

Lena Bauer
Dr. med.

**Extracellular vesicles from sulforaphane-treated cells in a pancreatic cancer model:
Establishment of an isolation method and investigation of the effect on target cells**

Fach: Chirurgie

Doktormutter: Prof. Dr.rer.nat Svetlana Karakhanova

Zusammenfassung

Trotz intensiver Forschung ist das duktales Adenokarzinom des Pankreas weiterhin mit einer schlechten Prognose assoziiert. Deshalb ist die Entwicklung neuer Therapieoptionen dringend notwendig. In den letzten Jahren haben extrazelluläre Vesikel, welche in Körperflüssigkeiten und Zellkulturüberständen vorkommen, das Interesse der Forscher als diagnostisches und therapeutisches Werkzeug geweckt. Sie werden von Zellen produziert und transportieren genetische Informationen, Proteine, Lipide und sind Vermittler der zellulären Kommunikation. Daher beeinflussen extrazelluläre Vesikel zahlreiche Aspekte der Krebsbiologie, unter anderem Apoptose, Chemoresistenz und Krebsstammzeleigenschaften. Ihre Fähigkeit, Stoffe zu transportieren, kann als Shuttle für therapeutische Zwecke eingesetzt werden. Das Isothiozyanat Sulforaphan ist ein vielversprechender Naturstoff mit multiplen antikanzerogenen Eigenschaften. Es kann in großen Mengen in Kreuzblütler-Gemüse vorgefunden und einfach konsumiert werden. Erste Ergebnisse klinischer Studien weisen auf günstige Effekte von Sulforaphan in antineoplastischen Kombinationstherapien hin. Jedoch stellt der zielgerichtete Transport von Sulforaphan zu Zielzellen weiterhin ein Hindernis dar. Zukünftig könnte dieses Problem durch den Einsatz extrazellulärer Vesikel als Transporter gelöst werden. Die Entwicklung einer Methode zur Isolation extrazellulärer Vesikel eröffnet neue Perspektiven in der Diagnostik und Behandlung des Pankreaskarzinoms. Jedoch sind diese Methoden aktuell noch kostenintensiv, nicht in jedem Labor einsetzbar und nicht standardisiert.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer Methode zur Isolierung extrazellulärer Vesikel aus Pankreaskarzinomzellen im Labor sowie die Untersuchung des Effektes von aus Sulforaphan behandelten Zellen isolierter extrazellulärer Vesikel auf Pankreaskarzinomzielzellen.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnte ich erfolgreich eine polyethylenglykolbasierte Isolationsmethode basierend auf einem Protokoll von Rider et al auf die technischen Gegebenheiten des Labors anpassen. Außerdem modifizierte ich die Methode zur Anwendung in der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC3.

Anschließende Experimente bestätigten das Vorhandensein von für extrazelluläre Vesikel typischen Proteinen in Isolaten. Zudem zeigten elektronenmikroskopische Bilder und eine Nanopartikeltrackinganalyse eine für extrazelluläre Vesikel typische Morphologie und Größenverteilung. Außerdem konnte ich die Messung von farbstoffmarkierten extrazellulären Vesikeln auf einem konventionellen Durchflusszytometer etablieren. Die Aufnahme von extrazellulären Vesikeln in Zielzellen konnte durch den Nachweis von farbstoffpositiven Zielzellen nach Behandlung mit farbstoffmarkierten extrazellulären Vesikeln bestätigt werden.

Die Behandlung von Pankreaskarzinomzellen mit extrazellulären Vesikeln aus sulforaphanbehandelten Zellen veränderte weder die Zellviabilität und die Apoptose- und Nekroserate noch die Expression von Krebsstammzellmarkern auf Zielzellen. Zudem wurde die Tumorgroße in einem *in ovo* Xenograftmodell nicht beeinflusst.

Die intravenöse Injektion von extrazellulären Vesikeln in ein Hühnereixenograftmodell hatte keinen toxischen Effekt auf den Hühnerembryo. Außerdem kam es durch die Behandlung der Eier mit extrazellulären Vesikeln aus BxPC3 Pankreaskarzinomzellen weder zu einer Tumorvergrößerung noch zu einer verstärkten hepatischen Metastasierung.

Zusammenfassend war es mir nicht möglich, einen Effekt von extrazellulären Vesikeln aus sulforaphanbehandelten Zellen *in vitro* oder *in ovo* nachzuweisen. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnte ich jedoch erfolgreich eine Methode für die Isolation von extrazellulären Vesikeln aus Pankreaskarzinomzellen etablieren. Bei einer möglichen Reevaluation der Versuche könnte man extrazelluläre Vesikel gezielt mit Sulforaphan beladen und die oben genannten Aspekte erneut untersuchen. Die gezielte Beladung der extrazellulären Vesikel könnte mittels Transfektion, Elektroporation oder mittels Ultraschallbehandlung erfolgen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die intravenöse Applikation von extrazellulären Vesikeln keinen toxischen Effekt auf Hühnerembryos in einem *in ovo*-Modell hat. Dies könnte auf die Möglichkeit hinweisen, extrazelluläre Vesikel zukünftig *in vivo* einzusetzen.