

Aus der Klinik für Hämatologie und Onkologie
Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Nikolas von Bubnoff

Charakterisierung extrazellulärer Vesikel des Blasenkarzinoms aus dem Urin von Erkrankten

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Universität zu Lübeck
- **Aus der Sektion Medizin** -

Vorgelegt von
Piet Zamzow
aus der Hansestadt Stade

Lübeck 2025



1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Frank Gieseler
Ko-Betreuer: Prof. Dr. med. Karl-Friedrich Klotz
2. Berichterstatter: PD Dr. med. Clemens Mathias Rosenbaum
Tag der mündlichen Prüfung: Lübeck, der 10.04.2025
Zum Druck genehmigt: Lübeck, der 23.04.2025
Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Maligne Erkrankungen der Harnblase	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Pathologie des Blasenkarzinoms	2
1.1.3 Risikofaktoren und Ätiologie des Blasenkarzinoms	4
1.1.4 Klinik und Diagnostik des Blasenkarzinoms.....	6
1.1.5 Therapie des Blasenkarzinoms	6
1.2 Extrazelluläre Vesikel	8
1.2.1 Definition und Nomenklatur	8
1.2.2 Aufbau und Entstehung von extrazellulären Vesikeln	9
1.2.3 Zell-Zell-Kommunikation durch EV	12
1.2.4 Isolation und Analysis von EV	12
1.3 Extrazelluläre Vesikel als Treiber von Metastasierung und der Entstehung von Thrombosen	13
1.3.1 EV im Kontext des Gerinnungssystems	13
1.3.2 Zellbiologische Einflüsse von TF und CD147 auf die Metastasierung von Tumoren..	17
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	21
2 Methoden.....	23
2.1 Standardisierung von Methoden zur Analyse von membrangefärbten extrazellulären Vesikeln mittels Durchflusszytometrie	23
2.1.1 Zellkultur.....	23
2.1.2 Isolation von EV aus Zellkulturüberständen.....	25
2.1.3 Durchflusszytometrie	26
2.1.4 CFDA-SE-Färbung.....	28
2.1.5 Antikörperfärbung von Membranproteinen	29
2.1.6 Elektronenmikroskopie	29
2.1.7 Nanopartikel-Tracking-Analyse	29
2.1.8 Triton X-100.....	30
2.1.9 Indirekte Färbung von hsEV über Zellfärbung.....	31
2.2 Zellkultur-Modell für Blasenkarzinome und Experimente an klinischen Proben von Patienten mit Urothelkarzinomen	32

2.2.1	Zellkultur-Modell zur Charakterisierung und Untersuchung von hsEV aus Blasenkarzinomen	32
2.2.2	Akquise und Verarbeitung klinischer Proben	32
2.2.3	Antikörperfärbung von potenziellen Markern für Invasivität	33
2.2.4	Absonderung markierter CD147-Vesikel aus J82-Zellen	34
2.2.5	ZYMUPHEN MP-Activity Assay	34
2.2.6	ZYMUPHEN MP-TF Assay.....	35
2.2.7	Matrix-Metalloproteasen-Aktivität	36
2.2.8	Migrationsassay.....	37
2.2.9	Bindung von Vesikeln an J82-Zellen	38
2.2.10	ERK/pERK-Stimulation in COLO357	38
2.3.11	ORIS-Migrationsassay	40
3	Ergebnisse	42
3.1	Entwicklung eines standardisierten Protokolls zur Untersuchung von EV mittels Durchflusszytometrie	42
3.1.1	Optimierung der Färbebedingungen für den Membranfarbstoffs CFDA-SE	42
3.1.2	Einfluss von Hintergrundrauschen durch partikelhaltige Resuspensionsmedien auf die Quantifizierung von EV.....	43
3.1.3	Reduktion von falsch-positiven und falsch-negativen Ereignissen durch Auswahl eines geeigneten Triggers im Fluoreszenzkanal.....	45
3.1.4	Indirekter Nachweis von hsEV durch Detergenzbehandlung.....	46
3.1.5	Ursprung von hsEV aus der Zellmembran der Tumorzellen.....	47
3.2	Charakterisierung der hsEV von Urothelkarzinomzellen anhand von der Zellkulturreihen RT4 und J82 sowie Proben von Patienten mit Blasenkarzinom	50
3.2.1	Deskriptive Charakterisierung der hsEV aus Urinproben anhand von Anzahl und biologischen Parametern	50
3.2.2	Höhere CD147-Spiegel von hsEV von invasiven Karzinomen.....	54
3.2.3	Nachweis des Ursprungs der hsEV aus der Zellmembran durch Transfektion von markiertem CD147	57
3.2.4	Zellmigration bei tumorassoziierten hsEV.....	59
3.2.5	Induktion von Matrixmetalloproteasen durch CD147-positive und TF-positive hsEV.....	60
3.2.6	Inhibition der Bindung von hsEV an Tumorzellen durch AC-73 und TFPI	62
4	Diskussion.....	64
4.1	Methodische Aspekte	64
4.1.1	Auswahl der Methoden zur Isolation und Analyse der hsEV	64
4.1.2	Standardisierung durchflusszytometrischer Untersuchung von EV	67
4.1.3	Standardisierte CFDA-SE Färbung zur sicheren durchflusszytometrischen hsEV-Identifikation	68

4.1.4	Falsch-positive Ereignisse durch Färbemedien	69
4.1.5	Einfluss der Wahl der Geräteeinstellungen auf Durchflusszytometrie	69
4.1.6	Beweise für das Vorliegen von EV in den Sedimenten der hs-Zentrifugation	70
4.1.7	Anreicherung von Ektosomen durch sequenzielle Zentrifugation	71
4.2	Klinische Aspekte	72
4.2.1	hsEV als potenzieller „liquid-biopsy“- Marker.....	72
4.2.2	Höhere Level an CD147 und TF-Aktivität bei EV von invasiven Blasenkarzinomen ...	73
4.2.3	Charakterisierung der Effekte von erhöhter TF-Activity und CD147-Expression in Karzinomzellen und EV.....	73
4.2.4	Erhöhte zelluläre MMP-Induktion durch CD147-tragende EV	74
4.2.5	Effektive Hemmung der Wirkung CD147-tragender EV durch AC-73	74
4.2.6	Erhöhte Wirkung von AC-73 durch TFPI	75
4.2.7	Verhinderung der Bindung von hsEV an J82-Zellen durch AC-73.....	76
5	Zusammenfassung.....	78
6	Literaturverzeichnis.....	80
7	Danksagung	93
8	Lebenslauf	94

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 : Tabellarische Darstellung der Einteilung des Urothelkarzinoms in Stadien gemäß der TNM-Klassifikation	3
Abbildung 2 Schematische Darstellung der klassischen Gerinnungskaskade.....	15
Abbildung 3 Illustration des zellgebundenen Gerinnungsmodells	17
Abbildung 4 Wirkung der Oberflächenproteine von EV auf Zielzellen	22
Abbildung 5 Optimierung von der Variablen der hsEV-Färbung mit CFDA-SE	43
Abbildung 6 Hintergrundrauschen in der Durchflusszytometrie durch Färbemedien	45
Abbildung 7 Einfluss des Triggere im FITC-Kanal auf die Quantifizierung von hsEV.....	46
Abbildung 8 Detergenzbehandlung der hsEV mit Triton-X-100.....	47
Abbildung 9 Membrantracking von CFSE-gefärbten COLO357-Zellen.....	48
Abbildung 10 Antikörperfärbung der hsEV von COLO357 mit CD9, CD63 und CD81	49
Abbildung 11 Vergleich der hsEV von Gesunden gegenüber Blasenkarzinomen bzgl. Konzentration, TF, PS, ERK und ORIS	51
Abbildung 12 Korrelation der Variablen Konzentration TF, PS, ERK und ORIS der hsEV von Gesunden und Erkrankten	52
Abbildung 13 Vergleich der hsEV von invasiven gegenüber nichtinvasiven Blasenkarzinomen bzgl. Konzentration, TF, PS, ERK und ORIS	53
Abbildung 14 Korrelation der Variablen Konzentration TF, PS, ERK und ORIS der hsEV von invasiven und nichtinvasiven Blasenkarzinome.....	54
Abbildung 15 Oberflächenmarker EpCAM, CD147, CD47 und HER2 auf hsEV von RT4 und J82	55
Abbildung 16 Oberflächenmarker CD147 sowie TF-Activity auf hsEV von RT4, J82 und Patienten	56
Abbildung 17 Größenverteilung der EV in Überständen und Pellet der hs-Zentrifugation.....	57
Abbildung 18 hsEV-Tracking mit CD147-GFP und hsEV-Bildung durch TF/CD147-Überexpression	58
Abbildung 19 Migrationinduktion durch hsEV von J82 sowie Inhibition durch AC-73	59
Abbildung 20 MMP-Aktivierung durch hsEV von J82 und Patientenproben sowie Inhibition durch AC-73 und TFPI	61
Abbildung 21 Induktion von Invasivität durch hsEV von J82 und Patientenproben sowie Inhibition durch AC-73 und TFPI.....	62
Abbildung 22 Hemmung der hsEV-Bindung an Zellen durch AC-73 und TFPI	63

Abkürzungsverzeichnis

ATP.....	<i>Adenosintriphosphat</i>
BRCA.....	<i>BReast CAncer, early onset</i>
CFDA-SE.....	<i>Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester</i>
CFSE.....	<i>Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester</i>
DNA.....	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
EGF.....	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA.....	<i>Enzym-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EMMPRIN.....	<i>Extracellular Matrix MetalloPRoteinase INducer</i>
ERK.....	<i>Extracellular-Signal Regulated Kinases</i>
ESCRT.....	<i>Endosomal sorting complex required for transport</i>
EV.....	<i>Extrazelluläre Vesikel</i>
FGFR-3.....	<i>Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 3</i>
FITC.....	<i>Fluoresceinisothiocyanat</i>
FMO.....	<i>Fluorescence Minus One</i>
FSC.....	<i>Forward-Scatter-Channel</i>
GFP.....	<i>green fluorescent protein</i>
HNPCC.....	<i>Hereditäres Nicht-Polypöses Colorektales Carcinom</i>
HRAS.....	<i>Harvey Rat Sarcoma Virus</i>
hsEV.....	<i>high-speed-Extrazelluläre Vesikel</i>
ICD.....	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i>
IP3.....	<i>Inositol-1,4,5-Triphosphat</i>
ISEV.....	<i>International Society for Extracellular Vesicles</i>
LAE.....	<i>Lungenarterienembolie</i>
LAMP-1.....	<i>Lysosomal-assoziiertes Membranprotein 1</i>
lsEV.....	<i>low-speed-Extrazelluläre Vesikel</i>
MAP.....	<i>Mitogen Activated Protein</i>
MMP.....	<i>Matrix MetalloProteasen</i>
MVB.....	<i>multivesicular bodies</i>
NTA.....	<i>Nano Particle Tracking Analysis</i>
PAR.....	<i>Protease Activatet Receptors</i>
PBS.....	<i>Phosphatgepufferte Salzlösung</i>
PD-L1.....	<i>Programmed Cell Death Ligand 1</i>
PE.....	<i>Pyhcoerythrin</i>
PS.....	<i>Phosphatidylserin</i>
PTEN.....	<i>Phosphatase und Tensin Homolog</i>
RB1.....	<i>Retinoblastom1-Gen</i>
RNA.....	<i>Ribonukleinsäure</i>

RPMI.....	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SSC.....	<i>Sideward-Scatter-Channel</i>
TEM.....	<i>tetraspanin-enriched domains</i>
TF.....	<i>Tissue Factor</i>
TGF-beta.....	<i>Tumor-Growth-Factor-beta</i>
TNF- α	<i>Tumornekrose-Faktor- α</i>
TUR-B.....	<i>Transurethrale Resektion der Blase</i>
TVT.....	<i>Tiefe Beinvenenthrombose</i>
UICC.....	<i>Union internationale contre le cancer</i>
VEGF.....	<i>Siehe, Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VTE.....	<i>Venöse Thrombembolie</i>
vWF.....	<i>VanWillebrand-Faktor</i>

1 Einleitung

Die vorliegende Forschungsarbeit untersucht extrazelluläre Vesikel (EV) als potenzielle Biomarker bei Patienten mit Blasenkarzinomen. EV sind submikroskopisch kleine, biomembranumhüllte Partikel, denen eine Rolle in der interzellulären Kommunikation zugeschrieben wird. In der aktuellen onkologischen Forschung werden EV im Zusammenhang mit der Entstehung und dem Fortschreiten maligner Erkrankungen untersucht. Diese Arbeit folgt diesem Forschungszweig und beleuchtet eine Subgruppe der EV, die sogenannten Ektosomen, sowie deren mögliche zellbiologische Bedeutung beim Harnblasenkarzinom.

Zunächst werden im Folgenden maligne Erkrankungen der Harnblase vorgestellt. Anschließend wird der aktuelle Forschungsstand zu EV dargelegt, wobei der Einfluss auf Metastasierung und die Entstehung von Thrombosen einen besonderen Fokus bildet.

1.1 Maligne Erkrankungen der Harnblase

1.1.1 *Epidemiologie*

Entartungen der Harnblase beinhalten Tumoren, die in ihrer Mehrzahl vom Urothel ausgehen. Bezüglich der Epidemiologie ergibt sich eine auffällige Geschlechterverteilung: Von den geschätzten 28.000 Neuerkrankungen, die pro Jahr in Deutschland auftreten, entfallen fast 80% auf Personen biologisch männlichen Geschlechtes. Mit 4,7% aller Krebs-Diagnosen ist das Blasenkarzinom die viert-häufigste Krebserkrankung beim Mann, mit 1,8% die 14.-häufigste bei der Frau. (RKI – Krebs in Deutschland, 2019). Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 73 und 77 Jahren, wobei die Erkrankungsrate mit dem Alter ansteigt. Dieser Effekt ist bei Männern stärker ausgeprägt als bei Frauen. Aufgrund der demographischen Entwicklung hin zu einer älteren Bevölkerung wird eine zunehmende epidemiologische Bedeutung des Blasenkarzinoms erwartet: Die Neuerkrankungsrate stieg im Zeitraum von 2003 bis 2013 um 1,8% bei Männern und 0,8% bei Frauen an. Bei Kindern und Jugendlichen sind Neoplasien der Harnblase sehr seltenen, sie treten hauptsächlich im Zusammenhang mit mesenchymalen Tumoren wie dem Rhabdomyosarkom auf (Graf et al., 2022).

Das 5-Jahresüberleben liegt bei Männern bei 79% und für Frauen bei 73%. Dieser Unterschied kann teilweise dadurch erklärt werden, dass der altersspezifische Erkrankungsgipfel bei Frauen mit 85 Jahren und höher liegt, bei Männern aber zwischen 70 und 74, sodass bei Frauen auch andere altersabhängige Mortalitätsursachen Einfluss nehmen. Die absolute Erkrankungszahl sinkt mit steigendem Alter ab, die Erkrankungsrate gemessen als Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner steigt mit steigendem Lebensalter jedoch deutlich an. Dies ist durch die geringe Gesamtzahl von Menschen in der Alterskategorie über 85 zu erklären.

Die Mortalitätsrate (Tode pro 100.000 Einwohner) betrug 2013 für Männer 6 und für Frauen 1,8 (RKI - Krebs in Deutschland, 2019). Die Mortalität variiert stark zwischen den unterschiedlichen Subtypen des Urothelkarzinoms. So liegt die 5-Jahres-Überlebensrate von nicht-invasiven Blasenkarzinomen bei über 90 %, wohingegen sie bei invasiv wachsenden Tumoren unter 40 % liegt (RKI, 2023).

1.1.2 Pathologie des Blasenkarzinoms

Wie eingangs erwähnt, gehen die meisten Entartungen der Harnblase vom Urothel aus. Bei 90% der Neoplasien der Harnblase handelt es sich um Urothelkarzinome. Das Urothel ist ein spezialisiertes Epithel, dessen Funktion darin besteht, vollständig impermeabel zu sein, um Flüssigkeiten innerhalb des Harntraktes zu halten. Dies wird durch eine spezielle Glykokalyx und eine hohe Ausprägung von Zell-Zell-Kontakten ermöglicht.

Das Urothel hat eine langsame Erneuerungsrate von 6 bis 12 Monaten. Zum Vergleich: Die Erneuerungsrate des Darmepithels liegt beispielsweise bei nur zwei Tagen. An der Basalmembran der Harnblase befindet sich eine Schicht von Stammzellen mit unbegrenztem Teilungspotential, sodass die Erneuerung des Urothels ein lebenslanger Prozess ist (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019; Thompson et al., 2015).

Die Tumore der Harnblase werden gemäß der WHO-Klassifikation von 2016 eingeteilt, die zunächst zwischen Tumoren urothelialen und nicht-urothelialen Ursprungs unterscheidet. Die urothelialen Tumoren werden in invasive und nicht-invasive Formen unterteilt, wobei das Kriterium der Invasivität das Durchbrechen der Lamina muscularis propria ist. Diese Einteilung bildet die Grundlage der ICD-

Verschlüsselung von Urothelkarzinomen. Die nicht-urothelialen Formen machen weniger als 5 % aus und bestehen zu 90 % aus Plattenepithelkarzinomen oder Adenokarzinomen (Humphrey et al., 2016; S3-Leitlinie Urothelkarzinom AWMF, 2020).

In der klinischen Praxis ist hingegen die Einteilung nach Stadien basierend auf dem TNM-System gebräuchlicher und klinisch relevanter. Den verschiedenen Konstellationen dieser drei Deskriptoren wird nach der „Union internationale contre le cancer“ (UICC) ein Stadium zugeordnet (Greene & Sobin, 2009). Die nachfolgende Tabelle zeigt die verschiedenen UICC-Stadien gemäß der TNM-Klassifikation auf.

Stadium	Primärtumor	Lymphknoten	Metastase
0a/0is	Ta/Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2a-b	N0	M0
III	T3a-b T4a	N0	M0
IV	T4b	N0	M0
	Jedes T	N1-3	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

Abbildung 1 : Tabellarische Darstellung der Einteilung des Urothelkarzinoms in Stadien gemäß der TNM-Klassifikation.

Entscheidend für die weitere Therapie und Prognose ist im Wesentlichen die Einteilung anhand des T-Stadiums. Tumoren, die die Lamina muscularis propria erreichen, also ein Stadium T2a oder höher, gelten als muskelinvasive Blasentumoren (Lee & Droller, 2000; S3-Leitlinie Urothelkarzinom AWMF 2020). Metastasen treten nur bei invasiven Karzinomen auf.

Die nicht-muskelinvasiven Urothelkarzinome machen etwa 75 % aller Urothelkarzinome aus. Betrachtet man die Verteilung der T-Stadien zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, so wird bei Männern in etwa 70 % der Fälle ein Stadium T1, also ein nicht-invasives Urothelkarzinom, nachgewiesen. Bei Frauen hingegen liegt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in etwa zwei Dritteln der Fälle bereits eine invasiv-fortgeschrittene Erkrankung vor (RKI – Krebs in Deutschland, 2019).

1.1.3 Risikofaktoren und Ätiologie des Blasenkarzinoms

Einer der relevantesten Risikofaktoren für die Entwicklung eines Blasenkarzinoms ist eine positive Raucheranamnese. Rauchen von Tabakzigaretten erhöht das Risiko an einem Blasenkarzinom zu erkranken um das Dreifache gegenüber Nichtrauchern (Jubber et al., 2023). Zudem gibt es Hinweise auf eine familiäre Disposition: 4,3% der Erkrankten haben einen Verwandten ersten Grades, der ebenfalls an einem Blasenkarzinom erkrankt ist und 50% der Patienten haben eine positive Familienanamnese für diverse Karzinome (Koutros et al., 2021). In Industrienationen ist neben Tabakrauch die Exposition zu arbeitsplatzbezogenen Karzinogenen ursächlich für ca. 5% aller Urothelkarzinome. Dabei geht es insbesondere um aromatische organische Verbindungen wie 4-Aminobiphenyl oder Benzidin, welche in der Farbstoff- und Gummiherstellung Verwendung finden (Burger et al., 2001). In Niedriglohnländern spielt hingegen die chronische Entzündung durch Infektionen wie Schistosomiasis eine deutlich größere Rolle. Arzneimittelassoziierte Tumore sind insbesondere im Rahmen von Chemotherapien mit Cyclophosphamid beschrieben. Auch chronische andauernde Entzündungen der ableitenden Harnwege durch nicht-schistosomiasis-assoziierte Infektionen (häufig bei geriatrischen Patienten oder Menschen mit einer Paraparese) oder chronisch einliegendem Dauerkatheter haben gegenüber der Allgemeinbevölkerung ein erhöhtes Risiko, ein Blasenkarzinom zu entwickeln. (Ismail et al., 2018).

Anders als beispielweise bei HNPCC- oder BRCA-positiven Tumoren konnte bei Urothelkarzinomen noch kein einzelnes assoziiertes Gen identifiziert werden. Es wird jedoch vermutet, dass der Entstehung des nicht-invasiven papillaren Urothelkarzinoms andere Pathomechanismen zugrunde liegen als dem muskelinvasiven Typ. Bei nicht-invasiven Tumoren findet sich zu 75% eine aktivierende Mutation im EGFR-3-Gen und zu 30% eine Mutation im HRAS-Gen. Beides sind Protoonkogene, welche bei Expression zur Überaktivierung der Ras/MEK/ERK-Kaskade führen, die wiederum Zellteilung induziert. Hieraus resultiert ein verstärktes Wachstum des Tumors, welcher sich typischerweise als maligner, blumenkohlartiger Polyp in der Harnblase präsentiert (Thompson et al., 2015; Van Der Horst et al., 2012). Demgegenüber stehen bei dem nicht-invasiven Urothelkarzinom eher die Inaktivierung von antineoplastischen Genen im

Vordergrund. So wurden Mutationen nachgewiesen, die zur Dysfunktion von p53, RB1 oder PTEN führen (Shariat et al., 2008; Van Der Horst et al., 2012).

Einen wesentlichen Faktor in der Tumorprogression des Urothelkarzinoms stellt das besondere Tumormikromilieu dar. Unter Tumormikromilieu versteht man die Gesamtheit der entarteten Zellen (hier Urothelzellen) im Zusammenspiel mit der umliegenden extrazellulären Matrix, begleitenden Mesenchym- und Immunzellen und daraus resultierenden hormonellen oder inflammatorisch Stimuli (Arneth, 2019). Tumorzellen sind beispielweise durch die Expression von Matrix-Metalloproteasen (MMP) dazu imstande, in das umliegende kollagene Bindegewebe zu infiltrieren (Mondal et al., 2020). Diese Schäden am extrazellulären Gewebe werden im Körper vergleichbar mit einer Wunde erkannt und führen zum Einstrom von mesenchymalen Vorläuferzellen, Fibroblasten sowie Zellen des Immunsystems. Es kommt zur Ausschüttung von Zytokinen wie VEGF, EGF und TGF-beta, die das Wachstum der Tumorzellen und die Angiogenese im Tumormikromilieu anregen (Enkelmann et al., 2011). Die einströmenden Makrophagen und neutrophilen Granulozyten schütten zusätzlich proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α aus, die wiederum die lokale Entzündungsreaktion unterhalten (Chen et al., 2013; Lima et al., 2014). Überdies produzieren diese Immunzellen reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies, die vermehrt zu Schäden an der DNA der umliegenden Zellen führt. Diese DNA-Schäden propagieren die Inaktivierung der oben genannte Protoonkogene und begünstigen somit die Entwicklung von malignen Tumoren (Michaud, 2007). Diese Zusammenhänge weisen auf die Bedeutung der Expression von CD147 hin, dass die Synthese und Ausschüttung von MMP anregt, wie weiter unten beschrieben.

1.1.4 Klinik und Diagnostik des Blasenkarzinoms

Grundsätzlich handelt es sich beim Blasenkarzinom um eine symptomarme Erkrankung. Das häufigste und oft erste Symptom ist das Auftreten einer schmerzlosen Makrohämaturie, die bei 20% der Betroffenen auftritt. Andere Symptome können Harndrang, Pollakisurie, Dysurie oder rezidivierende Harnwegsinfekte sein. Bei fortgeschrittenen Erkrankungen kann es zum Harnaufstau, somit Flankenschmerzen und einer B-Symptomatik kommen (Lenis et al., 2020).

Neben der Untersuchung des Urins auf Hämoglobin und der Sonographie der ableitenden Harnwege stellt die Zystoskopie den Goldstandard zur Diagnose des Blasenkarzinoms dar. Fällt in der Zystoskopie ein suspektes Areal auf, wird dieses durch eine transurethrale Resektion der Blase (TUR-B) entfernt. Das gewonnene Resektatmaterial kann dann histologisch begutachtet werden, um die Eindringtiefe des Tumors zu bestimmen, da das T-Stadium, wie zuvor beschrieben, für die Diagnose und Therapie entscheidend ist (Compérat et al., 2022; S3-Leitlinie Blasenkarzinom AWMF, 2020; Witjes et al., 2021).

1.1.5 Therapie des Blasenkarzinoms

Nicht-muskelinvasive Karzinome können mit einer TUR-B kurativ behandelt werden, da sie die Grenzen des Urothels noch respektieren. Oft kann hiermit eine sehr gute Tumorkontrolle erreicht werden. Zusätzlich wird adjuvant das Chemotherapeutikum Mitomycin intravesikal instilliert, um die Rezidivrate zu verringern. Diese wird als sogenannte Frühinstillation sechs Stunden nach der OP begonnen und dann je nach primärem Befund wöchentlich bis monatlich wiederholt. Aufgrund der hohen Rate an Lokalrezidiven von nicht-invasiven Blasentumoren sollte 6-8 Wochen nach der initialen TUR-B eine Kontrolluntersuchung mittels erneuter Zystoskopie durchgeführt werden. Diese Untersuchungen sind für die Patienten unangenehm und mit einem gewissen Risiko behaftet - hier sind innovative diagnostischen Methoden gesucht.

Bei muskelinvasiven Karzinomen ist eine lokale Resektion nicht mehr ausreichend, hier wird (unter Berücksichtigung des Allgemeinzustandes und des Patientenwillens) eine radikale Zystektomie inklusive pelviner Lymphadenektomie empfohlen. Dabei wird die Blase (bei Männern inklusive der Prostata) entfernt und

eine alternative Harnableitung angelegt. Zusätzlich zur operativen Therapie kann eine neoadjuvante oder adjuvante Chemotherapie mit Cisplatin und Gemcytabin erwogen werden, bei positivem Lymphknotenbefall sollte diese leitliniengemäß in jedem Fall erfolgen. Ergänzend werden in Abhängigkeit der Expressionsmuster bzw. genetischen Analysen neuere Therapieansätze aus dem Bereich der *"targeted -therapy"*, wie beispielweise der Einsatz von PD-L1-Hemmern in klinischen Studien erprobt (Rhea et al., 2021).

Bei Inoperabilität oder metastasiertem Tumor werden palliative Therapieprinzipien im Sinne von *"best supportive care"* angewandt. Hier können je nach Allgemeinzustand und Patientenwunsch auch palliative Chemotherapien oder operative Harnableitungen diskutiert werden (Raby et al., 2020).

Aufgrund der hohen Rate an Rezidiven mit der Notwendigkeit häufiger Zystoskopien besteht ein großes Interesse an einfach zu gewinnenden Biomarkern mit ausreichender Sensitivität zum Screening auf Rezidive. Zahlreiche solcher Marker sind Gegenstand aktueller Forschung, ohne dass diese bisher im klinischen Alltag vertreten sind. Einen vielversprechenden Kandidaten dieser Forschung stellen extrazelluläre Vesikel dar, die im Folgenden näher beleuchtet werden (Crocetto et al., 2022).

1.2 Extrazelluläre Vesikel

Der Ursprung der Erforschung von EV wurde in den Arbeiten von Chergaff und West gelegt, die in den Jahren zwischen 1930 und 1950 zahlreiche Arbeiten zur Blutgerinnung veröffentlicht haben, in denen sie durch Hochgeschwindigkeits-Zentrifugation Zellen von Gerinnungsfaktoren trennen wollten. Dabei fiel ihnen auf, dass das Sediment des bei 36000g zentrifugiertem zellfreien Blutplasmas prokoagulatorische Eigenschaften besaß, welche zu diesem Zeitpunkt nicht erklärt werden konnte (Chergaff & West, 1946). 1967 veröffentlichte Wolf seine Forschung zur Anfertigung elektronenmikroskopischer Aufnahmen dieser zentrifugierten Proben, in denen er kleinste Teilchen nachweisen konnte, welche sich eindeutig von Thrombozyten unterschieden. Diese wurden als „*platelet dust*“ bezeichnet, da ihr Ursprung zunächst in den Blutplättchen vermutet wurde (Wolf, 1967). In den 1980er Jahren erschienen dann zahlreiche Arbeiten, die Hinweise auf eine zelluläre Biomechanik beschrieben, mit der membranbehüllte Partikel in Zellen entstehen konnten. Trams et al. verwendeten 1981 dafür erstmals den Term „*Exosomen*“, der bis heute eine Subpopulation der EV beschreibt (Trams et al., 1981). Nach der Jahrtausendwende wurden zahlreiche Forschungsarbeiten veröffentlicht, die sich mit der Entstehung und biologischen Funktion der EV sowie deren Proteom, Lipidom und Genom befassten (Bard et al., 2004; Subra et al., 2007; Théry et al., 2001). Dieser Aufschwung mündete 2011 in der Gründung der „*International Society for Extracellular Vesicles*“, die sich mit der Standardisierung der Forschung an EV befassten (Couch et al., 2021) - die Arbeitsgruppe von Prof. Gieseler ist Mitglied der Society, die vorgegebenen Standards werden auch in dieser Arbeit berücksichtigt.

1.2.1 Definition und Nomenklatur

Bei extrazellulären Vesikeln handelt es sich um biomembranumhüllte Partikel zellulären Ursprungs, die Proteine, DNA und RNA der Mutterzelle tragen können. EV werden von nahezu jeder Zellart des Körpers produziert und können entsprechend aus einer Vielzahl von biologischen Medien isoliert werden. So konnten EV im Plasma, Urin, entzündlichen oder malignen Ergüssen, Liquor und sogar in der Muttermilch (oder Kuhmilch) nachgewiesen werden (Bruschi et al., 2023; Carnino & Lee, 2022; Cecchetti et al., 2019; Galley & Besner, 2020; Puhm et al., 2021).

EV sind eine heterogene Entität, deren Subtypen sich sowohl in der Zusammensetzung als auch in der Herkunft stark unterscheiden. Die ISEV unterscheidet nach ihrer Entstehung und Größe Exosomen (30-100 nm), und Ektosomen (100-1000 nm, auch Mikrovesikel oder Mikropartikel genannt (Doyle & Wang, 2019; Raposo & Stoorvogel, 2013)). Neben diesen Vesikeln lebender Zellen lassen sich auch Apoptosevesikel isolieren, welche im Rahmen des geordneten Zelltodes entstehen. Diese sind mit bis zu 5000 nm deutlich größer und sollen in dieser Arbeit keine weitere Beachtung finden.

Daneben werden Oberflächenmarker zur Charakterisierung der EV herangezogen, die sich je nach Ursprungszellen unterscheiden (Théry et al., 2018). In dieser Arbeit fokussieren wir auf Ektosomen, die wir durch sequenzielle Zentrifugation gewinnen und mithilfe verschiedener Methoden (ISEV-konform) definieren (Ender & Zamzow et al., 2019).

1.2.2 Aufbau und Entstehung von extrazellulären Vesikeln

EV bestehen aus einer Biomembran sowie aus einem Inhalt aus DNA, RNA und verschiedenen Proteinen. Die Vesikel werden auf unterschiedlichen Wegen von vielen verschiedenen Zellen produziert und freigesetzt. Da die Ektosomen aus der zellulären Membran gebildet werden, entspricht ihre Membran der ihrer Ursprungszelle.

Der Hauptbestandteil der Zell- bzw. Vesikelmembran sind Lipide. Diese sind in drei große Gruppen zu unterteilen: Glycerolphospholipide, die ein Glycerin-Rückgrat haben, Sphingolipide, die stattdessen die Fettsäure Sphingosin als Rückgrat nutzen, und Sterole wie zum Beispiel Cholesterin. Glycerolphospholipide und Sphingolipide haben gemeinsam, dass sie einen unpolaren Fettanteil und einen polaren Kopfanteil haben. Die Fettsäurereste sind hydrophob und bilden über Van-der-Waals-Pseudokräfte das „Innere“ der Doppelmembran aus, während die hydrophilen Kopfteile mit dem wässrigen Milieu des Extra- und Intrazellularraumes interagieren (Gerle, 2019; Ramos-Martín & D'Amelio, 2022). Dieser Aufbau sorgt dafür, dass die Membran semipermeabel ist; fettlösliche Teilchen können frei diffundieren, während polare Teilchen auf Transporter angewiesen (Harayama & Riezman, 2018). Die Verteilung verschiedener Fettsäuren auf das innere und äußere Blatt der Zellmembran ist bei normalen Zellen asymmetrisch. So findet sich

auf der Innenseite der Zellmembran vermehrt Phosphatidylserin (PS), auf der Außenseite hingegen Sphingomyelin und Phosphatidylcholin. Diese Verteilung ist das Ergebnis eines aktiven ATP-abhängigen Prozesses: Flippasen sind Proteine, die Phosphatidylserin von der äußeren in die innere Schicht der Biomembran transportieren, die Floppasen hingegen betreiben einen auswärts-gerichteten Transport (Nagata et al., 2020).

Neben den Fetten befinden sich auch eine Vielzahl verschiedener Proteine in der Membran von Zellen sowie auch Vesikeln. Dazu zählen transmembranäre Tunnelproteine, Ionenpumpen zur Homöostase des Salzhaushaltes, Glykoproteine, Oberflächenantigene, Enzyme und Matrixproteine. Tetraspanine wie CD9, CD63 und CD81 sind eine Familie transmembraner Glykoproteine, die sich auf der Oberfläche fast aller Zellen nachweisen lassen. Diese Proteine bilden auf der Zelloberfläche sogenannte „*tetraspanin-enriched domains*“ (TEM), Nanocluster, in denen Tetraspanine andere Proteine wie Integrine, Protasen oder Immunglobulinen verbinden und organisieren (Stipp et al., 2003). Die Funktion der Tetraspanine ist vielfältig, insbesondere scheinen sie eine Rolle bei der Adhäsion und Motilität von Zellen zu spielen. Folglich ist es wenig verwunderlich, dass ihnen eine Bedeutung bei der Migration von Karzinomzellen zugeschrieben wird (Detchokul et al., 2014; Hemler, 2014). Diese Tetraspanine lassen sich auch bei einer Vielzahl von Ektosomen nachweisen.

Exosomen werden intrazellulär aus multivesikulären Körpern (multivesicular bodies; MVB), die Teil des „*Endosomal sorting complex required for transport*“ (ESCRT) sind, freigesetzt. Dieses komplexe intrazelluläre Netzwerk von Membranen dient dem Transport und der Speicherung verschiedener Stoffwechselprodukte innerhalb der Zelle.

Gegenstand dieses Forschungsvorhabens sind Ektosomen. Diese entstehen durch Abschnürung aus der äußeren Zellmembran. Je nach Zelltyp ist die Absonderung von EV ein Prozess, der durch externe Stimuli wie Inflammation oder Wachstumsfaktoren beeinflusst werden kann oder spontan geschieht (Meldolesi, 2018). Die Grundlage der Abschnürung ist eine lokalisierte Veränderung der Komposition der Biomembran in der Mutterzelle, Trigger ist eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Hieraus folgt dann eine Abnahme der Aktivität

der Flippasen mit einer relativen Überaktivität der Floppasen, was in einer erhöhten Konzentration von Phosphatidylserin im äußeren Blatt der Zellmembran resultiert. Durch die aufgehobene Asymmetrie kommt es zu einer Wölbung der Zellmembran nach außen. Ein vergleichbarer Mechanismus ist bei der Aktivierung von Thrombozyten nach Stimulation mit ADP bekannt, bei dem es auch zu einer Expression von Phosphatidylserin kommt (Cocucci & Meldolesi, 2015; Tricarico et al., 2017; van der Pol et al., 2012). Eine Abschnürung von Ektosomen erfordert zusätzlich eine Verformung des Zytoskeletts im Bereich der Vesikelentstehung. Die membrannahen Aktinfasern werden durch das Protein Calpain von der Zellmembran gelöst, einer calciumabhängigen Cystein-Protease. Die Aktivierung von GTPasen der RHO-Familie mit folgender Aktivierung RHO-abhängigen Proteinkinase führt dabei zu einer Kontraktion der Aktin-Myosin-Filamente, welche eine Raffung der Zellmembran initiieren (Jaffe & Hall, 2005). Dies verstärkt die Vorwölbung der Region in dem Extrazellulärraum. Erhöhte RHO-GTPase-Aktivität in Zellen des Mammakarzinoms korreliert dabei mit einem erhöhten Absondern von Ektosomen (Wilson et al., 2013). Folgerichtig lassen sich auf der Oberfläche von Ektosomen Proteine aus der Zellmembran der Mutterzelle nachweisen, was in der onkologischen Forschung von besonderer Bedeutung ist. So stellen die oben genannten Tetraspanine einen möglichen Marker für die Abstammung von EV aus der äußeren Zellmembran dar. Von besonderem Interesse ist somit auch der Nachweis von Tumormarkern auf EV, welche auf der Oberfläche der Malignomzellen nachzuweisen sind (Van Niel et al., 2018).

1.2.3 Zell-Zell-Kommunikation durch EV

Anfänglich wurde angenommen, dass EV lediglich der Entsorgung intrazellulären Detritus dienen, beispielweise durch Exozytose oder durch die Zuführung zu Lysosomen (Johnstone et al., 1991). Mit der Entdeckung, dass EV funktionelle Rezeptoren präsentieren und genetisches Material transportieren, rückte ihre Bedeutung für Zell-Zell-Kommunikation in den Vordergrund (Maacha et al., 2019; Ratajczak et al., 2006).

Die EV diffundieren prinzipiell frei im extrazellulären Raum (Karampoga et al., 2022). Dabei erfolgt eine rege Interaktion mit der Zelloberfläche benachbarter Zellen. Beispielweise konnte gezeigt werden, dass Tissue-Factor-tragende EV von Thrombozyten nur mit Monozyten, nicht aber mit Neutrophilen interagieren. Dies legt eine funktionelle Bedeutung von EV nahe (Lösche et al., 2004; Meldolesi, 2018).

1.2.4 Isolation und Analysis von EV

Die Untersuchung von EV stellen aufgrund ihrer submikroskopischen Größe eine Herausforderung dar. Entsprechend wurden in diesem Forschungsfeld eine Reihe von spezialisierten Methoden entwickelt, welche im MISEV-2019-Konsensus vereinheitlicht wurden (Théry et al., 2019).

Diese Rahmenbedingungen wurden von unserer Arbeitsgruppe eingehalten und an die Forschungsfrage adaptiert. Zur Isolation von EV aus verschiedenen Medien wurde das Verfahren der sequenziellen Zentrifugation eingesetzt. Dabei werden Proben in mit aufsteigender Geschwindigkeit zentrifugiert und entweder Pellet oder Überstand weitergeführt. So können beispielweise Zelltrümmer oder Proteinaggregate entfernt werden, die die nachfolgenden Messungen beeinflussen würden. Die Analyse der so isolierten EV erfolgte per Durchflusszytometrie unter der Verwendung des Membranfarbstoffes CFDA-SE sowie fluoreszenzmarkierter Antikörper (siehe Kapitel 2). Zur Einhaltung der MISEV-Anforderungen wurde als zweites Instrument zur Validierung der Quantifizierung die "Nanoparticle-Tracking-Analysis" verwendet. Anschließend wurde die Charakterisierung um verschiedene ELISA-Untersuchungen ergänzt. Um die Wirkung von EV auf biologische Systeme zu bewerten erfolgten "in-vitro"-Stimulationsversuche von Zellkulturen, die in

Migrations- und Invasionsassays eingesetzt wurden. (Ender & Zamzow, 2019; Boddu & Zamzow, 2024)

1.3 Extrazelluläre Vesikel als Treiber von Metastasierung und der Entstehung von Thrombosen

Wie in Kapitel 1.2 dargelegt, sind EV elementarer Bestandteil der interzellulären Kommunikation, können Rezeptoren tragen und aktivieren, sowie genetisches Material und verschiedene Proteine zwischen Zellen austauschen. Folglich ist es nicht verwunderlich, dass ihnen zunehmend eine Rolle in der Entstehung verschiedener Krankheiten zugeschrieben wird. Bis dato konnten bereits Effekte für Asthma bronchiale, Diabetes Mellitus Typ II, Hypertonus, Gefäß- und Klappenerkrankungen, sowie rheumatischen Krankheiten beschrieben werden (Cortez-Espinosa et al., 2017; Haj-Salem et al., 2018; Heydari et al., 2023; Li et al., 2016; Otani et al., 2018). Insofern entfällt auf thrombotische und maligne Erkrankungen eine besondere Rolle. Vor diesem Hintergrund werden EV nachfolgend im Kontext des Gerinnungssystems sowie bei der Metastasierung von Tumoren dargestellt.

1.3.1 EV im Kontext des Gerinnungssystems

Bereits im frühen 19. Jahrhundert wurde beobachtet, dass Patient*innen, die eine Krebserkrankung aufweisen, überproportional häufig auch an venös-thrombotischen Erkrankungen leiden. Dieser Zusammenhang wurde nach seinem Erstbeschreiber "*Trousseau-Syndrom*" genannt (Trousseau, 1865). Die häufigsten venösen Thrombembolien (VTE) sind die tiefe Beinvenenthrombose (TVT) sowie die Lungenarterienembolie (LAE). Letztere ist Teil dieser Gruppe, da der okkludierende Thrombus seinen Ursprung im venösen Gefäßsystem hat (Turetz et al., 2018). Diesem komplexen paraneoplastischen Phänomen liegen diverse Ursachen zugrunde. Am häufigsten wird in diesem Kontext die "*Virchow-Trias*" zitiert, welche die drei Grundvoraussetzungen für die Entstehung eines Thrombus beschreibt: Erstens eine Alteration des Blutflusses mit partieller oder totaler Stase, zweitens Veränderungen der Gefäßwände und drittens Hyperkoagulabilität des Blutes durch systemische Entzündung, Wachstumsfaktoren und Gerinnungsfaktoren (Kushner et al., 2022). Die erhöhte Rate von VTE bei malignen Neoplasien wird dabei vor allem auf die Hyperkoagulabilität zurückgeführt. Hierbei

kommt es zu einer Überaktivierung der intrinsischen wie extrinsischen Gerinnungskaskade, welche im Folgenden kurz erörtert werden (Khorana et al., 2022).

Die extrinsische Kaskade beginnt mit dem Tissue Factor (TF), der auf den Fibroblasten der subendotheliale Matrix exprimiert wird. Im Falle einer Gefäßverletzung kommt TF in Kontakt mit dem Plasma und dient als Membranrezeptor für Faktor VII (FVII), welcher frei im Plasma vorliegt. Dieser sogenannte "Tenase-Komplex" aktiviert das Plasmaproteine Faktor X (FX) zu FXa, welcher zusammen mit FVa, FVIIa und TF den sogenannten Prothrombinase-Komplex bildet. Daneben existiert die intrinsische Kaskade. Maßgeblich hier ist, dass alle beteiligten Gerinnungsfaktoren in inaktiver Form bereits im Blutplasma vorliegen. Die Aktivierung der intrinsischen Kaskade erfolgt durch Bradykininen, die von beschädigten Gefäßzellen ausgeschüttet werden. Dabei wird FXII aktiviert, dessen aktive Form FXIIa dann FXI zu FXIa aktiviert. Diese Protease aktiviert FVIII und FIX, die gemeinsam den FVIIIa/FIXa Komplex bilden, welcher wiederum FX aktiviert.

Beide Kaskaden resultieren also in der Aktivierung des Prothrombinase-Komplexes, welcher FII (Prothrombin) zu Thrombin spaltet. Thrombin ist die entscheidende Protease, die FI (Fibrinogen) zu Fibrin umsetzt, einem Protein, welches im Gefäß polymerisiert und Netze bildet. In diesen Netzen werden Thrombozyten gefangen, die wiederum die Gerinnung unterstützen. Dieses Gebilde nennt sich „Weißer Thrombus“. Werden im Verlauf auch Erythrozyten eingefangen entsteht der „Rote Thrombus“ (Müller-Berghaus, 1999).

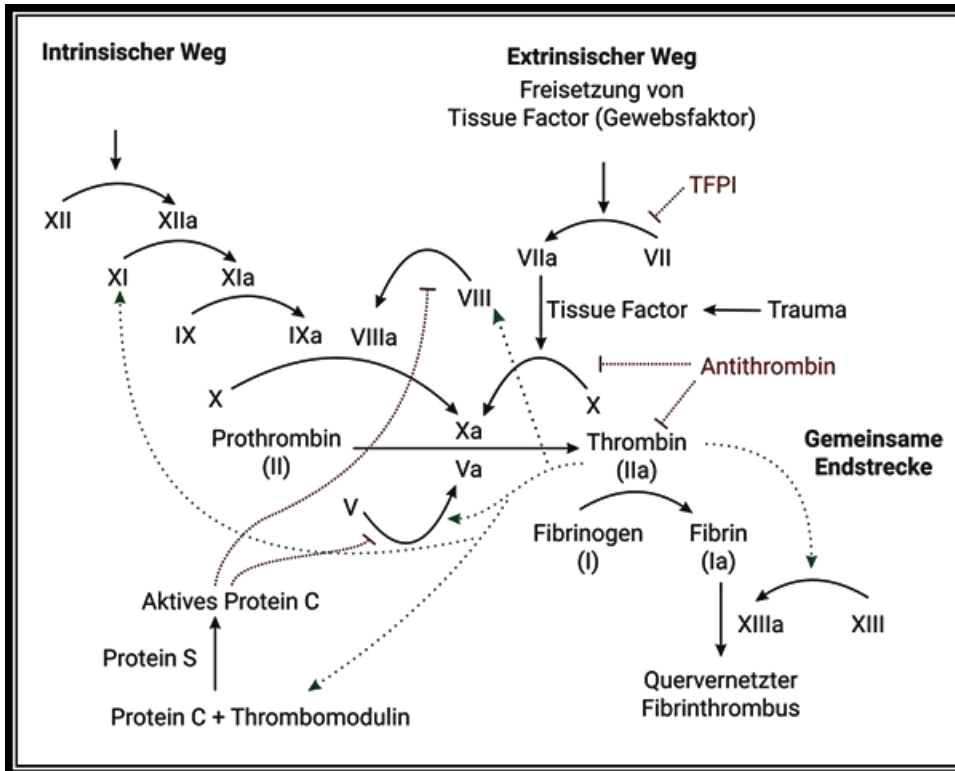


Abbildung 2 Schematische Darstellung der klassischen Gerinnungskaskade

Es sind auf der linken Seite die plasmagebundenen Faktoren der intrinsischen Kaskade und auf der rechten Seite der Tissue-Factor-abhängige bzw. extrinsische Pfad illustriert. Diese beiden Pfade münden in der Bildung von Thrombin, welches letztlich Fibrin bildet und somit in der Ausbildung eines weißen Thrombus mündet. Die extrinsische Kaskade wird physiologisch durch TFPI gehemmt.

Quelle: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Coagulation_deutsch.png, Zugriffsdatum 25.04.2024)

Auch wenn dieses klassische Bild der Gerinnung heute noch oft gelehrt wird, setzt sich zunehmend das sogenannte zellbasierte Gerinnungsmodell durch. Dabei wird insbesondere die Bedeutung der Lokalisation der oben genannten Reaktionen hervorgehoben, also die Oberfläche äußeren Zellmembran. Das zellbasierte Modell wird in drei zeitgleich ablaufende Phasen eingeteilt, die Initiation, Amplifikation und Propagation.

Die Initiation beschreibt die Phase, in der subendotheliale, TF-tragende Zellen bei einer Gefäßschädigung in Kontakt mit den plasmatischen Gerinnungsfaktoren kommen. Dabei wird Faktor VII an die Oberfläche der Zellen (bspw. Fibroblasten) gebunden und der FVII/III Komplex aktiviert FX. Der so entstandene FXa wird über seine gamma-Carboxylgruppen an die Zelloberfläche der TF-tragenden Zelle gebunden. Dazu ist FIV (Calcium) erforderlich, welches als positiv geladene Brücke zwischen den negativ geladenen γ -Carboxylgruppen und den negativ geladenen Phosphatidylserinen der Membran fungiert. FXa aktiviert daraufhin geringe Mengen

Thrombin, die ebenfalls an der Membran gebunden werden. Überdies erfolgt die Umsetzung des im Plasma vorliegenden Faktors IX in FIXa.

Während der Amplifikation kommt es zu einem Anhaften von Thrombozyten an der subendothelialen Matrix über den vonWillebrand-Faktor (vWF). Dadurch gelangen die Thrombozyten in die Nähe des Initiations-Bereichs. Das dort gebildete Thrombin sowie auch der TF bewirken über eine Aktivierung von PAR-Rezeptoren eine Freisetzung von FVa aus den alpha-Granula der Thrombozyten. Zudem bindet der im Plasma vorhandene Komplex aus vWF/FVIII an die Thrombozyten, wo dieser durch die prokoagulatorische Proteasen gespalten wird. Wie bei den anderen Gerinnungsfaktoren erfolgt nun eine calciumabhängige Bindung von FVIII an die Thrombozyten, sodass FV und FVIII auf der Oberfläche vorhanden sind. In der Propagation kommt es zur Diffusion von FIXa zur Oberfläche der Thrombozyten. Dieser Faktor wurde zuvor während der Initiation aktiviert. Der entstehende Komplex aus FVIII/FIXa kann dann FX auf der Oberfläche der Thrombozyten aktivieren, welches zusammen mit FVa zu massiver Bildung von Thrombin führt. Dieses Thrombin unterstützt wiederum alle Prozesse der Initiation und Amplifikation, sodass es zur effektiven Hämostase kommt (Hoffman, 2003; Smith, 2009). Das Zusammenspiel dieser drei Phasen ist im nachfolgenden Schaubild visualisiert:

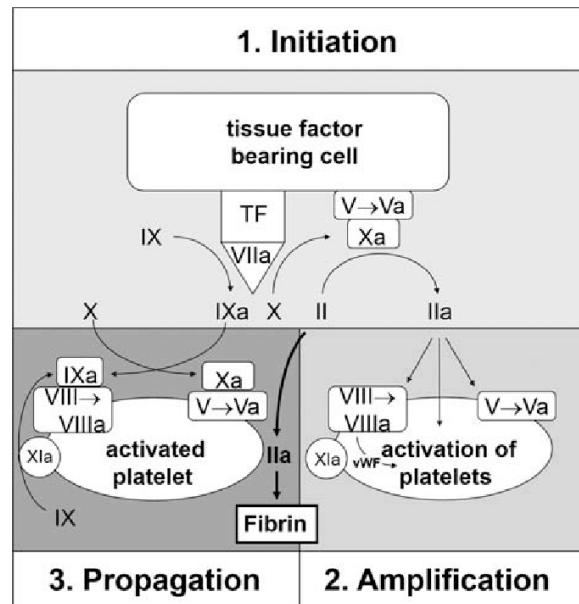


Abbildung 3 Illustration des zellgebundenen Gerinnungsmodells

Alle drei Phasen "Initiation", "Amplifikation" und "Propagation" finden auf zellulären Oberflächen statt, entweder an den Fibroblasten der subendothelialen Matrix bspw. nach Gefäßarrosion oder in den fortgeschrittenen Phasen auf aktivierten Thrombozyten, an deren durch Phosphatidylserin negativ geladenen Oberflächen über Calcium Gerinnungsfaktoren binden können. Quelle: Bezinover et al., 2018

Aus diesem Modell geht hervor, dass für die Aktivierung der plasmatischen Gerinnung zwei wesentliche Gegebenheiten vorhanden sein müssen: Zum einen müssen Oberflächen vorhanden sein, an denen die Faktoren der Initiation binden können und zum anderen müssen diese Oberflächen den TF tragen. Es ist seit langem bekannt, dass bestimmte Arten von Malignomen, insbesondere Adenokarzinome, zur vermehrten Expression von TF auf ihrer Zelloberfläche neigen (Nitori et al., 2005).

1.3.2 Zellbiologische Einflüsse von TF und CD147 auf die Metastasierung von Tumoren

Da das Auftreten von Metastasen ein kritischer Punkt in der Entwicklung von Tumoren ist, wird neben der koagulatorischen Kapazität der Vesikel vermehrt ihre Rolle in der Entstehung von Metastasen diskutiert (Nogués et al., 2018). Mit Beginn der Metastasierung nimmt die Überlebensrate von Patient*innen drastisch ab, sodass geschätzt wird, dass Metastasierung die primäre Todesursache von über 90% aller Krebspatient*innen darstellt (Steeg, 2006). Dementsprechend definieren Hanahan and Weinberg „Invasion und Metastasierung“ 2011 als eines der acht „hallmarks of cancer“; es ist also ein fundamentaler Schritt der Tumorprogression (Hanahan & Weinberg, 2011).

Die Metastasierung folgt der sogenannten „Invasions-Metastasierungs-Kaskade“: Zunächst erfolgt eine Invasion des lokalen Gewebes durch die Tumorzellen, gefolgt von der Stimulation der Angiogenese und Migration hin zum Gefäßsystem. Kommt es zur Intravasation, können sich die Tumorzellen im Körper verteilen (Lugano et al., 2020; Neophytou et al., 2021). Über 99% dieser Tumorzellen werden durch das Immunsystem im Blut abgetötet, einem geringen Teil gelingt jedoch die Extravasation und Proliferation in einem neuen Gewebe (Mack & Marshall, 2010).

Die zellulären Signalwege, deren Dysregulation zur Invasion und Migration in den ersten Schritten der Metastasierungskaskade führt, sind zahlreich und können in ihrer Gänze hier nicht erörtert werden. Im Folgenden sollen jedoch zwei Signalwege dargestellt werden, deren Effektoren relevant für den Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind.

Der erste dieser Signalwege ist die „extracellular signal-regulated kinases“, die ERK-Kaskade, wobei die Enzyme durch extrazelluläre Reize wie Hormone aktiviert werden und schlussendlich die Transkription, Translation und damit den Stoffwechsel der Zelle beeinflussen. Der klassische Weg beginnt dabei mit EGF, einem Hormon, das den gleichnamigen Rezeptor bindet und seine intrazelluläre Tyrosinkinase aktiviert. Dadurch kommt es zu einer Serie von Phosphorylierungen verschiedener Kinasen, bis ERK zu pERK umgesetzt wird. pERK ist ebenfalls eine Kinase, die Schlüsselregulatoren der Proteinbiosynthese aktiviert. Cyclin D beispielweise komplexiert mit phosphoryliertem Cdk4 und Cdk6, wodurch der Zellzyklus und damit die Zellteilung angeregt wird (Chambard et al., 2007). Eine Aktivierung von ERK führt auch zu einer verstärkten Migration von Zellen. Um zu migrieren, muss sich eine Zelle aus dem festen Verband seines Organs lösen können. Die Aktivierung von ERK sorgt dabei dafür, dass die Zelle ihre integrin-vermittelten Zell-Zellkontakte löst. Durch die ERK-abhängige Synthese von Matrix-Metalloprotease 9 werden extrazelluläre Kollagene abgebaut und dadurch die Verankerung der Zelle im Bindegewebe des Organs gelöst (Hwang et al., 2011). Die Motilität der einzelnen Zellen ist ebenfalls abhängig von der ERK-Aktivierung, da die Aktivierung des Aktin-Myosin-Zytoskelettes erhöht wird (Hartmann et al., 1994; Mendoza et al., 2015). Zudem liegt eine Beteiligung des ERK-Signalweges an der vaskulären Permeabilität vor, da Endothelien mit hoher ERK-Aktivierung eine niedrigere Dichtigkeit zeigen (Kevil et al., 1998). Alle oben genannten Eigenschaften

sind erforderlich, damit eine maligne Zelle sein Ursprungsgewebe verlassen und in eine neue Umgebung eindringen kann. Mutationen, die eine konstante Aktivierung innerhalb der ERK-Kaskade verursachen lassen, sich in zahlreichen Tumorarten nachweisen (Hobbs et al., 2016; Salaroglio et al., 2019).

Ein weiterer Aktivator des ERK-Signalweges ist Tissue Factor. Es handelt sich um ein transmembranes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 47 kD, das aus 263 Aminosäuren besteht (Daubie et al., 2007; Morrissey et al., 1987). TF kann der Klasse II Zytokin-Rezeptorfamilie zugeordnet werden und seine extrazelluläre Domäne ist strukturverwandt mit den Rezeptoren für Interferon alpha und beta. Zytosolseitig kann TF durch Proteinkinase C phosphoryliert werden, was intrazellulär zur Vernetzung mit Integrinen beiträgt (Ahamed et al., 2005).

TF wird primär von Fibroblasten der subendothelialen Matrix exprimiert und führt bei Kontakt mit Blut, beispielweise bei Verletzungen, zur Aktivierung der Gerinnungskaskade (Wilcox et al., 1989). Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass TF als Kofaktor mit anderen Proteasen auch hormonähnliche Funktionen erfüllt. Der Komplex aus TF mit der aktivierten Serinprotease Faktor VIIa ist dazu in der Lage, „protease-aktiviert-receptors“ zu aktivieren, die sogenannte PAR-Familie. Wie der Name suggeriert, führt ein Abspalten von Aminosäuren durch Proteasen an diesen Rezeptoren zu einer Strukturänderung mit folgender Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden (Posma et al., 2019). Es gibt mindestens vier verschiedene PAR, wobei PAR-2 durch den genannten TF/VIIa-Komplex aktiviert werden kann. In der PAR-2 tragenden Zelle kommt es zur Aktivierung des ERK- und IP3-Signalweges mit Induktion der Zellteilung, Zellwachstum, Migration sowie der Ausschüttung von IL6 und IL8 (Daubie et al., 2007; Posma et al., 2019). Zusätzlich kommt es durch das im Rahmen der Gerinnungskaskade gebildete Thrombin zur Aktivierung von PAR1. Die zelluläre Antwort auf eine PAR1-Aktivierung ist je nach Gewebe und Zellart variabel, in Mausmodellen wurden sowohl Wachstums- und Migrationsfördernde Effekte als auch hemmende Effekte beschrieben (Darmoul et al., 2003; Spek et al., 2019).

Unsere eigene Arbeitsgruppe konnte zudem für Brust-, Kolon-, Pankreas- und Prostatakarzinome zeigen, dass hohe TF-Konzentrationen mit einer verschlechterten Prognose vergesellschaftet sind. Auch auf den EV von

Tumorzellen zeigen sich erhöhte Level von TF, was anteilig zur erhöhten Thromboserate in malignen Tumoren beiträgt (Gamberl et al., 2016).

Um den Prozess der Invasion zu beginnen, müssen sich Tumorzellen aus der festen Verankerung ihres Zellverbandes lösen und über die Auflösung der extrazellulären Matrix einen Weg bereiten. Hierfür bedarf es der Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen, einer Gruppe von Enzymen, die Kollagene spalten können (Fares et al., 2020). Dies erfolgt unter anderem durch CD147, einem transmembranären Glykoprotein, das auch unter dem Synonym „Extracellular Matrix MetalloPRoteinase INducer“ bzw. EMMPRIN bekannt ist (Nabeshima et al., 2006). CD147 wird auf den Fibroblasten innerhalb des Tumormikromilieus diverser Tumorarten verstärkt exprimiert. Es hat eine Größe von 269 Aminosäuren und verfügt über zwei extrazelluläre Domänen (D1 und D2) mit den Struktureigenschaften von Immunglobulinen (Muramatsu & Miyauchi, 2003). CD147-Moleküle bilden aufgrund ihrer Struktur Dimere auf der Zellmembran der exprimierenden Zelle. Die interzelluläre Dimerisierung von CD147 zwischen zwei Zellen des hepatozellulären Karzinoms resultiert in einer ERK-Aktivierung mit vermehrter Ausschüttung von Matrixmetalloproteasen. Ein im Kontext dieser Arbeit besonders relevanter Faktor ist die Beobachtung von „freiem“ CD147, welches von Tumorzellen abgegeben werden kann. Kommt es zur Aufnahme durch eine andere Tumorzelle resultiert eine Aktivierung der MAP-Kinase-Signalkaskade mit folgender Induktion von Migration und Proliferation. Es kann angenommen werden, dass die Entstehung von „freiem“ CD147 durch die Freisetzung über EV erfolgt, die dieses an ihrer Oberfläche tragen (Sidhu et al., 2004).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Evidenz, dass Ektosomen in der Proliferation und Migration von Malignomen sowie die Entstehung von damit assoziierten paraneoplastischen Erkrankungen eine wesentliche Bedeutung haben, nimmt stetig zu. Insbesondere die Ektosomen sind eine bisher wenig erforschte Gruppe der EV, die jedoch aufgrund der Ähnlichkeit ihrer Zelloberfläche eine faszinierende Entität darstellt, wurde in diesem Forschungsprojekt untersucht.

Zunächst wird ein standardisiertes Protokoll zur Separation von Ektosomen aus biologischen Medien sowie zur weiteren Down-Stream-Analyse mittels Durchflusszytometrie, ELISA und NTA etabliert, bevor klinische Proben von Patienten untersucht wurden. Dieses Protokoll wurde anhand von Zellkulturüberständen der Pankreaskarzinomzelllinie COLO357 untersucht, einer Zell Linie mit konstant hoher PAR2 Expression.

Anschließend wurde die erarbeitete Methode verwendet, um EV der Blasenkarzinomzelllinien RT4 und J82 (invasiv und nicht-invasiv) zu isolieren und in Bezug auf TF und CD147 zu charakterisieren.

Die anhand dieses Modells gewonnene Expertise im Umgang mit EV diente dann dazu, die EV aus dem Urin von Patienten mit Blasenkarzinomen unterschiedlicher Stadien zu untersuchen. Die zugrunde liegende Hypothese ist, dass diese EV als potenzielle *"liquid biopsy"* zur Unterscheidung verschiedener invasiver Tumorstadien dienen kann. EV-Konzentration, TF-activity, PS-Konzentration, ERK-Aktivierung und Migrationsinduktion wurden in diesem Kontext als relevante Parameter herangezogen.

Die Frage, ob EV-abhängige mitogene Mechanismen ein mögliches Ziel für innovative Tumorthérapien darstellen, wurde mit dem Einfluss von TFPI, dem spezifischen Hemmer des TF sowie AC-73, einem Hemmer von CD147, untersucht. Insbesondere interessierte die Fragen, ob EV-induzierte Migration und Invasion von Tumorzellen durch den Einsatz dieser Substanzen effektiv reduziert werden können.

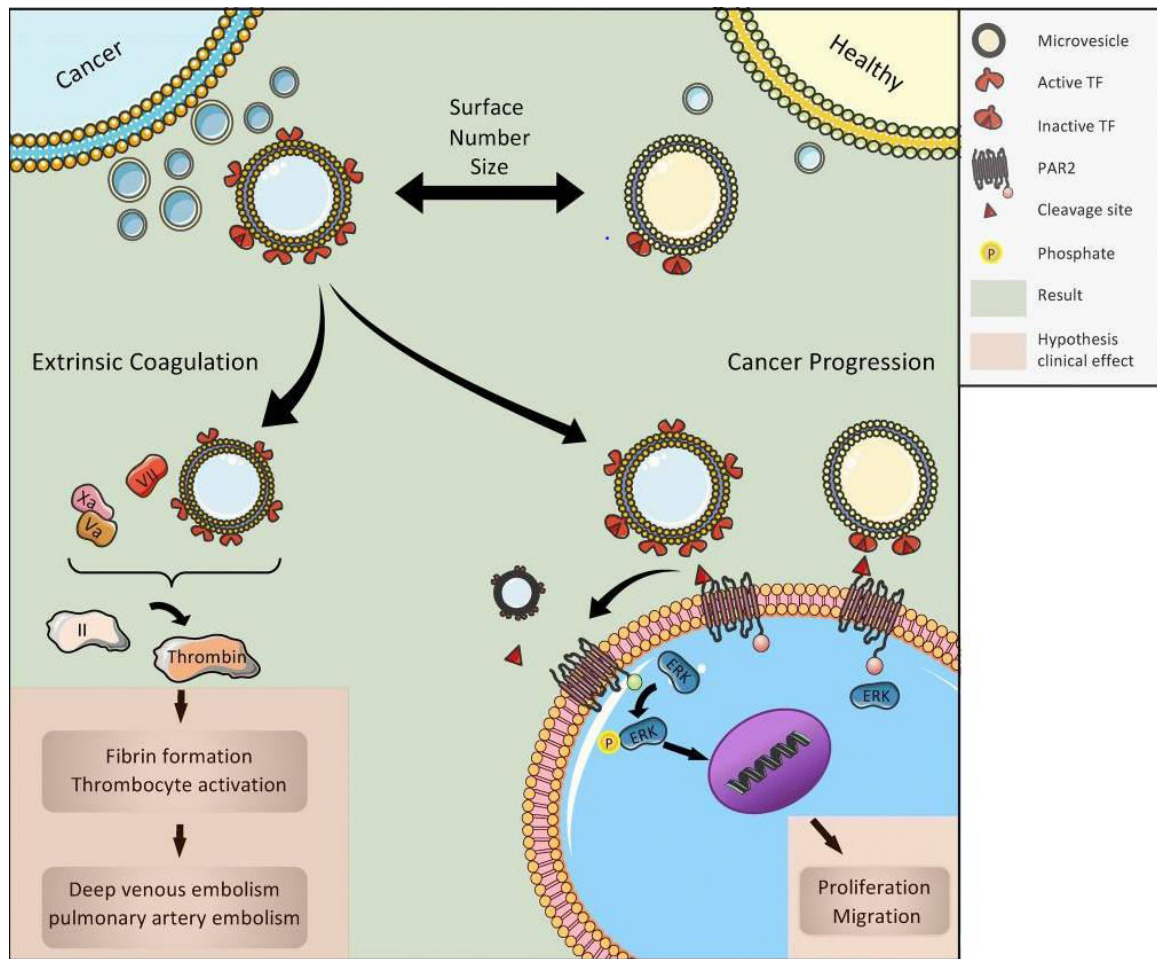


Abbildung 4 Wirkung der Oberflächenproteine von EV auf Zielzellen

Die Abbildung visualisiert schematisch Unterschiede zwischen den EV von Tumorzellen gegenüber gesunden Zellen im Hinblick auf Größe, Anzahl und Oberflächenproteine. Diese tumorstämmigen EV können darüber beispielweise die Gerinnungskaskade stimulieren oder sich auf die Proliferation von Zellen auswirken.

Quelle: Ender et al., 2020

2 Methoden

Auf Basis des dargelegten Forschungsstandes (Kapitel 1) werden nachfolgend die verwendeten Methoden in dieser Studie erläutert. Dafür werden die einzelnen Schritte der Analyse von EV beschrieben, um so ein standardisiertes, methodisches Verfahren zu etablieren. Die einzelnen Methoden werden daher jeweils beschrieben, bevor ihre Anwendung in der vorliegenden Forschungsarbeit expliziert wird. Anschließend wird auf Basis des Zellkultur-Modells für Blasenkarzinome die im Rahmen der Studie durchgeführten Experimente an klinischen Proben von Patienten mit Urothelkarzinomen dargestellt.

2.1 Standardisierung von Methoden zur Analyse von membrangefärbten extrazellulären Vesikeln mittels Durchflusszytometrie

Für die Analyse von EV bedarf es aufeinander aufbauender Schritte, um membrangefärbte EV mittels Durchflusszytometrie analysieren zu können. Als Basis wird daher zunächst auf die Zellkultur sowie auf die Isolation von EV eingegangen, bevor die einzelnen Methoden der vorliegenden Studie schrittweise beschrieben werden. Alle dargelegten Experimente wurden an Zellen des Pankreaskarzinoms COLO357 durchgeführt.

2.1.1 Zellkultur

Die Zelllinie COLO357 diente als Modellorganismus zur Erprobung von Methoden zur Gewinnung und Anreicherung von Ektosomen, die Zellen stammen ursprünglich aus einer Lymphknotenmetastase eines adenosquamösen Karzinoms des exokrinen Pankreas. Die Zelllinie wächst adhärent auf dem Boden einer T75-Zellkulturflasche als Monolayer. Als Ausgangsmedium diente RPMI (Roswell-Park-Memorial-Institute) 1640, eine Hydrogencarbonat-Pufferlösung, die in zahlreichen Zellkultursystemen Verwendung findet. Neben dem Puffer enthält sie Aminosäuren, Vitamine und Salze, um den Zellen alle Stoffwechseledukte zur Verfügung zu stellen. Außerdem gibt der beigefügte Indikator Phenolrot Aufschluss über den pH-Wert und damit über den Stoffwechselstatus der Zellkulturflasche; der Indikator schlägt bei einem sauren- pH-Wert von rot zu gelb um. Zusätzlich wurde dem Medium 10% Panexin hinzugefügt, ein synthetischer Serumersatz mit definierten

Mengen von Proteinen, Lipiden, Salzen, Aminosäuren, Spurenelementen und einigen Hormonen, als zusätzliche Nährstoffquelle für die Zellen. Um einer bakteriellen Kontamination vorzubeugen, enthält das Medium 1% Penicillin/Streptomycin. Zudem besteht es zu 1% Natrium-Pyruvat. Im weiteren Verlauf der Forschungsarbeit wird dieses Medium als COLO357-Medium bezeichnet.

Für das Umsetzen der Zellen wurde die Population bei ca. 80%-iger Konfluenz des Zellrasens bei 10-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop auf eine neue Flasche umgesetzt. Dazu wurde zunächst das alte Medium entfernt und vorsichtig mit 10 mL PBS gewaschen, um Rückstände zu entfernen, bevor anschließend 2 mL Accutase in die Flasche gegeben wurden. Dabei handelt es sich um eine Mischung von Enzymen, die sowohl kollagenolytisch als auch proteolytisch wirken und somit die Zellen aus ihrer extrazellulären Matrix herauslösen. Vor Benutzung wurde das Reagenz auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend wurde die Flasche für 5-10 Minuten im Brutschrank inkubiert, lichtmikroskopisch die Ablösung der Zellen kontrolliert und gegebenenfalls mechanisch unterstützt. Waren die Zellen zu über 99% abgelöst, wurde die Flasche mit 4 mL COLO357-Medium gespült. Dabei wurde die Zellsuspension mehrfach in die Pipette aufgenommen und breitflächig über dem Boden der Flasche wieder ausgestoßen, um noch adhärente Zellen zu lösen. Im Anschluss wurden 6 mL der Suspension in ein 15 mL Falcon überführt und für 5 Minuten bei 350xg und Raumtemperatur zentrifugiert, um Reste der Accutase aus dem Medium zu entfernen. Diese Geschwindigkeit ist ausreichend, um Zellen zu pelletieren, ohne sie dabei zu beschädigen. Anschließend wurde das Zellpellet in 4 mL COLO357-Medium wieder resuspendiert. Dazu wurde zunächst der Überstand vorsichtig abgekippt, das Pellet mechanisch gelockert und anschließend das Medium hinzugeführt. Daraufhin konnte eine beliebige Fraktion der Zellen für weitere Experimente oder zur Weiterführung der Zellkultur verwendet werden, wobei die Zahlen vor der weiteren experimentellen Verwendung gezählt werden sollten. Dazu wurde eine Neubauer-Zählkammer mit einer Lebend-Tod-Färbung mit Trypanblau verwendet, da nur tote Zellen Trypanblau aufnehmen, sodass nicht-lebige Zellen unter dem Mikroskop kräftig blau erscheinen. Diese werden bei der Zählung nicht berücksichtigt. Hierbei ist zu beachten, dass die Zählung zügig erfolgen muss, da Trypanblau selbst zytotoxisch ist. Im vorliegenden Versuch

wurden 4 μL COLO357-Suspension in 36 μL Trypanblau gegeben, wodurch eine Verdünnung um den Faktor 10 vorlag. Eine konfluente T75-Flasche von COLO357 enthielt ca. 10×10^6 Zellen.

Für die Weiterführung der Kultur wurde schließlich 1 mL der Zellsuspension in eine neue T75-Flasche zusammen mit 14 mL COLO357-Medium ausgesät.

2.1.2 Isolation von EV aus Zellkulturüberständen

Zur Standardisierung der Untersuchungsbedingungen wurden EV aus den Überständen von Zellkulturen der COLO357, RT4 und J82 gewonnen. Bei einer Konfluenz von 80% wurden im Rahmen des regulären Umsetzens der Zellen die Überstände gewonnen, um die EV durch sequenzielle Zentrifugation daraus zu isolieren. Dazu wurden grundlegend die Protokolle von Lacroix et al. verwendet, welche den Empfehlungen der „*International Society of Thrombosis and Haemostasis*“ folgen (Lacroix et al., 2012). Bei dieser sequenziellen Zentrifugation werden Proben konsekutiv bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten und mit variabler Dauer zentrifugiert, um Partikel, in diesem Fall EV, voneinander zu separieren.

Im ersten Schritt wurden die Zellkulturüberstände bei 470x g für 10 Minuten zentrifugiert, um freie Zellen aus dem Überstand zu entfernen. Der zellfreie Überstand wurde anschließend bei 2500xg für 15 Min bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand weitergeführt und erneut unter identischen Bedingungen zentrifugiert. Diese zwei aufeinanderfolgenden Zentrifugationen bei 2.500xg für 15 Minuten werden im Folgenden als „low-speed“-Zentrifugation („Is-Zentrifugation“) bezeichnet, die dazu dient Zelltrümmer und größere apoptotische Körperchen aus der Probe zu entfernen. Analog dazu werden die in den Überständen verbliebenen Partikel im Weiteren als „low-speed-Extrazelluläre Vesikel“ (IsEV) bezeichnet.

Auf diese Is-Zentrifugation folgte eine Zentrifugation mit 10.000xg für 90 Min bei 4°C. Dabei sedimentierten die größeren Vesikel in das Pellet, kleinere EVs und Proteinaggregate verblieben im Überstand, der verworfen oder für weitere Experimente eingefroren werden konnte. Das Pellet wurde in 0,22 μm filtriertem PBS resuspendiert. Diese Resuspension enthält die im Rahmen dieser Studie betrachtete Population größerer EV, die im Folgenden als „high-speed-Extrazelluläre Vesikel“ (hsEV) bezeichnet werden.

2.1.3 Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der Vesikelanzahl, zur Abschätzung der Größe sowie zur qualitativen Analyse von Oberflächenmarkern wurden die hsEV-Proben in einem High-Resolution-Durchflusszytometer (Novocyte, OLS OMNI Life Science) untersucht, das mit einem Laser der Wellenlänge 488 nm ausgestattet ist. Zusätzlich wurden die Fluoreszenzkanäle FITC und PE genutzt. Im Folgenden werden diese Verfahren kurz erklärt, bevor jeweils ihr Einsatz in der Studie dieser Forschungsarbeit dargelegt wird.

In einem Durchflusszytometer passieren Teilchen in einem Probenstrom einen (oder mehrere Laser), welcher im 90°-Winkel auf den Probenkanal gerichtet ist. Die Teilchen verursachen eine Streuung des Lasers, welche auf Detektorplatten registriert und anschließend durch die herstellereigene Software analysiert wird. Trifft die Streustrahlung eines Partikels auf die Detektorplatte, wird dies als ein „Ereignis“ gezählt. Da bei kontinuierlichem Fluss im Probenstromkanal das untersuchte Volumen bekannt ist, kann dadurch die Konzentration in der Probe ermittelt werden. Jedem Ereignis sind – je nach Modalität mit der gemessen wird – weitere Eigenschaften zur Charakterisierung des Partikels zugeordnet. Die Größe eines Teilchens kann über den Forward-Scatter-Channel (FSC) bestimmt werden. Hierbei wird die Streuung entlang der Achse des Lasers gemessen, wobei sich die Detektorplatte in gerade Linie gegenüber der Laserquelle befindet. Die so entstehende Streuung ist hauptsächlich von dem Volumen eines Teilchens abhängig. Nimmt man idealisiert eine runde Form von bspw. Zellen an, kann damit der Diameter berechnet werden. Der Sideward-Scatter-Channel (SSC) hingegen registriert Streustrahlung, welche in einem Winkel von 15-150° zum Strahlengang auftritt. Die Detektorplatte befindet sich entsprechend im 90° Winkel des Lasers. Diese Streuung entsteht insbesondere an Grenzflächen von Partikeln, die einen geringeren Durchmesser haben als die Wellenlänge des eingesetzten Lasers. Im Kontext von Zellanalysen handelt es sich dabei bspw. um das Endoplasmatische Retikulum oder den Nukleus. Vereinfacht betrachtet weist ein hoher Wert im SSC auf eine hohe Granularität innerhalb einer Zelle hin.

Neben der Streustrahlung kann eine Charakterisierung der Partikel über den Einsatz von fluoreszierenden Farbstoffen erfolgen. Diese können mit Lasern spezifischer Wellenlänge angeregt werden und emittieren dann selbst Strahlung einer

bestimmten Wellenlänge. Diese wird nach Passage von optischen Filtern auf einer Detektorplatte für das jeweilige Spektrum aufgezeichnet. Es wird die kontinuierliche Größe der Fluoreszenzintensität in den jeweiligen Kanälen aufgezeichnet. Durch die Verwendung von verschiedenen Filtern und Lasern kann so eine große Menge verschiedener Färbungen gleichzeitig an einem Partikel untersucht werden. In dieser Arbeit wurde zum Nachweis von CFDA-Farbstoff der FITC-Kanal verwendet. Dieser Membranfarbstoff wird durch Licht der Wellenlänge 498 nm angeregt und emittiert Licht von 517 nm. Für die Antikörperfärbungen wurde der PE-Kanal verwendet, welcher Licht der Wellenlänge 574 nm registriert.

Für jeden Kanal des Durchflusszytometers kann ein „Trigger“ eingestellt werden, also ein Minimalwert, der von einem eingehenden Signal erreicht werden muss, um als Ereignis aufgefasst zu werden. Je niedriger der Trigger gewählt wird, desto mehr falsch-positive Ereignisse werden aufgezeichnet, die keinem echten Teilchen im Probenstrom entsprechen. Wählt man der Trigger zu hoch, werden Partikel nicht registriert und es kommt zu Fehlmessungen, die beispielweise Größe und Konzentration unterschätzen. Außerdem ist es möglich innerhalb von bestimmten Kanälen „gates“ zu definieren, innerhalb derer Ereignisse quantifiziert werden. Diese „gates“ dienen dazu, nur bestimmte Populationen zu umfassen und dann in anderen Kanälen abzubilden. Beispielweise können in dem FSC-Kanal „gates“ etabliert werden, um Teilchen einer bestimmten Größe zu markieren und anschließend in einem Fluoreszenzkanal darzustellen.

Die Größe von EVs liegt nahe der Detektionsgrenze der FSC- und SSC-Kanäle. Somit liegen die Ereignisse unmittelbar in der Nähe des Hintergrundrauschens in diesen Kanälen. Bei der Quantifizierung von Ereignissen in diesem Grenzbereich erzeugen kleinste Änderungen der Größe des „gates“ oder des Triggers große Abweichungen der gemessenen Konzentration (Robert, S. und Lacroix, 2012). Um die Ergebnisse der Messungen vergleichbar zu machen, wurde deshalb das „gating“ nach Größe standardisiert mit „Megamix Beads“ durchgeführt, die zusätzlich zu den EV-Proben und Leer-Probe auf jede Platte aufgetragen wurden. Dabei handelt es sich um fluoreszente Partikel definierter Größe. Der für das Größen-„gate“ verwendete „MegamixPlus FSC“ beinhaltet die Durchmesser 0,1 µm, 0,3 µm, 0,5 µm und 0,9 µm. Die distinkten Peaks im FSC wurden mit einem „gate“ umschlossen

und dieses auf die hsEV-Proben übertragen. Die innerhalb dieses „gates“ gelegenen Ereignisse wurden dann in weiteren Kanälen untersucht.

Eine Schwierigkeit bei der Messung kleiner Partikel wie EVs ist das Auftreten des Schwarm-Effektes, womit das gleichzeitige Passieren mehrerer Teilchen durch den Laser gemeint ist, sodass nur ein Ereignis registriert wird. Dies führt zu einem Unterschätzen der Konzentration. Die Streuung dieses Ereignisses ist jedoch höher und folglich wird die Größe überschätzt (Lucchetti et al., 2020). Je kleiner der Durchmesser des Probenstroms ist, desto geringer ist dieses Risiko, da die Partikel sich im linearen Kernfluss hintereinander aufreihen (van der Pol et al., 2012). Da der Durchmesser direkt proportional zur Geschwindigkeit des Probenstroms ist, wurde diese in der vorliegenden Studie mit 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ sehr langsam gewählt, um einen möglichst schmalen Strom zu erzeugen.

Die Proben wurden über den NovoSampler (OLS OMNI Life Science) automatisiert aus 96-Well-Platten aufgenommen und gemessen. Jede Probe wurde 4-fach aufgetragen mit je 50 μL pro Well und die Messung bei 25 μL gestoppt. Zudem wurde eine Leerprobe mit PBS aufgetragen, um das Hintergrundrauschen zu beurteilen. Auch wurde das Gerät vor jeder Messung einer 96-Well-Platte automatisiert gereinigt.

2.1.4 CFDA-SE-Färbung

Um intakte, biologisch aktive hsEV von Membranteilen oder durch den Zentrifugationsprozess beschädigten EV zu unterscheiden wurde der Biomembranfarbstoff Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFDA-SE) verwendet. Diese nicht-fluorescente Substanz ist aufgrund der Diacetatgruppe membrangängig und wird über endovesikuläre Esterase in Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) umgesetzt. Da CFSE kovalent an die Aminogruppen membranständiger Proteine bindet, kommt es durch die Abspaltung der Diacetatgruppe zur Entwicklung der Fluoreszenzeigenschaft von CFDA. Die Esterasen benötigen zur Funktion eine intakte intrazelluläre bzw. intravesikuläre Umgebung mit bestimmtem pH-Wert und Elektrolytkonzentrationen, wie sie nur gegenüber dem Medium abgeschlossenen Biomembranen existieren kann. Somit können nur hsEV angefärbt werden, deren Biomembran intakt ist.

Da zum Zeitpunkt der Durchführung der Studie keine einheitlichen Protokolle bzgl. der Färbebedingungen von EV vorlagen wurden verschiedene Ansätze untersucht, die in Bezug auf Konzentrationen, Färbedauern und Färbetemperaturen variierten. Dafür wurde CFDA-SE im Anschluss an die zweite Is-Zentrifugation hinzugegeben und anschließend überschüssiger Farbstoff über die hs-Zentrifugation ausgewaschen.

2.1.5 Antikörperfärbung von Membranproteinen

Gemäß dem MISEV-Konsensus von 2018 kann der Ursprung von EV aus der Zellmembran über den Nachweis von Membranproteinen der Tetraspaninfamilie erbracht werden. Daher wurden in der Studie Anti-human CD9-Antikörper, anti-human CD63-Antikörper sowie anti-human-CD81-Antikörper verwendet (Biolegend, San Diego, USA), wobei diese mit Phycoerythrin (PE) markiert wurden. Hierzu wurde eine Isotyp-Kontrolle mit murinem anti-human IgG1kappa durchgeführt. Die Färbung wurde nach der zweiten Is-Zentrifugation für 20 min bei 4°C durchgeführt. Anschließend wurden die Proben per Durchflusszytometrie im PE-Kanal untersucht.

2.1.6 Elektronenmikroskopie

Um zu bestätigen, dass sich in den Isolaten hsEV befinden, wurden in Kooperation mit dem Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck elektronenmikroskopische Aufnahmen der hsEV-Proben angefertigt. Hierzu wurden die hsEV-Pellets in 4% Paraformaldehyd resuspendiert und für 20 Minuten inkubiert, um die hsEV zu fixieren. Anschließend wurde die Probe mit Wasser verdünnt und erneut für 90 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert. Das gereinigte hsEV-Pellet wurde in filtriertem, in 2,5%igem PBS resuspendiert und bei 4°C gelagert. Es wurden 10-20 µL auf ein Thermanox-Deckglas aufgetragen und für 90 Minuten in einer Feuchtkammer gelagert. Hierdurch sedimentierten die EV auf den Boden des Deckglases. Mithilfe einer aufsteigenden Acetonreihe wurden die Proben dehydriert und letztlich in einer CO₂-Umgebung mittels überkritischer Trocknung schonend entwässert. Anschließend erfolgte der Zusatz von Goldpartikeln und die Untersuchung mit dem EVO LS 15 Elektronenmikroskop (Zeiss, Deutschland).

2.1.7 Nanopartikel-Tracking-Analyse

Bei der Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA) handelt es sich um ein indirektes mikroskopisches Verfahren zur Visualisierung und Quantifizierung

submikroskopischer Teilchen in flüssigen Medien. Es können abhängig vom verwendeten Gerät und Medium Teilchen in einem Größenbereich von 10 bis 2000 nM dargestellt werden. Das Verfahren basiert auf der Messung der Brown'schen Bewegung der Teilchen im flüssigen Medium. Diese ist abhängig von der Größe des Teilchens sowie der Temperatur und Viskosität des Mediums. Bei konstanter Temperatur und bekannter Viskosität lässt sich aus der vom Teilchen zurückgelegten Strecke dessen Größe berechnen. Dafür wird die Probe in eine Zählkammer injiziert und fließt an einem Laser vorbei. An den Teilchen wird das Licht des Lasers gebrochen und kann als Video durch eine Kamera aufgenommen werden. Mithilfe spezieller NTA-Software können so die Pfade der Teilchen visualisiert und gemessen werden. Die Messung aller sichtbaren Partikel erfolgt gleichzeitig, sodass eine Größenverteilung der in der Probe befindlichen Teilchen angegeben werden kann. Da das Volumen der Messkammer normiert ist, kann gleichzeitig die Konzentration der Teilchen angegeben werden. Es werden je nach Hersteller Videosequenzen einer definierten Länge aufgenommen und daraus letztlich ein Mittelwert für die analysierte Probe gebildet. Die Videosequenzen werden in Echtzeit abgebildet, sodass eine manuelle Justierung der Flussrate sowie der Kameraeinstellungen möglich ist. Manche Geräte verfügen zusätzlich über eine Fluoreszenzkamera, um selektiv mit Farbstoff markierte Teilchen zu analysieren. In der vorliegenden Studie wurden die hsEV-Proben auf ein Volumen von 1 mL in gefiltertem PBS verdünnt. Dabei wurden 0,22 μM Membranfilter verwendet. Die Messungen wurden mit dem NanoSight NS300 (Malvern Instruments Ltd., Vereinigtes Königreich) durchgeführt und pro Probe jeweils drei Messungen durchgeführt. Die Flussrate wurde auf 100 $\mu\text{L}/\text{Min}$ eingestellt und entsprechend den Herstellerempfehlungen 30-sekündige Videosequenzen aufgezeichnet. Währenddessen wurde das Kameraniveau manuell angepasst, um die optimale Auflösung zu erhalten. Die Ermittlung der EV-Größe erfolgte mithilfe von Polystyrene-Kugeln von 100 nM Durchmesser als Referenzgröße.

2.1.8 Triton X-100

Um indirekt das Vorhandensein von biologisch aktiven biomembranumhüllten Teilchen zu beweisen, wurden die hsEV-Proben mit einem Detergens behandelt. Dafür wurden hsEV gemäß dem oben genannten Protokoll aus Zellkulturen der COLO357-Zellreihe isoliert. Nach der „ls“-Zentrifugation wurde der Hälfte der Isolate

0,1% Triton-X-100 zugesetzt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der anderen Hälfte wurde als Kontrolle filtriertes PBS hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben mit 40 μM CFDA-SE für 10 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Die Proben wurden dann der „hs“-Zentrifugation unterzogen, die Pellets in filtriertem PBS resuspendiert und per Durchflusszytometrie quantifiziert.

2.1.9 Indirekte Färbung von hsEV über Zellfärbung

Um den Ursprung der hsEV aus der Zellmembran der Mutterzelle nachzuweisen wurden COLO357-Zellen mit CFDA-SE gefärbt und anschließend hsEV-Isolate per Durchflusszytometrie untersucht. Es wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen mit 40 μM CFDA-SE für 10 Min bei 37°C gefärbt und anschließend überschüssiger Farbstoff ausgewaschen. Die Zellen wurden in 5 mL COLO357-Medium resuspendiert und in eine T25-Flasche ausgesät. Es wurde nach 24 sowie 48 Stunden Überstand gewonnen und dem hs-Isolationsprotokoll unterzogen. Hierbei wurde keine erneute Färbung mit CFDA-SE nach der Is-Zentrifugation durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mittels Durchflusszytometrie quantifiziert.

2.2 Zellkultur-Modell für Blasenkarzinome und Experimente an klinischen Proben von Patienten mit Urothelkarzinomen

Im Folgenden wird das experimentelle Vorgehen mit den hsEV von Blasenkarzinomzellen geschildert. Nach der Isolation werden die Oberflächenkonzentrationen von TF und PS bestimmt sowie Effektorexperimente an Zellkulturen durchgeführt, um die hsEV vermittelte ERK-Aktivierung, die Bildung von Matrixmetalloproteasen und die Migrations- und Invasionsinduktion zu quantifizieren. Ergänzend wurden potenzielle pharmakologische Angriffspunkte mittels TFPI und AC-73 untersucht.

2.2.1 Zellkultur-Modell zur Charakterisierung und Untersuchung von hsEV aus Blasenkarzinomen

Die im vorangegangenen Abschnitt erläuterten Experimente wurden an Zellen des Pankreaskarzinoms COLO357 durchgeführt und zur Etablierung eines Standards zur Isolation und Charakterisierung von hsEV mittels Durchflusszytometrie verwendet. Als *in vitro* Modell des Blasenkarzinoms wurden zudem weitere funktionelle Untersuchungen an den Zelllinien RT4 (CLS GmbH, Deutschland) und J82 (ATCCC HTB-1) durchgeführt. RT4 entstammt einem nicht-muskelinvasivem, J82 einem muskelinvasivem Blasenkarzinom. Diese Zellreihen wurden in T25 mL Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Verdopplungszeit der RT4 beträgt 40 Stunden, für J82 sind es 24 Stunden. Vor der hsEV-Isolation wurden die Zellkulturen mit PBS gewaschen und auf exosomenbereinigtes FBS-Medium (Gibco, Deutschland) umgesetzt. Die Isolation erfolgte gemäß dem hs-Isolationsprotokoll.

2.2.2 Akquise und Verarbeitung klinischer Proben

Um letztlich diagnostische und therapeutische Implikationen der EV von malignen Zellen zu untersuchen wurden in Zusammenarbeit mit der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Lübeck Patienten mit Verdacht auf oder gesichertem Blasenkarzinomen unterschiedlicher Stadien rekrutiert.

Die Patienten kamen zwischen 07:00 und 11:00 Uhr morgens in die Ambulanz der Urologie zur Aufnahme, Aufklärung und Laborabnahme im Rahmen des bevorstehenden Eingriffes. Es wurden Urinproben in sterilen Urinbecher gewonnen, die bei Raumtemperatur aufbewahrt und gegen 12:00 Uhr zur weiteren Verarbeitung

abgeholt wurden. Der Urin wurde in 15 mL Falcons überführt und bei 2.500xg für 15 Minuten bei RT zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände in neue 15 mL Falcons überführt und das Pellet verworfen. Die Überstände wurden dann erneut bei 2.500xg für 15 Minuten bei RT zentrifugiert. Damit entsprachen die so aufbereiteten Proben der Is-Zentrifugation. Danach wurden die Überstände der Urinproben in 2 mL Eppendorf-Gefäßen aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Pro Patienten lagen so fünf Gefäße á 2 mL vor. Überschüssiges Patientenmaterial wurde in 50 mL Falcons gesammelt und ebenfalls bei -80°C eingefroren.

Vor der Durchführung von weiteren Experimenten wurden die Proben zunächst für ca. 30 Minuten bei RT aufgetaut und mit CFDA-SE gefärbt. Den Proben wurden 8 µL der 10 mM CFDA-SE Stammlösung zugesetzt, was einer 250-fachen Verdünnung und einer absoluten Konzentration von 40 µM in den Proben entspricht. Um einem Ausbleichen des Farbstoffes vorzubeugen, wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert, bevor die Proben bei 10.000xg für 90 Min bei 4 °C zentrifugiert wurden. Die Überstände wurden verworfen oder weiteren Experimenten unterzogen und das Pellet in 2 mL gefiltertem PBS (0,22 µm) bei RT resuspendiert.

2.2.3 Antikörperfärbung von potenziellen Markern für Invasivität

Die Zellreihen RT4 und J82, die daraus gewonnenen hsEV-Isolate sowie die hsEV-Isolate aus der klinischen Kohorte wurden verschiedene Oberflächenmarker untersucht, die im Kontext der Invasivität beschrieben wurden. Konkret wurden die Transmembranproteine EpCAM, CD147, CD47 sowie HER2 untersucht. Hierzu wurden murine anti-humane Antikörper gegen die jeweiligen Proteine verwendet, welche mit Phycoerythrin markiert waren. Nach der CFDA-SE-Färbung und vor der hs-Zentrifugation wurde eine Färbung mit Antikörpern für 20 min bei 4°C durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mit 1 mL PBS zum Stoppen der Färbung verdünnt und der „hs“-Zentrifugation unterzogen. Die hsEV wurden anschließend per Durchflusszytometrie untersucht und Ereignisse innerhalb des FITC-positiv-"gate" im PE-Kanal dargestellt. Zur Etablierung eines PE-positiv-"gate" wurden FMO-Kontrollen durchgeführt.

2.2.4 Absonderung markierter CD147-Vesikel aus J82-Zellen

Analog zu dem Experiment mit COLO357-Zellen, bei dem Zellen mit CFDA-SE gefärbt und die daraus resultierenden hsEV untersucht wurden, wurden die hsEV von J82-Zellen in Bezug auf CD147 untersucht. Es wurden Zellen der J82-Zellkultur mit einem CD147-Konstrukt transfiziert, welches mit „green fluorescent protein“ (GFP) markiert war. Dabei handelt es sich um eine fluoreszierende Substanz, die mit Licht der Wellenlänge 397 oder 475 nm angeregt werden kann und deren Emissionswellenlänge 509 nm beträgt. Es wurden gemäß dem Standardprotokoll hsEV aus der transfizierten Zellkultur gewonnen und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dabei wurde keine erneute Färbung mit CFDA-SE durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde eine hsEV-Probe mit Triton-X-100 behandelt und ebenfalls per Durchflusszytometrie untersucht.

2.2.5 ZYMUPHEN MP-Activity Assay

Mithilfe des ZYMUPHEN MP-Activity Assay (Aniara, West Chester, OH, USA) kann die molare Konzentration von Phosphatidylserin (PS) in einer hsEV-Probe bestimmt werden. Der Assay wurde dabei nach Herstellerangaben durchgeführt: Die mit Annexin V und Streptavidin beschichteten Mikrotiter-Streifen wurden in den vorgesehenen Rahmen eingespannt. Für die Erstellung einer Standardkurve wurden je 100 µL einer Kalibratorlösung mit bekannter Stockkonzentration eingesetzt und in entsprechenden Verdünnungen (C, C:2, C:4; C:10, C:20, 0 in Verdünnungslösung) als Doppelwerte aufgetragen. Als Qualitätskontrolle dienen mitgelieferte „Control low“ und „Control high“, die eine bekannte Konzentration von PS beinhalten. Die hsEV-Proben wurden als vierfache Werte à 100 µL aufgetragen, die Platte wurde versiegelt und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Wells fünfmal mit Wash-Puffer-Lösung gespült und je 100 µL R1 (Boviner FaktorX/FaktorV-Mix) sowie 50 µL R2 (humanes Prothombin) pro Well hinzugegeben. Der Faktor X/V-Komplex setzt mit PS als Cofaktor Prothrombin zu Thrombin um. Nach 10 Minuten Inkubation bei 37 °C wurden 50 µL R3 (Thrombin-spezifisches Chromogen) pro Well pipettiert und für 3 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dieses Chromogen wird von der Protease Thrombin umgesetzt. Um die Reaktion zu stoppen wurde 2% Zitronensäure hinzugefügt. Nach einer 10-minütigen Farbstabilisierungsphase wurde die Absorption in einem ELISA-Reader (Spectramax id30, Molecular Devices) bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

Da der Faktor X/V-Komplex und Kalzium im Überschuss vorliegt wird PS zum begrenzenden Faktor dieser Reaktion.

Die Auswertung erfolgte über die Gerade der Kalibrator-Standardreihe sowie den Leerwerten. Da der Kalibrator eine definierte Konzentration hat, die für jedes Kit angegeben wird, konnte jedem Absorptionswert eine Konzentration zugeordnet und eine lineare Regression durchgeführt werden. Zusätzlich wurde die Gerade auf den Absorptionswert der Leerprobe geeicht, da dieser der Absorption des partikelfreien Verdünnungslösung entspricht. Die Formel der Geraden wurde nach der Konzentration aufgelöst und damit zunächst die Konzentrationen der Kontrollen berechnet und mit den vom Hersteller angegebenen Bereichen verglichen. Stimmt die experimentell ermittelten Konzentrationen mit den angegebenen Werten überein wurde die Regression für gültig befunden und damit die Konzentrationen der Proben in pg berechnet.

2.2.6 ZYMUPHEN MP-TF Assay

Der ZYMUPHEN-Microparticle-Tissue-Factor-Assay (Aniara, West Chester, OH, USA) dient zur Bestimmung der Konzentration von TF-activity pro mL eingesetzter Probe. Wie der MP-A basiert er auf dem ELISA-Prinzip (Tatsumi K._2014).

Hierfür wurden die mit monoklonalen murinen Antikörper gegen humanen TF beschichteten Mikrotiterplatten in den Rahmen eingespannt und die Sealing-Strips entfernt. Pro Well wurden zunächst 200 μ L MP-TF-Enhancer vorgelegt und anschließend 20 μ L der Standardreihe (Calibratorlösung 1:1, 1:2, 1:4, 1:10, 1:20), Sample Diluent oder der Controls high/low als Doppelwerte aufgetragen. Die Proben wurden als vierfache Werte aufgetragen. Die Platte wurde mit Parafilm versiegelt und über Nacht inkubiert. Während dieser Inkubation binden TF-exprimierende EV an die Antikörper. Am nächsten Tag wurde die Folie entfernt und die Wells zunächst fünfmal mit auf 37°C vorgewärmter Wash-Puffer-Lösung gewaschen. Es wurden 100 μ L Wash-Puffer vorgelegt und anschließend je 25 μ L R1 (humaner Faktor VIIa) und R2 (humaner Faktor X) pipettiert. Beide Reagenzien wurden 1 Stunde vor Benutzung nach Anleitung vom Hersteller angesetzt und 30 Minuten vor Nutzung im Wärmeschrank bei 37°C vorgewärmt. Die Platte wurde erneut versiegelt und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Während dieser Periode bildet sich der Tenase-Komplex aus dem TF der EVs und dem zugegebenen Faktor VIIa, der dann Faktor X zu Faktor Xa umsetzt. Daraufhin wurden 50 μ L R3

(chromogenes Substrat für Faktor Xa) hinzugefügt, welches ebenfalls 1 Stunde vor Nutzung angesetzt und 30 Minuten bei 37°C vorgewärmt wurde. Um ein potenzielles Ausbleichen des Fluorochroms zu vermeiden, wurde bei ausgeschaltetem Deckenlicht gearbeitet. Es folgte eine weitere Inkubation bei 37 °C für 2 Stunden. Die Reaktion wurde mit 50 µL 2% Zitronensäure gestoppt. Die Farbe stabilisierte für 10 Minuten, anschließend wurde die Absorption bei 405 nM gemessen.

Da alle Reagenzien im Überschuss zu TF vorliegen, wird dieser zur limitierenden Größe. Folglich ist die Absorption direkt proportional zu seiner Konzentration. Besonders an diesem Vorgehen ist, dass der Tissue-Faktor an der Umsetzung des Substrates direkt beteiligt ist; da es eine aktive und inaktive Form des Tissue-Faktors gibt, kann mit diesem Assay selektiv die Konzentration der aktiven und damit biologisch wirksamen Variante bestimmt werden.

Die Auswertung geschah analog zum MP-Activity-Assay über die Gerade der Calibrator-Standardreihe sowie den Leerwert. Der Calibrator hat eine definierte Konzentration, die für jedes Kit angegeben wird. So konnte jedem Absorptionswert eine Konzentration zugeordnet und eine lineare Regression durchgeführt werden. Zusätzlich wurde die Gerade auf den Absorptionswert der Leerprobe geeicht. Die Formel der Geraden wurde nach der Konzentration aufgelöst und damit zunächst die Konzentrationen der Controls berechnet und mit den vom Hersteller angegebenen Bereichen verglichen. Stimmt die experimentell ermittelten Konzentrationen mit den angegebenen Werten überein wurde die Regression für gültig befunden und damit die Konzentrationen der Proben in pg/mL berechnet.

2.2.7 Matrix-Metalloproteasen-Aktivität

Die Fähigkeit von hsEV zur Induktion von MMP in malignen Zellen wurde mithilfe des Amplite™ Universal Fluorimetric MMP Activity Assay Kit (AAT Bioquest) durchgeführt. Als Modelzelle diente dabei J82, welche entweder mit hsEV der J82-Zellkultur oder mit Urin-hsEV der klinischen Kohorte für 24 Stunden stimuliert wurde. Anschließend wurden Überstände der stimulierten Kultur gewonnen und in eine 96-Well-Platte aufgetragen. Gemäß Herstellerempfehlung wurde MMP-Green hinzugefügt, welches ein Substrat für MMP innerhalb der biologischen Probe darstellt. Während dieses Vorgehens wird MMP-Green gespalten und in die fluoreszente Form überführt. Anschließend wurde die Fluoreszenz in „relative fluorescence units“ photometrisch gemessen. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz,

der mit rekombinantem CD147 behandelt wurde, welches eine hohe MMP-Aktivität induziert. Außerdem wurde manchen Ansätzen AC-73 zugesetzt, ein spezifischer Hemmer von CD147. Dieser verhindert die Bildung von CD147-Dimeren auf der Zelloberfläche und somit die Aktivierung der folgenden ERK-Kaskade. Es wurden sowohl die Effekte von 2,5 als auch 5 μM AC-73 untersucht. In einem weiteren Ansatz wurde den hsEV-stimulierten Zellkulturmedien zusätzlich zu AC-73 noch TFPI hinzugefügt, ein spezifischer Hemmer des Tissue Factor.

2.2.8 Migrationsassay

Um Migrationsinduktion durch hsEV-Stimulation zu untersuchen, wurden hängende Zellkultureinsätze in 24-Well-Platten verwendet, deren Böden mit Poren von 8,0 μm Durchmesser durchsetzt ist. Auf dem Boden der Einsätze wurde Matrigel (Corning, VA) verteilt und bei 37°C für 30 Minuten verfestigt. Dabei handelt es sich zunächst um ein flüssiges Gemisch aus Proteinen, welches bei 37°C polymerisiert und als Modell einer Laminin- und Kollagen-IV-haltigen extrazellulären Matrix dient. Anschließend wurden Zellen aus einer der beiden Zellkulturreihen RT4 oder J82 gewonnen und in die mit Matrigel beschichtete Platte aufgetragen. Die Zellen wurden teilweise zuvor mit hsEV oder rekombinantem CD147-Protein stimuliert. Andere Ansätze wurden mit variablen Konzentrationen von TFPI oder AC-37 behandelt.

In den Boden der Wells wurde Medium mit 10% FBS-Anteil vorgelegt, um einen Migrationsgradienten hin zum nährstoffreicheren Medium zu etablieren. Anschließend wurde dieser Ansatz für 16 bzw. 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellkultureinsätze wurden mittels Diff-Quick-Protokoll gefärbt. Dazu wurden die Wells zunächst mit 200 μL PBS gewaschen und anschließend mit 100 μL der DiffQuick-Fix-Lösung fixiert. Nach 2 Minuten wurde diese entfernt und durch 100 μL der eosinophilen DiffQuick-I-Lösung ersetzt, welche wiederum nach 2 Minuten durch 100 μL der basophilen DiffQuick-II-Lösung ausgetauscht wurde. Abschließend wurde zweimal mit 200 μL PBS gewaschen und die Platte für 30 Minuten unter einer Werkbank/ Abzug mit kontinuierlichem Luftstrom getrocknet. Die Quantifikation der migrierten Zellen wurde anschließend mittels Lichtmikroskopie und Bildverarbeitung über ImageJ durchgeführt.

2.2.9 Bindung von Vesikeln an J82-Zellen

Es wurden Zellen der Zellreihe J82 aus der Zellkulturflasche gelöst, bei 470xg für 15 Minuten zentrifugiert und anschließend in Zellkulturmedium resuspendiert. Diese freien, ungefärbten J82-Zellen wurden anschließend mit CFSE-gefärbten hsEV aus J82-Kulturen für 20 Minuten behandelt. Die Zellen wurden erneut bei 470xg für 15 Minuten sedimentiert und der Überstand verworfen. Dadurch konnten freie hsEV aus der Probe entfernt werden. Die Zellen wurden in PBS resuspendiert und per Durchflusszytometrie im FITC-Kanal untersucht. Zur Überprüfung der Reversibilität wurden diese Ansätze wiederholt und zusätzlich zu den hsEV entweder 5 μM AC-73 oder 2,5 μM AC-73 mit 300 ng/mL TFPI hinzugefügt.

2.2.10 ERK/pERK-Stimulation in COLO357

Zur Bestimmung des Einflusses von Vesikeln auf den MAP-Kinase-Signalweg wurden Pankreaskarzinom-Zellen der Zelllinie COLO357 mit der hsEV-Präparation aus Patientenproben stimuliert. Im ELISA-Verfahren wurden dann ERK und pERK mit Antikörpern fluoreszent markiert und die Absorption photometrisch bestimmt. Zur Assay Vorbereitung wurden COLO357-Zellen in einer Dichte von 3×10^4 Zellen/100 μL COLO357-Medium in jedes Well einer Zellkultur-geeigneten 96-Well-Platte ausgesät. Es wurden insgesamt zwei 96-Well-Platten vorbereitet, jeweils eine für die Behandlung mit einem Antikörper gegen ERK und pERK. Um das Adhärenieren der Zellen zu gewährleisten wurden die Platten über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Nach 24 Stunden wurde mikroskopisch kontrolliert, ob ein konfluenten Monolayer in den Wells ausgebildet war. Der Überstand wurde entfernt, durch 100 μL „Hungermedium“ (COLO-Medium mit 1% statt 10% Panexin) ersetzt und weiter im Brutschrank inkubiert. Dadurch werden andere Einflussfaktoren auf die ERK-Phosphorylierung wie die Position im Zellzyklus und die metabolische Aktivität ausgeschaltet, da in nährstoffarmem Milieu der Zellmetabolismus aller Zellen auf ein vergleichbar niedriges Niveau sinkt und ERK liegt überwiegend unphosphoryliert vor (Garbison, Kim E. 2012). Nach 3 Stunden wurde das Medium entfernt und die isolierten hsEV der Patientenproben als Stimuli appliziert. Dafür wurden aus der hsEV-Präparation 450 μL entnommen und mit 450 μL PBS verdünnt (1:2). Aus dieser Verdünnung wurden 100 μL pro Well in vierfacher Auftragung auf beiden

Platten pipettiert. In die Kontroll-Wells wurden auch jeweils in vierfacher Auftragung 100 μL PBS aufgetragen. Exakt 10 Minuten nach Befüllung des ersten Wells wurden die Proben wieder abpipettiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass Geschwindigkeit und Reihenfolge entsprechend der Befüllung waren, sodass die Inkubationszeit für die Wells sich nicht unterschied.

Die weiteren Schritte der Durchführung erfolgten nach Herstellerangaben: Die Platten wurden dreimal mit Waschpuffer A gewaschen und trocken geklopft. Es wurden 100 μL der Fixierlösung in jedes Well pipettiert und für 20 Minuten bei RT inkubiert. Die Platte wurde erneut dreimal mit Waschpuffer A gewaschen und 200 μL Quenching Puffer wurden in jedes Well pipettiert. Nach 20 Minuten Inkubation bei RT wurde die Platte viermal mit Waschpuffer A gewaschen. Es wurden 200 μL des Blockpuffers pro Well appliziert und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Zuletzt wurde nun dreimal mit Wash Waschpuffer B gewaschen, die Platten mit Parafilm versiegelt und bei -80 °C eingefroren.

Am Folgetag wurden die Platten für 1 Stunde bei RT aufgetaut. Es wurde in alle Wells einer Platte je 50 μL des murinen Anti-ERK1/2-Antikörpers oder des murinen anti-phospho-ERK1/2-Antikörpers pipettiert und die Platten eindeutig beschriftet. Nach 2 Stunden Inkubation bei RT wurde dreimal mit Waschpuffer B gewaschen. Es wurde jeweils auf beiden Platten 50 μL des horseradish-peroxidase-konjugierten (HRP) Anti-Maus-IgG-Antikörpers pro Well pipettiert und 1 Stunde bei RT inkubiert, wodurch dieser an den Fc-Teil des Primärantikörpers bindet. Nach der Inkubation wurde viermal mit Waschpuffer B gewaschen. Es wurden 100 μL des Tetramethylbenzidin-Substrates (TMB) pro Well pipettiert und für 30 min bei RT in Dunkelheit inkubiert. Dabei oxidiert die HRP das TMB-Substrat, es entsteht eine blaue Färbung. Zuletzt wurden 50 μL der Stop-Lösung pro Well pipettiert. Durch die Zugabe der Schwefelsäure färben sich die Wells gelb. Direkt im Anschluss wurde die Absorption der Wells bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen.

Zur Auswertung wurde der Quotient der Absorptionen des pERK zu ERK gebildet. Um Unterschiede zwischen verschiedenen Durchläufen durch beispielsweise abweichende Zellzahl auszugleichen, wurde dieser Quotient wiederum auf den PBS Leerwert der jeweiligen Messreihe normiert.

2.3.11 ORIS-Migrationsassay

Der ORIS-Migrations-Assay ist ein in-vitro-Verfahren zur Quantifizierung der durch Vesikel induzierten Migration von Tumorzellen, was insbesondere im Hinblick auf die mögliche Rolle von EVs im Rahmen der malignen Tumormigration relevant ist.

Im Rahmen der Studie wurden daher 3×10^4 COLO357-Zellen in 100 μL in je einem Well der ORIS-Platte ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die ORIS-Platte ist eine spezielle 96-Well-Platte mit einem Kunststoff-Stopper in der Mitte des Bodens der Wells, so dass dort keine Zellen wachsen können. Nach 24 Stunden wurden die Stopper gezogen und kontrolliert, ob eine kreisrunde, zellfreie Fläche in der Mitte bei sonst konfluentem Monolayer außen vorhanden war. Bei ausreichendem Bewuchs wurden dann verschiedene Stimuli appliziert, dabei handelte es sich analog zum ERK/pERK-ELISA entweder um die isolierten hsEV oder PBS als Leerprobe. Es wurden 100 μL der Probe pro Well aufgetragen, je vier Wells pro Probe. Da die hsEV nach der Zentrifugation in PBS resuspendiert vorlagen wurden zusätzlich 100 μL eines 20% Panexin-haltigen COLO357 Mediums pro Well pipettiert, um die Zellen während der nächsten 48h mit Nährstoffen zu versorgen. Dadurch ergab sich ein Anteil von 10% Panexin, der den Zellkulturbedingungen der COLO357 entspricht. Die Zellen wurden dann für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C 5% CO_2 inkubiert. Am nächsten Tag wurden noch einmal 100 μL 10% COLO357-Medium hinzugegeben, um den Zellen weiterhin genug Metabolite zur Verfügung zu stellen und die Platte für weitere 24 Stunden im Brutschrank gelagert. Nach insgesamt 48 Stunden Inkubation wurde das Medium entfernt und die Zellen mit einer DiffQuick-Färbung eingefärbt, wobei dem gleichen Protokoll wie in Kapitel 2.2.8 gefolgt wurde. Zur Auswertung wurden die Kreisflächen der Wellböden durch ein mit einer Kamera (Point Grey, Richmond, British Columbia, Kanada) ausgestattetes Lichtmikroskop (ZEISS, Oberkochen, Deutschland) aufgenommen und digitalisiert. Im Anschluss wurde über die Software Fuji mithilfe eines speziell dafür geschriebenen Makros die von Zellen bedeckte Fläche gemessen. Zur Bestimmung der bewachsenen Fläche wurde mit der Software ImageJ zunächst das Bild in schwarz-weiß gefärbt und der Kontrast maximiert, sodass sich der unbewachsene Untergrund weiß und die Zellen schwarz darstellen. Anschließend wurde die Anzahl der weißen Pixel gemessen. Da die auszuwertenden Bilder jedoch nicht nur die Kreisfläche des Migrationsbereichs zeigen, sondern auch umliegend

das Schwarz der Blende, musste zur Berechnung des bewachsenen Areal zunächst die Kreisfläche ermittelt werden. Dazu wurde bei einer repräsentativen Leerprobe der Durchmesser des Kreises in Pixeln gemessen und über $A = \pi \times r^2$ die Fläche in Pixeln berechnet. Die gemessene weiße Fläche wurde dann von dieser Kreisfläche subtrahiert; das Ergebnis stellt die schwarze, also bewachsene Fläche innerhalb des Kreises dar. Teilt man diese Pixelanzahl durch die Gesamtpixel des Kreises erhält man den prozentualen Anteil des Bewuchses, wobei 0% keine Zellen und 100% eine vollständige Bedeckung darstellen. Die Pixelmenge innerhalb des Kreises ergab sich als 1920924 Pixel.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Excel 2010 sowie mit Graphpad Prism 8. Für dichotom-nominalskalierte Gruppen mit intervallskalierten Werten wurde der Students-T-Test zur Ermittlung der Signifikanz verwendet. Bei mehr als zwei Gruppen wurde ein two-way-ANOVA durchgeführt. Zur Auswertung nicht normalverteilter Ergebnisse wurde stattdessen der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Zur Ermittlung von Korrelationen wurde die Pearsons-Produkt-Moment-Korrelation verwendet, wobei die Stärke der Korrelation als schwach für $r = 0,1$, mittel für $r = 0,3$ und stark für $r = 0,5$ interpretiert wurde (1988_Cohen).

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente (Kapitel 2) sind auf zwei Ebenen zu betrachten. Zum einen im Hinblick auf die Entwicklung eines standardisierten Protokolls zur Untersuchung von EV mittels Durchflusszytometrie und zum anderen in Bezug auf die Charakterisierung der hsEV von Urothelkarzinomzellen anhand von den Zellkulturreihen RT4 und J82 sowie auf die Proben von Patienten mit Blasenkarzinom.

3.1 Entwicklung eines standardisierten Protokolls zur Untersuchung von EV mittels Durchflusszytometrie

Für die Entwicklung eines standardisierten Protokolls wurden die dargestellten Methoden (Kapitel 2.1) im Hinblick auf die Färbebedingungen, Hintergrundrauschen, Auswahl des Triggers, Nachweis von membranumhüllten Teilchen und Ursprung untersucht. Dabei wurden jeweils Kontrolluntersuchungen durchgeführt, um ein zuverlässiges Verfahren für die Untersuchung von EV mittels Durchflusszytometrie zu etablieren.

3.1.1 Optimierung der Färbebedingungen für den Membranfarbstoff CFDA-SE

Um die optimalen Färbebedingungen von EV mittels CFDA-SE zu ermitteln wurden die Variablen Temperatur, Färbedauer und Konzentration für den Einsatz des Farbstoffes untersucht. Dafür wurden EV-haltige Überstände aus COLO357-Zellkulturen nach der zweiten „ls-Zentrifugation“ für 10 oder 60 Minuten, bei 4°C, Raumtemperatur oder 37°C sowie mit 1 oder 40 µM CFDA-SE gefärbt, bevor sie der hs-Zentrifugation unterzogen wurden. Anschließend wurden die Proben in PBS resuspendiert und durchflusszytometrisch im FITC-positiv-"gate" quantifiziert. Der Trigger im FITC-Kanal lag bei 600, der Probenstrom wurde daher auf 10 mL/min eingestellt.

In den bei 4°C inkubierten Proben können signifikant mehr Ereignisse gegenüber den Proben bei Raumtemperatur oder 37°C detektiert werden. Dieser Unterschied zeigt sich sowohl bei kurzer Inkubationsdauer für 10 Minuten als auch bei langer Inkubationsdauer von 60 Minuten. Insofern wird die Temperatur auf 4°C festgelegt, um eine möglichst hohe Anzahl an Ereignissen erkennen zu können. In Bezug auf die Färbedauer lassen sich in allen Ansätzen bei einer Dauer von 10 Minuten eine

höhere Ereigniszahl als bei 60 Minuten detektieren. Dementsprechend wird eine Färbedauer von 10 Minuten bestimmt. Bei der Konzentration des Farbstoffs zeigte sich, dass der Einsatz von höherkonzentriertem CFDA-SE mit 40 μM signifikant mehr Ereignisse gegenüber der Verwendung von 1 μM erzeugt. Dabei ist dieser Effekt nicht linear bei aufsteigenden Konzentrationen von 80 oder sogar 120 μM zu beobachten. Eine Darstellung dieser Variablen in Bezug auf die Anzahl detektierbarer Ereignisse findet sich in der folgenden Abbildung:

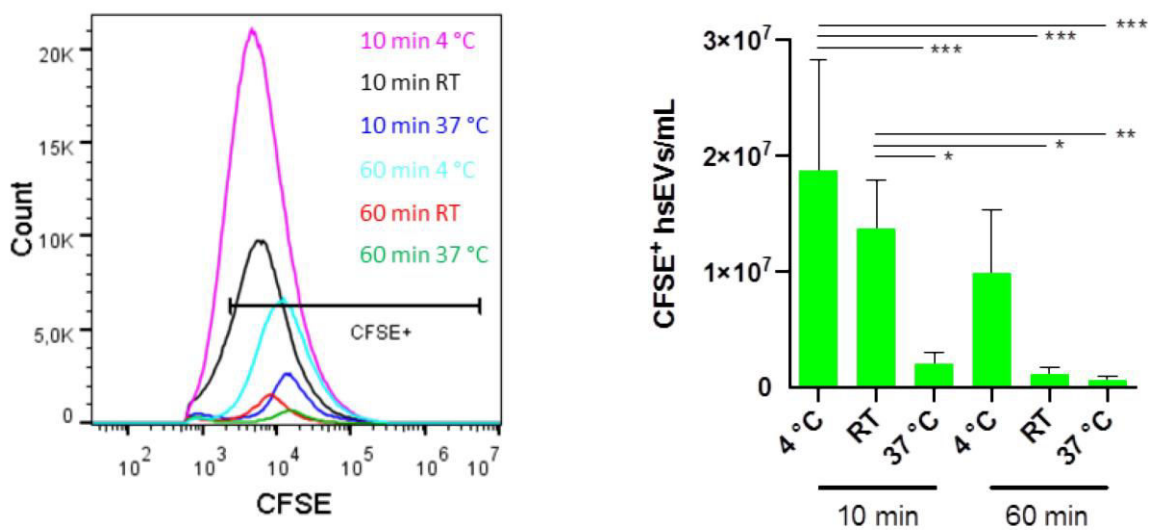


Abbildung 5 Optimierung von Temperatur, Konzentration und Zeit der hseEV-Färbung mit CFDA-SE

Die linke Grafik zeigt eine repräsentative Darstellung der Anzahl von Ereignissen im FITC-Kanal der Durchflusszytometrie für die variablen Färbeansätze. Das Balkendiagramm auf der rechten Seite sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bei n = 4. Die statistische Analyse wurde mit two-way ANOVA und Tukey's multiple comparison test durchgeführt. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

Quelle: Ender, Zamzow et al., 2019

Vor dem Hintergrund dieser Untersuchungen der Variablen Temperatur, Färbedauer und Konzentration wurden für alle weiteren Experimente die CFDA-SE-Färbungen mit 40 μM für 10 Minuten bei 4°C durchgeführt, um einerseits die höchste Anzahl an Ereignissen zu detektieren und andererseits die Intertestrelabilität zu erhöhen.

3.1.2 Einfluss von Hintergrundrauschen durch partikelhaltige Resuspensionsmedien auf die Quantifizierung von EV

Aufgrund der Verwendung von hochauflösenden Durchflusszytometern sowie der geringen Größe der Partikel nahe am Hintergrundrauschen der Maschine können

schon kleine Störfaktoren zu relevanten Unterschieden in den Messergebnissen führen. Das Medium, in dem Resuspensionen und Färbungen durchgeführt werden, stellt dabei den größten Störfaktor dar. Daher wurden pures PBS, PBS mit Zusatz von 1% BSA sowie das COLO357-Medium auf Hintergrundrauschen mittels Durchflusszytometrie untersucht und die Ereignisse im FITC-Kanal bzw. im FITC-positiv-"gate" quantifiziert. Dabei konnten in einer Probe mit durch 0,22 µM-Filter gereinigtem PBS ohne Trigger für dem FITC-Kanal $1,2 \times 10^8$ Ereignisse nachgewiesen werden, weswegen diese als das geräteeigene Hintergrundrauschen gewertet wurden. Um dieses Hintergrundrauschen auszuschließen, wurde die Fluoreszenzintensität durch das Anlegen eines "gate" im FITC-Kanal markiert, ab der weniger als 99% dieser Ereignisse registriert wurden. Anschließend wurden die oben genannten Medien dem hs-Isolationsprotokoll inklusive CFDA-SE-Färbung mit 40 µM für 10 Minuten bei 4°C (wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben) unterzogen und im FITC-Kanal untersucht. Dabei konnten in allen Proben zusätzliche Ereignisse über das Maß des Hintergrundrauschen aufgezeichnet werden, was auf einen erfolgreichen Ausschluss des Hintergrundrauschens schließen lässt. Insbesondere in den proteinreichen Ansätzen mit BSA oder COL357-Medium zeigten sich distinkte Peaks nahe dem FITC-positiv-"gate". Ergänzend wurde eine Positivkontrolle mit hsEV der COLO357 Zellkultur durchgeführt, in der sich eine Überschneidung zwischen dem Peak der hsEV und dem von Medium bzw. PBS mit BSA zeigte. Somit ist davon auszugehen, dass proteinreiche Medien Einfluss auf die gemessene Anzahl der Vesikel ausübt. Aufgrund dessen wurden in allen folgenden EV-Präparationen proteinfreie Lösungen wie PBS verwendet, um diese Störfaktoren zu reduzieren und möglichst einheitliche Ergebnisse zu generieren. Die verschiedenen, oben beschriebenen Ansätze sind in der folgenden Abbildung übersichtlich dargestellt:

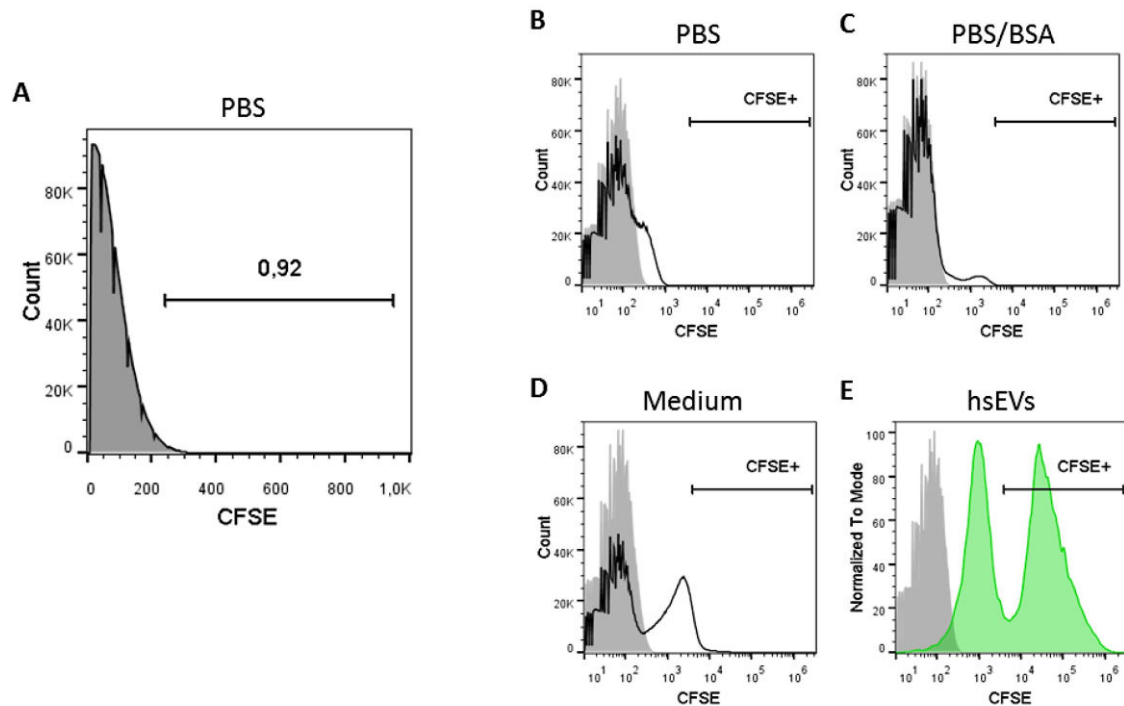


Abbildung 6 Hintergrundrauschen in der Durchflusszytometrie durch Färbemedien

Die linke Grafik (A) zeigt das Histogramm einer Messung von reinem PBS im FITC-Kanal des Durchflusszytometers. In den Grafiken auf der rechten Seite sieht man die Histogramme der Messungen von mit CFDA-SE gefärbtem PBS (B), PBS mit BSA (C) und COLO357-Medium (D). Zuletzt ist als Positivkontrolle eine hsEV-Probe der COLO357-Zelllinie dargestellt (E). In hellgrausieht man jeweils im Hintergrund der Grafiken (B)-(E) das Histogramm der reinen PBS-Probe (A).

Quelle: Ender, Zamzow et al., 2019

3.1.3 Reduktion von falsch-positiven und falsch-negativen Ereignissen durch Auswahl eines geeigneten Triggers im Fluoreszenzkanal

Um eine standardisierte Untersuchung von hsEV per Durchflusszytometrie zu ermöglichen, sollten die Geräteeinstellungen einheitlich für alle Untersuchungen definiert werden. Hierbei kann neben dem Probenstrom auch der Trigger für die jeweiligen Kanäle eingestellt werden. Für die Untersuchung des Triggers wurden hsEV von COLO357 isoliert und in zwei Ansätze aufgeteilt. Einer wurde gemäß dem normalen Protokoll mit 40 μ M CFDA-SE für 10 Minuten bei 4°C gefärbt, der andere wurde mit PBS behandelt. Diese Proben wurden per Durchflusszytometrie untersucht und die Ereignisse im FITC-Kanal quantifiziert. Als Negativkontrolle wurde zudem eine PBS-Probe ohne hsEV mitgeführt. Zusätzlich wurde diese Messung mit aufsteigendem Trigger von 100 bis 1000 im FITC-Kanal wiederholt. Dabei ergeben sich in allen Ansätzen zahlreiche Ereignisse für niedrige Trigger-

Werte; ein signifikanter Unterschied zwischen gefärbtem und ungefärbtem Ansatz konnte nicht dargestellt werden. Ab einem Trigger von 300 konnten weder in der ungefärbten EV-Probe noch in der PBS-Probe Ereignisse nachgewiesen werden, in der gefärbten hsEV-Probe hingegen wurden immer noch Ereignisse detektiert. Allerdings ist kein signifikanter Unterschied im FITC-positiv-"gate" zwischen einem Trigger von 300 und 1000 festzustellen. Vergleicht man jedoch den relativen Anteil der Ereignisse im FITC-positiv-"gate" an den insgesamt detektierten Ereignissen werden bis zu einem Trigger von 600 mit jeder 100er-Stufe des Triggers signifikant mehr FITC-positive Ereignisse gemessen:

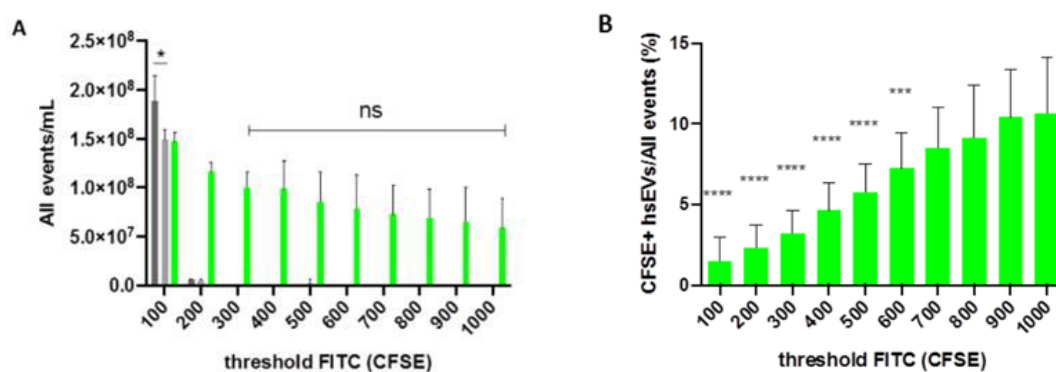


Abbildung 7 Einfluss des Triggers im FITC-Kanal auf die Quantifizierung von hsEV

Die linke Grafik (A) zeigt ein Balkendiagramm der Gesamt-Ereignisse im FITC-Kanal für verschiedene Trigger-Werte von 100 bis 1000, in dunkelgrau ein pures PBS, in hellgrau ungefärbte hsEV der COLO357 sowie in grün mit CFDA-SE gefärbte hsEV. Abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung für $n = 4$. Das Balkendiagramm auf der rechten Seite (B) zeigt den relativen Anteil von Ereignissen im FITC-positiv-"gate" (hier CFSE+) an den Gesamt-Ereignissen im FITC-Kanal. Die statistische Analyse wurde mit two-way ANOVA und Tukey's multiple comparison test durchgeführt. * $p < 0,05$, *** $p < 0,01$, **** $p < 0,001$, ns = not significant.

Quelle: Ender, Zamzow et al., 2019

Aus dieser Untersuchung kann abgeleitet werden, dass es eine Minimal-Trigger von mindestens 300 im FITC-Kanal erfordert, um suffizient Hintergrundrauschen zu minimieren. Da ein höherer Trigger die Auflösung der Untersuchung im Bereich des FITC-positiv-"gate" verbesserte, wurde in allen folgenden Experimenten ein Trigger von 600 eingestellt.

3.1.4 Indirekter Nachweis von hsEV durch Detergenzbehandlung

Um zu zeigen, dass die Reaktion von CFDA-SE nur in einer Probe mit biologisch aktiven Teilchen mit Lipid-Doppelmembran möglich ist, wurde eine hsEV-Probe von

COLO357 vor der Färbung mit CFDA-SE mit 0,1 % Triton X-100 behandelt. Eine unbehandelte hsEV-Probe wurde als Positivkontrolle verwendet und gemäß dem oben beschriebenen Protokoll mit 40 μ M CFDA-SE gefärbt. Anschließend wurden die Ereignisse beider Ansätze mittels Durchflusszytometrie im FITC-positiv-"gate" quantifiziert. In der Kontrollprobe lag der Anteil der „FITC-positiv“ Ereignisse bei etwas über 15%, durch die Behandlung mit Triton X-100 nur noch bei 1%:

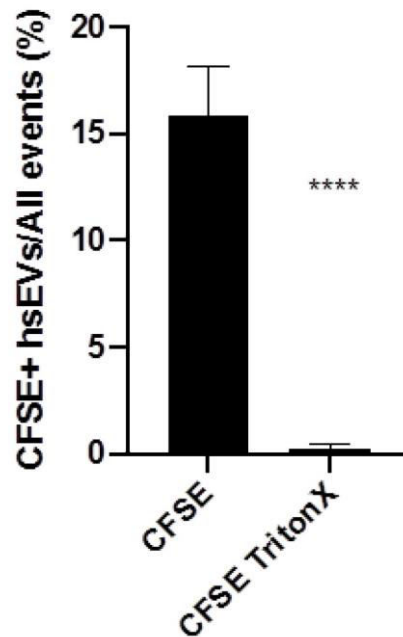


Abbildung 8 Detergenzbehandlung der hsEV mit Triton-X-100

Dargestellt ist ein Histogramm der Ereignisse im FITC-positiv-"gate" (hier CFSE+) relativ an den insgesamt aufgezeichneten Ereignissen einer gefärbten COLO357-Probe. Diese wurden mit oder ohne die Zugabe von Triton-X-100 nach dem Standardprotokoll eingefärbt. **** $p < 0,001$

Quelle: Ender, Zamzow et al., 2019

Hier ist also ein deutlich signifikanter Unterschied zu erkennen. Daraus ist zu schließen, dass nur intakte hsEV-Membranen durch CFDA-SE angefärbt werden können. Dies ist zudem als weiterer Hinweis auf die erfolgreiche Isolation und Färbung von EV durch die sequenzielle Zentrifugation zu bewerten.

3.1.5 Ursprung von hsEV aus der Zellmembran der Tumorzellen

Die durch sequenzielle Zentrifugation gewonnene Population von hsEV soll aufgrund ihrer Größe zum überwiegenden Teil den Ektosomen entsprechen, welche ihren Ursprung in der Zellmembran der Mutterzelle haben. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden COLO357-Zellen mit 1 μ M CFDA-SE gefärbt und anschließend für

24 bzw. 48 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Überstände gemäß dem Zentrifugationsprotokoll aufbereitet, dabei wurde keine zusätzliche Färbung mit CFDA-SE durchgeführt. Sowohl die Überstände als auch das resuspendierte Pellet der hs-Zentrifugation wurden per Durchflusszytometer untersucht und im FITC-positiv-"gate" quantifiziert. Sowohl im Überstand als auch im Pellet konnten Ereignisse registriert werden. Es sind jedoch deutlich mehr Ereignisse in dem resuspendierten Pellet festzustellen. Da die mean-fluorescence-intensity der Ereignisse im Pellet höher ist, erkennbar an dem Peak im Histogramm in Abbildung 9, weisen die Ereignisse also eine deutliche größere Menge CFSE auf. Dies ist ein Indikator für die Herkunft der in dieser Studie untersuchten hsEV aus der Zellmembran der Ursprungszelle, welche durch CFDA-SE gefärbt wurde.

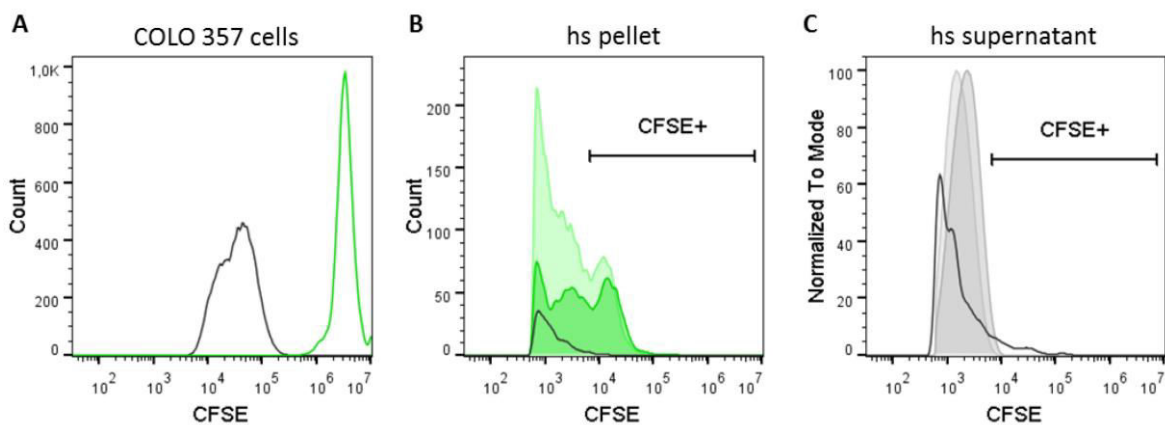


Abbildung 9 Membrantracking von CFSE-gefärbten COLO357-Zellen

Grafik (A) zeigt Histogramme der Ereignisse von ungefärbten (schwarz) und gefärbten (grün) COLO357-Zellen im FITC-Kanal (hier CFSE) des Durchflusszytometers. Im Anschluss wurden die Überstände der Zellkultur dem Isolationsprotokoll unterzogen und das pellet (B) sowie die Überstände der hs-Zentrifugation per Durchflusszytometrie quantifiziert. Die schwarzen Histogramme entsprechen dem ungefärbten Ansatz, die dunkelgrünen bzw. -grau gefärbten Histogramme einer Färbung für 24h und die hellgrünen bzw. -grauen Histogramme einer Färbung für 48h.

Quelle: Ender, Zamzow et al., 2019

Neben dem "tracking" von markierten Biomembranen können auch definierte Strukturproteine der äußeren Zellmembran untersucht werden. Konkret wurden für die Untersuchung die Integrine CD9, CD63 sowie CD81 betrachtet. Nach der Färbung mit PE-markierten Antikörpern gegen diese Proteine wurden die EV per Durchflusszytometrie in PE und FITC-Kanal dargestellt und ein "gate" für FITC- und PE-positivität etabliert. In diesem "gate" liegende Ereignisse entsprachen hsEV mit intakter Biomembran (CFSE-positiv) und positivem Nachweis der entsprechenden Proteine auf der Oberfläche. Auf der Oberfläche konnten dabei die hsEV der

COLO357-Zellen sowohl CD9 als auch CD81 nachgewiesen werden, CD63 hingegen nicht.

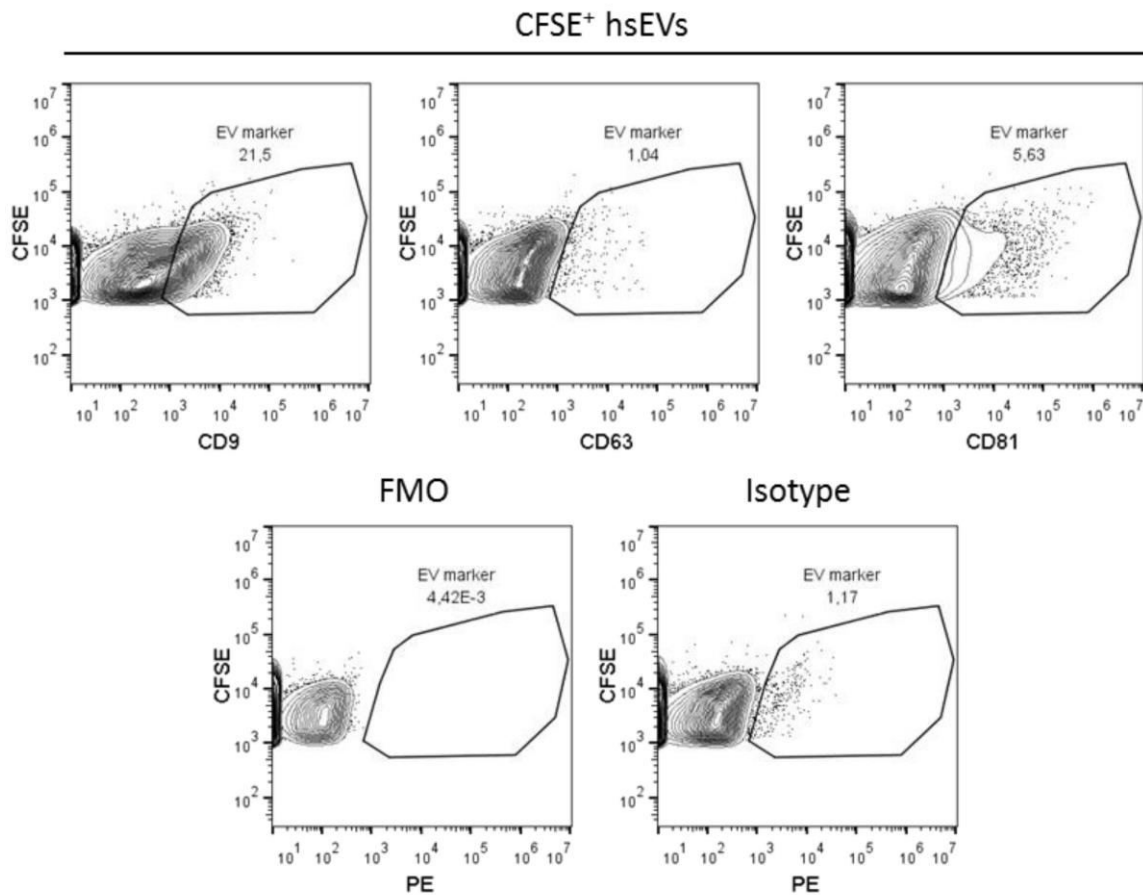


Abbildung 10 Antikörperfärbung der hsEV von COLO357 mit CD9, CD63 und CD81

Die oberen Abbildungen zeigen die Ereignisse einer durchflusszytometrischen Untersuchung von hsEV der COLO357 im FITC- und PE-Kanal. Die hsEV wurden mit CFDA-SE sowie jeweils einem Antikörper gegen CD8, CD63 und CD81 gefärbt. Das PE-"gate" wurde mithilfe von FMO-Kontrollen etabliert, als Negativkontrolle dienten Isotyp-Färbungen.

Quelle: Ender, Zamzow et al., 2019

Daraus ist abzuleiten, dass hsEV der COLO357 zwei bekannte Strukturproteine der äußeren Zellmembran auf ihrer Oberfläche tragen. Es handelt sich demnach um einen weiteren Hinweis auf den Ursprung der hier isolierten EV. Zur Bestimmung des "gate" wurden FMO-Kontrollen durchgeführt, als Negativ-Kontrolle erfolgte eine Isotyp-Färbung.

3.2 Charakterisierung der hsEV von Urothelkarzinomzellen anhand von der Zellkulturreihen RT4 und J82 sowie Proben von Patienten mit Blasenkarzinom

Nach der Etablierung eines Isolations- und Färbeprotokolls sowie einem einheitlichen durchflusszytometrischen Untersuchungsstandard wurden die hsEV aus dem Urin von Patienten mit Blasenkarzinomen in Bezug auf ihre Anzahl, Oberflächeneigenschaften sowie biologische Potenz untersucht. Zusätzlich dienten die Zellkulturreihen RT4 und J82 als Modellkultur des Blasenkarzinoms, um die Ergebnisse der klinischen Proben mit denen der gut standardisierten Zellkultur zu vergleichen.

Insgesamt wurden Proben von 79 Patienten gesammelt, welche zur Durchführung einer TUR-B oder Zystektomie in der Ambulanz vorstellig wurden. 67,9% der Probanden waren weiblich, das mittlere Alter betrug 70 Jahre (+/- 11,4 Jahre SD). Bei 72,2% der Patienten konnte ein Blasenkarzinom nachgewiesen werden, davon waren wiederum 38,6% histopathologisch als invasives Karzinom zu klassifizieren. Etwa ein Viertel der Patienten hatte eine positive Raucheranamnese. Bei 11% der Patienten gab es in der Vorgeschichte zudem eine tiefe Venenthrombose.

3.2.1 Deskriptive Charakterisierung der hsEV aus Urinproben anhand von Anzahl und biologischen Parametern

Die Urinproben der Patienten wurden gemäß dem oben beschriebenen Isolationsprotokoll aufbereitet, um hsEV anzureichern und mit CFDA-SE zu färben. Anschließend wurden diese hsEV mittels Durchflusszytometrie quantifiziert sowie per ELISA auf die Menge aktiven TF und PS untersucht. Zusätzlich wurde die ERK-Aktivierung und Migrationsinduktion in COLO357-Zellen durch hsEV-Stimulation der Patienten analysiert.

Zunächst wurde die Kohorte geteilt in Subgruppen von Patienten, bei denen kein Urothelkarzinom nachgewiesen wurde und denjenigen mit Karzinom jeglichen Stadiums. Im Urin der Karzinompatienten wurden im Mittel $1,70 \times 10^7$ EV/mL gemessen, in der karzinomfreien Gruppe $1,63 \times 10^7$. Der Unterschied zwischen den Gruppen ist demnach nicht statistisch signifikant. Auch bezüglich der TF-Activity, der PS-Konzentration, der ERK-Aktivierung sowie der Migration im ORIS liegt kein signifikanter Unterschied vor.

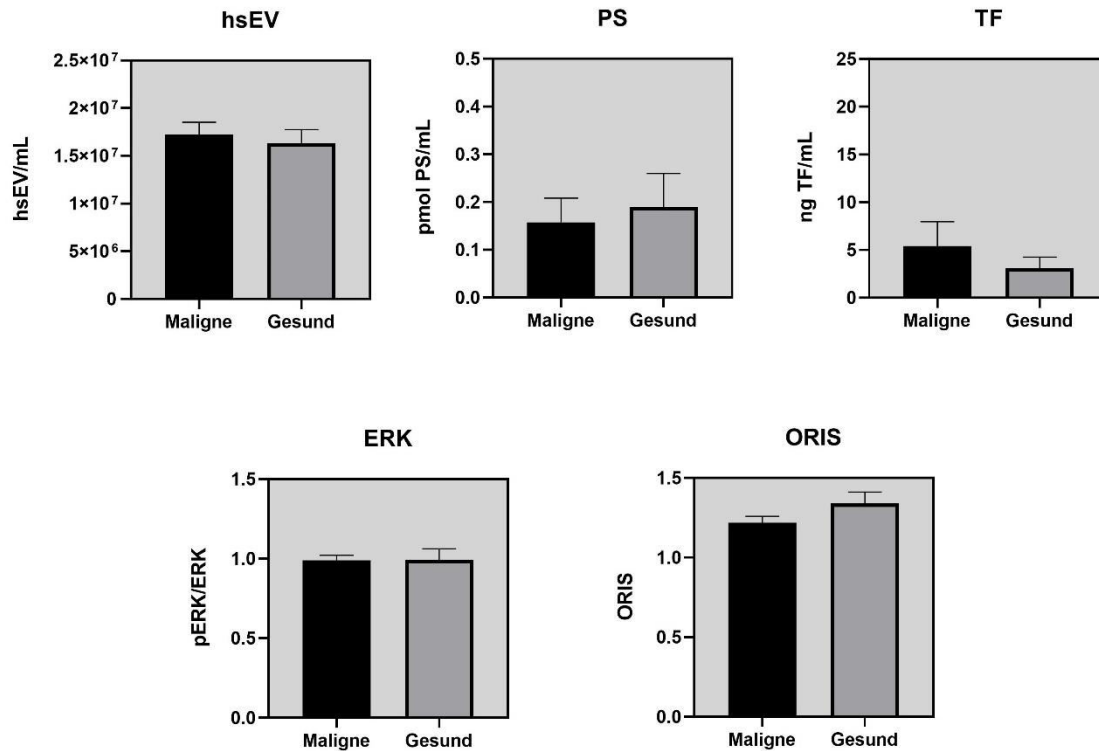


Abbildung 11 Vergleich der hsEV von Gesunden gegenüber Blasenkarzinomen bzgl. Konzentration, TF, PS, ERK und ORIS

Dargestellt als Balkendiagramme sind die Mediane mit SEM der Parameter hsEV-Anzahl, PS-Konzentration, TF-Konzentration, ERK/pERK-Verhältnis sowie ORIS-Migration im Patientenurin der Gruppen "Maligne" und "Gesund". Die Statistische Testung erfolgte mit Students-T-Test, * $p < 0,05$

Allerdings zeigte die Korrelationsmatrix der erhobenen Parameter von den urinstämmigen hsEV der Karzinompatienten eine signifikante positive Korrelation zwischen TF und PS: Der R-Wert liegt hier bei 0,43 und zeigt damit eine mittlere Effektstärke an. Außerdem liegt eine schwache negative Korrelation von ERK mit der Zellmigration im ORIS vor. Andere signifikante Korrelationen von relevanter Effektstärke liegen nicht vor.

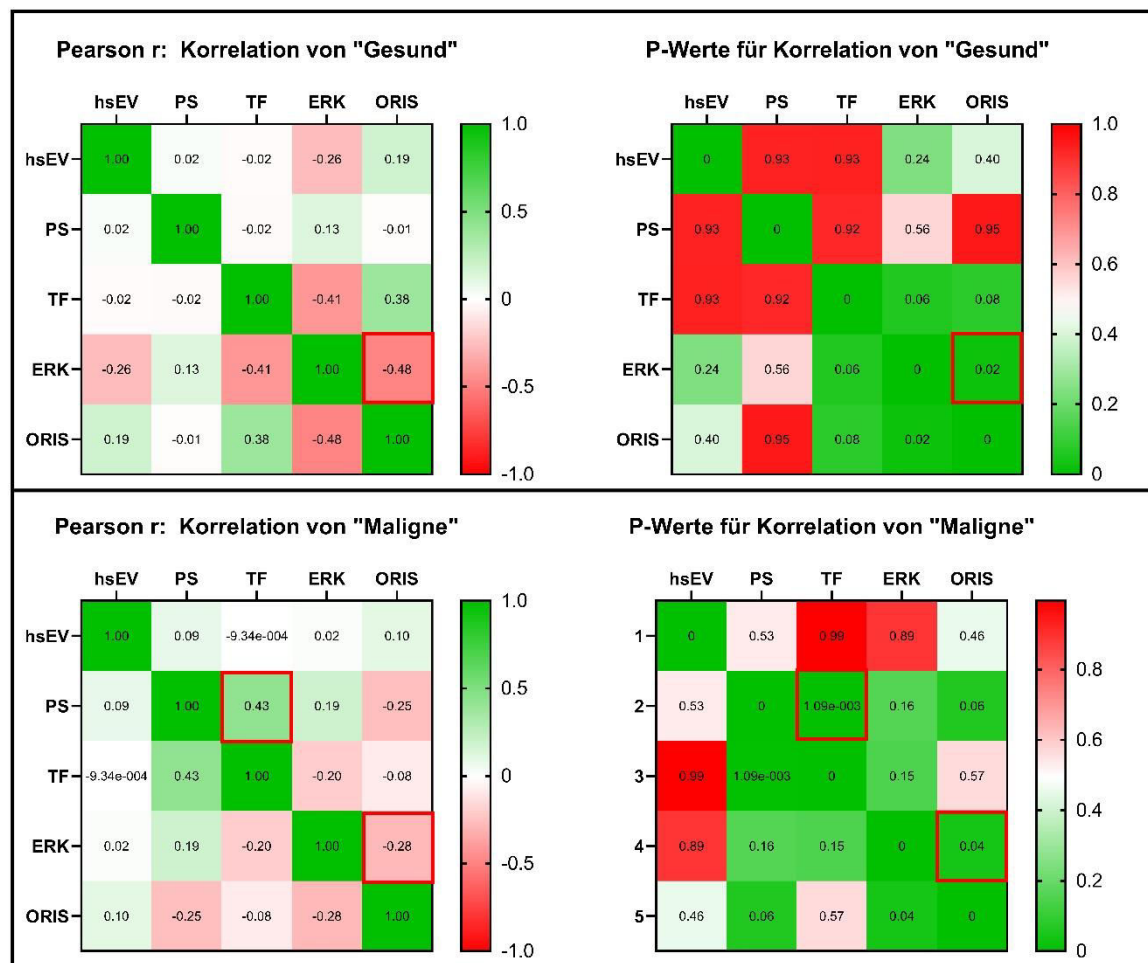


Abbildung 12 Korrelation der Variablen Konzentration TF, PS, ERK und ORIS der hsEV von Gesunden und Erkrankten

Dargestellt sind die Korrelationstabellen als heatmap für die Parameter hsEV, PS, TF, ERK und ORIS für die Gruppen „Gesund“ (oben) und „Maligne“ (unten). Grüne Farbe symbolisiert zunehmende, rote Farbe abnehmende Korrelation (links). Korrelation wurde über pearsons r ermittelt, Signifikanzniveau $p < 0,05$

Die Patienten mit Blasenkarzinomen lassen sich weiterhin in zwei Subgruppen unterteilen: Diejenigen, deren Tumor die Grenzen des Urothels einhalten gegenüber denjenigen, bei denen die Grenzen ihres Ursprungsgewebes bereits durchbrochen wurde. Diese Unterteilung folgt somit der Leitlinie Urothelkarzinom der Deutschen Gesellschaft für Urologie entsprechend in nicht-muskelinvasiv (NMI) und muskelinvasiv (MI).

Auch im Vergleich dieser Subgruppen ergibt sich bezüglich der Vesikelkonzentration kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Betrachtet man jedoch die TF-Konzentration ist eine 10-fach erhöhte Konzentration von aktivem Tissue-Factor auf der Oberfläche der hsEV von MI-Tumoren im Vergleich zu den NMI-Tumoren nachzuweisen; dieser Unterschied ist statistisch

signifikant. Eine ähnliche Tendenz ließ sich auch bei der PS-Konzentration feststellen, diese war jedoch nicht signifikant. Wie auch im Vergleich der gesunden zur erkrankten Gruppe liegt bezüglich der ERK-Aktivierung oder der Migration von COLO357-Zellen kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

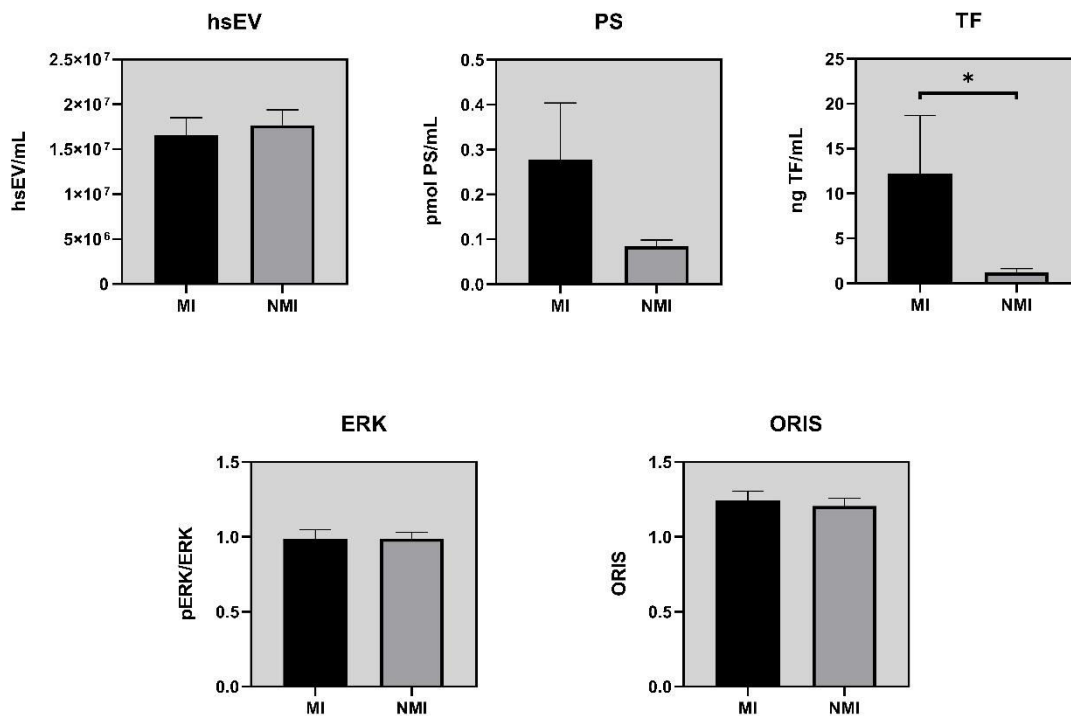


Abbildung 13 Vergleich der hsEV von invasiven gegenüber nichtinvasiven Blasenkarzinomen bzgl. Konzentration, TF, PS, ERK und ORIS

Dargestellt als Balkendiagramme sind die Mediane mit SEM der Parameter hsEV-Anzahl, PS-Konzentration, TF-Konzentration, ERK/pERK-Verhältnis sowie ORIS-Migration im Patientenurin der Gruppen „Muskelinvasiv“ (MI) und „Nicht-muskelinvasiv“ (NMI). Die Statistische Testung erfolgte mit Students-T-Test, * $p < 0,05$

Die Korrelationsmatrix für den Subgruppen MI und NMI sind im Folgenden dargestellt. Hier wird deutlich, dass für die MI-Gruppe eine signifikante positive Korrelation zwischen PS und TF vorliegt. Weiterhin ist eine negative Korrelation sowohl von PS und auch von der ERK-Aktivierung auf die Migrationsanalyse im ORIS zu beobachten. Während sich die Assoziation von PS mit TF nicht in der NMI-Gruppe wiederfindet, liegt jedoch eine positive Korrelation von PS mit der ERK-Aktivierung vor. Wie auch in der MI-Gruppe korreliert der PS-Spiegel negativ mit der Migration im ORIS-Assay:

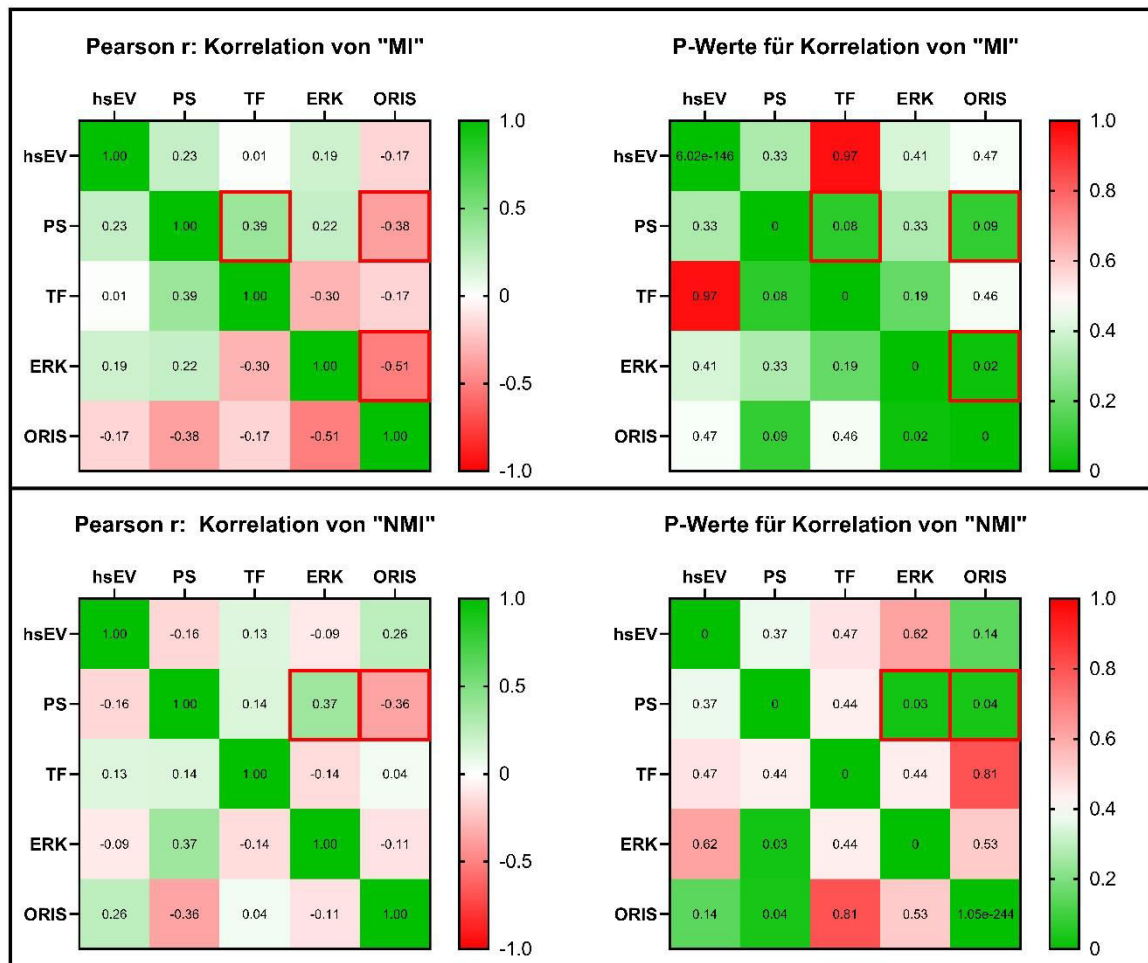


Abbildung 14 Korrelation der Variablen Konzentration TF, PS, ERK und ORIS der hsEV von invasiven und nichtinvasiven Blasenkarzinome

Dargestellt sind die Korrelationstabellen als heatmap für die Parameter hsEV, PS, TF, ERK und ORIS für die Gruppen „Muskelinvasiv“ (oben) und „Nicht-Muskelinvasiv“ (unten). Grüne Farbe symbolisiert zunehmende, rote Farbe abnehmende Korrelation (links). Korrelation wurde über pearsons r ermittelt, Signifikanzniveau $p < 0,05$.

3.2.2 Höhere CD147-Spiegel von hsEV von invasiven Karzinomen

Wie eingangs geschildert (Kapitel 1.3.2) gibt es zahlreiche transmembrane Glykoproteine, die einen relevanten Einfluss auf die Bewegung von Tumorzellen im Tumormikromilieu und die sich daraus ergebende Fähigkeit zur Metastasierung und Invasion nehmen. Die hsEV der Zellkultur sowie der Patientenproben wurden daher mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD147, EpCAM, CD47 und HER2 gefärbt und per Durchflusszytometrie charakterisiert. Die mean-fluorescence-intensity von mit anti-CD147-Antikörpern behandelten hsEV der invasiven J82 liegt deutlich über der von RT4-stämmigen Vesikeln. Dies lässt eine erhöhte Konzentration auf der Oberfläche der EV vermuten. Der relative Anteil an CD147-positiven hsEV der J82-Zellen liegt bei ca. 12 %. Dies stellt eine dreifache

Erhöhung gegenüber den hsEV der RT4-Zellreihe dar. Bezüglich der anderen Marker unterscheiden sich die hsEV der beiden Zellkulturlinien nicht in relevantem Maß:

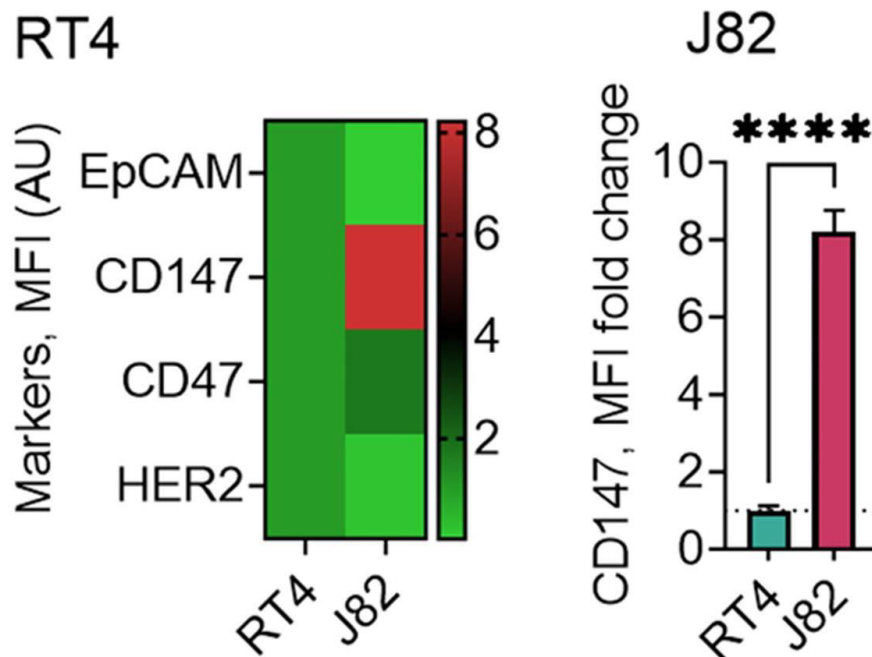


Abbildung 15 Oberflächenmarker EpCAM, CD147, CD47 und HER2 auf hsEV von RT4 und J82

Die heatmap auf der linken Seite zeigt die „mean fluorescence intensity“ von Zellen der Zelllinien RT4 und J82 im PE-Kanal der Durchflusszytometrie. Die hsEV wurden mit jeweils mit Antikörpern für die Oberflächenmarker EpCAM, CD147, CD47 und HER2 gefärbt. Das Balkendiagramm auf der rechten Seite illustriert den Unterschied der Zellen von RT4 gegenüber J82 bezüglich CD147. Mediane mit 10er und 90er Perzentile, nichtparametrische Testung mit Mann-Whitney U Test.

Quelle: Boddu und Zamzow et al., 2024

Aus den Urinproben der Patienten lässt sich zudem der Unterschied in der CD147-Expression bei den hsEV nachweisen: Der Anteil der CD147-positiven hsEV in den Proben der MI-Gruppe ist gegenüber denen der NMI-Gruppe zweifach erhöht.

Neben CD147 wurden die hsEV der Zellkulturen RT4 und J82 auch auf ihre Tissue-Factor-Activity (TFA) untersucht. Die hsEV der RT4 zeigten beinahe keine TFA, wohingegen diejenigen der J82-Zellen einen deutlichen Substratumsatz im ELISA erzeugen. Wie auch für CD147 lässt sich dieser Unterschied auch in den klinischen Proben nachweisen, da die TFA der hsEV von invasiv Erkrankten um das Dreifache höher ist als die der nichtinvasiv Erkrankten:

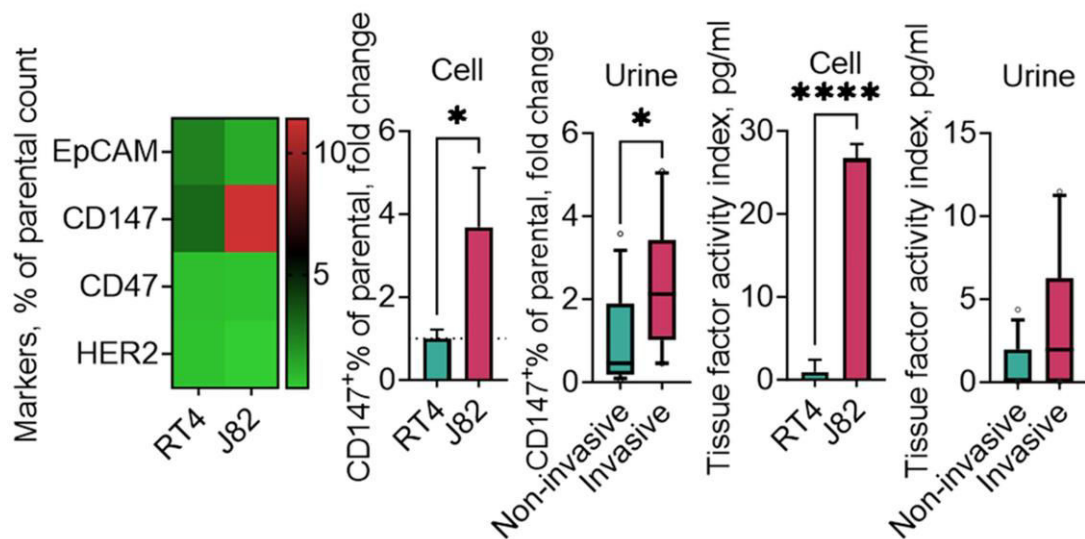


Abbildung 16 Oberflächenmarker CD147 sowie TF-Activity auf hsEV von RT4, J82 und Patienten

Die heatmap auf der linken Seite zeigt den relativen Anteil positiver hsEV der Zelllinien RT4 und J82 im PE-Kanal der Durchflusszytometrie für die Marker EpCAM, CD147, CD47 und HER2 gefärbt an den Gesamt-hsEV. Die Balkendiagramme bzw. Boxplots (von links nach rechts) zeigen die CD147-Positivität der hsEV der Zelllinien RT4 und J82 sowie der hsEV aus Patientenurin für die Gruppen „MI“ (hier Invasive) und NMI (hier Non-invasive). Außerdem ist für die hsEV der Zelllinien als auch aus Patientenurin die Tissue-Factor-Activity dargestellt. Mediane mit 10er und 90er Perzentile, nichtparametrische Testung mit Mann-Whitney U Test.

Quelle: Boddu und Zamzow et al., 2024

Neben der Durchflusszytometrie wurden die hsEV der J82-Zellen auch durch NTA quantifiziert und in Bezug auf ihre Größe untersucht. Im Pellet der hs-Zentrifugation liegt die mittlere Größe der Partikel bei 171 nm, demgegenüber werden im Überstand selektiv kleinere Partikel angereichert. Betrachtet man die Größenverteilung ergibt sich für die EV im Pellet eine deutlich heterogenere Verteilung im Vergleich zu denen aus den Überständen. Wie auch bei den EV der COLO357 wurde eine Färbung der Biomembranmarker CD9, CD63 und CD81 an den Partikeln im Pellet und im Überstand durchgeführt. Diese lassen sich in beiden Gruppen nachweisen. Auch wenn kein signifikanter Unterschied zwischen Überstand und Pellet vorlag, ist jedoch ein Trend zu erhöhten Werten in den pelletierten hsEV zu erkennen:

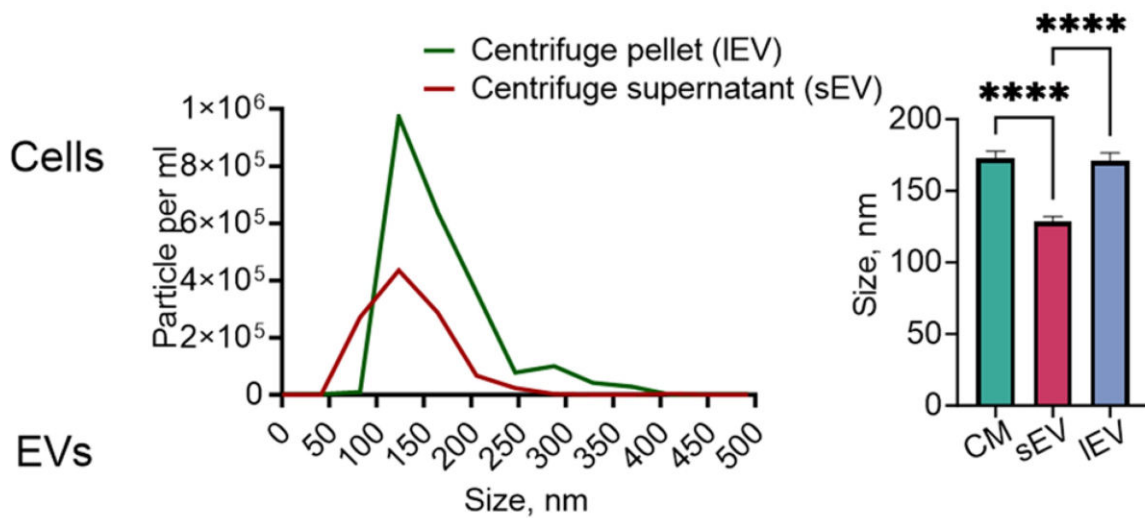


Abbildung 17 Größenverteilung der EV in Überständen und Pellet der hs-Zentrifugation

Die Graphen auf der linken Seite zeigen die Größenverteilung der EV von im Medium von J82-Zellen (hier CM; culture medium) nach der hs-Zentrifugation im resuspendierten pellet (hier IEV für large EV) und dem Überstand (hier sEV für small EV). Die Messung erfolgte über NTA. Das Balkendiagramm zeigt den Median des Durchmessers mit 10. und 90. Perzentile, statistische Testung mittels Mann-Whitney U Test.

Quelle: Boddu und Zamzow et al., 2024

3.2.3 Nachweis des Ursprungs der hsEV aus der Zellmembran durch Transfektion von markiertem CD147

Für den Nachweis des Ursprungs von hsEV wurden Zellen der J82-Zelllinie mit GFP-markierten CD147-Konstrukten transfiziert und der Erfolg mittels konfokaler Mikroskopie nachgewiesen. Vergleichbar mit dem tracking von CFSE-gefärbten Vesikeln bei COLO357 wurden die hsEV der transfizierten J82 isoliert und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dabei konnten GFP-positive hsEV ohne weitere Färbung im FITC-Kanal nachgewiesen werden. Eine Negativprobe mit Triton-X-100 bestätigt die Reversibilität der Ergebnisse nach Auflösung von membrangebundenen Partikeln, wodurch die Herkunft der hsEV aus der äußeren Biomembran der Mutterzelle erneut bestätigt werden konnte. Um den Einfluss von CD147 und TF-Überexpression auf EV-Ausschüttung und das invasive Potential zu untersuchen, wurden J82-Zellen mit Plasmiden für Tissue-Factor sowie CD147 transfiziert. Hierdurch produzieren und exprimieren die behandelten Zellen erhöhte Spiegel der entsprechenden Proteine. Die Quantifizierung mittels NTA zeigte dabei eine signifikant erhöhte EV-Anzahl in den

Überständen der transfizierten Zellkultur gegenüber der Vergleichsgruppe unbehandelter J82-EV. Anschließend wurden die aus der transfizierten Zellkultur gewonnenen hsEV zur Stimulation von J82-Zellen in einem Invasionsassay verwendet. Verglichen mit den hsEV der Normvariante induzierten die hsEV aus den mit TF und CD147 transfizierten Kulturen eine doppelt so hohe Invasivität der Zellen:

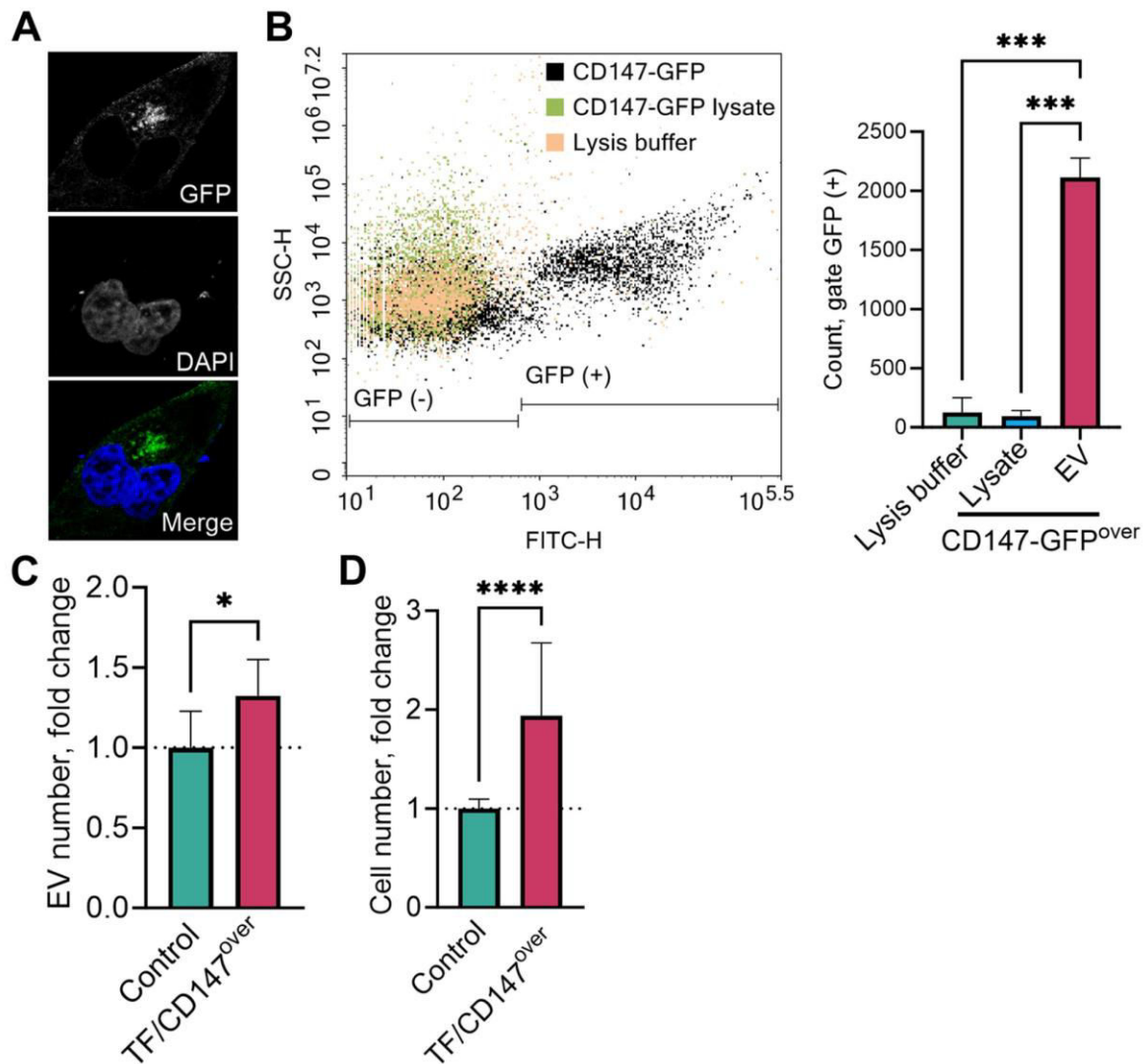


Abbildung 18 hsEV-Tracking mit CD147-GFP und hsEV-Bildung durch TF/CD147-Überexpression

Abbildung A zeigt mit CD147-GFP markierte J82-Zellen in der konfokalen Mikroskopie (Von oben: GFP; DAPI; GFP+Dapi). Die hsEV der CD147-GFP-markierten J82-Zellen wurden durchflusszytometrisch im FITC-Kanal untersucht, eine Behandlung mit Triton X-100 (hier lysis buffer) dient als Negativkontrolle (B). Aus dem Medium von mit TF- und CD147-Plasmiden transfizierten J82-Zellen wurden nach 48h hsEV isoliert und diese per NTA quantifiziert (C). Diese hsEV wurden als Stimulation im Invasions-Assay verwendet, als Kontrollgruppe dienen jeweils hsEV nativer J82-Zellen (D). Mittelwerte mit Standardabweichung, statistische Testung mittels students t-test.

Quelle: Boddu und Zamzow et al., 2024

3.2.4 Zellmigration bei tumorassoziierten hsEV

Für ein Migrationsassay wurden J82-Zellen in porösen Well-Einsätzen ausgesät und mit hsEV stimuliert, die ebenfalls von J82-Zellen gewonnen wurden. Anschließend wurde durch Bildaufnahmen der Einsätze die Menge der migrierten Zellen quantifiziert. Als Negativkontrolle diente eine Aufnahme der Zellen ohne weiteren Stimulus. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit den hsEV eine deutlich höhere Migration der Tumorzellen erzeugt als bei der Leerprobe. Dieser Effekt ist durch die Zugabe von AC-73, einem spezifischen Inhibitor von CD147, vollständig reversibel. Wird zusätzlich zu AC73 noch tissue-factor-pathway-inhibitor (TFPI), also den natürlichen Antagonisten des TF, ergänzt, reduziert sich die induzierte Migration erneut um den Faktor zwei:

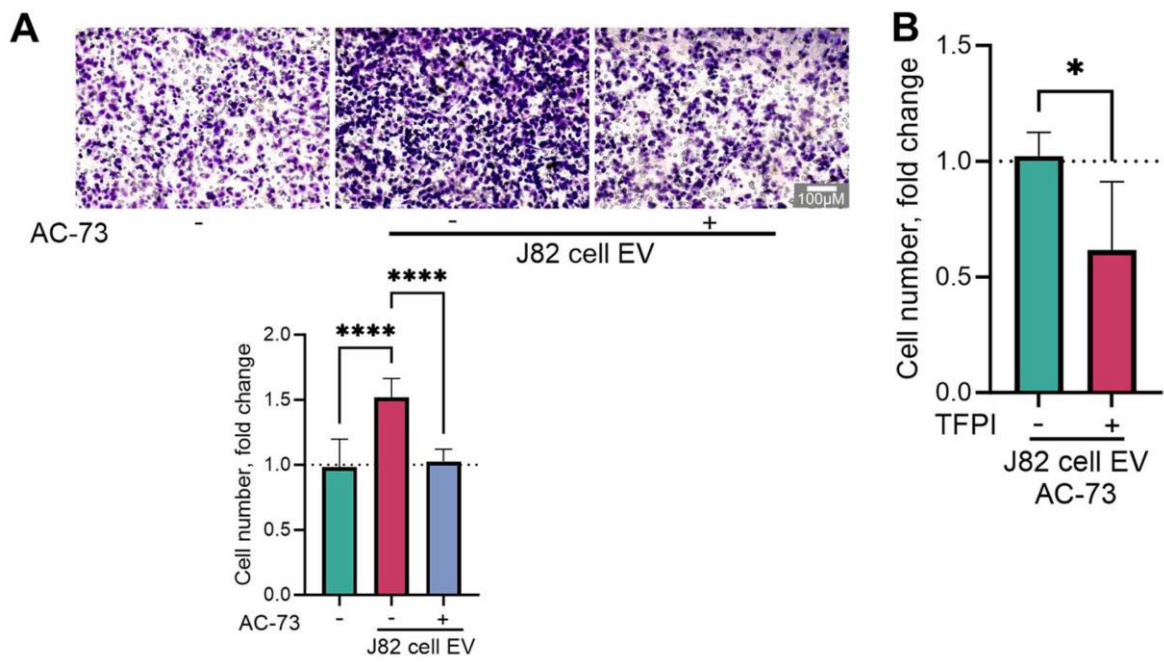


Abbildung 19 Migrationinduktion durch hsEV von J82 sowie Inhibition durch AC-73

Dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen des Migrationsassays mit J82-Zellen, welche mit hsEV der J82-Zellen stimuliert wurden. In weiteren Ansätzen wurde zusätzlich 5 µg CD147 (A) oder 2,5 µM AC-73 (B) zusammen mit 300 ng/mL TFPI appliziert. Es wurden 6-8 Bilder der migrierten Zellen zur Auswertung verwendet. Mittelwerte mit Standardabweichung, statistische Testung mittels students t-test.

Quelle: Boddu und Zamzow et al., 2024

3.2.5 Induktion von Matrixmetalloproteasen durch CD147-positive und TF-positive hsEV

Die Grundlage der Migration und Invasion von Tumorzellen ist die Aktivierung von Matrixmetalloproteasen, um Strukturen des extrazellulären Raums im Tumormikromilieu aufzulösen. Werden J82-Zellen mit hsEV aus der Zellkultur stimuliert kommt es gegenüber einer unstimulierten Kontrolle zu einer statistisch signifikanten Verdreifachung der Matrixmetalloproteasen-Aktivität. Bei Verdoppelung der Menge der eingesetzten EV, bestimmt an der Gesamtproteinmenge der hsEV-Isolation, liegt sogar eine Vervierfachung vor. Zum Vergleich der Relevanz dieser Effekte wurde als Positivkontrolle rekombinantes rCD147 eingesetzt, dessen Einfluss auf die MMP-Aktivität sich jedoch nicht signifikant von dem der hochdosierten hsEV unterscheidet.

Wie auch im vorangegangenen Experiment wurden die Versuche unter Zusatz von AC-73 wiederholt. Dabei zeigte sich, dass sich die MMP-Aktivität nach Zugabe von 2,5 μM AC-73 um ca. 50% reduziert, eine Verwendung von 5 μM jedoch zu keinem Unterschied im Vergleich zu der von unstimulierten Zellen führt. Eine noch ausgeprägtere Hemmung der Matrixmetalloproteasen-Aktivität gegenüber der singulären Therapie kann durch die duale Hemmung mittels AC-73 und TFPI erreicht werden.

Diese Experimente wurden mit den hsEV der Patienten mit invasivem Blasenkarzinom wiederholt. Auch hier kann eine signifikante Steigerung der MMP-Aktivität durch hsEV nachgewiesen werden, auch wenn die Effektstärke im Vergleich mit den Modell-EV aus der Zellkultur weniger ausgeprägt ist. Dieser Effekt lässt sich auch durch AC-73 und TFPI inhibieren, wie in der folgenden Abbildung deutlich wird.

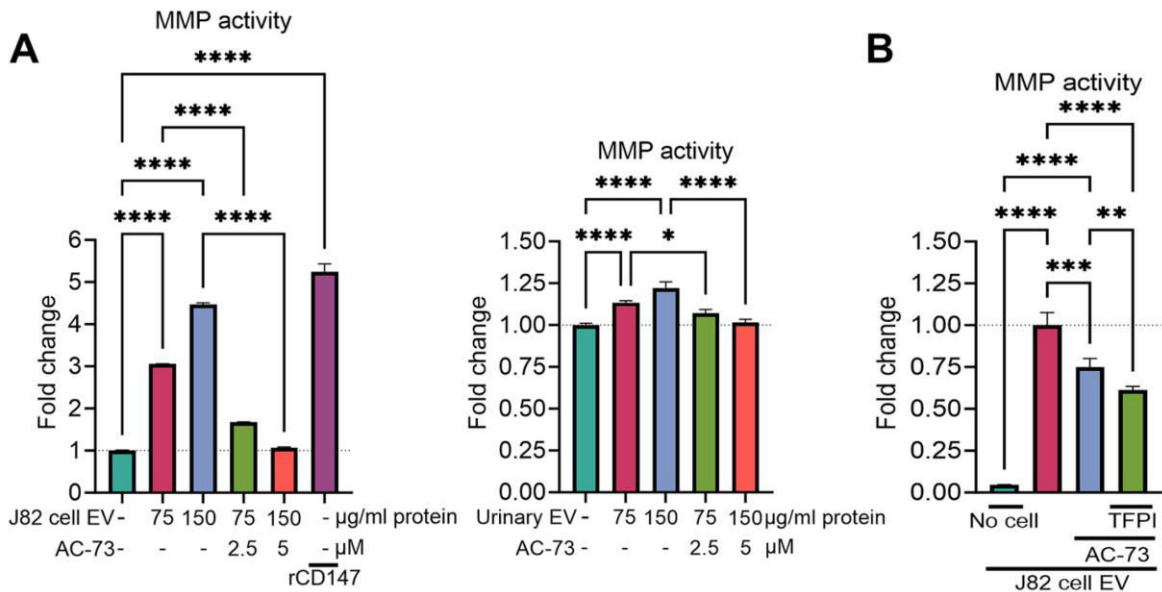


Abbildung 20 MMP-Aktivierung durch hsEV von J82 und Patientenproben sowie Inhibition durch AC-73 und TFPI

Die Balkendiagramme zeigen die Freisetzung von MMP aus J82-Zellen durch Stimulation mit hsEV von J82-Zellen (A, rechts) oder aus Urinproben von Patienten mit muskelinvasivem Blasenkarzinom (A, links). Zusätzlich wurde entweder 2,5 oder 5 μM AC-73 appliziert. Rekombinantes rCD147 diente als Positivkontrolle. Außerdem wurde die duale Hemmung durch TFPI und AC-73 auf die MMP-Aktivierung durch J82-hsEV untersucht (B). Mittelwerte mit Standardabweichung, statistische Testung mittels one-way-ANOVA

Quelle: Boddu und Zamzow et al., 2024

Neben der oben beschriebenen Migration wurde auch die Invasivität von Tumorzellen nach Stimulation mit hsEV untersucht. Stimuliert man J82-Zellen mit hsEV aus der J82-Zellkultur kommt es zu einer ca. fünffachen Erhöhung der Invasivität. Zudem induzieren die hsEV aus den Urinproben von Patienten mit invasivem Blasenkarzinom eine über zweifach erhöhte Invasivität gegenüber der unstimulierten Probe. Bei Behandlung der Zellen vor der Stimulation mit AC73 ist der Effekt der J82-hsEV um über 50% zu reduzieren. Ein vergleichbarer Trend wird auch bei den hsEV der Karzinompatienten beobachtet, wenngleich der Unterschied hier nicht statistisch signifikant ist. Behandelt man die Zellen zusätzlich zur AC-73 vor der Stimulation mit hsEV mit TFPI kommt es erneut zu einer Verringerung der Invasivität um ca. 50% gegenüber der einfachen Behandlung mit AC73:

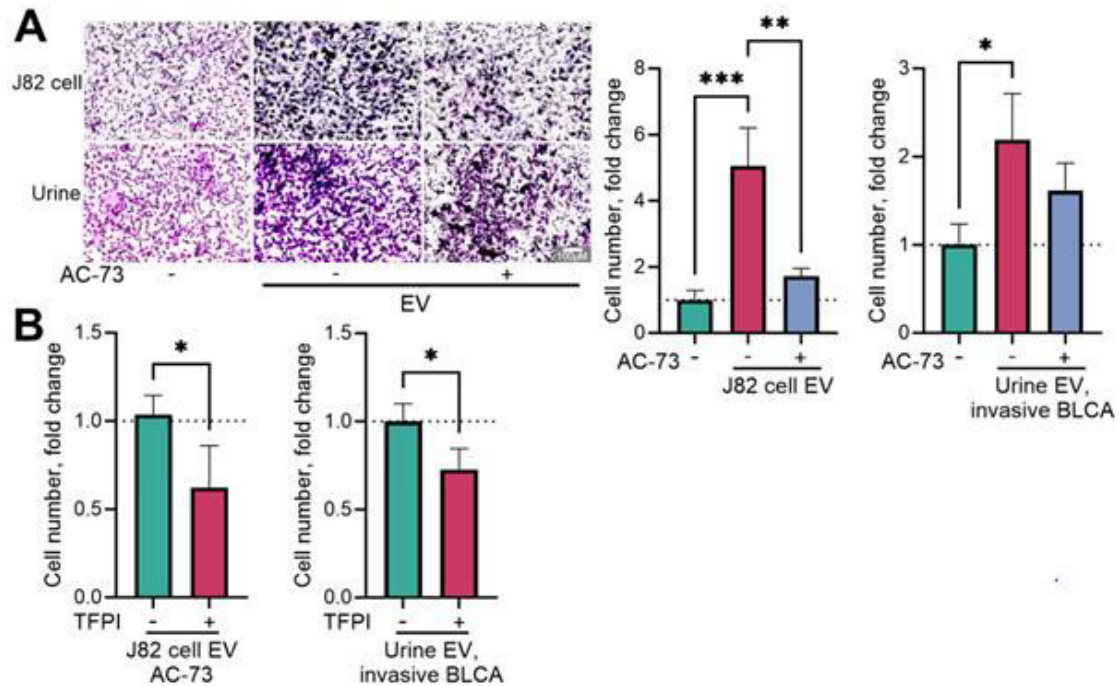


Abbildung 21 Induktion von Invasivität durch hsEV von J82 und Patientenproben sowie Inhibition durch AC-73 und TFPI

Dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen des Invasionsassays mit J82-Zellen, welche mit hsEV der J82-Zellen oder aus Urinproben von Patienten mit muskelinvasivem Blasenkarzinom stimuliert wurden. In weiteren Ansätzen wurde zusätzlich 5 μg CD147 (A) oder 2,5 μM Ac-73 zusammen mit 300 ng/mL TFPI appliziert. Es wurden 6-8 Bilder der migrierten Zellen zur Auswertung verwendet. Mittelwerte mit Standardabweichung, statistische Testung mittels students t-test.

Quelle: Boddu und Zamzow et al., 2024

3.2.6 Inhibition der Bindung von hsEV an Tumorzellen durch AC-73 und TFPI

Ein möglicher Pathomechanismus der Migrations- und Invasionsinduktion durch hsEV wird in der Bindung von EV an die Oberfläche der Zielzellen mit subsequenter Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden vermutet. Denn im Gegensatz zu einer nicht behandelten Zellprobe erzeugen ungefärbte J82-Zellen nach der Inkubation mit CFSE-gefärbten hsEV ein positives Signal im FITC-Kanal der Durchflusszytometrie. Dieser Effekt lässt sich durch den Einsatz von AC-73 vermindern, wodurch nur noch 75% der gemessenen Zellen FITC-Positivität zeigten. Wie auch in den vorherigen Experimenten konnte dieser Effekt durch die Zugabe von TFPI signifikant verstärkt werden: durch die duale Hemmung wurden nur noch ca. 30% der Ereignisse gegenüber der unbehandelten Probe verzeichnet.

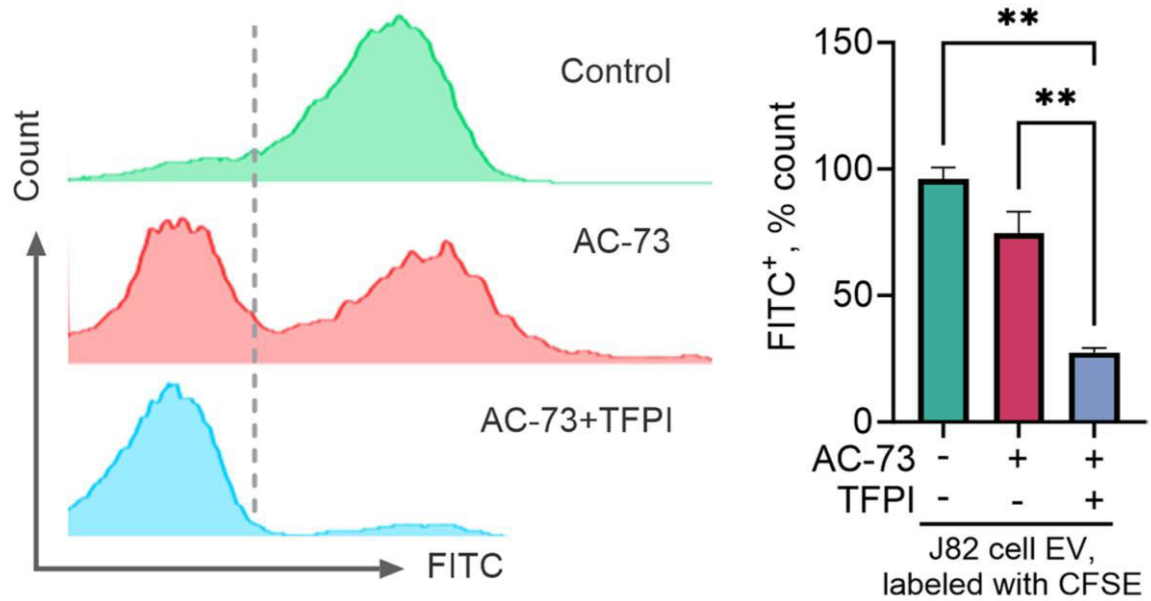


Abbildung 22 Hemmung der hsEV-Bindung an Zellen durch AC-73 und TFPI

Linksseitig sieht man Histogramme von J82-Zellen, die mit CFDA-SE-gefärbten hsEV der J82-Zelllinie inkubiert und anschließend im FITC-Kanal des Durchflusszytometers quantifiziert wurden. Zusätzlich wurden entweder 5 μM AC-73 oder 2,5 μM AC-73 mit 300 ng/mL TFPI appliziert. Das Balkendiagramm zeigt den Anteil FITC-positiver Ereignisse nach Behandlung mit den Inhibitoren relativ zur Kontrollmessung. Mittelwerte mit Standardabweichung, statistische Testung mittels students t-test.

Quelle: Boddu und Zamzow et al., 2024

4 Diskussion

4.1 Methodische Aspekte

In der vorliegenden Arbeit wurden hsEV durch sequenzielle Zentrifugation aus Zellkulturüberständen und Urinproben von Karzinompatienten isoliert und mithilfe von hochauflösender Durchflusszytometrie charakterisiert. Hierbei wurde die der Membranfarbstoff CFDA-SE verwendet, um die hsEV im Fluoreszenz-„Gate“ darzustellen.

4.1.1 Auswahl der Methoden zur Isolation und Analyse der hsEV

Gemäß MISEV ist zunächst eine kritische Betrachtung der verwendeten Methoden zur Isolation der EV erforderlich, um die gewonnenen Ergebnisse einzuordnen. Diese können nach den zwei Qualitäten "Purity" und "Recovery" bewertet werden. „Purity“ bezeichnet die Reinheit der gewonnenen Vesikelpopulation. Da mit komplexen biologischen Flüssigkeiten gearbeitet wird, sind Verunreinigungen mit Proteinaggregaten, Liposomen, Lipoproteinen, Zellorganellen oder Viren zu erwarten (Sódar et al., 2016). Diese kann man quantitativ als Quotient aus EV-Bestandteilen gegen Nicht-EV-Bestandteile beschreiben. Neben der „Purity“ stellt die angestrebte „Recovery“ die zweite Qualität dar, die den Anteil an isolierten EV im Vergleich zu den insgesamt im Ursprungsmedium vorhandenen EV beschreibt (Coumans et al., 2017).

Grundsätzlich lassen sich die Methoden zur Separation in dichteabhängige und durchmesserabhängige Verfahren unterscheiden. Die am weitesten verbreitete Methode zur Separation ist das dichteabhängige Verfahren der differentiellen Zentrifugation, welches auch in dieser Arbeit verwendet wurde (Tiwari et al., 2021). Dabei werden die Teilchen in einer Probe entsprechend ihrer Größe und Dichte relativ zum Medium getrennt, wobei dichtere Teilchen bei niedrigeren Drehzahlen sedimentieren. In den ersten Zentrifugationsschritten werden Zellen, Zelltrümmer, Proteinaggregate und Apoptosevesikel sedimentiert, wobei die EV im Überstand bleiben. Typische Geschwindigkeiten dafür liegen zwischen 350xg und 2500xg. Der Überstand wird dann schrittweise mit höheren Geschwindigkeiten zentrifugiert, sodass die einzelnen Subgruppen von EV getrennt werden. Zur Sedimentation der kleinsten EV im Bereich von 40 nm, auch Ultrazentrifugation genannt, werden Geschwindigkeiten von 100.000xg verwendet (Livshits et al., 2015). Da bei dieser

Methode sowohl „Recovery“ als auch „Purity“ der sequenziellen Zentrifugation hoch sind, hat sich diese als Standard durchgesetzt. Neben der differentiellen Zentrifugation gibt es bei den dichteabhängigen Verfahren auch die Dichtegradienten-Zentrifugation, bei der ein Trennmedium bekannter Dichte wie Sucrose oder Iodixanol zusätzlich mit zentrifugiert wird, um die Trennung der Fraktionen zu unterstützen (Brakke, 1953; Greening et al., 2015).

Alternativ zu diesen dichteabhängigen sind auch durchmesserabhängige Verfahren möglich. Das technisch einfachste Verfahren ist dabei die Ultrafiltration, bei der die Probe durch die Applikation einer Kraft durch einen Filter bestimmter Porengröße gepresst wird. Aufgrund der mechanischen Belastung dieses Verfahrens ist die „Recovery“ jedoch eingeschränkt. Auch chromatographische Methoden sind möglich, wie beispielsweise die „Size-Exclusion-Chromatography“. Dabei wird die Probe durch eine Kolonne gefiltert, die mit einem Gel aus porösen Kugeln gefüllt ist. Hierbei diffundieren kleine Partikel in die Poren der Kugeln und treten langsamer am Ende der Kolonne aus als größere Teilchen (Lobb et al., 2017; Mori & Barth, 1999). Auch immunologische Verfahren wie Immuno-Capture-Assays können verwendet werden. Dabei werden EV, welche spezifische Oberflächenmarker exprimieren, mithilfe von monoklonalen Antikörpern gebunden (Kanwar et al., 2014). Physikalische Methoden durch Präzipitations-Assays lassen sich beispielsweise durch Polyethylenglykol umsetzen, wobei sich die Membranpartikel lösen, ohne zu degenerieren. Hierbei kann eine hohe Konzentrierung von EV erreicht werden, dies jedoch zu Lasten der „Purity“, da auch andere fettlösliche Substanzen mit isoliert werden (Coumans et al., 2017; Webber & Clayton, 2013).

Nachdem die EV isoliert wurden, stehen für die Analyse zahlreiche Verfahren zur Auswahl, die grundsätzlich in physikalische Methoden, die die Menge, Form und Größe der Partikel beschreiben, und in kompositionelle Verfahren, die die Zusammensetzung der Lipidmembran, DNA, RNA und Proteine der EV untersuchen, unterteilt werden können.

Bei der physikalischen Analyse besteht die größte Herausforderung in der geringen Größe der EV, da diese durch konventionelle Lichtmikroskopie nicht mehr darstellbar sind. Das am häufigsten verwendete Verfahren der physikalischen Analyse ist der „Nanoparticle-Tracking-Assay“ (NTA), bei dem die Brownsche

Molekularbewegung und Streulicht verwendet werden, um EV zu quantifizieren und ihre Größe abzuschätzen. Andere Methoden sind das „Dynamic Light Scattering“, eine dem NTA ähnliche Methode, bei der jedoch nicht der Teilchenpfad, sondern die Fluktuationen in der Lichtintensität gemessen werden, oder das „Tunable Resistive Pulse Sensing“, bei dem Partikel eine Nanomembran passieren und die Veränderung des elektrischen Widerstands der Membran Rückschlüsse auf die Größe und Zahl der Teilchen erlaubt (Maas et al., 2014; Palmieri et al., 2014). Neben diesen Verfahren ist auch die Visualisierung über Elektronenmikroskopie möglich, wobei diese wenig Anwendung findet.

Zu den gebräuchlichsten kompositionellen Analysen zählen antikörpergestützte Verfahren wie der Western Blot, bei dem spezifische Proteine in EV-Proben durch Antikörperbindung und Elektrophorese nachgewiesen werden (Kowal, 2017). Einen anderen Ansatz stellen globale oder gezielte Proteomanalysen dar. Dabei werden Proben mithilfe von Massenspektrometrie auf eine Vielzahl von Proteinen untersucht. Aufgrund sinkender Kosten solcher Analysen finden diese zunehmend Anwendung (Schey et al., 2015).

Neben Verfahren, die entweder zu den physikalischen oder zu den kompositionellen Analysen zählen, stellt die Durchflusszytometrie ein Verfahren dar, das sowohl physikalische als auch kompositionelle Analysen zulässt. Waren ältere Durchflusszytometer aufgrund der Auflösungsgröße der physikalischen Kanäle um 300 nm nicht geeignet, um zuverlässig EV darzustellen, stellt die FACS-Analyse mit den neueren Generationen der High-Resolution-Durchflusszytometer jedoch eine vielseitige Technik zur Analyse dar. Neben den physikalischen Eigenschaften lassen sich durch fluoreszente Antikörper Oberflächenmarker auf intakten EV färben und nachweisen (McKinnon, 2018; Szatanek et al., 2017).

Mithilfe der sequenziellen Zentrifugation konnten in dieser Arbeit zuverlässig hsEV aus verschiedenen biologischen Medien isoliert werden. Die Methode zeigte in allen durchgeführten Experimenten eine stabile Reliabilität, was insbesondere an den häufig wiederholten Zellkulturmodellen nachgewiesen werden konnte. Neben der vergleichsweise einfachen Handhabung bietet die sequenzielle Zentrifugation den Vorteil, nicht auf die Verwendung von Agenzien wie Antikörper angewiesen zu sein, die direkt mit den EV interagieren. Zudem ist die globale Expertise mit diesem

Verfahren hoch, da es die älteste standardisierte Methode zur Gewinnung von EV ist. In Bezug auf die „Recovery“ variieren die Angaben in der Literatur stark zwischen 5-80% (Jayachandran et al., 2012). Da im Rahmen dieser Studie keine alternativen Verfahren getestet wurden, kann keine Aussage bezüglich der „Recovery“ in den vorliegenden Experimenten getroffen werden. Für zukünftige Forschung sollte dies berücksichtigt werden, um eine bessere Vergleichbarkeit mit anderen Arbeitsgruppen zu erzielen

Ein weiterer Aspekt ist der Zeitaufwand der Zentrifugation. Um dem zu begegnen, könnte beispielsweise die „Size-Exclusion-Chromatographie“ verwendet werden. Die „Recovery“ der Size-Exclusion-Chromatographie ist ähnlich der sequenziellen Zentrifugation, jedoch wird die „Purity“ der erhaltenen Fraktionen mit 80 % höher angegeben. Das Verfahren ist weniger zeitaufwändig; eine Skalierung zur Verarbeitung größerer Probenmengen ist mit herkömmlichen Laborgeräten jedoch kaum möglich. Zudem ist die scharfe Trennung von Exosomen und Ektosomen rein anhand des Durchmessers der Partikel nicht möglich, da sich die Populationen in ihrer Größe überschneiden (Vogel et al., 2016).

Neben diesen physikalischen Verfahren ist auch die Verwendung von Immunocapture-Assays möglich, die spezifische Oberflächenproteine der EV binden und so beispielsweise selektiv CD63-positive EV isolieren. Diese Methode ergibt eine hohe „Purity“, jedoch ist die „Recovery“ im Vergleich zur Gesamtanzahl der vorhandenen EV in einer Probe niedrig. Da es bisher keinen einzelnen EV-Oberflächenmarker gibt, eignet sich diese Methode nicht für Strukturanalysen aller in einer Probe vorhandenen EV, sondern eher zur Untersuchung spezifischer Subgruppen (Skoczylas et al., 2023).

4.1.2 Standardisierung durchflusszytometrischer Untersuchung von EV

Als besonders vielseitiges Instrument hat sich die Durchflusszytometrie erwiesen. Wie in Abschnitt 4.1.1 bereits erläutert, handelt es sich hierbei sowohl um ein physikalisches als auch ein kompositionelles Verfahren, sodass mit dieser einen Methode eine Vielzahl an Parametern erhoben werden kann.

Bei der Durchflusszytometrie von Zellen ist es notwendig, bestimmte Populationen mit manuell gesetzten "Gates" zu isolieren und weiter zu untersuchen. Hierin liegt die Stärke und gleichzeitig die Schwäche des Verfahrens: Da es sehr individuell

angepasst werden kann, sind die Ergebnisse stark von dem auswertenden Benutzer abhängig. Dieser Effekt kommt insbesondere bei der Untersuchung von EV zum Tragen, da die Größe der EV an der Nachweisgrenze der physikalischen Kanäle FSC und SSC liegt. Steigert man die Auflösung in diesem Bereich, nimmt auch die Menge an falsch-positiven Ereignissen zu.

Um diesem Effekt vorzubeugen, wurde ein standardisiertes Gating-Verfahren mittels Polystyrol-Beads bestimmter Größe etabliert, das für jede Untersuchung gleich war. So konnte die Intertest-Reliabilität der Analyse verbessert werden. Auffällig war, dass das durch das beads-definierte „gate“ den Größenbereich zwischen 0,3 und 0,9 μm abbildet, während die durch das NTA festgestellte Größe der Teilchen eher im Bereich von 0,1-0,2 μm liegt. Dies ist mit der abnehmenden Korrelation der Streuung im FSC mit der Größe des lichtbrechenden Teilchens bei kleinsten Partikeln zu erklären (Shapiro, 2003). Insofern ist die Größenbeschreibung von EV mittels Durchflusszytometrie nicht exakt, allerdings überwiegen dennoch die Vorteile eines standardisierten „gatings“. Daher erscheint auch die Ergänzung des NTA zur Durchflusszytometrie in diesem Fall sinnvoll.

Eine weitere potenzielle Fehlerquelle in der Durchflusszytometrie von EV ist das Aufkommen falsch-positiver Ereignisse durch Teilchen EV-ähnlicher Größe, die jedoch keine EV sind. Dabei handelt es sich um Proteinaggregate, Zelltrümmer oder beschädigte EV (Meldolesi, 2018). Um dem zu begegnen, wurde eine Färbung mittels CFDA-SE vorgenommen, welches zur enzymatischen Aktivierung intakte Zellen bzw. EV benötigt (Banks & Paquette, 1995). Überdies konnten Arraud et al. zeigen, dass ein relevanter Anteil der EV in ungefärbten Proben nicht durch das Durchflusszytometer erkannt wird (Arraud et al., 2016). Demnach entsprechen die in dem definierten FITC-positiv-Gate aufgezeichneten Ereignisse intakten EV. Um diesem Problem zu begegnen, wurden die EV mittels CFDA-SE markiert.

4.1.3 Standardisierte CFDA-SE Färbung zur sicheren durchflusszytometrischen hsEV-Identifikation

Die optimalen Färbebedingungen mit CFDA-SE zur Färbung von hsEV unterscheiden sich deutlich von denen für Zellen. Obwohl eine kleine Oberfläche zu färben ist, war eine erhöhte CFDA-SE-Konzentration erforderlich, um zuverlässig positive Signale im FITC-Kanal zu erzeugen. Da es sich um einen

enzymabhängigen Färbeprozess handelt, liegt die Vermutung nahe, dass das Temperaturoptimum der Färbebedingungen bei 37°C liegen sollte. Interessanterweise ließen sich jedoch nach Färbungen bei Raumtemperatur oder sogar bei 4°C deutlich höhere Mengen an hsEV nachweisen. Eine denkbare Erklärung hierfür ist die Degeneration von hsEV durch thermischen Stress, da die unmittelbar nach und vor der Färbung stattfindenden Zentrifugationen bei 4°C durchgeführt werden. Mehrere Studien haben gezeigt, dass wiederholtes Auftauen oder das Lagern von hsEV bei 37°C zu einer deutlichen Reduktion intakter hsEV im Medium führt (Gelibter et al., 2022; Yuan et al., 2021; Zhang et al., 2020).

Bezüglich der Färbedauer hat sich eine kurze Inkubationszeit von 10 Minuten gegenüber 60 oder sogar 120 Minuten als effektiver herausgestellt. Eine Arbeit von Morales-Kastresana et al. zeigte zwar eine effektivere Färbung mit höheren MFI-Werten bei kürzerer Inkubation, wies jedoch, ebenso wie in dieser Arbeit, auf eine zeitabhängige Reduktion der Konzentration von EV hin (Morales-Kastresana et al., 2017). Somit erscheint eine höhere Farbstoffkonzentration zugunsten einer kürzeren Inkubationszeit sinnvoll. Da verschiedene Färbeprotokolle zu teilweise drastisch unterschiedlichen Ergebnissen führen, ist die routinemäßige Beschreibung des Färbeprotokolls zwingend erforderlich.

4.1.4 Falsch-positive Ereignisse durch Färbemedien

Trotz der spezifischen Aktivierung von CFDA-SE durch Esterasen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Verwendung von komplexeren Färbemedien wie Zellkulturüberstand oder BSA-haltigem PBS falsch-positive Ereignisse im FITC-Kanal erzeugt (De Rond et al., 2018). Dies ist insbesondere im Hinblick auf die klinische Anwendung interessant, da Medien wie Urin und Blutplasma um ein Vielfaches mehr Proteine sowie unspezifische Esterasen enthalten als die in-vitro Reagenzien. Die Färbung mit CFDA-SE sollte daher, sofern möglich, erst nach Resuspension der hsEV in purem PBS erfolgen.

4.1.5 Einfluss der Wahl der Geräteeinstellungen auf Durchflusszytometrie

Ein weiterer Faktor, der zu großen Unterschieden in den Ergebnissen der Durchflusszytometrie führt, sind die Einstellungen des Durchflusszytometers. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Auswahl unterschiedlicher Trigger-Werte

deutlich abweichende Ergebnisse entstehen. Dies ist insbesondere bei einem sehr niedrig gewählten Trigger der Fall, wie es die Analyse von EV oft erfordert. Der Trigger sollte daher hoch genug eingestellt sein, um zuverlässig Hintergrundgeräusche herauszufiltern. Entsprechend sollte in jeder Arbeit, in der Durchflusszytometrie verwendet wird, die Höhe des Triggers sowie das verwendete Gerät benannt werden. Arkesteijn et al. haben bereits gezeigt, dass ein höherer Trigger im FSC-Kanal die Menge an Hintergrundrauschen und somit falsch-positive Signale in der Durchflusszytometrie reduzieren kann. In der vorliegenden Arbeit konnte der zusätzliche Nutzen der gezielten Auswahl des Triggers im Fluoreszenz-Gate gezeigt werden (Arkesteijn et al., 2020).

4.1.6 Beweise für das Vorliegen von EV in den Sedimenten der hs-Zentrifugation

Die MISEV-2018 fordert die Verwendung von mindestens zwei komplementären Verfahren sowie den Nachweis ausgewählter Membranmarker für eine qualitativ hochwertige Analyse von EV.

Zunächst einmal stellt die CFDA-SE-Färbung selbst eine Kontrolle dar, da sich das Fluoreszenzsignal der gefärbten hsEV deutlich von falsch-positiven Ereignissen wie Proteinaggregaten unterscheidet (Holmes et al., 2001). Bei Behandlung einer Probe mit einem Detergens wie Triton X-100 lassen sich nach der Färbung mit CFDA-SE keine positiven Ereignisse mehr nachweisen. Obwohl die gleiche Menge Proteine in der Probe vorhanden ist, gibt es ohne intakte Biomembranen kein Signal.

Zudem konnten auch Partikel im NTA aufgezeichnet werden, deren Größe und optisches Signal denen von EV entspricht. Dies wurde durch eine direkte Visualisierung mittels Elektronenmikroskopie bestätigt, obwohl diese Methode aufgrund der aufwändigen Präparation der Proben nicht als Routineverfahren geeignet ist.

Bezüglich der Membranmarker konnten sowohl für die hsEV-Überstände als auch für die Sedimente der COLO357-Zellen die Tetraspanine CD9 und CD81 mittels Antikörperfärbung im Durchflusszytometer nachgewiesen werden. Da nur die CFSE-positiven hsEV auf diese Marker untersucht wurden, handelt es sich dabei um oberflächengebundene und nicht um freie oder an Detritus gebundene Proteine.

Damit wurde ein konsensugerechter Nachweis über das Vorliegen von EV in den Isolaten erbracht (Théry et al., 2018).

4.1.7 Anreicherung von Ektosomen durch sequenzielle Zentrifugation

In dieser Arbeit sollten vornehmlich extrazelluläre Vesikel (EV) charakterisiert werden, die den membranständigen Ektosomen entsprechen. Da es gemäß den MISEV-Konventionen aktuell keinen einheitlichen Standard gibt, um Exosomen von Ektosomen zu unterscheiden, wurde für diese Arbeit ein eigenes Verfahren entwickelt. Zunächst wurden die Größenverteilungen der high-speed EV (hsEV) mit denen der EV im Überstand der Zentrifugation verglichen. Dabei zeigten sich die hsEV im Mittel größer und größenvariabler als diejenigen im Überstand, was mit den theoretischen Charakteristika von Exosomen gegenüber Ektosomen übereinstimmt.

Eine weitere Bestätigung der erfolgreichen Separation konnte durch den Nachweis CFDA-SE-gefärbter EV erbracht werden. Färbt man selektiv die Zellmembran einer Zellkulturzelle mit CFDA-SE und isoliert aus deren Zellkulturmedium EV, zeigt sich eine Anreicherung von CFSE-positiven EV im Sediment der High-Speed-Zentrifugation. Somit kann angenommen werden, dass diese EV direkt aus der Zellmembran der Mutterzelle abgeschnürt wurden und somit den Ektosomen entsprechen. Einschränkend muss hierbei angemerkt werden, dass auch im Überstand einige CFSE-positive Ereignisse aufgezeichnet wurden. Dies unterstützt die Annahme, dass die Zentrifugation ein ausreichendes, aber nicht exaktes Trennen der Populationen ermöglicht.

Diese Ergebnisse werden gestützt durch das Tracking von CD147-transfizierten Zellen des Urothelkarzinoms J82. Das in der Zellmembran der transfizierten Zelle exprimierte CD147 konnte mittels markierter Antikörper in der Durchflusszytometrie auf intakten hsEV nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse decken sich auch mit den Erkenntnissen von Siddhu et al., die ebenfalls beschreiben, dass CD147 selektiver in Ektosomen angereichert wird (Sidhu et al., 2004).

4.2 Klinische Aspekte

Die im vorangegangenen Kapitel gewonnenen Erkenntnisse wurden anschließend benutzt, um zunächst hsEV eines Zellkulturmodells mit den Blasenkarzinomzelllinien RT4 und J82 als auch im Verlauf die hsEV aus Urinproben von Blasenkarzinompatienten zu charakterisieren. Neben der Durchflusszytometrie wurden auch ELISA-Verfahren, kameragestützte Migrations- und Invasionsassays sowie NTA verwendet.

4.2.1 *hsEV als potenzieller „liquid-biopsy“-Marker*

Eine Vielzahl von menschlichen Zellen gibt EV an ihre Umgebung ab. Dies gilt in besonderem Maße für maligne entartete Zellen. Diese Eigenschaft macht im Kontext des Blasenkarzinoms Urin zu einem vielversprechenden Medium zur Analyse von tumorstämmigen EV, da er einfach zu gewinnen ist und im Vergleich zu Blutplasma ein weniger komplex ist. Musante et al. konnten 2020 vielfältige Populationen von epithelialen EV im Urin nachweisen. Lee et al. gelang die Isolation tumorstämmiger Exosomen aus Urinproben (N. Lee et al., 2022; Musante et al., 2020).

An diese Forschungen wird in der vorliegenden Arbeit mit der erfolgreichen Isolation von hsEV, die zu einem großen Teil den Exosomen entsprechen, aus dem Urin von Patienten mit Blasenkarzinomen angeknüpft. Dabei konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der Konzentration von hsEV zwischen der invasiven und der nicht-invasiven Gruppe festgestellt werden. Während Liang et al. (2017) zeigten, dass Patienten mit Urothelkarzinomen doppelt so hohe Konzentrationen von EV im Urin aufwiesen wie die gesunde Kontrollgruppe, konnte dieser Unterschied mit den vorliegenden Daten nicht bestätigt werden (Liang et al., 2017). Da es insgesamt jedoch nur wenige Arbeiten gibt, die sich mit der Konzentration der EV im Urin von Blasenkarzinomkranken befassen, bedarf es hier weiterer Forschung zur Verifizierung der Ergebnisse, insbesondere im Hinblick auf die Isolationsmethoden.

Ein signifikanter Unterschied lag zwischen der TF-Konzentration von invasiven und nicht-invasiven Blasenkarzinomen vor, mit einer höheren TF-Aktivität bei den invasiven Tumoren. Die Sensitivität dieses Parameters lag bei 77 % mit einer Spezifität von 72 %. Ein anderer miRNA-basierter Urin-Assay von Lee et al. wurde ebenfalls zur Unterscheidung von invasivem vs. nicht-invasivem Urothelkarzinom

verwendet und erreichte eine deutlich höhere Sensitivität von 91 % (H. Lee et al., 2014). Kritisch ist bei diesen Arbeiten zu bewerten, dass die Stichprobengröße häufig nur 50 bis 100 Probanden betrug. Zur Bewertung der Eignung als klinischer Prädiktor sollten Arbeiten mit größeren Stichproben erfolgen.

4.2.2 Höhere Level an CD147 und TF-Aktivität bei EV von invasiven Blasenkarzinomen

Wie beschrieben, haben die EV der muskelinvasiven Patienten eine signifikant erhöhte TF-Aktivität gegenüber den NMI-Tumoren. Gleichzeitig war auch das Protein CD147 signifikant stärker auf der Oberfläche der MI-hsEV nachzuweisen. Dies spiegelte sich auch in den Zellkulturexperimenten wider: Sowohl die Zellen der J82-Zelllinie als auch die von ihnen abgesonderten EV zeigten höhere Konzentrationen von CD147 und eine erhöhte TF-Aktivität. Dies deutet auf mögliche synergistische Effekte der beiden Glykoproteine in der Propagation invasiver Tumorerkrankungen hin, da die Assoziation von erhöhtem TF auf der Oberfläche von Karzinomen mit einer höheren Aggressivität der Erkrankung bereits mehrfach gezeigt wurde (Poon RT, 2003).

4.2.3 Charakterisierung der Effekte von erhöhter TF-Activity und CD147-Expression in Karzinomzellen und EV

Um die Effekte von TF und CD147 im Modell weiter zu untersuchen, wurden J82-Zellen mit beiden Proteinen transfiziert. Die erfolgreiche Transfektion wurde mittels konfokaler Mikroskopie bestätigt. Diese auf TF und CD147 hochpositiven Zellen zeigten einen deutlich erhöhten Efflux von hsEV im Vergleich zur normalen Variante der J82-Zellen. Eine ähnliche Beobachtung machten Lucchetti et al. bei EV von Kolonkarzinomzellen (Lucchetti et al., 2020). Die überexprimierenden hsEV induzierten im Vergleich zur Normvariante eine signifikant höhere invasive Kapazität der J82-Zellen, was beispielsweise für die Metastasierung oder das Überwinden natürlicher Barrieren wie der Basalmembran relevant ist. Eine mechanistische Erklärung für die Synergien zwischen CD147 und TF im Kontext der Invasivität ist derzeit noch nicht bekannt. Es wäre jedoch denkbar, dass ein additiver Effekt der durch CD147 ausgelösten Aktivierung von MMPs und der durch TF stimulierten PAR-Rezeptoren die zelluläre Motilität steigert. Eine erhöhte CD147-Konzentration im Blut induziert eine vermehrte Freisetzung von TF, wie Schulz et al. im Rahmen bakterieller Entzündungen zeigten (Schulz et al., 2018). Eine potenzielle

diagnostische Bedeutung von CD147-tragenden EV wurde zudem von Gu et al. für das kolorektale Karzinom gezeigt: In ihren Experimenten korrelierte die Konzentration von CD147-positiven EV signifikant mit der Überlebensrate der Patienten (Gu et al., 2023). Für definitive Aussagen über mögliche Anwendungen in der Diagnostik ist die Stichprobengröße der vorliegenden Arbeit jedoch nicht ausreichend.

4.2.4 Erhöhte zelluläre MMP-Induktion durch CD147-tragende EV

Ein anderer Name für CD147 ist EMMPRIN, abgeleitet von der physiologischen Funktion dieses Proteins, die Freisetzung und Aktivierung von MMPs zu regulieren. Im Rahmen der Tumorprogression in ihrem Mikromilieu scheint dem „freien“ CD147 eine besondere Rolle zuzukommen. Es wird von Tumorzellen freigesetzt und induziert in umliegenden Zellen ebenfalls eine MMP-Ausschüttung (Tang et al., 2004). Tatsächlich konnte auch durch die CD147-tragenden hsEV der invasiven Zelllinie J82 eine deutliche Steigerung der MMP-Aktivität in der gleichen Zelllinie verursacht werden. Somit erscheint die CD147-Konzentration auf hsEV nicht nur als deskriptive Größe, sondern als relevanter Bestandteil des Pathomechanismus der MMP-Aktivierung. Dieser im Zellkulturmodell messbare Effekt konnte ebenfalls durch die hsEV der invasiv erkrankten Patienten in signifikantem Maße reproduziert werden, was erneut die potenzielle Bedeutung im klinischen Kontext unterstreicht.

4.2.5 Effektive Hemmung der Wirkung CD147-tragender EV durch AC-73

Die bisher gewonnenen Ergebnisse demonstrieren die promigratorischen und proinvasiven Effekte sowohl von TF als auch von CD147. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass eine gezielte Hemmung dieser Proteine neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen könnte. Da AC-73 ein spezifischer Hemmer von CD147 ist, könnte dieser aufgrund seiner oralen Bioverfügbarkeit als Medikament eingesetzt werden. Fu et al. (2016) konnten eine signifikante Hemmung der Mobilität von hepatozellulären Karzinomzellen durch AC-73 nachweisen, und Spinello et al. erzielten ähnliche Ergebnisse in der Forschung an Zellen der akuten myeloischen Leukämie. Demnach wird die Wirkung von AC-73 über die Verhinderung der Bildung von CD147-Dimeren vermittelt (Fu et al., 2016; Spinello et al., 2019).

In der vorliegenden Arbeit konnte die durch J82-stämmige hsEV induzierte Migration und Invasion der Urothelkarzinomzellen durch den Einsatz von AC-73 vollständig blockiert werden. Auch war die Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen durch den Zusatz von AC-73 zu verhindern, was vermutlich einen erheblichen Teil der migrationshemmenden Wirkung erklärt. Hervorzuheben ist, dass sich diese Ergebnisse nicht nur in den Zellkulturexperimenten ergaben, sondern auch die Wirkung von hsEV der muskelinvasiven Blasenkarzinome der Patientenkohorte erfolgreich durch die Verwendung von AC-73 gehemmt werden konnte. Somit stellt AC-73 aus unserer Sicht einen vielversprechenden Kandidaten für die Reduktion hsEV-getriebener Tumorprogression dar. In Bezug auf den Wirkmechanismus von AC-73 auf die Tumor-hsEV konnte ferner gezeigt werden, dass die Adhäsion der hsEV an die Tumorzelle inhibiert wird. CD147-tragende hsEV wurden mit CFSE gefärbt und gemeinsam mit J82-Zellen inkubiert. Auf diesen Zellen konnte anschließend ebenfalls ein positives Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden, was auf eine Bindung oder sogar eine Fusion der hsEV mit der Tumorzelle schließen lässt. Dieser Effekt wird durch AC-73 deutlich vermindert. Hieraus lässt sich ableiten, dass nicht nur die Dimerisierung von CD147 auf der Zelloberfläche von Tumorzellen, sondern auch die möglicherweise entscheidendere Aufnahme von „freiem“ bzw. hsEV-gebundenem CD147 in die Zielzelle erfolgreich verhindert werden kann.

4.2.6 Erhöhte Wirkung von AC-73 durch TFPI

TFPI ist der selektive Hemmer des aktiven TF und blockiert dessen Funktion als Protease. In unserer Arbeitsgruppe konnte Gamperl et al. eine effektive Reduktion der Migration von Tumorzellen durch den Einsatz von TFPI-haltigen LMWH zeigen (Gamperl et al., 2016). Vergleichbare Ergebnisse lieferten auch Dang et al., die die Migration von Glioblastomzellen mit TFPI verhinderten (Dang & Morales, 2023). In der vorliegenden Arbeit führte die zusätzliche Applikation von TFPI zu AC-73 zur vollständigen Aufhebung der promigratorischen und invasionsfördernden Effekte der hsEV von fortgeschrittenen Blasenkarzinomen. Dies könnte durch die unterschiedliche Wirkung von TFPI, nämlich die Hemmung der PAR2-Aktivierung, und die Blockade der MMP-Aktivierung durch AC-73 erklärbar sein. Zudem konnte eine verstärkte Hemmung der MMP-Freisetzung unter der dualen Therapie nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass TF und CD147

möglicherweise an einem bisher unbekanntem gemeinsamen Mechanismus zur Induktion von MMPs beteiligt sind. Zur Verifizierung dieser Annahme sind weitere Forschungsarbeiten zur Interaktion von TF und CD147 in Bezug auf die MMP-Aktivität notwendig.

4.2.7 Verhinderung der Bindung von hsEV an J82-Zellen durch AC-73

Für die Bindung von EV an die entsprechenden Zielzellen wird eine Beteiligung der Tetraspanine, Integrine und Proteoglykane vermutet (Mulcahy et al., 2014). Es gibt drei Mechanismen, wie EV eine Signalwirkung in der Zielzelle hervorrufen können.

1. Die erste Möglichkeit ist die Verschmelzung der EV mit der Membran der Zielzelle. Dies führt dazu, dass Oberflächenproteine der Mutterzelle auf die Zielzelle übertragen werden und ggf. Signalkaskaden in Gang gesetzt werden. Weiterhin können die Inhaltsstoffe der EV (z.B. genetisches Material) intrazellulär freigesetzt werden. Die Fusion mit der Zielzelle wird u.a. über das Tetraspanin 9 sowie Syncytin-1 und -2 initiiert (Prada & Meldolesi, 2016).
2. Die zweite Möglichkeit besteht in der Endozytose der EV durch Clathrin-abhängige Prozesse an „coated-pits“ oder auch Makropinozytose (Jiang et al., 2017; Prada & Meldolesi, 2016). Anschließend kommt es zum LAMP-1-gesteuerten Transport im endoplasmatischen Retikulum, bis es zu einer Fusion der Biomembranen innerhalb der Zielzelle kommt.
3. Die dritte Möglichkeit ist die direkte Aktivierung von Membranrezeptoren der Zielzelle durch Oberflächenproteine der hsEV.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass hsEV durch den Einsatz von AC-73 und TFPI nicht an Zellen der Zellkultur J82 binden konnten. Die CFDA-SE markierten hsEV ließen sich vor Behandlung mit den Agenzien im FITC-positiv-„Gate“ des Durchflusszytometers nachweisen. Nach Zugabe von AC-73 und TFPI konnte keine Fluoreszenz mehr gemessen werden. Somit ist sowohl eine Bindung an der Oberfläche als auch eine Endozytose der hsEV unwahrscheinlich, da in beiden Fällen CFSE in den Zellen der J82 nachzuweisen wäre. Ursächlich hierfür ist die durch AC-73 aufgehobene Dimerisierung von CD147 auf Vesikel und Zielzelle anzunehmen. Ob dennoch eine Signalwirkung über die oben beschriebene

Möglichkeit der direkten Rezeptorbindung erfolgen kann, wenn die Bindung an die Oberfläche verhindert wird, ist aktuell unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

5 Zusammenfassung

Das erste Ziel dieses Forschungsvorhabens bestand in der Etablierung eines standardisierten Protokolls zur Separation von EV durch sequenzielle Zentrifugation und zur Analyse durch membranfarbstoffgestützte Durchflusszytometrie. Wie in den Kapiteln 2.1, 3.1 und 4.1 ausführlich beschrieben konnte hierbei gezeigt werden, dass die Isolation und Analyse eine Vielzahl an Parametern zu bedenken sind, um hochwertige Ergebnisse zu erhalten. Durch die Auswahl der richtigen Gerätekonfiguration sowie geeigneter Färbemedien konnten Fehlmessungen im Laufe der Untersuchung jedoch effektiv minimiert werden. Der damit einhergehende Isolationserfolg von hsEV konnte zudem über Detergenzbehandlungen nachgewiesen werden. Dass die hsEV überwiegend Ektosomen entsprechen konnte zudem durch das Tracking von CFSE- bzw. CD147-gefärbten Biomembranen gezeigt werden.

Das zweite Ziel bestand darin, hsEV aus dem Urin von Patienten mit Blasenkarzinomen unterschiedlicher Stadien zu untersuchen und daraus Erkenntnisse für die Nutzung von hsEV als Biomarker für Harnblasenkarzinome abzuleiten. Die Ergebnisse zeigten, dass hsEV aus dem Patientenurin keine sichere Unterscheidung zwischen gesunden und an Blasenkarzinom erkrankten Patienten anhand der Parameter TF-Aktivität, PS, ERK-Aktivierung oder Migrationsinduktion ermöglichen. Es konnte jedoch sowohl bei den Karzinompatienten als auch in den Modellzellkulturen RT4 und J82 eine signifikant erhöhte TF-Aktivität auf den hsEV nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigten die hsEV von MI-Tumoren höhere CD147-Konzentrationen auf der Oberfläche. Auch induzierten die hsEV von MI-Tumoren in den funktionellen Untersuchungen eine deutlich erhöhte Migration und Invasivität. Dies ist vor allem durch die gesteigerte Freisetzung von MMP durch die hsEV zu erklären. Diese promigratorischen und proinvasiven Effekte ließen sich durch den Einsatz von AC-73 hemmen, was die Bedeutung der hsEV-abhängigen MMP-Induktion erneut unterstreicht. Ergänzt man die Behandlung mit TFPI, verstärkt sich der beobachtete hemmende Effekt noch weiter. Auch die Hemmung der MMP-Aktivität ließ sich durch TFPI verstärken, was auf einen gemeinsamen Mechanismus von TF und CD147 zur Freisetzung von MMP schließen lässt. Somit stellen AC-73 sowie der Einsatz von TFPI-haltigen LMWH eine vielversprechende Therapieoption in der zukünftigen antineoplastischen Therapie dar.

Durch diese Arbeit konnte ein Beitrag zur standardisierten Analyse von EV mittels Durchflusszytometrie geleistet und die Vielseitigkeit dieses Verfahrens unterstrichen werden. Überdies ergeben sich zahlreiche Indikatoren für die Rolle von hsEV im Kontext der Karzinomprogression, was weiterführende Forschung in diesem Feld vielversprechend macht. Bezüglich der Wertigkeit als diagnostischer Marker sind größere Studien notwendig, die insbesondere die TF-Aktivität als Marker berücksichtigen sollten.

6 Literaturverzeichnis

- Ahamed, J., Belting, M., & Ruf, W. (2005). Regulation of tissue factor-induced signaling by endogenous and recombinant tissue factor pathway inhibitor 1. *Blood*, *105*(6), 2384–2391. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2004-09-3422>
- Arkesteijn, G. J. A., Lozano-Andrés, E., Libregts, S. F. W. M., & Wauben, M. H. M. (2020). Improved Flow Cytometric Light Scatter Detection of Submicron-Sized Particles by Reduction of Optical Background Signals. *Cytometry. Part A : The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, *97*(6), 610–619. <https://doi.org/10.1002/CYTO.A.24036>
- Arneth, B. (2019). Tumor Microenvironment. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, *56*(1). <https://doi.org/10.3390/MEDICINA56010015>
- Arraud, N., Gounou, C., Turpin, D., & Brisson, A. R. (2016). Fluorescence triggering: A general strategy for enumerating and phenotyping extracellular vesicles by flow cytometry. *Cytometry. Part A : The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, *89*(2), 184–195. <https://doi.org/10.1002/CYTO.A.22669>
- Banks, P. R., & Paquette, D. M. (1995). Comparison of three common amine reactive fluorescent probes used for conjugation to biomolecules by capillary zone electrophoresis. *Bioconjugate Chemistry*, *6*(4), 447–458. <https://doi.org/10.1021/BC00034A015>
- Bard, M. P., Hegmans, J. P., Hemmes, A., Luider, T. M., Willemsen, R., Severijnen, L. A. A., Van Meerbeeck, J. P., Burgers, S. A., Hoogsteden, H. C., & Lambrecht, B. N. (2004). Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *31*(1), 114–121. <https://doi.org/10.1165/RCMB.2003-0238OC>
- Bezinover, D., Dirkmann, D., Findlay, J., Guta, C., Hartmann, M., Nicolau-Raducu, R., Mukhtar, A. M., Moguilevitch, M., Pivalizza, E., Rosenfeld, D., Saner, F., Wray, C., Wagener, G., & West, J. (2018). Perioperative coagulation management in liver transplant recipients. *Transplantation*, *102*(4), 578–592. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002092>
- Boddu, V. K., Zamzow, P., Kramer, M. W., Merseburger, A. S., Gorantla, S. P., Klinger, M., Cramer, L., Sauer, T., Gemoll, T., von Bubnoff, N., Gieseler, F., & Darabi, M. (2024). Targeting cancer-derived extracellular vesicles by combining CD147 inhibition with tissue factor pathway inhibitor for the management of urothelial cancer cells. *Cell Communication and Signaling : CCS*, *22*(1), 129. <https://doi.org/10.1186/S12964-024-01508-X>
- Brakke, M. K. (1953). Zonal separations by density-gradient centrifugation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *45*(2), 275–290. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(53\)80005-6](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(53)80005-6)
- Bruschi, M., Candiano, G., Angeletti, A., Lugani, F., & Panfoli, I. (2023). Extracellular Vesicles as Source of Biomarkers in Glomerulonephritis. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(18). <https://doi.org/10.3390/IJMS241813894>
- Burger, M. S., Torino, J. L., & Swaminathan, S. (2001). DNA damage in human transitional cell carcinoma cells after exposure to the proximate metabolite of the bladder carcinogen 4-aminobiphenyl. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, *38*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1002/EM.1044>

- Carnino, J. M., & Lee, H. (2022). Extracellular vesicles in respiratory disease. *Advances in Clinical Chemistry*, *108*, 105–127. <https://doi.org/10.1016/BS.ACC.2021.07.008>
- Cecchetti, A., Finamore, F., Puxeddu, I., Ferro, F., & Baldini, C. (2019). Salivary extracellular vesicles versus whole saliva: New perspectives for the identification of proteomic biomarkers in Sjögren's syndrome. *Clinical and Experimental Rheumatology*, *37*, S240–S248. <https://www.clinexprheumatol.org/abstract.asp?a=14491>
- Chambard, J. C., Lefloch, R., Pouysségur, J., & Lenormand, P. (2007). ERK implication in cell cycle regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1773*(8), 1299–1310. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2006.11.010>
- Chargaff, E., & West, R. (1946). The biological significance of the thromboplastic protein of blood. PMID: 20273687. *J Biol Chem.*, *166*, 189–197.
- Chen, M. F., Lin, P. Y., Wu, C. F., Chen, W. C., & Wu, C. T. (2013). IL-6 Expression Regulates Tumorigenicity and Correlates with Prognosis in Bladder Cancer. *PLoS ONE*, *8*(4), 61901. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0061901>
- Clinique médicale de l'Hôtel-Dieu de Paris - Armand Trousseau - Google Books*. (n.d.). Retrieved March 18, 2024, from https://books.google.de/books?hl=de&lr=&id=af1aAAAAQAAJ&oi=fnd&pg=PA1&ots=zKpEW r92VU&sig=mMsol7TXCKYRCVotr6U4AGNCzJY&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Cocucci, E., & Meldolesi, J. (2015). Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in Cell Biology*, *25*(6), 364–372. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2015.01.004>
- Compérat, E., Amin, M. B., Cathomas, R., Choudhury, A., De Santis, M., Kamat, A., Stenzl, A., Thoeny, H. C., & Witjes, J. A. (2022). Current best practice for bladder cancer: a narrative review of diagnostics and treatments. *Lancet (London, England)*, *400*(10364), 1712–1721. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)01188-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01188-6)
- Cortez-Espinosa, N., Perez-Campos Mayoral, L., Perez-Campos, E., Alejandro Cabrera Fuentes, H., Perez-Campos Mayoral, E., Martínez-Cruz, R., Pina Canseco, S., Mayoral Andrade, G., Martínez Cruz, M., Gallegos Velasco, I., & Hernández Cruz, P. (2017). Platelets and Platelet-Derived Microvesicles as Immune Effectors in Type 2 Diabetes. *Current Vascular Pharmacology*, *15*(3), 207–217. <https://doi.org/10.2174/1570161115666170126130309>
- Couch, Y., Buzàs, E. I., Vizio, D. Di, Gho, Y. S., Harrison, P., Hill, A. F., Lötvall, J., Raposo, G., Stahl, P. D., Théry, C., Witwer, K. W., & Carter, D. R. F. (2021). A brief history of nearly EV-erything – The rise and rise of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, *10*(14). <https://doi.org/10.1002/JEV2.12144>
- Coumans, F. A. W., Brisson, A. R., Buzas, E. I., Dignat-George, F., Drees, E. E. E., El-Andaloussi, S., Emanuelli, C., Gasecka, A., Hendrix, A., Hill, A. F., Lacroix, R., Lee, Y., Van Leeuwen, T. G., Mackman, N., Mäger, I., Nolan, J. P., Van Der Pol, E., Pegtel, D. M., Sahoo, S., ... Nieuwland, R. (2017). Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circulation Research*, *120*(10), 1632–1648. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309417>
- Crocetto, F., Barone, B., Ferro, M., Busetto, G. M., La Civita, E., Buonerba, C., Di Lorenzo, G., Terracciano, D., & Schalken, J. A. (2022). Liquid biopsy in bladder cancer: State of the art and

- future perspectives. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 170. <https://doi.org/10.1016/J.CRITREVONC.2022.103577>
- Dang, T. T., & Morales, J. C. (2023). Abstract B043: Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), a novel invasion and therapy target in glioblastoma multiforme. *Cancer Research*, 83(2_Supplement_2), B043–B043. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.METASTASIS22-B043>
- Darmoul, D., Gratio, V., Devaud, H., Lehy, T., & Laburthe, M. (2003). Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induces cell proliferation and motility in human colon cancer cells. *The American Journal of Pathology*, 162(5), 1503–1513. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64283-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64283-6)
- Daubie, V., Pochet, R., Houard, S., & Philippart, P. (2007). Tissue factor: a mini-review. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1(3), 161–169. <https://doi.org/10.1002/TERM.9>
- De Rond, L., Van Der Pol, E., Hau, C. M., Varga, Z., Sturk, A., Van Leeuwen, T. G., Nieuwland, R., & Coumans, F. A. W. (2018). Comparison of Generic Fluorescent Markers for Detection of Extracellular Vesicles by Flow Cytometry. *Clinical Chemistry*, 64(4), 680–689. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2017.278978>
- Detchokul, S., Williams, E. D., Parker, M. W., & Frauman, A. G. (2014). Tetraspanins as regulators of the tumour microenvironment: implications for metastasis and therapeutic strategies. *British Journal of Pharmacology*, 171(24), 5462–5490. <https://doi.org/10.1111/BPH.12260>
- Doyle, L. M., & Wang, M. Z. (2019). Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/CELLS8070727>
- El-Shal, A. S., Shalaby, S. M., Abouhashem, S. E., Elbary, E. H. A., Azazy, S., Rashad, N. M., & Sarhan, W. (2021). Urinary exosomal microRNA-96-5p and microRNA-183-5p expression as potential biomarkers of bladder cancer. *Molecular Biology Reports*, 48(5), 4361–4371. <https://doi.org/10.1007/S11033-021-06451-5>
- Ender, F., Freund, A., Quecke, T., Steidel, C., Zamzow, P., von Bubnoff, N., & Gieseler, F. (2020). Tissue factor activity on microvesicles from cancer patients. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 146(2), 467–475. <https://doi.org/10.1007/S00432-019-03073-0>
- Ender, F., Zamzow, P., von Bubnoff, N., & Gieseler, F. (2019). Detection and Quantification of Extracellular Vesicles via FACS: Membrane Labeling Matters! *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1). <https://doi.org/10.3390/IJMS21010291>
- Enkelmann, A., Heinzelmann, J., Von Eggeling, F., Walter, M., Berndt, A., Wunderlich, H., & Junker, K. (2011). Specific protein and miRNA patterns characterise tumour-associated fibroblasts in bladder cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 137(5), 751–759. <https://doi.org/10.1007/S00432-010-0932-6>
- Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2020 5:1, 5(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>
- Fu, Z. G., Wang, L., Cuiv, H. Y., Peng, J. L., Wangc, S. J., Gengc, J. J., Liu, J. De, Feng, F., Song, F., Li, L., Zhu, P., Jiang, J. L., & Chen, Z. N. (2016). A novel small-molecule compound targeting CD147

- inhibits the motility and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget*, 7(8), 9429–9447. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.6990>
- Galley, J. D., & Besner, G. E. (2020). The Therapeutic Potential of Breast Milk-Derived Extracellular Vesicles. *Nutrients*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/NU12030745>
- Gamperl, H., Plattfaut, C., Freund, A., Quecke, T., Theophil, F., & Gieseler, F. (2016). Extracellular vesicles from malignant effusions induce tumor cell migration: inhibitory effect of LMWH tinzaparin. *Cell Biology International*, 40(10), 1050–1061. <https://doi.org/10.1002/CBIN.10645>
- Gelibter, S., Marostica, G., Mandelli, A., Siciliani, S., Podini, P., Finardi, A., & Furlan, R. (2022). The impact of storage on extracellular vesicles: A systematic study. *Journal of Extracellular Vesicles*, 11(2). <https://doi.org/10.1002/JEV2.12162>
- Gerle, C. (2019). Essay on Biomembrane Structure. *The Journal of Membrane Biology*, 252(2–3). <https://doi.org/10.1007/S00232-019-00061-W>
- Graf, N., Furtwängler, R., & Stein, R. (2022). *Tumoren der Blase und der Prostata beim Kind*. 1–5. https://doi.org/10.1007/978-3-642-41168-7_205-2
- Greene, F. L., & Sobin, L. H. (2009). A worldwide approach to the TNM staging system: collaborative efforts of the AJCC and UICC. *Journal of Surgical Oncology*, 99(5), 269–272. <https://doi.org/10.1002/JSO.21237>
- Greening, D. W., Xu, R., Ji, H., Tauro, B. J., & Simpson, R. J. (2015). A protocol for exosome isolation and characterization: evaluation of ultracentrifugation, density-gradient separation, and immunoaffinity capture methods. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1295, 179–209. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2550-6_15
- Gu, C., Shang, A., Liu, G., Zhu, J., Zhang, W., Jin, L., Sun, Z., & Li, D. (2023). Identification of CD147-positive extracellular vesicles as novel non-invasive biomarkers for the diagnosis and prognosis of colorectal cancer. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 548. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2023.117510>
- Haj-Salem, I., Plante, S., Gounni, A. S., Rouabhia, M., & Chakir, J. (2018). Fibroblast-derived exosomes promote epithelial cell proliferation through TGF- β 2 signalling pathway in severe asthma. *Allergy*, 73(1), 178–186. <https://doi.org/10.1111/ALL.13234>
- Hämostaseologie. (1999). *Hämostaseologie*. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-07673-6>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>
- Harayama, T., & Riezman, H. (2018). Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 19(5), 281–296. <https://doi.org/10.1038/NRM.2017.138>
- Hartmann, G., Weidner, K. M., Schwarz, H., & Birchmeier, W. (1994). The motility signal of scatter factor/hepatocyte growth factor mediated through the receptor tyrosine kinase Met requires intracellular action of Ras. *Journal of Biological Chemistry*, 269(35), 21936–21939. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)31736-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)31736-2)

- Hemler, M. E. (2014). Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages. *Nature Reviews. Cancer*, *14*(1), 49–60. <https://doi.org/10.1038/NRC3640>
- Heydari, R., Koohi, F., Rasouli, M., Rezaei, K., Abbasgholinejad, E., Bekeschus, S., & Doroudian, M. (2023). Exosomes as Rheumatoid Arthritis Diagnostic Biomarkers and Therapeutic Agents. *Vaccines*, *11*(3). <https://doi.org/10.3390/VACCINES11030687>
- Hobbs, G. A., Der, C. J., & Rossman, K. L. (2016). RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *Journal of Cell Science*, *129*(7), 1287–1292. <https://doi.org/10.1242/JCS.182873>
- Hoffman, M. (2003). A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Reviews*, *17*(SUPPL. 1). [https://doi.org/10.1016/S0268-960X\(03\)90000-2](https://doi.org/10.1016/S0268-960X(03)90000-2)
- Holmes, K., Lantz, L. M., Fowlkes, B. J., Schmid, I., & Giorgi, J. V. (2001). Preparation of Cells and Reagents for Flow Cytometry. *Current Protocols in Immunology*, *44*(1), 5.3.1-5.3.24. <https://doi.org/10.1002/0471142735.IM0503S44>
- Humphrey, P. A., Moch, H., Cubilla, A. L., Ulbright, T. M., & Reuter, V. E. (2016). The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *European Urology*, *70*(1), 106–119. <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2016.02.028>
- Hwang, Y. P., Yun, H. J., Choi, J. H., Han, E. H., Kim, H. G., Song, G. Y., Kwon, K. il, Jeong, T. C., & Jeong, H. G. (2011). Suppression of EGF-induced tumor cell migration and matrix metalloproteinase-9 expression by capsaicin via the inhibition of EGFR-mediated FAK/Akt, PKC/Raf/ERK, p38 MAPK, and AP-1 signaling. *Molecular Nutrition & Food Research*, *55*(4), 594–605. <https://doi.org/10.1002/MNFR.201000292>
- Ismail, S., Karsenty, G., Chartier-Kastler, E., Cussenot, O., Comp erat, E., Roupr et, M., & Ph e, V. (2018). Prevalence, management, and prognosis of bladder cancer in patients with neurogenic bladder: A systematic review. *Neurourology and Urodynamics*, *37*(4), 1386–1395. <https://doi.org/10.1002/NAU.23457>
- Jaffe, A. B., & Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *21*, 247–269. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CELLBIO.21.020604.150721>
- Jayachandran, M., Miller, V. M., Heit, J. A., & Owen, W. G. (2012). Methodology for isolation, identification and characterization of microvesicles in peripheral blood. *Journal of Immunological Methods*, *375*(1–2), 207–214. <https://doi.org/10.1016/J.JIM.2011.10.012>
- Jiang, J., Kao, C. Y., & Papoutsakis, E. T. (2017). How do megakaryocytic microparticles target and deliver cargo to alter the fate of hematopoietic stem cells? *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, *247*, 1–18. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2016.12.021>
- Johnstone, R. M., Mathew, A., Mason, A. B., & Teng, K. (1991). Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins. *Journal of Cellular Physiology*, *147*(1), 27–36. <https://doi.org/10.1002/JCP.1041470105>
- Jubber, I., Ong, S., Bukavina, L., Black, P. C., Comp erat, E., Kamat, A. M., Kiemeney, L., Lawrentschuk, N., Lerner, S. P., Meeks, J. J., Moch, H., Necchi, A., Panebianco, V., Sridhar, S. S., Znaor, A.,

- Catto, J. W. F., & Cumberbatch, M. G. (2023). Epidemiology of Bladder Cancer in 2023: A Systematic Review of Risk Factors. *European Urology*, *84*(2), 176–190. <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2023.03.029>
- Kanwar, S. S., Dunlay, C. J., Simeone, D. M., & Nagrath, S. (2014). Microfluidic device (ExoChip) for on-chip isolation, quantification and characterization of circulating exosomes. *Lab on a Chip*, *14*(11), 1891–1900. <https://doi.org/10.1039/C4LC00136B>
- Karampoga, A., Tzaferi, K., Koutsakis, C., Kyriakopoulou, K., & Karamanos, N. K. (2022). Exosomes and the extracellular matrix: a dynamic interplay in cancer progression. *The International Journal of Developmental Biology*, *66*(1-2-3), 97–102. <https://doi.org/10.1387/IJDB.210120NK>
- Kevil, C. G., Keith Payne, D., Mire, E., & Alexander, J. S. (1998). Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(24), 15099–15103. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.24.15099>
- Key Statistics for Bladder Cancer | American Cancer Society*. (n.d.). Retrieved March 18, 2024, from <https://www.cancer.org/cancer/types/bladder-cancer/about/key-statistics.html>
- Khorana, A. A., Mackman, N., Falanga, A., Pabinger, I., Noble, S., Ageno, W., Moik, F., & Lee, A. Y. Y. (2022). Cancer-associated venous thromboembolism. *Nature Reviews. Disease Primers*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/S41572-022-00336-Y>
- Koutros, S., Decker, K. L., Baris, D., Pardo, L. A., Johnson, A., Hosain, G. M. M., Rothman, N., Karagas, M. R., Schwenn, M. R., & Silverman, D. T. (2021). Bladder cancer risk associated with family history of cancer. *International Journal of Cancer*, *148*(12), 2915–2923. <https://doi.org/10.1002/IJC.33486>
- Kushner, A., West, W. P., Suheb, M. Z. K., & Pillarisetty, L. S. (2022). Virchow Triad. *Radiopaedia.Org*. <https://doi.org/10.53347/rid-7113>
- Lacroix, R., Judicone, C., Poncelet, P., Robert, S., Arnaud, L., Sampol, J., & Dignat-George, F. (2012). Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, *10*(3), 437–446. <https://doi.org/10.1111/J.1538-7836.2011.04610.X>
- Lee, H., Jun, S. Y., Lee, Y. S., Lee, H. J., Lee, W. S., & Park, C. S. (2014). Expression of miRNAs and ZEB1 and ZEB2 correlates with histopathological grade in papillary urothelial tumors of the urinary bladder. *Virchows Archiv : An International Journal of Pathology*, *464*(2), 213–220. <https://doi.org/10.1007/S00428-013-1518-X>
- Lee, N., Canagasingham, A., Bajaj, M., Shanmugasundaram, R., Hutton, A., Bucci, J., Graham, P., Thompson, J., & Ni, J. (2022). Urine exosomes as biomarkers in bladder cancer diagnosis and prognosis: From functional roles to clinical significance. *Frontiers in Oncology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/FONC.2022.1019391>
- Lee, R., & Droller, M. J. (2000). The natural history of bladder cancer. Implications for therapy. *The Urologic Clinics of North America*, *27*(1), 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0094-0143\(05\)70229-9](https://doi.org/10.1016/S0094-0143(05)70229-9)

- Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), D. K. e. V. (DKG) und D. K. (DKH). (2020). *S3-Leitlinie Früherkennung, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion. August*, 1–400.
- Lenis, A. T., Lec, P. M., & Chamie, K. (2020). Bladder Cancer: A Review. *JAMA*, *324*(19), 1980–1991. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2020.17598>
- Li, X. F., Wang, Y., Zheng, D. D., Xu, H. X., Wang, T., Pan, M., Shi, J. H., & Zhu, J. H. (2016). M1 macrophages promote aortic valve calcification mediated by microRNA-214/TWIST1 pathway in valvular interstitial cells. *American Journal of Translational Research*, *8*(12), 5773. [/pmc/articles/PMC5209529/](https://doi.org/10.7554/ajtr.201608125773)
- Liang, L. G., Sheng, Y. F., Zhou, S., Inci, F., Li, L., Demirci, U., & Wang, S. Q. (2017). An Integrated Double-Filtration Microfluidic Device for Detection of Extracellular Vesicles from Urine for Bladder Cancer Diagnosis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1660*, 355–364. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7253-1_29
- Lima, L., Oliveira, D., Tavares, A., Amaro, T., Cruz, R., Oliveira, M. J., Ferreira, J. A., & Santos, L. (2014). The predominance of M2-polarized macrophages in the stroma of low-hypoxic bladder tumors is associated with BCG immunotherapy failure. *Urologic Oncology*, *32*(4), 449–457. <https://doi.org/10.1016/J.UROLONC.2013.10.012>
- Livshits, M. A., Khomyakova, E., Evtushenko, E. G., Lazarev, V. N., Kulemin, N. A., Semina, S. E., Generozov, E. V., & Govorun, V. M. (2015). Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Scientific Reports*, *5*. <https://doi.org/10.1038/SREP17319>
- Lobb, R. J., Lima, L. G., & Möller, A. (2017). Exosomes: Key mediators of metastasis and pre-metastatic niche formation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *67*, 3–10. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2017.01.004>
- Lösche, W., Scholz, T., Temmler, U., Oberle, V., & Claus, R. A. (2004). Platelet-derived microvesicles transfer tissue factor to monocytes but not to neutrophils. *Platelets*, *15*(2), 109–115. <https://doi.org/10.1080/09537100310001649885>
- Lucchetti, D., Battaglia, A., Ricciardi-Tenore, C., Colella, F., Perelli, L., Maria, R. De, Scambia, G., Sgambato, A., & Fattorossi, A. (2020). Measuring Extracellular Vesicles by Conventional Flow Cytometry: Dream or Reality? *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), 1–15. <https://doi.org/10.3390/IJMS21176257>
- Lugano, R., Ramachandran, M., & Dimberg, A. (2020). Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *77*(9), 1745–1770. <https://doi.org/10.1007/S00018-019-03351-7>
- Lüllmann-Rauch, R., & Asan, E. (2019). Taschenlehrbuch Histologie Lüllmann Rauch: 27 Anhang. *Taschenlehrbuch Histologie*, 724–731. <https://shop.thieme.de/Taschenlehrbuch-Histologie/9783132425293>
- Maacha, S., Bhat, A. A., Jimenez, L., Raza, A., Haris, M., Uddin, S., & Grivel, J. C. (2019). Extracellular vesicles-mediated intercellular communication: roles in the tumor microenvironment and anti-cancer drug resistance. *Molecular Cancer*, *18*(1). <https://doi.org/10.1186/S12943-019-0965-7>

- Maas, S. L. N., Vrij, J. De, & Broekman, M. L. D. (2014). Quantification and size-profiling of extracellular vesicles using tunable resistive pulse sensing. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 92. <https://doi.org/10.3791/51623>
- Mack, G. S., & Marshall, A. (2010). Lost in migration. *Nature Biotechnology*, 28(3), 214–229. <https://doi.org/10.1038/NBT0310-214>
- McKinnon, K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology*, 120, 5.1.1. <https://doi.org/10.1002/CPIM.40>
- Meldolesi, J. (2018). Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication. *Current Biology : CB*, 28(8), R435–R444. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2018.01.059>
- Mendoza, M. C., Vilela, M., Juarez, J. E., Blenis, J., & Danuser, G. (2015). ERK reinforces actin polymerization to power persistent edge protrusion during motility. *Science Signaling*, 8(377), ra47. <https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.AAA8859>
- Michaud, D. S. (2007). Chronic inflammation and bladder cancer. *Urologic Oncology*, 25(3), 260–268. <https://doi.org/10.1016/J.UROLONC.2006.10.002>
- Mondal, S., Adhikari, N., Banerjee, S., Amin, S. A., & Jha, T. (2020). Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitors in cancer: A minireview. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 194. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2020.112260>
- Morales-Kastresana, A., Telford, B., Musich, T. A., McKinnon, K., Clayborne, C., Braig, Z., Rosner, A., Demberg, T., Watson, D. C., Karpova, T. S., Freeman, G. J., Dekruyff, R. H., Pavlakis, G. N., Terabe, M., Robert-Guroff, M., Berzofsky, J. A., & Jones, J. C. (2017). Labeling Extracellular Vesicles for Nanoscale Flow Cytometry. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-01731-2>
- Mori, S., & Barth, H. G. (1999). *Size Exclusion Chromatography*. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-03910-6>
- Morrissey, J. H., Fakhrai, H., & Edgington, T. S. (1987). Molecular cloning of the cDNA for tissue factor, the cellular receptor for the initiation of the coagulation protease cascade. *Cell*, 50(1), 129–135. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90669-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90669-6)
- Mulcahy, L. A., Pink, R. C., & Carter, D. R. F. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(1). <https://doi.org/10.3402/JEV.V3.24641>
- Muramatsu, T., & Miyauchi, T. (2003). Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histology and Histopathology*, 18(3), 981–987. <https://doi.org/10.14670/HH-18.981>
- Musante, L., Bontha, S. V., La Salvia, S., Fernandez-Piñeros, A., Lannigan, J., Le, T. H., Mas, V., & Erdbrügger, U. (2020). Rigorous characterization of urinary extracellular vesicles (uEVs) in the low centrifugation pellet - a neglected source for uEVs. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-60619-W>
- Nabeshima, K., Iwasaki, H., Koga, K., Hojo, H., Suzumiya, J., & Kikuchi, M. (2006). Emprin (basigin/CD147): Matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression. *Pathology International*, 56(7), 359–367. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2006.01972.x>

- Nagata, S., Sakuragi, T., & Segawa, K. (2020). Flippase and scramblase for phosphatidylserine exposure. *Current Opinion in Immunology*, 62, 31–38. <https://doi.org/10.1016/J.COI.2019.11.009>
- Neophytou, C. M., Panagi, M., Stylianopoulos, T., & Papageorgis, P. (2021). The Role of Tumor Microenvironment in Cancer Metastasis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Cancers*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/CANCERS13092053>
- Nitori, N., Ino, Y., Nakanishi, Y., Yamada, T., Honda, K., Yanagihara, K., Kosuge, T., Kanai, Y., Kitajima, M., Hirohashi, S., & Tirschashi, T. (2005). Prognostic significance of tissue factor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 11(7), 2531–2539. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0866>
- Nogués, L., Benito-Martin, A., Hergueta-Redondo, M., & Peinado, H. (2018). The influence of tumour-derived extracellular vesicles on local and distal metastatic dissemination. *Molecular Aspects of Medicine*, 60, 15–26. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2017.11.012>
- Otani, K., Yokoya, M., Kodama, T., Hori, K., Matsumoto, K., Okada, M., & Yamawaki, H. (2018). Plasma exosomes regulate systemic blood pressure in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 503(2), 776–783. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2018.06.075>
- Palmieri, V., Lucchetti, D., Gatto, I., Maiorana, A., Marcantoni, M., Maulucci, G., Papi, M., Pola, R., De Spirito, M., & Sgambato, A. (2014). Dynamic light scattering for the characterization and counting of extracellular vesicles: a powerful noninvasive tool. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(9), 1–8. <https://doi.org/10.1007/S11051-014-2583-Z/METRICS>
- Posma, J. J., Grover, S. P., Hisada, Y., Owens, A. P., Antoniak, S., Spronk, H. M., & Mackman, N. (2019). Roles of Coagulation Proteases and PARs (Protease-Activated Receptors) in Mouse Models of Inflammatory Diseases. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 39(1), 13–24. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311655>
- Prada, I., & Meldolesi, J. (2016). Binding and Fusion of Extracellular Vesicles to the Plasma Membrane of Their Cell Targets. *International Journal of Molecular Sciences 2016, Vol. 17, Page 1296*, 17(8), 1296. <https://doi.org/10.3390/IJMS17081296>
- Puhm, F., Boilard, E., & MacHlus, K. R. (2021). Platelet Extracellular Vesicles: Beyond the Blood. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 41(1), 87–96. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314644>
- Raby, S. E. M., Hoskin, P., & Choudhury, A. (2020). The role of palliative radiotherapy in bladder cancer: a narrative review. *Annals of Palliative Medicine*, 9(6), 4294–4299. <https://doi.org/10.21037/APM-20-1347>
- Ramos-Martín, F., & D’Amelio, N. (2022). Biomembrane lipids: When physics and chemistry join to shape biological activity. *Biochimie*, 203, 118–138. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2022.07.011>
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology*, 200(4), 373–383. <https://doi.org/10.1083/JCB.201211138>
- Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P., & Ratajczak, M. Z. (2006). Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence

- for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, 20(5), 847–856. <https://doi.org/10.1038/SJ.LEU.2404132>
- Rhea, L. P., Mendez-Marti, S., Kim, D., & Aragon-Ching, J. B. (2021). Role of immunotherapy in bladder cancer. *Cancer Treatment and Research Communications*, 26. <https://doi.org/10.1016/J.CTARC.2020.100296>
- Rki. (2019). *RKI – Krebs in Deutschland – 2019/2020*. www.krebsdaten.de/harnblasenkrebs
- Salaroglio, I. C., Mungo, E., Gazzano, E., Kopecka, J., & Riganti, C. (2019). ERK is a Pivotal Player of Chemo-Immune-Resistance in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10). <https://doi.org/10.3390/IJMS20102505>
- Schey, K. L., Luther, J. M., & Rose, K. L. (2015). Proteomics characterization of exosome cargo. *Methods (San Diego, Calif.)*, 87, 75–82. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2015.03.018>
- Schulz, A., Chuquimia, O. D., Antypas, H., Steiner, S. E., Sandoval, R. M., Tanner, G. A., Molitoris, B. A., Richter-Dahlfors, A., & Melican, K. (2018). Protective vascular coagulation in response to bacterial infection of the kidney is regulated by bacterial lipid A and host CD147. *Pathogens and Disease*, 76(8). <https://doi.org/10.1093/FEMSPD/FTY087>
- Shapiro, H. M. (2003). Practical Flow Cytometry. *Practical Flow Cytometry*. <https://doi.org/10.1002/0471722731>
- Shariat, S. F., Karam, J. A., Lotan, Y., & Karakiewicz, P. I. (2008). Critical Evaluation of Urinary Markers for Bladder Cancer Detection and Monitoring. *Reviews in Urology*, 10(2), 120. [/pmc/articles/PMC2483317/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17148331/)
- Sharma, A., & Johnson, A. (2020). Exosome DNA: Critical regulator of tumor immunity and a diagnostic biomarker. *Journal of Cellular Physiology*, 235(3), 1921–1932. <https://doi.org/10.1002/JCP.29153>
- Sidhu, S. S., Mengistab, A. T., Tauscher, A. N., LaVail, J., & Basbaum, C. (2004). The microvesicle as a vehicle for EMMPRIN in tumor–stromal interactions. *Oncogene* 23:4, 23(4), 956–963. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207070>
- Skoczylas, Ł., Gawin, M., Fochtman, D., Widłak, P., Whiteside, T. L., & Pietrowska, M. (2023). Immune capture and protein profiling of small extracellular vesicles from human plasma. *Proteomics*. <https://doi.org/10.1002/PMIC.202300180>
- Skotland, T., Sandvig, K., & Llorente, A. (2017). Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Progress in Lipid Research*, 66, 30–41. <https://doi.org/10.1016/J.PLIPRES.2017.03.001>
- Smith, S. A. (2009). The cell-based model of coagulation. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care (San Antonio, Tex.: 2001)*, 19(1), 3–10. <https://doi.org/10.1111/J.1476-4431.2009.00389.X>
- Sódar, B. W., Kittel, Á., Pálóczi, K., Vukman, K. V., 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, E. I. (2016). Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP24316>

- Spek, C. A., Tekin, C., & Bijlsma, M. F. (2019). Protease-activated receptor-1 impedes prostate and intestinal tumor progression in mice: comment. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, *17*(1), 235–238. <https://doi.org/10.1111/JTH.14329>
- Spinello, I., Saulle, E., Quaranta, M. T., Pasquini, L., Pelosi, E., Castelli, G., Ottone, T., Voso, M. T., Testa, U., & Labbaye, C. (2019). The small-molecule compound AC-73 targeting CD147 inhibits leukemic cell proliferation, induces autophagy and increases the chemotherapeutic sensitivity of acute myeloid leukemia cells. *Haematologica*, *104*(5), 973–985. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2018.199661>
- Steeg, P. S. (2006). Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nature Medicine*, *12*(8), 895–904. <https://doi.org/10.1038/NM1469>
- Stipp, C. S., Kolesnikova, T. V., & Hemler, M. E. (2003). Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, *28*(2), 106–112. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)00014-2)
- Subra, C., Laulagnier, K., Perret, B., & Record, M. (2007). Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie*, *89*(2), 205–212. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2006.10.014>
- Szataneck, R., Baj-Krzyworzeka, M., Zimoch, J., Lekka, M., Siedlar, M., & Baran, J. (2017). The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(6). <https://doi.org/10.3390/IJMS18061153>
- Tang, Y., Kesavan, P., Nakada, M. T., & Yan, L. (2004). Tumor-Stroma Interaction: Positive Feedback Regulation of Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) Expression and Matrix Metalloproteinase-Dependent Generation of Soluble EMMPRIN. *Molecular Cancer Research*, *2*(2), 73–80. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.73.2.2>
- Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., & Amigorena, S. (2001). Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *166*(12), 7309–7318. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.166.12.7309>
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J. M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., ... Zuba-Surma, E. K. (2018). 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. *Journal of Extracellular Vesicles*, *7*(1). <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- Thompson, D. B., Siref, L. E., Feloney, M. P., Hauke, R. J., & Agrawal, D. K. (2015). Immunological basis in the pathogenesis and treatment of bladder cancer. *Expert Review of Clinical Immunology*, *11*(2), 265–279. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2015.983082>
- Tissue Factor Expression Correlates with Tumor Angiogenesis and Invasiveness in Human Hepatocellular Carcinoma | Clinical Cancer Research | American Association for Cancer Research.* (n.d.). Retrieved April 25, 2024, from <https://aacrjournals.org/clincancerres/article/9/14/5339/202187/Tissue-Factor-Expression-Correlates-with-Tumor>

- Tiwari, S., Kumar, V., Randhawa, S., & Verma, S. K. (2021). Preparation and characterization of extracellular vesicles. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y. : 1989)*, 85(2). <https://doi.org/10.1111/AJI.13367>
- Tomiyaama, E., Fujita, K., Matsuzaki, K., Narumi, R., Yamamoto, A., Uemura, T., Yamamichi, G., Koh, Y., Matsushita, M., Hayashi, Y., Hashimoto, M., Banno, E., Kato, T., Hatano, K., Kawashima, A., Uemura, M., Ukekawa, R., Takao, T., Takada, S., ... Nonomura, N. (2022). EphA2 on urinary extracellular vesicles as a novel biomarker for bladder cancer diagnosis and its effect on the invasiveness of bladder cancer. *British Journal of Cancer*, 127(7), 1312–1323. <https://doi.org/10.1038/S41416-022-01860-0>
- Trams, E. G., Lauter, C. J., Norman Salem, J., & Heine, U. (1981). Exfoliation of membrane ectoenzymes in the form of micro-vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 645(1), 63–70. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(81\)90512-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(81)90512-5)
- Tricarico, C., Clancy, J., & D'Souza-Schorey, C. (2017). Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases*, 8(4), 220–232. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1215283>
- Turetz, M., Sideris, A. T., Friedman, O. A., Tripathi, N., & Horowitz, J. M. (2018). Pulmonary Embolism: Epidemiology, Pathophysiology, and Natural History of Pulmonary Embolism. *Seminars in Interventional Radiology*, 35(2), 92. <https://doi.org/10.1055/S-0038-1642036>
- Van Der Horst, G., Bos, L., & Van Der Pluijm, G. (2012). Epithelial plasticity, cancer stem cells, and the tumor-supportive stroma in bladder carcinoma. *Molecular Cancer Research : MCR*, 10(8), 995–1009. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0274>
- van der Pol, E., Böing, A. N., Gool, E. L., & Nieuwland, R. (2016). Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, 14(1), 48–56. <https://doi.org/10.1111/JTH.13190>
- van der Pol, E., Böing, A. N., Harrison, P., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2012). Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacological Reviews*, 64(3), 676–705. <https://doi.org/10.1124/PR.112.005983>
- Van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 19(4), 213–228. <https://doi.org/10.1038/NRM.2017.125>
- Vogel, R., Coumans, F. A. W., Maltesen, R. G., Böing, A. N., Bonnington, K. E., Broekman, M. L., Broom, M. F., Buzás, E. I., Christiansen, G., Hajji, N., Kristensen, S. R., Kuehn, M. J., Lund, S. M., Maas, S. L. N., Nieuwland, R., Osteikoetxea, X., Schnoor, R., Scicluna, B. J., Shambrook, M., ... Pedersen, S. (2016). A standardized method to determine the concentration of extracellular vesicles using tunable resistive pulse sensing. *Journal of Extracellular Vesicles*, 5(1). <https://doi.org/10.3402/JEV.V5.31242>
- Webber, J., & Clayton, A. (2013). How pure are your vesicles? *Journal of Extracellular Vesicles*, 2(1), 19861. <https://doi.org/10.3402/JEV.V2I0.19861>
- Wilcox, J. N., Smith, K. M., Schwartz, S. M., & Gordon, D. (1989). Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(8), 2839–2843. <https://doi.org/10.1073/PNAS.86.8.2839>

- Wilson, K. F., Erickson, J. W., Antonyak, M. A., & Cerione, R. A. (2013). Rho GTPases and their roles in cancer metabolism. *Trends in Molecular Medicine*, *19*(2), 74–82. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2012.10.011>
- Witjes, J. A., Bruins, H. M., Cathomas, R., Comp erat, E. M., Cowan, N. C., Gakis, G., Hern andez, V., Linares Espin os, E., Lorch, A., Neuzillet, Y., Rouanne, M., Thalmann, G. N., Veskim ae, E., Ribal, M. J., & van der Heijden, A. G. (2021). European Association of Urology Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Summary of the 2020 Guidelines. *European Urology*, *79*(1), 82–104. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2020.03.055>
- Wolf, P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *British Journal of Haematology*, *13*(3), 269–288. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2141.1967.TB08741.X>
- Yuan, F., Li, Y. M., & Wang, Z. (2021). Preserving extracellular vesicles for biomedical applications: consideration of storage stability before and after isolation. *Drug Delivery*, *28*(1), 1501–1509. <https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1951896>
- Zhang, Y., Bi, J., Huang, J., Tang, Y., Du, S., & Li, P. (2020). Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications. *International Journal of Nanomedicine*, *15*, 6917–6934. <https://doi.org/10.2147/IJN.S264498>

7 Danksagung

Ich möchte mich zunächst bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Experimentelle Onkologie“ bedanken, die in zahllosen Labortreffen gegrübelt, diskutiert, kritisiert, gelobt und immer wieder motiviert haben. Ein besonderer Dank geht dabei an Frau Dr. F.E., die mich die Grundlagen des wissenschaftlichen Arbeitens gelehrt und auch an den weniger sonnigen Tagen des Laborlebens toleriert hat. Auch möchte ich mich bei V. B. K. bedanken, aus dessen Kooperation die umfangreichste Publikation dieses Projektes entstanden ist.

Ich möchte mich bei meinen Eltern und meiner Familie bedanken für zahlreiche Motivationsschübe und liebevollen Erinnerungen an die Vollendung dieses Projektes. Ein Umfeld wundervoller Freunde, die mir zugehört und mich emotional, mental, professionell und nochmals emotional zu jedem Zeitpunkt unterstützt haben ist ein Privileg, für das ich sehr dankbar bin.

Mein Dank gilt auch den Kollegen der Klinik für Urologie für die Hilfe bei der Probengewinnung sowie den fachlichen Austausch im Bezug auf das Urothelkarzinom.

Zuletzt aber umso bedeutender möchte ich mich herzlich bei meinem Betreuer Prof. Frank Gieseler bedanken. Neben der wissenschaftlichen Begleitung und Bereitstellung von Equipment und Team waren die Diskussionen und das Feedback stets hilfreich und zielführend. Bis zuletzt warst du trotz teils hitziger Debatten immer geduldig und optimistisch mit mir, vielen Dank!

8 Lebenslauf

Piet Zamzow

Hochschulausbildung und ärztliche Tätigkeit

10/2022 bis 03/2025	Assistenzarzt der Klinik für Innere Medizin Schön Klinik Neustadt in Holstein
08/2022	Erteilung der Approbation als Arzt
10/2015 - 06/2022	Studium Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
06/2019 - 04/2020	Notfallmedizin und Notarztwagenpraktikum Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin
10/2016 - 06/2017	Tutorat für makroskopische Anatomie Institut für Anatomie Lübeck
2018 – 2025	Dissertation

Veröffentlichungen

02/2024	“Targeting cancer-derived extracellular vesicles by combining CD147 inhibition with tissue factor pathway inhibitor for the management of urothelial cancer cells” Cell Communications and Signaling
02/2020	„Tissue factor activity on microvesicles from cancer patients“ Journal of Cancer Research and Clinical Oncology
12/2019	„Detection and Quantification of Extracellular Vesicles via FACS: Membrane Labeling Matters!“ International Journal of Molecular Science

Kongresse

02/2019	European Organisation for Research and Treatment of Cancer - Pharmaceutical and Molecular Mechanism Group Winter Meeting in Verona, Italien Besucher
10/2018	International Symposium on Cancer-Immuno-Oncology Lübeck Besucher