

**Analyse Großer Extrazellulärer Vesikel
in humanem Blutplasma aus drei verschiedenen
Herzhöhlen mittels Durchflusszytometrie**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Paul Jamme

aus Berlin-Kreuzberg

2022

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter*in: Priv.-Doz. Dr. Felix Jansen
2. Gutachter*in: Prof. Dr. Gunther Hartmann

Tag der Mündlichen Prüfung: 26.09.2022

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
für Kardiologie, Angiologie, Pneumologie und Internistische Intensivmedizin
Direktor*in: Prof. Dr. Georg Nickenig

Meinen Eltern und Geschwistern

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis.....	5
1.	Einleitung.....	9
1.1	Extrazelluläre Vesikel	9
1.1.1	Exosomen.....	16
1.1.2	Große Extrazelluläre Vesikel.....	17
1.1.3	Apoptosekörper	18
1.2	EV und kardiovaskuläre Erkrankungen	18
1.3	Zielsetzung der Studie.....	22
2.	Material und Methoden.....	23
2.1	Material.....	23
2.2	Methoden.....	25
2.2.1	Studiendesign.....	25
2.2.2	Probensammlung	26
2.2.2.1	Rekrutierung der Patienten.....	26
2.2.2.2	MitraClip®-Verfahren.....	26
2.2.2.3	Gewinnung der Blutproben.....	28
2.2.2.4	Herstellen von thrombozytenfreiem Plasma.....	29
2.2.2.5	Patientendaten	30
2.2.3	Experimente	30
2.2.3.1	Auftauen der Proben im Wasserbad	30
2.2.3.2	Differentielle Zentrifugation.....	30
2.2.3.3	Färbung der Vesikel	31
2.2.3.4	Durchflusszytometer.....	33
2.2.3.5	Gating-Strategie	34
2.2.4	Statistik.....	37
3.	Ergebnisse.....	38
3.1	Validierung des Protokolls.....	38
3.1.1	Kontrolle des Zentrifugationsschemas	38
3.1.2	Die Kontrolle der Vesikelfärbung	40
3.1.2.1	Kontrolle der Färbung durch das Calcein AM	41

3.1.2.2	Vergleich von Annexin V und Calcein AM	42
3.1.2.3	Kontrolle der Färbung durch die Antikörper	43
3.1.3	Kontrolle des Gatings	46
3.1.4	Größenbestimmung der Vesikel	48
3.1.5	Ausschluss eines Swarming	50
3.1.6	Weitere Versuchsangaben	52
3.2	Analyse der Patientenproben	55
3.2.1	Baselinecharakteristika.....	56
3.2.2	Behandlung im Herzkatheterlabor	60
3.2.3	Große EV und die drei Herzhöhlen	61
3.2.3.1	Gesamtzahl der Großen EV in den Herzhöhlen	61
3.2.3.2	Einzelne Vesikelpopulationen in den Herzhöhlen	61
3.2.3.3	Subgruppenanalyse der thrombozytären EV in den Herzhöhlen	62
3.2.4	Große EV und die verschiedenen Arten des Vorhofflimmerns.....	63
3.2.4.1	Gesamtzahl der Großen EV nach der Art des Vorhofflimmerns.....	63
3.2.4.2	Einzelne Vesikelpopulationen nach der Art des Vorhofflimmerns	64
3.2.4.3	Subgruppenanalyse der thrombozytären EV nach der Art des VHF	66
3.2.5	Große EV und der aktuelle Herzrhythmus.....	67
3.2.5.1	Gesamtzahl der Vesikel nach dem aktuellen Herzrhythmus	67
3.2.5.2	Einzelne Vesikelpopulationen nach dem aktuellen Herzrhythmus	68
3.2.5.3	Subgruppenanalyse der thrombozytären EV nach dem aktuellen HR	70
4.	Diskussion	71
4.1	Bedeutung der Studienergebnisse	71
4.2	Limitationen	75
4.3	Ausblick	79
5.	Zusammenfassung.....	82
6.	Abbildungsverzeichnis.....	83
7.	Tabellenverzeichnis.....	84
8.	Literaturverzeichnis	85
9.	Danksagung	113

Abkürzungsverzeichnis

ACS	akutes Koronarsyndrom (Acute Coronary Syndrome)
ANOVA	Varianzanalyse (Analysis Of Variance)
APC	Allophycocyanin
aPTT	aktivierte Partielle Thromboplastinzeit (activated Partial Thromboplastin Time)
Calcein AM	Acetoxymethyl-Calcein
cAVK	cerebrale Arterielle Verschlusskrankheit
CSE-Hemmer	Cholesterin-Synthese-Enzym-Hemmer
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOAK	Direktes Orales Antikoagulans
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
EV	Extrazelluläre Vesikel
evRNA	in Extrazellulären Vesikeln enthaltene RNA
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence-Activated Cell Scanning)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMO	Fluorescence Minus One
FSC	Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter)
HCAEC	humane koronararterielle Endothelzellen (Human Coronary Artery Endothelial Cells)
HUVEC	humane umbilikalvenöse Endothelzellen (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)
ICD	Implantierbarer Cardioverter Defibrillator
ILV	Intraluminale Vesikel
INR	International Normalized Ratio
ISEV	International Society for Extracellular Vesicles
KHK	Koronare Herzkrankheit
LA	linkes Atrium
LAA	linkes Vorhofohr (Left Atrial Appendage)

MACCE	schwere kardiovaskuläre Komplikation (Major Adverse Cardiac and Cerebrovascular Event)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)
MI	Mitralklappeninsuffizienz
miRNA	micro-Ribonukleinsäure
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MVB	multivesikulärer Körper (Multivesicular Body)
NTA	Nanoparticle Tracking Analysis
NYHA	New York Heart Association
pAVK	periphere Arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PCI	perkutane koronare Intervention (Percutaneous Coronary Intervention)
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PE	Phycoerythrin
PFP	thrombozytenfreies Plasma (Platelet-Free Plasma)
PMT	Photomultiplier
PS	Phosphatidylserin
RA	rechtes Atrium
RPS	Resistive Pulse Sensing
siRNA	small interfering RNA
SSC	Seitwärtsstreulicht (Sideward Scatter)
TAVI	kathetergesteuerte Aortenklappenimplantation (Transcatheter Aortic Valve Implantation)
TF	Gewebefaktor (Tissue Factor)
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TSG	Tumor Susceptibility Gene
VHF	Vorhofflimmern
VPS	Vacuolar Protein Sorting

1. Einleitung

1.1 Extrazelluläre Vesikel

Mitte der 1960er Jahre wurde in Untersuchungen von Blutplasma eine unbekannte Art kleinster Partikel nachgewiesen. Diese Partikel ließen sich durch eine Zentrifugation isolieren und besaßen eine prokoagulatorische Wirkung. Sie wurden initial rein deskriptiv als „Platelet-Dust“ bezeichnet (Wolf, 1967). Nach der Entschlüsselung des Stoffwechsels des Transferrinrezeptors durch die Arbeitsgruppen um P. Stahl und der Entdeckung des Transferrinrezeptors auf der Oberfläche von Zellfragmenten führten Harding et al. (1984) den Begriff der Extrazellulären Vesikel ein.

Extrazelluläre Vesikel (EV) stellen Abschnürungen von Zellen dar. Inzwischen konnten EV nahezu aller Zelltypen nachgewiesen werden. Beispielfähig seien die Vesikel von Thrombozyten, Erythrozyten, Endothelzellen, Makrophagen, Dendritischen Zellen, B- bzw. T-Lymphozyten, Granulozyten, Epithelzellen, Neuronen und Tumorzellen genannt (Bhatnagar et al., 2007; Blanchard et al., 2002; Combes et al., 1999; Eken et al., 2008; Fauré et al., 2006; Heijnen et al., 1999; Raposo et al., 1996; van Niel et al., 2001; Willekens et al., 2005; Wolfers et al., 2001; Zitvogel et al., 1998). Nach ihrer Trennung von der Mutterzelle werden die EV in den Extrazellulärraum freigesetzt. Folglich sind sie zum Beispiel in Plasma, Urin, Bronchialsekret, Pleuraflüssigkeit, Galleflüssigkeit, Aszites, Liquor, Fruchtwasser, Muttermilch und Synovialflüssigkeit enthalten (Admyre et al., 2003; Admyre et al., 2007; Arraud et al., 2014; Bard et al., 2004; Dai et al., 2008; Keller et al., 2011; Masyuk et al., 2010; Pisitkun et al., 2004; Skriner et al., 2006; Street et al., 2012).

Extrazelluläre Vesikel sind im Rahmen physiologischer wie auch pathologischer Stoffwechselforgänge nachweisbar (Hugel et al., 2005). Sie werden kontinuierlich oder als Antwort auf zellulären Stress sezerniert (Théry et al., 2009). Häufige Auslöser der Vesikelbildung sind die Zellaktivierung und die Apoptose (Jimenez et al., 2003). Der Mechanismus, der zur Sekretion der EV führt, ist nicht abschließend verstanden. Er scheint jedoch wesentlich von einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration abhängig zu sein (Raposo et al., 1997; Valadi et al., 2007).

Extrazelluläre Vesikel bestehen aus einer Lipiddoppelschicht und einem intravesikulären Raum. Je nach Mutterzelle enthalten sie zusätzliche Bestandteile. Diese sind charakteristisch für den jeweiligen Zelltyp und variieren mit dem Aktivierungsstatus der Mutterzelle (Diehl et al., 2012; Haraszti et al., 2016; Jansen et al., 2013). In der Membran der EV befinden sich unter anderem Lipide, Proteine und Rezeptoren (Abrams et al., 1990; Fourcade et al., 1995; Stuart et al., 1995). Das Innere der EV enthält Stoffwechselprodukte, Proteine, Nukleinsäuren, Zytokine und weitere Bestandteile (Bianco et al., 2009; Nolte-'t Hoen et al., 2012; Théry et al., 2001). Konzentrationsunterschiede einzelner Proteine und RNA-Moleküle zwischen den Mutterzellen und ihren Vesikeln deuten auf einen zielgerichteten Einschluss der Biomoleküle in die Vesikel hin (Kowal et al., 2016; Ratajczak et al., 2006).

Zunächst erfolgte eine Einteilung der Vesikel nach ihrer Größe in Exosomen (exosomes), Große Extrazelluläre Vesikel (large extracellular vesicles) und Apoptosekörper (apoptotic bodies). Exosomen stellen mit einer Größe von ungefähr 30 - 100 nm die kleinste Gruppe der EV dar. Darauf folgen mit einer Größe von etwa 100 - 1000 nm die Großen Extrazellulären Vesikel. Apoptosekörper besitzen eine Größe von ca. 1000 nm bis hin zu einigen Mikrometern. Somit sind Exosomen und Große EV ähnlich groß wie Very Low Density Lipoproteine (VLDL) und Chylomikronen. Ihre Dichte liegt jedoch mit 1,06 - 1,20 g/mL bzw. 1,03 - 1,18 g/mL über der Dichte der VLDL und Chylomikronen (Sluijter et al., 2018). Apoptosekörper besitzen mit 1,24 - 1,28 g/ml die höchste Dichte der EV.

Neuere Studien zeigen, dass eine strikte Unterscheidung der Vesikel allein anhand ihrer Größe nicht möglich ist. van der Pol et al. (2014) analysierten Exosomen und Große EV mithilfe verschiedener Verfahren und registrierten sich überlagernde Größenverteilungen. Inzwischen ist die Einteilung der EV auf der Grundlage ihres Entstehungsmechanismus allgemein anerkannt (Witwer et al., 2013).

Die Isolation der Extrazellulären Vesikel ist durch mehrere Methoden möglich. Als Standardverfahren ist die Differentielle (Ultra-)Zentrifugation weiterhin das am häufigsten angewandte Verfahren. Daneben stehen die Präzipitation, Dichtegradientenzentrifugation, Filtration, Größenausschluss-Chromatographie und Immunaффinität zur Auswahl.

Die ersten Hypothesen zur Funktion der Extrazellulären Vesikel beschrieben einen Mechanismus, der es den Zellen erlaubt, überflüssige Stoffwechselprodukte abzustößen. Pan und Johnstone (1983) zeigten, dass die Reifung der Retikulozyten mit der Sekretion von EV einhergeht. Heute ist erwiesen, dass EV eine wichtige Rolle in der interzellulären Kommunikation spielen. Sie können von einer Mutterzelle abgegeben und von einer Zielzelle aufgenommen werden (Al-Nedawi et al., 2008). Der Austausch der EV erfolgt dabei entweder über den Extrazellulärraum zwischen Nachbarzellen oder über den Blutstrom zwischen entfernt voneinander gelegenen Geweben. Die Interaktion der EV mit der Zielzelle verläuft wiederum auf verschiedenen Wegen. Ein Teil der EV bindet über Liganden an Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzelle (Hanayama et al., 2002; Miyanishi et al., 2007; Segura et al., 2007). Andere EV fusionieren mit der Zellmembran der Zielzelle (Montecalvo et al., 2012). Wieder andere EV werden durch Endozytose in die Zielzelle aufgenommen (Morelli et al., 2004). Ob und auf welche Art und Weise ein Vesikel und eine Zielzelle miteinander interagieren, ist von dem Zelltyp, dem Reifegrad und dem Aktivierungsstatus der Zielzelle abhängig (Morelli et al., 2004; Nolte-t Hoen et al., 2009; Valadi et al., 2007).

Die besondere Bedeutung der Extrazellulären Vesikel für den Stoffwechsel liegt darin, dass mit den EV auch die enthaltenen Biomoleküle übertragen werden. Dabei handelt es sich beispielsweise um Phospholipide, Ceramide und Cholesterol (Haraszti et al., 2016; Stuart et al., 1995; Théry et al., 2009). EV transportieren Membranrezeptoren wie den Major Histocompatibility Complex (MHC), das Zelladhäsionsmolekül CD62P (P-Selektin) und den Gerinnungsfaktor III, auch Tissue Factor (TF) genannt (Abrams et al., 1990; Müller et al., 2003; Raposo et al., 1996). Daneben transportieren EV diverse Proteine des Zellinneren und der extrazellulären Matrix sowie Tumorantigene (Kowal et al., 2016; Wolfers et al., 2001). Sie enthalten mRNA und miRNA, die nach dem Einschluss in die Zielzelle biologisch aktiv sind (Montecalvo et al., 2012; Ratajczak et al., 2006; Skog et al., 2008; Valadi et al., 2007). Ferner übertragen EV Signaltransduktionsmoleküle, Wachstumsfaktoren, Stoffwechsellzyme und Teile des Zytoskeletts, (Lötvall et al., 2014).

Der Abbau der Extrazellulären Vesikel wird durch die Zielzellen vermittelt. Im Blutstrom zirkulierende EV werden vorwiegend durch die Zellen des Retikuloendothelialen Systems

in Milz und Leber sowie durch Endothelzellen eliminiert (Al Faraj et al., 2012; Dasgupta et al., 2012; Willekens et al., 2005). So zeigten splenektomierte Mäuse höhere Vesikelspiegel als nicht-operierte Mäuse (Dasgupta et al., 2009). Tierversuche deuten darauf hin, dass EV eine Halbwertszeit von wenigen Minuten besitzen (Smyth et al., 2015).

Die Wirkungen der Extrazellulären Vesikel sind so vielfältig wie ihre Zusammensetzung. EV steuern Signalkaskaden, indem sie an Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzelle binden. Zum Beispiel tragen endotheliale Exosomen den Liganden Delta-like 4, dessen Bindung an den Notch-Rezeptor 1 auf der Oberfläche von Endothelzellen zu einer Internalisierung und Degradation des Rezeptors führt (Sheldon et al., 2010). Die Folge dieser Hemmung ist eine Steigerung der Angiogenese.

Zudem nehmen EV Einfluss auf die Funktion des Endothels. Große EV von Thrombozyten steigern die Expression des Adhäsionsmoleküls CD54 (ICAM-1) auf der Oberfläche von Endothelzellen und fördern die Anhaftung von Monozyten an die Gefäßwand (Barry et al., 1998). Andere Große EV senken die Expression der Stickstoffmonoxid-Synthase in Endothelzellen (Martin et al., 2004). Jansen et al. (2012) wiesen durch Messen der Caspase-3-Aktivität nach, dass endotheliale Große EV zu einer dosisabhängigen Reduktion der Camptothecin-induzierten Apoptoserate von humanen koronararteriellen Endothelzellen (HCAEC) führen.

Darüber hinaus beeinflussen EV die Blutgerinnung. Das Phosphatidylserin auf der Oberfläche der Vesikel bildet eine große Anlagerungsfläche für Gerinnungsfaktoren und wirkt stark thrombogen (Morel et al., 2011). In den EV enthaltene Arachidonsäure kann von Thrombozyten und Endothelzellen aufgenommen werden (Barry et al., 1997). Durch die Prostacyclinsynthase entsteht Prostacyclin, ein starker Inhibitor der Blutgerinnung. Durch Cyclooxygenasen entsteht dagegen Thromboxan A₂, ein sehr potenter Vasokonstriktor. Suades et al. (2012) erkannten in vitro, dass Blut mit einer erhöhten Konzentration der thrombozytären Großer EV ein verstärktes Thrombuswachstum zeigt (Suades et al., 2012). Granulozytäre und monozytäre Vesikel transportieren den Tissue Factor in Thrombozyten und fördern auf diese Weise die Entstehung von Thromben in vivo (Biró et al.,

2003; Rauch et al., 2000). Auch TF+ EV sind eine mögliche Ursache des erhöhten Thromboserisikos von Tumorpatienten (Geddings et al., 2016). Demgegenüber existieren Große EV, die den Tissue Factor Pathway Inhibitor-I tragen (Steppich et al., 2005). Und Monozytäre Große EV hemmen die Blutgerinnung durch das enthaltene Thrombomodulin (Satta et al., 1997).

Manche EV wirken immunmodulatorisch. Karlsson et al. (2001) prägten den Begriff der Tolerosomen, um hervorzuheben, dass Exosomen von Zellen des Darmepithels Antigene aus der Nahrung präsentieren und so eine Immuntoleranz gegenüber diesen Antigenen vermitteln. Zudem spielen EV bei der Entstehung von Autoimmunkrankheiten eine Rolle, wie der Rheumatoiden Arthritis (Skriner et al., 2006). Théry et al. (2002) wiesen nach, dass Exosomen von Dendritischen Zellen MHC II-Rezeptoren und Antigene in andere Dendritische Zellen transportieren und dadurch die Aktivierung von CD4+ T-Lymphozyten hervorrufen. Zudem können Exosomen CD8+ T-Lymphozyten auch ohne die Hilfe von Dendritischen Zellen aktivieren (Admyre et al., 2006). Werden Große EV von Mäusen, die an einer Sepsis leiden, auf gesunde Mäuse übertragen, induzieren sie erneut Symptome einer Sepsis (Mortaza et al., 2009).

Die Theorie des Trojanischen Pferdes besagt, dass Retroviren den zellulären Bildungsapparat der Exosomen nutzen, um eigene Viruspartikel freizusetzen (Gould et al., 2003). Tatsächlich zeigen die Bildung der Exosomen und die Bildung der Viruspartikel Gemeinsamkeiten (Pornillos et al., 2002b). Die Ausbreitung des HI-Virus ist von der Funktion des TSG101 und des VPS4 abhängig (Garrus et al., 2001). Monozytäre Große EV enthalten den Rezeptor CCR5 und ermöglichen in Zellkulturen die Ausbreitung des HI-Virus auf Zellen, die andernfalls nicht für das Virus empfänglich wären (Mack et al., 2000). Zellen, die mit intrazellulär lebenden Mykobakterien, Salmonellen oder Toxoplasmen infiziert sind, sezernieren EV, in denen Pathogen-assoziierte molekulare Muster nachweisbar sind (Bhatnagar et al., 2007). Diese regen Makrophagen über Toll-like-Rezeptoren zur Bildung proinflammatorischer Zytokine an.

Nicht zuletzt sind EV an der Regulierung eines Tumorwachstums beteiligt. Die Förderung des Tumorwachstums beruht einerseits auf einer Hemmung des Immunsystems, anderer-

seits auf einer Verbreitung kanzerogener Signale. Andreola et al. (2002) demonstrierten, dass Exosomen von Tumorzellen mithilfe des Fas-Liganden die Apoptose von T-Lymphozyten einleiten und so dem Immunsystem entgegenwirken. Große EV von Zellen des Glioblastoms transportieren eine mutierte Form des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors in andere Tumorzellen (Al-Nedawi et al., 2008). Dieser EGFRvIII ist in den Zielzellen für die Aktivierung von Signalkaskaden und eine Steigerung der Zellproliferation verantwortlich. Zudem stimulieren EV von Tumorzellen die Gefäßneubildung, die eine Voraussetzung für das Tumorstadium ist (Kim et al., 2002). Untersuchungen an Mäusen ergaben, dass thrombozytäre Große EV die Metastasierung von Zellen des Bronchialkarzinoms begünstigen (Janowska-Wieczorek et al., 2005). Auch Exosomen von Zellen des malignen Melanoms wirken prometastatisch (Peinado et al., 2012).

Besonders interessant erscheint die Fähigkeit der EV, eine Immunantwort auszulösen, die das Tumorstadium hemmt. Zitvogel et al. (1998) züchteten Mäuse, die an einem Mastozytom oder Mammakarzinom litten. Gleichzeitig inkubierten sie Dendritische Zellen mit Antigenen dieser Tumore sowie IL-4 und GM-CSF. Die aus dem Zellüberstand isolierte Exosomen enthielten die MHC-Rezeptoren I und II. Nach intradermaler Injektion bewirkten diese Exosomen eine Aktivierung CD8⁺ zytotoxischer T-Lymphozyten und eine Abnahme der Tumormasse der Mäuse. Wolfers et al. (2001) konnten nachweisen, dass auch Exosomen der Tumorzellen selbst Tumorantigene präsentieren. Zusammen mit Dendritischen Zellen rufen sie die Aktivierung CD8⁺ zytotoxischer T-Lymphozyten hervor. Die Arbeitsgruppe von Clothilde Théry untersuchte die Effekte von in vivo gebildeten Exosomen (Zeelenberg et al., 2008). Die Wissenschaftler erstellten durch Transfektion neuartige Zelllinien des Fibrosarkoms, die ein spezifisches Tumorantigen entweder in freier Form oder in Form von Exosomen sezernierten. Nach Injektion der Tumorzellen in die Subkutis von Mäusen wurde die Tumormasse überwacht. Solche Tumorzellen, die das Antigen in freier Form sezernierten, zeigten ein schnelleres Wachstum als Tumorzellen, die das Antigen an Exosomen gebunden sezernierten.

Die antineoplastische Wirkung der EV kann auch durch die Übertragung einer miRNA vermittelt werden. Ohno et al. (2013) züchteten Mäuse, die EGFR⁺ Zellen eines humanen Mammakarzinoms trugen. Zudem entwickelten sie Exosomen, die einen Liganden des

EGF-Rezeptors auf ihrer Oberfläche trugen und mit der miRNA let-7a angereichert waren. Nach Injektion dieser Exosomen in die Blutbahn der Mäuse gelangte die miRNA let-7a in die Tumorzellen, wo sie die Translation der mRNA HMGA2 bremste. Die Folge war eine direkte Hemmung des Tumorwachstums.

Extrazelluläre Vesikel stellen einen neuen Ansatz für die Behandlung von Krankheiten dar. Zwei Eigenschaften der Vesikel erscheinen dabei besonders relevant. Sie zeigen eine selektive Anreicherung von Proteinen und Nukleinsäuren (Kowal et al., 2016; Nolte't Hoen et al., 2012). Außerdem vermitteln sie einen Schutz derselben vor Proteasen und RNAsen (Montecalvo et al., 2012). Auf diese Weise könnten EV die Diagnostik von Krankheiten erleichtern. Einer „Liquid Biopsy“ gleich bilden sie eine Quelle von Informationen, die andernfalls nur schwer zugänglich wären. So fanden Jansen et al. (2014) bei Patienten mit einer stabilen KHK einen Zusammenhang zwischen der Konzentration der miRNA-126 innerhalb der Großen EV und dem zukünftigen Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse, während die Konzentration der miRNA-126 im Plasma keine Voraussagen zuließ. Zudem könnten EV die Therapie von Krankheiten verbessern. Es ist denkbar, dass sich die Bildung der Vesikel medikamentös beeinflussen lässt, so dass günstige Signale überwiegen. Auch der Einsatz der Vesikel als neue Medikamentenklasse erscheint vielversprechend.

Im Jahr 2012 wurde die International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) gegründet. Kurze Zeit später erschien die erste Ausgabe des Journal of Extracellular Vesicles. Seitdem veröffentlicht die ISEV regelmäßig Empfehlungen zur Standardisierung der Vesikelforschung (Lötvall et al., 2014; Théry et al., 2018). Die Online-Datenbank EV-TRACK soll die Vergleichbarkeit von Studien erhöhen, indem sie Studienprotokolle in einheitlicher Form zur Verfügung stellt (Van Deun et al., 2017). Andere Register geben einen Überblick über den Protein- und Nukleinsäuregehalt der EV (ExoCarta, 2021).

Die folgenden Kapitel erläutern die drei Vesikelarten ausgehend von ihrem Entstehungsmechanismus und ihre Bedeutung für die Entwicklung von Herz-Kreislauf-erkrankungen.

1.1.1 Exosomen

Exosomen repräsentieren die am besten untersuchte Klasse der Extrazellulären Vesikel. Die Bezeichnung wurde erstmals 1981 verwendet, um Vesikel mit einer 5' Nucleotidase-Aktivität in Zellkulturüberständen zu beschreiben (Trams et al., 1981). Seit 1987 wird sie für EV genutzt, die aus dem Zellinneren hervorgehen (Johnstone et al., 1987; Raposo et al., 1996). In Abbildung 1 sind die Entstehungsmechanismen der Exosomen, Großen EV und Apoptosekörper einander gegenübergestellt.

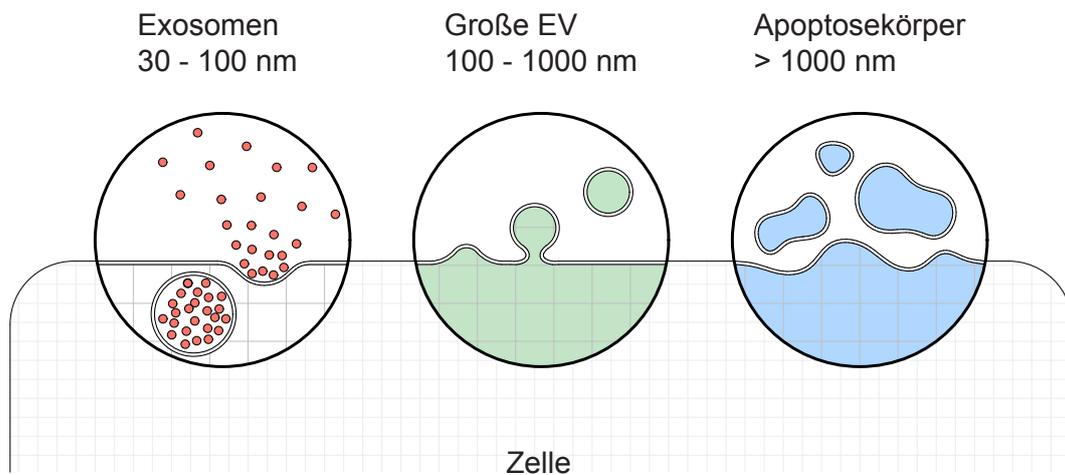


Abb. 1: Die Entstehungsmechanismen der Extrazellulären Vesikel

Schematische Darstellung einer Zelle. Die drei Lupen zeigen die Bildung der Exosomen ausgehend von den multivesikulären Körpern, die Bildung der Großen EV an der Zellmembran und die Bildung der Apoptosekörper im Rahmen des programmierten Zelltodes.

An der Zellmembran entstehen durch Endozytose die Endosomen. Anschließend führen Einstülpungen der Endosomenmembran zur Bildung kleiner Vesikel, den sogenannten Intraluminalen Vesikeln (ILV) (Pan et al., 1985). Ein Endosom und die darin enthaltenen ILV werden zusammen als Multivesikulärer Körper (MVB) bezeichnet (Johnstone et al., 1987). Das weitere Schicksal der MVB kann auf zwei Wegen verlaufen. Durch das Verschmelzen der MVB mit Lysosomen werden die enthaltenen ILV abgebaut (Luzio et al., 2000). Erfolgt dagegen die Fusion der MVB mit der Zellmembran, werden die ILV als Exosomen freigesetzt (Pan et al., 1985). Ihre Membran ist entgegengesetzt zu der Membran der Zellkompartimente ausgerichtet, so dass Transmembranproteine ihre ursprüngliche Orientierung beibehalten (Johnstone et al., 1984).

Die Bildung der Exosomen ist eng an den Transport von Proteinen gekoppelt. Der dahinterstehende Mechanismus beruht auf der Funktion der sogenannten „Endosomal Sorting Complexes Required for Transport“ (ESCRT) (Babst, 2005). Zunächst befinden sich die vier ESCRT auf der Außenseite der Endosomenmembran (Gillooly et al., 2000; Raiborg et al., 2001). Mithilfe eines „Ubiquitin-Interacting Motif“ binden sie die zu transportierenden Proteine (Pornillos et al., 2002a). Die anschließende Reaktionskaskade führt zu einer Krümmung der Endosomenmembran (Babst et al., 2002). Begünstigt wird die Krümmung zusätzlich durch die Gliederung der Endosomenmembran in Mikrodömänen (de Gassart et al., 2003). Nach Abschluss des Prozesses befinden sich die Proteine im Inneren der ILV. Diese können nun mit den Exosomen sezerniert werden.

1.1.2 Große Extrazelluläre Vesikel

Große Extrazelluläre Vesikel fanden lange Zeit weniger Beachtung als Exosomen. Die Namensgebung war uneinheitlich und die Begriffe Mikrovesikel, Mikropartikel, Exovesikel, und Ektosomen wurden synonym verwendet (Witwer und Théry, 2019).

Große EV entstehen unmittelbar an der Zellmembran in einem Prozess, der als Direct Budding bezeichnet wird. In Ruhe zeigt die Zellmembran einen asymmetrischen Aufbau (Bretscher, 1972). Durch die ATP-abhängige Aktivität der Enzyme Flippase und Floppase sowie die ATP-unabhängige Aktivität der Scramblase werden Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin auf die Innenseite der Lipiddoppelschicht transportiert, während Phosphatidylcholin und Sphingomyelin auf die Außenseite transportiert werden (Daleke, 2003). Die Bindung von Phosphatidylserin an Bestandteile des Zytoskeletts dient der Stabilisierung der Zellmembran (Manno et al., 2002). Durch den Einfluss physikalischer und chemischer Stimuli steigt der intrazelluläre Calciumspiegel. Das Calcium bewirkt eine Hemmung der Flippase, wodurch es zu einer Anreicherung von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche kommt (Daleke, 2003). Zudem löst das Enzym Calpain das Zytoskelett von der Zellmembran (Zwaal und Schroit, 1997). Sphingomyelinasen bilden Ceramide, welche die Krümmung der Zellmembran begünstigen (Bianco et al., 2009). Durch die Anlagerung weiterer Proteine entstehen sogenannte Lipid Rafts. Sie sind reich an Cholesterol und binden die zu transportierenden Proteine (Del Conde et al., 2005). Alle genannten Veränderungen führen schließlich zu einer Ausstülpung der Zellmembran und einer Freisetzung Großer EV (Hugel et al., 2005).

Das bekannteste Lipid der Großen Extrazellulären Vesikel ist das Phosphatidylserin (Théry et al., 2009). Es vermittelt den Vesikeln eine stark prokoagulatorische Eigenschaft. Bedeutende Proteine der Großen EV sind Integrine, Selektine, das PSGL-1 und der Tissue Factor (Del Conde et al., 2005; Falati et al., 2003).

1.1.3 Apoptosekörper

Apoptosekörper sind bis heute wenig untersucht. Sie entstehen wie die Großen EV an der Zellmembran, werden jedoch erst im Rahmen des programmierten Zelltodes sichtbar. Die Apoptose spielt eine wichtige Rolle in der Embryogenese und dient der Elimination alter Zellen. Sie verläuft ohne eine Entzündungsreaktion (Depraetere, 2000). Durch die Aktivierung der Caspasen 8 und 9 wird eine Kaskade in Gang gesetzt, an deren Ende der Abbau der Zellbestandteile steht (Battistelli und Falcieri, 2020). Kennzeichnend für die Apoptose sind die Verkleinerung der Zelle, die Fragmentierung des Zellkerns, die Kondensation des Chromatins, die Expression von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche sowie die Bildung von Membranbläschen. Die Apoptose endet mit dem Zerfall der Zelle in Apoptosekörper, welche Histone, DNA und fragmentierte Zellorganellen enthalten (Hauser et al., 2017; Hristov et al., 2004; Théry et al., 2009).

1.2 EV und kardiovaskuläre Erkrankungen

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen die häufigste Todesursache weltweit dar (World Health Organisation, 2021). Im Jahr 2019 waren 35,3 % der Todesfälle in Deutschland auf sie zurückzuführen (Statistisches Bundesamt, 2021d). Sie verursachen eine erhöhte Morbidität in der Gesellschaft und hohe Kosten im Gesundheitswesen (Statistisches Bundesamt, 2021b, c). Unter den kardiovaskulären Erkrankungen sind Thrombembolien von besonderer Relevanz. Es werden arterielle und venöse Embolien unterschieden. Zu den arteriellen Embolien zählen die arterio-arteriellen und kardiogenen Embolien. Während erstgenannte ihren Ursprung in atherosklerotischen Plaques eines großen Gefäßes haben, gehen kardiogene Embolien von Thromben innerhalb des Herzens aus. Als Risikofaktoren einer kardiogenen Embolie gelten das Vorhofflimmern, Ischämische und Dilatative Herzerkrankungen, Fehlbildungen der Herzklappen, Herzklappenprothesen, infektiöse und nicht-infektiöse Endokarditiden sowie Vorhofflimmern (Hart, 1992). Die bedeutendste Ursache kardiogener Schlaganfälle ist das Vorhofflimmern (Wolf et al., 1991).

Das Vorhofflimmern (VHF) stellt mit einer Prävalenz von 2 % die häufigste Herzrhythmusstörung in Deutschland dar (Deutsche Herzstiftung eV, 2021). Das Lebenszeitrisiko für das Auftreten eines VHF beträgt etwa 25 % (Lloyd-Jones et al., 2004). Das VHF steht zusammen mit dem Vorhofflattern an fünfter Stelle der häufigsten tödlich verlaufenden Herzkreislauferkrankungen (Statistisches Bundesamt, 2021a). Obwohl sich die Behandlungsmöglichkeiten mit der Einführung der Pulmonalvenenisolation und der direkten oralen Antikoagulantien (DOAK) verbessert haben, zeigen Patienten mit einem VHF nach wie vor eine höhere Morbidität und Mortalität als Patienten ohne ein VHF (Balla und Cappato, 2020; Saglietto et al., 2020). Unabhängige Risikofaktoren für ein VHF sind ein Diabetes mellitus, eine arterielle Hypertonie, eine Herzinsuffizienz und Erkrankungen der Herzklappen (Benjamin et al., 1994). Die Häufung der Risikofaktoren im Laufe des Lebens erklärt, weshalb die Inzidenz des VHF mit dem Alter zunimmt. Das pathophysiologische Korrelat des VHF ist eine Fibrosierung und Erweiterung des linken Vorhofes (Boldt et al., 2004; Delgado et al., 2017). Durch eine Steigerung der Umbauvorgänge in den Vorhöfen fördert das VHF seine eigene Entstehung (Wijffels et al., 1995). Die Behandlungsansätze der Rhythmuskontrolle und Frequenzkontrolle erschienen in den beiden Studien AFFIRM und RECORDAF zunächst ebenbürtig (Camm et al., 2011; Wyse et al., 2002). Neuere Studien deuten jedoch darauf hin, dass eine frühe Rhythmuskontrolle inklusive einer Pulmonalvenenisolation von Vorteil ist (Kirchhof et al., 2020).

Es werden mindestens drei Arten des Vorhofflimmerns unterschieden: das paroxysmale VHF, das persistierende VHF und das permanente VHF. Das Fortschreiten eines paroxysmalen VHF zu einem permanenten VHF ist häufig und mit einer Zunahme kardiovaskulärer Ereignisse verbunden (De Vos et al., 2012). Insbesondere Patienten mit einem persistierenden oder permanenten VHF sind durch häufige kardiale Embolien und schwerwiegende Schlaganfälle gefährdet (Al-Khatib et al., 2013; Ganesan et al., 2016; Inaba et al., 2018). Mehr als 90 % der intrakardialen Thromben von Patienten mit einem nicht-rheumatischen Vorhofflimmern entstehen dabei im linken Vorhofohr (Blackshear und Odell, 1996). Im Folgenden soll die Abkürzung LAA für den englischen Begriff Left Atrial Appendage verwendet werden. Der sonographische Nachweis einer erniedrigten Flussgeschwindigkeit oder einer erhöhten Echogenität im LAA ist hinweisend auf ein besonders hohes Infarktisiko (Goldman et al., 1999).

Die ersten Erkenntnisse zur Bedeutung der Extrazellulären Vesikel für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen stammen aus Betrachtungen einzelner Patientengruppen. In vielen Fällen wurde ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Großen EV im Blutplasma und dem Vorliegen kardiovaskulärer Risikofaktoren beschrieben. So untersuchten Amabile et al. (2014) 844 Personen aus dem Kollektiv der FHS Offspring Study (Kannel et al., 1979). Mithilfe der Durchflusszytometrie wiesen sie signifikant erhöhte Spiegel der endothelialen Großen EV bei Personen mit arterieller Hypertonie, erhöhten Triglyceriden, niedrigem HDL-Cholesterin, großem BMI und großem Taillenumfang nach.

Extrazelluläre Vesikel sind direkt an der Entstehung arterieller und venöser Thrombembolien beteiligt sind. Der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1, der regelmäßig im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen erhöht ist, fördert die Bildung prothrombotischer endothelialer Großer EV (Brodsky et al., 2002). Die Plaques atherosklerotischer Gefäße enthalten Große EV von Makrophagen, Lymphozyten, Granulozyten, Erythrozyten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen in stark angereicherter Form (Leroyer et al., 2007; Mallat et al., 1999). Zudem fördern EV die Gefäßneubildung, die maßgeblich an der Entstehung instabiler Plaques beteiligt ist (Brill et al., 2005; Kim et al., 2002; Kolodgie et al., 2003; Martinez und Andriantsitohaina, 2011).

Auch in venösen Thromben sind EV nachweisbar (Falati et al., 2003). Ramacciotti et al. (2009) demonstrierten an Mäusen, dass die durch Ligatur der Vena cava inferior hervorgerufene Thrombenbildung mit einem Verbrauch leukozytärer EV einhergeht, während der Plasmaspiegel der thrombozytären EV ansteigt. In einer anderen Untersuchung riefen EV von Patienten, die am Herzen operiert wurden, nach intravenöser Injektion in Mäusen eine verstärkte Thrombenbildung hervor (Biró et al., 2003). Eine retrospektive Studie zeigte, dass der Nachweis TF+ EV das Thromboserisiko von Tumorpatienten erhöht (Zwicker et al., 2009).

Der Einsatz der Extrazellulären Vesikel in der Diagnostik von Herzkreislauferkrankungen ist vielversprechend. Die Bestimmung der leukozytären Großen EV erlaubte es, Patienten mit einer asymptomatischen Atherosklerose frühzeitig zu erkennen (Chironi et al., 2006).

Das Plasma von Patienten, die an einer manifesten peripheren arteriellen Verschlusskrankheit leiden (pAVK), enthält vermehrt CD62P+ Große EV aktivierter Thrombozyten (van der Zee et al., 2006). Es besteht ein Zusammenhang zwischen erhöhten endothelialen Großen EV und dem Auftreten einer cerebralen arteriellen Verschlusskrankheit (cAVK), instabiler Carotisplaques und eines Schlaganfalls (Jung et al., 2009; Sarlon-Bartoli et al., 2013; Simak et al., 2006). Werner et al. (2006) untersuchten anhand von 50 Patienten mit einer KHK den Zusammenhang zwischen dem Plasmaspiegel der Großen EV und der endothelzellvermittelten Dilatation der Koronargefäße. Hier korrelierte ein erhöhter Plasmaspiegel der endothelialen Großen EV mit einer geringen Vasodilatation nach Gabe von Acetylcholin. Ein akutes Koronarsyndrom (ACS) geht mit einem Anstieg der Großen EV von Endothelzellen und Erythrozyten im peripheren Blut einher (Mallat et al., 2000; Suades et al., 2015). Auch der intrakoronar gemessene Spiegel der thrombozytären und endothelialen EV ist im Rahmen eines ACS erhöht (Porto et al., 2012).

EV ermöglichen die Diagnosestellung einer venösen Thrombembolie. Chirinos et al. (2005) fanden signifikant erhöhte Plasmaspiegel der endothelialen EV in einer Gruppe von 25 Patienten mit einer tiefen Beinvenenthrombose oder Lungenarterienembolie. Die Kombination der Vesikelzahl mit zusätzlichen Markern könnte die Sensitivität verbessern (Rectenwald et al., 2005). Weitere Studien mit kleinen Fallzahlen wiesen erhöhte Spiegel der thrombozytären EV sowie der PSGL-1+ EV von Monozyten und Endothelzellen in Patienten mit einer venösen Embolie nach (Jamaly et al., 2018a; Wang et al., 2018).

Als Beispiel für Veränderungen der Vesikelzusammensetzung soll im Folgenden die miRNA-126 vorgestellt werden. Die miRNA-126 wird von Endothelzellen gebildet und ist ein bedeutendes Signal zur Endothelzellproliferation, Endothelzellmigration und Re-endothelialisierung (Fish et al., 2008; Wang et al., 2008). Apoptosekörper von Endothelzellen wirken durch den Transport der miRNA-126 in Endotheliale Vorläuferzellen gefäß-
protektiv (Zernecke et al., 2009). Ein Diabetes Typ II und eine KHK gehen mit einer erniedrigten Plasmakonzentration der miRNA-126 einher (Fichtlscherer et al., 2010; Zampetaki et al., 2010). Dagegen zeigen Blutproben aus den Koronargefäßen von Patienten mit einem ACS signifikant erhöhte Spiegel der miRNA-126 (De Rosa et al., 2011). Beachtenswert ist der Nachweis einer veränderten miRNA-Konzentration im Inneren der

EV. Jansen et al. (2013) zeigten in ihrer Studie an 176 Patienten, dass ein Diabetes Typ II mit einer signifikanten Reduktion der miRNA-126 innerhalb der Großen EV einhergeht. Bei Patienten mit einer stabilen KHK korrelierte die innerhalb der Großen EV gemessene Konzentration der miRNA-126 zudem mit dem zukünftigen Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse (Jansen et al., 2014).

Extrazelluläre Vesikel erlauben prognostische Aussagen. Sinning et al. (2011) erkannten in ihrer Studie an 200 Patienten mit einer stabilen KHK, dass CD31+ EV aus dem Plasma einen geeigneten prädiktiven Marker für das Eintreten eines ersten „Major Adverse Cardiac and Cerebrovascular Event“ (MACCE), die Notwendigkeit einer Revaskularisation und das Versterben an einem MACCE darstellen. Nozaki et al. (2009) bestimmten den Spiegel der endothelialen EV, die durch das spezifische VE-Cadherin gekennzeichnet sind, und erhielten ähnliche Ergebnisse. In beiden Studien erlaubte die Kombination der Vesikelzahl mit weiteren Markern eine bessere Abschätzung des Risikos für ein zukünftiges MACCE.

1.3 Zielsetzung der Studie

Das Ziel dieser Studie ist es, mithilfe der Durchflusszytometrie den Plasmaspiegel der Großen EV im rechten und linken Vorhof sowie im linken Vorhofohr zu bestimmen und diesen zwischen Patienten mit verschiedenen Arten des Vorhofflimmerns zu vergleichen. Die Analyse zielt neben den endothelialen und erythrozytären Großen EV insbesondere auf die thrombozytären Großen EV ab. Wir erwarten neue Erkenntnisse zu dem gesteigerten Risiko von Patienten mit Vorhofflimmern, eine kardiogene Embolie zu entwickeln.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 1 enthält eine Übersicht der Geräte, Utensilien und Reagenzien, die in der Studie Verwendung fanden.

Tab. 1: Die Materialliste

Geräte	Hersteller (Katalog-Nummer)
Autoklav VX-150	Systec GmbH, Linden, Deutschland
Pipetten Eppendorf Research®, 2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten Eppendorf Research® plus, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland (3121 000.015), (3121 000.074), (3121 000.082), (3121 000.120)
Tischzentrifuge MiniSpin® plus, Rotor F-45-12-11	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland (5453 000 015)
Zentrifuge 5810R, Rotor A-4-81	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland (5811000015), (5810 718.007)
Zentrifuge 5430R, Rotor FA-45-30-11	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland (5428 000 205), (5427 753 001)
Vortexer ZX3	Velp Scientifica Srl, Usmate, Italien (F20220176)
Vortexer labdancer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland (0003365000)
Vortexer Genius 3	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland (0003340000)
Freezer Forma 900 Series	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Freezer Hera Freeze HFU B Series	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Wasserbad WNB 29	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Flockeneisbereiter AF20	Scotsman Ice, Mailand, Italien
BD FACSCanto II Flow Cytometer	BD Biosciences, San Jose, USA (23-10918-00)

Allgemeines aus dem Krankenhaus

Safety-Multifly®-Kanüle	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland (85.1638.203)
S-Monovette® Citrate 0,106 mol/l, 2,9 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland (04.1902)

S-Monovette® EDTA K3E, 2,6 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland (04.1901)
S-Monovette® EDTA K3E, 9,0 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland (02.1066.001)

Allgemeines aus dem Labor

Pipette Tip premium surface, 10 µl, 200 µl, 1250 µl	nerbe plus GmbH & Co. KG, Winsen/ Luhe, Deutschland (07-362-2015), (07-366-2015), (07-369-2015)
EPPENDORF TUBES® Save-Lock Tubes, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland (0030 120.086), (0030 120.94)
EPPENDORF TUBES® PCR clean 5,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland (0030 119.460)
CELLSTAR® Tubes, 15 ml, PP, graduated, conical bottom, blue screw cap, sterile	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich (188271)
Probenröhre 75 x 12 mm	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland (55.1579)

Reagenzien

Invitrogen™, UltraPure™ DNase/RNase- Free Distilled Water, 10 x 500 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (10977-049)
Gibco™, DPBS, no calcium, no magne- sium, 10 x 500 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (14190-250)
Annexin V Binding Buffer, 10X concen- trate	BD Biosciences, San Jose, USA (556454)
Dimethyl sulfoxide p.A.	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland (A3608,0100)
Triton® X-100, for molecular biology	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland (T8787-50ML)
Adenosindiphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland (A2754-100MG)

Vesikelmarker

FITC Annexin V 1,0 ml	BD Biosciences, San Jose, USA (556419)
Calcein, AM, cell-permeant dye 1 mg	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (C1430)
Anti-Hu/Mo CD62P, PerCP-eFluor™710 0,125 ml; 0,5 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (46-0626-80), (46-0626-82)
PE Mouse Anti-Human CD31 2,0 ml	BD Biosciences, San Jose, USA (555446)
APC Mouse Anti-Human CD41a 2,0 ml	BD Biosciences, San Jose, USA (559777)

CD42b-APC-Vio770 (TM) 300 µl	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland (130-100-202)
CD235a (Glycophorin) PE-Vio® 770, human 60 µl; 200 µl; 300 µl	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland (130-120-614), (130-120-474), (130-100-261)
BV510 Mouse Anti-Human CD62E 250 µl	BD Biosciences, San Jose, USA (742705)
BV421 Mouse Anti-Human CD142 250 µl	BD Biosciences, San Jose, USA (744003)
CD142-VioBlue® human 300 µl	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland (130-098-972)
Anti-Hu CD14, PE 500 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (12-0149-42)
APC Mouse Anti-Human CD16 250 µl	BD Biosciences, San Jose, USA (561304)
Anti-Hu CD45, APC-eFluor® 780 125 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (47-0459-41)

Beads

UltraComp eBeads™ Compensation Beads	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (01-2222-42)
Amino Fluorescent Particles, Nile Red 0,96 µm	Spherotech, Inc., Lake Forest, USA (AFP-0856-2)
Nano Fluorescent Particle Size Standard Kit, Yellow	Spherotech, Inc., Lake Forest, USA (NFPPS-52-4K)
CountBright™ absolute counting beads	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (C36950)
Silica Microspheres 0,299 µm; 1,046 µm	Bangs Laboratories, Inc., Fishers, USA (SS02001), (SS04000)
AccuCount Blank Particles 2,0 µm	Spherotech, Inc., Lake Forest, USA (ACBP-20-10)

2.2 Methoden

2.2.1 Studiendesign

Die vorliegende Studie wurde im Januar 2018 in der Kardiologie des Universitätsklinikums Bonn initiiert. Alle Studienteilnehmer entstammen dem Patientenkollektiv der Klinik. Die Methodik umfasst hauptsächlich die Durchflusszytometrie. Die Durchführung der Studie erfolgte nach Zustimmung durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Bonn (283/16) sowie in Übereinstimmung mit den Richtlinien der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) und den entsprechenden gesetzlichen Grundlagen.

Vor Einwilligung in die Studie wurden die Patienten umfassend durch einen Arzt über das Vorhaben des Projektes und die resultierenden Risiken aufgeklärt. Das Procedere kann in die zwei Arbeitsteile Probensammlung und Experimente eingeteilt werden. Eine Vielzahl grundlegender Versuche ermöglichte die Etablierung eines Protokolls zur Analyse der Großen Extrazellulären Vesikel in Blutplasma. Anschließend wurde das Protokoll angewandt, um die Anzahl der Großen EV in den Plasmaproben der Studienteilnehmer zu bestimmen.

2.2.2 Probensammlung

Das Kapitel erläutert die Rekrutierung der Patienten, das MitraClip®-Verfahren, die Gewinnung der Blutproben und das Herstellen von thrombozytenfreiem Plasma.

2.2.2.1 Rekrutierung der Patienten

Die Grundlage der LAA-Studie bilden Blutproben von Patienten, die in der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums Bonn behandelt wurden. In dem Zeitraum von Februar 2018 bis Juli 2019 nahmen 62 Patienten an der Studie teil. Die Aufnahme der Patienten erfolgte ungeachtet ihrer Vorerkrankungen. Allen Studienteilnehmern ist gemein, dass sie in einer interventionellen, kathetergestützten Technik am Herzen behandelt wurden. Dabei wurden diejenigen Eingriffe berücksichtigt, die eine Katheterisierung des rechten und des linken Herzens notwendig machten. Hierzu zählten die Rekonstruktion der Mitralklappe mittels MitraClip®-Verfahren, die Mitralklappenvalvuloplastie mithilfe eines Ballons, der Verschluss des linken Vorhofohres durch einen LAA-Okkluder und der Verschluss eines persistierenden Foramen Ovale. Aufgrund der großen Zahl der Mitralklappenbehandlungen am Universitätsklinikum Bonn erfolgte bei 89,7 % der Probanden eine Behandlung mit dem MitraClip®-Verfahren.

2.2.2.2 MitraClip®-Verfahren

Das MitraClip®-Verfahren wurde Ende der 1990er Jahre von der Firma Evalve Inc. entwickelt, die heute Teil von Abbott Laboratories ist. Die Mitralklappeninsuffizienz kann in eine primäre und eine sekundäre Form eingeteilt werden. Während erstgenannte auf Schäden an der Herzklappe selbst beruht, ist die sekundäre Mitralklappeninsuffizienz auf degenerative Veränderungen des linken Ventrikels zurückzuführen. Das MitraClip®-

Verfahren dient vorwiegend der Behandlung einer sekundären Mitralklappeninsuffizienz. Die EVEREST I-Studie demonstrierte die Umsetzbarkeit des MitraClip®-Verfahrens (Feldman et al., 2009). Aufgrund einer geringeren Invasivität stellt es für ältere Patienten mit einem hohen Operationsrisiko eine Alternative zu der konventionellen Operation dar. Die EVEREST II-Studie ergab, dass die konventionelle Operation zwar zu einer besseren Reduktion der Mitralklappeninsuffizienz führt, das MitraClip®-Verfahren jedoch weniger akute Blutungskomplikationen hervorruft (Feldman et al., 2011). In einem Follow-up über fünf Jahre zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den NYHA-Stadien III und IV oder in der Mortalität zwischen den Patienten nach MitraClip®-Verfahren und den Patienten nach herkömmlicher Operation (Feldman et al., 2015). Aufgrund von widersprüchlichen Ergebnissen in den zwei randomisierten kontrollierten Studien MITRA-FR und COAPT erfolgt heute eine strenge Auswahl der Patienten, die dem MitraClip®-Verfahren zugeführt werden (Obadia et al., 2018; Stone et al., 2018). Einzelne Patientengruppen könnten von dem Eingriff besonders profitieren (Grayburn et al., 2019).

Im Folgenden soll der Ablauf des MitraClip®-Verfahrens nach der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie zusammengefasst werden (Boekstegers et al., 2013). Der Eingriff wird in Vollnarkose durchgeführt. Er beginnt mit der Punktion der Vena femoralis mithilfe einer Punktionskanüle und dem Einbringen eines Schleusensystems in Seldinger Technik. Nun verabreicht der Anästhesist dem Patienten eine geringe Dosis Heparin. Über einen Führungsdraht wird ein Brockenbrough-Katheter in die Vena Cava inferior und weiter bis zum rechten Vorhof geschoben. Die Lage des Katheters wird kontinuierlich über die Röntgenanlage und die Transösophageale Echokardiographie überwacht. Befindet sich die Brockenbrough-Nadel im Bereich der Fossa ovalis, erfolgt die transseptale Punktion vom rechten Vorhof in den linken Vorhof. Unmittelbar danach werden dem Patienten über den Katheter 70 - 100 IE Heparin pro Kilogramm Körpergewicht verabreicht. Der Zielwert der Aktivierten Koagulationszeit liegt von nun an zwischen 250 – 300 s. Anschließend können ein Steuerungskatheter und der MitraClip® eingebracht werden. Nach Passieren der Mitralklappe, wird der MitraClip® leicht zurückgezogen, um die Segel der Klappe zu greifen. Durch das Schließen des MitraClips® werden die Segel der Mitralklappe einander näher gebracht und in der neuen Position fixiert. Sofern das Device wunschgemäß sitzt und der mittlere Druckgradient über der Mitralklappe den Grenzwert

von 5 mm/Hg nicht übersteigt, kann der MitraClip® freigesetzt werden. Die Behandlung endet mit dem Entfernen des Katheters und dem Verschluss der Punktionsstelle in der Leiste.

2.2.2.3 Gewinnung der Blutproben

Für jeden Patienten wurden wiederholt Blutentnahmen durchgeführt. Sie umfassen eine Blutentnahme vor der Intervention und mehrere Blutentnahmen während der Intervention.

Am Vorabend des Eingriffs wurde den Studienteilnehmern Blut über eine periphere Vene oder einen Zentralen Venenkatheter abgenommen. Die Blutproben umfassten jeweils ein EDTA- und ein Citratröhrchen. Sie wurden an das Gerinnungslabor des Universitätsklinikums Bonn gesandt. Die bestimmten Werte umfassen: D-Dimere, Leukozytenzahl, Erythrozytenzahl, Hämoglobin, mittleres korpuskuläres Volumen, mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt, Thrombozytenzahl, mittleres Thrombozytenvolumen, Anzahl großer Thrombozyten, Quick-Wert, International Normalized Ratio (INR), partielle Thromboplastinzeit (aPTT), Thrombinzeit, Reptilasezeit, Fibrinogen, Faktor II, Faktor V, Faktor VII, Faktor VIII und Faktor X.

Während des interventionellen Eingriffs erfolgten Blutentnahmen aus drei verschiedenen Herzhöhlen. Sie dienten sowohl der Bestimmung der genannten Gerinnungsparameter durch das Gerinnungslabor als auch der Analyse der Großen Extrazellulären Vesikel durch unsere Arbeitsgruppe. Mithilfe des einliegenden Brockenbrough-Katheters wurde Blut aus dem rechten Atrium entnommen. Nach der transseptalen Punktion wurde über einen Pigtail-Katheter Blut aus dem linken Atrium und dem linken Vorhofohr gewonnen. Der Operateur füllte zu jeder der drei Lokalisationen eine sterile Spritze mit 20 ml Blut. Ohne Verzögerung gelang das Überführen der Blutproben aus den sterilen Spritzen in vorbereitete Blutentnahmeröhrchen. Diese umfassten pro Lokalisation ein EDTA-Röhrchen à 9,0 ml, ein EDTA-Röhrchen à 2,6 ml und drei Citrat-Röhrchen à 2,9 ml. Die Beschriftung der Röhrchen nach Antikoagulans, Fallnummer des Patienten, Datum des Eingriffs und Lokalisation erlaubte zu jedem Zeitpunkt eine exakte Zuordnung der Proben. Es wurde besonders darauf geachtet, die Zeit zwischen den Blutentnahmen gering zu

halten. Der Weitertransport der Proben geschah bei Umgebungstemperatur und ohne Erschütterungen. Vom Zeitpunkt der dritten Blutentnahme im Herzkatheterlabor bis zur Weiterverarbeitung der Proben in unserem abteilungseigenen Labor vergingen nicht mehr als zehn Minuten.

2.2.2.4 Herstellen von thrombozytenfreiem Plasma

Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten im Labor der Medizinischen Klinik und Poliklinik II. Es befindet sich unweit des Herzkatheterlabors. Zwei Zentrifugationsschritte dienten der Herstellung von thrombozytenfreiem Plasma (PFP).

Eppendorf Tubes der Größe 2 ml wurden bereitgestellt. Tabelle 2 zeigt beispielhaft die Beschriftung der Tubes für den ersten Studienteilnehmer. Zunächst wurden die Blutentnahmeröhrchen für 15 min bei 1500 g und 22 °C zentrifugiert. Der Überstand des jeweiligen Blutentnahmeröhrchens wurde in die entsprechend beschrifteten Eppendorf Tubes überführt. Dabei blieb der Buffy-Coat unberührt. Der zelluläre Rest wurde verworfen. Anschließend wurden die Eppendorf Tubes für 2 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Erneut wurden die Überstände in vorbereitete Eppendorf Tubes überführt und die Pellets verworfen. Das thrombozytenfreie Plasma wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C eingefroren. Dieses Vorgehen erlaubte das Sammeln mehrerer Proben an einem Tag. Die Zeitspanne der Lagerung bis zur durchflusszytometrischen Analyse betrug weniger als zwölf Monate.

Tab. 2: Die Probenbeschriftung

EDTA <i>LAA-001</i> Patienten-Nr. RA 07.02.18	EDTA <i>LAA-001</i> Patienten-Nr. RA 07.02.18	Citrat <i>LAA-001</i> Patienten-Nr. RA 07.02.18	Citrat <i>LAA-001</i> Patienten-Nr. RA 07.02.18	EDTA <i>LAA-001</i> Patienten-Nr. LA 07.02.18	EDTA <i>LAA-001</i> Patienten-Nr. LA 07.02.18	EDTA <i>LAA-001</i> Patienten-Nr. 07.02.18
Citrat <i>LAA-001</i> Patienten-Nr. LA 07.02.18	Citrat <i>LAA-001</i> Patienten-Nr. LA 07.02.18	EDTA <i>LAA-001</i> Patienten-Nr. LAA 07.02.18	EDTA <i>LAA-001</i> Patienten-Nr. LAA 07.02.18	Citrat <i>LAA-001</i> Patienten-Nr. LAA 07.02.18	Citrat <i>LAA-001</i> Patienten-Nr. LAA 07.02.18	

2.2.2.5 Patientendaten

Es wurde eine Tabelle mit Angaben zu den klinischen Parametern der Patienten angelegt. Sie entstammen dem Krankenhausinformationssystem des Klinikums. Die Informationsquellen umfassen Arztbriefe, Pflegebögen, OP-Berichte, Konsile, Laborwerte, Ergebnisse der Funktionsdiagnostik und weitere Befunde.

2.2.3 Experimente

Die LAA-Studie umfasst insgesamt 53 durchflusszytometrische Experimente. Der Großteil der Experimente diente der Etablierung des Protokolls zur Analyse der Großen EV. Zum Abschluss wurden die Plasmaproben der 58 Patienten mithilfe des Protokolls auf Vesikel untersucht. Im Folgenden sei das Vorgehen nach dem finalen Protokoll wiedergegeben.

2.2.3.1 Auftauen der Proben im Wasserbad

Das Auftauen des Citrat-Plasmas erfolgte in einem Wasserbad. Nach der Entnahme der Proben aus dem Freezer wurden die Eppendorf Tubes für etwa 5 Minuten in ein 36 °C warmes Bad getaucht. Vor dem nächsten Schritt wurde kontrolliert, dass die Tubes keine Schäden aufwiesen. Im Falle eines sichtbaren Koagels wurde die Probe verworfen. Durch separates Auf- und Abpipettieren jeder der Proben wurde eine homogene Durchmischung sichergestellt. Ein neuer Satz Eppendorf Tubes wurde nach Fallnummer und Entnahmeort beschriftet. Anschließend wurden aus jeder Probe 150 µl des PFP in das entsprechende Eppendorf Tube überführt.

2.2.3.2 Differentielle Zentrifugation

Die Vesikelisolation geschah mithilfe der differentiellen Zentrifugation. Durch das mehrfache Zentrifugieren von Überständen mit steigenden G-Zahlen können zunehmend kleinere Probenbestandteile gewonnen werden. Das Wiederholen eines Schrittes führt zu einer Aufreinigung der Probe. Jede Probe wurde mit 1000 µl phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) versetzt und durch vorsichtiges Vortexen gemischt. Anschließend wurden die Proben für 40 min bei 20.000 g und 4 °C zentrifugiert (Jansen et al., 2013; Jansen et al., 2012; Jansen et al., 2014). Der Überstand wurde durch behutsames Dekantieren aus den Eppendorf Tubes entfernt. Nach dem Resuspendieren der Pellets in jeweils 1000 µl PBS wurden die Proben erneut für 40 min bei 20.000 g und 4° C zentrifugiert. Nun wurde der

Überstand durch exaktes Pipettieren entnommen und verworfen. Zum Abschluss der Isolation bildeten die EV ein nicht sichtbares Pellet am Boden der Eppendorf Tubes.

2.2.3.3 Färbung der Vesikel

In Vorbereitung auf die Analyse der Patientenproben am Durchflusszytometer erfolgte die Färbung der Vesikel. Insgesamt kamen sechs Marker zum Einsatz. In Tabelle 3 sind jedem Marker der Fluoreszenzfarbstoff, die Zielstruktur und die durch ihn nachgewiesene Zellart zugeordnet. Von großer Bedeutung ist die Unterscheidung zwischen Calcein AM und den fünf Antikörpern.

Tab. 3: Die Marker des finalen Protokolls

Marker	Fluorochrom	Zielstruktur	Expression insbesondere durch
Calcein AM	Eigenfluoreszenz	Zellinnere	intakte Zellen
Anti-CD31	Phycoerythrin (PE)	PECAM-1 (GpIIa)	Endothelzellen, Thrombozyten
Anti-CD62P	PerCP-eFluor710	P-Selektin (GMP-140)	stim. Thrombozyten, Endothelzellen
Anti-CD235a	PE-Vio770	Glycophorin A	Erythrozyten, inkl. Vorläuferzellen
Anti-CD41	Allophycocyanin (APC)	GpIIb	Thrombozyten, Megakaryozyten
Anti-CD42b	APC-Vio770	CD42b	Thrombozyten, Megakaryozyten

Die ISEV empfiehlt seit 2018 den Einsatz eines zytosolischen Markers für die Färbung von EV (Théry et al., 2018). Calcein ist ein Derivat des Fluoresceins. Die Verbindung von Calcein und einem Acetoxymethyl-Rest (Calcein AM) erlaubt die spezifische Färbung intakter Zellen (Jansen et al., 2013). Calcein AM ist dem vielgenutzten Annexin V in zweierlei Hinsicht überlegen. Obwohl Annexin V an Phosphatidylserin (PS) bindet, werden nicht alle EV durch Annexin V gefärbt (Koopman et al., 1994; Shet et al., 2003). Zudem ist PS auch in Lipoproteinen enthalten (Darabi und Kontush, 2016). Anders als Annexin V erfüllt Calcein AM seine Funktion erst nach einer Aktivierung im Inneren der Zelle.

Zunächst ist Calcein AM nicht fluoreszierend. In seiner ungeladenen Form diffundiert es ungehindert durch die Zellmembran. Im Zytosol spalten Esterasen das Calcein AM in einen Acetoxymethyl-Rest und einen Calcein-Rest. Das so freigesetzte Calcein entwickelt eine Eigenfluoreszenz mit einem Emissionsmaximum von 517 nm. Zudem ist es nun geladen und damit unfähig, die Zellmembran zu passieren. Diese beiden Eigenschaften des

aktivierten Calceins, Fluoreszenzlicht zu emittieren und sich im Inneren einer Zelle anzureichern, machen es zu einem idealen Marker für intakte Zellen. Analog dazu können auch intakte Vesikel gefärbt werden. Gray et al. (2015) beschrieben diesen Mechanismus im Jahr 2015 und zeigten eine gute Abgrenzung von intakten Vesikeln und Zelltrümmern in der Durchflusszytometrie.

Antikörper binden Oberflächenmarker auf Zellmembranen. Die Kopplung der Antikörper mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht ihren Einsatz in der Mehrkanal-Durchflusszytometrie. Der Antikörper Anti-CD31 bindet an das Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM-1). Es befindet sich hauptsächlich auf der Oberfläche von Endothelzellen und Thrombozyten und vermittelt den Durchtritt von Leukozyten durch das Endothel. Anti-CD41 wiederum bindet das GpIIb/IIIa auf der Oberfläche von Thrombozyten, welches Teil des Rezeptors für Fibrinogen, Fibronektin und Von-Willebrand-Faktor ist. Durch den Vergleich der Expression von CD31 und CD41 kann auf die Abstammung der Vesikel geschlossen werden. So stellen sich endotheliale EV CD31+ und CD41- dar, während thrombozytäre EV sowohl CD31+ als auch CD41+ sind. Anti-CD235a erkennt das Glycophorin A und ist ein Marker für erythrozytäre Vesikel. Das anti-CD42b markiert ausschließlich Thrombozyten. Eine Stimulation führt zu der Expression von P-Selektin auf Oberfläche von Thrombozyten und Endothelzellen. Es spielt eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen.

Nach der Isolation lagen die Vesikel in Form von Pellets in den Eppendorf Tubes vor. FACS-Röhrchen wurden bereitgestellt und beschriftet. Diese umfassten sowohl FACS-Röhrchen für die Compensation als auch FACS-Röhrchen für die zu messenden Proben. Die Pellets aus den Eppendorf Tubes wurden in jeweils 100 µl PBS resuspendiert und direkt in die bereitstehenden FACS-Röhrchen überführt.

Zunächst erfolgte die Färbung durch die fünf Antikörper. Hierzu wurde ein Mikroliter des jeweiligen Antikörpers in das zugehörige Röhrchen für die Compensation und die Probenröhrchen gegeben. Auf jede Antikörperzugabe folgte ein vorsichtiges Vortexen. Dieses Vorgehen wurde für alle Antikörper wiederholt. Dann wurden die Proben für 45 min unter lichtgeschützten Bedingungen und bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluss an die erste Inkubationszeit erfolgte die Färbung durch Calcein AM. Um die finale Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ zu erreichen, war das Erstellen einer Stock Solution und einer Working Solution vonnöten. 1 mg Calcein AM wurde in 100 μl Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Diese Stock Solution enthielt Calcein in einer 10 millimolaren Konzentration und konnte in Aliquots von 10 μl bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Unmittelbar vor einem Experiment wurde die Stock Solution aufgetaut und verdünnt. Die Working Solution enthielt entsprechend der Anzahl der Proben jeweils ein Vielfaches von 0,5 μl dieser Stock Solution und 400 μl PBS. Die Konzentration des Calcein AM in der Working Solution betrug 12,5 $\mu\text{mol/l}$. Nach wiederholtem Vortexen wurden jeweils 400 μl der Working Solution zu den gefärbten Proben gegeben, so dass ein Probenvolumen von insgesamt 500 μl entstand. Ungefärbte Proben und Compensation Tubes ohne Beschriftung für Calcein wurden lediglich mit 400 μl PBS aufgefüllt. Anschließend erfolgte erneut eine Inkubation für 20 min unter lichtgeschützten Bedingungen und bei Raumtemperatur.

Tab. 4: Die Fluorochrome des finalen Protokolls

Marker	Fluorochrom	Laser (nm)	Ex. max. (nm)	Em. max. (nm)	Filter
Calcein AM	Eigenfluoreszenz	488	494	517	530/30
Anti-CD31	PE	488	496	578	585/42
Anti-CD62P	PerCP-eFluor710	488	482	710	695/40
Anti-CD235a	PE-Vio770	488	565	775	780/60
Anti-CD41	APC	633	650	660	660/20
Anti-CD42b	APC-Vio770	633	652	775	780/60

2.2.3.4 Durchflusszytometer

Die Experimente wurden an einem FACSCanto II der Marke Becton Dickinson durchgeführt. Aus den Tabellen 4 und 5 gehen die Spezifikationen des Gerätes hervor. Es wurden zwei Thresholds eingestellt. Die Threshold für den Sideward Scatter betrug 200 und die Threshold für das Calcein im FITC-Kanal betrug ebenfalls 200. Hierbei lautete die Verknüpfung zwischen den beiden Thresholds "OR". Bei der Analyse wurden also diejenigen Events berücksichtigt, die entweder im SSC-Kanal oder im FITC-Kanal oberhalb der Threshold von 200 lagen. Die Analyse der Proben geschah stets mit der niedrigsten Flussrate. Die Dauer der Aufnahme variierte zwischen den Compensations und den Patienten-

proben, betrug für die Patientenproben jedoch immer 2 min. In einem Teil der Fälle erfolgte das Erstellen der Compensation direkt am Durchflusszytometer. Andernfalls wurde die Compensation nachträglich mithilfe des Programms FlowJo hinzugefügt. Unmittelbar vor dem Einmessen wurde jedes Probenröhrchen mit 50 µl Counting Beads versetzt und durch Vortexen gemischt. Im Anschluss an die letzte Messung erfolgte die Sicherung der Daten auf einem externen Speichermedium. Die Daten wurden sowohl als FCS-Files als auch in Form von Experiment-Files gespeichert.

Tab. 5: Die Einstellungen des Durchflusszytometers

Marker	Kanal	Laser	Detektor	Spannung
	FSC		Photodiode	450
	SSC		Photomultiplier (PMT)	450
Calcein AM	FITC	Blau	PMT Grün	450
Anti-CD31	PE	Blau	PMT Orange	500
Anti-CD62P	PerCP	Blau	PMT Rot	500
Anti-CD235a	PE-Cy7	Blau	PMT Infrarot	500
Anti-CD41	APC	Rot	PMT Rot	500
Anti-CD42b	APC-Cy7	Rot	PMT Infrarot	500

2.2.3.5 Gating-Strategie

Die Bearbeitung der gewonnenen Daten erfolgte durch die Software FlowJo Version 10 (Becton Dickinson). Mit ihrer Hilfe lassen sich registrierte Ereignisse in Form von Punktwolken darstellen. Dabei entspricht jeder Punkt einem gemessenen Event. Die Achsenbeschriftung zeigt die Signalstärke für den jeweiligen Parameter an. Gates dienen dazu, einzelne Vesikelpopulationen getrennt voneinander zu untersuchen.

In einem ersten Schritt wurde für jede Probe die Anzahl der gemessenen Counting Beads bestimmt, wobei zum Ausschluss von Doubletten die Sideward Scatter Width und die Sideward Scatter Height Berücksichtigung fanden (nicht dargestellt).

Die Abbildung 2 stellt die Abfolge der weiteren Gates dar. Zunächst wurden der Forward Scatter und der Sideward Scatter in einem Dot-Plot gegeneinander aufgetragen. Während der FSC einen Überblick über die Größe aller EV gibt, spiegelt der SSC die Granularität aller EV wider.

Mit der Wahl des FITC-Kanals auf der x-Achse konnte die Färbung durch Calcein AM beurteilt werden. Events mit einem positiven Signal entsprechen intakten EV, in deren Inneren sich das aktivierte Calcein anreichert. Eine ähnliche Verteilung zeigt das Histogramm. Aufgrund der Größenverteilung der EV und verstärkt durch die Wahl der Threshold sind zwei scharf getrennte Populationen zu erkennen. An dieser Stelle wurde ein Gate für Calcein-positive Events eingeführt. Alle folgenden Abbildungen stellen Subsets dieses Gates dar.

Die Differenzierung der intakten EV in thrombozytäre und endotheliale EV erfolgte durch den Vergleich der Expression von CD31 und CD41. Thrombozytäre EV stellen sich positiv für die Fluoreszenzfarbstoffe PE und APC dar. Endotheliale EV erscheinen dagegen nur positiv für PE. Ein Gate mit vier Quadranten dient der Trennung dieser Populationen. So enthält der Quadrant Nummer 2 die doppelt positiven, thrombozytären EV.

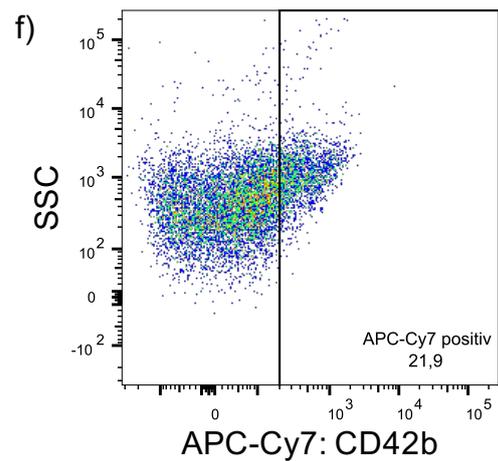
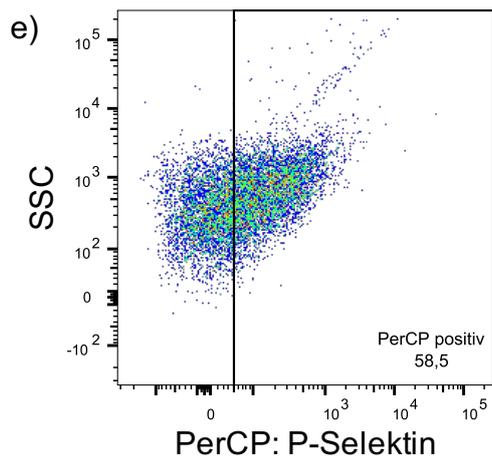
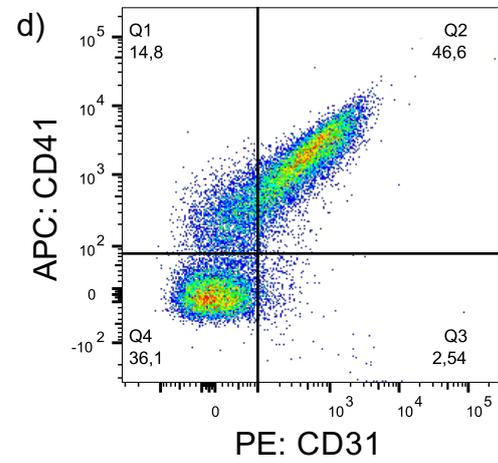
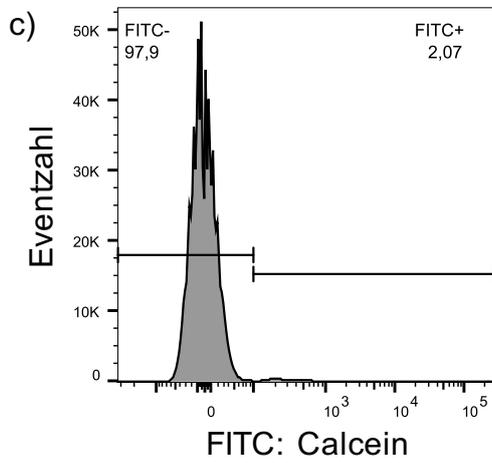
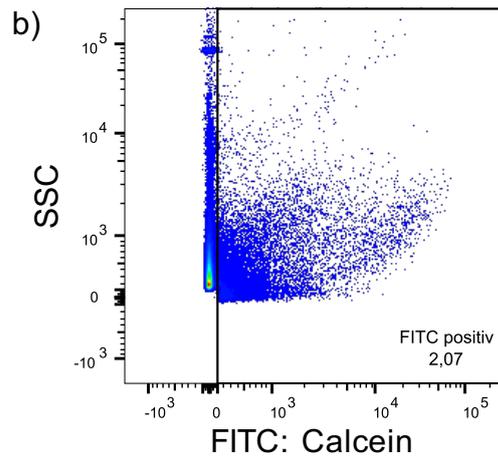
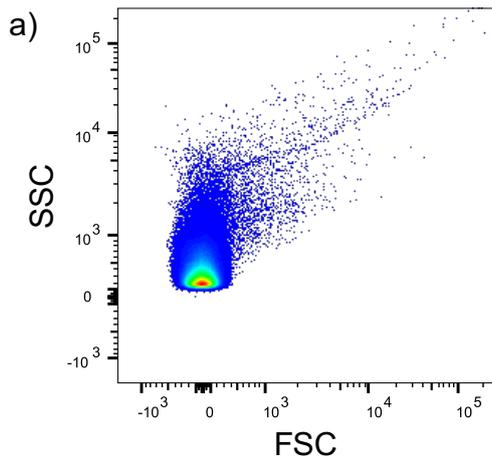
Das dazugehörige Subset wurde nacheinander auf die Expression der Marker P-Selektin und CD42b hin untersucht. Die Bestimmung der erythrozytären EV geschah ausgehend von den Calcein-positiven Events, die nach dem Marker CD235a aufgetragen wurden.

Für jedes Gate wurde eine Eventzahl bestimmt und der jeweiligen Vesikelpopulationen zugeordnet. Mithilfe einer ersten Formel konnte von der Anzahl der gemessenen Vesikel-Events, der Anzahl der gemessenen Bead-Events, der Ausgangskonzentration der Counting Beads und dem Probenvolumen auf die Konzentration der EV in der Probe geschlossen werden:

$$\frac{\text{EV}}{\mu\text{l Probe}} = \left(\frac{\text{Vesikelevents}}{\text{Beadevents}} \right) * \left(\frac{\text{Ausgangskonzentration}}{\text{Probenvolumen}} \right)$$

In einer zweiten Formel wurde außerdem berücksichtigt, dass dem Probenvolumen von 555 μl das kleinere Ausgangsvolumen von 150 μl Plasma zugrunde lag. Das Ergebnis entspricht der Vesikelzahl pro Mikroliter Plasma.

$$\frac{\text{EV}}{\mu\text{l Plasma}} = \left(\frac{\text{EV}}{\mu\text{l Probe}} \right) * \left(\frac{\text{Probenvolumen}}{\text{Ausgangsvolumen}} \right)$$



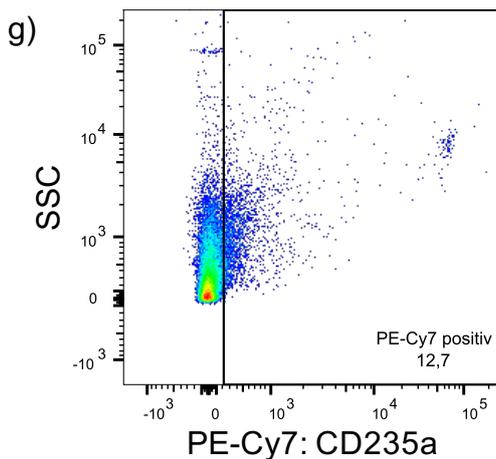


Abb. 2: Die Gatingstrategie

Die Abfolge der Gates für die Analyse der Vesikelpopulationen entlehnt aus Zietzer et al., 2021 mit Genehmigung des Journals. a) Der Dot-Plot zeigt alle gemessenen Events in der Auftragung FSC vs. SSC. b) Die Darstellung der Events in den Kanälen FITC und SSC erlaubt das Gating der Calcein+ Events. c) Ein Histogramm des FITC-Kanals enthält dasselbe Gate mit der Grenze von 200. d) Das Subset der Calcein+ Events wurde nach PE und APC aufgetragen und mit einem kreuzförmigen Gate belegt. Das Subset der doppelt positiven Events ermöglichte das Einfassen der e) PerCP+ Events sowie der f) APC-Cy7+ Events. g) Die erneute Betrachtung des Subsets der Calcein+ Events diente dem Gating der PE-Cy7+ Events. Vergleiche hierzu Exp20190328.

2.2.4 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Software Prism für macOS Version 9 (GraphPad). Sie umfasste beschreibende Statistiken und das Testen von Gruppenunterschieden. Kontinuierliche Variablen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung aufgeführt. Sie wurden durch den D'Agostino-Pearson Test und die Beurteilung von QQ-Plots auf das Vorliegen einer Normalverteilung hin untersucht. Bei gegebener Normalverteilung erfolgte der Mittelwertvergleich von zwei Gruppen mithilfe des zweiseitigen, ungepaarten t -Tests und von mehr als zwei Gruppen mithilfe der One-Way-ANOVA Analyse. Im Falle von zwei unabhängigen Variablen wurde eine Two-Way-ANOVA Analyse angewandt. Als Post-hoc-Test diente der Tukey's Multiple Comparisons Test. Bei Fehlen einer Normalverteilung erfolgte der Mittelwertvergleich mithilfe des Mann-Whitney U Tests. Kategoriale Variablen sind als Häufigkeiten sowie Prozentzahlen angegeben. Der Mittelwertvergleich erfolgte mithilfe des Chi-Quadrat-Tests. War der Chi-Quadrat-Test nicht anwendbar, weil ein Wert der Tabelle 0 betrug oder weniger als 20 % der Werte größer als 5 waren, wurde ein Fisher's Exact Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

Das Ziel der LAA-Studie bestand zunächst in der Etablierung eines Protokolls zur Analyse der Großen Extrazellulären Vesikel in Plasmaproben mithilfe der Durchflusszytometrie. Anschließend wurden dem Protokoll folgend die Proben von 58 Patienten untersucht. Diese Zweiteilung der Studie soll sich auch im Ergebnisteil widerspiegeln. In einem ersten Abschnitt wird die Validierung des Protokolls anhand von Kontrollexperimenten erläutert. In einem zweiten Abschnitt werden die Ergebnisse aus der Analyse der Patientenproben vorgestellt.

3.1 Validierung des Protokolls

Die Vorarbeiten umfassten 38 durchflusszytometrische Experimente. Nähere Angaben zu den Versuchen finden sich auch im Abschnitt „Weitere Versuchsangaben“. Untersucht wurden insbesondere das Zentrifugationsschema, die Negativkontrollen, die Färbung durch das Calcein AM, die Färbung durch die Antikörper, die Gatingstrategie, die Größe der Vesikel und der Ausschluss des sogenannten Swarmings.

3.1.1 Kontrolle des Zentrifugationsschemas

Der Erfolg der Vesikelisolation wurde durch die Analyse der Überstände untersucht, die nach den einzelnen Zentrifugationsschritten entstanden. Im Anschluss an den zweiten Zentrifugationsschritt wurden 200 µl des thrombozytenfreien Plasmas in ein FACS-Röhrchen überführt und bis zur Färbung auf Eis gelagert. Ebenso wurden nach dem dritten und dem vierten Zentrifugationsschritt jeweils 200 µl des Überstandes in zusätzliche FACS-Röhrchen gegeben und beiseitegestellt. Das zuletzt gewonnene Pellet wurde in 100 µl PBS resuspendiert. Schließlich erfolgte die Färbung aller erstellten Proben.

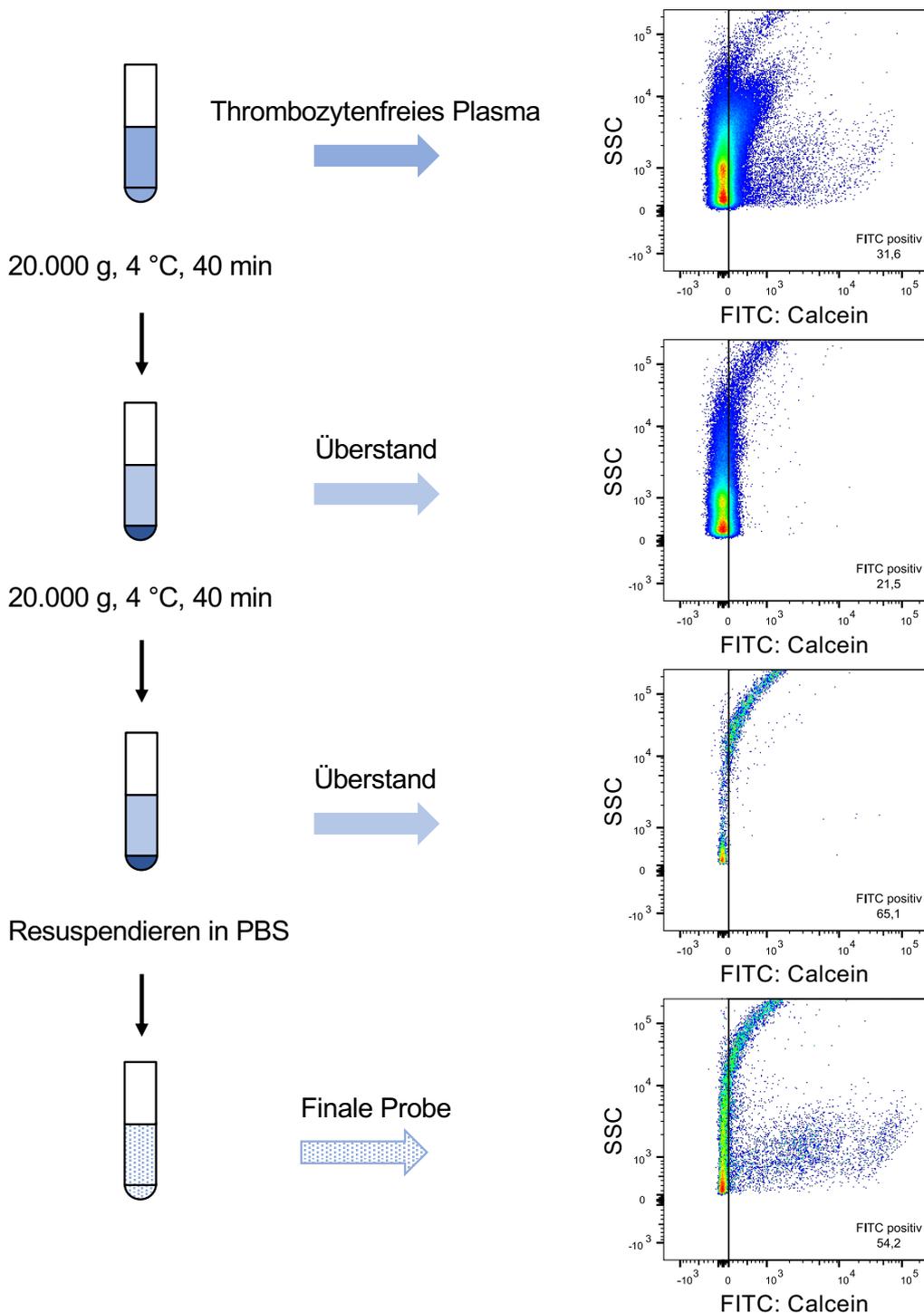


Abb. 3: Die Analyse der Überstände

Vergleich der Überstände, die nach den einzelnen Zentrifugationsschritten entstanden, adaptiert an Zietzer et al., 2021. Die Dot-Plots zeigen das a) thrombozytenfreie Plasma, b) den ersten Überstand, c) den zweiten Überstand sowie d) die finale Probe jeweils in der Auftragung FITC vs. SSC. Die Gates geben den prozentualen Anteil der Calcein+ Events an. Vergleiche hierzu Exp20180830.

Die Abbildung 3 zeigt das Zentrifugationsschema sowie die Analyse des thrombozytenfreien Plasmas, der zwei Überstände und der finalen Probe. Die Dotplots stellen alle gemessenen Events in der Auftragung FITC gegen den SSC dar. Das PFP enthält sehr viele Events und im FITC-Kanal ist eine dünne positive Population sichtbar. In den Überständen nimmt die Eventzahl ab und es fehlen positive Events. Erst nach dem Resuspendieren des zuletzt gewonnenen Pellets und der Analyse der finalen Probe findet sich die positive Population wieder. Hierbei handelt es sich um die durch Calcein gefärbten Vesikel. Das zweifache Zentrifugieren mit hohen G-Zahlen bewirkte außerdem eine Aufreinigung der Vesikel. Ihr Anteil an allen gemessenen Events ist in der finalen Probe auf 54,2 % gestiegen. Diese Ergebnisse bestätigen die Gültigkeit des Zentrifugationsschemas zur Isolation der Großen EV.

3.1.2 Die Kontrolle der Vesikelfärbung

Zum Nachweis der erfolgreichen Färbung der Vesikel dienten neben gefärbten und ungefärbten Vesikelproben auch Proben, die keine Vesikel enthielten. Der Vergleich dieser Proben erlaubte die Unterscheidung zwischen Vesikeln und Debris bzw. Electronic Noise. Zusätzlich zu den Plasmaproben wurden zwei weitere FACS-Röhrchen angesetzt. Das erste wurde mit 100 µl PBS gefüllt und anschließend analog zu den Plasmaproben gefärbt. Das zweite FACS-Röhrchen wurde mit 500 µl PBS gefüllt und nicht gefärbt.

Die Abbildung 4 zeigt das Ergebnis der Analyse des ungefärbten PBS, des gefärbten PBS und der ungefärbten Plasmaprobe. Das unbehandelte PBS enthält wenige Events, die zudem klein und wenig granular erscheinen. Hierbei handelt es sich entweder um Debris, also minimale Verunreinigungen, oder um sogenannten Electronic Noise. Dieser entsteht bei der Einstellung hoher Voltages, wie sie für die Detektion der EV notwendig sind. Die Färbung des PBS führt lediglich zu einer leichten Zunahme der gemessenen Events. In der Auftragung FITC gegen SSC sind nahezu keine positiven Events erkennbar. Demgegenüber ergibt die Analyse der Plasmaprobe eine um das Vielfache höhere Eventzahl. Darüber hinaus lässt das Diagramm eine zusätzliche Population erkennen. Sie entspricht den zu messenden EV. Diese Befunde ermöglichen die Identifizierung der EV im Diagramm. Sie schließen aus, dass die Färbung der Proben zu falsch hohen Vesikelzahlen führt.

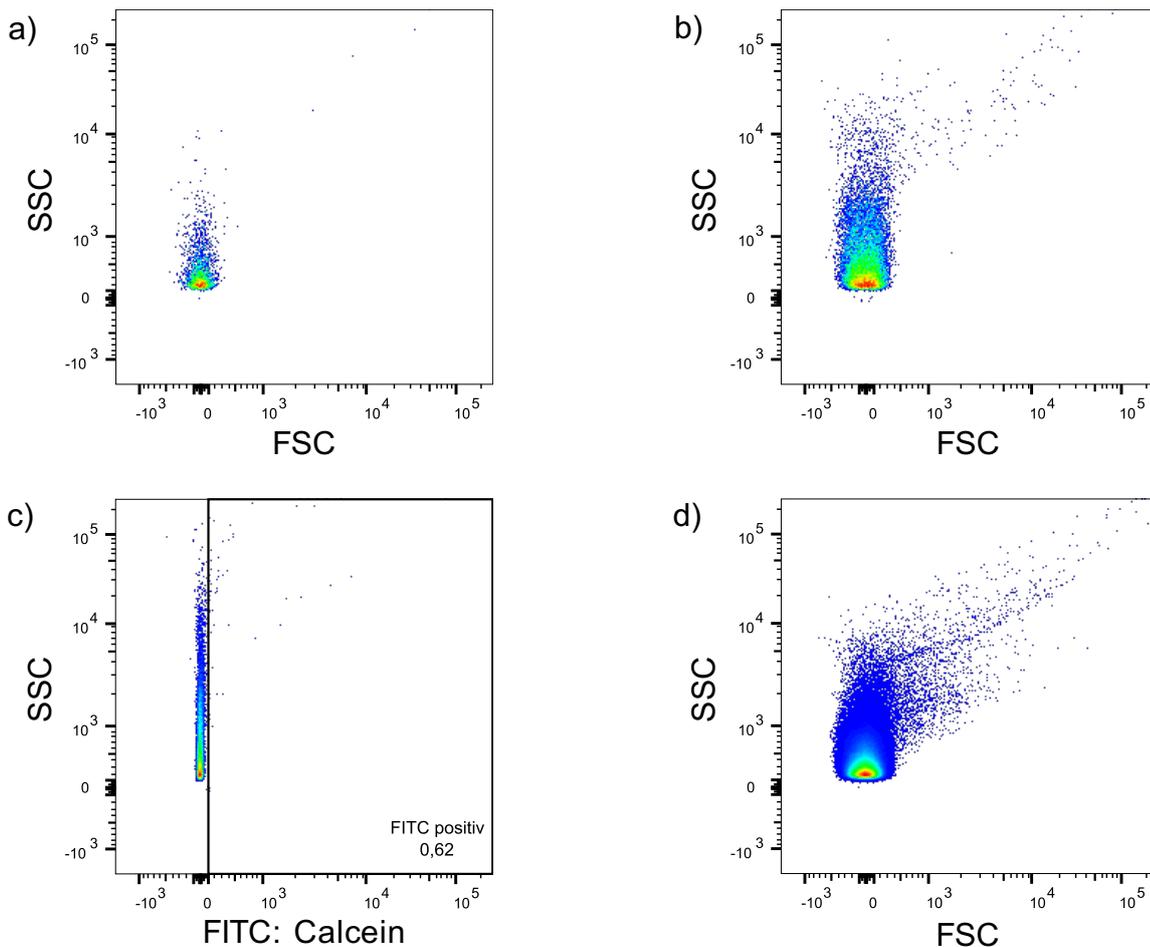


Abb. 4: Die Positiv- und Negativkontrollen

Vergleich vesikelfreier und vesikelreicher Proben. a) Der erste Dot-Plot zeigt das Ergebnis der Analyse von unbehandeltem PBS in der Auftragung FSC vs. SSC. Das PBS wurde durch Calcein AM gefärbt, analysiert und anschließend in den Kanälen b) FSC und SSC bzw. c) FITC und SSC abgebildet. d) Der vierte Dot-Plot enthält die Events aus der Analyse einer unbehandelten Vesikelprobe nach dem FSC und dem SSC. Die Angabe in c) entspricht dem prozentualen Anteil der Calcein+ Events. Vergleiche hierzu Exp20190328.

3.1.2.1 Kontrolle der Färbung durch das Calcein AM

Die spezifische Färbung intakter EV durch Calcein AM konnte durch die Zugabe eines Detergens beurteilt werden. Die Abbildung 5 zeigt das Ergebnis der Analyse von zwei Plasmaproben in einem Histogramm. Dargestellt ist der FITC-Kanal. Die erste Probe wurde im Anschluss an die Vesikelisolation durch Calcein AM gefärbt. Der zugehörige rote Graph zeigt eine positive und eine negative Population. Die zweite Probe entspricht ebenfalls einer gefärbten Probe. Diese wurde jedoch abschließend mit $0,5 \mu\text{l}$ Triton X-100 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) versetzt. Hierbei handelt es sich um ein Tensid, das Zellmembranen lysiert ohne Proteine zu denaturieren. Der zugehörige schwarze Graph zeigt

keine Calcein-positive Population. In umgekehrter Art und Weise zum Prinzip der Färbung führt das Lysieren der Vesikel zu einer Freisetzung des Calceins. Dieses kann nun nicht mehr vom Durchflusszytometer erfasst werden. Das Fehlen Calcein-positiver Events nach der Zugabe eines Detergens bestätigt, dass Calcein AM ausschließlich intakte Vesikel färbt.

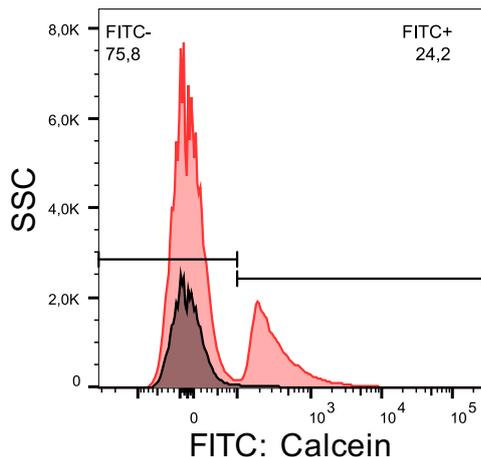


Abb. 5: Die Zugabe eines Detergens

Vergleich zweier Vesikelproben adaptiert an Zietzer et al., 2021. Die Auftragung erfolgt nach FITC und SSC. Der rote Graph zeigt die Events einer durch Calcein AM gefärbten Probe. Der schwarze Graph entspricht den Events einer Probe, die zusätzlich mit 0,5 µl Triton X-100 versetzt wurde. Die Größe der Gates ist in Prozenten angegeben. Vergleiche hierzu Exp20190808.

3.1.2.2 Vergleich von Annexin V und Calcein AM

Annexin V ist ein viel genutzter Marker in der Durchflusszytometrie. Es bindet an das Phospholipid Phosphatidylserin und kann mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelt werden. Zwei Versuchsansätze ermöglichten es, das Calcein AM und Annexin V in ihren Färbereigenschaften miteinander zu vergleichen.

Die Abbildung 6 stellt eine durch 5 µl Annexin V gefärbte Probe und eine durch Calcein AM gefärbte Probe einander gegenüber. Die Diagramme entsprechen Subsets des FITC+ Gates in der Auftragung PE gegen APC. Somit werden ausschließlich Events gezeigt, die positiv für den Vesikelmarker erscheinen. Im Falle der Färbung durch Annexin V umfasste das Subset 17103 Events. Für Calcein AM lag die Zahl mit 12776 Events deutlich darunter. Der Großteil der Vesikel ist positiv für die Marker CD31 und CD41 und entspricht

thrombozytären EV. Mithilfe eines ellipsoiden Gates lässt sich der Unterschied zwischen den Färbungen quantifizieren. Für die durch Annexin V gefärbte Probe lag der Anteil der thrombozytären Großen EV an allen EV bei 17,4 %. Für die durch Calcein AM gefärbte Probe betrug dieser 50,5 %. Mit dem Wissen um die verschiedenen Färbemechanismen des Annexin V und des Calcein AM legen diese Ergebnisse die Schlussfolgerung nahe, dass Calcein AM weniger Zellfragmente markiert und so zu einer besseren Auftrennung der Populationen führt.

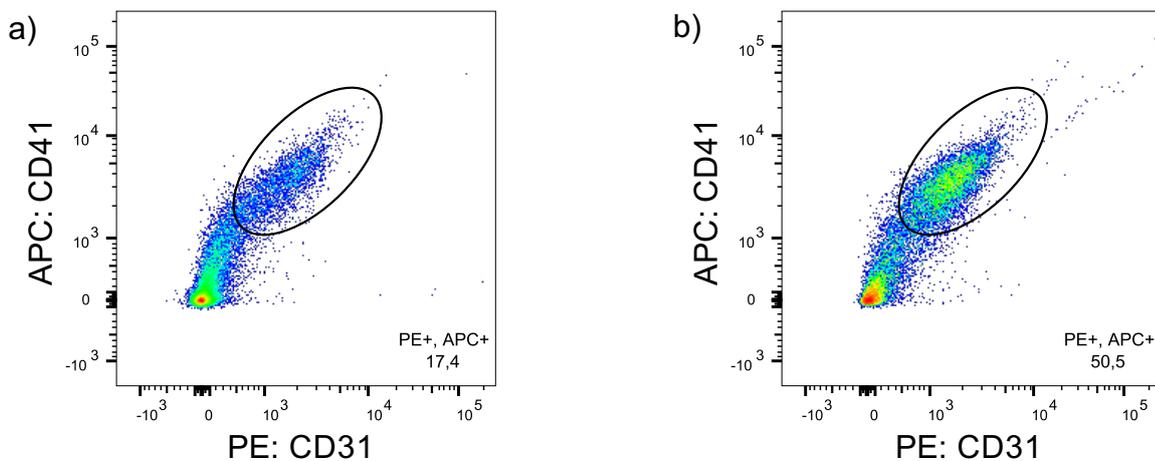


Abb. 6: Die Färbung durch Annexin V und Calcein AM

Gegenüberstellung der Färbung durch Annexin V und Calcein AM. Die Vesikelproben wurden durch die Antikörper Anti-CD31, Anti-CD41 und Anti-CD235a sowie a) Annexin V bzw. b) Calcein AM gefärbt. Dargestellt ist jeweils das Subset der Calcein+ EV in der Auftragung PE vs. APC. Die Anzahl der Annexin V+ EV beträgt 17103. Die Anzahl der Calcein+ EV beträgt 12776. Ein ellipsoides Gate umschließt die Population der doppelt positiven Events und nennt deren prozentualen Anteil an allen Vesikeln. Vergleiche hierzu Exp20180816 und Exp20180817a.

3.1.2.3 Kontrolle der Färbung durch die Antikörper

Zum Zeitpunkt der ersten Experimente umfasste die Vesikelfärbung zusätzlich zu den Markern des finalen Protokolls weitere Antikörper. Mit ihrer Hilfe sollten neue Erkenntnisse zu den Vesikeln von Thrombozyten, Endothelzellen, Monozyten und Granulozyten sowie dem Aktivierungsgrad der Zellen gewonnen werden. Der folgende Abschnitt handelt von den Antikörpern, die im finalen Protokoll fehlen. Die Überprüfung der Färbungen umfasste Negativkontrollen, das Detergens Triton X-100 und sogenannte FMO's (siehe unten).

Die Tabelle 6 gibt eine Übersicht aller Marker, die in der Studie Verwendung fanden. Sie wurden auf zwei Färbepanel aufgeteilt. Der Antikörper Anti-CD45 fungierte als Leukozytenmarker. Die Antikörper Anti-CD14 und Anti-CD16 dienten der Färbung von Monozyten und Dendritischen Zellen bzw. Natürlichen Killerzellen und Neutrophilen Granulozyten. Ein weiteres Ziel der Studie bestand in der Bestimmung der Tissue Factor-tragenden EV. In den Experimenten kamen zwei Antikörper Anti-CD142 zum Einsatz. Da beide Antikörper gegen den Klon HTF-1 gerichtet waren, unterschieden sie sich hauptsächlich in dem gebundenen Fluoreszenzfarbstoff.

Tab. 6: Die zwei Färbepanel

Panel 1	Fluorochrom	Zielstruktur	Expression insbesondere durch
Anti-CD142	BV421	Tissue factor (GF III)	Stim. Endothelzellen, Monozyten
Anti-CD142	VioBlue®	Tissue factor (GF III)	Stim. Endothelzellen, Monozyten
Anti-CD62E	BV510	LECAM-1	Stimulierte Endothelzellen
Calcein AM	Eigenfluoreszenz	Zellinnere	Intakte Vesikel
Anti-CD31	PE	PECAM-1 (GpIIa)	Endothelzellen, Thrombozyten
Anti-CD62P	PerCP-eFluor710	P-Selektin (GMP-140)	Stim. Thrombozyten, Endothelzellen
Anti-CD235a	PE-Vio770	Glycophorin A	Erythrozyten, inkl. Vorläuferzellen
Anti-CD41	APC	GpIIb	Thrombozyten, Megakaryozyten
Anti-CD42b	APC-Vio770	CD42b	Thrombozyten, Megakaryozyten
Panel 2			
Calcein AM	Eigenfluoreszenz	Zellinnere	Intakte Vesikel
Anti-CD14	PE	CD14	Monozyten, Dendritische Zellen
Anti-CD16	APC	IgG-Fc-Rezeptor III	NK-Zellen, Neutrophile
Anti-CD45	APC-eFluor® 780	Leukocyte common antigen	Leukozyten

Für die sechs Marker des finalen Protokolls erlaubten die oben beschriebenen Ergebnisse eine eindeutige und reproduzierbare Abgrenzung positiver und negativer Vesikel. Für die übrigen Antikörper war diese Unterscheidung nicht sicher möglich.

In Abbildung 7 ist beispielhaft das Ergebnis der Vesikelfärbung nach dem Tissue Factor dargestellt. Die Analyse einer ungefärbten Probe ergab ein Diagramm, das eine schmale und für den Tissue Factor negative Population enthält. Die wenigen positiven Events sind gleichmäßig auf der x-Achse verteilt. Die Zugabe eines Antikörpers Anti-CD142 führte

zum Auftreten einer umschriebenen positiven Population. Da in diesen Abbildungen zu Vergleichszwecken jedoch auf ein vorausgehendes Gate für Calcein-positive Events verzichtet wurde, mussten die Populationen nachträglich untersucht werden. Hier zeigte sich, dass die fraglich positiven Events nicht durch Calcein AM anfärbbar waren. Demnach handelt es sich bei den Events nicht um Vesikel, sondern um Debris und Electronic Noise. Dies wird auch dadurch gestützt, dass die Zugabe des Antikörpers Anti-CD142-BV421 zu einer breiten Streuung der negativen Population führt.

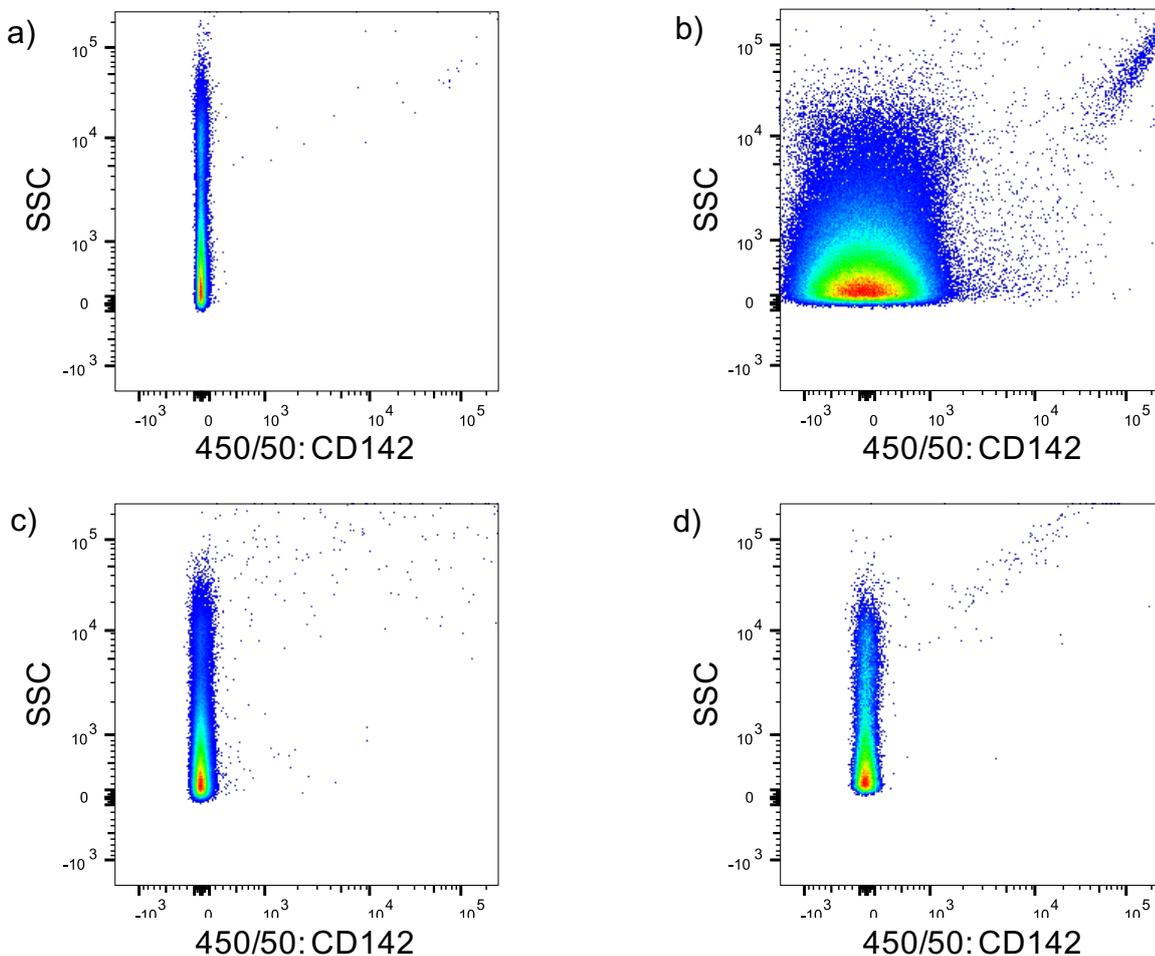


Abb. 7: Die Färbung nach dem Tissue Factor

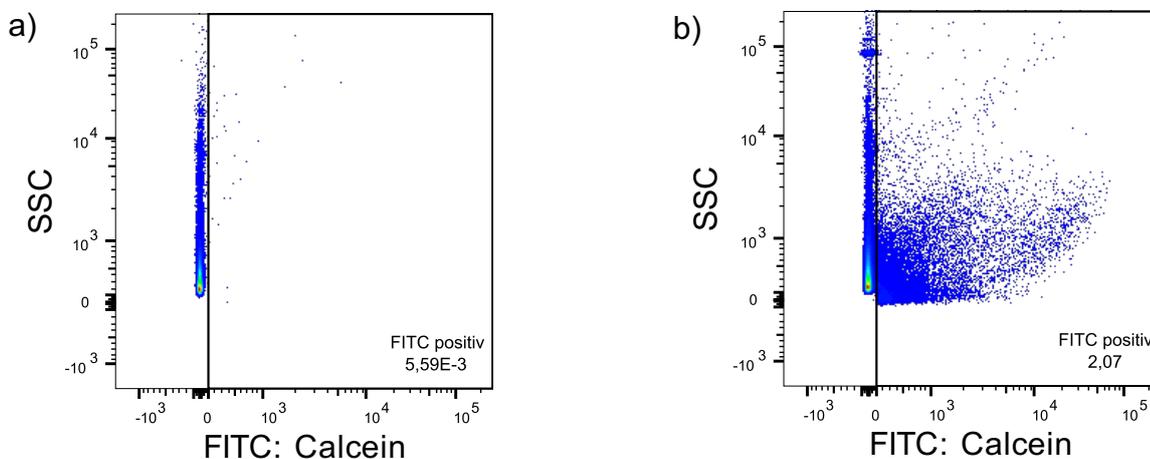
Einsatz zweier Antikörper zur Färbung des Tissue Factors. In einem ersten Versuchsteil wurde eine a) unbehandelte Vesikelprobe mit einer b) durch den Antikörper Anti-CD142-BV421 gefärbten Vesikelprobe verglichen. In einem zweiten Versuchsteil wurde eine unbehandelte Vesikelprobe mit einer durch den Antikörper Anti-CD142-VioBlue gefärbten Vesikelprobe verglichen. Die Dot-Plots zeigen jeweils alle gemessenen Events in der Auftragung 450/50 vs. SSC. Vergleiche hierzu Exp20180927a und Exp20180927b.

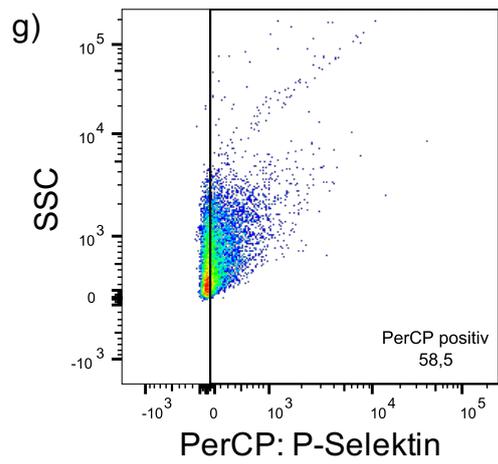
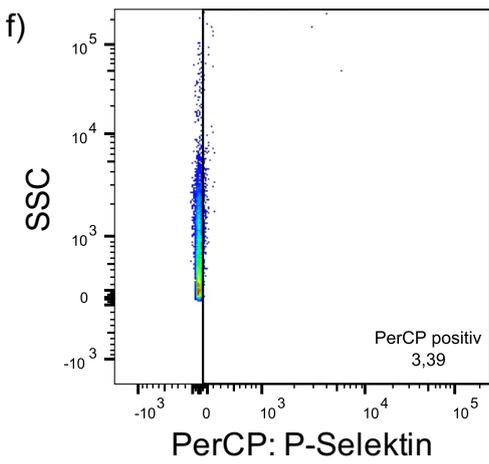
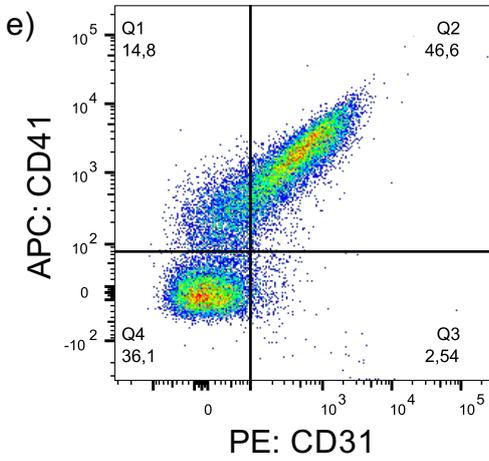
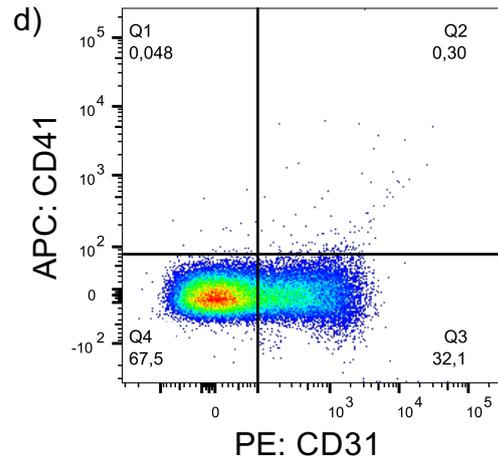
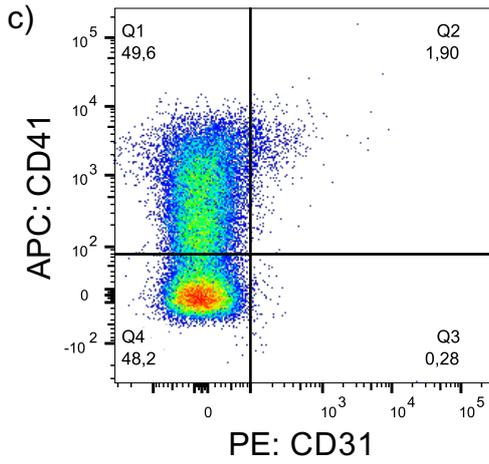
Der erfolgreiche Einsatz von Antikörpern in der Durchflusszytometrie erfordert zum Einen deren spezifische Bindung an ein Antigen. Zum Anderen muss der gekoppelte Farbstoff ein starkes Fluoreszenzsignal erzeugen. Für die im Vergleich zu Zellen sehr kleinen EV ist die Durchflusszytometrie im besonderen Maße von der Expression des Antigens abhängig. Während der Etablierung des Protokolls wurden die Kontrolllexperimente unter Verwendung verschiedener Antikörperkonzentrationen und Geräteeinstellungen vielfach wiederholt. Die Färbung des Tissue Factors erfolgte gar durch zwei verschiedene Antikörper. Dennoch war in den Kontrolllexperimenten zu den Markern CD14, CD16, CD45, CD62E und CD142 eine sichere Unterscheidung zwischen positiven und negativen Vesikelpopulationen nicht möglich. Aus diesem Grund wurden die zugehörigen Antikörper aus dem finalen Protokoll entfernt.

3.1.3 Kontrolle des Gatings

Die zuverlässige Abgrenzung von Vesikelpopulationen wurde mithilfe der sogenannten Fluorescence Minus One (FMO) überprüft. Dabei handelt es sich um Proben, die durch alle Marker eines Protokolls gefärbt werden bis auf einen. Aus dem Vergleich der FMO mit einem Full Staining kann eine Grenze zwischen Population gesetzt werden, die positiv bzw. negativ für einen Marker erscheinen.

Die Abbildung 8 zeigt das Full Staining und die FMO jeweils in der passenden Auftragung. Es ist ersichtlich, dass erst die Zugabe eines Markers zum Auftreten einer positiven Population führt. Diese kann durch ein Gate eingefasst werden.





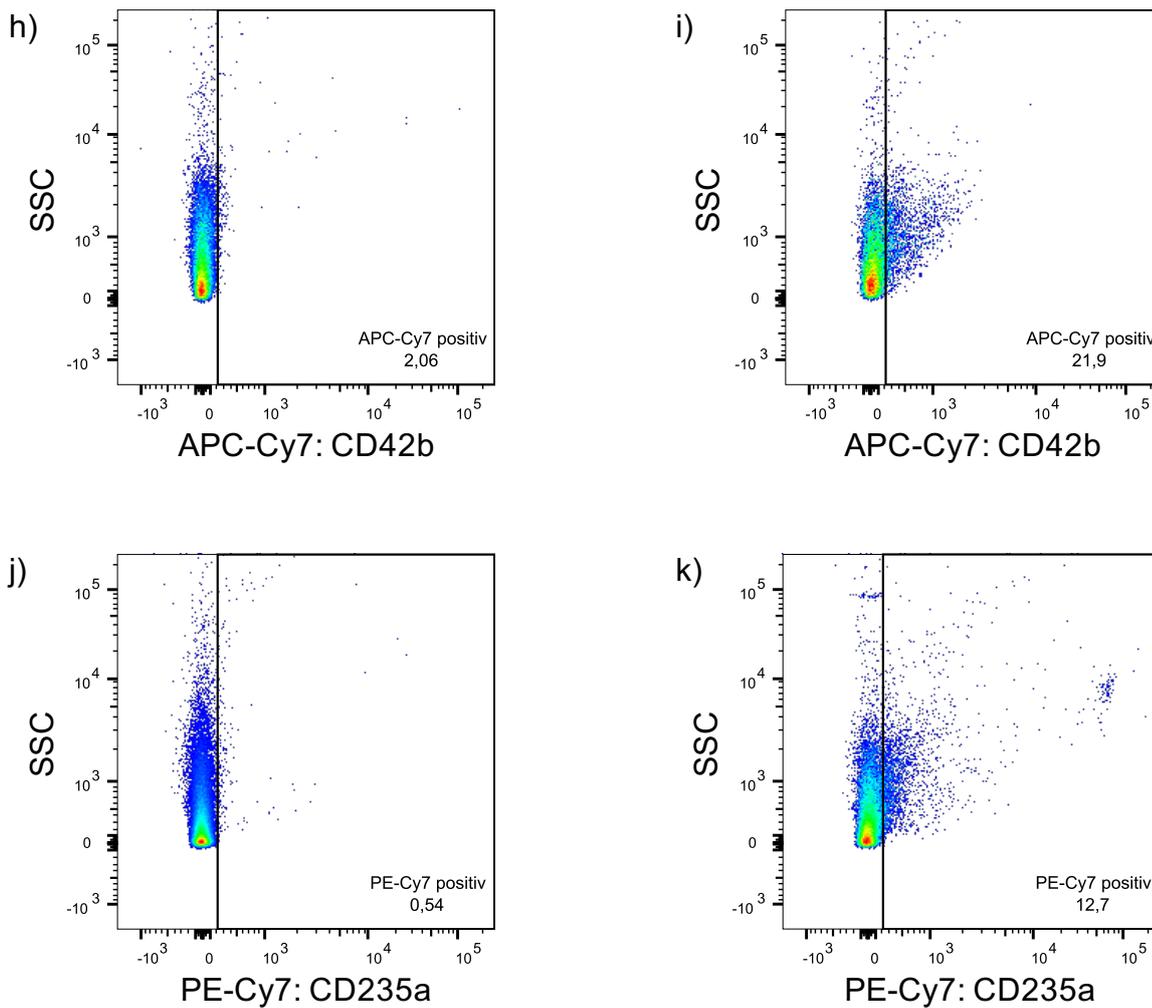


Abb. 8: Die Fluorescence Minus One

Vergleich der Fluorescence Minus One mit einem Full Staining entlehnt aus Zietzer et al., 2021 mit Genehmigung des Journals. Die Dot-Plots zeigen die FMO für a) Calcein AM, c) CD31, d) CD41, f) P-Selektin, h) CD42b und j) CD235a sowie das Full Staining in der entsprechenden Auftragung (b, e, g, i, k). Nach der Gatingstrategie handelt es sich bei den Abbildungen zu CD31, CD41 und CD235a um Subsets der Calcein+ Events. Die Abbildungen zu P-Selektin und CD42b stellen Subsets des zweiten Quadranten aus e) dar. Zu jedem Gate ist der prozentuale Anteil angegeben. Vergleiche hierzu Exp20190328.

3.1.4 Größenbestimmung der Vesikel

Große Extrazelluläre Vesikel entstehen durch eine Abschnürung an der Zellmembran. Die Größe der EV besteht als grober Richtwert für die Analyse fort. Sie kann durch die Zugabe von Referenz-Beads zu den Vesikelproben geschätzt werden. Die ersten Studien zu EV verwendeten Beads aus Polystyrol (Mullier et al., 2011). Aktuell wird die Verwendung von Silica Beads empfohlen, die einen zu den Vesikeln ähnlichen Brechungsindex besitzen.

Die Silica Beads wurden in den Größen 0,299 μm und 1,046 μm angesetzt. Hierzu wurden drei FACS-Röhrchen bereitgestellt und mit 2 ml PBS gefüllt. Nach kräftigem Vortexen wurden jeweils 0,5 μl der Silica Beads zu dem ersten bzw. zweiten Ansatz hinzugegeben. Im Anschluss an ein gründliches Vortexen wurden wiederum jeweils 0,5 μl der Lösungen in den dritten Ansatz überführt. Die Verdünnung der Silica Beads betrug 1:16.000.000.

Die Abbildung 9 zeigt drei Dot-Plots in einem Overlay. Die Achsen sind nach dem FSC und dem SSC beschriftet. In Schwarz erscheinen alle Events einer durch Calcein AM gefärbten Probe. Rot markiert sind die Calcein-positiven Events dieser Probe. Die grünen Events entsprechen den Silica Beads. Es wird deutlich, dass viele Vesikel zwischen 1,046 μm und 0,299 μm messen. Der Großteil der EV ist sogar kleiner als 0,299 μm . Die umschriebene Population am oberen Rand des Diagramms entspricht den AccuCount Blank Particles 2.0 μm , die im finalen Protokoll als Counting Beads dienen. Aus diesen Ergebnissen folgt, dass ein Gate mit einer unteren Grenze von 200 im SSC geeignet ist, insbesondere die Anzahl der Großen EV zu bestimmen.

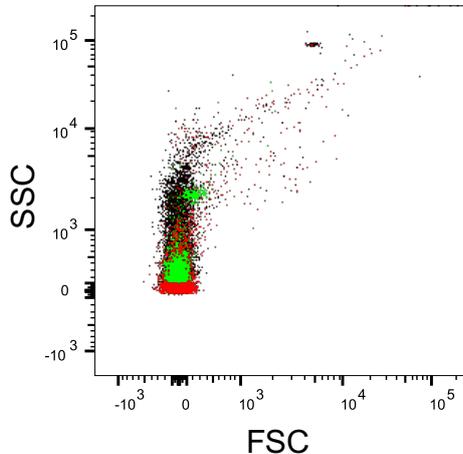


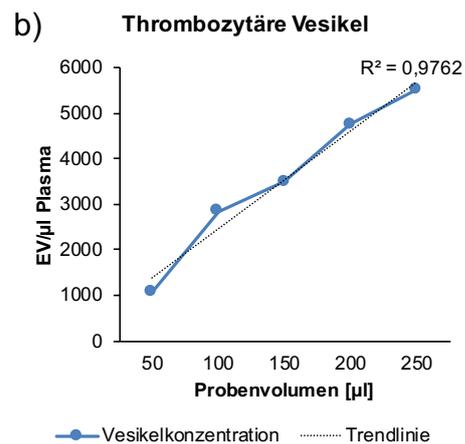
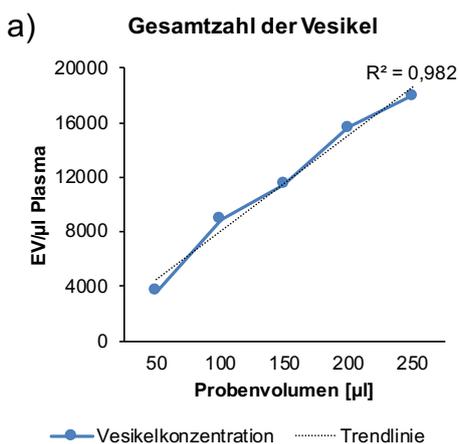
Abb. 9: Die Silica Beads

Vergleich der Vesikel mit Beads einer definierten Größe adaptiert an Zietzer et al., 2021. Die Abbildung stellt ein Overlay von drei Dot-Plots in der Auftragung FSC vs. SSC dar. Eine Vesikelprobe wurde durch Calcein AM gefärbt. Silica Beads der Größen 0,299 μm und 1,046 μm wurden mit PBS 16.000.000x verdünnt. Die Events der Vesikelprobe erscheinen in schwarz. Die Calcein+ Vesikel wurden nachträglich rot gefärbt. Die grünen Events entsprechen den Silica Beads. Vergleiche hierzu Exp20190321.

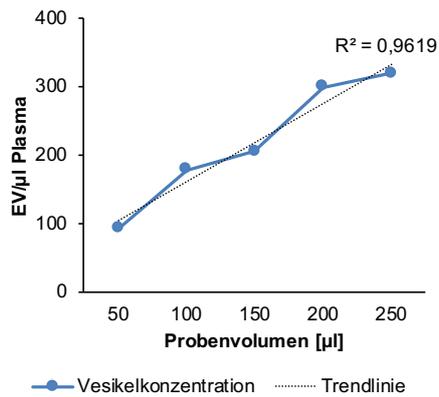
3.1.5 Ausschluss eines Swarming

Die Durchflusszytometrie von sehr kleinen Partikeln ist anfällig gegenüber einem Effekt, der Swarming genannt wird. Er beschreibt, dass mehrere kleine Partikel gleichzeitig die Zählkammer eines Durchflusszytometers durchlaufen und als ein Event gewertet werden. Der Effekt nimmt mit steigender Konzentration der Partikel zu. Das Ergebnis ist eine fehlerhafte Eventzahl, wobei die tatsächliche Eventzahl unterschätzt wird. Zum Ausschluss des Swarming werden Verdünnungsreihen eingesetzt (van der Pol et al., 2012).

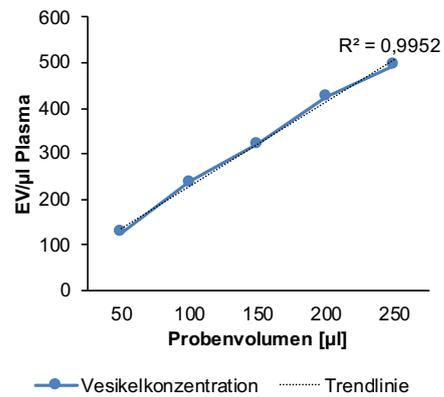
Die Abb. 10 zeigt jeweils ein Diagramm für die Gesamtzahl der Vesikel sowie für die thrombozytären, endothelialen, erythrozytären, CD62P-positiven und CD42b-positiven EV. Das Ausgangsmaterial bildeten 50, 100, 150, 200 und 250 μl thrombozytenfreies Plasma. Zu jedem Probenvolumen ist die gemessene Vesikelzahl angegeben. Die verschiedenen Färbungen zeigen ein ähnliches Bild. Sowohl für die Gesamtzahl der Vesikel als auch für die einzelnen Vesikelarten lässt sich ein linearer Zusammenhang zwischen dem Ausgangsvolumen und der Vesikelzahl beschreiben. Eine Trendlinie mitsamt Bestimmtheitsmaß verdeutlicht dies. Demnach führt eine steigende Vesikelkonzentration in dem untersuchten Bereich nicht zu verfälschten Eventzahlen. Dieser Befund schließt ein Swarming aus.



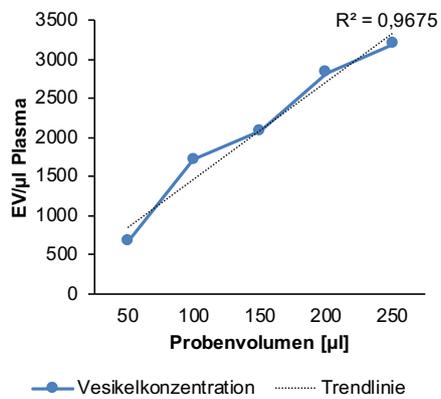
c) Endotheliale Vesikel



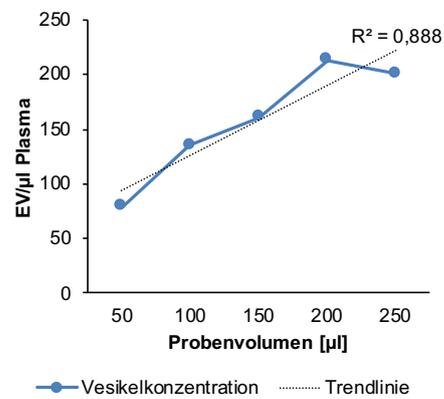
d) Erythrozytäre Vesikel



e) CD62P+ Vesikel



f) CD42b+ Vesikel

**Abb. 10:** Die Verdünnungsreihe

Betrachtung der Vesikelkonzentration bei steigendem Ausgangsvolumen. Die Diagramme zeigen die Plasmakonzentration aller Vesikel sowie der thrombozytären, endothelialen, erythrozytären, CD62P+ und CD42b+ EV, die nach der Zentrifugation von 50 µl, 100 µl, 150 µl, 200 µl und 250 µl Plasma bestimmt wurden. Eine lineare Trendlinie und deren Bestimmtheitsmaß sind dargestellt. Vergleiche hierzu Exp20181130.

3.1.6 Weitere Versuchsangaben

Exp20180816	
Probenvolumen (µl)	200
Marker	Annexin V, Anti-CD31, Anti-CD235a, Anti-CD41
Antikörpermenge	Jeweils 1 µl
Reagenzien	5 µl Annexin V-FITC
Voltages	FSC 581 SSC 428 FITC 464 PE 510 PE-Cy7 580 APC 533
Threshold	FSC = 200 "AND" SSC = 200
Aufnahmezeit (s)	60
Exp20180817a	
Probenvolumen (µl)	200
Marker	Calcein AM, Anti-CD31, Anti-CD235a, Anti-CD41
Antikörpermenge	Jeweils 1 µl
Reagenzien	Calcein (10 µM)
Voltages	FSC 583 SSC 430 FITC 465 PE 511 PE-Cy7 582 APC 533
Threshold	FSC = 200 "AND" SSC = 200
Aufnahmezeit (s)	60
Exp20180830	
Probenvolumen (µl)	200
Marker	Calcein AM, Anti-CD31, Anti-CD235a, Anti-CD41, Anti-CD42b, Anti-CD142
Antikörpermenge	Jeweils 1 µl
Reagenzien	Calcein (10 µM)
Voltages	FSC 500 SSC 450 FITC 450 PE 509 PE-Cy7 400 APC 534 APC-Cy7 600 450/50 500
Threshold	FSC = 200 "AND" SSC = 200
Aufnahmezeit (s)	60

Exp20180920

Probenvolumen (µl)	200
Marker	Calcein AM, Anti-CD14, Anti-CD16, Anti-CD45
Antikörpermenge	Jeweils 1 µl
Reagenzien	Calcein (10 µM)
Voltages	FSC 500 SSC 500 FITC 450 PE 500 APC 600 APC-Cy7 600
Threshold	FSC = 200 "AND" SSC = 200
Aufnahmezeit (s)	60

Exp20180927a

Probenvolumen (µl)	200
Marker	Calcein AM, Anti-CD142-BV421
Antikörpermenge	Jeweils 1 µl
Reagenzien	Calcein (2 µM)
Voltages	FSC 500 SSC 500 FITC 350 450/50 400
Threshold	FSC = 200 "AND" SSC = 200
Aufnahmezeit (s)	60

Exp20180927b

Probenvolumen (µl)	200
Marker	Calcein AM, Anti-CD142-VioBlue
Antikörpermenge	Jeweils 1 µl
Reagenzien	Calcein (2 µM)
Voltages	FSC 500 SSC 500 FITC 350 450/50 450
Threshold	FSC = 200 "AND" SSC = 200
Aufnahmezeit (s)	60

Exp20181130

Probenvolumen (µl)	50, 100, 150, 200 bzw. 250 µl
Marker	Calcein AM, Anti-CD31, Anti-CD62P, Anti-CD235a, Anti-CD41, Anti-CD42b
Antikörpermenge	Jeweils 1 µl
Reagenzien	Calcein (10 µM) 50 µl AccuCount Blank Particles
Voltages	FSC 450 SSC 450 FITC 450 PE 500 PerCP 500 PE-Cy7 500 APC 500 APC-Cy7 500
Threshold	SSC = 200 "OR" FITC = 200
Aufnahmezeit (s)	120

Exp20190321

Probenvolumen (µl)	150
Marker	Calcein AM, Anti-CD31, Anti-CD62P, Anti-CD235a, Anti-CD41, Anti-CD42b
Antikörpermenge	Jeweils 1 µl
Reagenzien	Calcein (10 µM) Full staining: 50 µl AccuCount Blank Particles
Voltages	FSC 450 SSC 450 FITC 450 PE 500 PerCP 500 PE-Cy7 500 APC 500 APC-Cy7 500
Threshold	SSC = 200 "OR" FITC = 200
Aufnahmezeit (s)	120

Exp20190328

Probenvolumen (µl)	150
Marker	Calcein AM, Anti-CD31, Anti-CD62P, Anti-CD235a, Anti-CD41, Anti-CD42b
Antikörpermenge	Jeweils 1 µl
Reagenzien	Calcein (10 µM) Full staining: 50 µl AccuCount Blank Particles
Voltages	FSC 450 SSC 450 FITC 450 PE 500 PerCP 500 PE-Cy7 500 APC 500 APC-Cy7 500
Threshold	SSC = 200 "OR" FITC = 200
Aufnahmezeit (s)	120

Exp20190808

Probenvolumen (µl)	150
Marker	Calcein AM, Anti-CD31, Anti-CD62P, Anti-CD235a, Anti-CD41, Anti-CD42b
Antikörpermenge	Jeweils 1 µl
Reagenzien	Calcein (10 µM) Full staining: 50 µl AccuCount Blank Particles
Voltages	FSC 450 SSC 450 FITC 450 PE 500 PerCP 500 PE-Cy7 500 APC 500 APC-Cy7 500
Threshold	SSC = 200 "OR" FITC = 200
Aufnahmezeit (s)	120

3.2 Analyse der Patientenproben

Der vorherige Abschnitt demonstrierte die Gültigkeit des Studienprotokolls für die Bestimmung der Großen EV in Plasmaproben. Im Folgenden werden die Ergebnisse aus der abschließenden Analyse der Patientenproben vorgestellt.

3.2.1 Baselinecharakteristika

Insgesamt nahmen 62 Patienten an der Studie teil. Von diesen wurden 59 Patienten in die Vesikelanalyse eingeschlossen. Im Falle von einem Patienten scheiterte die Proben-sammlung im Herzkatheterlabor. Daher umfasst die finale Kohorte 58 Patienten.

Die Tabelle 7 präsentiert die Baselinecharakteristika der 58 Patienten. Diese wurden nach der Art des Vorhofflimmerns in drei Gruppen eingeteilt (s. unten). Etwa 17 % der Patienten hatten in der Vorgeschichte nie ein Vorhofflimmern entwickelt, 36 % der Patienten besaßen ein nicht-permanentes VHF und 47 % der Patienten litten an einem permanenten VHF. Das mittlere Alter der Patienten betrug $78,8 \pm 7,1$ Jahre ($p=0,80$). Das Geschlechterverhältnis zwischen den Gruppen war ausgeglichen ($p=0,78$).

Die Auswertung der kardiovaskulären Risikofaktoren ergab, dass die Patienten ohne VHF häufiger einen Diabetes mellitus besaßen als die Patienten mit einem nicht-permanenten VHF (50 % vs. 4,8 %, $p=0,01$).

Aus den Laborergebnissen ist ersichtlich, dass die Patienten ohne VHF im Vergleich zu den Patienten mit einem nicht-permanenten bzw. permanenten VHF einen deutlich erhöhten Spiegel des NT-proBNP (14668 ng/l vs. 3653 ng/l, $p=0,02$; 14668 ng/l vs. 4028 ng/l, $p=0,01$) aufwiesen. Dagegen zeigten die Patienten mit einem permanenten VHF im Vergleich zu den Patienten ohne VHF bzw. mit einem nicht-permanenten VHF signifikant reduzierte Quick-Werte (61 % vs. 85,4 %, $p=0,03$; 61 % vs. 80 %, $p=0,04$). Ferner bestanden Unterschiede in der Plasmakonzentration der Gerinnungsfaktoren II, V, VII und X. Die Betrachtung der Vorerkrankungen lässt erkennen, dass die Patienten ohne Vorhofflimmern häufiger eine 3-Gefäß-KHK besaßen als die Patienten mit einem nicht-permanenten VHF bzw. permanenten VHF (60 % vs. 9,5 %, $p=0,01$; 60 % vs. 14,8 %, $p=0,01$). Ebenso litten sie häufiger an einer pAVK (50 % vs. 9,5 %, $p=0,02$) und einer cAVK (50 % vs. 4,8 %, $p=0,01$). Entsprechend waren die Patienten ohne VHF im Vorfeld häufiger durch eine perkutane Koronarintervention (PCI) behandelt worden als die Patienten mit einem permanenten VHF (70 % vs. 25,9 %, $p=0,02$).

Die Medikation bestand bei Patienten ohne VHF vermehrt aus Aspirin (70 % vs. 9,5 %, $p=0,001$; 70 % vs. 22,2 %, $p=0,02$), während die Einnahme eines direkten oralen Antikoagulans im Vergleich zu den Patienten mit einem nicht-permanenten VHF seltener erfolgte (20 % vs. 76,2 %, $p=0,01$).

Es fanden sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der Ejektionsfraktion ($p=0,76$), der Größe des LA ($p=0,20$) oder dem Vorliegen einer höhergradigen Mitralklappeninsuffizienz ($p=0,47$).

Tab. 7: Die Baselinecharakteristika in Abhängigkeit des Vorhofflimmerns

Alter und Geschlecht	Alle Pat., n = 58	Kein VHF, n = 10 (17 %)	Nicht-perm. VHF, n = 21	Perm. VHF, n = 27 (47 %)	p-Wert
Alter [Jahre]	78,8 ± 7,1	77,4 ± 6,4	78,9 ± 6,0	79,2 ± 8,3	0,80
Weibliches Geschlecht [n, %]	27 (47)	4 (40)	11 (52,4)	12 (44,4)	0,78
Aktuelle Intervention [n, %]					
MitraClip®	52 (89,7)	9 (90)	18 (85,7)	25 (92,6)	0,74
LAA-Okkluder	5 (8,6)	0 (0)	3 (14,3)	2 (7,2)	0,40
MK-Valvuloplastie	1 (1,7)	1 (10)	0 (0)	0 (0)	0,09
Risikofaktoren					
BMI [kg/m ²]	26,2 ± 4,9	24 ± 3,9	25,7 ± 5	27,4 ± 4,9	0,14
Art. Hypertonie [n, %]	56 (96,6)	10 (100)	20 (95,2)	26 (96,3)	n.s.
Diabetes mellitus [n, %]	14 (24,1)	5 (50)	1 (4,8)	8 (29,6)	0,02
	Kein VHF vs. Nicht-perm. VHF p=0,01; Fisher's exact test				
Dyslipidämie [n, %]	52 (89,7)	8 (80)	20 (95,2)	24 (88,9)	n.s.
Familiäres Risiko [n, %]	6 (10,3)	0 (0)	4 (19)	2 (7,4)	n.s.
Nikotinabusus [n, %]	12 (20,7)	2 (20)	3 (14,3)	7 (25,9)	n.s.

Laboregebnisse

Cholesterin ges. [mg/dl]	154,9 ± 45,8	158,6 ± 49,3	158,5 ± 39,3	150,8 ± 50,4	0,83
HDL-Cholesterin [mg/dl]	50 ± 13,7	50,6 ± 14,3	53,1 ± 11,2	47,3 ± 15,1	0,34
LDL-Cholesterin [mg/dl]	94 ± 38,7	94,5 ± 36,8	88,9 ± 32,1	97,8 ± 44,5	0,74
Triglyceride [mg/dl]	99,0 ± 52,8	96,7 ± 61,8	110,8 ± 55,3	90,9 ± 47,8	0,47
Lipoprotein a [nmol/l]	61,6 ± 104,8	89,2 ± 66,9	79,3 ± 159,4	35,4 ± 50,9	0,36
Kreatinin [mg/dl]	1,55 ± 1,04	1,87 ± 1,14	1,35 ± 0,58	1,59 ± 1,26	0,42
CRP [mg/dl]	15,91 ± 24,31	21,46 ± 31,09	16,77 ± 27,3	13,07 ± 19,20	0,65
NT-proBNP [ng/l]	6192 ± 9778	14668 ± 17842	3653 ± 3740	4028 ± 4480	0,0100
	Kein VHF vs. Nicht-perm. VHF: p=0,02; Tukey's test Kein VHF vs. Perm. VHF: p=0,01; Tukey's test				
Quick [%]	72,9 ± 26,6	85,4 ± 28,1	80 ± 24	61 ± 24,3	0,01
	Kein VHF vs. Perm. VHF: p=0,03; Tukey's test Nicht-perm. VHF vs. Perm. VHF: p=0,04; Tukey's test				
INR []	1,3 ± 0,4	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,3	1,5 ± 0,5	0,0544
aPTT [s]	29,2 ± 5,3	27,4 ± 3,4	29,1 ± 6,3	30 ± 4,9	0,43
Leukozyten [10E9/l]	7,1 ± 2,3	6,7 ± 2,3	7,7 ± 2,7	6,9 ± 1,8	0,39
Erythrozyten [10E12/l]	3,7 ± 0,7	3,8 ± 0,8	3,7 ± 0,7	3,7 ± 0,5	0,79
Hämoglobin [g/dl]	11,1 ± 2,2	11 ± 2,3	11,3 ± 2,4	11,0 ± 2,1	0,89
Hämatokrit [%]	32,9 ± 5,6	32,3 ± 6,1	33 ± 6	33 ± 5,3	0,93
Thrombozyten [10E9/l]	208 ± 64,2	200 ± 65,2	218 ± 72,3	202,4 ± 57,2	0,67
Faktor II [%]	75,1 ± 25,8	84,1 ± 17,8	83,2 ± 26,4	63,8 ± 24,7	0,02
	Nicht-perm. VHF vs. Perm. VHF: p=0,03; Tukey's test				
Faktor V [%]	93,5 ± 24,4	109,3 ± 33,4	96,2 ± 22,8	84,1 ± 17	0,02
	Kein VHF vs. Perm. VHF: p=0,02; Tukey's test				
Faktor VII [%]	71,2 ± 31	84,4 ± 33,6	81,4 ± 29	56,2 ± 26	0,01
	Kein VHF vs. Perm. VHF: p=0,03; Tukey's test Nicht-perm. VHF vs. Perm. VHF: p=0,01; Tukey's test				
Faktor VIII [%]	202,2 ± 60,6	227,6 ± 62,6	203,8 ± 60,5	189,7 ± 58,7	0,26
Faktor X [%]	72 ± 31,2	78,9 ± 27,4	81,9 ± 29,8	59,9 ± 31,1	0,04
	Nicht-perm. VHF vs. Perm. VHF: p=0,05; Tukey's test				

Vorerkrankungen [n, %]

KHK					
1-Gefäß-KHK	11 (19,0)	0 (0,0)	6 (28,6)	5 (18,5)	n.s.
2-Gefäß-KHK	8 (13,8)	1 (10,0)	2 (9,5)	5 (18,5)	n.s.
3-Gefäß-KHK	12 (20,7)	6 (60,0)	2 (9,5)	4 (14,8)	
	Kein VHF vs. Nicht-perm. VHF: p=0,01; Fisher's exact test				
	Kein VHF vs. Perm. VHF: p=0,01; Fisher's exact test				
Vorherige PCI	22 (37,9)	7 (70,0)	8 (38,1)	7 (25,9)	0,05
	Kein VHF vs. Perm. VHF: p=0,02; Fisher's exact test				
Herzinfarkt	15 (25,9)	3 (30,0)	5 (23,8)	7 (25,9)	0,93
Bypass am Herzen	10 (17,2)	3 (30,0)	3 (14,3)	4 (14,8)	n.s.
pAVK	15 (25,9)	5 (50,0)	2 (9,5)	8 (29,6)	0,05
	Kein VHF vs. Nicht-perm. VHF: p=0,02; Fisher's exact test				
cAVK	14 (24,1)	5 (50,0)	1 (4,8)	8 (29,6)	0,02
	Kein VHF vs. Nicht-perm. VHF: p=0,01; Fisher's exact test				
Herzinsuffizienz NYHA III + IV	45 (77,9)	7 (70)	18 (85,7)	20 (74,5)	n.s.
Z.n. TAVI	6 (10,3)	0 (0,0)	1 (4,8)	5 (18,5)	n.s.
Z.n. MitraClip®	6 (10,3)	1 (10)	2 (9,5)	3 (11,1)	n.s.
ICD	10 (17,2)	2 (20,0)	5 (23,8)	3 (11,1)	n.s.
CHA2DS2-VASc-Score					
1-3 Punkte	4 (6,9)	-	4 (19)	0 (0)	0,03
4-6 Punkte	36 (62,1)	-	14 (66,7)	22 (81,5)	0,32
7-9 Punkte	8 (13,8)	-	3(14,3)	5 (18,5)	0,99
HAS-BLED-Score					
1-3 Punkte	37 (63,8)	-	18 (85,7)	19 (70,4)	0,30
4-6 Punkte	11 (19)	-	3 (14,3)	8 (29,6)	0,30
7-9 Punkte	0 (0)	-	0 (0)	0 (0)	
COPD	11 (19,0)	2 (20,0)	4 (19,0)	5 (18,5)	n.s.
Dialyse	4 (6,9)	1 (10,0)	1 (4,8)	2 (7,4)	n.s.

Medikamente [n, %]

Aspirin	15 (25,9)	7 (70,0)	2 (9,5)	6 (22,2)	0,001
	Kein VHF vs. Nicht-perm. VHF: p=0,001; Fisher's exact test Kein VHF vs. Perm. VHF: p=0,02; Fisher's exact test				
Clopidogrel	23 (39,7)	7 (70,0)	7 (33,3)	9 (33,3)	0,10
DOAK	32 (55,2)	2 (20,0)	16 (76,2)	14 (51,9)	0,01
	Kein VHF vs. Nicht-perm. VHF: p=0,01; Fisher's exact test				
Vitamin K-Antagonist	15 (25,9)	2 (20,0)	4 (19,0)	9 (33,3)	0,48
Betablocker	48 (82,8)	6 (60,0)	19 (90,5)	23 (85,2)	n.s.
Digitoxin	3 (5,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (11,1)	n.s.
Amiodaron	4 (6,9)	1 (10,0)	3 (14,3)	0 (0,0)	n.s.
Flecainid	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
ACE-Hemmer / AT1-BI.	45 (77,6)	8 (80,0)	16 (76,2)	21 (77,8)	n.s.
Calciumantagonist	7 (12,1)	2 (20,0)	1 (4,8)	4 (14,8)	n.s.
Diuretikum	57 (98,3)	10 (100,0)	21 (100,0)	26 (96,3)	n.s.
CSE-Hemmer	35 (60,3)	6 (60,0)	14 (66,7)	15 (55,6)	0,74

Echokardiographie

Ejektionsfraktion [%]	51,7 ± 14,5	49,7 ± 18,4	50,9 ± 14	53,4 ± 13,7	0,76
MK-Insuffizienz Grad III + IV [n, %]	41 (74,6)	8 (80)	16 (76,2)	17 (70,9)	0,47
MK-Stenose > Grad I [n, %]	4 (6,9)	1 (10)	1 (4,8)	2 (7,4)	n.s.
AK-Stenose > Grad I [n, %]	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Größe des LA [ml]	92,59 ± 45,28	70 ± 10,95	88 ± 37,59	107,1 ± 57,73	0,20

3.2.2 Behandlung im Herzkatheterlabor

Von den 58 Patienten wurden 52 Patienten (90 %) mit einem MitraClip® behandelt, wobei ein Patient gleichzeitig einen MitraClip® in Mitralklappenposition und einen MitraClip® in Trikuspidalklappenposition erhielt. Bei fünf Patienten (9 %) erfolgte ein Verschluss des linken Vorhofohres durch einen LAA-Okkluder und bei einem Patienten (2 %) erfolgte eine Mitralklappenvalvuloplastie. Unter allen Patienten waren sechs Patienten (10 %) durch einen oder mehrere MitraClips® vorbehandelt. Die aktuelle Implantation eines MitraClips® verlief in 88 % der Fälle erfolgreich.

3.2.3 Große EV und die drei Herzhöhlen

Die Auswertung der Vesikelzahlen beginnt mit der Betrachtung der drei Herzhöhlen.

3.2.3.1 Gesamtzahl der Großen EV in den Herzhöhlen

Die Abbildung 11 zeigt die Gesamtzahl der Großen EV aller Studienteilnehmer für das rechte Atrium (RA), das linke Atrium (LA) und das linke Vorhofohr (LAA). Der Vergleich der Mittelwerte ergab keinen signifikanten Unterschied in der Gesamtzahl der Vesikel zwischen den drei Herzhöhlen ($p=0,39$). Der Mittelwert lag für das RA bei 10166 EV/ μ l Plasma, für das LA bei 10305 EV/ μ l Plasma und für das LAA bei 9148 EV/ μ l Plasma.

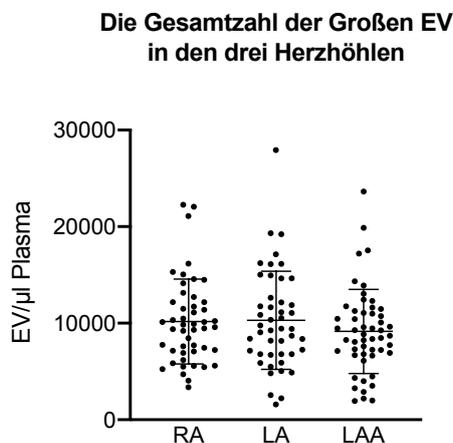


Abb. 11: Die Gesamtzahl der Großen EV in den drei Herzhöhlen

Bestimmung der Calcein+ Großen EV im rechten Atrium (RA), linken Atrium (LA) und linken Vorhofohr (LAA) mittels Durchflusszytometrie. $n = 58$. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte mitsamt Mittelwert und Standardabweichung. $p=0,39$; One-Way ANOVA.

3.2.3.2 Einzelne Vesikelpopulationen in den Herzhöhlen

Zusätzlich zu der Gesamtzahl der Vesikel wurden die Spiegel der thrombozytären, erythrozytären und endothelialen Großen EV in den drei Herzhöhlen miteinander verglichen. Die Abbildung 12 gibt den prozentualen Anteil der Vesikelpopulationen an allen EV an. Die thrombozytären Großen EV bildeten mit durchschnittlich 26 % die größte Vesikelpopulation im Plasma. Es folgten die erythrozytären EV mit einem Anteil von 7 % und die endothelialen EV mit einem Anteil von 2 %. Die Analyse erbrachte keinen signifikanten Unterschied in der Größe der Vesikelpopulationen zwischen den drei Herzhöhlen. Die thrombozytären Großen EV betragen im RA 25,38 %, im LA 25,81 % und im LAA 26,75 % ($p=0,51$). Die erythrozytären Großen EV bildeten im RA 6,05 %, im LA

6,87 % und im LAA 8,12 % aller EV ($p=0,19$). Und die endothelialen Großen EV machten im RA 1,84 %, im LA 1,62 % sowie im LAA 1,63 % aus ($p=0,19$).

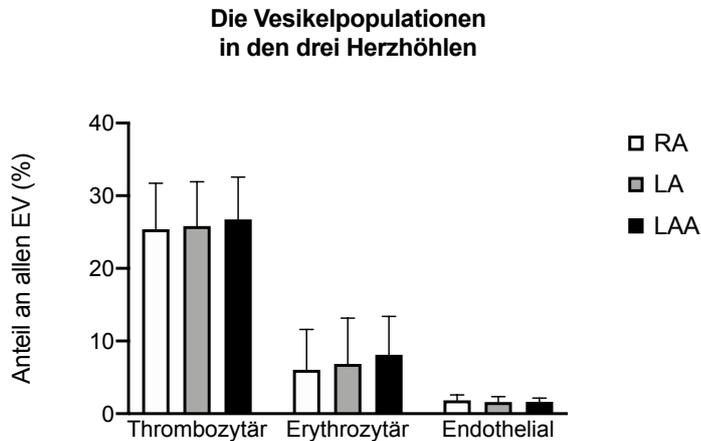


Abb. 12: Die Vesikelpopulationen in den drei Herzhöhlen
Betrachtung der thrombozytären, erythrozytären und endothelialen Großen EV im rechten Atrium (RA), linken Atrium (LA) und linken Vorhofohr (LAA). $n = 58$. Dargestellt ist der Mittelwert der jeweiligen Vesikelpopulation mitsamt Standardabweichung als prozentualer Anteil an den Calcein+ Großen EV. One-Way ANOVA.

3.2.3.3 Subgruppenanalyse der thrombozytären EV in den Herzhöhlen

Durch ein weiteres Gating wurden die Großen EV von Thrombozyten auf die Expression der Marker CD62P und CD42b hin untersucht. Die Abbildung 13 zeigt die Subgruppenanalyse. Der Anteil der CD62P+ Großen EV an allen Großen EV lag mit durchschnittlich 16 % deutlich höher als der Anteil der CD42b+ Großen EV mit durchschnittlich 3 %. Auch hier bestand kein signifikanter Unterschied im Anteil der Vesikelpopulationen zwischen den drei Herzhöhlen. Die Ergebnisse zu den CD62P+ Großen EV umfassen im RA 15,51 %, im LA 15,75 % und im LAA 16,32 % ($p=0,73$). Die Angaben zu den CD42b+ Großen EV sind im RA 2,42 %, im LA 2,63 % sowie im LAA 2,80 % ($p=0,74$).

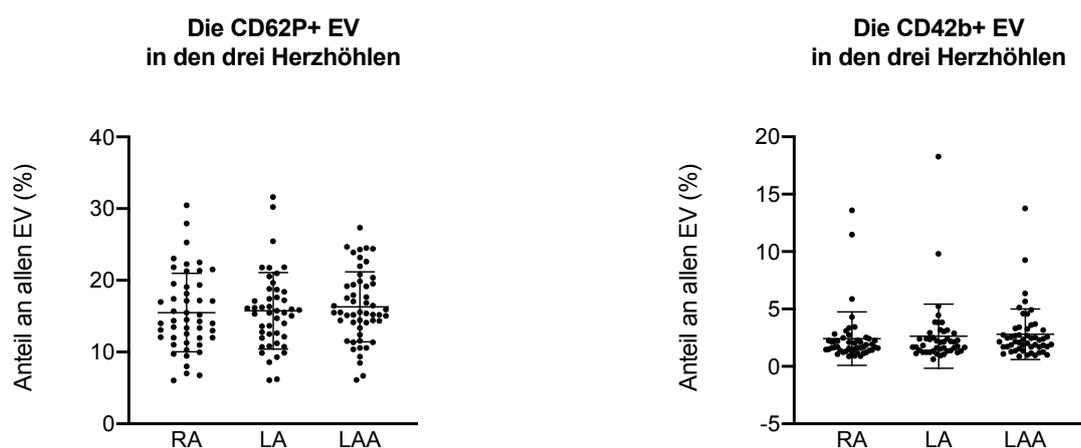


Abb. 13: Die Subgruppenanalyse der thrombozytären EV in den drei Herzhöhlen. Betrachtung der Calcein+/CD31+/CD41+ Großen EV im rechten Atrium (RA), linken Atrium (LA) und linken Vorhofohr (LAA), die zusätzlich durch CD62P bzw. CD42b markiert waren. $n = 58$. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte als prozentualer Anteil der jeweiligen Vesikelzahl an den Calcein+ Großen EV mitsamt Mittelwert und Standardabweichung. One-Way ANOVA.

3.2.4 Große EV und die verschiedenen Arten des Vorhofflimmerns

An dieser Stelle der Auswertung wurden die erhobenen Patientendaten verwendet, um die Vesikelzahlen mit den Vorerkrankungen der Patienten zu vergleichen. Die Patienten wurden in Anlehnung an die Leitlinie der European Society of Cardiology (ESC) von 2016 in drei Gruppen eingeteilt (Kirchhof et al., 2016). Die erste Gruppe umfasste Patienten ohne ein Vorhofflimmern. Die zweite und dritte Gruppe enthielten Patienten mit einem bekannten Vorhofflimmern. Während das permanente Vorhofflimmern über mehr als ein Jahr fortbesteht, muss das nicht-permanente Vorhofflimmern in ein paroxysmales und ein persistierendes Vorhofflimmern differenziert werden. Ersteres tritt wiederholt auf und endet meist innerhalb von 48 h spontan. Letzteres hält über mindestens sieben Tage an oder wird nach sieben Tagen durch eine medikamentöse bzw. elektrische Kardioversion beendet.

3.2.4.1 Gesamtzahl der Großen EV nach der Art des Vorhofflimmerns

Die Abbildung 14 zeigt die Gesamtzahl der Großen EV aufgeteilt nach den Herzhöhlen und der Art des Vorhofflimmerns. Die Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, weder bei der Betrachtung der Lokalisation ($p=0,53$) noch bei der Betrachtung des Vorhofflimmer-Typs ($p=0,87$).

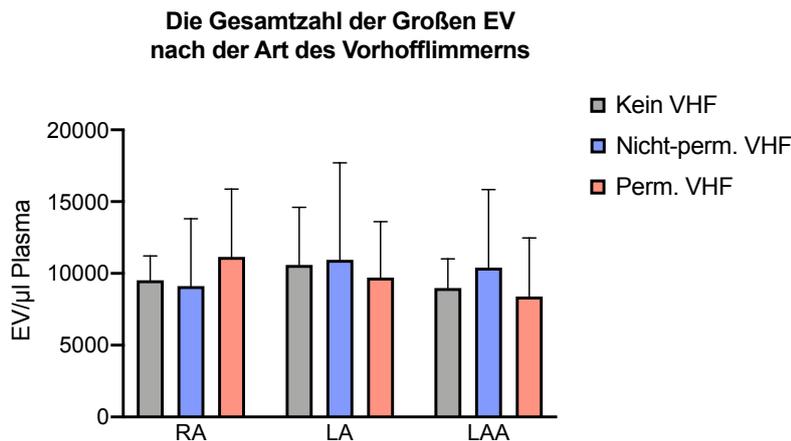


Abb. 14: Die Gesamtzahl der Großen EV nach der Art des Vorhofflimmerns. Durchflusszytometrische Bestimmung der Calcein+ Großen EV im rechten Atrium (RA), linken Atrium (LA) und linken Vorhofohr (LAA) von Patienten ohne ein Vorhofflimmern in der Vergangenheit, Patienten mit einem nicht-permanenten Vorhofflimmern und Patienten mit einem permanenten Vorhofflimmern. Abbildung adaptiert an Zietzer et al., 2021. n=10/21/27. Dargestellt ist der Mittelwert der jeweiligen Vesikelpopulation mitsamt Standardabweichung. Two-Way ANOVA.

3.2.4.2 Einzelne Vesikelpopulationen nach der Art des Vorhofflimmerns

Auch die Spiegel der thrombozytären, endothelialen und erythrozytären Großen EV wurden vor dem Hintergrund eines Vorhofflimmerns ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt. Erstmals fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen zwei Gruppen. Innerhalb des linken Vorhofohres besaßen die Patienten mit einem permanenten VHF im Vergleich zu den Patienten mit einem nicht-permanenten VHF einen höheren Spiegel der thrombozytären Großen EV ($p=0,05$). Ihr Anteil an allen Großen EV betrug $28,51 \pm 4,50$ % bzw. $24,01 \pm 6,15$ %. Die Auswertung der endothelialen und erythrozytären Großen EV ergab in der Two-Way-ANOVA ein signifikantes Ergebnis, nicht jedoch im Post-hoc-Test.

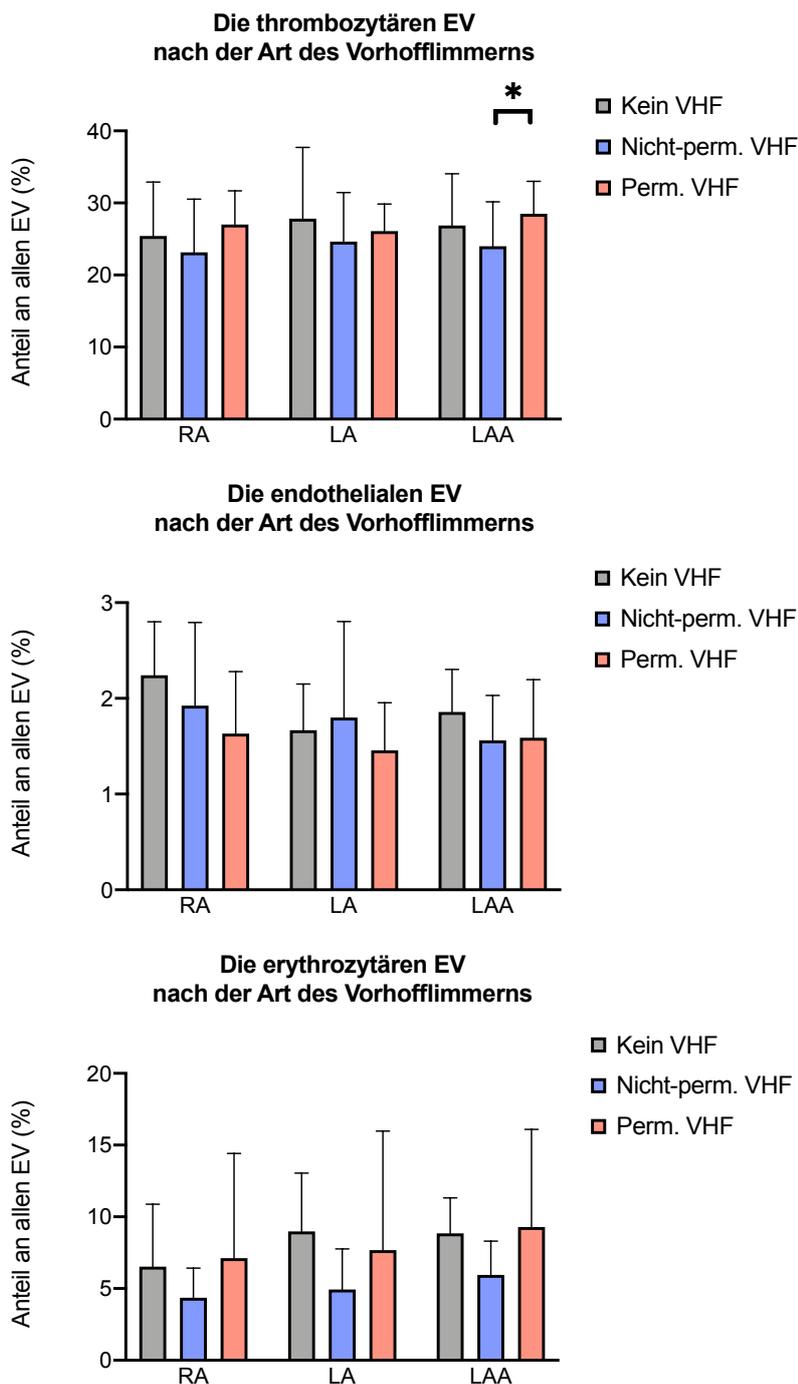


Abb. 15: Die Vesikelpopulationen nach der Art des Vorhofflimmerns
Betrachtung der thrombozytären, endothelialen und erythrozytären Großen EV im rechten Atrium (RA), linken Atrium (LA) und linken Vorhofohr (LAA) bei Patienten ohne ein Vorhofflimmern in der Vergangenheit, Patienten mit einem nicht-permanenten Vorhofflimmern und Patienten mit einem permanenten Vorhofflimmern. Abbildung adaptiert an Zietzer et al., 2021. n=10/21/27. Dargestellt ist der Mittelwert der jeweiligen Vesikelpopulation mitsamt Standardabweichung als prozentualer Anteil an den Calcein+ Großen EV. * $p < 0,05$; Two-Way ANOVA + Tukey's Multiple Comparisons Test.

3.2.4.3 Subgruppenanalyse der thrombozytären EV nach der Art des VHF

Die weitergehende Analyse der Großen EV von Thrombozyten ergab zusätzliche Ergebnisse. Diese gehen aus Abbildung 16 hervor. Es existierten signifikante Unterschiede in der Anzahl der CD62P+ Großen EV zwischen den Patienten mit einem nicht-permanenten VHF und jenen mit einem permanenten VHF. Ein dauerhaft bestehendes VHF ging mit einem erhöhten Anteil der CD62P+ EV sowohl im RA ($13,20 \pm 5,65\%$ vs. $17,16 \pm 4,49\%$: $p=0,04$) als auch im LAA ($13,66 \pm 4,29\%$ vs. $17,84 \pm 4,05\%$: $p=0,02$) einher. Ein ähnliches Bild zeigte sich für die CD42b+ EV, jedoch waren die angedeuteten Unterschiede nicht signifikant.

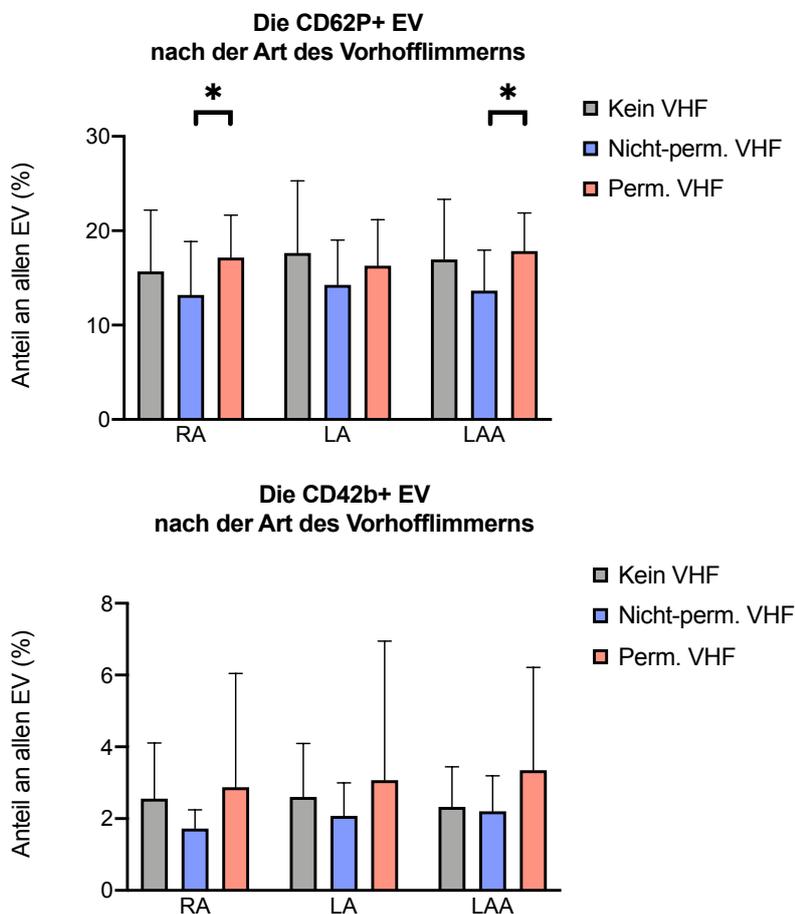


Abb. 16: Die Subgruppenanalyse der thrombozytären EV nach der Art des VHF Betrachtung der Calcein+/CD31+/CD41+ Großen EV im rechten Atrium (RA), linken Atrium (LA) und linken Vorhofohr (LAA), die zusätzlich durch CD62P bzw. CD42b markiert waren. $n=10/21/27$. Die Gruppen entsprechen Patienten ohne ein Vorhofflimmern in der Vergangenheit, Patienten mit einem nicht-permanenten Vorhofflimmern und Patienten mit einem permanenten Vorhofflimmern. Dargestellt ist der Mittelwert der jeweiligen Vesikelpopulation mitsamt Standardabweichung als prozentualer Anteil an den Calcein+ Großen EV. $*p<0,05$; Two-way ANOVA + Tukey's multiple comparison test.

3.2.5 Große EV und der aktuelle Herzrhythmus

In der vorherigen Auswertung wurden die Patienten nach dem diagnostizierten Vorhofflimmer-Typ in drei Gruppen eingeteilt. Ergänzend hierzu untersuchten wir die Vesikelzahlen nach dem zum Zeitpunkt der Untersuchung vorliegenden Herzrhythmus. Unterschieden wurden Patienten mit einem aktuellen Sinusrhythmus und Patienten mit einem aktuellen Vorhofflimmern. Da ein Patient ein Vorhofflattern zeigte, wurde er von der Auswertung ausgeschlossen. Die betrachteten Gruppen waren mit 28 und 29 Patienten ausgeglichen.

3.2.5.1 Gesamtzahl der Vesikel nach dem aktuellen Herzrhythmus

Die Abbildung 17 stellt die Gesamtzahl der Vesikel vor, sortiert nach den drei Herzhöhlen und nach dem aktuellen Herzrhythmus. Die statistische Auswertung konnte zunächst keinen signifikanten Unterschied zwischen den Patienten mit einem gegenwärtigen Sinusrhythmus und jenen mit einem gegenwärtigen Vorhofflimmern für das rechte Atrium (9322 ± 4117 vs. 11091 ± 4529 ; $p=0,20$), das linke Atrium (10929 ± 6120 vs. 9680 ± 3817 ; $p=0,71$) und das linke Vorhofohr (9964 ± 4715 vs. 8450 ± 3975 ; $p=0,43$) feststellen.

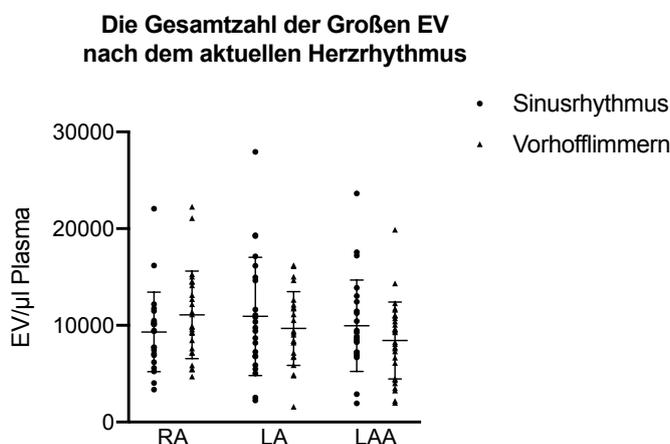


Abb. 17: Die Gesamtzahl der Großen EV nach dem aktuellen Herzrhythmus. Durchflusszytometrische Bestimmung der Calcein+ Großen EV im rechten Atrium (RA), linken Atrium (LA) und linken Vorhofohr (LAA) von Patienten mit einem Sinusrhythmus bzw. einem Vorhofflimmern zum Zeitpunkt der Untersuchung. Abbildung adaptiert an Zietzer et al., 2021. $n=28/29$. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte mitsamt Mittelwert und Standardabweichung. Mann-Whitney U Test.

3.2.5.2 Einzelne Vesikelpopulationen nach dem aktuellen Herzrhythmus

Erneut lieferte die Betrachtung der einzelnen Vesikelpopulationen ein signifikantes Ergebnis. Es ist in Abbildung 18 hervorgehoben. Die Patienten, die sich in einem Vorhofflimmern befanden, besaßen im Vergleich zu den Patienten in einem Sinusrhythmus einen höheren Anteil thrombozytärer Großer EV im rechten Atrium ($26,64 \pm 5,52$ % vs. $23,72 \pm 7,04$ %: $p=0,03$) und linken Vorhofohr ($28,09 \pm 5,22$ vs. $25,20 \pm 6,22$ %: $p=0,02$). Im Gegensatz hierzu war ihr Spiegel der endothelialen Großen EV innerhalb des rechten Atriums erniedrigt ($1,60 \pm 0,63$ % vs. $2,11 \pm 0,80$ %: $p=0,02$). Für die erythrozytären Großen EV war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen im rechten Atrium ($6,74 \pm 7,12$ % vs. $5,31 \pm 3,14$ %: $p=0,62$), linken Atrium ($7,42 \pm 8,20$ % vs. $6,31 \pm 3,61$ %: $p=0,50$) und linken Vorhofohr ($8,86 \pm 6,75$ % vs. $7,25 \pm 2,58$ %: $p=0,83$) nachweisbar.

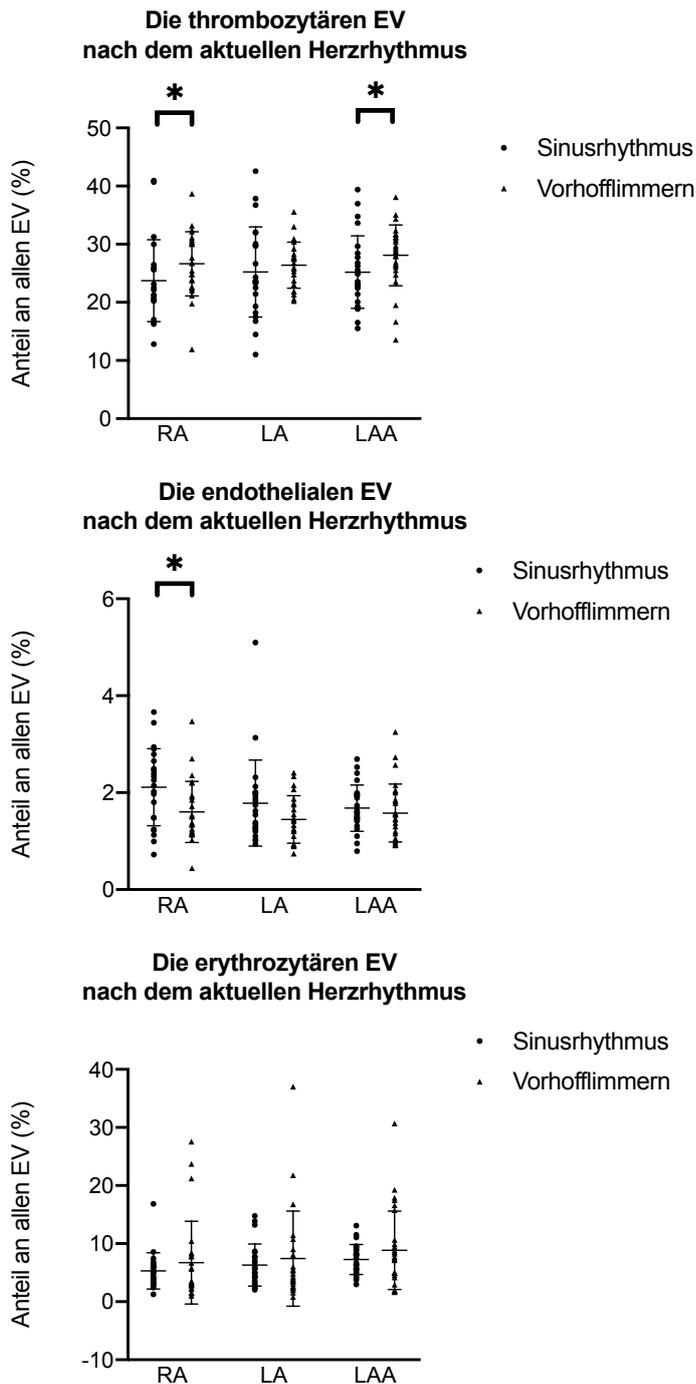


Abb. 18: Die Vesikelpopulationen nach dem aktuellen Herzrhythmus
 Betrachtung der thrombozytären, endothelialen und erythrozytären Großen EV im rechten Atrium (RA), linken Atrium (LA) und linken Vorhofohr (LAA) bei Patienten mit einem Sinusrhythmus bzw. einem Vorhofflimmern zum Zeitpunkt der Untersuchung. Abbildung adaptiert an Zietzer et al., 2021. n=28/29. Dargestellt ist der Mittelwert der jeweiligen Vesikelpopulation mitsamt Standardabweichung als prozentualer Anteil an den Calcein+ Großen EV. * $p < 0,05$; Mann-Whitney U Test.

3.2.5.3 Subgruppenanalyse der thrombozytären EV nach dem aktuellen HR

Die Abbildung 19 präsentiert die CD62P+ und CD42b+ Großen EV. Es ist ersichtlich, dass das Vorliegen eines Vorhofflimmerns mit einem erhöhten Anteil der CD62P+ Großen EV sowohl im rechten Atrium ($16,73 \pm 4,84$ % vs. $14,06 \pm 6,01$ %: $p=0,03$) als auch im linken Vorhofohr ($17,37 \pm 4,44$ % vs. $15,09 \pm 5,18$ %: $p=0,04$) einherging. Für die CD42b+ Großen EV blieb diese Auswertung dagegen ohne Unterschied im rechten Atrium ($2,73 \pm 3,08$ % vs. $2,06 \pm 1,05$ %: $p=0,72$), linken Atrium ($2,99 \pm 3,80$ % vs. $2,27 \pm 1,11$ %: $p=0,79$) und linken Vorhofohr ($3,21 \pm 2,81$ % vs. $2,32 \pm 1,02$ %: $p=0,59$).

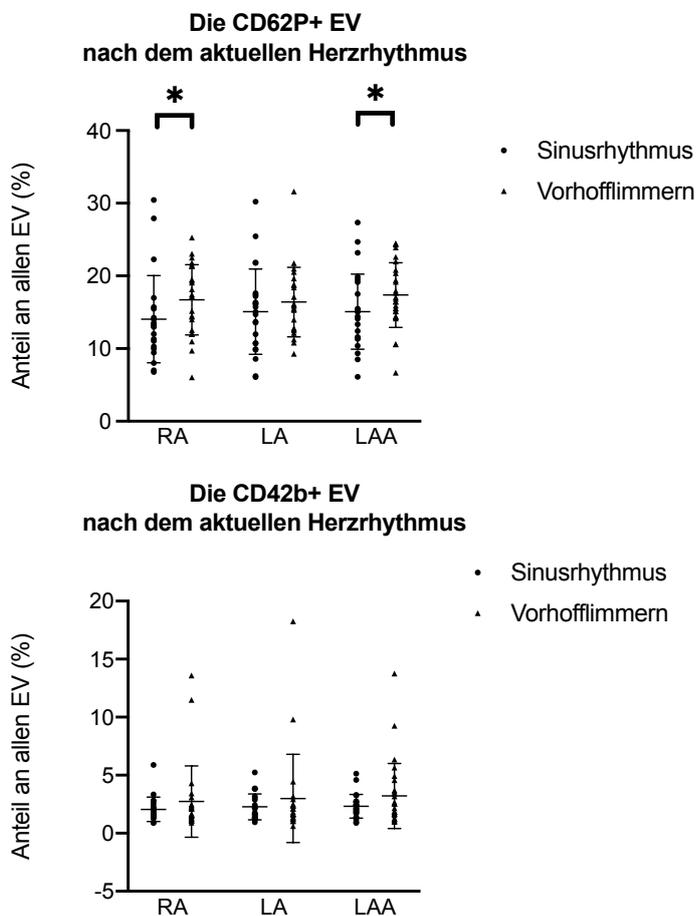


Abb. 19: Die Subgruppenanalyse der thrombozytären EV nach dem aktuellen HR Betrachtung der Calcein+/CD31+/CD41+ Großen EV im rechten Atrium (RA), linken Atrium (LA) und linken Vorhofohr (LAA), die zusätzlich durch CD62P bzw. CD42b markiert waren. $n=28/29$. Die Gruppen entsprechen Patienten mit einem Sinusrhythmus bzw. Patienten mit einem Vorhofflimmern zum Zeitpunkt der Untersuchung. Dargestellt ist der Mittelwert der jeweiligen Vesikelpopulation mitsamt Standardabweichung als prozentualer Anteil an den Calcein+ Großen EV. * $p<0,05$; Mann-Whitney U Test.

4. Diskussion

4.1 Bedeutung der Studienergebnisse

Die Ergebnisse der Studie bestätigen, dass der überwiegende Teil der Großen EV im Blutplasma von Thrombozyten abstammt, gefolgt von erythrozytären und endothelialen Großen EV (Loyer et al., 2014). Die Analyse der Studienkohorte ergab zunächst keinen signifikanten Unterschied in der Gesamtzahl der Vesikel und in der Anzahl der einzelnen Vesikelpopulationen zwischen den Herzhöhlen. Allerdings brachte die Untersuchung der Vesikelzahlen vor dem Hintergrund eines Vorhofflimmerns neue Erkenntnisse. In der Einteilung der Patienten nach dem diagnostizierten Vorhofflimmer-Typ besaßen die Patienten mit einem permanenten Vorhofflimmern im Vergleich zu den Patienten mit einem nicht-permanenten Vorhofflimmern einen um 4,5 % höheren Anteil der thrombozytären Großen EV im linken Vorhofohr ($28,51 \pm 4,50$ % vs. $24,01 \pm 6,15$ %; $p=0,05$). Dies entsprach einer relativen Erhöhung von 18,72 %. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch in der Einteilung der Patienten nach dem zum Zeitpunkt der Untersuchung festgestellten Herzrhythmus. Ein aktuelles Vorhofflimmern ging mit einem höheren Anteil der thrombozytären Großen EV im rechten Atrium und linken Vorhofohr einher. Die absolute Anteilsdifferenz betrug 2,92 % ($26,64 \pm 5,52$ % vs. $23,72 \pm 7,04$ %; $p=0,03$) bzw. 2,89 % ($28,09 \pm 5,22$ vs. $25,20 \pm 6,22$ %; $p=0,02$). Dies entsprach einer relativen Erhöhung der thrombozytären Großen EV von 12,3 % bzw. 11,47 %. Interessanterweise konnte ebenfalls ein höherer Anteil der CD62P+ Großen EV im rechten Atrium und linken Vorhofohr von Patienten mit einem aktuellen Vorhofflimmern nachgewiesen werden. Hier belief sich die absolute Anteilsdifferenz auf 2,67 % ($16,73 \pm 4,84$ % vs. $14,06 \pm 6,01$ %; $p=0,03$) bzw. 2,28 % ($17,37 \pm 4,44$ % vs. $15,09 \pm 5,18$ %; $p=0,04$). Entsprechend lag der Anteil um 18,99 % bzw. 15,13 % höher.

Diese veränderten Vesikelzahlen sind nicht auf eine veränderte Anzahl der Mutterzellen zurückzuführen, da die Auswertung der Baseline-Charakteristika eine gleichmäßige Verteilung der Thrombozyten in den Patientengruppen nachwies ($200 \pm 65,2$ vs. $218 \pm 72,3$ vs. $202,4 \pm 57,2 \cdot 10^9/l$; $p=0,67$).

Patienten mit einem Vorhofflimmern leiden unter dem dauerhaft erhöhten Risiko, eine kardiogene Embolie zu entwickeln (Wolf et al., 1991). Die Folge ist eine Häufung ischämischer Schlaganfälle in dieser Patientengruppe. Aus vorhergehenden Studien ist bekannt, dass die Quelle der Embolie in der Mehrzahl der Fälle im linken Vorhofohr liegt (Blackshear und Odell, 1996). Es existieren vielfältige Theorien zu der Ursache der Thrombenbildung im LAA. Entsprechend der Virchow-Trias werden Veränderungen in der Struktur der Herzwand, in der Flussgeschwindigkeit des Blutes sowie in der Zusammensetzung des Blutes angenommen. Die Abbildung 20 stellt vereinfacht dar, wie das Vorhofflimmern die Komponenten der Virchow Trias und somit die Entstehung von Thromben beeinflusst.

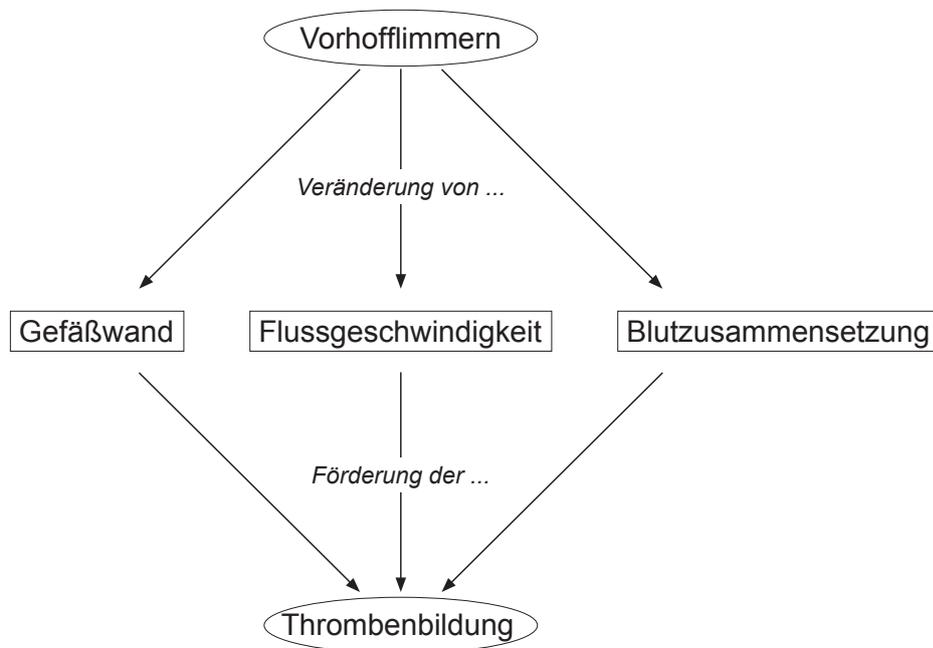


Abb. 20: Der Einfluss des Vorhofflimmerns auf die Thrombenbildung

Boldt et al. (2004) fanden in histologischen Untersuchungen eine verstärkte Fibrosierung des linken Atriums von Patienten mit einem Vorhofflimmern im Vergleich zu Patienten mit einem Sinusrhythmus. Die Inzidenz des Vorhofflimmerns korreliert mit der Größe des linken Atriums (Henry et al., 1976; Vaziri et al., 1994). Die Vergrößerung des LA wiederum ist ein Risikofaktor für einen ischämischen Schlaganfall (Benjamin et al., 1995). Eine er-

niedrige Flussgeschwindigkeit innerhalb des LAA geht mit einem gesteigerten Schlaganfallrisiko einher. Auch ein verstärkter Echokontrast in der Ultraschalldiagnostik zeigt ein gesteigertes Schlaganfallrisiko an (The Stroke Prevention in Atrial Fibrillation Investigators Committee on Echocardiography, 1998).

Es ist nicht abschließend geklärt, welcher Umstand die Thrombenbildung im Herzen am stärksten begünstigt. Das Vorhofflimmern könnte eine Hauptursache darstellen oder aber die Begleiterscheinung eines insgesamt erhöhten kardiovaskulären Risikos sein. Wahrscheinlich ist, dass sich die Faktoren, die zu einer Thrombenbildung führen, gegenseitig verstärken. Die Vergrößerung des linken Atriums könnte zu einem Vorhofflimmern führen, ähnlich wie ein Vorhofflimmern zu einer Vergrößerung des linken Atriums führen könnte (Thamilarasan und Klein, 1999). Zudem überschneiden sich die Risikofaktoren für die Vergrößerung des linken Atriums und für das Auftreten des Vorhofflimmerns. So ist die arterielle Hypertonie ein gemeinsamer Prädiktor beider Veränderungen (Benjamin et al., 1994; Dittich et al., 1999).

Mit dieser Studie konnten wir Änderungen in einer der Komponenten der Virchow Trias nachweisen. Die veränderte Zusammensetzung des Blutes im linken Vorhof von Patienten mit einem permanenten Vorhofflimmern erlaubt keine Aussagen zu Ursache und Wirkung. Dennoch könnte die erhöhte Konzentration der thrombozytären Großen EV Ausdruck der gesteigerten Thrombogenität sein, die ursächlich für die Häufung ischämischer Schlaganfälle bei Patienten mit einem Vorhofflimmern ist.

Nebenbefundlich bestand bei den Patienten mit einem aktuellen Vorhofflimmern im Vergleich zu den Patienten mit einem aktuellen Sinusrhythmus eine um 0,51 % ($1,60 \pm 0,63$ % vs. $2,11 \pm 0,80$ %: $p=0,02$) niedrigere Konzentration der endothelialen Großen EV im rechten Atrium. Dies bedeutete eine relative Erniedrigung um 24,22 %. Es bleibt unklar, ob dieser Befund durch eine Schädigung des Endothels oder durch einen vermehrten Verbrauch endothelialer Großer EV im Rahmen des Vorhofflimmerns erklärt werden kann.

Die vorliegende Studie stellt eine der ersten Untersuchungen zum Spiegel der Großen EV im Blutplasma dar, das direkt den Herzhöhlen entstammt. Bisherige Studien waren meist

auf die Analyse der Großen EV in Blutplasma aus peripheren und herznahen Gefäßen beschränkt. Die Analyse von Plasmaproben aus der ARISTOTLE-Studie und einer vergleichbaren Patientenkohorte ohne Vorhofflimmern ergab erhöhte Spiegel der thrombozytären, erythrozytären und leukozytären Großen EV in Patienten mit einem VHF (Thulin et al., 2020). Demgegenüber war der Spiegel der endothelialen Großen EV signifikant erniedrigt.

Mørk et al. (2019) bestimmten die Vesikelkonzentration in Blutplasma, das während einer Operation am offenen Herzen gesammelt wurde. Die Proben wurden entweder über einen ZVK aus dem kleinen Kreislauf oder über eine Punktionskanüle aus dem linken Vorhofrohr entnommen und mithilfe eines EV Array analysiert (Jørgensen et al., 2013). Zu der Studienkohorte zählten zwölf Patienten ohne ein VHF, sieben Patienten mit einem paroxysmalen VHF und sechs Patienten mit einem persistierenden oder permanenten VHF. Die Patienten mit einem VHF zeigten im Vergleich zu jenen ohne ein VHF einen erhöhten Spiegel Annexin V+ EV in den Proben, die über einen ZVK gewonnen wurden. Die Verwendung eines Antikörpers Anti-Tissue Factor (TF9-10H10) zur Fixierung der EV ergab zudem, dass die Patienten mit einem VHF einen erhöhten Spiegel TF+ EV im LAA besaßen. Weitere signifikante Ergebnisse betrafen unter anderem die CD31+ EV, die bei Patienten mit einem VHF ebenfalls im LAA erhöht waren. Dagegen bestanden keine Unterschiede in der Vesikelkonzentration zwischen den Entnahmeorten oder zwischen den VHF-Typen.

Die Kritik an der Studie von Mørk et al. (2019) umfasst die geringe Patientenzahl. Zwar liefert die Analyse der Vesikel mithilfe eines EV Array schnelle Ergebnisse, jedoch ist das Verfahren anfällig für Verunreinigungen aus dem Plasma. Es erfolgte keine Differenzierung zwischen den verschiedenen Vesikelarten. Darüber hinaus wurden die Blutproben während einer Operation am offenen Herzen entnommen, die ihrerseits zu einer Aktivierung diverser Blutzellen führt.

Zusammenfassend repräsentiert unsere Studie eine neuartige und umfangreiche Analyse der Großen Extrazellulären Vesikel in humanem Blutplasma aus drei verschiedenen Herzhöhlen mittels Durchflusszytometrie.

4.2 Limitationen

Zunächst sollen allgemeine Fehlerquellen erläutert werden, die die Vesikelisolation und Vesikelanalyse gefährden. Die Differentielle Zentrifugation ist mit 81 % die am häufigsten eingesetzte Methode der Vesikelisolation (Gardiner et al., 2016). Allerdings stellt sie ein sehr zeitintensives Verfahren dar. Hohe G-Kräfte während der Zentrifugation können die Vesikel schädigen. Zudem ist keine strikte Trennung der drei verschiedenen Vesikelarten möglich.

Es existieren vielfältige weitere Methoden der Vesikelisolation, die ihrerseits Vorteile und Nachteile besitzen. Die Präzipitation umfasst die Zugabe eines hydrophilen Polymers zu der Probe. Die anschließende Zentrifugation mit niedriger G-Zahl verursacht eine Abscheidung der EV am Boden des Gefäßes. Es handelt sich um ein einfaches Verfahren, das jedoch anfällig für Verunreinigungen ist. Die Dichtegradientenzentrifugation verwendet einen Sucrose- bzw. Iodixanol- Dichtegradienten. Ein einzelner Zentrifugationsschritt führt zu einer Auftrennung der Probenbestandteile in Schichten ähnlicher Dichte. Während sich Lipoproteine besser separieren lassen, ist weiterhin keine sichere Unterscheidung von EV und Proteinaggregaten bzw. Lipoproteinen möglich (Yuana et al., 2014). Die Filtration nutzt Poren unterschiedlicher Größe zur Trennung von Teilchen. Diese existieren in solch kleinen Größen wie 200 nm, können die EV beim Durchtritt aber schädigen. Die Größenausschluss-Chromatographie erfolgt mithilfe einer Chromatographiesäule. Während die größeren Moleküle früh an das Ende der Säule gelangen, erreichen kleine Moleküle den Detektor erst später. Größter Nachteil der Größenausschluss-Chromatographie ist die starke Verdünnung der Probenbestandteile. Die Isolation durch Immunität beruht auf der Bindung von Antikörpern an die gesuchten Antigene. Dabei sind die Antikörper an Beads oder eine unbewegliche Oberfläche gebunden. Leider ist das Verfahren mit hohen Kosten verbunden. Aufgrund der genannten Schwierigkeiten wird die Entwicklung neuer Ideen zur Vesikelisolation, wie z.B. der Mikrofluidik, mit großem Einsatz vorangetrieben.

Die Durchflusszytometrie stellt ein weit verbreitetes Verfahren zur Analyse von Zellen dar. Sie basiert auf dem Nachweis von Oberflächenmarkern mithilfe fluoreszierender Antikörper. Innerhalb des Durchflusszytometers durchläuft die Probe eine Zählkammer, in der

ein Laser den Fluoreszenzfarbstoff anregt. Das emittierte Licht wird von einem Detektor registriert und in ein elektrisches Signal umgewandelt. So werden für jede Zelle separate Daten zur Stärke des Lichtsignals gesammelt. Die Verwendung mehrerer Laser und Lichtfilter ermöglicht die gleichzeitige Analyse verschiedener Marker. Angewandt auf Große Extrazelluläre Vesikel gibt die Durchflusszytometrie Informationen zu der zellulären Abstammung der Vesikel.

Ein weiteres Verfahren der Vesikelanalyse ist die Nanopartikel-Tracking-Analyse (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA). Sie beruht auf der Brown'schen Molekularbewegung kleiner Teilchen und nutzt einen Laser in Kombination mit der Dunkelfeldmikroskopie. Das Verfahren ermöglicht eine schnelle und kostengünstige Bestimmung der Partikelgröße und deren Anzahl. Die Dynamische Lichtstreuung (Dynamic Light Scattering, DLS) beruht ebenfalls auf der Brown'schen Molekularbewegung. Sie misst Änderungen in der Intensität des von der Probe reflektierten Lichts und berechnet mithilfe mathematischer Formeln die Vesikelgröße. Während die DLS Aussagen zu der Aggregation der Vesikel ermöglicht, ist sie nur für die Analyse monodisperser Vesikepopulationen geeignet. Die Widerstandsimpulserfassung (Resistive Pulse Sensing, RPS) verwendet zwei flüssigkeitsgefüllte Kammern, die über einen äußeren Stromkreis und eine zentrale Flüssigkeitsbrücke miteinander verbunden sind. Eine angelegte Spannung bewirkt einen Stromfluss, der abgeschwächt wird, sobald anstelle von Ionen ein größeres Partikel die Flüssigkeitsbrücke durchläuft. Das RPS gibt Informationen zu der Vesikelgröße und der Vesikelkonzentration. Neben den genannten Verfahren bestehen weitere Möglichkeiten, die Vesikel zu charakterisieren. Mithilfe der Elektronenmikroskopie können EV direkt sichtbar gemacht werden. Die Gelelektrophorese und der Western Blot erlauben Untersuchungen des Proteingehalts der EV. Zudem ermöglicht die Polymerasekettenreaktion den Nachweis einzelner Nukleinsäuren.

Spätestens seit 2013 erfolgen Untersuchungen zum Einfluss präanalytischer Faktoren auf die Vesikelanalyse (Lacroix et al., 2013). Im Folgenden soll der Umgang mit Blutproben näher beleuchtet werden.

Bereits vor der Blutentnahme ist auf eine längere Nüchternphase der Patienten zu achten, denn sowohl zirkulierende Proteinaggregate als auch Chylomikronen und Lipoproteine können die spätere Vesikelanalyse beeinträchtigen (György et al., 2011; Sódar et al., 2016; Yuana et al., 2014). Chylomikronen besitzen eine Größe von 200 - 600 nm (Sódar et al., 2016). Low density Lipoproteine (LDL) sind mit 25 - 27 nm deutlich kleiner als Chylomikronen, allerdings liegt ihre Konzentration im Plasma um den Faktor 20000 höher (Tsukamoto et al., 2004). Durch ein Swarming und die Bindung an EV stellen LDL einen beachtenswerten Störfaktor für die Vesikelanalyse dar.

Hohe Scherkräfte während der Blutentnahme stimulieren die Vesikelbildung und führen zu falsch hohen Vesikelzahlen (Miyazaki et al., 1996). Das Scientific Standardisation Committee der International Society on Thrombosis and Haemostasis empfiehlt zur Gerinnungshemmung die Verwendung des Antikoagulans Natriumcitrat (Lacroix et al., 2013). Die gewonnenen Blutproben sollten ohne Erschütterungen transportiert werden, um eine Aktivierung der Thrombozyten zu vermeiden. Andernfalls könnte die Vesikelzahl auch nach der Blutentnahme um ein Vielfaches ansteigen (Yuana et al., 2015). Nach ihrer Gewinnung sollten die Blutproben zeitnah zentrifugiert werden (Ayers et al., 2011). Dabei sollte der erste Zentrifugationsschritt zur Herstellung von Blutplasma bei Raumtemperatur erfolgen (Witwer et al., 2013). Daneben können Antikörperaggregate die Vesikelzahl verfälschen (Aass et al., 2011).

Wenngleich wir einen Einfluss der genannten Fehlerquellen nicht mit absoluter Sicherheit ausschließen können, versuchten wir doch, unter Beachtung der aktuellen Empfehlungen, die Auswirkungen von Störgrößen auf die Vesikelanalyse zu minimieren. Nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft wirken sich eine Zeitverzögerung von einer Stunde zwischen der Blutentnahme und der Probenverarbeitung, eine Lagerung des gefrorenen Plasmas für bis zu ein Jahr und ein einzelner Auftauzyklus nicht negativ auf die Probenqualität aus (Yuana et al., 2015).

Bei der Betrachtung der Baselinecharakteristika ist auffällig, dass die Patientengruppe ohne VHF im Vergleich zu den anderen Patientengruppen tendenziell ein höheres kardiovaskuläres Risiko besaß. Dies ist erkennbar an der höheren Rate eines Diabetes mellitus

(kein VHF vs. nicht-perm. VHF: $p=0,01$), einer 3-Gefäß-KHK (kein VHF vs. nicht-perm. VHF: $p=0,01$; kein VHF vs. perm. VHF: $p=0,01$), einer cAVK (kein VHF vs. nicht-perm. VHF: $p=0,01$) und pAVK (kein VHF vs. nicht-perm. VHF: $p=0,02$). Auch das NT-proBNP war in der Patientengruppe ohne VHF im Vergleich zu den übrigen Gruppen erhöht (kein VHF vs. nicht-perm. VHF: $p=0,02$; kein VHF vs. perm. VHF: $p=0,01$).

Diese Befunde stehen in Kontrast zu der Tatsache, dass ein Diabetes mellitus, eine arterielle Hypertonie und eine Herzinsuffizienz mit einer gesteigerten Inzidenz des Vorhofflimmerns einhergehen (Benjamin et al., 1994). Es bleibt zu betonen, dass die Zusammensetzung der Studienkohorte nicht beeinflusst wurde. Die Aufnahme der Studienteilnehmer erfolgte unabhängig ihrer Vorerkrankungen. Während des Studienzeitraums wurden nahezu alle Patienten in die LAA-Studie eingeschlossen, die in der Kardiologie des UKB durch einen MitraClip® behandelt wurden.

Die Medikation der Patienten wurde in Vorbereitung auf den Eingriff im Herzkatheterlabor umgestellt. Insbesondere eine Antikoagulation wurde angepasst. Die Einnahme eines Vitamin-K-Antagonisten oder Direkten oralen Antikoagulans wurde vorübergehend durch die Gabe von Heparin ersetzt. Während der Intervention erhielten die Patienten zusätzliches Heparin, um eine Thrombenbildung an der Oberfläche der Instrumente zu verhindern. Dabei richtete sich die Dosierung nach der aktivierten Koagulationszeit. Gao et al. (2011) untersuchten die Wirkung des Heparins auf Thrombozyten und wiesen eine Verstärkung aktivierender Signale nach. Es mehren sich Hinweise darauf, dass eine Gerinnungshemmung durch Heparin zu einer Steigerung der Vesikelzahl führt (Jamaly et al., 2018b; Lacroix et al., 2012).

Eine Änderung der Medikation oder des Behandlungsverfahrens zu Studienzwecken war nicht vorgesehen. Auswirkungen der Heparinisierung und der Art des Katheters auf die Vesikelanalyse können nicht gänzlich ausgeschlossen werden, jedoch wurde auf eine einheitliche Behandlung der Patienten geachtet. Die Antikoagulation wurde nach einem standardisierten Schema durchgeführt. Und das MitraClip®-Verfahren fand nach einem festen Protokoll statt.

Von den Studienteilnehmern konnten 58 Patienten in die Vesikelanalyse eingeschlossen werden. Nicht in allen Fällen war die Entnahme von drei Blutproben aus dem Herzen möglich. Ein Teil der Proben musste während der Experimente verworfen werden. Insgesamt wurden 146 Blutproben mithilfe der Durchflusszytometrie untersucht.

Die Färbung der Vesikel nach den Oberflächenmarkern CD62E, CD14, CD16, CD45 und CD142 ergab keine validen Ergebnisse. Im Falle der gegen Leukozyten gerichteten Antikörper war eine Unterscheidung zwischen ungefärbten und gefärbten Vesikeln nicht möglich. Auch der Einsatz von zwei verschiedenen Antikörpern gegen den Tissue Factor erlaubte keine Abgrenzung zwischen positiven und negativen Populationen.

Die Recherche zu der Präsenz des TF auf der Oberfläche von EV ergab widersprüchliche Ergebnisse. Eine große Zahl an Studien konnte TF+ EV im Rahmen von Erkrankungen nachweisen (Falati et al., 2003; Mallat et al., 1999; Shet et al., 2003; Zwicker et al., 2009). Es bleibt jedoch unsicher, ob TF+ EV auch im Blut von gesunden Probanden enthalten sind. Butenas et al. (2005) fanden den TF allenfalls in sehr geringer Konzentration auf der Oberfläche nicht-stimulierter Blutzellen. Es ist denkbar, dass der Tissue Factor erst infolge der Wirkung von Kollagen und Thrombin aus dem Zellinneren an die Zelloberfläche transportiert wird (Müller et al., 2003). Bouchard et al. (2010) hinterfragten die Ergebnisse vorheriger Studien und verwiesen auf einen Assay zur Bestimmung des TF, der sich als fehlerhaft erwies (Bogdanov et al., 2009). Eine andere Studie ergab, dass die verfügbaren Antikörper unterschiedlich gut geeignet sind, den TF zu markieren (Basavaraj et al., 2012). Eine exakte Färbung ist jedoch die Voraussetzung für die erfolgreiche Anwendung der Durchflusszytometrie auf die Vesikelanalyse. Mangels einer sicheren Identifizierung der gefärbten Vesikel in den Dot-Plots wurden die genannten Marker aus dem finalen Protokoll der Studie entfernt.

4.3 Ausblick

Diese Studie könnte auch in Zukunft neue Erkenntnisse zu der Bedeutung der Großen Extrazellulären Vesikel für die Thrombenbildung im Herzen bringen. Die Patienten wurden regelmäßig mithilfe der Echokardiographie untersucht. Im Falle des MitraClip®-Verfahrens war die Transösophageale Echokardiographie ein integraler Bestandteil der Behandlung.

Die erhobenen Daten umfassen die Morphologie des Herzens, die Pumpfunktion des Herzens, die Funktion der Herzklappen sowie die Flussgeschwindigkeit im linken Vorhofrohr. Der Vergleich der echokardiographischen Befunde mit dem Spiegel der Großen EV könnte etwaige Zusammenhänge aufdecken. Bereits heute ist erwiesen, dass das Schlaganfallrisiko von Patienten ohne ein Vorhofflimmern mit der Morphologie des LAA variiert (Blackshear und Odell, 1996). Die Nachverfolgung der Patienten würde zeigen, wie sich das Überleben und die Lebensqualität der Patienten durch die MitraClip®-Behandlung verändert haben. Die Korrelation der Daten mit der Vesikelzahl könnte es ermöglichen, die Aussagekraft der EV in der Prognose kardiovaskulärer Erkrankungen zu beurteilen.

Extrazelluläre Vesikel erfüllen mit einem komplexen Bildungsmechanismus, einem spezifischen Gehalt an Biomolekülen und der Fähigkeit, diverse Stoffwechselprozesse zu beeinflussen, wichtige Voraussetzungen für einen erfolgreichen Einsatz im Krankenhaus. Der Nutzen der EV für die Diagnostik und Therapie von Erkrankungen wird derzeit intensiv erforscht. Extrazelluläre Vesikel könnten die Diagnostik von solch unterschiedlichen Erkrankungen erleichtern wie Gefäßerkrankungen, Nierenerkrankungen, Autoimmunerkrankungen und neurologischen Erkrankungen (Amabile et al., 2005; Combes et al., 1999; Saman et al., 2012; Zhou et al., 2006). Von herausragender Bedeutung sind die Ergebnisse von Melo et al. (2015), die erstmals EV als Biomarker einer Tumorerkrankung identifizierten.

Es bleibt offen, inwiefern Änderungen der Vesikelkonzentration den Erfolg einer medikamentösen Behandlung widerspiegeln (Suades et al., 2013). Im Jahr 2005 wurden Exosomen als neue Therapieoption von Tumorerkrankungen untersucht. Zwei gleichzeitig veröffentlichte klinische Studien der Phase I bestätigten, dass die Isolation, die Modifikation und die erneute Verabreichung von Exosomen sicher möglich sind (Escudier et al., 2005; Morse et al., 2005).

Vor der Einführung der Extrazellulären Vesikel in den klinischen Alltag müssen jedoch vielfältige Hürden überwunden werden. Als die drängendste Herausforderung erscheint

die Standardisierung der Versuche (Théry et al., 2018). Die Offenlegung von Studienprotokollen stellt einen ersten wichtigen Schritt in diese Richtung dar (Van Deun et al., 2017). Seit 2015 veröffentlichen die International Society on Extracellular Vesicles, die International Society on Advancement of Cytometry und die International Society on Thrombosis and Haemostasis gemeinsame Empfehlungen zur Vesikelanalyse (The EV Flow Cytometry Working Group, 2021). Auch die europäischen Projekte METVES I und II sollen der klinischen Anwendung der EV den Weg bereiten (European Metrology Programme for Innovation and Research, 2021).

5. Zusammenfassung

Die Extrazellulären Vesikel bilden ein junges Forschungsfeld. Die Untergruppe der Großen EV entsteht durch eine Knospenbildung an der Zellmembran. Für vielfältige Erkrankungen konnten Änderungen in Anzahl und Aufbau der Vesikel nachgewiesen werden. Gefördert durch das SciMed-Programm der Medizinischen Fakultät Bonn untersuchte diese Studie die Bedeutung der Großen EV für die Entstehung intrakardialer Thromben bei Patienten mit einem Vorhofflimmern. In dem Zeitraum von Februar 2018 bis Juli 2019 wurde eine Biobank mit Plasmaproben von 62 Patienten aufgebaut. Das Blut wurde während einer kathetergestützten Behandlung aus dem rechten Atrium, linken Atrium und linken Vorhofohr gewonnen. Eine Vielzahl grundlegender Experimente ermöglichte die Etablierung eines Protokolls für die Analyse der Großen EV in den gesammelten Proben. Der Einsatz von Calcein AM und fünf weiterer Antikörper erlaubte die Analyse der thrombozytären, endothelialen und erythrozytären Vesikel sowie der Expression von CD62P und CD42b. Abschließend wurden die Vesikelzahlen vor dem Hintergrund des diagnostizierten Vorhofflimmertyps und des zum Zeitpunkt der Untersuchung bestehenden Herzrhythmus ausgewertet. Die Ergebnisse der Studie wurden 2020 auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie vorgestellt, mit einem Young Investigator Award ausgezeichnet und in der Zeitschrift *Clinical Research In Cardiology* veröffentlicht (Zietzer et al., 2021). Sie konnten einen erhöhten Anteil der thrombozytären Großen EV im linken Vorhofohr der Patienten mit einem permanenten Vorhofflimmern im Vergleich zu den Patienten mit einem nicht-permanenten Vorhofflimmern nachweisen. Die Patienten mit einem aktuellen Vorhofflimmern zeigten zusätzlich gegenüber jenen mit einem aktuellen Sinusrhythmus eine Erhöhung der thrombozytären Großen EV im rechten Atrium. Dies spiegelte sich auch in der Untersuchung der CD62P-positiven Großen EV wider. Demgegenüber war der Anteil der endothelialen Großen EV im rechten Atrium von Patienten mit einem aktuellen Vorhofflimmern erniedrigt. Die nachgewiesenen Änderungen in der Zusammensetzung des Blutes könnten einen Anhalt geben für die erhöhte Thrombogenität im linken Vorhofohr von Patienten mit einem Vorhofflimmern, welche die Ursache des gesteigerten Schlaganfallrisikos in dieser Patientengruppe ist. Die thrombozytären Großen Extrazellulären Vesikel verdienen eine weitere Erforschung als Surrogatmarker für das Risiko eines ischämischen Schlaganfalls von Patienten mit einem Vorhofflimmern.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die Entstehungsmechanismen der Extrazellulären Vesikel	16
Abb. 2: Die Gatingstrategie	37
Abb. 3: Die Analyse der Überstände	39
Abb. 4: Die Positiv- und Negativkontrollen	41
Abb. 5: Die Zugabe eines Detergens	42
Abb. 6: Die Färbung durch Annexin V und Calcein AM	43
Abb. 7: Die Färbung nach dem Tissue Factor	45
Abb. 8: Die Fluorescence Minus One	48
Abb. 9: Die Silica Beads	49
Abb. 10: Die Verdünnungsreihe	51
Abb. 11: Die Gesamtzahl der Großen EV in den drei Herzhöhlen	61
Abb. 12: Die Vesikelpopulationen in den drei Herzhöhlen	62
Abb. 13: Die Subgruppenanalyse der thrombozytären EV in den drei Herzhöhlen	63
Abb. 14: Die Gesamtzahl der Großen EV nach der Art des Vorhofflimmerns	64
Abb. 15: Die Vesikelpopulationen nach der Art des Vorhofflimmerns	65
Abb. 16: Die Subgruppenanalyse der thrombozytären EV nach der Art des VHF	66
Abb. 17: Die Gesamtzahl der Großen EV nach dem aktuellen Herzrhythmus	67
Abb. 18: Die Vesikelpopulationen nach dem aktuellen Herzrhythmus	69
Abb. 19: Die Subgruppenanalyse der thrombozytären EV nach dem aktuellen HR	70
Abb. 20: Der Einfluss des Vorhofflimmerns auf die Thrombenbildung	72

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Die Materialliste	23
Tab. 2: Die Probenbeschriftung	29
Tab. 3: Die Marker des finalen Protokolls	31
Tab. 4: Die Fluorochrome des finalen Protokolls	33
Tab. 5: Die Einstellungen des Durchflusszytometers	34
Tab. 6: Die zwei Färbepanel	44
Tab. 7: Die Baselinecharakteristika in Abhängigkeit des Vorhofflimmerns	57

8. Literaturverzeichnis

Aass HC, Øvstebø R, Trøseid AM, Kierulf P, Berg JP, Henriksson CE. Fluorescent particles in the antibody solution result in false TF- and CD14-positive microparticles in flow cytometric analysis. *Cytometry A*. 2011; 79: 990-999

Abrams CS, Ellison N, Budzynski AZ, Shattil SJ. Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood*. 1990; 75: 128-138

Admyre C, Grunewald J, Thyberg J, Gripenbäck S, Tornling G, Eklund A, Scheynius A, Gabrielsson S. Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid. *Eur Respir J*. 2003; 22: 578-583

Admyre C, Johansson SM, Paulie S, Gabrielsson S. Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT. *Eur J Immunol*. 2006; 36: 1772-1781

Admyre C, Johansson SM, Qazi KR, Filén JJ, Lahesmaa R, Norman M, Neve EP, Scheynius A, Gabrielsson S. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol*. 2007; 179: 1969-1978

Al Faraj A, Gazeau F, Wilhelm C, Devue C, Guérin CL, Péchoux C, Paradis V, Clément O, Boulanger CM, Rautou PE. Endothelial cell-derived microparticles loaded with iron oxide nanoparticles: feasibility of MR imaging monitoring in mice. *Radiology*. 2012; 263: 169-178

Al-Khatib SM, Thomas L, Wallentin L, Lopes RD, Gersh B, Garcia D, Ezekowitz J, Alings M, Yang H, Alexander JH, Flaker G, Hanna M, Granger CB. Outcomes of apixaban vs. warfarin by type and duration of atrial fibrillation: results from the ARISTOTLE trial. *Eur Heart J*. 2013; 34: 2464-2471

Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol*. 2008; 10: 619-624

Amabile N, Cheng S, Renard JM, Larson MG, Ghorbani A, McCabe E, Griffin G, Guerin

C, Ho JE, Shaw SY, Cohen KS, Vasan RS, Tedgui A, Boulanger CM, Wang TJ. Association of circulating endothelial microparticles with cardiometabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Eur Heart J*. 2014; 35: 2972-2979

Amabile N, Guérin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddaert J, London GM, Tedgui A, Boulanger CM. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16: 3381-3388

Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, Squarcina P, Accornero P, Lozupone F, Lugini L, Stringaro A, Molinari A, Arancia G, Gentile M, Parmiani G, Fais S. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med*. 2002; 195: 1303-1316

Arraud N, Linares R, Tan S, Gounou C, Pasquet JM, Mornet S, Brisson AR. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J Thromb Haemost*. 2014; 12: 614-627

Ayers L, Kohler M, Harrison P, Sargent I, Dragovic R, Schaap M, Nieuwland R, Brooks SA, Ferry B. Measurement of circulating cell-derived microparticles by flow cytometry: sources of variability within the assay. *Thromb Res*. 2011; 127: 370-377

Babst M. A protein's final ESCRT. *Traffic*. 2005; 6: 2-9

Babst M, Katzmann DJ, Snyder WB, Wendland B, Emr SD. Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell*. 2002; 3: 283-289

Balla C, Cappato R. Stroke and mortality risk after atrial fibrillation ablation: lesson from the CABANA trial. *Eur Heart J Suppl*. 2020; 22: L38-L40

Bard MP, Hegmans JP, Hemmes A, Luider TM, Willemsen R, Severijnen LA, van Meerbeeck JP, Burgers SA, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004; 31: 114-121

Barry OP, Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest.* 1997; 99: 2118-2127

Barry OP, Praticò D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest.* 1998; 102: 136-144

Basavaraj MG, Olsen JO, Østerud B, Hansen JB. Differential ability of tissue factor antibody clones on detection of tissue factor in blood cells and microparticles. *Thromb Res.* 2012; 130: 538-546

Battistelli M, Falcieri E. Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. *Biology (Basel).* 2020; 9:

Benjamin EJ, D'Agostino RB, Belanger AJ, Wolf PA, Levy D. Left atrial size and the risk of stroke and death. The Framingham Heart Study. *Circulation.* 1995; 92: 835-841

Benjamin EJ, Levy D, Vaziri SM, D'Agostino RB, Belanger AJ, Wolf PA. Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort. The Framingham Heart Study. *Jama.* 1994; 271: 840-844

Bhatnagar S, Shinagawa K, Castellino FJ, Schorey JS. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood.* 2007; 110: 3234-3244

Bianco F, Perrotta C, Novellino L, Francolini M, Riganti L, Menna E, Saglietti L, Schuchman EH, Furlan R, Clementi E, Matteoli M, Verderio C. Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. *Embo j.* 2009; 28: 1043-1054

Biró E, Sturk-Maquelin KN, Vogel GM, Meuleman DG, Smit MJ, Hack CE, Sturk A, Nieuwland R. Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. *J Thromb Haemost.* 2003; 1: 2561-2568

Blackshear JL, Odell JA. Appendage obliteration to reduce stroke in cardiac surgical patients with atrial fibrillation. *Ann Thorac Surg.* 1996; 61: 755-759

Blanchard N, Lankar D, Faure F, Regnault A, Dumont C, Raposo G, Hivroz C. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J Immunol.* 2002; 168: 3235-3241

Boekstegers P, Hausleiter J, Baldus S, von Bardeleben RS, Beucher H, Butter C, Franzen O, Hoffmann R, Ince H, Kuck KH, Rudolph V, Schäfer U, Schillinger W, Wunderlich N. Interventionelle Behandlung der Mitralklappeninsuffizienz mit dem MitraClip®-Verfahren. *Kardiologe.* 2013; 7:91–104

Bogdanov VY, Cimmino G, Tardos JG, Tunstead JR, Badimon JJ. Assessment of plasma tissue factor activity in patients presenting with coronary artery disease: limitations of a commercial assay. *J Thromb Haemost.* 2009; 7: 894-897

Boldt A, Wetzel U, Lauschke J, Weigl J, Gummert J, Hindricks G, Kottkamp H, Dhein S. Fibrosis in left atrial tissue of patients with atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease. *Heart.* 2004; 90: 400-405

Bouchard BA, Mann KG, Butenas S. No evidence for tissue factor on platelets. *Blood.* 2010; 116: 854-855

Bretscher MS. Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nat New Biol.* 1972; 236: 11-12

Brill A, Dashevsky O, Rivo J, Gozal Y, Varon D. Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization. *Cardiovasc Res.* 2005; 67: 30-38

Brodsky SV, Malinowski K, Golightly M, Jesty J, Goligorsky MS. Plasminogen activator inhibitor-1 promotes formation of endothelial microparticles with procoagulant potential. *Circulation.* 2002; 106: 2372-2378

Butenas S, Bouchard BA, Brummel-Ziedins KE, Parhami-Seren B, Mann KG. Tissue factor activity in whole blood. *Blood.* 2005; 105: 2764-2770

Camm AJ, Breithardt G, Crijns H, Dorian P, Kowey P, Le Heuzey JY, Merioua I, Pedrazzini L, Prystowsky EN, Schwartz PJ, Torp-Pedersen C, Weintraub W. Real-life observations

of clinical outcomes with rhythm- and rate-control therapies for atrial fibrillation RECORDAF (Registry on Cardiac Rhythm Disorders Assessing the Control of Atrial Fibrillation). *J Am Coll Cardiol*. 2011; 58: 493-501

Chirinos JA, Heresi GA, Velasquez H, Jy W, Jimenez JJ, Ahn E, Horstman LL, Soriano AO, Zambrano JP, Ahn YS. Elevation of endothelial microparticles, platelets, and leukocyte activation in patients with venous thromboembolism. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 45: 1467-1471

Chironi G, Simon A, Hugel B, Del Pino M, Gariepy J, Freyssinet JM, Tedgui A. Circulating leukocyte-derived microparticles predict subclinical atherosclerosis burden in asymptomatic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26: 2775-2780

Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, Mutin M, Sanmarco M, Sampol J, Dignat-George F. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest*. 1999; 104: 93-102

Dai S, Wei D, Wu Z, Zhou X, Wei X, Huang H, Li G. Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. *Mol Ther*. 2008; 16: 782-790

Daleke DL. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res*. 2003; 44: 233-242

Darabi M, Kontush A. Phosphatidylserine in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2016; 27: 414-420

Dasgupta SK, Abdel-Monem H, Niravath P, Le A, Bellera RV, Langlois K, Nagata S, Rumbaut RE, Thiagarajan P. Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood*. 2009; 113: 1332-1339

Dasgupta SK, Le A, Chavakis T, Rumbaut RE, Thiagarajan P. Developmental endothelial locus-1 (Del-1) mediates clearance of platelet microparticles by the endothelium. *Circulation*. 2012; 125: 1664-1672

de Gassart A, Geminard C, Fevrier B, Raposo G, Vidal M. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood*. 2003; 102: 4336-4344

De Rosa S, Fichtlscherer S, Lehmann R, Assmus B, Dimmeler S, Zeiher AM. Transcoronary concentration gradients of circulating microRNAs. *Circulation*. 2011; 124: 1936-1944

De Vos CB, Breithardt G, Camm AJ, Dorian P, Kowey PR, Le Heuzey JY, Naditch-Brûlé L, Prystowsky EN, Schwartz PJ, Torp-Pedersen C, Weintraub WS, Crijns HJ. Progression of atrial fibrillation in the REgistry on Cardiac rhythm disORDers assessing the control of Atrial Fibrillation cohort: clinical correlates and the effect of rhythm-control therapy. *Am Heart J*. 2012; 163: 887-893

Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*. 2005; 106: 1604-1611

Delgado V, Di Biase L, Leung M, Romero J, Tops LF, Casadei B, Marrouche N, Bax JJ. Structure and Function of the Left Atrium and Left Atrial Appendage: AF and Stroke Implications. *J Am Coll Cardiol*. 2017; 70: 3157-3172

Depraetere V. "Eat me" signals of apoptotic bodies. *Nat Cell Biol*. 2000; 2: E104

Deutsche Herzstiftung eV, 2021: Deutscher Herzbericht 2019. <https://www.herzstiftung.de/e-paper/#0> (Zugriffsdatum: 09.02.2021)

Diehl P, Fricke A, Sander L, Stamm J, Bassler N, Htun N, Ziemann M, Helbing T, El-Osta A, Jowett JB, Peter K. Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovasc Res*. 2012; 93: 633-644

Dittrich HC, Pearce LA, Asinger RW, McBride R, Webel R, Zabalgaitia M, Pennock GD, Safford RE, Rothbart RM, Halperin JL, Hart RG. Left atrial diameter in nonvalvular atrial fibrillation: An echocardiographic study. *Stroke Prevention in Atrial Fibrillation Investigators*. *Am Heart J*. 1999; 137: 494-499

Eken C, Gasser O, Zenhausern G, Oehri I, Hess C, Schifferli JA. Polymorphonuclear

neutrophil-derived ectosomes interfere with the maturation of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2008; 180: 817-824

Escudier B, Dorval T, Chaput N, André F, Caby MP, Novault S, Flament C, Leboulaire C, Borg C, Amigorena S, Boccaccio C, Bonnerot C, Dhellin O, Movassagh M, Piperno S, Robert C, Serra V, Valente N, Le Pecq JB, Spatz A, Lantz O, Tursz T, Angevin E, Zitvogel L. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J Transl Med.* 2005; 3:

European Metrology Programme for Innovation and Research, 2021: Standardisation of concentration measurements of extracellular vesicles for medical diagnoses. <https://www.metves.eu> (Zugriffsdatum: 15.03.2021)

ExoCarta, 2021: EXOSOME PROTEIN, RNA AND LIPID DATABASE. <http://www.exocarta.org> (Zugriffsdatum: 11.02.2021)

Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E, Celi A, Croce K, Furie BC, Furie B. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med.* 2003; 197: 1585-1598

Fauré J, Lachenal G, Court M, Hirrlinger J, Chatellard-Causse C, Blot B, Grange J, Schoehn G, Goldberg Y, Boyer V, Kirchhoff F, Raposo G, Garin J, Sadoul R. Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol Cell Neurosci.* 2006; 31: 642-648

Feldman T, Foster E, Glower DD, Kar S, Rinaldi MJ, Fail PS, Smalling RW, Siegel R, Rose GA, Engeron E, Loghin C, Trento A, Skipper ER, Fudge T, Letsou GV, Massaro JM, Mauri L. Percutaneous repair or surgery for mitral regurgitation. *N Engl J Med.* 2011; 364: 1395-1406

Feldman T, Kar S, Elmariah S, Smart SC, Trento A, Siegel RJ, Apruzzese P, Fail P, Rinaldi MJ, Smalling RW, Hermiller JB, Heimansohn D, Gray WA, Grayburn PA, Mack MJ, Lim DS, Ailawadi G, Herrmann HC, Acker MA, Silvestry FE, Foster E, Wang A, Glower DD, Mauri L. Randomized Comparison of Percutaneous Repair and Surgery for Mitral Regurgitation: 5-Year Results of EVEREST II. *J Am Coll Cardiol.* 2015; 66: 2844-2854

Feldman T, Kar S, Rinaldi M, Fail P, Hermiller J, Smalling R, Whitlow PL, Gray W, Low R, Herrmann HC, Lim S, Foster E, Glower D. Percutaneous mitral repair with the MitraClip system: safety and midterm durability in the initial EVEREST (Endovascular Valve Edge-to-Edge REpair Study) cohort. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 54: 686-694

Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, Weber M, Hamm CW, Röxe T, Müller-Ardogan M, Bonauer A, Zeiher AM, Dimmeler S. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res.* 2010; 107: 677-684

Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh RF, Wythe JD, Ivey KN, Bruneau BG, Stainier DY, Srivastava D. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell.* 2008; 15: 272-284

Fourcade O, Simon MF, Vioché C, Rugani N, Leballe F, Ragab A, Fournié B, Sarda L, Chap H. Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell.* 1995; 80: 919-927

Ganesan AN, Chew DP, Hartshorne T, Selvanayagam JB, Aylward PE, Sanders P, McGavigan AD. The impact of atrial fibrillation type on the risk of thromboembolism, mortality, and bleeding: a systematic review and meta-analysis. *Eur Heart J.* 2016; 37: 1591-1602

Gao C, Boylan B, Fang J, Wilcox DA, Newman DK, Newman PJ. Heparin promotes platelet responsiveness by potentiating $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -mediated outside-in signaling. *Blood.* 2011; 117: 4946-4952

Gardiner C, Di Vizio D, Sahoo S, Théry C, Witwer KW, Wauben M, Hill AF. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *J Extracell Vesicles.* 2016; 5: 32945

Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, Morham SG, Zavitz KH, Wang HE, Wettstein DA, Stray KM, Côté M, Rich RL, Myszka DG, Sundquist WI. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell.* 2001; 107: 55-65

Geddings JE, Hisada Y, Boulaftali Y, Getz TM, Whelihan M, Fuentes R, Dee R, Cooley

BC, Key NS, Wolberg AS, Bergmeier W, Mackman N. Tissue factor-positive tumor microvesicles activate platelets and enhance thrombosis in mice. *J Thromb Haemost.* 2016; 14: 153-166

Gillooly DJ, Morrow IC, Lindsay M, Gould R, Bryant NJ, Gaullier JM, Parton RG, Stenmark H. Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *Embo j.* 2000; 19: 4577-4588

Goldman ME, Pearce LA, Hart RG, Zabalgoitia M, Asinger RW, Safford R, Halperin JL. Pathophysiologic correlates of thromboembolism in nonvalvular atrial fibrillation: I. Reduced flow velocity in the left atrial appendage (The Stroke Prevention in Atrial Fibrillation [SPAF-III] study). *J Am Soc Echocardiogr.* 1999; 12: 1080-1087

Gould SJ, Booth AM, Hildreth JE. The Trojan exosome hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 10592-10597

Gray WD, Mitchell AJ, Searles CD. An accurate, precise method for general labeling of extracellular vesicles. *MethodsX.* 2015; 2: 360-367

Grayburn PA, Sannino A, Packer M. Proportionate and Disproportionate Functional Mitral Regurgitation: A New Conceptual Framework That Reconciles the Results of the MITRA-FR and COAPT Trials. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2019; 12: 353-362

György B, Módos K, Pállinger E, Pálóczi K, Pásztói M, Misják P, Deli MA, Sipos A, Szalai A, Voszka I, Polgár A, Tóth K, Csete M, Nagy G, Gay S, Falus A, Kittel A, Buzás EI. Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood.* 2011; 117: 39-48

Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature.* 2002; 417: 182-187

Haraszi RA, Didiot MC, Sapp E, Leszyk J, Shaffer SA, Rockwell HE, Gao F, Narain NR, DiFiglia M, Kiebish MA, Aronin N, Khvorova A. High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *J Extracell Vesicles.* 2016; 5:

Harding C, Heuser J, Stahl P. Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. *Eur J Cell Biol.* 1984; 35: 256-263

Hart RG. Cardiogenic embolism to the brain. *Lancet.* 1992; 339: 589-594

Hauser P, Wang S, Didenko VV. Apoptotic Bodies: Selective Detection in Extracellular Vesicles. *Methods Mol Biol.* 2017; 1554: 193-200

Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood.* 1999; 94: 3791-3799

Henry WL, Morganroth J, Pearlman AS, Clark CE, Redwood DR, Itscoitz SB, Epstein SE. Relation between echocardiographically determined left atrial size and atrial fibrillation. *Circulation.* 1976; 53: 273-279

Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood.* 2004; 104: 2761-2766

Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda).* 2005; 20: 22-27

Inaba O, Yamauchi Y, Sekigawa M, Miwa N, Yamaguchi J, Nagata Y, Obayashi T, Miyamoto T, Kamata T, Isobe M, Goya M, Hirao K. Atrial fibrillation type matters: greater infarct volume and worse neurological defects seen in acute cardiogenic cerebral embolism due to persistent or permanent rather than paroxysmal atrial fibrillation. *Europace.* 2018; 20: 1591-1597

Jamaly S, Basavaraj MG, Starikova I, Olsen R, Braekkan SK, Hansen JB. Elevated plasma levels of P-selectin glycoprotein ligand-1-positive microvesicles in patients with unprovoked venous thromboembolism. *J Thromb Haemost.* 2018a: 1546–1554

Jamaly S, Ramberg C, Olsen R, Latysheva N, Webster P, Sovershaev T, Brækkan SK, Hansen JB. Impact of preanalytical conditions on plasma concentration and size

distribution of extracellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Sci Rep.* 2018b; 8:

Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, Marquez-Curtis L, Machalinski B, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer.* 2005; 113: 752-760

Jansen F, Yang X, Hoelscher M, Cattelan A, Schmitz T, Proebsting S, Wenzel D, Vosen S, Franklin BS, Fleischmann BK, Nickenig G, Werner N. Endothelial microparticle-mediated transfer of MicroRNA-126 promotes vascular endothelial cell repair via SPRED1 and is abrogated in glucose-damaged endothelial microparticles. *Circulation.* 2013; 128: 2026-2038

Jansen F, Yang X, Hoyer FF, Paul K, Heiermann N, Becher MU, Abu Hussein N, Kobschull M, Bedorf J, Franklin BS, Latz E, Nickenig G, Werner N. Endothelial microparticle uptake in target cells is annexin I/phosphatidylserine receptor dependent and prevents apoptosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32: 1925-1935

Jansen F, Yang X, Proebsting S, Hoelscher M, Przybilla D, Baumann K, Schmitz T, Dolf A, Endl E, Franklin BS, Sinning JM, Vasa-Nicotera M, Nickenig G, Werner N. MicroRNA expression in circulating microvesicles predicts cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *J Am Heart Assoc.* 2014; 3:

Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Soderland C, Horstman LL, Ahn YS. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb Res.* 2003; 109: 175-180

Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem.* 1987; 262: 9412-9420

Johnstone RM, Adam M, Pan BT. The fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro. *Can J Biochem Cell Biol.* 1984; 62: 1246-1254

Jørgensen M, Bæk R, Pedersen S, Søndergaard EK, Kristensen SR, Varming K.

Extracellular Vesicle (EV) Array: microarray capturing of exosomes and other extracellular vesicles for multiplexed phenotyping. *J Extracell Vesicles*. 2013; 2:

Jung KH, Chu K, Lee ST, Park HK, Bahn JJ, Kim DH, Kim JH, Kim M, Kun Lee S, Roh JK. Circulating endothelial microparticles as a marker of cerebrovascular disease. *Ann Neurol*. 2009; 66: 191-199

Kannel WB, Feinleib M, McNamara PM, Garrison RJ, Castelli WP. An investigation of coronary heart disease in families. The Framingham offspring study. *Am J Epidemiol*. 1979; 110: 281-290

Karlsson M, Lundin S, Dahlgren U, Kahu H, Pettersson I, Telemo E. "Tolerosomes" are produced by intestinal epithelial cells. *Eur J Immunol*. 2001; 31: 2892-2900

Keller S, Ridinger J, Rupp AK, Janssen JW, Altevogt P. Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics. *J Transl Med*. 2011; 9:

Kim CW, Lee HM, Lee TH, Kang C, Kleinman HK, Gho YS. Extracellular membrane vesicles from tumor cells promote angiogenesis via sphingomyelin. *Cancer Res*. 2002; 62: 6312-6317

Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, Ahlsson A, Atar D, Casadei B, Castella M, Diener HC, Heidbuchel H, Hendriks J, Hindricks G, Manolis AS, Oldgren J, Popescu BA, Schotten U, Van Putte B, Vardas P. 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. *Eur Heart J*. 2016; 37: 2893-2962

Kirchhof P, Camm AJ, Goette A, Brandes A, Eckardt L, Elvan A, Fetsch T, van Gelder IC, Haase D, Haegeli LM, Hamann F, Heidbüchel H, Hindricks G, Kautzner J, Kuck KH, Mont L, Ng GA, Rekosz J, Schoen N, Schotten U, Suling A, Taggeselle J, Themistoclakis S, Vettorazzi E, Vardas P, Wegscheider K, Willems S, Crijns H, Breithardt G. Early Rhythm-Control Therapy in Patients with Atrial Fibrillation. *N Engl J Med*. 2020; 383: 1305-1316

Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK, Farb A, Guerrero LJ, Hayase M, Kutys R, Narula J, Finn AV, Virmani R. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med*. 2003; 349: 2316-2325

Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994; 84: 1415-1420

Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, Dingli F, Loew D, Tkach M, Théry C. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113: E968-977

Lacroix R, Judicone C, Mooberry M, Boucekine M, Key NS, Dignat-George F. Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J Thromb Haemost*. 2013; 11: 1190–1193

Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, Robert S, Arnaud L, Sampol J, Dignat-George F. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *J Thromb Haemost*. 2012; 10: 437-446

Leroyer AS, Isobe H, Lesèche G, Castier Y, Wassef M, Mallat Z, Binder BR, Tedgui A, Boulanger CM. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 49: 772-777

Lloyd-Jones DM, Wang TJ, Leip EP, Larson MG, Levy D, Vasan RS, D'Agostino RB, Massaro JM, Beiser A, Wolf PA, Benjamin EJ. Lifetime risk for development of atrial fibrillation: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2004; 110: 1042-1046

Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, Gho YS, Kurochkin IV, Mathivanan S, Quesenberry P, Sahoo S, Tahara H, Wauben MH, Witwer KW, Théry C. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2014; 3:

Loyer X, Vion AC, Tedgui A, Boulanger CM. Microvesicles as cell-cell messengers in cardiovascular diseases. *Circ Res*. 2014; 114: 345-353

Luzio JP, Rous BA, Bright NA, Pryor PR, Mullock BM, Piper RC. Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J Cell Sci.* 2000; 113 (Pt 9): 1515-1524

Mack M, Kleinschmidt A, Brühl H, Klier C, Nelson PJ, Cihak J, Plachý J, Stangassinger M, Erfle V, Schlöndorff D. Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat Med.* 2000; 6: 769-775

Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2000; 101: 841-843

Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Lesèche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation.* 1999; 99: 348-353

Manno S, Takakuwa Y, Mohandas N. Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 1943-1948

Martin S, Tesse A, Hugel B, Martínez MC, Morel O, Freyssinet JM, Andriantsitohaina R. Shed membrane particles from T lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression. *Circulation.* 2004; 109: 1653-1659

Martinez MC, Andriantsitohaina R. Microparticles in angiogenesis: therapeutic potential. *Circ Res.* 2011; 109: 110-119

Masyuk AI, Huang BQ, Ward CJ, Gradilone SA, Banales JM, Masyuk TV, Radtke B, Splinter PL, LaRusso NF. Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010; 299: G990-G999

Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, Le Bleu VS, Mittendorf EA, Weitz J, Rahbari N, Reissfelder C, Pilarsky C, Fraga MF, Piwnica-Worms

D, Kalluri R. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*. 2015; 523: 177-182

Miyanishi M, Tada K, Koike M, Uchiyama Y, Kitamura T, Nagata S. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature*. 2007; 450: 435-439

Miyazaki Y, Nomura S, Miyake T, Kagawa H, Kitada C, Taniguchi H, Komiyama Y, Fujimura Y, Ikeda Y, Fukuhara S. High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. *Blood*. 1996; 88: 3456-3464

Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan ML, Karlsson JM, Baty CJ, Gibson GA, Erdos G, Wang Z, Milosevic J, Tkacheva OA, Divito SJ, Jordan R, Lyons-Weiler J, Watkins SC, Morelli AE. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*. 2012; 119: 756-766

Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011; 31: 15-26

Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, Sullivan ML, Stolz DB, Papworth GD, Zahorchak AF, Logar AJ, Wang Z, Watkins SC, Falo Jr. LD, Thomson AW. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*. 2004; 104: 3257-3266

Mørk M, Andreassen JJ, Rasmussen LH, Lip GYH, Pedersen S, Bæk R, Jørgensen MM, Kristensen SR. Elevated blood plasma levels of tissue factor-bearing extracellular vesicles in patients with atrial fibrillation. *Thromb Res*. 2019; 173: 141-150

Morse MA, Garst J, Osada T, Khan S, Hobeika A, Clay TM, Valente N, Shreeniwas R, Sutton MA, Delcayre A, Hsu DH, Le Pecq JB, Lyerly HK. A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Transl Med*. 2005; 3:

Mortaza S, Martinez MC, Baron-Menguy C, Burban M, de la Bourdonnaye M, Fizanne L, Pierrot M, Calès P, Henrion D, Andriantsitohaina R, Mercat A, Asfar P, Meziani F. Detrimental hemodynamic and inflammatory effects of microparticles originating from septic rats. *Crit Care Med*. 2009; 37: 2045-2050

Müller I, Klocke A, Alex M, Kotzsch M, Luther T, Morgenstern E, Zieseniss S, Zahler S, Preissner K, Engelmann B. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *Faseb j.* 2003; 17: 476-478

Mullier F, Bailly N, Chatelain C, Dogné JM, Chatelain B. More on: calibration for the measurement of microparticles: needs, interests, and limitations of calibrated polystyrene beads for flow cytometry-based quantification of biological microparticles. *J Thromb Haemost.* 2011; 9: 1679-1681; author reply 1681-1672

Nolte-'t Hoen EN, Buermans HP, Waasdorp M, Stoorvogel W, Wauben MH, t Hoen PA. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40: 9272-9285

Nolte-'t Hoen EN, Buschow SI, Anderton SM, Stoorvogel W, Wauben MH. Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. *Blood.* 2009; 113: 1977-1981

Nozaki T, Sugiyama S, Koga H, Sugamura K, Ohba K, Matsuzawa Y, Sumida H, Matsui K, Jinnouchi H, Ogawa H. Significance of a multiple biomarkers strategy including endothelial dysfunction to improve risk stratification for cardiovascular events in patients at high risk for coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 54: 601-608

Obadia JF, Messika-Zeitoun D, Leurent G, lung B, Bonnet G, Piriou N, Lefèvre T, Piot C, Rouleau F, Carrié D, Nejjari M, Ohlmann P, Leclercq F, Saint Etienne C, Teiger E, Leroux L, Karam N, Michel N, Gilard M, Donal E, Trochu JN, Cormier B, Armoiry X, Boutitie F, Maucort-Boulch D, Barnel C, Samson G, Guerin P, Vahanian A, Mewton N. Percutaneous Repair or Medical Treatment for Secondary Mitral Regurgitation. *N Engl J Med.* 2018; 379: 2297-2306

Ohno S, Takanashi M, Sudo K, Ueda S, Ishikawa A, Matsuyama N, Fujita K, Mizutani T, Ohgi T, Ochiya T, Gotoh N, Kuroda M. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Mol Ther.* 2013; 21: 185-191

Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell.* 1983; 33: 967-978

Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol.* 1985; 101: 942-948

Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, García-Santos G, Ghajar C, Nitadori-Hoshino A, Hoffman C, Badal K, Garcia BA, Callahan MK, Yuan J, Martins VR, Skog J, Kaplan RN, Brady MS, Wolchok JD, Chapman PB, Kang Y, Bromberg J, Lyden D. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med.* 2012; 18: 883-891

Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 13368-13373

Pornillos O, Alam SL, Rich RL, Myszka DG, Davis DR, Sundquist WI. Structure and functional interactions of the Tsg101 UEV domain. *Embo j.* 2002a; 21: 2397-2406

Pornillos O, Garrus JE, Sundquist WI. Mechanisms of enveloped RNA virus budding. *Trends Cell Biol.* 2002b; 12: 569-579

Porto I, Biasucci LM, De Maria GL, Leone AM, Niccoli G, Burzotta F, Trani C, Tritarelli A, Vergallo R, Liuzzo G, Crea F. Intracoronary microparticles and microvascular obstruction in patients with ST elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous intervention. *Eur Heart J.* 2012; 33: 2928-2938

Raiborg C, Bremnes B, Mehlum A, Gillooly DJ, D'Arrigo A, Stang E, Stenmark H. FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *J Cell Sci.* 2001; 114: 2255-2263

Ramacciotti E, Hawley AE, Farris DM, Ballard NE, Wroblewski SK, Myers Jr. DD, Henke PK, Wakefield TW. Leukocyte- and platelet-derived microparticles correlate with thrombus weight and tissue factor activity in an experimental mouse model of venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 2009; 101: 748-754

Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ.

B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med.* 1996; 183: 1161-1172

Raposo G, Tenza D, Mecheri S, Peronet R, Bonnerot C, Desaymard C. Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol Biol Cell.* 1997; 8: 2631-2645

Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, Ratajczak MZ. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia.* 2006; 20: 847-856

Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, Badimon JJ, Hember J, Riederer MA, Nemerson Y. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood.* 2000; 96: 170-175

Rectenwald JE, Myers Jr. DD, Hawley AE, Longo C, Henke PK, Guire KE, Schmaier AH, Wakefield TW. D-dimer, P-selectin, and microparticles: novel markers to predict deep venous thrombosis. A pilot study. *Thromb Haemost.* 2005; 94: 1312-1317

Saglietto A, De Ponti R, Di Biase L, Matta M, Gaita F, Romero J, De Ferrari GM, Anselmino M. Impact of atrial fibrillation catheter ablation on mortality, stroke, and heart failure hospitalizations: A meta-analysis. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2020; 31: 1040-1047

Saman S, Kim W, Raya M, Visnick Y, Miro S, Saman S, Jackson B, McKee AC, Alvarez VE, Lee NC, Hall GF. Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 2012; 287: 3842-3849

Sarlon-Bartoli G, Bennis Y, Lacroix R, Piercecchi-Marti MD, Bartoli MA, Arnaud L, Mancini J, Boudes A, Sarlon E, Thevenin B, Leroyer AS, Squarcioni C, Magnan PE, Dignat-George F, Sabatier F. Plasmatic level of leukocyte-derived microparticles is associated with unstable plaque in asymptomatic patients with high-grade carotid stenosis. *J Am Coll Cardiol.* 2013; 62: 1436-1441

Satta N, Freyssinet JM, Toti F. The significance of human monocyte thrombomodulin

during membrane vesiculation and after stimulation by lipopolysaccharide. *Br J Haematol.* 1997; 96: 534-542

Segura E, Guérin C, Hogg N, Amigorena S, Théry C. CD8⁺ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo. *J Immunol.* 2007; 179: 1489-1496

Sheldon H, Heikamp E, Turley H, Dragovic R, Thomas P, Oon CE, Leek R, Edelmann M, Kessler B, Sainson RC, Sargent I, Li JL, Harris AL. New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by Delta-like 4 incorporation into exosomes. *Blood.* 2010; 116: 2385-2394

Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, Koopmeiners L, Key NS, Heibel RP. Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood.* 2003; 102: 2678-2683

Simak J, Gelderman MP, Yu H, Wright V, Baird AE. Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. *J Thromb Haemost.* 2006; 4: 1296-1302

Sinning JM, Losch J, Walenta K, Böhm M, Nickenig G, Werner N. Circulating CD31⁺/Annexin V⁺ microparticles correlate with cardiovascular outcomes. *Eur Heart J.* 2011; 32: 2034-2041

Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry Jr. WT, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.* 2008; 10: 1470-1476

Skriner K, Adolph K, Jungblut PR, Burmester GR. Association of citrullinated proteins with synovial exosomes. *Arthritis Rheum.* 2006; 54: 3809-3814

Sluijter JPG, Davidson SM, Boulanger CM, Buzás EI, de Kleijn DPV, Engel FB, Giricz Z, Hausenloy DJ, Kishore R, Lecour S, Leor J, Madonna R, Perrino C, Prunier F, Sahoo S, Schiffelers RM, Schulz R, Van Laake LW, Ytrehus K, Ferdinandy P. 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.* 2018; 114: 19-34

Smyth T, Kullberg M, Malik N, Smith-Jones P, Graner MW, Anchordoquy TJ. Biodistribution and delivery efficiency of unmodified tumor-derived exosomes. *J Control Release.* 2015; 199: 145-155

Sódar BW, Kittel Á, Pálóczi K, Vukman KV, Osteikoetxea X, Szabó-Taylor K, Németh A, Sperlágh B, Baranyai T, Giricz Z, Wiener Z, Turiák L, Drahos L, Pállinger É, Vékey K, Ferdinandy P, Falus A, Buzás EI. Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection. *Sci Rep.* 2016; 6: 24316

Statistisches Bundesamt, 2021a: Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen. <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html> (Zugriffsdatum: 09.02.2021)

Statistisches Bundesamt, 2021b: Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachen die höchsten Kosten. https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2017/09/PD17_347_236.html (Zugriffsdatum: 09.02.2021)

Statistisches Bundesamt, 2021c: Statistik der schwerbehinderten Menschen - Kurzbericht 2019. https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Behinderte-Menschen/_inhalt.html (Zugriffsdatum: 09.02.2021)

Statistisches Bundesamt, 2021d: Zahl der Todesfälle im Jahr 2019 um 1,6 % gesunken. <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/todesfaelle.html> (Zugriffsdatum: 09.02.2021)

Steppich B, Mattisek C, Sobczyk D, Kastrati A, Schömig A, Ott I. Tissue factor pathway inhibitor on circulating microparticles in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 2005; 93: 35-39

Stone GW, Lindenfeld J, Abraham WT, Kar S, Lim DS, Mishell JM, Whisenant B, Grayburn PA, Rinaldi M, Kapadia SR, Rajagopal V, Sarembock IJ, Brieke A, Marx SO, Cohen DJ, Weissman NJ, Mack MJ. Transcatheter Mitral-Valve Repair in Patients with Heart Failure. *N Engl J Med.* 2018; 379: 2307-2318

Street JM, Barran PE, Mackay CL, Weidt S, Balmforth C, Walsh TS, Chalmers RT, Webb DJ, Dear JW. Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid. *J Transl Med.* 2012; 10:

Stuart MC, Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RF, Reutelingsperger CP, Frederik PM. Ultrastructural detection of surface exposed phosphatidylserine on activated blood platelets. *Thromb Haemost.* 1995; 74: 1145-1151

Suades R, Padró T, Alonso R, Mata P, Badimon L. Lipid-lowering therapy with statins reduces microparticle shedding from endothelium, platelets and inflammatory cells. *Thromb Haemost.* 2013; 110: 366-377

Suades R, Padró T, Vilahur G, Badimon L. Circulating and platelet-derived microparticles in human blood enhance thrombosis on atherosclerotic plaques. *Thromb Haemost.* 2012; 108: 1208-1219

Suades R, Padró T, Vilahur G, Martin-Yuste V, Sabaté M, Sans-Roselló J, Sionis A, Badimon L. Growing thrombi release increased levels of CD235a(+) microparticles and decreased levels of activated platelet-derived microparticles. Validation in ST-elevation myocardial infarction patients. *J Thromb Haemost.* 2015; 13: 1776-1786

Thamilarasan M, Klein AL. Factors relating to left atrial enlargement in atrial fibrillation: "chicken or the egg" hypothesis. *Am Heart J.* 1999; 137: 381-383

The EV Flow Cytometry Working Group, 2021: Home. <http://www.evflowcytometry.org> (Zugriffdatum: 15.03.2021)

The Stroke Prevention in Atrial Fibrillation Investigators Committee on Echocardiography. Transesophageal echocardiographic correlates of thromboembolism in high-risk patients with nonvalvular atrial fibrillation. *Ann Intern Med.* 1998; 128: 639-647

Théry C, Boussac M, Véron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, Amigorena S. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol.* 2001; 166: 7309-7318

Théry C, Duban L, Segura E, Véron P, Lantz O, Amigorena S. Indirect activation of naïve CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol.* 2002; 3: 1156-1162

Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9: 581-593

Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, Ayre DC, Bach JM, Bachurski D, Baharvand H, Balaj L, Baldacchino S, Bauer NN, Baxter AA, Bebawy M, Beckham C, Bedina Zavec A, Benmoussa A, Berardi AC, Bergese P, Bielska E, Blenkiron C, Bobis-Wozowicz S, Boilard E, Boireau W, Bongiovanni A, Borràs FE, Bosch S, Boulanger CM, Breakefield X, Breglio AM, Brennan M, Brigstock DR, Brisson A, Broekman ML, Bromberg JF, Bryl-Górecka P, Buch S, Buck AH, Burger D, Busatto S, Buschmann D, Bussolati B, Buzás EI, Byrd JB, Camussi G, Carter DR, Caruso S, Chamley LW, Chang YT, Chen C, Chen S, Cheng L, Chin AR, Clayton A, Clerici SP, Cocks A, Cocucci E, Coffey RJ, Cordeiro-da-Silva A, Couch Y, Coumans FA, Coyle B, Crescitelli R, Criado MF, D'Souza-Schorey C, Das S, Datta Chaudhuri A, de Candia P, De Santana EF, De Wever O, Del Portillo HA, Demaret T, Deville S, Devitt A, Dhondt B, Di Vizio D, Dieterich LC, Dolo V, Dominguez Rubio AP, Dominici M, Dourado MR, Driedonks TA, Duarte FV, Duncan HM, Eichenberger RM, Ekström K, El Andaloussi S, Elie-Caille C, Erdbrügger U, Falcón-Pérez JM, Fatima F, Fish JE, Flores-Bellver M, Försonits A, Frelet-Barrand A, Fricke F, Fuhrmann G, Gabrielsson S, Gámez-Valero A, Gardiner C, Gärtner K, Gaudin R, Gho YS, Giebel B, Gilbert C, Gimona M, Giusti I, Goberdhan DC, Görgens A, Gorski SM, Greening DW, Gross JC, Gualerzi A, Gupta GN, Gustafson D, Handberg A, Haraszti RA, Harrison P, Hegyesi H, Hendrix A, Hill AF, Hochberg FH, Hoffmann KF, Holder B, Holthofer H, Hosseinkhani B, Hu G, Huang Y, Huber V, Hunt S, Ibrahim AG, Ikezu T, Inal JM, Isin M, Ivanova A, Jackson HK, Jacobsen S, Jay SM, Jayachandran M, Jenster G, Jiang L, Johnson SM, Jones JC, Jong A, Jovanovic-Talisman T, Jung S, Kalluri R, Kano SI, Kaur S, Kawamura Y, Keller ET, Khamari D, Khomyakova E, Khvorova A, Kierulf P, Kim KP, Kislinger T, Klingeborn

M, Klinke 2nd DJ, Kornek M, Kosanović MM, Kovács Á F, Krämer-Albers EM, Krasemann S, Krause M, Kurochkin IV, Kusuma GD, Kuypers S, Laitinen S, Langevin SM, Languino LR, Lannigan J, Lässer C, Laurent LC, Lavieu G, Lázaro-Ibáñez E, Le Lay S, Lee MS, Lee YXF, Lemos DS, Lenassi M, Leszczynska A, Li IT, Liao K, Libregts SF, Ligeti E, Lim R, Lim SK, Linē A, Linnemannstöns K, Llorente A, Lombard CA, Lorenowicz MJ, Lörincz Á M, Lötvall J, Lovett J, Lowry MC, Loyer X, Lu Q, Lukomska B, Lunavat TR, Maas SL, Malhi H, Marcilla A, Mariani J, Mariscal J, Martens-Uzunova ES, Martin-Jaular L, Martinez MC, Martins VR, Mathieu M, Mathivanan S, Maugeri M, McGinnis LK, McVey MJ, Meckes Jr. DG, Meehan KL, Mertens I, Minciacchi VR, Möller A, Møller Jørgensen M, Morales-Kastresana A, Morhayim J, Mullier F, Muraca M, Musante L, Mussack V, Muth DC, Myburgh KH, Najrana T, Nawaz M, Nazarenko I, Nejsun P, Neri C, Neri T, Nieuwland R, Nimrichter L, Nolan JP, Nolte-'t Hoen EN, Noren Hooten N, O'Driscoll L, O'Grady T, O'Loghlen A, Ochiya T, Olivier M, Ortiz A, Ortiz LA, Osteikoetxea X, Østergaard O, Ostrowski M, Park J, Pegtel DM, Peinado H, Perut F, Pfaffl MW, Phinney DG, Pieters BC, Pink RC, Pisetsky DS, Pogge von Strandmann E, Polakovicova I, Poon IK, Powell BH, Prada I, Pulliam L, Quesenberry P, Radeghieri A, Raffai RL, Raimondo S, Rak J, Ramirez MI, Raposo G, Rayyan MS, Regev-Rudzki N, Ricklefs FL, Robbins PD, Roberts DD, Rodrigues SC, Rohde E, Rome S, Rouschop KM, Rughetti A, Russell AE, Saá P, Sahoo S, Salas-Huenuleo E, Sánchez C, Saugstad JA, Saul MJ, Schiffelers RM, Schneider R, Schøyen TH, Scott A, Shahaj E, Sharma S, Shatnyeva O, Shekari F, Shelke GV, Shetty AK, Shiba K, Siljander PR, Silva AM, Skowronek A, Snyder 2nd OL, Soares RP, Sódar BW, Soekmadji C, Sotillo J, Stahl PD, Stoorvogel W, Stott SL, Strasser EF, Swift S, Tahara H, Tewari M, Timms K, Tiwari S, Tixeira R, Tkach M, Toh WS, Tomasini R, Torrecilhas AC, Tosar JP, Toxavidis V, Urbanelli L, Vader P, van Balkom BW, van der Grein SG, Van Deun J, van Herwijnen MJ, Van Keuren-Jensen K, van Niel G, van Royen ME, van Wijnen AJ, Vasconcelos MH, Vechetti Jr. IJ, Veit TD, Vella LJ, Velot É, Verweij FJ, Vestad B, Viñas JL, Visnovitz T, Vukman KV, Wahlgren J, Watson DC, Wauben MH, Weaver A, Webber JP, Weber V, Wehman AM, Weiss DJ, Welsh JA, Wendt S, Wheelock AM, Wiener Z, Witte L, Wolfram J, Xagorari A, Xander P, Xu J, Yan X, Yáñez-Mó M, Yin H, Yuana Y, Zappulli V, Zarubova J, Žėkas V, Zhang JY, Zhao Z, Zheng L, Zheutlin AR, Zickler AM, Zimmermann P, Zivkovic AM, Zocco D, Zuba-Surma EK. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the

International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018; 7:

Thulin Å, Lindbäck J, Granger CB, Wallentin L, Lind L, Siegbahn A. Extracellular vesicles in atrial fibrillation and stroke. *Thromb Res*. 2020; 193: 180-189

Trams EG, Lauter CJ, Salem Jr. N, Heine U. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 1981; 645: 63-70

Tsukamoto H, Takei I, Ishii K, Watanabe K. Simplified method for the diameter sizing of serum low-density lipoprotein using polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Clin Chem Lab Med*. 2004; 42: 1009-1012

Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007; 9: 654-659

van der Pol E, Coumans FA, Grootemaat AE, Gardiner C, Sargent IL, Harrison P, Sturk A, van Leeuwen TG, Nieuwland R. Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *J Thromb Haemost*. 2014; 12: 1182-1192

van der Pol E, van Gemert MJ, Sturk A, Nieuwland R, van Leeuwen TG. Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. *J Thromb Haemost*. 2012; 10: 919-930

van der Zee PM, Biró E, Ko Y, de Winter RJ, Hack CE, Sturk A, Nieuwland R. P-selectin- and CD63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease and myocardial infarction. *Clin Chem*. 2006; 52: 657-664

Van Deun J, Mestdagh P, Agostinis P, Akay Ö, Anand S, Anckaert J, Martinez ZA, Baetens T, Beghein E, Bertier L, Berx G, Boere J, Boukouris S, Bremer M, Buschmann D, Byrd JB, Casert C, Cheng L, Cmoch A, Daveloose D, De Smedt E, Demirsoy S, Depoorter V, Dhondt B, Driedonks TA, Dudek A, Elsharawy A, Floris I, Foers AD, Gärtner

K, Garg AD, Geurickx E, Gettemans J, Ghazavi F, Giebel B, Kormelink TG, Hancock G, Helsmoortel H, Hill AF, Hyenne V, Kalra H, Kim D, Kowal J, Kraemer S, Leidinger P, Leonelli C, Liang Y, Lippens L, Liu S, Lo Cicero A, Martin S, Mathivanan S, Mathiyalagan P, Matusek T, Milani G, Monguió-Tortajada M, Mus LM, Muth DC, Németh A, Nolte-'t Hoen EN, O'Driscoll L, Palmulli R, Pfaffl MW, Primdal-Bengtson B, Romano E, Rousseau Q, Sahoo S, Sampaio N, Samuel M, Scicluna B, Soen B, Steels A, Swinnen JV, Takatalo M, Thaminy S, Théry C, Tulkens J, Van Audenhove I, van der Grein S, Van Goethem A, van Herwijnen MJ, Van Niel G, Van Roy N, Van Vliet AR, Vandamme N, Vanhauwaert S, Vergauwen G, Verweij F, Wallaert A, Wauben M, Witwer KW, Zonneveld MI, De Wever O, Vandesompele J, Hendrix A. EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nat Methods*. 2017; 14: 228-232

van Niel G, Raposo G, Candalh C, Boussac M, Hershberg R, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology*. 2001; 121: 337-349

Vaziri SM, Larson MG, Benjamin EJ, Levy D. Echocardiographic predictors of nonrheumatic atrial fibrillation. The Framingham Heart Study. *Circulation*. 1994; 89: 724-730

Wang M, Fu Y, Xu L, Xiao L, Yue Y, Liu S, Huang Q, Li S, Li Y. Diagnostic value of platelet-derived microparticles in pulmonary thromboembolism: A population-based study. *Exp Ther Med*. 2018; 16: 3099-3106

Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell*. 2008; 15: 261-271

Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Kosiol S, Nickenig G. Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26: 112-116

Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation*. 1995; 92: 1954-1968

Willekens FL, Werre JM, Kruijt JK, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Groenen-Döpp YA, van den Bos AG, Bosman GJ, van Berkel TJ. Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood*. 2005; 105: 2141-2145

Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, Nolte-'t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, Théry C, Wauben MH, Hochberg F. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*. 2013; 2:

Witwer KW, Théry C. Extracellular vesicles or exosomes? On primacy, precision, and popularity influencing a choice of nomenclature. *J Extracell Vesicles*. 2019; 8:

Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*. 1967; 13: 269-288

Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. *Stroke*. 1991; 22: 983-988

Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Théry C, Masurier C, Flament C, Pouzieux S, Faure F, Tursz T, Angevin E, Amigorena S, Zitvogel L. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med*. 2001; 7: 297-303

World Health Organisation, 2021: Global health estimates: Leading causes of death. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death> (Zugriffsdatum: 09.02.2021)

Wyse DG, Waldo AL, Di Marco JP, Domanski MJ, Rosenberg Y, Schron EB, Kellen JC, Greene HL, Mickel MC, Dalquist JE, Corley SD. A comparison of rate control and rhythm control in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2002; 347: 1825-1833

Yuana Y, Böing AN, Grootemaat AE, van der Pol E, Hau CM, Cizmar P, Buhr E, Sturk A, Nieuwland R. Handling and storage of human body fluids for analysis of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2015; 4: 29260

Yuana Y, Levels J, Grootemaat A, Sturk A, Nieuwland R. Co-isolation of extracellular vesicles and high-density lipoproteins using density gradient ultracentrifugation. *J Extracell Vesicles*. 2014; 3:

Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Bonora E, Shah A, Willeit J, Mayr M. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res*. 2010; 107: 810-817

Zeelenberg IS, Ostrowski M, Krumeich S, Bobrie A, Jancic C, Boissonnas A, Delcayre A, Le Pecq JB, Combadière B, Amigorena S, Théry C. Targeting tumor antigens to secreted membrane vesicles in vivo induces efficient antitumor immune responses. *Cancer Res*. 2008; 68: 1228-1235

Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, Hristov M, Köppel T, Jahantigh MN, Lutgens E, Wang S, Olson EN, Schober A, Weber C. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal*. 2009; 2: ra81

Zhou H, Pisitkun T, Aponte A, Yuen PS, Hoffert JD, Yasuda H, Hu X, Chawla L, Shen RF, Knepper MA, Star RA. Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. *Kidney Int*. 2006; 70: 1847-1857

Zietzer A, Al-Kassou B, Jamme P, Rolfes V, Steffen E, Bulic M, Hosen MR, Goody PR, Tiyerili V, Zimmer S, Schrickel JW, Sedaghat A, Franklin BS, Werner N, Nickenig G, Jansen F. Large extracellular vesicles in the left atrial appendage in patients with atrial fibrillation-the missing link? *Clin Res Cardiol*. 2021:

Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med*. 1998; 4: 594-600

Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood*. 1997; 89: 1121-1132

Zwicker JI, Liebman HA, Neuberg D, Lacroix R, Bauer KA, Furie BC, Furie B. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clin Cancer Res.* 2009; 15: 6830-6840

9. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. Felix Jansen für die Bereitstellung des Forschungsthemas und seine sehr geschätzten Ratschläge.

Ein besonderer Dank gilt den Betreuern der Studie Herrn Dr. Andreas Zietzer und Herrn Dr. Baravan Al-Kassou für ihre unermüdliche Unterstützung zu jeder Zeit.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Georg Nickenig, der in der Kardiologie des UKB exzellente Forschungsbedingungen geschaffen hat.

Ihm und Herrn Prof. Dr. Nikos Werner, Herrn Prof. Dr. Jan-Malte Sinning und Herrn Priv.-Doz. Dr. Lutz Büllsfeld danke ich für die Entnahme von Blutproben im Herzkatheterlabor.

Ich danke Herrn Andreas Dolf für die Einführung in die Durchflusszytometrie.