesh, S., & Clanachan, A. (2014): Anesthetic cardioprotection in clinical practice from proof-of-concept to clinical applications. *Curr. Pharm. Des.* 20(36), 5706–5726.
98. Zhao, Z. Q., Corvera, J. S., Halkos, M. E., Kerendi, F., Wang, N. P., Guyton, R. A., & Vinten-Johansen, J. (2003): Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: Comparison with ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285(2 54-2), 579–588.
99. Zhou, C., Liu, Y., Yao, Y., Zhou, S., Fang, N., Wang, W., & Li, L. (2013):  $\beta$ -blockers and volatile anesthetics may attenuate cardioprotection by remote preconditioning in adult cardiac surgery: A meta-analysis of 15 randomized trials. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 27(2), 305–311.

## **7. Anhang**

### **7.1. Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Versuchsaufbau im Labor .....	15
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Probengewinnung .....	17
Abbildung 3: ZetaView Partikelmessung.....	22
Abbildung 4: Reaktionsprinzip des Pierce™ LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kits.....	24
Abbildung 5: Prinzip des EV-Aufnahmeexperiments .....	28
Abbildung 6: Caspase-Glo Reaktionsprinzip.....	30
Abbildung 7: Caspase-Aktivität (Lumineszenz-Signal, RLU) über einen Zeitraum von 165 Minuten.....	32
Abbildung 8: Versuchsablauf: H9c2-Zellen wurden für 4, 8 und 12 Stunden mit DMEM(+FCS) bzw. DMEM(-FCS) und normoxischem- bzw. hypoxischem Gas behandelt .....	33
Abbildung 9: Versuchsablauf der EV-Behandlung unter Serumentzug.....	34
Abbildung 10: Versuchsablauf der EV-Behandlung unter Ischämie mit Isofluran-Präkonditionierung. ....	35
Abbildung 11: Konzentrationen Extrazellulärer Vesikel arterieller Proben von Patienten vor und nach RIPC Manöver bzw. nach Sham.....	36
Abbildung 12: Fold Change der EV-Konzentration vor und 60 Minuten nach RIPC- bzw. Sham.....	37
Abbildung 13: Zusammenhang zwischen EV-Konzentration und -Inkubationsdauer in H9c2-Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie.....	39
Abbildung 14: Etablierungsschritte für eine Ischämie Simulation. ....	40
Abbildung 15: Caspase 3/7-Aktivität (RLU) in H9c2-Zellen nach 4, 8 und 12 Stunden Hypoxie bzw. Normoxie .....	41

Abbildung 16: Caspase 3/7-Aktivität (RLU) in H9c2-Zellen nach 4, 8 und 12 stündiger Kultivierung in DMEM ohne FCS (Serumentzug) und unter normoxischen Bedingungen. ....	42
Abbildung 17: Caspase 3/7-Aktivität (RLU) in H9c2-Zellen nach 4, 8 und 12 stündiger Kultivierung in DMEM ohne FCS (Serumentzug) und hypoxischer Begasung .....	43
Abbildung 18: Caspase 3/7-Aktivität (RLU) in H9c2-Zellen nach 4, 8 und 12 stündiger Kultivierung in DMEM ohne FCS (Serumentzug) unter hypoxischer bzw. normoxischer Begasung .....	44
Abbildung 19: Caspase 3/7-Aktivität (RLU) in H9c2 Zellen nach einer Behandlung durch post RPC- bzw. post Sham-EVs .....	45
Abbildung 20: Caspase 3/7-Aktivität (RLU) in H9c2 Zellen nach Inkubation mit pre und post RPC- EVs. ....	46
Abbildung 21: A.&B.: Caspase 3/7-Aktivität (RLU) in H9c2 Zellen nach Isofluran-Konditionierung unter Ischämiebedingungen (Hypoxie und DMEM(-)FCS). B: Zusätzliche Behandlung mit EV (post RPC bzw. Sham) .....	47

## 7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte .....	13
Tabelle 2: Liste der Reagenzien, Kits und Chemikalien .....	16
Tabelle 3: Liste der Verbrauchsmaterialien.....	19
Tabelle 4: Verwendete Software.....	19
Tabelle 5: Zusammensetzung der Probenarten des Caspase Glo 3/7-Assays .....	31

### 7.3. Abkürzungsverzeichnis

AT (Basenpaar)	A-T (Adenin und Thymin)
CABG	Koronararteriellen-bypass Operation
CD	Cluster of differentiation / Oberflächenproteine
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
E. Coli	Escherichia coli
EU/ml	Endotoxin Units/Milliliter
EV	Extracellular vesicles (Extrazelluläre Vesikel)
HSP	Heat shock proteins (Hitzeschockproteine)
IPC	Ischämische Präkonditionierung
L/min	Liter pro Minute
LAL	Limulus-Amöbozyten-Lysat
LED	Light-Emitting Diode (Lichtemittierende Diode)
M	Mittelwert
MI	Myokardinfarkt
n.s.	Nicht signifikant
part/ml	Nanopartikel pro Milliliter
PCI	Perkutane koronare Intervention
pNA	p- Nitroaniline
RIPC	Remote Ischemic Preconditioning = Ischämische Fern-Präkonditionierung
RLU	Relative Light Units
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
Vol.%	Volumenprozent
I/R	Ischämie/Reperfusion
CK-MB	Creatin-Kinase Myokardtyp
TIVA	Totale intravenöse Anästhesie
MVC	Multivesicular bodies = Multivesikuläre Körper
RPM	Revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute

## **8. Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.