

Aus dem Bereich Human- und Molekularbiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes,
Homburg/Saar

Etablierung eines Verfahrens zur gezielten Anreicherung von Exosomen aus *liquid biopsies* von Patienten mit diagnostiziertem klarzelligen Nierenzellkarzinom

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2023

vorgelegt von: Dirk Himbert
geb. am: 02.03.1988 in Saarbrücken, Deutschland

Tag der Promotion: 26.02.2024

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Friedrich Grässer

Prof. Dr. med. Lorenz Thurner

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung/ Summary	5
1.1 Zusammenfassung	5
1.2 Summary.....	7
2. Einleitung.....	8
2.1 Tumore	8
2.1.1 Entstehung und Entwicklung von Tumoren.....	8
2.1.2 Die Biologie und Verteilung urologischer Tumorerkrankungen	9
2.2 Liquid Biopsies	12
2.3 Die Rolle von Exosomen in der Tumorforschung.....	13
2.3.1 Funktion	15
2.3.2 Techniken zur Isolation und Charakterisierung	16
2.3.3 Mikrovesikel / Extrazelluläre Vesikel als Biomarker.....	18
2.4 Tumorspezifische Marker für Exosomen	19
2.4.1 Bisher verwendete Biomarker: EpCAM	20
2.4.2 Potenzielle tumorspezifische Marker	20
2.4.2.1 CD70	21
2.4.2.2 CA9	22
2.4.2.3 CD147.....	23
2.5 Methodenetablierung an biologischen Systemen.....	24
2.5.1 Anreicherung von Exosomen über magnetische <i>Beads</i>	25
2.5.2 Charakterisierung von exosomalen Oberflächenproteinen via Nanochips	28
2.6 Hypothesen und Zielsetzung.....	29
3. Material und Methodik	32
3.1 Patientenproben.....	32
3.2 Zellkulturtechniken	33
3.2.1 Eingesetzte Zelllinien	33
3.2.2 Konservierung und Lagerung von Zellen	33
3.2.3 Auftauen und Kultivierung von Zellen	34
3.2.4 Zellyse	34
3.3 Isolation von Exosomen.....	35
3.3.1 Exosomenisolation aus Zellkulturüberständen	35
3.3.1.1 Produktion von exosomenfreien FKS (ED-FKS).....	35
3.3.1.2 Kultivierung und Isolationsprozess	35
3.3.2 Exosomenisolation aus Gewebe	36
3.3.3 Exosomenisolation aus Plasma.....	388

3.4 Charakterisierung von Exosomen.....	388
3.4.1 Nano Tracking Analysis (NTA).....	39
3.4.2 Transelektronenmikroskopie (TEM).....	40
3.4.3 Western Blot.....	41
3.5 Anreicherung von Exosomen	43
3.5.1 Magnetische <i>Beads</i>	43
3.5.2 Chip-basierte Methode.....	45
3.6 Immunohistochemie	48
3.7 Materialien und Geräte.....	49
3.8 Chemikalien und Reagenzien/ Lösungen.....	50
3.9 Kits und Enzyme	52
3.10 Geräte- und Computersoftware	53
4. Ergebnisse	54
4.1 Charakterisierung von Exosomen aus Zellkultur	54
4.1.1 TEM-Aufnahmen von Exosomen aus Zellkultur	55
4.1.2 NTA-Messungen von Exosomen aus Zellkultur	56
4.1.3 Charakterisierung von Oberflächenmarkern auf Exosomen aus Zellkultur	61
4.1.3.1 Qualitätskontrolle: Expression von zell- und exosomenspezifischen Proteinen im klarzelligen Nierenzellkarzinom	61
4.1.3.2 Expression von Tumormarkern (EpCAM, CD147, CA9, CD70) in Zelllinien des klarzelligen Nierenzellkarzinoms	63
4.1.3.3 Expression von zell-, exosomen- und tumorspezifischen Proteinen in Zelllinien von invasiven Blasentumoren.....	65
4.1.3.4 Expression von zell-, exosomen- und tumorspezifischen Proteinen in Zelllinien von malignen und benignen Tumoren der Niere, der Blase, sowie der Prostata	66
4.2. Charakterisierung von Exosomen aus Gewebe	69
4.2.1 TEM-Aufnahmen von Gewebe-Exosomen.....	69
4.2.2 NTA von Gewebeexosomen	71
4.2.3 Charakterisierung von Proteinen auf Exosomen aus Gewebe.....	74
4.2.3.1 Vergleich verschiedener Isolationsmethoden zur Gewinnung von Exosomen aus Gewebe	74
4.2.3.2 Expression von Zell- und Exosomenmarkern in Tumor- und Normalgewebe.....	76
4.2.3.3 Expression von Tumormarkern in Tumor- und Normalgewebe	77
4.3 Immunhistochemie Gewebe	79
4.4 Plasma-Exosomen.....	82
4.4.1 NTA bei Plasma-Exosomen	82
4.4.2 TEM von Plasma-Exosomen.....	845

4.5 Chip-Technik	86
4.5.1 Etablierung an Zelllinien von Nierenzellkarzinom und Prostatafibroblasten	86
4.5.2 Vergleich zwischen Zellkulturüberständen, isolierten Exosomenproben und unbehandelten Plasmaproben.....	89
4.5.2.1 Vergleich der Expression von Tetraspaninen auf Exosomen aus Plasma und Zellkultur	89
4.5.2.2 Vergleich der Expression und Kolokalisation von CD147 auf Exosomen	91
4.5.3 Expression und Kolokalisation von Tetraspaninen und Tumormarkern auf Exoso- men aus Blutplasma und Zellkultur mit Bezug zum klarzelligen Nierenzellkarzinom.....	92
4.5.3.1 Vergleich der Expression und Kolokalisation von Tetraspaninen auf Exosomen aus Blutplasma	93
4.5.3.2 Vergleich der Expression und Kolokalisation Tumormarkern auf Exosomen aus Blutplasma und Zellkultur mit Bezug zum klarzelligen Nierenzellkarzinom.....	99
4.5.3.3 Expression von CA9 und CD147 auf Exosomen aus Blutplasma eines Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzinom.....	103
4.5.3.4 Vergleich der Expression von Exosomenmarkern auf Exosomen aus Plasma von Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzinom	107
4.5.3.5 Vergleich der Expression von CD147 auf Exosomen aus Plasma von Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzinom.....	110
4.6 Anreicherung von Exosomen durch magnetische <i>Beads</i>	113
4.6.1 Anreicherung von Exosomen aus Zellkulturproben mittels <i>Beads</i>	113
4.6.1.1 CD63 als Zielprotein	113
4.6.1.2 CD147 als Zielprotein	116
4.6.2 Anreicherung von Exosomen aus Plasmaproben mittels <i>Beads</i>	117
5. Diskussion.....	121
5.1 Charakterisierung von Exosomen aus Zellkultur	121
5.2 Charakterisierung von Exosomen aus Gewebe	126
5.3 Charakterisierung von Exosomen aus Blutplasma.....	129
5.4 Chip-Technik	131
5.5 Anreicherung von Exosomen durch magnetische <i>Beads</i>	137
5.6 Limitationen	142
5.7 Fazit und Ausblick.....	142
6. Literaturverzeichnis.....	144
7. Tabellenverzeichnis	187
8. Abbildungsverzeichnis.....	188
9. Abkürzungsverzeichnis	191
10. Anhang	193
11. Publikationen und Danksagung	197

11.1 Auflistung der wissenschaftlichen Beiträge	197
11.1.1 Veröffentlichungen in Fachzeitschriften nach <i>peer-review</i> -Verfahren.....	197
11.1.2 Vorträge auf nationalen und internationalen Fachkonferenzen	197
11.1.3 Posterbeiträge auf nationalen und internationalen Fachkonferenzen.....	197
11.1.4 Auszeichnungen und Preise	198
11.2 Danksagung	199
12. Lebenslauf	201

1. Zusammenfassung/ Summary

1.1 Zusammenfassung

Unter den Tumorerkrankungen repräsentieren die oft tödlich verlaufenden urologischen Tumore eine Entität mit einem erheblichen Anteil. Extrazelluläre Vesikel eröffnen als innovative Biomarker die besten Chancen zu einer frühzeitigen Erkennung und dann zielgerichteten Behandlung solcher Tumore. Exosomen stellen hierbei eine wichtige Untergruppe der Extrazellulären Vesikel dar. Von diesen ist bekannt, dass sie eine aktive Rolle in der Zell-Zell-Kommunikation spielen, und über Proteine und Nukleinsäuren an der Zellprägung sowie der Kontrolle der Zellaktivität beteiligt sind. Ihr Potenzial liegt in ihrer Bioverfügbarkeit in allen Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin, Speichel *etc*, und sie werden von fast allen Zelltypen ausgeschieden. Zudem spiegelt ihre molekulare Zusammensetzung ihre Herkunft wider, so lassen sie sich theoretisch ihrem Ursprung wie Tumorgewebe oder Normalgewebe zuordnen. Allerdings wurden bisher keine für die Diagnostik von Nierenzellkarzinomen nutzbaren Biomarker beschrieben. Zum anderen sind Exosomen, die von solchen Tumoren sezerniert werden, in den diagnostisch nutzbaren Körperflüssigkeiten nur in sehr geringer Konzentration vorhanden. Weiterhin befinden sich in Körperflüssigkeiten noch eine Vielzahl an Proteinen, Lipiden, Nukleinsäuren und Vesikeln/Partikeln, die von anderen Quellen kommen können.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Proteine zu identifizieren, die sich nachweislich dem klarzelligen Nierenzellkarzinom zuordnen lassen und auf Exosomen vorhanden sind. Diese Tumormarker sollen dazu verwendet werden, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem sich Exosomen solcher Tumore, gezielt aus dem Blut oder Urin anreichern lassen.

Die vorliegende Arbeit dokumentiert die erfolgreiche Isolation von Exosomen aus verschiedensten Quellen (Zellkultur, Gewebe und Plasma) und Entitäten (Niere, Blase, Prostata) unter Anwendung eines breiten Methodenspektrums (Ultrazentrifugation, Kits, Nano-Chips, magnetische *Beads*). Ein Verfahren zur Anreicherung/Isolierung von Exosomen aus Gewebe via Ultrazentrifugation mit Saccharosegradient wurde weiterentwickelt und etabliert. CD147, CA9, CD70 sind als potenzielle tumorspezifische Biomarker im Nierenzellkarzinom (NZK), *in-vitro* sowie *in-vivo*, darstellbar. Die gezielte Anreicherung von Exosomen mittels magnetischer *Beads*, die mit exosomal (CD63) oder tumoralen (CD147) Antikörpern gekoppelt waren, konnte im *in-vitro* Modell in der Zellkultur erfolgreich etabliert werden. Hier zeigten sich unterschiedliche Expressionsmuster auf den CD63-positiven und den CD147-positiven Subpopulationen. Die Kollokalisierung des Tumormarkers CD147 und der Exosomenmarker CD9, CD63, CD81 auf den CD9-positiven, CD63-positiven oder CD81-positiven Subpopulationen wurde unter Verwendung eines Nano-Chips *in-vitro* (Zellkultur) und *in-vivo* (humanes Blutplasma) quantifiziert.

Aufbauend auf diesen Daten kann auf der Ebene von Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren eine weitere Charakterisierung der Exosomensubpopulationen erfolgen. Die Einbindung innovativer, hochauflösender Techniken erlaubt darauf aufbauend die Entwicklung einer Reihe von Markern zur diagnostischen und therapeutischen Implementierung von Exosomen in der Tumorbehandlung.

1.2 Summary

In developed societies, tumors are among the most common diseases which eventually lead to death. Improvements in diagnostics and therapy have been the focus of numerous research projects for many decades. Urological cancers represent a large proportion of tumor diseases. Early detection and targeted treatment offer the best chance of successfully combating the disease. Extracellular vesicles can fulfil these requirements as innovative biomarkers. Exosomes, a subgroup of extracellular vesicles, are known to play an active role in cell-to-cell communication and to be involved in cell imprinting and the control of cell activity via proteins and nucleic acids. The great medical potential lies in their bioavailability, as they are found in all body fluids like blood, urine, or saliva and are excreted by almost all cell types. In addition, their molecular composition reflects their origin, so they can theoretically be assigned to their cell of origin (e.g. tumor tissue or normal tissue).

However, no biomarkers that can be used for diagnostics in ccRCC have been described to date. On the other hand, in the body fluids that can be used for diagnostic purposes (e.g. urine, blood), exosomes that explicitly originate from urological tumor cells are only present in very low concentrations. Furthermore, there are a large number of proteins, lipids, nucleic acids and vesicles/particles in body fluids, which may originate from other sources.

The aim of this study was to identify proteins that can be proven to be associated with clear cell renal cell carcinoma. These tumor markers should be used to develop a method with which exosomes secreted by a clear cell RCC can be selectively enriched from the blood or urine.

This work describes the successful isolation of exosomes from different sources (cell culture, tissue and plasma) and entities (kidney, bladder, prostate) using a wide range of methods (ultracentrifugation, kits, nano-chips, magnetic beads). A known method for enriching/isolating exosomes from tissue via ultracentrifugation through a sucrose gradient was improved and established. CD147, CA9, CD70 were identified as potential tumor-specific biomarkers in renal cell carcinoma (RCC), both in-vitro and in-vivo.

The enrichment of exosomes using magnetic beads coupled with exosomal (CD63) or tumor-specific (CD147) antibodies was successfully established in an in-vitro model in cell culture. Here, different expression patterns were found on the CD63-positive and the CD147-positive subpopulations. The colocalization of the tumor marker CD147 and the exosome markers CD9, CD63, CD81 on the CD9-positive, CD63-positive or CD81-positive subpopulations was quantified in vitro (cell culture) and in vivo (human blood plasma) using a nanochip.

Based on these data, the further characterization of the exosome subpopulations on the level of proteins, lipids and nucleic acids is envisioned. The integration of innovative, high-resolution techniques allows the development of a marker panel for the diagnostic and therapeutic implementation of exosomes in tumor therapy.

2. Einleitung

□ Alle verwendeten Personalbegriffe beziehen sich in gleicher Weise auf Frauen und Männer.

2.1 Tumore

Der Begriff Tumor (lateinisch für „Schwellung“ oder Geschwulst) bezeichnet im Allgemeinen die krankhafte Schwellung eines Organes in Folge einer Gewebewucherung, die auf übermäßige Zellvermehrung zurückzuführen ist. Er kommt sowohl im Reich der Tiere (Animalia) und dem der Pflanzen (Plantae) vor [1]. Tumore lassen sich in gutartige (benigne) und bösartige (maligne) Neubildungen (Neoplasien) von Körpergewebe unterteilen. Neoplasien entstehen durch Fehlregulationen innerhalb einer oder mehrerer Zellen, und sind somit monoklonal bzw. multiklonal [2 - 4]. Benigne Tumore sind gut abgrenzbar, ausdifferenziert, besitzen eine homogene Struktur, und wachsen langsam sowie verdrängend. Sie weisen sehr geringe Zellveränderungen auf und bedingen einen symptomarmen, metastasen-freien Krankheitsverlauf. Maligne Tumore sind schlecht abgrenzbar, wenig differenziert, besitzen eine heterogene Struktur, und wachsen schnell sowie invasiv. Sie weisen eine hohe Mutationsrate, viele atypische Veränderungen und eine hohe Zellteilungsrate auf. Der Krankheitsverlauf ist eher kurz und oft letal [5, 6, 7].

In dieser Arbeit wird ausschließlich Bezug auf Malignome des Menschen genommen.

2.1.1 Entstehung und Entwicklung von Tumoren

Tumorerkrankungen zählen zu den häufigsten Krankheiten mit einem erhöhten Auftreten im fortgeschrittenen Alter [8 - 10]. Unter den Begriff »Krebs«, oder auch Karzinom, fallen alle bösartigen Neubildungen von (Tumor-) Gewebe - einschließlich der Lymphome und Leukämien [11].

Die genetischen Veränderungen und der damit verbundene Selektionsprozess führt dazu, dass fortgeschrittene menschliche bösartige Tumore (Malignome) karyotypisch und biologisch sehr individuell sind. Tumore weisen oft einen heterogenen Karyotyp auf, deshalb strebt man eine individuelle Therapie an. Eine auf den Individualtyp zugeschnittene Therapie wäre in diesem Zusammenhang erstrebenswert [12]. Sie ist in der „Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme“ (ICD-10, Kapitel II) definiert. Sie spiegelt nicht immer den klinischen Verlauf der Erkrankungen wider und dient als Kodierung für die Dokumentation [13].

2.1.2 Die Biologie und Verteilung urologischer Tumorerkrankungen

Die Einteilung in Neubildungen mit gutartigem, bösartigem oder unsicherem Verhalten weist zudem historische Veränderungen, beispielsweise bei Blasen Tumoren, auf [14]. Bösartige Neubildungen können ihren Ursprung in unterschiedlichen Zellarten haben und in den verschiedensten Organen des menschlichen Körpers entstehen. Die meisten Krebskrankheiten beginnen in den inneren und äußeren Körperoberflächen (Epithelien) [15]. Ein Großteil der Tumoren sind vom Drüsengewebe ausgehende Adenokarzinome, sowie Plattenepithelkarzinome, bösartige Tumoren des Übergangsepithels (Urothelkarzinome) und kleinzellige Karzinome [16, 17]. Leukämien und Lymphome entstehen im blutbildenden Knochenmark oder in den lymphatischen Geweben [18, 19]. Ferner können bösartige Tumore ihren Ausgangspunkt gleichfalls in den pigmentbildenden Zellen (Melanome), in den Stützzellen des Nervensystems (Gliome) oder im Binde- und Stützgewebe (u. a. Sarkome) haben [20, 21, 22].

Im Jahr 2016 wurden nach Schätzung des ZfKD in Deutschland insgesamt circa 492.000 Krebserkrankungen diagnostiziert. Hiervon traten ca. 258.500 Erkrankungen bei Männern und 233.600 Erkrankungen bei Frauen auf. Damit liegen die Fallzahlen für Krebs seit 2007 beharrlich bei etwas unter 500.000, mit relativ kleinen Abweichungen [22].

Da das Erkrankungsrisiko für das Gros der Krebsarten mit steigendem Alter zunimmt [23 - 25], ist aufgrund der steigenden Zahl älterer Menschen [26, 27] in der Bevölkerung eine stetige Zunahme zu erwarten [28]. Rechnet man diese Entwicklung mittels Altersstandardisierung heraus, so ist festzustellen, dass die Erkrankungsraten bei Männern innerhalb der letzten 10 Jahre um 12 %, bei Frauen um 1 %, zurück gegangen sind. Diese Abweichungen sind vor allem durch die geschlechtsspezifischen gegenläufigen Entwicklungen bei durch das Rauchen geförderten Krebskrankheiten bedingt [22].

Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten sind ein Maß für die Überlebenschancen von Krebspatientinnen und -patienten verglichen mit der Gesamtbevölkerung mit gleichem Alter und Geschlecht. Sie sind stark von der Tumorart abhängig und reichen von Werten unter 20 % für bösartige Tumoren der Lunge, Leber und Bauchspeicheldrüse bis hin zu Werten über 90 % für das maligne Melanom der Haut, den Hodenkrebs und den Prostatakrebs [22]. Bei vielen Krebserkrankungen ist die Ätiologie (zugrunde liegender ursächlicher Zusammenhang) unbekannt oder die bekannten Ursachen lassen sich nicht beeinflussen. Präventive Verfahren gibt es daher bis dato nur für bestimmte Tumorarten [22, 29 - 31].

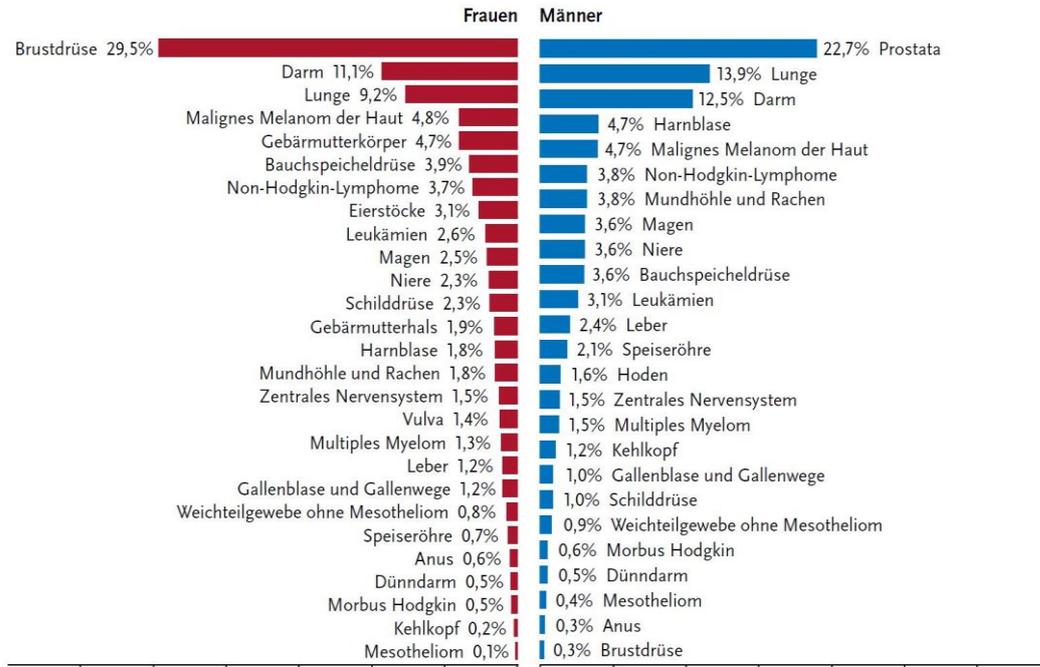


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs. [22]

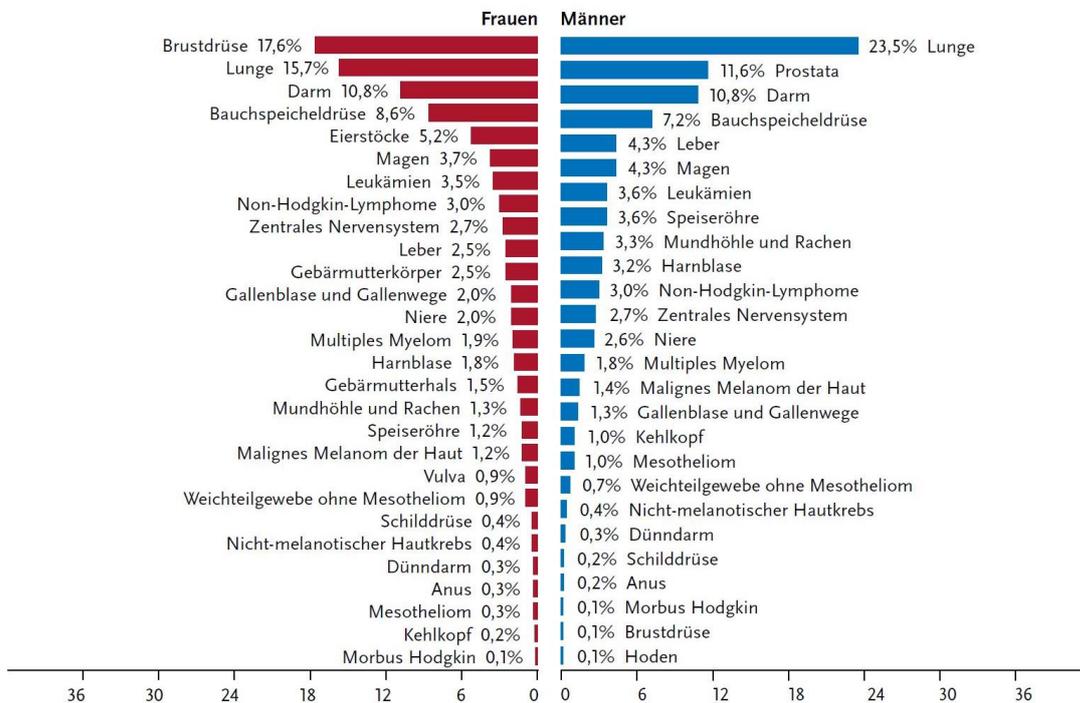


Abbildung 2: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2016. [22]

Zu den urologischen Tumorerkrankungen gehören die Blasenkarzinome und Nierenkarzinome sowie die Karzinome von Prostata, Hoden und Penis beim Mann [22]. Das Nierenzellkarzinom (NZK) zählt zu den eher seltenen Tumorerkrankungen, mit einem Anteil von 2,3 % Neuerkrankungen bei Frauen bzw. 3,8 % Neuerkrankungen bei Männern, gemessen an der Gesamtheit aller jährlich erfassten Krebsneuerkrankungen in Deutschland [22]. Nichtsdestotrotz beläuft sich die geschätzte Zahl der Personen, die jedes Jahr weltweit am Nierenkarzinom erkranken, auf mehrere Hunderttausend (>338.000 im Jahr 2012 und + 22% bis zum Jahr 2020) [32].

Maligne Neubildungen der Niere können in verschiedenen Geweben entstehen. Von allen Nierentumoren in Erwachsenen kommen die Nierenzellkarzinome mit einem Anteil von knapp 96 % am häufigsten vor. Bei Kindern sind diese seltener, bei ihnen überwiegen die Nephroblastome (Wilms-Tumoren). In Deutschland wurden im Jahr 2016 etwa 14.640 Neuerkrankungen gezählt, Männer waren fast doppelt so häufig betroffen wie Frauen [22]. Das NZK ist gekennzeichnet durch unterschiedliche histologische Subtypen. Diese werden durch die Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation 2016 beschrieben [33]. Unter den malignen Tumoren macht das klarzellige NZK etwa 75 % der Nierenzellkarzinome aus. Die restlichen 20–25 % der NZKs sind nicht-klarzellige NZKs, wie zum Beispiel chromophobe NZKs, Karzinome des Sammelrohres, Translokations-assoziierte Nierenzellkarzinome, medulläre Nierenkarzinome und andere, sehr seltene, aber zuweilen auch sehr aggressive NZKs. Diese Formen können erblich sein oder sporadisch auftreten [34, 35]. Zu den Markern für das NZK zählen VHL (Von-Hippel-Lindau Syndrom), vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF) und Carboanhydrase 9 (CA9) [36, 37]. Allerdings fehlt ein aussagekräftiger, prognostischer Marker für das NZK bis heute. Bisher gibt es keine zuverlässigen löslichen Marker, die im Blut oder Urin nachgewiesen werden können. Eine präzise Diagnose ist ein wichtiges Werkzeug in der effektiven Behandlung dieser Krankheit. Daher müssen komplexere Strategien zur Früherkennung oder sogar Vorhersage von NZK entwickelt werden.

Blasenkrebs ist ein Karzinom der Urothel- oder „Schirmzellen“, die das Lumen der Harnblase auskleiden. Urothelkarzinome können aber auch im oberen Harntrakt (Nierenbecken und Harnleiter) und in der proximalen Harnröhre auftreten. Blasenkarzinome machen etwa 90 bis 95 % der Urothelkarzinome aus. Histologisch umfassen Blasenkarzinome 75 % rein urotheliale Karzinome und 25 % solche mit abweichender Histologie, was die Behandlung dieser Erkrankung komplexer macht [38]. Beim Blasenkrebs handelt es sich überwiegend um Karzinome des Urothels, die häufig an verschiedenen Orten der Blase und abführenden Harnwege gemeinsam auftreten [22]. Derzeit sind zudem weltweit schätzungsweise 500 000

Neuerkrankungen und 200 000 Todesfälle auf Blasenkrebs zurückzuführen. Dabei beträgt das Lebenszeitrisiko für Blasenkrebs bei Männern ca. 1,1 % und bei Frauen 0,27 %. Mehr als 1,6 Millionen Menschen, weltweit, leben mit dieser Krankheit [39].

Während einige Urin-Biomarker von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zugelassen sind und bei ausgewählten Patienten nützliche therapeutische Zusatzstoffe sind, fehlt allen die diagnostische Genauigkeit, die erforderlich ist, um die Zystoskopie zu ersetzen [40]. Gemäß den Leitlinien der *European Association of Urology* (EAU) gibt es keine ausreichenden Beweise für die Verwendung von TMB (*tumour mutational burden*), molekularen Subtypen, Immun- oder anderen Genexpressionssignaturen für die Behandlung von Patienten mit Urothelkarzinomen [41].

Ein verbessertes Verständnis der Molekularbiologie und Genetik von Blasenkarzinomen hat die Art und Weise, wie lokalisierte und fortgeschrittene Erkrankungen diagnostiziert und behandelt werden, weiterentwickelt. Während die Immunstimulation über BCG (*Bacillus-Calmette-Guérin* = ruft in der Blase örtliche Entzündung hervor) die tragende Säule der Therapie von nicht-muskelinvasivem Blasenkarzinomen mit mittlerem und hohem Risiko ist, wurden die therapeutischen Optionen für muskelinvasive und fortgeschrittene Erkrankungen um Immuntherapie mit Checkpoint-Hemmung, anderen zielgerichteten Therapien und Antikörper-Wirkstoff-Konjugate erweitert [23].

2.2 Liquid Biopsies

Trotz erheblicher Fortschritte in der Diagnostik fehlen geeignete Methoden zur Früherkennung von Krebserkrankungen. Die Früherkennung von Tumorerkrankungen ist jedoch einer der vielversprechendsten Ansätze zur Verbesserung der Therapieergebnisse in Kombination mit einer individuellen Prognosebewertung zur Verbesserung der Therapieauswahl [42 - 47]. In diesem Zusammenhang gewinnen Biomarker im klinischen Management zunehmend an Bedeutung [48 - 50].

Die Flüssigbiopsie stellt eine weniger invasive Methode zur Beobachtung der Entwicklung von Karzinomen dar. Sie hat sich als Kandidat für den Ersatz einer invasiven Gewebebiopsie herausgestellt. Prinzipiell ermöglicht sie eine häufigere und genauere Probenahme von Tumorpatienten, mit dem klaren Ziel, auf lange Sicht die Präzisionsmedizin für jeden Einzelnen zu ermöglichen [51, 52].

Zirkulierende Tumorzellen (*CTCs*, englisch: *circulating tumor cells*), extrazelluläre Vesikel (*EVs*) und zirkulierende Tumor-DNA (*ctDNA*) sind die gängigen, frei beweglichen Biomarker, die aus einer Flüssigbiopsie entnommen und analysiert werden können. *CTCs* sind Krebszellen, die von Tumoren (primäre und/ oder Metastasen) in das Gefäßsystem abgegeben werden. *EVs* sind Vesikel in Nanometergröße, einschließlich Exosomen und

Mikrovesikeln, die durch ihre molekulare Fracht (Proteine, mRNA, microRNAs (miRNAs) und DNA) eine wichtige Rolle in der interzellulären Kommunikation spielen. Die ctDNA ist eine, tumorbedingt, kurze, zersplitterte Form der DNA, die ebenfalls in den Blutkreislauf abgegeben wird und tumorbedingte genetische Veränderungen aufweist. Jeder dieser zirkulierenden Biomarker hat einzigartige Eigenschaften, die möglicherweise das Krebsmanagement unterstützen könnten. Viele Studien haben gezeigt, dass Flüssigbiopsien helfen können, die Krebsdiagnose und -prognose sowie die Therapieüberwachung von Krebs der verschiedensten Entitäten zu verbessern [53 - 61].

Insbesondere flüssige Biopsien aus Blut und Urin stellen eine vielversprechende Quelle für Biomarker dar, da sie das komplexe Spektrum von Tumorzellen, und Veränderungen der Mikroumgebung in einem Gewebe, im Vergleich zu Tumorgewebebiopsien widerspiegeln. Dieser minimalinvasive Ansatz stellt einen weiteren wichtigen Vorteil dar, der mehrere Analysen während des Krankheitsverlaufs ermöglicht [62 - 64].

Um einen effizienten klinischen Einsatz zu erreichen, muss noch an der Standardisierung von sowohl präanalytischen als auch analytischen Verfahren geforscht und die Probennahme von Flüssigbiopsiekomponenten (z.B. DNA oder EVs) für alle harmonisiert oder standardisiert werden. Das Spektrum der Standardisierung in präanalytischen Verfahren umfasst die Wahl der Blutentnahmeröhrchen, die Zeit zwischen Blutentnahme und Plasmagewinnung, das Verfahren der Verarbeitung der Primärproben sowie die Verfahren zur Gewinnung/ Isolierung von Flüssigbiopsiekomponenten. Standardprozeduren sollten auch für ihre Charakterisierung und Quantifizierung validiert werden. Darüber hinaus sollte die Standardisierung den Fokus auch auf die Maximierung der Ausbeute der Flüssigbiopsien setzen. Wie oben erwähnt, könnte die Flüssigbiopsie die Charakterisierung der Krebsheterogenität (Tumoren und Metastasen) und ihre Entwicklung besser darstellen. Allerdings sind zusätzlich große klinische Validierungsstudien ebenfalls obligatorisch, um die Effizienz der verschiedenen gefundenen Marker in Flüssigbiopsien (einschließlich Exosomen, ctDNA oder CTC) zu bewerten und zu zeigen, dass es dadurch Vorteile für den Patienten in der klinischen Praxis gibt [62].

Damit eignen sich Flüssigbiopsien im NZK schlussendlich mehr für das *Follow-Up* und weniger für das *Screening*.

2.3 Die Rolle von Exosomen in der Tumorforschung

Zellen regulieren sich selbst (Homöostase), im Gewebe auch untereinander (zellübergreifend). Dies geschieht über regulatorische Netzwerke und Botenstoffe/Signalmoleküle auf verschiedenen molekularen Ebenen (DNA, RNAs, Proteine).

Extrazelluläre Vesikel (u. a. Exosomen) stellen einen Weg der intra- und interzellulären Kommunikation sowie Regulation dar. Diese Vesikel spielen eine bedeutende Rolle für Tumorprogression und Metastasierung. Erstmals beschrieben wurden Extrazelluläre Vesikel (EVs) bereits 1946 als prokoagulierende, von Blutplättchen abgeleitete, Partikel in Plasma [65]. Mehr als 20 Jahre später, in den 1960er Jahren, wurden sie als „Blutplättchenstaub“ bezeichnet und beschrieben [66].

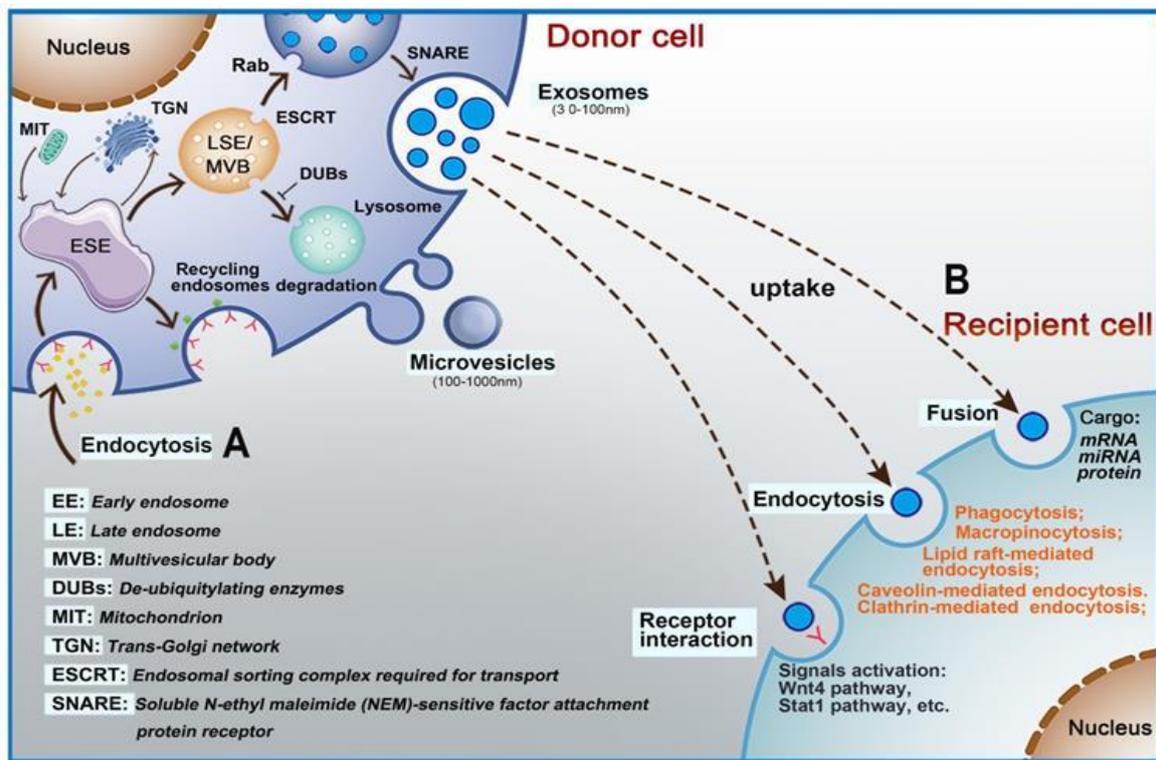


Abbildung 3: Intrazelluläre Biogenese und Sekretion extrazellulärer Vesikel. A: Der Prozess der Exosomenbildung beginnt mit frühsortierenden Endosomen (ESE), die durch Endozytose auf der Oberfläche von Plasmamembranen gebildet werden. Anschließend reift ESE zu einem späten Endosom (LSE)/multivesikulären Körper (MVB) und Exosomen werden durch Fusion von MVBs in den extrazellulären Raum freigesetzt. B: Exosomen interagieren mit Zielzellen über Rezeptoren, Fusion mit Plasmamembran, Endozytose oder Freisetzung ihrer Fracht. ESE= *early sorting endosome*; LSE= *late sorting endosome*; MVB= *multivesicular body*. [67]

Extrazelluläre Vesikel (EVs) stellen eine neue mutmaßliche Klasse von Biomarkern aus flüssigen Biopsien dar. Diese EVs mit einem Durchmesser von 30–5000 nm werden hauptsächlich in große (d. H. Mikrovesikel) und kleine EVs (d. H. Exosomen) unterteilt. Zu den spezifischen Markern für IEVs (*large extracellular vesicles*) zählen TOMM20, RPS7. Zu den spezifischen Markern für sEVs (*small extracellular vesicles*) zählen ADAM10, Syntenin-1, Alix und Tetraspanine. Solche extrazellulären Vesikel lassen sich in zahlreiche Subpopulationen unterteilen. So konnten sogenannte „Mitovesikel“ als Subpopulation mit mitochondrialen Proteinen bereits beschrieben werden [68]. Im Gegensatz zu den größeren Mikrovesikeln werden Exosomen mit einer charakteristischen Größe von 30–150 nm von fast allen Zellen prozessiert und aktiv sekretiert. Sie sind nicht nur an physiologischen Prozessen beteiligt,

sondern auch an der Tumorentwicklung und -progression. Denn Tumorzellen weisen Veränderungen auf, welche sich unter anderem in abweichenden Expressionsmustern bestimmter (tumorassoziierter) Proteine zeigen, und sich auch in deren Exosomen wiederfinden. Die molekularen Eigenschaften von EVs spiegeln zumindest teilweise die Biologie ihrer Elternzellen wider und machen sie somit zu einer vielversprechenden Quelle für Biomarker aus flüssigen Biopsien [69 – 79].

Um die Nomenklatur in dieser Arbeit zu vereinheitlichen, wird der Begriff „EVs“ für alle Arten von Vesikeln endosomalen Ursprungs, also auch für Exosomen, verwendet.

2.3.1 Funktion

Extrazelluläre Vesikel, insbesondere Exosomen, werden von nahezu allen Zelltypen abgegeben und aufgenommen und sind in allen Körperflüssigkeiten und -geweben zu finden [80]. Mit ihrer molekularbiologischen Fracht in ihrem Lumen sowie den membrangebundenen Molekülen können sie dort, wo sie in Kontakt mit anderen Zellen treten, oder von ihnen aufgenommen werden, zu einer zellulären Reaktion führen. EVs spielen somit eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell-Kommunikation und der Zellhomöostase (siehe Abbildung 4). So können durch EVs metabolische Programme, Interaktionen mit dem Immunsystem, Reparaturmechanismen oder die Regulierung der Genexpression gesteuert werden. Körperflüssigkeiten, wie zum Beispiel Sperma, Fruchtwasser, Blut und Muttermilch enthalten Exosomen mit, mutmaßlich, bedeutenden Funktionen [81].

Da auch Tumorzellen über das komplette genetische Repertoire verfügen, können sie sich unter anderem diese Funktionen von EVs zu Nutze machen, um zum Beispiel die Tumormikroumgebung zu kontrollieren, die Angiogenese für die Versorgung des eigenen Tumorgewebes zu fördern oder die Metastasierung zu fördern und metastatische Nischen vorzubereiten [82].

Da Exosomen so reich an verschiedenen Arten von molekularbiologischen Strukturen sind, sind sie prädestiniert als minimalinvasive Biomarker für die Früherkennung, Diagnose und Prognose verschiedener Krebsarten, sofern sich geeignete Techniken und Verfahren für deren Isolation und Charakterisierung etablieren.

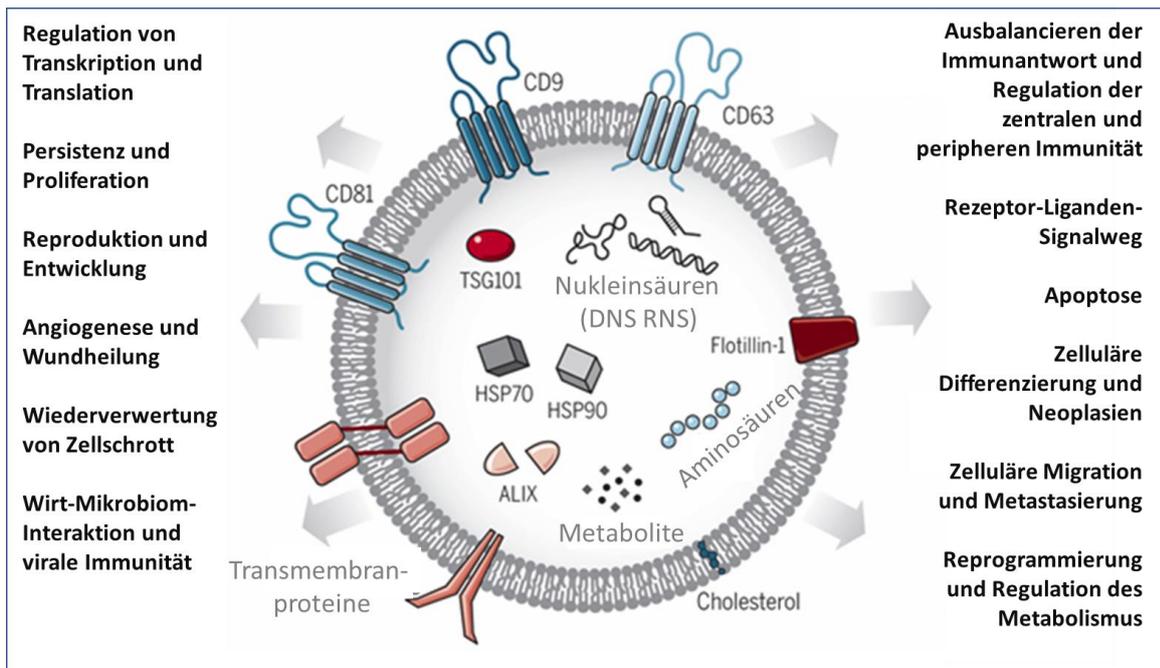


Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines Exosomes, sowie umrahmend die möglichen Funktionen und Effekte auf andere Zellen. Adaptiert von Kalluri und LeBleu (2020). Quelle [80]

2.3.2 Techniken zur Isolation und Charakterisierung

Aufgrund ihrer geringen Größe und der oft sehr heterogenen Zusammensetzung biologischer Flüssigkeiten bedarf es spezieller Techniken, um Exosomen spezifisch aus diesen zu isolieren und nachfolgend zu charakterisieren. Diese Techniken müssen imstande sein, spezifisch solche Partikel zu isolieren, die die morphologischen und molekularbiologischen Kriterien von Exosomen erfüllen.

Zu diesen Methoden zählen vor allem Ultrazentrifugation, Ultrafiltration, Affinitätsreaktionen mit Antikörpern und magnetischen Partikeln, massenspektrometrische Verfahren, Größenausschlusschromatografie, Dialyse mit hydrostatischer Filtration, Präzipitation und Mikrofluidik [82].

Das Sedimentieren kleinster Partikel durch differentielle Zentrifugation bis hin zur Ultrazentrifugation galt lange Zeit als Goldstandard für die Gewinnung von Exosomen [83]. Doch gerade für die Methode der Ultrazentrifugation gilt, dass sich im Isolat neben Exosomen auch Lipoproteine, lösliche Proteine, und extrazelluläre Partikel, die von nicht-endosomalen Wegen stammen, befinden können [84, 85]. Und vor allem können abhängig von Rotortyp, Höhe der Zentrifugalkräfte, Zentrifugationszeiten und der Wahl von Dichtegradienten die Exosomenausbeute erheblich schwanken sowie die Reinheit der Exosomenisolate beeinflusst werden [86].

Nach wie vor stehen sich zwei Prinzipien, physikalische und biochemische, konträr gegenüber. Durch Isolationsverfahren die nach physikalischen Kenngrößen, wie Größe oder Dichte der

Partikel, Vesikel isolieren (z.B. Größenausschlusschromatografie, Ultrazentrifugation), werden zwar weniger Subpopulationen diskriminiert, dafür aber oft unerwünschte Partikel ko-isoliert [87]. Im Falle von biochemischen Verfahren, z.B. durch Antikörper, verhält es sich genau andersrum. Hier werden extrazelluläre Partikel hochspezifisch selektiert, und Partikel, die zwar über ähnliche morphologische Eigenschaften verfügen, aber nicht der Klassifikation von EVs entsprechen [88], aussortiert. Allerdings decken diese Verfahren nur einen Teil der EV-Subpopulationen ab, denn der Anteil an isolierten EV-Subpopulationen gemessen an der Gesamtpopulation, hängt von der Wahl und Zahl der verwendeten Antikörper, oder der Effektivität des Isolations-Kits, ab [89 - 91].

Bei Präzipitationsfällungen kann unter Umständen beides auftreten – die Ko-Isolation unerwünschter Partikel und der Verlust von Subpopulationen [59, 78, 92].

Bewährt hat sich eine Kombination verschiedener Methoden zur Isolation, basierend auf wiederholten Zentrifugations- und Filtrationsschritten, gefolgt von einem abschließenden Ultrazentrifugationsschritt, in dem die Exosomen pelletiert werden, sowie verschiedener Methoden zur Charakterisierung der exosomalen Morphologie und des Proteingehaltes, einschließlich Elektronenmikroskopie, Durchflusszytometrie und Western Blot. Exosomen können auch aus verschiedenen Körperflüssigkeiten wie Plasma isoliert werden, indem das gleiche Verfahren wie für Zellkulturmedien verwendet wird. Bei hochviskosen Flüssigkeiten kann es erforderlich sein, die Probe vor dem Zentrifugations- und Filtrationsschritt mit PBS zu verdünnen, die Zentrifugalkraft zu steigern, die Dauer der Ultrazentrifugation zu erhöhen und die Probe mit einem Saccharose-Gradienten weiter aufzureinigen [93].

Im komplexen Aufbau von Gewebe liegt wiederum die Herausforderung, die Gewebeproben so zu behandeln, dass nicht durch äussere Einflüsse während des Isolationsprozesses vesikelartige Strukturen entstehen oder Vesikel freigesetzt werden, die das Ergebnis verfälschen. Das Verfahren umfasst einen milden extrazellulären Matrixverdau des Gewebes, eine Reihe von Filtrations- und Zentrifugationsschritten zur Reinigung, und einen Iodixanol-basierten hochauflösenden Dichtestufengradienten oder einen auf Saccharose basierenden Gradienten. Diese Technik ermöglicht quantitative, hochgradig reproduzierbare Untersuchungen von EV-Subtypen, einschließlich Subpopulationen von Mikrovesikeln, Exosomen und Mitovesikeln [94].

Es bleibt also die Herausforderung, die bewährten Techniken sinnvoll zu kombinieren, zu optimieren und an die wissenschaftlichen Fragestellungen anzupassen. Die zu etablierenden Verfahren sollen am Ende spezifisch, aber gleichzeitig möglichst diskriminierungsfrei gegenüber Exosomen-Subpopulationen sein. Eine qualitativ hochwertige Isolierungsmethode für Exosomen, gekoppelt mit der Charakterisierung dieser Exosomen, ist hierbei entscheidend,

um Exosomen von sonstigen Vesikeln und Partikeln abzugrenzen. Zielführend in dieser Arbeit ist die Verwendung von Oberflächenmolekülen als Biomarker, um eine spezifische Selektion von Exosomen zu ermöglichen.

2.3.3 Mikrovesikel / Extrazelluläre Vesikel als Biomarker

Biomarker werden häufig als Diagnoseinstrumente, Plattformen für personalisierte Medizin und Ersatzendpunkte für die klinische Forschung eingesetzt [95]. Exosomen erfüllen die Eigenschaften von Biomarkern, weil sie in leicht zugänglichen Körperflüssigkeiten wie Blut und Urin freigesetzt werden und den Status der freisetzenden Zelle abbilden [96]. Damit Exosomen als Biomarker fungieren, müssen diese Marker enthalten, die dazu geeignet sind objektive, quantifizierbare und reproduzierbare Messungen im medizinischen Kontext anzustellen.

Solche Marker für bestimmte Exosomen zu identifizieren ist Voraussetzung dafür, große Mengen reiner und spezifischer Exosomen aus Mischungen verschiedener Vesikeltypen in einem großen Lösungsvolumen zu isolieren. Und dies wiederum ist notwendig, um die Eigenschaften dieser Exosomen auf allen Ebenen (DNA, RNA, Proteine) so gut zu charakterisieren, dass man das diagnostische und therapeutische Potenzial auch vollständig ausschöpfen kann [97]. Aufgrund ihres zellulären Ursprungs und der auf ihrer Oberfläche vorhandenen Proteine/ Lipide/ Rezeptoren, sind Exosomen ideale Kandidaten für die Verwendung als Biomarker. In klinischen Studien liegen die meisten Anwendungen von Exosomen bisher in ihrer Funktion als Biomarker [98] und weniger in der Nutzung als therapeutisches Mittel.

Zahlreiche Arbeiten weisen darauf hin, dass Exosomen als Biomarker für die Diagnose und Prognose bösartiger Tumore, und anderer Krankheiten, verwendet werden können. Eine Reihe von Veröffentlichungen beschreibt den Zusammenhang von Exosomen mit verschiedenen Krebsarten. Zu den aussagekräftigsten, diagnostischen Molekülen in und auf Exosomen zählen exosomale Proteine und RNAs [96]. Doch schon die Konzentration von zirkulierenden Exosomen kann ein diagnostischer Parameter sein und die Funktion eines Biomarkers erfüllen. Denn es konnte schon nachgewiesen werden, dass sich Konzentration und Herkunft mit dem Fortschreiten des Krankheitsverlaufes ändern [99]. Exosomen kommen häufiger in Körperflüssigkeiten vor als zirkulierende Tumorzellen, sind außerdem unter physiologischen Bedingungen sehr stabil und bestehen aus Molekülen, die tumor-spezifisch sein können. Die Moleküle, aus denen sich Exosomen zusammensetzen, und die als Biomarker geeignet sein könnten, lassen sich in vier Gruppen unterteilen. Das sind die Nukleinsäuren (DNA, mRNA, nicht-kodierende RNAs), Lipide (Cholesterol, Phospholipide),

lösliche Proteine (Enzyme, Signalproteine, Proteine des Zytoskelettes) und Oberflächenproteine (Transmembranproteine, Adhäsionsmoleküle, Rezeptoren) [100].

Für die Bedeutung der Exosomen-Proteomik und der Erforschung der krankheitsassoziierten Protein-Biomarker für neurodegenerative, neuropsychiatrische und andere Erkrankungen gibt es schon valide Hinweise [101]. Für die Verbesserung der Behandlung von Tumoren der Niere ist dieser Ansatz innovativ und vielversprechend. Bisher fehlen noch diagnostische Biomarker für Nierenzellkarzinome (NZK), die für Flüssigbiopsien geeignet sind, obwohl vielversprechende Daten veröffentlicht wurden, die auf ihr diagnostisches Potenzial hinweisen. Diese Studien zu EVs konzentrieren sich hauptsächlich auf microRNAs (miRNAs) und Proteine in Serum und Urin [102]. Exosomen können möglicherweise als diagnostisches Mittel Krankheiten im Frühstadium erkennen, da das Exosom verschiedene Protein-Biomarker trägt, die mit einer bestimmten Krankheit assoziiert sind. Daher ist es ein vielversprechender Ansatz, EVs und deren tumorspezifischen Oberflächenproteine näher zu untersuchen, mit dem Ziel diagnostische Biomarker für NZKs zu klassifizieren.

2.4 Tumorspezifische Marker für Exosomen

Aufgrund ihrer leichten Zugänglichkeit, Stabilität und tumorspezifischen Moleküle haben EVs großes Potenzial als diagnostische und prognostische Biomarker [103]. Andererseits ist die Nutzung von EVs als Träger oder als Impfstoff gegen Tumore auch eine attraktive Strategie für die Karzinombehandlung. Aufgrund ihrer Stabilität in Körperflüssigkeiten, Tropismus zu bestimmten Organen und minimalen Nebenwirkungen können EVs erfolgreich Antikrebsmoleküle transportieren, um Krebszellen anzugreifen – eine neuartige Strategie für die Krebsbehandlung als zellfreie Antikrebsimpfstoffe [104].

Im Allgemeinen muss man berücksichtigen, dass von Tumoren abgeleitete Exosomen nur einen bestimmten Teil der Exosomen in Blut und Urin darstellen, zusätzlich zu denen, die von verschiedenen Organen und Zellen sekretiert werden. Daher könnten Anreicherungstechniken für Tumorexosomen über tumor- oder zelltypspezifische Marker ihre diagnostische Genauigkeit erhöhen [102]. Somit stellt die Möglichkeit, von Tumorzellen in Plasma/ Serum produzierte EVs zu isolieren und zu erforschen, eine wichtige Gelegenheit für die Entschlüsselung dieser Mechanismen und die Entdeckung von Biomarkern dar. Die Rolle von EVs bei der therapeutischen Resistenz von fortgeschrittenem Prostatakrebs und deren Verwendung als Biomarker zur Vorhersage von Resistenzen wurde schon beschrieben [105]. Exosomale miRNAs (exomiRs) sind als Biomarker für die Tumorentwicklung und -progression vielversprechend [106]. Von Gewebe abgeleitete sEVs (*small extracellular vesicles* = Exosomen) enthalten prognostische proteomische Signaturen [107]. Neben den Nukleinsäuren eignen sich also insbesondere die Proteine, die sich in der Membran der

Vesikel befinden, als potenzielle Biomarker, sofern diese nachweislich tumorspezifisch oder tumorassoziiert sind.

2.4.1 Bisher verwendete Biomarker: EpCAM

Das *Epithelial cell adhesion molecule* (EpCAM) ist ein ungefähr 40 Kilodalton (kDa) großes, Transmembran-Glykoprotein Typ I. Das menschliche EPCAM-Gen befindet sich auf dem Chromosom 2 (2p21) und hat eine geschätzte Größe von 14 Kilobasen (kb) [108]. EpCAM spielt eine herausragende Rolle bei Bildung interzellulärer Adhäsionen, Aufrechterhaltung der epithelialen Integrität des Magen-Darm-Trakts und Förderung des epithelialen Phänotyps über verschiedene Gewebetypen hinweg. Embryologische Studien zeigen, dass EpCAM eine wichtige Rolle bei der epithelialen Organentwicklung und Plazentabildung spielt [109].

Zusätzlich zu seiner Rolle in gesundem Gewebe spielt EpCAM eine herausragende Rolle in der Krebsbiologie und war das erste humane tumorassoziierte Antigen, das mit monoklonalen Antikörper identifiziert wurde [110]. Nachfolgende Studien haben gezeigt, dass EpCAM häufig und stark auf der Zelloberfläche vieler epithelialer Krebsarten exprimiert wird, mit der höchsten Expression bei Adenokarzinomen der Bauchspeicheldrüse, des Dickdarms und der Prostata [111]. EpCAM hat zahlreiche verschiedene Funktionen, die wichtige Auswirkungen auf die Krebsinitiierung haben. Dazu zählen die Progression und die Mechanismen die den Transfer vom Epithel zum Mesenchym (EMT= epithelialer-mesenchymaler Transfer). Bei Krebs ist EMT ein komplexer Prozess, bei dem epitheliale Krebszellen Schlüsselmerkmale verändern und einen mesenchymalen Phänotyp annehmen, der die Zellmotilität ermöglicht, und so Invasion und Metastasierung fördert [112].

Das Epithelzelladhäsionsmolekül (EpCAM) dient darüber hinaus als weiterer Marker und fand auch bei NZK-Patienten Einsatz [108, 113]. EpCAM ist ein Epithelzellmarker, jedoch kein tumorspezifischer Zellmarker, und wird sogar bei aggressiven, dedifferenzierten Tumoren (einschließlich NZK) herunterreguliert [114].

2.4.2 Potenzielle tumorspezifische Marker

Wie bereits beschrieben lassen sich Markerproteine, wie zum Beispiel EpCAM oder PSMA, nicht auf beliebig viele Tumorentitäten anwenden, oder sind gar nur auf eine Entität beschränkt.

Daher haben wir Carboanhydrase 9 (CA9), CD70 und CD147 als vielversprechende tumorspezifische Marker auf Exosomen im NZK ausgewählt, da schon gezeigt wurde, dass diese während der Tumorentwicklung und des Fortschreitens im klarzelligen NZK hochreguliert sind [115 – 118]. Nachfolgend werden diese Proteine näher beschrieben, und ihre Bedeutung in der menschlichen Physiologie und Pathologie näher betrachtet.

2.4.2.1 CD70

CD70 (CD27L) ist ein Typ-II-Transmembran-Glykoprotein [119] und wird überwiegend auf aktivierten Lymphozyten exprimiert [120, 121]. Seine immunologische Bedeutung liegt in der Vermittlung von Signalen zwischen B- und T-Zellen, und damit dem Aufbau und Kontrolle einer Immunantwort [122 - 124].

Menschliches CD70 besteht aus 193 Aminosäuren, mit einer extrazellulären Bindungsdomäne, einem Transmembransegment und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne und zwei potenziellen N-verknüpften Glykosylierungsstellen, einer Molekülmasse von 50 kDa (als Homotrimer) [125, 126]. CD70 ist membrangebunden, Spaltprodukte wurden bis dato nicht beschrieben.

CD70 bindet an seinen einzigartigen Rezeptor, CD27, ein Transmembranglykoprotein der TNFR-Superfamilie vom Typ I mit etwa 55 kDa, das als Homodimer mit einer Disulfidbrücke exprimiert wird, die zwei Monomerketten verbindet [127, 128]. In vielen Studien konnte festgestellt werden, dass für die Ausbildung einer Immunantwort eine effiziente zelluläre Interaktion zwischen CD70 und CD27, also eine aktivierte CD70-CD27-Wechselwirkung, nötig ist [129, 130].

Dabei interagiert CD70 mit CD27 und moduliert die Immunantwort durch gezielte Stimulation des Antigenrezeptors und des *Toll-like*-Rezeptors auf T-Zellen, B-Zellen, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen [131, 132]. Zusätzlich zu seiner allgemeinen Immunregulationsfunktion scheint es an der Entstehung des klarzelligem NZK (auch *ccRCC*) - beteiligt zu sein, da festgestellt wurde, dass es im Vergleich zu normalem Nierengewebe hochreguliert ist [133].

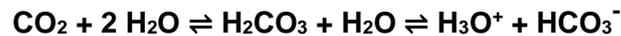
Bei der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) sind Anti-CD70-Antikörper (Cusatuzumab) in Kombination mit weiteren antikörperbasierten Therapeutika zur Anwendung gekommen, mit vielversprechenden Ergebnissen [134]. Bisher wurden solche Mono- und Kombinationstherapien hauptsächlich bei AML erforscht, aber auch andere Tumorarten könnten von diesem Ansatz profitieren. Der Fokus sollte dabei nicht nur auf CD70 allein, sondern auch auf die CD70-CD27-Achse gelegt werden. Dies kann neue Einblicke in die Mechanismen und Wirkungen von CD70 liefern und vielversprechende, neue therapeutische Ansätze im Bereich der allgemeinen Onkologie eröffnen [135].

Der aktuelle Forschungsstand zur Rolle von CD70 bei verschiedenen Tumorarten macht dieses Protein zu einem attraktiven Ziel für die antikörperbasierte Immuntherapie [136, 137]. Ansätze zur Erforschung und Behandlung von Autoimmun- und weiteren Entzündungserkrankungen existieren [138 - 140], werden aber hier nicht weiter behandelt. Der

Fokus in dieser Arbeit liegt in der weiteren Erforschung der Rolle von CD70 bei menschlichen Krebserkrankungen, insbesondere in Verbindung mit extrazellulären Vesikeln.

2.4.2.2 CA9

CA9 ist ein Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 54 und 58 kDa. Es kommt in der Zellmembran und dem Zellkern vor und zählt zu den Carboanhydrasen [141 - 143], welche die folgende Reaktion katalysieren [144, 145]:



Diese reversible Reaktion des Kohlendioxids (CO_2) mit Wasser (H_2O) zu Oxonium (H_3O^+) und Hydrogencarbonat/ Bicarbonat (HCO_3^-), tritt abhängig von den äußeren physikalischen Bedingungen (Gasdruck, Temperatur, etc.) automatisch ein und wird durch die katalytische Wirkung der CA-Enzyme begünstigt.

CAs sind Enzyme des menschlichen Stoffwechsels und an zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt [146]. Im Blut ist es innerhalb von Erythrozyten für die Erhöhung der Effizienz der Umwandlung von Kohlendioxid in Bicarbonat und Oxonium verantwortlich [144, 145] und im Magen ist es intrazellulär in den Belegzellen verortet, wo es, mithilfe der Reaktion von CO_2 , H_2O und Bicarbonat, an der Produktion der Salzsäure beteiligt ist [147, 148].

In der Niere fördert CA9 den Austausch von H^+ gegen Na^+ , welches in das Lumen des Tubulussystems sezerniert wird, und dort mit HCO_3^- Kohlensäure bildet. Die Kohlensäure wird am Bürstensaum der Tubuluszellen durch die Carboanhydrase in der beschriebenen Reaktion zu H_2O und CO_2 gespalten. Das Kohlendioxid diffundiert passiv in das Zytoplasma der Zelle [149].

CA9 zeigt Veränderungen im Tumormetabolismus und in der Säure- / Base-Regulation, wodurch das Tumorwachstum und die Metastasierung gefördert werden [150, 151]. Die Säure- / Base-Homöostase in Krebszellen wird durch das konzertierte Zusammenspiel von Carboanhydrasen (CAs) und verschiedenen Transportproteinen gesteuert. CA9 ist aufgrund seiner katalytischen Funktion an der Migration und Invasion von Krebszellen beteiligt. Da CA9 fast ausschließlich in Krebszellen exprimiert wird, könnte es als vielversprechender Biomarker und therapeutisches Ziel fungieren [152]. Der Nutzen von CA9 zur Diagnose von primärem und metastasiertem klarzelligem NZK wurde bereits demonstriert [153 - 155]. In der Therapie von Karzinomen findet die spezifische Inhibition von CA9 durch Carboanhydrasehemmer (z.B. Acetazolamid, Methazolamid, Diclofenamid) Anwendung [156 - 158].

Da CA9 als Schlüsselement für den zellulären Energiemetabolismus, vor allem den von Tumoren, gilt, ist es als Zielprotein (Therapeutikum) zur Unterdrückung der Tumorprogression und als prognostischer Marker in der Urologie von Bedeutung. So konnte schon nachgewiesen werden, dass CA9 als Ziel für die Bildgebung mit dem radioaktiv markierten Anti-CA9-Antikörper Girentuximab die Nachbeobachtung (*Follow-up*) unterstützt [159]. Dieser Ansatz wurde bereits klinisch erfolgreich getestet und kann prinzipiell zur intraoperativen Führung der NZK-Resektion verwendet werden [160]. Eine dosisabhängige Reaktion auf die Hemmung des Tumorwachstums durch humanisierte CA9-Antikörper, dessen therapeutische Wirksamkeit und Verträglichkeit wurde nachgewiesen. Die Ergebnisse demonstrieren das therapeutische Potenzial der CA9-zielgerichteten Therapie bei Nierenzellkarzinomen [161].

2.4.2.3 CD147

CD147, auch bekannt als Basigin, oder EMMPRIN (extrazellulärer Matrix-Metalloproteinase-Induktor), ist ein Glykoprotein mit vielseitigen funktionellen Eigenschaften. Es ist Mitglied der Immunglobulin-Superfamilien und auf dem Chromosom 19 lokalisiert [162, 163], hat ein Molekulargewicht von 28 kDa bzw. 43 – 66 kDa. Das Molekulargewicht ist abhängig vom Glykosylierungsgrad und der Quartärstruktur (Monomer oder Dimer) [164 - 168].

Es interagiert mit Ubiquitin C, bildet Komplexe mit MCTs (*monocarboxylate transporters*) und formt mit Lectin den EMT*-Suppressor-Komplex (EMT = epithelial-mesenchymale Transition) [163, 169 - 175].

CD147 ist für den Austausch von Laktat zwischen Zellen unverzichtbar, wirkt als Zelladhäsionsmolekül, induziert Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und beeinflusst damit unter anderem die Angiogenese. Daher ist es an mehreren tumorunterstützenden Prozessen beteiligt, darunter Matrixdegeneration, Tumorzellinvasion, Metastasierung und Angiogenese [176 - 178]. Die Expression von CD147 hat somit einen erheblichen Einfluss auf die zelluläre Kontrolle der Glykosylierung und der Induktion von Proteinase [179 - 181]. Die hochregulierte Expression von CD147 führt zu einer veränderten Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) und des basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktors (bFGF), zur Zellproliferation und zur Invasivität von NZK-Zellen [182].

Für das Prostatakarzinom konnte schon gezeigt werden, dass die Dysregulation der CD147-Expression die Invasivität von Prostataepithelzellen steigert und damit Überlebensprognose erheblich verschlechtert [175, 183].

Um geeignete tumorspezifische exosomale Marker im klarzelligen NZK zu identifizieren, wurde die Expression dieser potenziellen Biomarker auf Exosomen urologischer Tumor-Zelllinien und primären, vom Patienten stammenden Tumorgeweben sowie Plasmaproben, untersucht.

2.5 Methodenetablierung an biologischen Systemen: Von der Zellkultur über Gewebeanalysen hin zu *liquid biopsies* aus Blutplasma

Zellen sind der Ausgangspunkt von Partikeln, die in Flüssigkeiten zu finden sind und sich in Form, Größe und Zusammensetzung zum Teil stark voneinander unterscheiden (siehe Abbildung 5) [184].

Etablierte Zelllinien von Nierenzell-, Blasen- und Prostatakarzinomen dienen als Modellsystem für Untersuchungen von Proteinexpression, Exosomensekretion sowie der Etablierung und Validierung verschiedener Isolationsmethoden *in vitro*. Die Zellkultur ist dabei ein etabliertes Modellsystem zur Untersuchung der Physiologie und Biochemie gesunder und kranker Zellen. Oftmals lassen sich die gewonnenen Erkenntnisse *in vivo*, also zum Beispiel in Blut oder Gewebe höherer Lebewesen, reproduzieren. Im Gegensatz zur Arbeit mit komplexen Modellorganismen ist sie kostengünstiger und einfacher durchzuführen. Diese Zelllinien gibt es in den verschiedensten Ausführungen. So existieren Zelllinien von diversen Tumortypen der Blase, Niere, Prostata, die die Tumorheterogenität sowie die Tumorstadien gut abbilden. Das, die Zellen umgebende, Medium wird durch diese konditioniert und mit EVs angereichert, die das von ihrer Elternzelle abgeleitete charakteristische Proteinprofil aufweisen sollten. Dieses *in vitro* Modell lässt sich potenziell auf Gewebe übertragen, wenn zum Beispiel die Proteinexpression zuerst in Nierenzellkarzinomzelllinien und dann in Gewebeproben von primären Nierenzellkarzinomen charakterisiert wird. An diesen Schritt, dem Transfer von *in vitro* nach *in vivo*, folgt konsequenterweise die Analyse von Blutproben dieser Tumorpatienten [185 - 187].

Die Schwierigkeit, Blutproben als EV-Quelle zu nutzen, liegt darin, dass EVs, die vom Tumor oder dem gesunden Organ in das Gefäßsystem gelangen, stark verdünnt werden und noch mit vielen anderen Zellbestandteilen zusammen im Blut vorkommen. Die große Vielfalt an Partikelformen führt zu verschiedenen Reinheitsgraden für EVs, abhängig von der Herkunft. So steigt beim Wechsel von *in-vitro*-Versuchen zu *in-vivo*-Versuchen die Zahl der nicht gewünschten Partikel, in diesem Zusammenhang dann auch Kontamination genannt, sehr stark an. Ursächlich dafür ist eine große Zahl verschiedenster Zellen, die das sie umgebende Milieu mit solchen Partikeln anreichert. Zu diesen Partikeln zählen EVs (Exosomen, Mikrovesikel, Apoptotische Körper, etc.) und Nicht-EV-Partikel (HDL= *high density lipoproteins*; LDL= *low density lipoproteins*, IDL= *intermediate density lipoprotein*; VLDL= *very*

low density lipoprotein, etc.). So landen vom Gewebe ausgehend zwischen 10^7 bis zu 10^9 Mal mehr Nicht-EV-Partikel mit einem Durchmesser von weniger als $2\ \mu\text{m}$ im Blut als EVs [184]. EVs kommen also zum Einen in geringer Konzentration und zum Anderen gemeinsam mit einer großen Anzahl an Kontaminanten in Gewebe sowie Blut vor. Um dieses Dilemma zu lösen, benötigt es eine Anreicherungsmethode damit gezielt spezifische EVs gewonnen werden können.

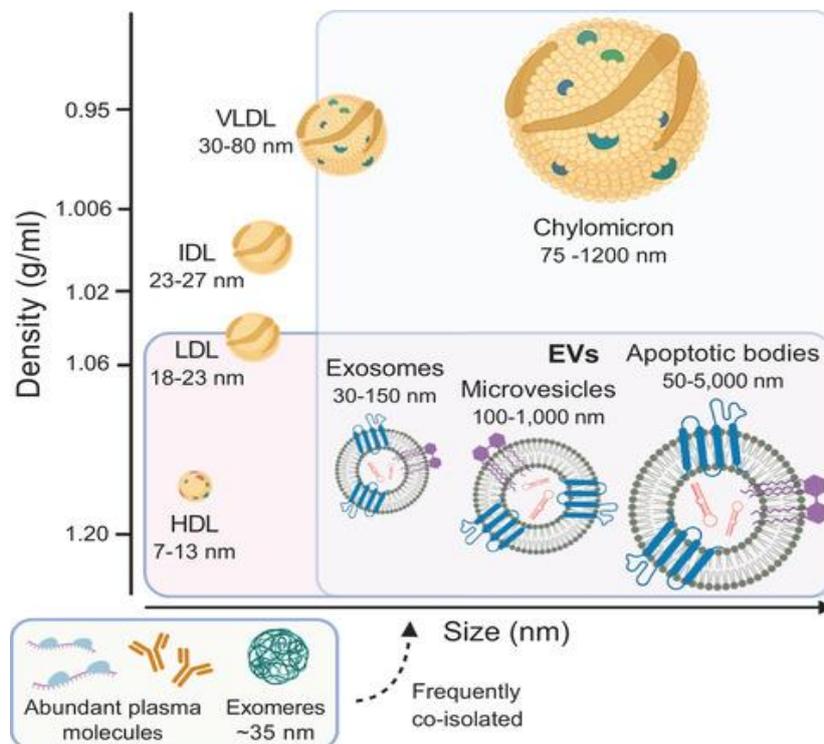


Abbildung 5: Schematische Darstellung verschiedener, sphärischer, Partikel zellulären Ursprungs. HDL= *high density lipoproteins*; LDL= *low density lipoproteins*, IDL= *intermediate density Lipoprotein*; VLDL= *very low density lipoprotein*; EV= *extracellular vesicle*. Quelle [184]

2.5.1 Anreicherung von Exosomen über magnetische *Beads*

Um der zum Teil geringen und schwankenden Konzentration von Exosomen in Flüssigbiopsien zu begegnen, empfiehlt sich der Einsatz eines Anreicherungsverfahrens. Dafür bietet sich ein System mit (magnetischen) *Beads* als zentraler Komponente an. Die Vorteile von magnetischen *Beads* liegen in der schnellen Durchführung der Wasch-/ Elutionsschritte, der hohen Reinheit und der hohen Ausbeute (siehe Kapitel 3.5.). Exosomen lassen sich so innerhalb weniger Minuten, und ohne biochemische Veränderungen oder Denaturierungen, aus wässriger Lösung extrahieren [188].

Diese Art der Anreicherung beruht auf biochemischen und biophysikalischen Grundprinzipien (siehe Kapitel 3.5.1). Dabei binden die Exosomen an die in Lösung applizierten *Beads*. Diese

Beads werden fixiert und binden die Exosomen an sich, sodass durch ein- oder mehrfache Waschrunde nicht-exosomale Bestandteile aus der Probe entfernt werden. Hernach liegen die Exosomen in hoher Reinheit und Konzentration vor.

Die Bindung der Exosomen an die *Beads* kann über verschiedenartige Schritte geschehen: Über die negative Ladung ihrer Oberfläche können Exosomen an magnetischen Kügelchen, die mit einem polykationischen Polymer beschichtet sind, anhaften [189]. Antikörperbeschichtete *Beads*, die mit Exosomenmembranmarkern wie CD9, CD63, ALIX und dem Epithelzelladhäsionsmolekül (EpCAM), gekoppelt sind, können Exosomen mittels Antikörper-Antigen-Interaktionen binden [190]. Durch eine Beschichtung mit Aldehyd/Sulfat-Latex absorbieren Latexkügelchen Exosomen. Diese passive Form der Bindung von Exosomen ist kostengünstig und reversibel. Exosomen lassen sich leicht aus der Lösung zurückgewinnen. Jedoch umfasst diese Methode zahlreiche Zentrifugationsschritte und ist nicht leicht reproduzierbar [191]. Letztlich können auch die Unterschiede der spezifischen Wechselwirkungen zwischen Rezeptoren und Liganden und anderen physikalischen Eigenschaften von Exosomen und *Beads* zur Anreicherung genutzt werden [192, 193].

Die Lösung der abgefangenen Exosomen von den *Beads* kann ebenfalls auf verschiedene Art und Weise erfolgen. Werden 2-Nitrobenzylgruppen als photospaltbare Linker verwendet, um CD63-Aptamere auf magnetischen *Beads* zu verankern, so lassen sich diese Verbindungen mit Lichtimpulsen spalten und so die Exosomen freisetzen [194]. Über spezielle Biotin-Streptavidin-Verbindungen lassen sich biotinylierte Antikörper gegen exosomale Oberflächenproteine auf mit Streptavidin beladenen *Beads* verankern. Diese Biotin-Streptavidin-Bindungen lassen sich über Proteasen wieder spalten [195, 196]. Wegen der Beschaffenheit der *Beads* (siehe Abbildung 6) lassen sich Exosomen-*Bead*-Komplexe auch analysieren, ohne dass die Exosomen abgespalten und von den *Beads* separiert werden müssen. Bei der Untersuchung der Proteinexpression ist nicht zu erwarten, dass es zur Beeinträchtigung der Messergebnisse durch die *Beads* kommt [197].

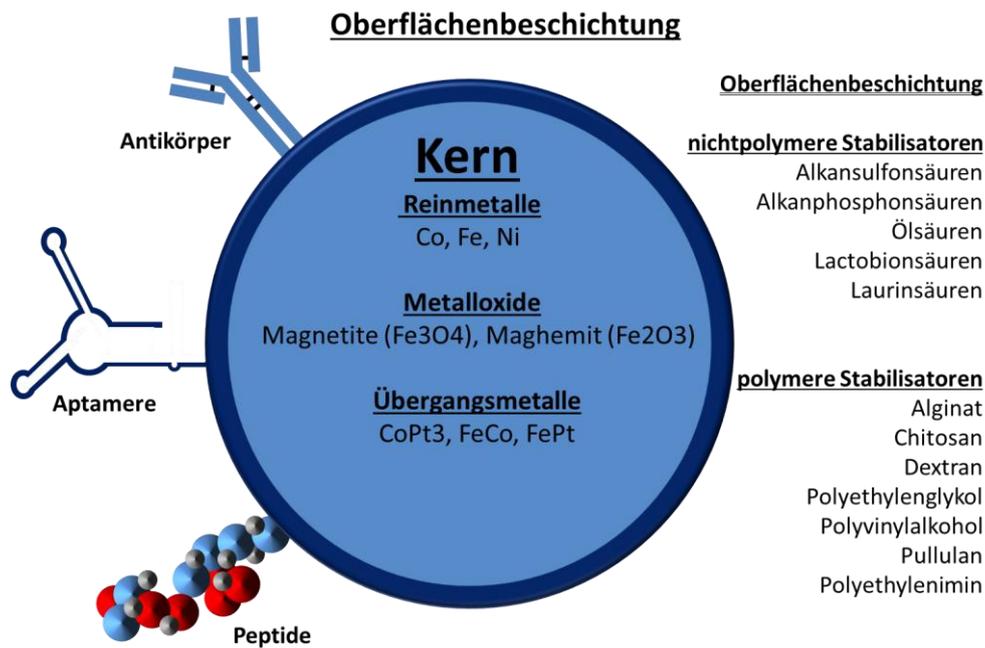


Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines magnetischen Beads (modifiziert nach Modh und Scheper (2018) [198]).

Dieses Anreicherungsverfahren unterliegt einigen Limitationen, die es zu erwähnen und zu beachten gilt. Eine Diskriminierung von EV-Subpopulationen kann grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden. Die Methode ist nicht standardisiert, was allerdings dringend geboten ist, da Inkubationszeit, Temperatur, Grad der Expression von Oberflächenmarkern, Konzentration des Zustands der Zielvesikel, Eigenschaften der Antikörper-Antigen-Wechselwirkung, Probentyp, Konzentration und Verhältnis von Kügelchen und Zielmolekülen variable Parameter sind, die einen erheblichen Einfluss auf das Endergebnis haben [198, 199].

Das Anreicherungsverfahren mit antikörpergekoppelten, magnetischen *Beads* soll in dieser Arbeit zur Anwendung kommen und an Flüssigbiopsien erprobt werden. Damit soll der Nachteil der geringen Konzentration von tumorösen Exosomen entgegengewirkt werden. Es soll die Grundlage für eine zukünftige klinische Anwendung bilden.

Die Verwendung solcher *Beads* wurde schon hinreichend an Exosomen verschiedener Entitäten und biologischer Quellen getestet. Über die Kopplung von Antikörpern gegen exosomale oder tumorale Oberflächenproteine lassen sich gezielt Populationen von Exosomen aus Blut- oder Urinproben gewinnen. So erhält man über diese Methode nicht nur eine ausreichende Konzentration zur weiteren Charakterisierung, sondern auch eine hohe Reinheit [200 – 203].

2.5.2 Charakterisierung von exosomalen Oberflächenproteinen via Nanochips

Die eingangs beschriebenen Eigenschaften von Exosomen machen diese extrazellulären Vesikel zur Quelle von zukünftigen Diagnoseinstrumenten, vorausgesetzt, dass die molekulare Beschaffenheit sehr genau und präzise charakterisiert werden kann. Dazu müssen Methoden und Techniken verwandt werden, die möglichst viele Exosomen, mit größtmöglicher Reinheit, sowie geringem Zeit- und Kostenaufwand, aus Flüssigkeitsbiospien extrahieren und analysieren können. Diese Methoden und Techniken müssen außerdem standardisiert werden können, damit sie sich im klinischen Umfeld leicht einsetzen lassen.

Bei den sogenannten „Nanochips“ bilden starre Oberflächen mit begrenzter räumlicher Ausdehnung die Basis, auf der alle Prozesse und Reaktionen ablaufen. Dabei sind nicht die Chips selbst in ihrer Ausdehnung auf den Nanometerbereich beschränkt. Es sind vielmehr die untersuchten Partikel und Moleküle, die in diesem Größenspektrum anzutreffen sind. Die Funktion umfasst im Wesentlichen die Fixierung und die drauf folgende Analyse von Exosomen. Das Grundprinzip beruht darauf, dass Exosomen auf der Oberfläche spezifisch gebunden, sowie ungewollte und unerwünschte Elemente entfernt werden. Die gebundenen Exosomen können dann mittels verschiedenster Methoden analysiert werden [204, 205].

Zu den Methoden mit sehr hoher Auflösung bis in den niedrigen Nanometerbereich zählen Fluoreszenzmessungen, Raman-Spektroskopie, Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Verfahren, Kolorimetrie (mit Gold-Nanopartikeln oder Enzym-H₂O₂-TMB-Wechselwirkung), Elektrochemische Methoden (amperometrische, voltametrische und Feldeffekttransistorbasierte Detektion). Solche Exosomen-Biosensoren, integriert auf Plattformen mit effizienten Isolations- und Analysemethoden, und in einem standardisierten Verfahren, bieten eine schnelle Reaktion, eine niedrige Nachweisgrenze und eine hohe Empfindlichkeit. Damit eröffnen sich potenzielle Ansätze für eine patientennahe Labordiagnostik [206 - 208]. Für die Fixierung können sich verschiedenste Oberflächenmerkmale von Exosomen, wie Proteine, Lipide oder allgemein die Hydrophobizität exosomaler Oberflächen, zunutze gemacht werden. Der Nachweis der gebundenen Exosomen erfolgt dann direkt oder indirekt [209 - 211]. Ein Standardverfahren zum Minimieren, Integrieren, Automatisieren und Skalieren biochemischer Prozesse kann durch eine mikrofluidische Plattform erreicht werden. Diese Systeme werden schon seit mehr als dreißig Jahren erforscht [212].

Die Verwendung von Nanomaterialien bilden die Grundlage für solche Plattformen. Sie ermöglichen die hocheffiziente Fixierung von Exosomen und eine nachgeschaltete Analyse auf ein und derselben Plattform. Versuche in diesem Rahmen werden so kostengünstig, skalierbar, zeitsparend und leicht reproduzierbar. Vorausgesetzt man optimiert die Spezifität

und Effizienz der exosomenbindenden Elemente, lassen sich sogar Interferenzpartikel (Mikrovesikel, Proteine etc.) gezielt diskriminieren [213]. Solche Nachteile in Sachen Effizienz und Spezifität begleiten viele Methoden, die sich durch einen ansonsten hohen Gehalt an Exosomen auszeichnen [214]. Der Zeit- und Kostenfaktor spielt vor allem in der Entwicklung einer auf Exosomen basierenden klinischen Diagnose und Behandlung von Tumoren eine zentrale Rolle, denn für diese ist eine schnelle Analyse und ein großer Probendurchsatz notwendig [213].

Die Entwicklung innovativer hochauflösender Technologien, wie zum Beispiel Antikörperbeschichteter Chips zuzüglich hochauflösender Optiken und leistungsstarker Software, ermöglicht eine zeit- und ressourcenschonende Charakterisierung von Exosomen, bei gleichzeitig hoher Quantität und Qualität. Die Kombination von *capturing antibodies* zum Rausfischen von Exosomen aus wässrigen Lösungen, dynamischer Lichtstreuung, fluoreszenz-markierter *detection antibodies*, sowie hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht es Subpopulationen von Exosomen und Kollokationen von Proteinen nachzuweisen, sowie hochauflösend darzustellen [215 – 218]. Diese Art der Charakterisierung von exosomalen Oberflächenproteinen via Nanochips soll in dieser Arbeit zur Anwendung kommen.

2.6 Hypothesen und Zielsetzung

Tumorzellen lassen sich durch ihren veränderten Metabolismus und ihre dysregulierten molekularen Netzwerke über die Proteinexpression oder andere organischen Moleküle (z.B. Nukleinsäuren) identifizieren. Diese spezifischen Eigenschaften, und die Unterschiede, die sich im Vergleich zu normalen Zellen beobachten lassen, bilden einen grundlegenden Ansatz für die Diagnose von Tumoren. Um diese Unterschiede möglichst früh, und möglichst schonend *in-vivo* feststellen zu können, müssen diese Biomarker, die für die Unterscheidung von Tumorzellen von Normalzellen taugen, leicht zugänglich sein. Extrazelluläre Vesikel, insbesondere Exosomen, haben sich diesbezüglich in der Forschung als prädestiniert erwiesen, da sie nachweislich vom Tumorgewebe abgegeben werden und somit in diversen Körperflüssigkeiten (Blut, Urin etc.) nachweisbar sind. Solche Exosomenpopulationen lassen sich mittels Flüssigbiopsien entnehmen und analysieren. Tumorexosomen unterscheiden sich in ihrer Zahl und molekularen Eigenschaften von Exosomen aus gesunden Zellen. Die Unterschiede in der Oberflächenstruktur (Oberflächenproteine, aber auch Lipid-Zusammensetzung) erlauben es, Exosomen gezielt aus Körperflüssigkeiten (Blut, Urin) anzureichern und zu analysieren.

Im Vergleich zu anderen Entitäten ist das *Follow-Up*, also die Nachsorge im Rahmen einer Tumorthherapie, verbesserungswürdig. Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit ist somit mögliche Kandidaten exosomaler Biomarker, die spezifisch für urologische Tumore (z.B. Nierenzellkarzinome, Harnblasenkarzinome, Prostatakarzinom) sind, zu testen. Der Hauptfokus liegt dabei auf dem klarzelligen Nierenzellkarzinom. Im Rahmen der Arbeit sollen deshalb folgende Aufgabenstellungen bearbeitet werden:

1. Testen geeigneter Markerproteine auf Tumorexosomen
2. Transfer vom Modellsystem auf humanen Gewebe- und Flüssigbiopsien
3. Entwicklung eines Anreicherungs- und Analysesystems

Diese Ziele stehen in Verbindung mit der Beantwortung wissenschaftlicher Fragestellungen:

- A) Lassen sich spezifische Markerproteine auf Exosomen nachweisen, die dazu geeignet sind, Tumorexosomen von Exosomen gesunder Zellen zu unterscheiden?
- B) Ist das gewählte Isolationsverfahren geeignet, Exosomen aus Gewebeproben von Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom zu gewinnen?
- C) Lassen sich Exosomen anhand dieser Biomarker gezielt aus Blut(-plasma) isolieren?
- D) Ist die Entwicklung und Etablierung eines selektiven Anreicherungsverfahrens der Exosomen mittels spezifischer Markerproteine im NZK möglich?

Zur Beantwortung der Fragen und dem Erreichen der Ziele sollen zunächst Exosomen aus Zellkulturüberständen isoliert und charakterisiert werden. Als Exosomenquelle dienen dabei Zelllinien von Nieren-, Harnblasen- und Prostatakarzinomen. Im weiteren Schritt soll das Untersuchungsspektrum auf Gewebe, und später auf humane Blutplasmaproben, erweitert, und die Ergebnisse mit denen aus der Zellkultur verglichen werden. Letztendlich sollen die Ergebnisse aus den Zellkulturexperimenten an Blut- oder Urinproben von Patienten mit diagnostiziertem Nierenzellkarzinom validiert werden.

Die Analysen der Expression von Tumormarkern auf Exosomen im Blutplasma sollen den Grundstein für die diagnostische Nutzung von Tumorexosomen legen.

Für die Isolation werden verschiedene Techniken, wie zum Beispiel Ultrazentrifugation oder Kitsysteme, verwendet und miteinander verglichen. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf dem Nachweis der Spezifität und Reinheit der isolierten Exosomen. Diese soll es ermöglichen, geeignete Marker auf Exosomen, die von urologischen Tumoren stammen, zu selektieren. Dazu werden im Vorfeld bekannte, zelluläre Oberflächenmarker ausgewählt und ihr Vorhandensein auf Exosomen der untersuchten Tumorarten untersucht. Nach dieser Analyse erfolgt die Entwicklung und Etablierung eines selektiven Anreicherungsverfahrens der Exosomen am

Beispiel des klarzelligen Nierenzellkarzinoms. Diese Anreicherungsverfahren ist notwendig, da Exosomen im Blut, im Vergleich zu der Vielzahl an organischen Molekülen und Partikeln, in einer sehr geringen Konzentration vorkommen. Unter diesen Exosomen müssen dann noch jene Subpopulationen selektiert werden, die als Biomarker geeignet sind.

Für eine verbesserte, präzise Charakterisierung von Exosomen, hinsichtlich ihrer Oberflächenmarker, wurde, nach sorgfältiger Prüfung, die hochauflösende Nano-Chip-Technik (Nanoview Bioscience) verwendet. Diese Technik hat das Potenzial, die Koexpression bestimmter Biomarker auf verschiedenen Subpopulationen von Exosomen aus unterschiedlichen biologischen Proben in hoher Auflösung und in kurzer Zeit nachzuweisen. Damit wäre es möglich, sowohl einen hohen Probendurchsatz von größeren Patientenkohorten mit verschiedenen Proteinmarkern zu testen, was der Grundlagenforschung sehr dienlich wäre, als auch einzelne Patientenproben mit verschiedenen Proteinmarkern zu analysieren, was der Individualdiagnostik einen großen Vorschub leisten würde.

Die Identifizierung von potenziellen, hochspezifischen Markern, soll die Entwicklung von minimal-invasiver, oder nicht-invasiver, Diagnostik, über eine erfolgreiche Selektion und Anreicherung von tumorspezifischen Exosomen, ermöglichen. Die Tumorexosomen sollen nicht nur quantifiziert werden, sondern in Zukunft auch qualitativ hinsichtlich ihrer molekularen Zusammensetzung, vor allem ihrer RNA-Moleküle (miRNAs oder mRNAs) und Proteine untersucht werden. Dies alles soll die Prognosebewertung und Therapieprädiktion im Kontext sogenannter „*liquid biopsies*“ erlauben.

Durch den Einsatz von Exosomen und innovativer Analyseverfahren wird erwartet, dass eine spezifischere und sensitivere Untersuchung von humanen Flüssigbiopsien möglich ist, als dies bisher durch die Analyse von nicht-zellgebundene Nukleinsäuren, sogenannter freier RNA, oder von zirkulierenden Tumorzellen der Fall ist.

3. Material und Methodik

Einzelne Protokolle und Methodiken wurden bereits publiziert [278].

3.1 Patientenproben

Das humane Probenmaterial stammte von Patienten, die ihre Gewebe- und Blutproben der Klinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums des Saarlandes zur Verfügung gestellt haben. Von allen Patienten lag eine schriftliche Einverständniserklärung über die Verwendung dieser Proben zu wissenschaftlichen Zwecken vor. Die Verwendung erfolgte im Rahmen der ethischen Richtlinien der Helsinki-Vereinbarung (Votum Nr. 141/14). Diese Datenbank enthielt alle für diese Arbeit notwendigen klinischen Daten, insbesondere die TNM-Klassifikation und die Histologie des Tumors (siehe Tabelle 1). Gewebeproben von Primärtumoren von Patienten mit einem klarzelligem Nierenzellkarzinom (NZK) wurden direkt nach der Operation aus den Tumoren bzw. Nierenpräparaten gewonnen und bei -80 °C trocken eingefroren, oder für die immunhistochemischen Analysen in Formaldehyd fixiert sowie in Paraffin eingebettet. Die verwendeten Plasmaproben stammten von peripheren Blutproben. Dieses Vollblut wurde nach der Entnahme in EDTA-Reaktionsgefäße überführt, drei bis fünf Mal invertiert, für 10 Minuten bei 2000 g zentrifugiert, die Plasma-Phase in ein Kryoröhrchen überführt und bis zur Verwendung bei – 80°C gelagert.

Tabelle 1: Auflistung der aus der Gewebedatenbank (*Biobanking*) entnommenen und für die Experimente verwendeten Tumor- und Normalgewebeproben (Tu / No).

NTB Nummer:	Tu / No	TNM:	Typ:
NTB 1304	Tu	pT3bN0MX	klarzellig
NTB 1302	Tu	pT3aNXXMX	klarzellig
NTB 1302	No		klarzellig
NTB 1288	Tu	pT3aNXXMX	klarzellig
NTB 1272	Tu	pT1bNXXMX	klarzellig
NTB 1233	No	pT3aNXXMX	klarzellig
NTB 1208	Tu	pT4NXcM1	klarzellig
NTB 1197	Tu	pT1bNXXMX	klarzellig (vorher Osteosarkom)
NTB 1194	Tu	pT3aNXcM1	klarzellig
NTB 1175	Tu	pT3a	klarzellig
NTB 1175	No		klarzellig
NTB 1161	Tu	pT1bNXXMX	klarzellig
NTB 1161	No		klarzellig
NTB 1160	Tu	pT1a	klarzellig
NTB 1132	Tu	pT1bNXXMX	klarzellig
NTB 1126	Tu	pT3aNXXMX	klarzellig
NTB 1126	No		klarzellig
NTB 1125	TU	pT1bNXM1	klarzellig (G1 u.G3)

3.2 Zellkulturtechniken

Bei den angewendeten Zellkulturtechniken handelte es sich um bereits etablierte, validierte und im Forschungslabor der Urologie des Universitätsklinikum Homburg standardmäßig durchgeführte Techniken.

3.2.1 Eingesetzte Zelllinien

Fünf NZK-Zelllinien (786-O, Caki1, Caki2, RCC53, RCC26), drei muskelinvasive Blasenkarzinomzelllinien (J82, 253J-BV, T24) und zwei Prostatazelllinien (LnCAP, C4-2) wurden in entsprechenden Medien (Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium [DMEM], Roswell Park Memorial Institute-1640-Medium [RPMI], DMEM / RPMI (1: 1) Sigma-Aldrich) kultiviert. Jedem Medium wurde je 10% fötales Kälberserum (FKS, Sigma-Aldrich) zugesetzt. Die humane Brustkrebszelllinie MCF7 diente als positive Kontrolle. Die zelllinienspezifischen Charakteristika und Komponenten sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit zelllinienspezifischen Medien, unter Zugabe von 10 % fetalem Kälberserum (FKS) und 5 % CO₂ bei 37 °C kultiviert.

Tabelle 2: Beschreibung der verwendeten Zelllinien und Auflistung der Nährmedien sowie deren Zusätze. FKS = fetales Kälberserum

Bezeichnung	Entität	Spezifität	Medium	FKS
786-O	Nierenkarzinom	klarzellig	DMEM/RPMI (1:1)	10 %
Caki1	Nierenkarzinom	klarzellig	RPMI	10 %
Caki2	Nierenkarzinom	klarzellig	RPMI	10 %
RCC26	Nierenkarzinom	klarzellig	DMEM	10 %
RCC53	Nierenkarzinom	klarzellig	DMEM	10 %
J82	Blasenkarzinom	invasiv	RPMI	10 %
253J-BV	Blasenkarzinom	invasiv	DMEM	10 %
T24	Blasenkarzinom	invasiv	RPMI	10 %
LnCAP	Prostatakarzinom	-	RPMI	10 %
C4-2	Prostatakarzinom	-	DMEM	10 %
MCF7	Mammakarzinom	-	DMEM	10 %

3.2.2 Konservierung und Lagerung von Zellen

Zur Konservierung der Zellen wurden die in der Zellkulturflasche gewachsenen Zellen von der Flaschenwand gelöst und anschließend kryokonserviert. Dazu wurde zunächst das Medium komplett entfernt und etwaige Reste des Mediums durch Spülen des Zellrasens mit PBS restlos entfernt. Anschließend wurden, abhängig von der Flaschengröße, unterschiedliche Volumina (25 cm² = 0,5 ml; 75 cm² = 1,5 ml) von Trypsin/EDTA [Sigma Aldrich GmbH]

appliziert und bis zum vollständigen Ablösen der Zellen bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden bis zum Ablösen, jedoch nicht länger als fünf Minuten, in Trypsin/EDTA inkubiert. Danach wurden die abgelösten und vereinzelt Zellen in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 300 g für drei Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, die Zellen in einem Gemisch aus 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) [Sigma Aldrich GmbH] und 30 % FKS resuspendiert (V = 2 ml). Diese Suspension wurde in ein 2-ml-Kryoröhrchen pipettiert und umgehend bei -80 °C, oder für die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C, eingefroren.

3.2.3 Auftauen und Kultivierung von Zellen

Zur Subkultivierung von Zellen mussten diese zunächst aus der Biobank entnommen und kontrolliert aufgetaut werden. Dazu wurden diese schnell, durch Zugabe von temperiertem Medium aufgetaut und in 5 ml Medium (inklusive 10 % FKS) resuspendiert, in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 300 g für drei Minuten zentrifugiert. Der DMSO-haltige Überstand wurde restlos verworfen und das Zellpellet in dem gewünschten Volumen Komplettmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine neue Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank gelagert. Am nächsten Tag wurde ein Medienwechsel durchgeführt. In den darauffolgenden Tagen wurde das Medium, je nach Geschwindigkeit der Zellteilung und des Zellmetabolismus, alle zwei bis drei Tage gewechselt. Bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden diese, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, abgelöst und zentrifugiert. Zum Ablösen der Zellen wurde, je nach Größe der Zellkulturflasche, ein definiertes Volumen Trypsin/EDTA (25 cm² = 0,5 ml; 75 cm² = 1,5 ml; 150 cm² = 2,5 ml; 300 cm² = 5 ml; 500 cm² = 7,5 ml) hinzugegeben. Nach der Zentrifugation und der Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet in dem gewünschten Volumen resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche mit vorgelegtem Komplettmedium überführt und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank gelagert.

3.2.4 Zellyse

Für die biochemischen Analysen der zellulären Proteinexpression mussten die Zellen pelletiert und durch Zugabe eines Lysepuffers die Zellmembran degradiert werden. Dazu wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, kultiviert, abgelöst und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in zwei ml Lysepuffer (siehe Kapitel 3.8, Tabelle 10) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 20000 g und 4 °C für 5 Minuten. Der Überstände, bzw. Klarlysate, wurden übernommen und in neue Reaktionsgefäße überführt, und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Proteinkonzentration wurde mittels des Bicinchoninsäure-Assays (Pierce™ BCA Protein Assay Kit von Thermo Fisher Scientific) nach dem Standardprotokoll des Herstellers bestimmt.

3.3 Isolation von Exosomen

3.3.1 Exosomenisolation aus Zellkulturüberständen

Die Zellen wurden zunächst wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben kultiviert. Da die verwendeten Zellen, zusätzlich zu den in den Medien enthaltenen Stoffen, noch weitere Stoffe für ihr Wachstum benötigen, wurde FKS zugesetzt. Dieses enthält neben den für ein gedeihliches Zellwachstum essenziellen Wachstumsfaktoren, Hormonen und Nährstoffen, auch Exosomen. Diese Exosomen würden alle nachfolgenden Analysen beeinflussen. Um diesen Fremdeintrag von Exosomen zu vermeiden, wurde exosomenfreies FKS hergestellt (siehe Kapitel 3.3.1.1). Dieses sogenannte ED-FKS (exosomen-depletiertes FKS) ersetzte das unbehandelte FKS. Das Medium mit ED-FKS wurde vor der Exosomenisolation den Zellen zugegeben. Die Zellen wurden wie nachfolgend beschrieben, behandelt und die Exosomen isoliert.

3.3.1.1 Produktion von exosomenfreien FKS (ED-FKS)

Handelsübliches FKS wurde steril in UZ-Röhrchen (Ultrazentrifugenröhrchen) abgefüllt und bei 4 °C und 200.000 g für mindestens 18 Stunden zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels eines 0,22-µm-Filters an der Sterilbank filtriert, aliquotiert ($V = 25 \text{ ml}$) und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3.1.2 Kultivierung und Isolationsprozess

Nach dem Auftauen und nach einigen Tage Wachstum, wurden die Zellen in 300 cm² oder 500 cm² (*Triple Flasks*) Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 40-50 % kultiviert. Dann folgte der Wechsel auf ED-Medium. Davor wurde das Normalmedium entfernt, 3-mal mit PBS gewaschen (10 ml oder 25 ml) und ED-Medium dazugegeben (30 ml oder 80 ml). Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 – 72 Stunden inkubiert. Dann wurde der Überstand abgenommen und differenziell zentrifugiert (2.000 g / 4 °C / 20 Minuten; 15.000 g / 4 °C / 30 Minuten). Die Überstände wurden jeweils übernommen und nach dem zweiten Zentrifugationsschritt weiter zur Exosomenisolierung verwendet.

Die differenzielle Zentrifugation diente der Entfernung von Zellen, Zellfragmenten und größeren Partikeln/Vesikeln. Für die Isolation von Exosomen aus den differenziell zentrifugierten Zellkulturüberständen diente die Ultrazentrifugation. Die Ultrazentrifugation erfolgte in einer Ultrazentrifuge L-80 mit dem Rotor Typ 40 Ti und 25-ml-UZ-Röhrchen (BeckmanCoulter). Die differenziell zentrifugierten Zellkulturüberstände (120 ml oder 160 ml pro Versuch und Zelllinie) wurden 90 Minuten bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die Pellets wurden in 1 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Sigma-Aldrich) gelöst und erneut 90 Minuten bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50–100 µl PBS (für NTA),

in 50-100µl 2-%-PFA-PBS (für TEM) oder Lysepuffer mit Proteaseinhibitor (für Western Blot) gelöst. Die Proteinkonzentration wurde über einen Bicinchoninsäure-Assay (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific) bestimmt. Alle Proben wurden bei -20°C in Lysepuffer / Proteaseinhibitor oder bei 4°C in PBS/2-%-PFA-PBS gelagert.

3.3.2 Exosomenisolation aus Gewebe

Die Isolierung von Exosomen aus Nierengewebe wurde gemäß eines veröffentlichten Protokolles für die Isolation von Exosomen aus Gehirngewebe [219] und für die Isolation von Exosomen aus Nierengewebe [220] durchgeführt. Diese Protokolle wurden entsprechend angepasst und optimiert, sodass daraus ein effizientes Verfahren für die Isolation von Exosomen aus Gewebe von Primärtumoren der Niere resultierte. Das Verfahren ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

Im Rahmen des Etablierungsprozesses, und zum Nachweis der dichteabhängigen Selektion von Partikeln unterschiedlicher Größe, wurde der Isolationsprozess neben dem dreischichtigen Saccharosegradient, auch mit einer einfachen, 30-%-igen Saccharoseschicht, sowie mit PBS anstatt von Saccharose, durchgeführt (siehe Abbildung 7). In allen Fällen wurde das Gewebe nach dem Auftauen enzymatisch dissoziiert und durch differenzielle Zentrifugation von größeren organischen Partikeln und Fragmenten befreit (Abbildung 7). Die so gewonnene Suspension wurde durch Ultrazentrifugation bei 100.000 g und 4 °C für 90 Minuten vorbehandelt. Anschließend erfolgte der eigentliche Isolationsprozess durch Ultrazentrifugation bei 180.000 g und 4 °C für 180 Minuten. Zuletzt erfolgte ein Waschriff mit PBS und Ultrazentrifugation bei 100.000 g und 4 °C für 90 Minuten (Abbildung 7 b und c).

Im Detail wurden circa 500 mg des Normal- oder Tumorgewebes in kleine Fragmente geschnitten. 20 mg dieser Gewebefragmente wurden mit Lysepuffer (einschließlich Phosphatase und Proteaseinhibitor) versetzt und als Lysat definiert. Das verbleibende Gewebe wurde 45 Minuten bei 37 ° C in 10 ml PBS inklusive 100 µl Kollagenase Typ III inkubiert. Anschließend wurden 720 µl Proteaseinhibitor und 180 µl Phosphataseinhibitor zugegeben und die Proben bei 300 g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und als "Homogenat" definiert. Der Überstand wurde bei 2000 g und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Das sedimentierte Pellet wurde verworfen und der Überstand

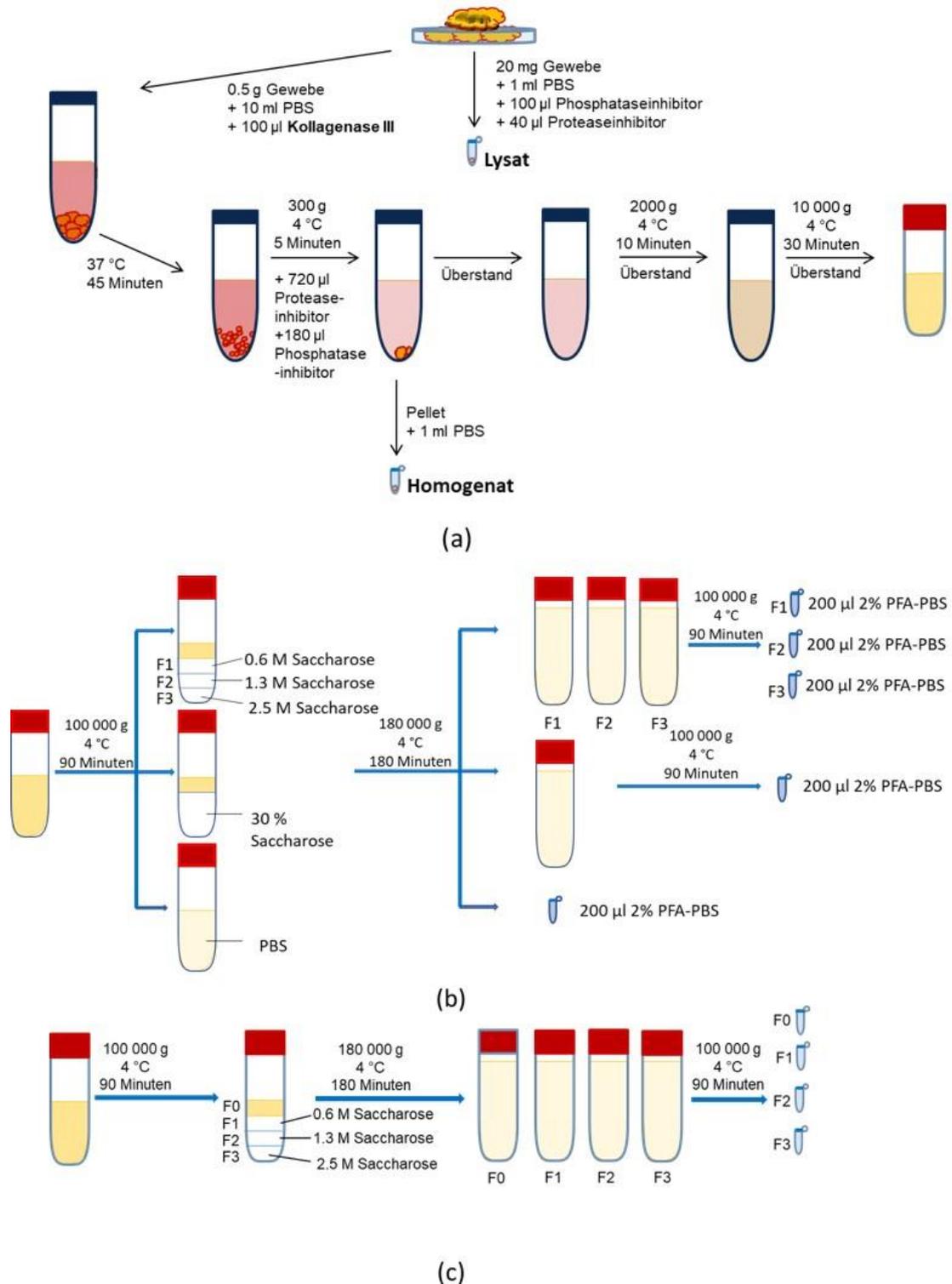


Abbildung 7: Schematischer Arbeitsablauf für die Exosomenisolierung aus primärem Nierengewebe über (a) Gewebepreparation durch Dissoziation der Zellen (Verdauung mit Typ 3-Kollagenase) und Entfernung von Zelltrümmern und größeren Fragmenten durch Differenzialzentrifugation, gefolgt von (b) Isolation und Reinigung der Exosomen mittels Ultrazentrifugation und Saccharose-Dichte-Gradienten. Aus den drei Isolationsvarianten (b) resultiert nach dem Etablierungsprozess das finale Protokoll (c).

Adaptiert und modifiziert von Himbert *et al.* [278] © Dirk Himbert (Eigenkomposition)

in einem neuen Reaktionsgefäß bei 10.000 g und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand 90 Minuten bei 4 °C mit 100.000 g zentrifugiert und das entsprechende Pellet in 6 ml PBS resuspendiert und als Fraktion 0 (= F0) definiert. Ein Saccharosegradient wurde in ein neues UZ-Röhrchen in absteigender Konzentration aufgeschichtet (F3: 2,5 M, 2 ml; F2: 1,3 M, 2 ml; F1: 0,6 M, 2 ml) und die Suspension darauf appliziert (F0: 6 ml). Die Proben wurden dann 180 Minuten bei 4 °C und 180.000 g zentrifugiert. Die Fraktionen 0 - 3 (F0, F1, F2 und F3) wurden einzeln abgenommen, in PBS gelöst, auf ein gleiches Volumen gebracht und 90 Minuten bei 4 °C mit 100.000 g zentrifugiert, um das Exosomenpellet zu waschen. Das resultierende Pellet wurde in 50–100 µl PBS (für NTA oder TEM) oder Lysepuffer (mit Proteaseinhibitorermischung) gelöst. Die Proteinkonzentration wurde unter Verwendung eines BCA-Assays bestimmt und die Proben bei -20°C in Lysepuffer / Proteaseinhibitor oder bei 4°C in PBS gelagert.

3.3.3 Exosomenisolation aus Plasma

Plasmaproben wurden aus Vollblut durch Zugabe des Chelatbildners Ethylendiamintetraazetat (EDTA), anschließender Zentrifugation bei 2000 g für 10 Minuten und Übernahme des Überstandes gewonnen. Die verwendeten Patientenproben wurden bei -80°C, die als Referenz dienenden Eigenblutproben für wenige Tage bei -20 °C, gelagert. Die Isolation der Exosomen erfolgte durch das „*Total Exosome Isolation Kit (from plasma)*“ (4484450, Fisher Scientific GmbH) nach mitgeliefertem Standardprotokoll. Kurzgefasst, es wurden 1,2 ml Blutplasma in neue Eppendorf Reaktionsgefäße überführt, für 20 Minuten bei 4 °C und 2000 g zentrifugiert, der Überstand übernommen und für 30 Minuten bei 4 °C und 15000 g zentrifugiert, der Überstand abermals übernommen und mit dem Isolationsreagenz inkubiert. Das so gewonnene Präzipitat wurde lysiert und proteinbiochemisch analysiert, oder in für Untersuchungen der intakten Exosomen in PBS gelöst. Lysate wurden bei -20 °C, Suspensionen in PBS bei 4 °C gelagert.

3.4 Charakterisierung von Exosomen

Um die Größe und Morphologie der isolierten Partikel zu analysieren, wurden die in 2%-PFA-PBS resuspendierten Proben mittels Transelektronenmikroskopie (TEM) bildlich dargestellt. Zur Quantifizierung und Größenbestimmung wurden die in PBS resuspendierten Exosomen mittels Nanotracking-Analyse (NTA) und differenzieller, dynamischer Lichtstreuung untersucht. Western Blot wurde durchgeführt, um die Proteinexpression der Zell- und Exosomenproben semiquantitativ zu bestimmen. Dabei wurden, je nach Spezifität der vorhandenen Antikörper, Konzentration der Gesamtproteinmenge im Lysat oder

Expressionslevel des untersuchten Proteins, 1 bis 20 µg Proteinmenge pro Versuch auf ein Polyacrylamidgel geladen.

3.4.1 Nano Tracking Analysis (NTA)

Ein NTA-Gerät (NanoSight LM10, NTA-Version: NTA: 3.3 Dev Build 3.3.301, Malvern Panalytical) diente zur Quantifizierung und Größenbestimmung der isolierten Partikel. Die Nanopartikel-Tracking-Analyse macht sich die Brown'sche Molekularbewegung und die Gesetzmäßigkeiten der dynamischen Lichtstreuung zunutze, um die Größe und Anzahl von Partikeln in Lösung zu bestimmen. Dazu wurden die in Flüssigkeit suspendierten Partikel, wie in Abbildung 8 schematisch dargestellt, mit einem Laserstrahl beleuchtet und das gestreute Licht mit einem Mikroskop detektiert. Die Bildverarbeitung erfolgte über eine integrierte Software. Diese verfolgte die Bewegungsbahnen der Partikel und berechnete aus der durchschnittlichen quadratischen Verschiebung z jeder Spur gemäß der Stokes-Einstein-Gleichung den entsprechenden hydrodynamischen Durchmesser d .

Die Stoke-Einstein-Gleichung beinhaltet im Nenner den Strömungskoeffizienten für kugelförmige Teilchen mit Radius r (Stokes'sche Gleichung) und im Zähler eine Abwandlung der kinetischen Gastheorie (Einstein-Gleichung). Daraus ergibt sich die Stoke-Einstein-Gleichung:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi \eta r}$$

Für die Messungen wurden die isolierten Exosomen in 100 µl PBS aufgenommen. Um eine geeignete Verteilung der Partikel zu erzielen, wurde diese Suspension 1:100, 1:500 und 1:1000 verdünnt und nacheinander in die Messkammer injiziert. Das Protokoll basierte auf den Angaben des Herstellers zur Messung von Partikeln in einer wässrigen Lösung unter Berücksichtigung des speziellen Brechungsindex von PBS.

Die Aufnahmen von drei biologischen Replikaten beinhalten je 3-5 Videos mit einer Dauer von 30 Sekunden pro Probe. Diese wurden durch die Software NTA 3.2 von Malvern ausgewertet.

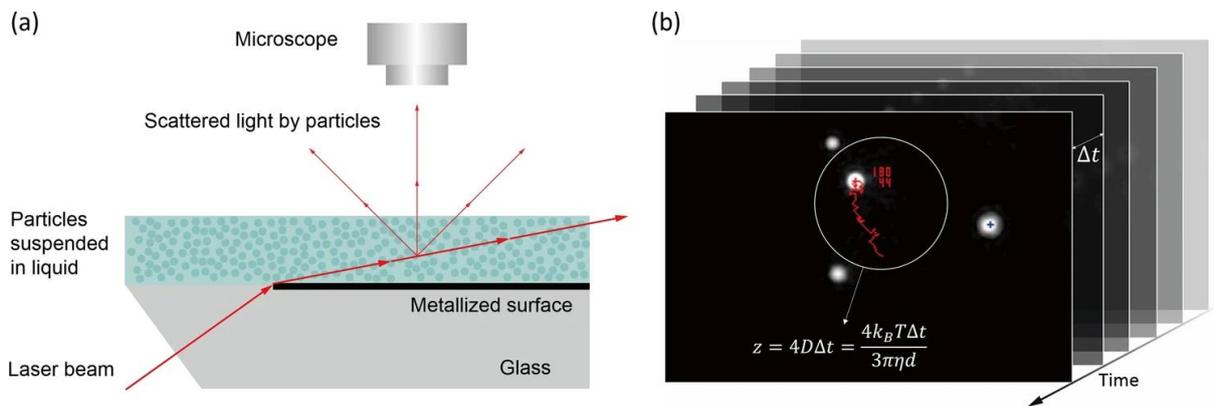


Abbildung 8: Prinzipien der Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA). a) Instrumenteller Aufbau und schematische Darstellung des Messprinzips. b) Aufzeichnung der mikroskopischen Aufnahmen über die Zeit und softwarebasierte Berechnung von Größe und Anzahl der in Lösung befindlichen Partikel. [221]

3.4.2 Transelektronenmikroskopie (TEM)

Um die Größe und Morphologie der isolierten Partikel zu analysieren, wurden diese Proben mittels eines Transelektronenmikroskops und der entsprechenden Software (FEI Tecnai 13, Hillsboro, Oregon, USA) bildlich dargestellt. Die Analyse mittels TEM diente als Qualitätskontrolle für die verschiedenen Isolationsmethoden und wurde beispielhaft in den einzelnen Versuchen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Proben vorab in 100 µl 2% -PFA-PBS fixiert. Ein Volumen von 20 µl der Probe wurde 1 Minute auf Parafilm gegeben. Ein kohlenstoffbeschichtetes Kupfergitter wurde auf den Tropfen gelegt und 30 Minuten inkubiert, gefolgt von dreimaligem Waschen mit Aquadest und anschließender Fixierung mit 1%

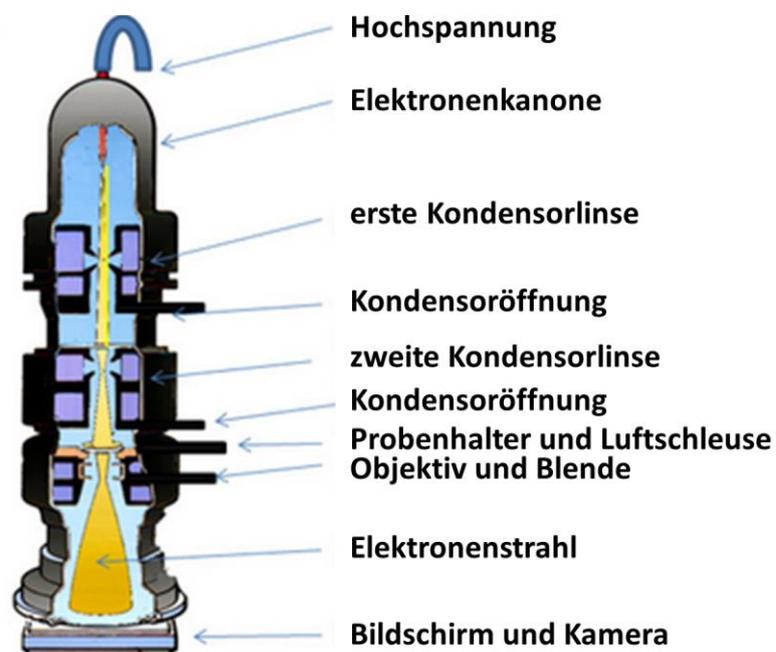


Abbildung 9: Vereinfachtes Diagramm eines Transmissionselektronenmikroskops. Modifiziert, Zeichnung von [222]

Glutaraldehyd für 5 Minuten. Das Gitter wurde dann dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und 1 Minute mit 1% Uranylacetat (pH7) kontrastiert. Nach 10 bis 15 Minuten wurde die TEM durchgeführt (Abbildung 9).

3.4.3 Western Blot

Western Blots wurde durchgeführt, um die Proteinexpression der Zell- und Exosomenproben semiquantitativ zu bestimmen. Es wurden 1 bis 20 µg Protein pro Versuch in die Tasche eines Polyacrylamidgels geladen. Die eingesetzte Proteinmenge variierte abhängig von der verfügbaren Gesamtproteinkonzentration der Probe, der Expression des untersuchten Proteins und der Spezifität der Antikörper. Die Ausbeute an Exosomen war oft sehr gering, sodass die Proben möglichst effizient eingesetzt werden mussten. Auch konnte die Expression bestimmter Proteine so gering sein, dass eine höhere Proteinmenge eingesetzt werden musste, um diese zu detektieren. Es stellte sich heraus, dass eine Menge von 3 µg Protein pro Versuch in den meisten Fällen ausreichend war. Alternativ wäre es auch möglich gewesen, bei geringer Signalintensität, die Konzentration von Primär- und Sekundärantikörpern zu erhöhen

Vor dem Western Blot wurden die Proteine aus Zellen und Exosomen mittels Lyse (siehe Kapitel 3.2.4) extrahiert und das Proteingemisch mittels Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Molekulargewicht aufgetrennt. Vor der Elektrophorese wurden die reduzierten Proteine bei 80°C für 5 Minuten thermisch denaturiert. Die Gelelektrophorese wurde 45 Minuten bei 25 mA, 200 V, 20 W durchgeführt. Dabei wanderten die negativ geladenen, denaturierten Proteine entlang des elektrischen Feldes durch ein 12,5%-iges Polyacrylamidgel Richtung Anode und wurden der Größe nach aufgetrennt. Um den Proteinbanden ein Molekulargewicht zuordnen zu können, wurde bei jedem Durchlauf separat ein Proteinstandard (Triple Color Protein Standard II, Serva) mit definierten Größenangaben in Kilodalton (kDa) in eine Geltasche geladen.

Darauffolgend wurden die in der dreidimensionalen Gelmatrix eingebetteten Proteine mittels *Semi-Dry Blot* und eines elektrischen Feldes auf eine Membran übertragen. Das halbtrockene Blotten wurde bei 100 mA, 200 V, 250 W bei Raumtemperatur für 60 Minuten mit einer Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF-Membran) durchgeführt. Die auf der PVDF-Membran fixierten Proteine konnten nun mit spezifischen Antikörpern gefärbt, und so die Proteine von Interesse analysiert werden.

Die PVDF-Membran wurde durch 60-minütige Inkubation mit einer Rinderserumalbumin-Tris-gepufferten Salzlösung, oder einer Milch-Tris-gepufferten Salzlösung, mit Tween20-Lösung (5% -BSA-TBST oder 5% -Milch-TBST) bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert, und so die noch freien Stellen auf der Membran blockiert. Dies verhinderte unspezifisches

Binden der Antikörper an der Membran. Parallel dazu wurde das Gel in Coomassieblau Brilliant Blue R Lösung (Serva) für 1 Stunde bei Raumtemperatur, oder über Nacht bei 4 °C, gefärbt. Anschließend wurde es mit Aquadest oder Entfärbelösung solange entfärbt, bis sich die Proteinbanden deutlich abzeichneten.

Zur Detektion der Proteine von Interesse wurden primären Antikörper gegen Exosomen (CD63, CD9, CD81, Syntenin, Alix), gegen zelluläre Markerproteine (GM130, Calretikulin) und gegen Tumormarker (CA9, CD147, CD70) in Kombination mit Meerrettich-Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpern verwendet. Die Inkubation der Membran mit den Primärantikörperlösungen (Tabelle 3) erfolgte auf einem Schüttler bei 4°C über Nacht.

Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper. * Radboud University Medical Center Nijmegen, Niederlande; **Cell Signaling

Antikörper (AK)	Herkunft	Molekulargewicht	Bedingungen	Verdünnung	Blocklösung und AK-Lösungsmittel	Hersteller
CD63	Hase	35-63 kDa	reduziert	1:1000	5 % Milchpulver in TBS-T	Abcam
CD9	Hase	22/24/35 kDa	reduziert	1:1000	5 % BSA in TBS-T	C.S.
CD81	Hase	22/24 kDa	reduziert	1:1000	5 % BSA in TBS-T	Abcam
CD81	Maus	22/24 kDa	reduziert	1:1000	5 % BSA in TBS-T	Abcam
Syntenin	Hase	32 kDa	reduziert	1:1000	5 % BSA in TBS-T	Abcam
Alix	Maus	95 kDa	reduziert	1:1000	5 % Milchpulver in TBS-T	NEB
GM130	Hase	130 kDa	reduziert	1:1000	5 % BSA in TBS-T	C.S.
Calretikulin	Hase	55 kDa	reduziert	1:1000	5 % BSA in TBS-T	C.S.
PD-L1	Hase	50 kDa	reduziert	1:500	5 % Milchpulver in TBS-T	C.S.
EpCAM	Hase	40 kDa	reduziert	1:1000	5 % Milchpulver in TBS-T	C.S.
GAPDH	Hase	37 kDa	reduziert	1:1000	5 % Milchpulver in TBS-T	C.S.
β-Aktin	Hase	45 kDa	reduziert	1:1000	5 % BSA in TBS-T	C.S.
CD54	Hase	89/92 kDa	reduziert	1:1000	5 % BSA in TBS-T	C.S.
CD70	Hase	21 kDa	reduziert	1:1000	5 % BSA in TBS-T	Abcam
CD147	Hase	50 kDa	reduziert	1:1000	5 % BSA in TBS-T	Abcam
CA9	Maus	50/55 kDa	reduziert	1:10000	5 % Milchpulver in TBS-T	RUM-Center*

Danach wurden die Antikörper, die nicht an ihre Zielproteine gebunden hatten, durch dreimal fünfminütiges Waschen mit TBS-T, entfernt. Dann wurde eine Sekundärantikörperlösung mit HRP-gekoppelten Antikörpern auf die Membran appliziert, und alles für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Abschließend wurden die Antikörper, die nicht an ihre Primärantikörper gebunden hatten, durch dreimal fünfminütiges Waschen mit TBS-T, entfernt.

Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper. HRP = horse reddish peroxidase

Antikörper	Verdünnung	Lösungsmittel	Hersteller
Anti-Hase-HRP-gekoppelt	1:2000	5 % Milchpulver oder BSA	Cell Signaling
Anti-Maus-HRP-gekoppelt	1:2000	5 % Milchpulver oder BSA	Cell Signaling

Mithilfe von Fluoreszenzbildnern wurden unter Verwendung eines Fluoreszenzbildgebers (ChemoStar PC ECL & Fluoreszenzbildgeber, INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) Fluoreszenzsignale bei einer Anregungswellenlänge von ungefähr 477 nm aufgenommen und die Proteine somit detektiert.

3.5 Anreicherung von Exosomen

3.5.1 Magnetische *Beads*

Zur gezielten Anreicherung von Exosomen aus Zellkultur und Plasmaproben mittels Antikörper gegen exosomenspezifische oder tumorspezifische Antigene wurden Streptavidin-beschichtete magnetische *Beads* (MBL-MEX-SA, ExoCap(TM) Streptavidin Kit, BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, 85386 Eching, Germany) verwendet. Diese *Beads* wurden mit biotinylierten, exosomenspezifischen Antikörpern (CD63, CD9) oder biotinylierten, tumorspezifischen Antikörpern (CD147) gekoppelt. Dazu wurden die biotinylierten Antikörpern mit den streptavidinierten *Beads* für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Diese modifizierten *Beads* wurden dann mit der entsprechenden Probe inkubiert. Zu diesen Proben zählen Exosomenisolate aus Zellkulturüberständen nach Ultrazentrifugation und Plasmaproben. Während der Inkubationszeit verbanden sich die in den Proben befindlichen Exosomen über ihre Oberflächenproteine (CD63, CD9 oder CD147) mit den entsprechenden Antikörpern auf den *Beads*. Die magnetischen *Beads* wurden nach der Inkubationszeit (24 Stunden bei 4 °C) mittels starker Magneten (MBL-3190/ Magnetic Rack/ BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, 85386 Eching, Germany) an einer Innenseite des Reaktionsgefäßes fixiert und alle nicht gebunden Bestandteile mit einer Waschlösung entfernt. Die *Bead*-Partikel-Komplexe wurden in 2%-PFA-PBS (für TEM) oder Lysepuffer mit Proteaseinhibitor (für Western Blot) gelöst und bei 4°C oder -20°C gelagert. Inkubations- und Waschschriffe sowie Probenvor- und nachbereitung und die Kopplung biotinylierter Antikörper mit den *Beads*, wurden gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten biotinylierten Antikörper

Antikörper	Bezeichnung	Hersteller
CD63	MBL-MEX002-6/Anti-CD63 (LAMP-3) mAb-Biotin	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, 85386 Eching, Germany
CD9	13174S/CD9 (D801A) Rabbit	Cell Signaling Technology Europe V./Zweigniederlassung Deutschland, Frankfurt a. M.
CD147	MA1-19511 CD147 (soluble) Monoclonal Antibody (MEM-M6/1)	Biotin, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten

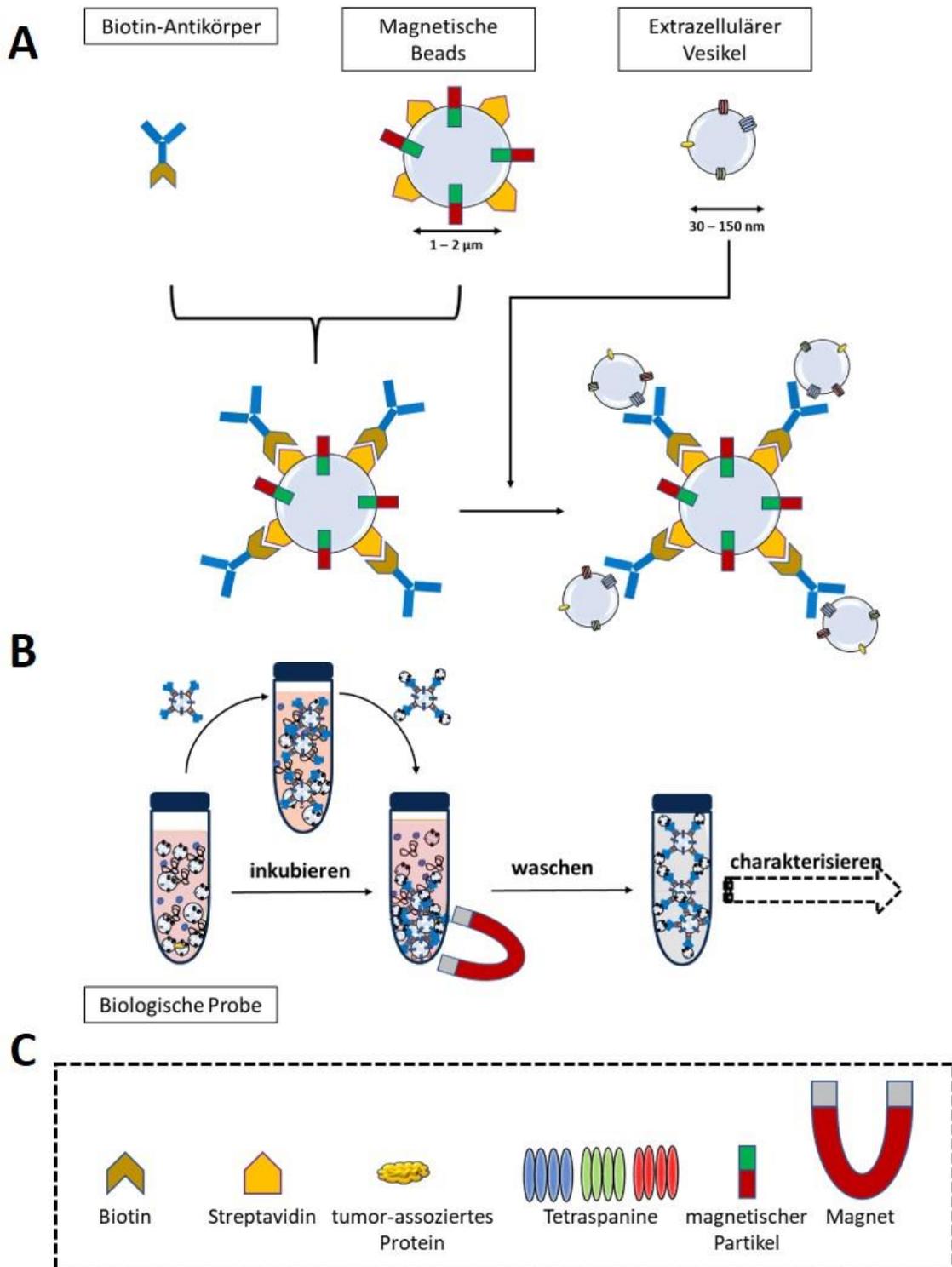


Abbildung 10: Schematischer Ablauf der Isolierung und Anreicherung von Extrazellulären Vesikeln (EVs) mittels magnetischer Beads. A = Modifizierung magnetischer Beads mit Antikörpern gegen typische Oberflächenproteine von EVs und Darstellung der Funktionsweise dieser modifizierten Beads. B = Anwendung modifizierter magnetischer Beads an biologischen Proben. B = Legende © Dirk Himbert (Eigenkomposition)

Der biotinylierte Antikörper CD9 wurde mithilfe eines Biotinylation-Kits (INB-4001-0030/ Biotin Check&Go! Antibody Labeling Confirmation Kit 30 Strips; INB-370-0010 Lightning-Link Rapid

Biotin Type A Labeling Kit/ BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, 85386 Eching, Germany), den Herstellerangaben folgend, selbst hergestellt.

3.5.2 Chip-basierte Methode

Zur spezifischen Anreicherung und Charakterisierung von Exosomen wurde das ExoView™ Tetraspanin Kit und der *ExoView™ R100 Automated Imager* von NanoView Bioscience (Brighton, MA 02135, United States) angewandt. Dazu wurden die Proben auf einen Chip gegeben, welcher mit Antikörpern gegen exosomenspezifische Proteine (CD9, CD63, CD81), beschichtet war. Als Negativkontrolle befand sich zudem ein Spot mit einem IgG-Antikörper. Partikel mit CD9, CD63 oder CD81 in ihrer Membran banden an die entsprechenden Antikörperspots, ungebundene Partikel wurden durch Waschschriffe entfernt. Diese so fixierten Exosomen wurden durch integrierte Laser und Mikroskop untersucht. So ließen sich Größe, Anzahl und Größenverteilung bestimmen. Durch die Zugabe fluorophor-gekoppelter Antikörper gegen exosomenspezifische (CD9, CD63, CD81) oder tumorspezifische (CD147) Proteine konnte die Ko-Expression dieser Proteine auf den einzelnen Subpopulationen der Exosomen untersucht werden. Es wurden unbehandelte Plasmaproben, Zellkulturüberstände und Exosomenisolate aus Zellkultur nach Ultrazentrifugation mit dieser Technik untersucht.

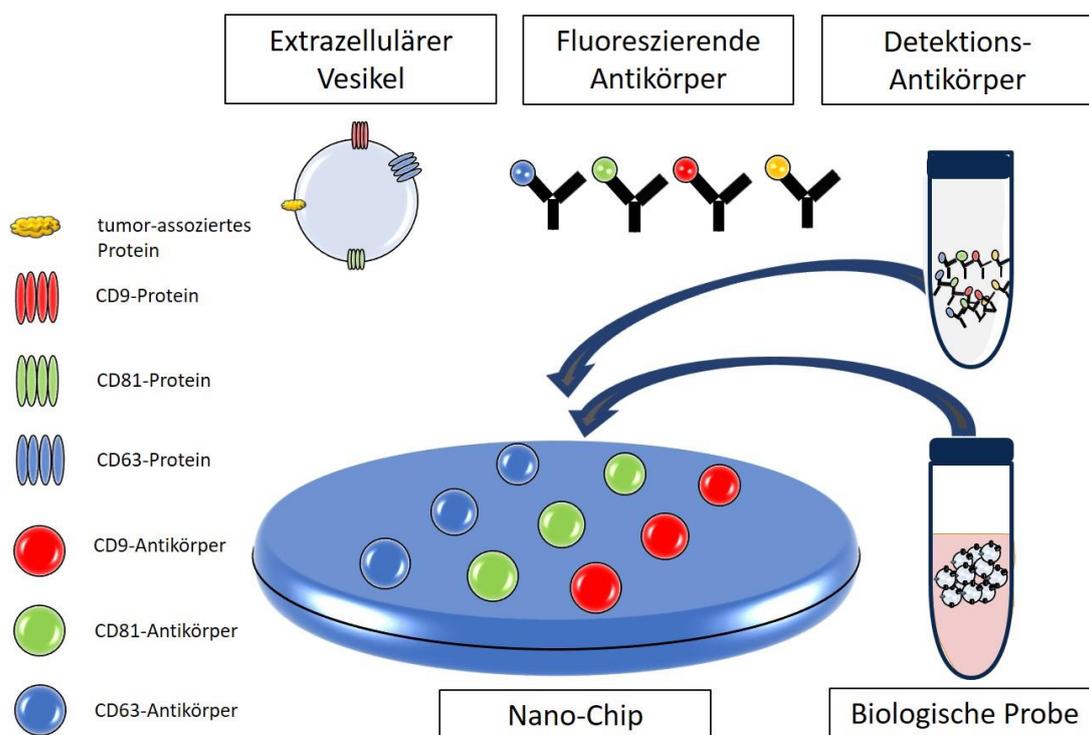


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des Nano-Chip-Systems von NanoView Bioscience. © Dirk Himbert (Eigenkomposition)

Die Versuchsdurchführung und die Bereitstellung der Rohdaten erfolgten teilweise durch den Hersteller, wurde aber sukzessive selbst übernommen.

Tabelle 6: Protokoll der Messreihe eines Kits mit 12 Nano-Chips. Je 50 µl Probenvolumen von zwei Probanden/Probandinnen (Plasma 1197; 1208) und Nierenzellkarzinomzelllinie (786-O, Caki2) wurden, nach entsprechender Vorbehandlung und Verdünnung, auf einen Chip (Chipnr. = Chipnummer) aufgetragen. Fixierte Partikel wurden mit fluoreszierenden Antikörpern gegen Exosomenmarker (CD9, CD81, CD63) oder gegen Tumormarker (CD147) gefärbt und in den korrespondierenden Wellenlängenbereichen detektiert (488 nm, 555 nm, 647 nm). PE = Phycoerythrin

Probe	Verdünnung	Chipnr.	Vorbehandlung	Blauer Kanal	Grüner Kanal	Roter Kanal
786-0 Zellkultur-überstand	1 in 2	36	differenzielle Zentrifugation	-	CD147-PE	-
Caki-2 Zellkultur-überstand	1 in 2	40	differenzielle Zentrifugation	-	CD147-PE	-
786-0 Exosomen	1 in 6	44	diff. Zentrifugation + Ultrazentrifugation	-	CD147-PE	-
Caki-2 Exosomen	1 in 6	45	diff. Zentrifugation + Ultrazentrifugation	-	CD147-PE	-
Plasma 1197	1 in 20	61	differenzielle Zentrifugation	-	CD147-PE	-
Plasma 1208	1 in 20	47	differenzielle Zentrifugation	-	CD147-PE	-
786-0 Zellkultur-überstand	1 in 10	51	differenzielle Zentrifugation	CD9-488	CD81-555	CD63-647
Caki-2 Zellkultur-überstand	1 in 10	53	differenzielle Zentrifugation	CD9-488	CD81-555	CD63-647
786-0 Exosomen	1 in 70	64	diff. Zentrifugation + Ultrazentrifugation	CD9-488	CD81-555	CD63-647
Caki-2 Exosomen	1 in 70	69	diff. Zentrifugation + Ultrazentrifugation	CD9-488	CD81-555	CD63-647
Plasma 1197	1 in 10	62	differenzielle Zentrifugation	CD9-488	CD81-555	CD63-647
Plasma 1208	1 in 10	68	differenzielle Zentrifugation	CD9-488	CD81-555	CD63-647

Tabelle 7: Protokoll der Messreihe eines Kits mit insgesamt 16 Nano-Chips. Je 50 µl Probenvolumen von fünf Probanden/Probandinnen (Plasma 1-5) und einer Nierenzellkarzinomzelllinie (Caki2) wurden, nach entsprechender Vorbehandlung und Verdünnung, auf einen Chip (Chipnr. = Chipnummer) aufgetragen. Fixierte Partikel wurden mit fluoreszierenden Antikörpern gegen Exosomenmarker (CD9, CD81, CD63) oder gegen Tumormarker (CA9, CD147, PD-L1) gefärbt und in den korrespondierenden Wellenlängenbereichen detektiert (488 nm, 555 nm, 647 nm). PE = Phycoerythrin

Probe	Verdünnung	Chipnr.	Vorbehandlung	Blauer Kanal	Grüner Kanal	Roter Kanal
Plasma 1	1:25	002	differenzielle Zentrifugation	CD9-488	CD81-555	CD63-647
Plasma 1	1:25	004	differenzielle Zentrifugation	-	CD147-PE	-
Plasma 1	1:25	016	differenzielle Zentrifugation	-	-	PD-L1-647
Plasma 2	1:25	017	differenzielle Zentrifugation	CD9-488	CD81-555	CD63-647
Plasma 2	1:25	019	differenzielle Zentrifugation	-	CD147-PE	-
Plasma 2	1:25	021	differenzielle Zentrifugation	-	-	PD-L1-647
Plasma 3	1:25	040	differenzielle Zentrifugation	CD9-488	CD81-555	CD63-647
Plasma 3	1:25	042	differenzielle Zentrifugation	-	CD147-PE	-
Plasma 3	1:25	043	differenzielle Zentrifugation	-	-	PD-L1-647
Plasma 4	1:1	045	differenzielle Zentrifugation	-	-	PD-L1-647
Plasma 4	1:25	047	differenzielle Zentrifugation	-	CD147-PE	-
Plasma 4	1:1	048	differenzielle Zentrifugation	CA9-488	-	-
Plasma 4	1:125	049	differenzielle Zentrifugation	CD9-488	CD81-555	CD63-647
Plasma 5	1:1	064	differenzielle Zentrifugation	CA9-488	CD147-PE	PD-L1-647
Plasma 5	1:125	066	differenzielle Zentrifugation	CD9-488	CD81-555	CD63-647
Caki2	1:5	068	differenzielle Zentrifugation + Ultrazentrifugation	CA9-488	CD147-PE	PD-L1-647

3.6 Immunohistochemie

Die FFPE-Gewebeschnitte (4 µm) wurden entparaffiniert (1 Stunde, 60 ° C), mit Xylol (dreimal für 10 Minuten) behandelt und innerhalb einer absteigenden Alkoholreihe in 5-Minuten-Schritten (100% –100% –70% –70% Ethanol, aqua dest) rehydratisiert. Das *Antigen retrieval* (10 mM Citratpuffer, pH 6,0 oder 10 mM Tris 1 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA, pH 9,0) wurde für 10–15 Minuten bei 95 ° C durchgeführt. Danach wurden die Schnitte mit BSA (3% BSA in PBS (w / v), pH 7,2) für 30 Minuten mit PBS gewaschen und für 20 Minuten mit Biotin blockiert (Biotin Block von DCS), gefolgt von Waschen mit PBS (20 Minuten). Die Gewebeschnitte wurden mit primären Antikörpern inkubiert (gelöst in 1% BSA in PBS, pH 7,2). Diese Antikörper richteten sich gegen CD70 (monoklonale Maus, MAB2738, RD Systems), CD147 (monoklonales Kaninchen, ab108308, Abcam), CA9 (rekombinante Maus, monoklonales Hybridom, Integra) oder EpCAM (monoklonales Kaninchen, D4K8R, Cell Signaling). Die Inkubation mit Primärantikörper erfolgte für 1 Stunde bei 37 ° C. Anschließend wurden die Schnitte viermal mit PBS gewaschen. Der Nachweis der detektierten Antigene wurde mit dem REAL Detection System Alkalische Phosphatase / ROTES Kaninchen / Maus (Dako / Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA) gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Erhebung sowie quantitative und qualitative Analyse der Daten wurde durch Herrn Dr. med. Philip Zeuschner durchgeführt.

3.7 Materialien und Geräte

Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
BioTrace PVDF Trägermembran (0,45 µm)	PALL GmbH
Filterpapier	Serva
Kanülen	Sarstedt AG & Co.
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One
Pasteurpipetten, Glas	Carl Roth GmbH +Co. KG
Pipetten	Eppendorf AG
Pipettenspitzen	Eppendorf AG
Polycarbonat Flasche 26 ml, 25x89 mm, dickwandig, mit roter Alu-Verschlusskappe	Beckman Coulter GmbH
Serologische Pipette, 1 ml	Sarstedt AG & Co
Serologische Pipette, 2 ml	Sarstedt AG & Co
Serologische Pipette, 5 ml	Sarstedt AG & Co
Serologische Pipette, 10 ml	Sarstedt AG & Co
Serologische Pipette, 25 ml	Sarstedt AG & Co
Skalpell	Sarstedt AG & Co
Spritzen	Sarstedt AG & Co
Sterilfilter (0,22 µm)	Merck Millipore
UZ-Röhrchen	Beckman Coulter
Zellkulturflaschen 25 cm ²	Corning
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Corning
Zellkulturflaschen 150 cm ²	Corning
Zellkulturflaschen 300 cm ²	Corning
Zellkulturflaschen 500 cm ²	Thermo Fisher Scientific
Zellkulturplatten 6 Well	Corning
Zellkulturplatten 12 Well	Corning
Zellkulturplatten 24 Well	Corning
Zellkulturplatten 48 Well	Corning
Zellkulturplatten 96 Well	Corning
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Sarstedt AG & Co.
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Sarstedt AG & Co.

Tabelle 9: Geräte

Gerät	Hersteller
Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH
ExoView™ R100 Automated Imager	NanoView Bioscience
ExoView™ Control Computer	NanoView Bioscience
Heizblock, Thermozykler	Eppendorf AG
Infinite F200pro	Tecan
Inkubator	Memmert
Lichtmikroskop	Carl Zeiss GmbH
NanoSight LM 10	Malvern
Rotor Typ 70 Ti	Beckman Coulter
Schüttler	Bio-Rad Laboratories GmbH
Spektrometer Infiniti F200 pro	Tecan
Trans-Blot SD semi-dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH
Transmissionselektronenmikroskop	Carl Zeiss GmbH
Ultrazentrifuge L-80	Beckman Coulter
Vakuumentrifuge	Chris
Zellzählgerät Luna	Biozym Scientific GmbH
Zentrifuge	Eppendorf AG

3.8 Chemikalien und Reagenzien/ Lösungen

Tabelle 10: Reagenzien und Lösungen

Puffer/Lösung	Reagenz	Konzentration/Menge
Phosphatgebufferte Salzlösung	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O KH ₂ PO ₄	137 mM 2,7 mM 10 mM 2 mM
Lysepuffer (pH = 7,6)	Tris NaCl Triton X-100 CHAPS SDS Protease-Inhibitoren Mix	50 mM 150 mM 1 % (v/v) 1 % (v/v) 0,1 % (v/v) 1 x
4x Trenngelpuffer (pH = 8,8)	Tris	1,5 M
4x Sammelgelpuffer (pH = 6,8)	Tris	0,5 M
10x Laufpuffer	Tris Glycin SDS	0,5 M 1,92 M 1 %
6x Probenpuffer - reduziert (pH = 6,8)	Tris Glycin SDS Dithiotriol (DTT) Bromphenolblau	0,5 M 30 % (v/v) 10 % (m/v) 600 mM Spatelspitze
6x Probenpuffer – nicht reduziert (pH = 6,8)	Tris Glycin SDS Bromphenolblau	0,5 M 30 % (v/v) 10 % (m/v) Spatelspitze
10 % APS	APS	10 % (m/v)
Sammelgel - 5 %ig - für 2 Minigele-	30 % A/B ddH ₂ O 4x Sammelgelpuffer 10 % SDS TEMED 10 %APS	420 µl 1,4 ml 625 µl 25 µl 3,75 µl 15 µl
Trenngel - 12,5 %ig - für 2 Minigele-	30 % A/B ddH ₂ O 4x Trenngelpuffer 10 % SDS TEMED 10 %APS	4,20 ml 3,10 ml 2,50 ml 100 µl 15 µl 60 µl
Trenngel - 10 %ig - für 2 Minigele-	30 % A/B ddH ₂ O 4x Trenngelpuffer 10 % SDS TEMED 10 %APS	3,30 ml 4,00 ml 2,50 ml 100 µl 15 µl 60 µl
Transferpuffer	Tris Glycin Methanol SDS	48 mM 39 mM 15% (v/v) 0,01% (m/v)

Puffer/Lösung	Reagenz	Konzentration/Menge
10x TBS-Tween	Tris NaCl Tween 20 pH=7,6	248 mM 1,37 M 1% (v/v)
Membranen & Filterpapier	BioTrace PVDF, 0,45 µm (PALL) Fluorobind Membrane, surface PVDF, 0,2 µm (SERVA) Chromatographiepapier, Cellulose, Grade 3MM Chr (VWR)	
BSA-Blocklösung	TBS-Tween BSA	1x 1 - 5 % (m/v)
Milch-Blocklösung	TBS-Tween Milchpulver	1x 1 - 5 % (m/v)
10x NETG-Blocklösung	Tris NaCl EDTA Tween20 Gelatine ddH ₂ O (in Mikrowelle lösen) pH = 7,5	0,5 M 1,5 M 50 mM 0,5 % (v/v) 0,4 (m/v)
Chemolumiszenzsubstrat I	SERVA Light Polaris CL HRP WB Substrate Kit	
Chemolumiszenzsubstrat II	Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate	

Tabelle 11: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid/Bis-Lösung (30 % w/v) 37.5:1	Serva
Albumin Bovin Fraktion (BSA)	Serva
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Bromphenolblau	Serva
CHAPS	Sigma Aldrich GmbH
Coomassieblau Brilliant Blue R Lösung	Serva
Desinfektionsmittel Incidin Plus	Ecolab
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich GmbH
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma Aldrich GmbH
Dithiotriol (DTT)	Serva
Essigsäure	Merck
Ethanol, reinst (95 %)	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich GmbH
Glutaraldehyd	Merck Millipore
Glycin	Sigma Aldrich GmbH
Kaliumchlorid	Sigma Aldrich GmbH
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma Aldrich GmbH
Magermilchpulver	Serva

Chemikalie	Hersteller
Methanol (100 %)	Merck
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Serva
Natriumchlorid	Sigma Aldrich GmbH
Natriumdodecylsulfat	Serva
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich GmbH
Phosphatgebufferte Salzlösung	Sigma Aldrich GmbH
Triple Color Protein Standard II	Serva
Tris	Serva
Triton X-100	Sigma Aldrich GmbH
Trypanblau	Sigma Aldrich GmbH
Tween 20	Sigma Aldrich GmbH
Uranlyoxalat	VWR
Xylol (100 %)	Merck

Tabelle 12: Zellkulturmedien und Zusätze

Medium	Hersteller
DMEM, 4,5 g Glukose	Sigma Aldrich GmbH
RPMI, 2 g Glukose	Sigma Aldrich GmbH
Fetales Kälberserum	Sigma Aldrich GmbH

3.9 Kits und Enzyme

Tabelle 13: Kits

Kit	Hersteller
Biotin Check&Go! Antibody Labeling Confirmation Kit	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH
ExoView™ Tetraspanin Kit	NanoView Bioscience
Lightning-Link Rapid Biotin Type A Labeling Kit	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
Total exosome isolation (from plasma)	Life Technologies

Tabelle 14: Enzyme

Enzym	Hersteller
Proteaseinhibitoren Mix HP	Serva
Trypsin/EDTA	Sigma Aldrich GmbH

3.10 Geräte- und Computersoftware

Tabelle 15: Geräte- und Computersoftware

Software	Hersteller
NTA 3.2	Malvern
ExoView Software Suite 3.0	NanoView Bioscience
ExoViewer™ Software V3	NanoView Bioscience
TEM Software	Carl Zeiss GmbH
INTAS Imager Analyzer	INTAS Science Imaging Instruments GmbH
Power Point	Microsoft

4. Ergebnisse

Zur Validierung der Isolation von Extrazellulären Vesikeln, bzw. Exosomen mit den entsprechenden Isolationsmethoden für Zellkultur, Gewebe oder Blutplasma wurden die isolierten Vesikel anhand diverser Methoden charakterisiert. Dafür wurden Größe und Größenverteilung mittels Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA), die Morphologie mittels Transelektronenmikroskopie (TEM) und die Expression exosomen-spezifischer Proteine mittels Western Blot, bestimmt. Für alle Vesikel, die zur weiteren Charakterisierung verwendet wurden, konnte nachgewiesen werden, dass diese in Form, Größe, Größenverteilung und Oberflächenmarkern exosomen-typische Charakteristika aufweisen.

Darüber hinaus wurde die Expression der ausgewählten Tumormarker (Auswahlkriterien siehe Kapitel 2.4, 2.5) auf isolierten Exosomen *in vitro* (Zellkultur) und auch *in vivo* (humanes Gewebe, humanes Blutplasma) nachgewiesen. Dabei wurden sowohl Zell- und Gewebeproben von Nieren-, Blasen- und auch Prostatakarzinomzelllinien untersucht. Aus den Isolationsversuchen von Exosomen aus menschlichen Gewebeproben der Niere mittels eines Saccharose-Dichtegradienten in Kombination mit Ultrazentrifugation resultierte ein spezifisches Isolationsprotokoll (siehe Kapitel 4.2).

Die Anreicherung von Exosomen mittels magnetischer *Beads* mit exosomen-spezifischen (CD63) oder tumor-spezifischen (CD147) Antikörpern zeigte im Western Blot eine klare Expression von Exosomenmarkern und eine Expression der Tumormarker CD147 und CA9 für Proben aus Zelllinien, nicht aber für Proben aus humanen Plasmaproben. Die Expression von EpCAM und CD70 war in den *bead*-behandelten Proben nicht nachweisbar.

Exosomen gehören zu den Extrazellulären Vesikeln und werden in der Literatur häufig als *small extracellular vesicles* (sEVs) bezeichnet. Nachfolgende Benennungen von Partikeln als „Exosomen“ oder „Extrazelluläre Vesikel“ bezeichnen demnach gleichermaßen Vesikel mit einem Durchmesser zwischen 30 und 150 nm und den weiteren, in den Kapiteln 2.2 und 2.3 beschriebenen, Eigenschaften. Des Weiteren bezeichnet der Begriff „Plasma“ das aus humanem Vollblut gewonnene Blutplasma.

4.1 Charakterisierung von Exosomen aus Zellkultur

Die Validierung der Ultrazentrifugation als Isolationsmethode zur Gewinnung von Exosomen von kultivierten Zelllinien erfolgte mittels Western Blot, NTA (Nanotrackinganalyseverfahren) und TEM (Transelektronenmikroskopie) exemplarisch anhand der Nierenzellkarzinomzelllinie (Caki1, Caki2, RCC53, 786-O). Diese Versuche zeigten, dass die isolierten Vesikel in Form,

Größe und Größenverteilung dem in der gängigen Literatur definierten Merkmale von Exosomen entsprachen (Abbildungen 12-14, [88]). Der qualitative und quantitative Nachweis für die Isolation von Exosomen aus diversen Zelllinien wurde damit erbracht.

4.1.1 TEM-Aufnahmen von Exosomen aus Zellkultur

Exosomen aus Zellkulturüberständen konnten mit ausreichender Reinheit und Konzentration isoliert werden (Abbildungen 12–14). Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)-Bilder zeigten kugelförmige Partikel mit Doppelmembranen und einer Größe zwischen 45 und 53 nm in allen fünf Zelllinien (Abbildung 12).

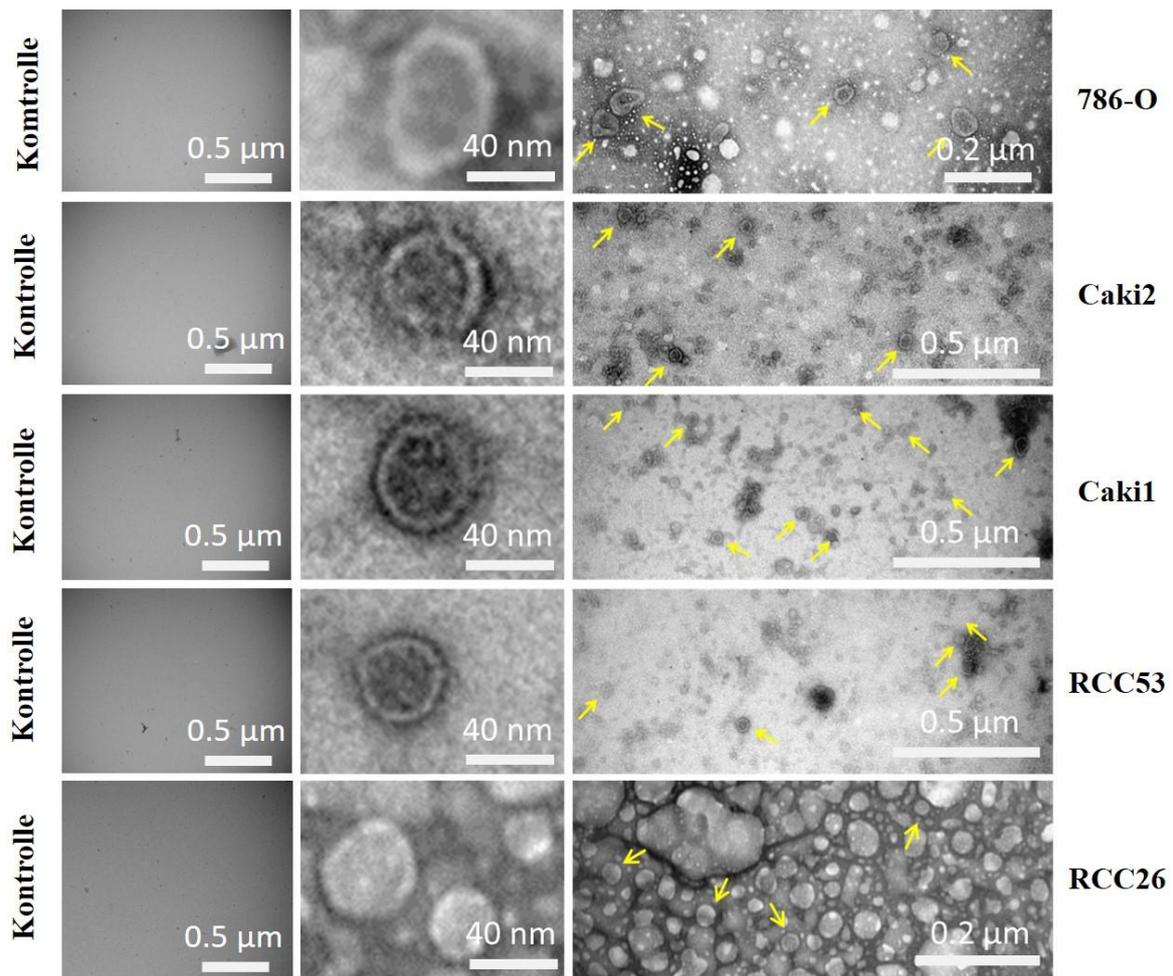


Abbildung 12: Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Aufnahme von Exosomen aus Nierenzellkarzinomzelllinien als qualitativer Nachweis der Isolation von extrazellulären Vesikeln. Linkes Feld: PBS; Mittleres Feld: Vergrößerung einzelner Exosomen. Rechtes Feld: Übersichtsaufnahme. Adaptiert von Himbert *et al.* [278]

Um die Qualität der Exosomenisolierung zu bestätigen, analysierten wir die Expression zellulärer (Golgi-Marker 130 (GM130)) und exosomaler (Differenzierungscluster 63, 81, 9 (CD63, CD81 und CD9)) Proteine über Western Blot (Abbildung 15). GM130 war in allen Zellen nachweisbar, jedoch nicht in den entsprechenden Exosomenproben, was eine hohe Reinigung

von Exosomen ohne zelluläre Verunreinigungen unterstreicht (Abbildung 15A). CD63 war in allen Exosomenproben angereichert. CD9 wurde in allen Exosomenproben, mit Ausnahme von 786-O, mit höheren Signalintensitäten als in den entsprechenden Zellproben nachgewiesen. CD81 wurde in niedrigen Konzentrationen in Exosomenproben von klarzelligen NZK-Zelllinien beobachtet, im Gegensatz zu MCF7 (Michigan Cancer Foundation – 7) - abgeleiteten Exosomen, die als Kontrolle dienten (Abbildung 15B).

4.1.2 NTA-Messungen von Exosomen aus Zellkultur

Die Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA) ergab in allen vier getesteten ccRCC-Zelllinien eine Größenverteilung mit einem Maximum bei etwa 100 nm, die die Größenverteilung der Exosomen widerspiegelt (Abbildung 14 A–D, Tabelle 16).

Tabelle 16: Vesikelgrößen und Größenverteilungen von isolierten Vesikeln von 786-O-Zellen gemittelt über drei Einzelmessungen und je 30 Sekunden Messdauer aus drei Messungen mit je 30 Sekunden Dauer in Abhängigkeit der Verdünnung. Vesikelsuspensionen wurden nach der Isolation und vor der Messung 1:100, 1:500 oder 1:1000 verdünnt. Werte wurden aus Abbildung 13 entnommen. Die abgelesenen Partikelkonzentrationen wurden entsprechend ihrer Verdünnung auf die Konzentration in einem Milliliter umgerechnet.

<u>Vesikelkonzentration [Partikel/ml]</u>			<u>Maxima</u>	<u>Vesikelgröße</u>		
<u>1:100</u>	<u>1:500</u>	<u>1:1000</u>		<u>1:100</u>	<u>1:500</u>	<u>1:1000</u>
5,0x10 ⁹	2,5x10 ¹⁰	1,9x10 ¹⁰	1	100 nm	101 nm	117 nm
5,0x10 ⁹	2,0x10 ¹⁰	1,2x10 ¹⁰	2	115 nm	130 nm	166 nm
3,0x10 ⁹	1,0x10 ¹⁰	0,5x10 ¹⁰	3	147 nm	178 nm	232 nm
3,1x10 ⁹	0,25x10 ¹⁰	0,2x10 ¹⁰	4	171 nm	267 nm	275 nm
1,3x10 ⁹	0,1x10 ¹⁰	0,2x10 ¹⁰	5	234 nm	377 nm	325 nm
0,5x10 ⁹	0,05x10 ¹⁰	0,19x10 ¹⁰	6	323 nm	469 nm	396 nm
0,1x10 ⁹	0,05x10 ¹⁰	0,1x10 ¹⁰	7	545 nm	528 nm	489 nm
0,1x10 ⁹	<0,01x10 ¹⁰	<0,01x10 ¹⁰	8	614 nm	619 nm	599 nm
0,05x10 ⁹	<0,01x10 ¹⁰	<0,01x10 ¹⁰	9	775 nm	751 nm	620 nm
-	<0,01x10 ¹⁰	<0,01x10 ¹⁰	10	-	842 nm	783 nm
-	-	<0,01x10 ¹⁰	11	-	-	889 nm

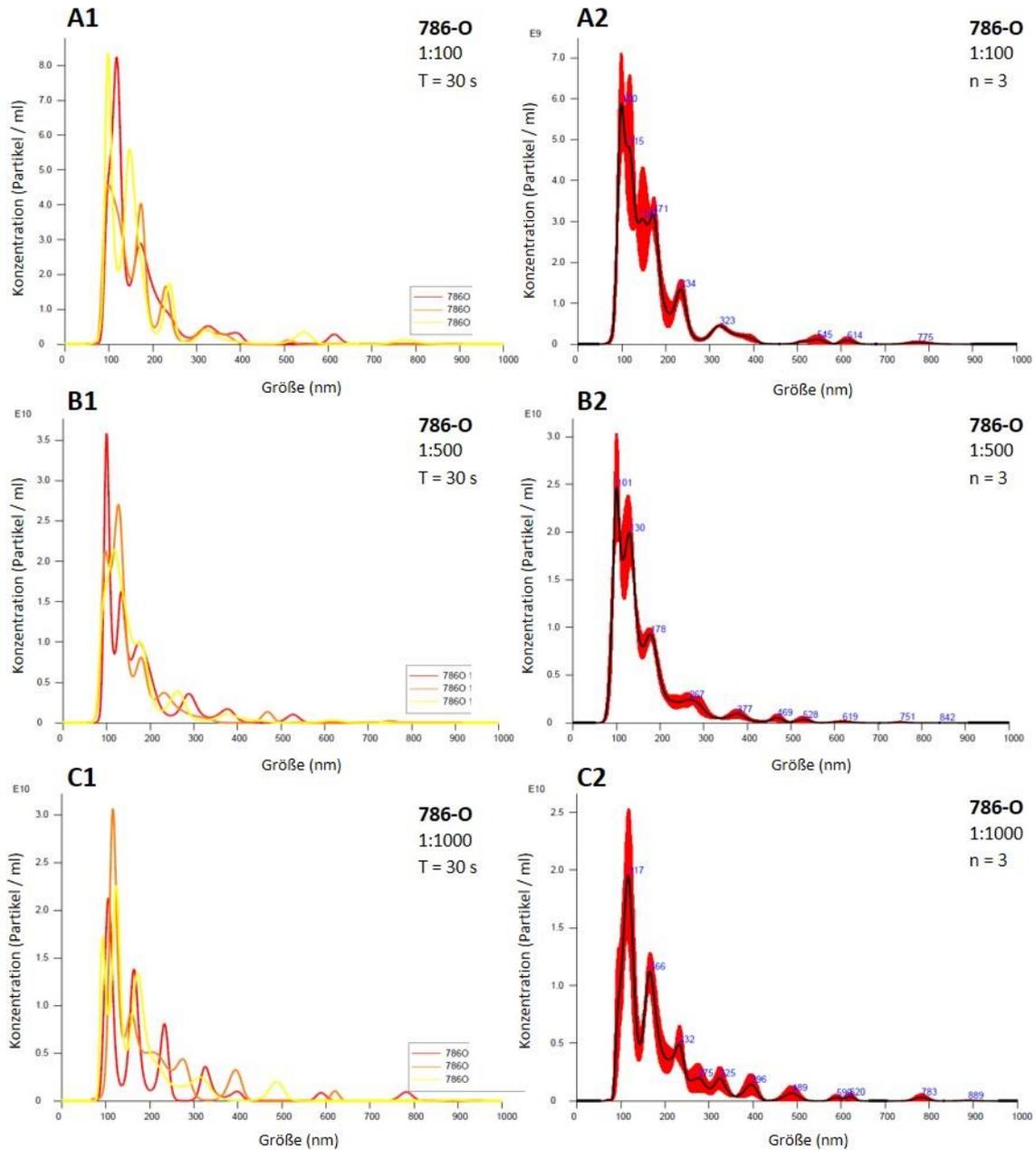


Abbildung 13: Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA) von Exosomen, die aus der humanen klarzelligen Nierenkarzinom-Zelllinie (ccRCC = *clear cell renal cell carcinoma*) 786-O stammen. (A1- C1) Einzelmessungen, (A2 – C2) Mittelung der Einzelmessungen. Die roten Balken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte aus den Messungen. Gemessen wurde eine Probe in drei Verdünnungen (1:100 = A1, A2; 1:500 = B1, B2; 1:1000 = C1, C2). n = 3; T = 30s.

Die Messungen der durch Ultrazentrifugation von Zellkulturüberständen gewonnenen Partikel ergab eine von der Verdünnung der Partikelsuspension abhängige Größenverteilung. Der Vergleich der drei Messungen über jeweils 30 Sekunden derselben Probe bei drei Verdünnungsstufen zeigte, dass bei allen Verdünnungen die Unterschiede der Einzelmessungen zwischen 100 nm und 150 nm Partikeldurchmesser am höchsten war. Bei

1:1000 Verdünnung nahmen diese Abweichung ab einer Partikelgröße von 250 nm aufwärts wieder zu (Abbildung 13; A1, B1, C1, Tabelle 16).

Die Messungen der durch Ultrazentrifugation von Zellkulturüberständen gewonnen Partikel ergab eine von der Verdünnung der Partikelsuspension abhängige Größenverteilung. Bei einer Verdünnung der Partikelsuspension von 1:100 ergab die Messung der Partikelgrößen und Berechnung der Partikelkonzentrationen einen Trend hin zu geringeren Konzentrationen und eine leichte Drift hin zu größeren Durchmessern, verglichen mit den Verdünnungsstufen 1:500 und 1:1000. Im Falle der Verdünnungen von 1:500 und 1:1000 lagen beide Parameter näher beieinander (Abbildung 13; A2, B2, C2, Tabelle 16).

Die Messergebnisse der NTA-Messungen von Isolaten aus den Nierenzellkarzinomzelllinien 786-O, Caki 1, Caki 2 und RCC53 verdeutlichte die Unterschiede und Gemeinsamkeiten von Vesikelgröße und Größenverteilung. Die Verteilung der Vesikelgrößen war abhängig von der Verdünnung. Die Vesikel der Zelllinie 786-O waren im Mittel größer als die der anderen drei Zelllinien. Die Vesikelgrößen der Zelllinien Caki1 und Caki2 lagen nah beieinander und die Vesikel der Zelllinie RCC53 lagen mit einer durchschnittlichen Größe von circa 138 nm dazwischen. Die Vesikelkonzentrationen waren zelllinienspezifisch. Die Unterschiede in den Messergebnissen, die beim Vergleich der verschiedenen Verdünnungen auftraten, waren bei Caki1 und RCC53 am größten. Hier unterschieden sich die Gesamtkonzentrationen der Vesikel deutlich (Abbildung 14, Tabelle 17, 18, 19).

Tabelle 17: Messung der Partikelgrößen gemittelt über drei Einzelmessungen und je 30 Sekunden Messdauer. Gemessen wurden 1:500- und 1:1000-Verdünnungen von Exosomensuspensionen aus vier Nierenzellkarzinomzelllinien. Die Werte wurden aus Abbildung 14 entnommen.

Maxima	786-O		Caki1		Caki2		RCC53	
	1:500	1:1000	1:500	1:1000	1:500	1:1000	1:500	1:1000
1	101 nm	117 nm	60 nm	83 nm	41 nm	89 nm	34 nm	89 nm
2	130 nm	166 nm	87 nm	103 nm	80 nm	130 nm	57 nm	120 nm
3	178 nm	232 nm	130 nm	182 nm	108 nm	192 nm	77 nm	170 nm
4	267 nm	275 nm	154 nm	210 nm	167 nm	272 nm	92 nm	193 nm
5	377 nm	325 nm	203 nm	272 nm	215 nm	-	127 nm	259 nm
6	469 nm	396 nm	276 nm	368 nm	244 nm	-	171 nm	354 nm
7	528 nm	489 nm	455 nm	-	286 nm	-	264 nm	-
8	619 nm	599 nm	-	-	324 nm	-	341 nm	-
9	751 nm	620 nm	-	-	527 nm	-	-	-
10	842 nm	783 nm	-	-	-	-	-	-
11	-	889 nm	-	-	-	-	-	-

Tabelle 18: Berechnung der Partikelkonzentrationen gemittelt über drei Einzelmessungen mit je 30 Sekunden Messdauer. Gemessen wurden 1:500- und 1:1000-Verdünnungen von Exosomensuspensionen aus vier Nierenzellkarzinomzelllinien. Angabe der Partikelkonzentrationen in Partikel/ml. Werte wurden aus Abbildung 14 übernommen. Die abgelesenen Partikelkonzentrationen wurden entsprechend ihrer Verdünnung auf die Konzentration in einem Milliliter umgerechnet.

Max	786-O		Caki1		Caki2		RCC53	
	1:500	1:1000	1:500	1:1000	1:500	1:1000	1:500	1:1000
1	2,5x10 ¹⁰	1,9x10 ¹⁰	0,3x10 ⁹	0,7x10 ¹⁰	<0,01x10 ¹⁰	1,05x10 ¹⁰	0,04x10 ¹⁰	0,8x10 ¹⁰
2	2,0x10 ¹⁰	1,2x10 ¹⁰	5,2x10 ⁹	1,7x10 ¹⁰	0,5x10 ¹⁰	0,5x10 ¹⁰	0,35x10 ¹⁰	3,1x10 ¹⁰
3	1,0x10 ¹⁰	0,5x10 ¹⁰	0,9x10 ⁹	0,5x10 ¹⁰	1,0x10 ¹⁰	0,175x10 ¹⁰	0,34x10 ¹⁰	0,12x10 ¹⁰
4	0,25x10 ¹⁰	0,2x10 ¹⁰	1,0x10 ⁹	0,3x10 ¹⁰	0,3x10 ¹⁰	<0,01x10 ¹⁰	0,2x10 ¹⁰	0,08x10 ¹⁰
5	0,1x10 ¹⁰	0,2x10 ¹⁰	0,4x10 ⁹	0,05x10 ¹⁰	0,05x10 ¹⁰	-	0,55x10 ¹⁰	0,1x10 ¹⁰
6	0,05x10 ¹⁰	0,19x10 ¹⁰	0,4x10 ⁹	<0,01x10 ¹⁰	<0,01x10 ¹⁰	-	0,62x10 ¹⁰	0,01x10 ¹⁰
7	0,05x10 ¹⁰	0,1x10 ¹⁰	<0,01x10 ¹⁰	-	<0,01x10 ¹⁰	-	0,12x10 ¹⁰	-
8	<0,01x10 ¹⁰	<0,01x10 ¹⁰	-	-	<0,01x10 ¹⁰	-	<0,01x10 ¹⁰	-
9	<0,01x10 ¹⁰	<0,01x10 ¹⁰	-	-	<0,01x10 ¹⁰	-	-	-
10	<0,01x10 ¹⁰	<0,01x10 ¹⁰	-	-	-	-	-	-
11	-	<0,01x10 ¹⁰	-	-	-	-	-	-

Tabelle 19: Mittlere Partikelgröße und Gesamtpartikelkonzentration. Berechnung der Partikelkonzentrationen gemittelt über drei Einzelmessungen mit je 30 Sekunden Messdauer. Gemessen wurden 1:500- und 1:1000-Verdünnungen von Exosomensuspensionen aus vier Nierenzellkarzinomzelllinien. Angabe der Partikelkonzentrationen in Partikel/ml. Werte wurden aus Abb. 14 übernommen und daraus der Mittelwert berechnet. Die Partikelkonzentrationen wurden entsprechend ihrer Verdünnung auf die Konzentration in einem Milliliter umgerechnet. Die Partikelkonzentrationen bilden hier die Summe der Konzentrationen aus 3 Einzelmessungen.

Zelllinie	Partikelgröße [nm]	Konzentration [Partikel/ml]	Verdünnung
786-O	163,0 +/- 4,8	1,92x10 ¹² +/- 3,92x10 ¹⁰	1:500
	189,0 +/- 5,0	1,56x10 ¹² +/- 1,44x10 ¹¹	1:1000
Caki2	119,0 +/- 10,1	4,58x10 ¹¹ +/- 1,27x10 ¹¹	1:500
	125,6 +/- 8,7	4,51x10 ¹¹ +/- 5,17x10 ¹⁰	1:1000
Caki1	130,0 +/- 7,0	1,91x10 ¹¹ +/- 8,79x10 ¹⁰	1:500
	114,3 +/- 5,6	6,86x10 ¹¹ +/- 2,02x10 ¹¹	1:1000
RCC53	139,5 +/- 8,0	3,88x10 ¹¹ +/- 8,90x10 ¹⁰	1:500
	137,0 +/- 7,7	2,45x10 ¹¹ +/- 1,06x10 ¹¹	1:1000

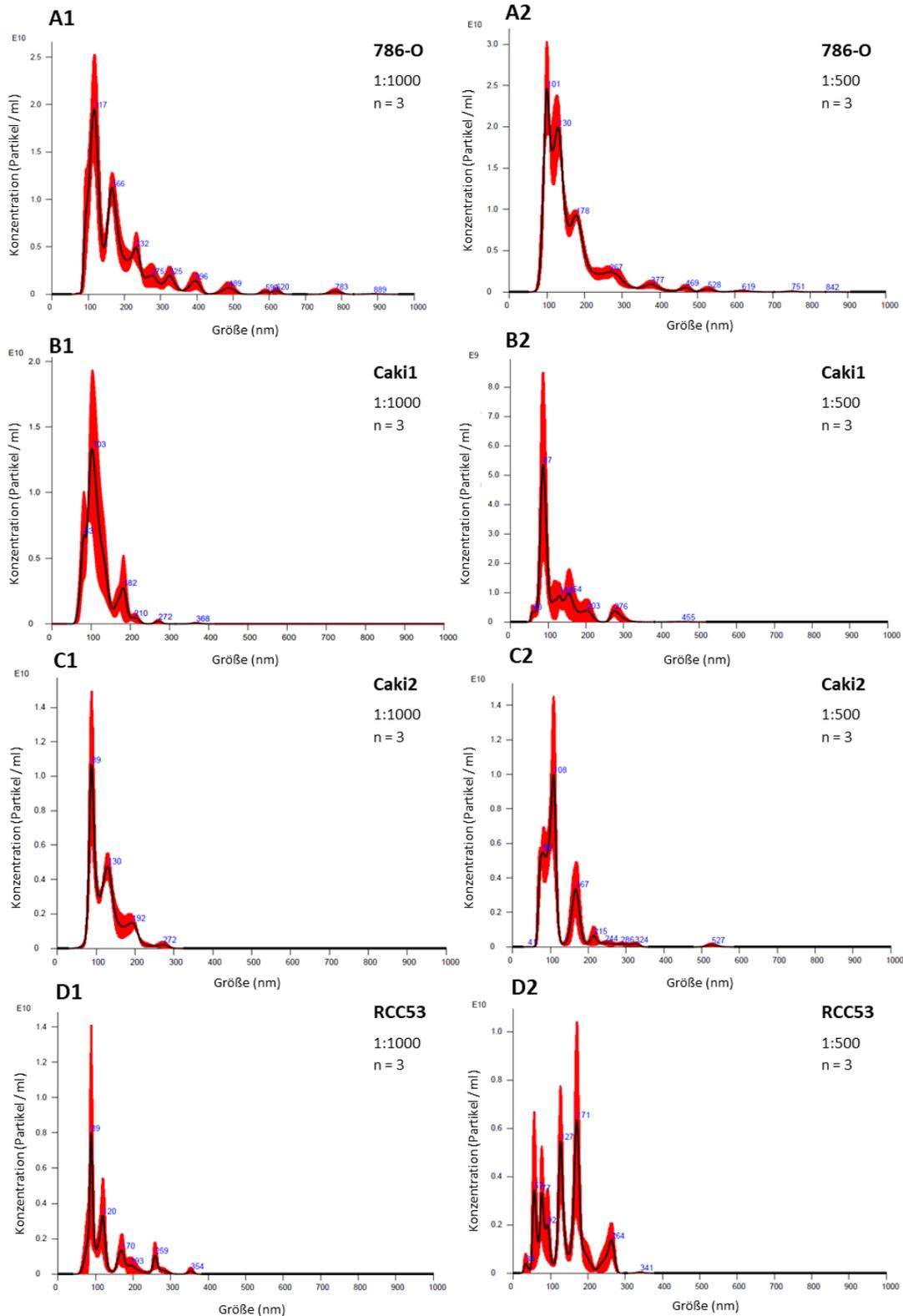


Abbildung 14: Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA) von Exosomen, die aus humanen klarzelligem Nierenkarzinom-Zelllinien (ccRCC = *clear cell renal cell carcinoma*) stammen (A) 786-O, (B) Caki1, (C) RCC53 und (D) Caki2-Zellkulturüberstände. Die roten Balken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte aus den Messungen (n = 3, T = 30s). Gemessen wurde je eine Probe in zwei Verdünnungen (1:1000 = A1 – D1; 1:500 = A2 – D2). Adaptiert von Himbert *et al.* [278]

4.1.3 Charakterisierung von Oberflächenmarkern auf Exosomen aus Zellkultur

Die semi-quantitative Messung der Proteinexpression zellspezifischer, exosomenspezifischer, und tumorassoziierter Proteine in Proteinproben aus Zellen und Exosomen von Nierenzellkarzinom-, Blasenkarzinom-, sowie Prostatakarzinomzelllinien mittels Western Blot zeigte sowohl innerhalb der Zelllinien als auch zwischen Zell- und Exosomenproben oder den einzelnen Entitäten Unterschiede. Die Exosomen aus den Zellkulturüberständen der malignen Nierenzellkarzinomzelllinien hatten in allen Fällen einen hohen Anteil exosomalarker Marker, eine geringe bis gar keine Präsenz zellulärer Marker, sowie eine sehr diverse Expression der untersuchten Tumormarker CD147, CA9, CD70 und EpCAM. Dasselbe galt für Exosomen, die aus den Zellkulturüberständen von Zellen der malignen Blasenkarzinomzelllinien J82, 253J-BV, T24, respektive der malignen Prostatakarzinomzelllinie VCap sowie der Prostata tumorfibroblastenzelllinie PTF, die mittels Ultrazentrifugation gewonnen wurden. Gleiches wurde auch bei der Isolation von Exosomen aus den Zellkulturüberständen von Zellen der benignen Zelllinien HEK (Niere), HCV29 (Blase), BPH (Prostata) und PNF (Prostata normalfibroblasten) beobachtet.

Nachfolgende Unterkapitel fassen die gemessenen Expressionsmuster zusammen.

4.1.3.1 Qualitätskontrolle: Expression von zell- und exosomenspezifischen Proteinen im klarzelligen Nierenzellkarzinom

Die Detektion des zellspezifischen Markers GM130 zeigte in den Proteinproben aus Zelllysaten der Nierenzellkarzinomzelllinien (786-O, Caki2, Caki1, RCC53) und der Mammakarzinomzelllinie MCF7 ein Expressionssignal im Bereich von 130 – 135 kDa (Abbildung 15 A, Tabelle 20).

Die Detektion der exosomenspezifischen Marker zeigte Unterschiede in der Expression dieser Proteine zwischen den Zellproben und den korrespondierenden Exosomenproben. Dies ist beispielhaft in den Western Blots (Abbildungen 15) gezeigt. Die Expression der verschiedenen Proteine ist in der Tabelle 20 gezeigt.

Die Daten zeigen, dass die Vesikel exosomentypische Merkmale aufweisen [88] und mit hoher Reinheit von den zellulären Bestandteilen getrennt und isoliert werden konnten.

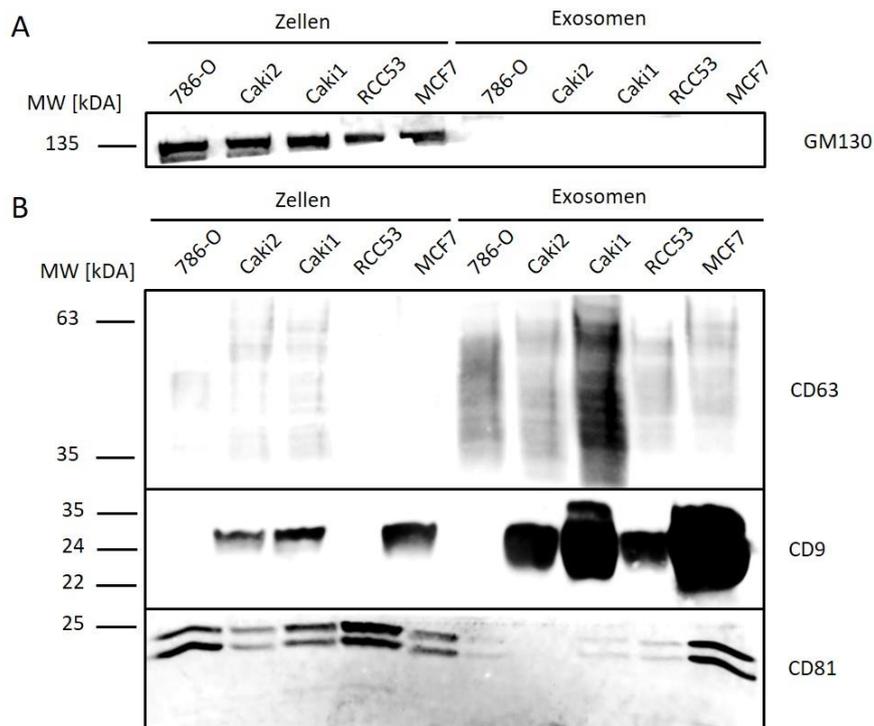


Abbildung 15: Western-Blot-Analyse von exosomal und zellulären Proteinen aus Zelllinien des klarzelligen Nierenzellkarzinoms (786-O, Caki2, Caki1 und RCC53) und Kontrollzelllinien (MCF7). (A) Zellmarker, (B) Exosomenmarker. Adaptiert von Himbert *et al.* [278]

Tabelle 20: Quantifizierung und Vergleich der Expression von Zell- und Exosomenmarkern in verschiedenen Zelllinien. „-“ = keine Expression; „+“ = niedrige Expression; „++“ = moderate Expression; „+++“ = hohe Expression.

	786-O	Caki 2	Caki1	RCC53	MCF7	
GM130	+++	+++	+++	+++	+++	ZELLEN
CD63	+	+	+	-	-	
CD9	-	+	+	-	+	
CD81	+++	+	++	+++	++	
GM130	-	-	-	-	-	EXOSOMEN
CD63	++	++	+++	+	+	
CD9	-	+++	+++	+++	+++	
CD81	+	-	+	+	+++	

4.1.3.2 Expression von Tumormarkern (EpCAM, CD147, CA9, CD70) in Zelllinien des klar-zelligen Nierenzellkarzinoms

CD147 und CA9 wurden in Zellen und Exosomen von NZK-Zelllinien mit zelllinienspezifischen Expressionsmustern nachgewiesen (Abbildung 16). CD70 trat nur in den MCF7-Kontrollzellen und ihren Exosomen als spezifische Bande bei 17 kDA auf. Die Expression der Tumormarker ist in Tabelle 21 zusammengefasst. Auch hier zeigten sich deutliche Unterschiede in den Expressionsmustern der genannten Tumormarker.

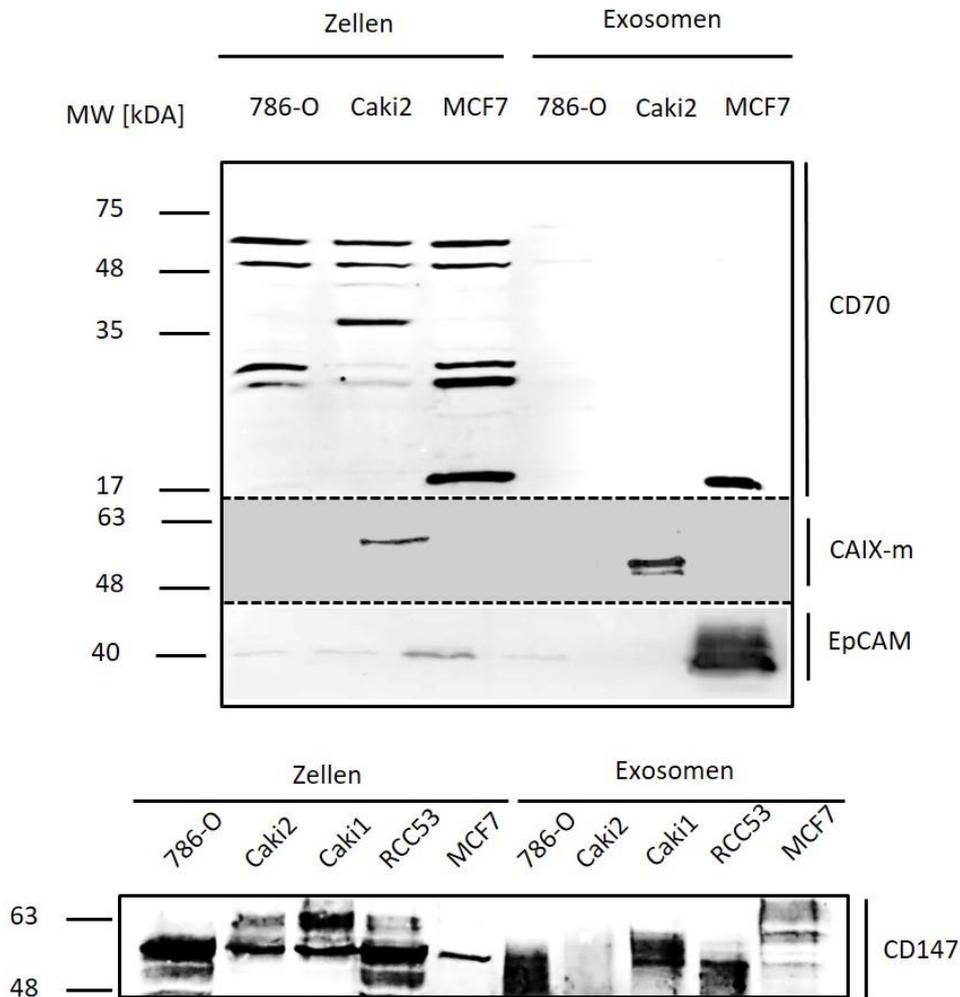


Abbildung 16: Western-Blot-Analyse von tumorassoziierten Markern. (a) Carboanhydrase 9 (CA9), CD70 und Epithelzelladhäsionsmolekül (EpCAM); (b) CD147) auf Exosomen von Nierenzellkarzinomzelllinien (786-O, Caki2, Caki1 und RCC53) und Kontrollzelllinien (MCF7). Adaptiert von Himbert *et al.* [278]

Tabelle 21: Quantifizierung und Vergleich der Expression von Tumormarkern in verschiedenen Zelllinien. „-“ = keine Expression; „+“ = niedrige Expression; „++“ = moderate Expression; „+++“ = hohe Expression; n.u.= nicht untersucht

	786-O	Caki 2	Caki1	RCC53	MCF7	
CD70	-	-	n.u.	n.u.	++	ZELLEN
CA9	-	+	n.u.	n.u.	-	
EpCAM	+	+	n.u.	n.u.	++	
CD147	+++	++	+++	+++	+	
CD70	-	-	n.u.	n.u.	++	EXOSOMEN
CA9	-	++	n.u.	n.u.	-	
EpCAM	+	-	n.u.	n.u.	+++	
CD147	+++	+	+++	+++	++	

CD70 und EpCAM sind in Zelllinien von Nierentumoren nicht präsent. CA9 ist in einer Nierenkarzinomzelllinie stark exprimiert und kommt dort auch in Exosomen vor. CD147 scheint als Tumormarker besonders geeignet, da er in allen getesteten Zelllinien sowohl in den Zellproben als auch in den Exosomenproben vorkommt.

4.1.3.3 Expression von zell-, exosomen- und tumorspezifischen Proteinen in Zelllinien von invasiven Blasen Tumoren

Die Expression der zellspezifischen (GM130, Calretikulin) und exosomenspezifischen (CD9, Syntenin, CD63, CD81, Alix) Proteine wurde in Zelllysaten und Lysaten von Exosomensuspensionen der Blasenkarzinomzelllinien J82, 253J-BV, T24 gemessen.

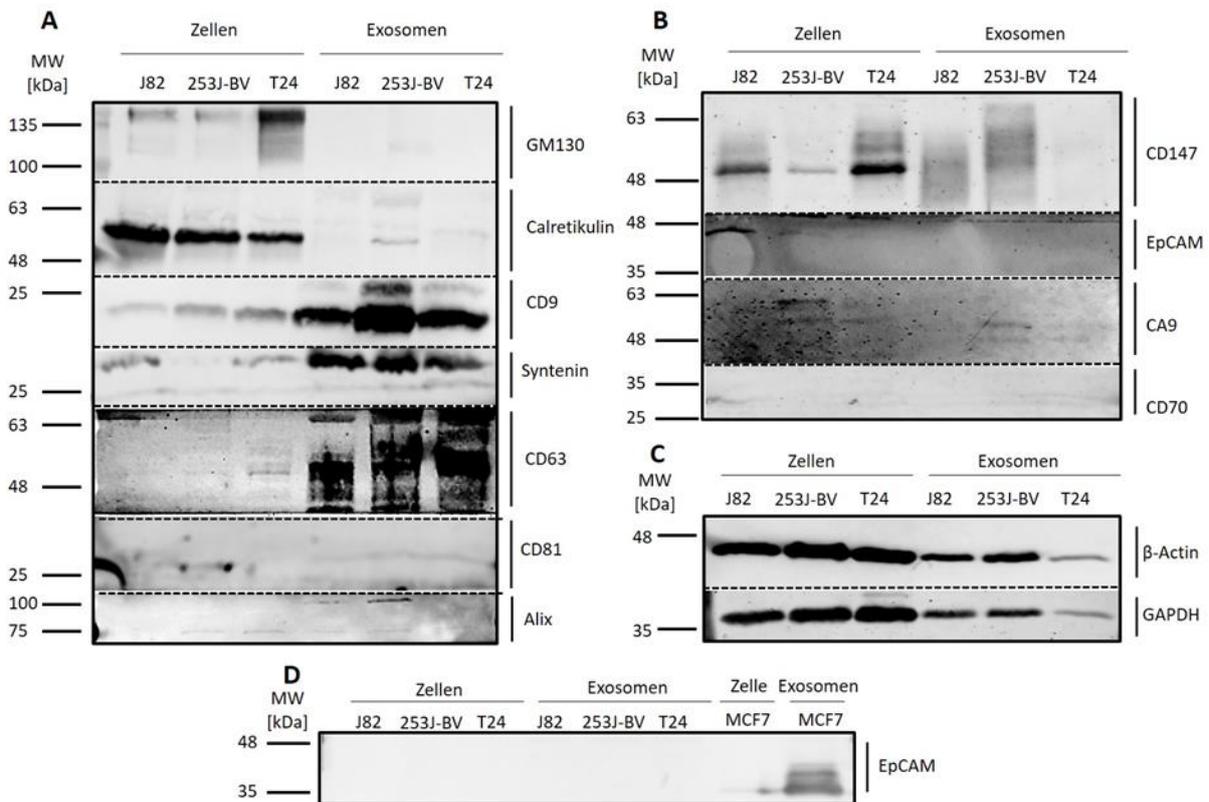


Abbildung 17: Western-Blot-Analyse von Proteinproben aus Zellen und Exosomen von Blasenkarzinomzelllinien (J82, 253J-BV, T24). Isolation der Exosomen erfolgte durch Ultrazentrifugation des Zellkulturüberstandes. A: Expression zellspezifischer (GM130, Calretikulin) und exosomenspezifischer (CD9, Syntenin, CD63, CD81, Alix) Marker. B: Expression tumorspezifischer Marker (CD147, EpCAM, CA9, CD70). C: Expression von Proteinen der Ladekontrolle (β -Aktin, GAPDH). D: Expression von EpCAM in Zellen und Exosomen der Blasenkarzinomzelllinien (J82, 253J-BV, T24), sowie MCF7 als Positivkontrolle. MW = Molekulargewicht; kDa = Kilodalton.

Tabelle 22: Quantifizierung und Vergleich der Expression von Zell-, Exosomen- und Tumormarkern in verschiedenen Zelllinien. „-“ = keine Expression; „+“ = niedrige Expression; „++“ = moderate Expression; „+++“ = hohe Expression; n.u.= nicht untersucht

	Zellen			Exosomen		
	J82	253J-BV	T24	J82	253J-BV	T24
GM130	+	+	+++	-	-	-
Calretikulin	+++	+++	+++	-	+	-
CD9	+	+	+	++	+++	++
Syntenin	+	-	+	+++	+++	++
CD63	-	-	-	++	+++	+++
CD81	-	-	-	-	-	-
Alix	-	-	-	+	+	-
CD147	++	+	+++	+	+	-
EpCAM	-	-	-	-	-	-
CA9	-	+	-	-	+	-
CD70	-	-	-	-	-	-

Die Daten zur Expression von Zellmarkern, Exosomenmarkern (Abbildung 17 A, Tabelle 22) und der Haushaltsproteine (Abbildung 17 C) zeigen, dass die Exosomen mit hoher Reinheit isoliert wurden und die Proteinmengen im Blot gleichmäßig verteilt sind. Die Proteine der Haushaltsgene β -Aktin und GAPDH wurden in den drei Zellproben gleichermaßen bei circa 45 kDa (β -Aktin) und 37 kDa (GAPDH) exprimiert. In den Exosomenproben waren die Signale ebenfalls in dem Bereich vorhanden. Die Signalintensitäten waren in allen drei Exosomenproben ausgeprägt und scharf abgegrenzt, jedoch schwächer als in den Zellproben. Von den getesteten Tumormarkern (C147, CD70, EpCAM, CA9) wurde CD147 in den Zellen klar exprimiert. Alle anderen Tumormarker konnten in den Zellen und Exosomen der Blasenkarzinomzelllinien, ausgenommen die Zelllinie 253J-BV, nicht nachgewiesen werden (Abbildung 17 B, Tabelle 22).

4.1.3.4 Expression von zell-, exosomen- und tumorspezifischen Proteinen in Zelllinien von malignen und benignen Tumoren der Niere, der Blase, sowie der Prostata

Die Expression von zell- (GM130, Calretikulin), exosomen- (Alix, CD63, CD9, CD81, Syntenin) und tumorspezifischen (CD147, CD70, CA9) Proteinen sowie Proteinen von Haushaltsgenen (β -Aktin, GAPDH) wurde in Zellen und Exosomen von benignen (HEK, Niere; HCV29, Blase; BPH, Prostata) und malignen (786-O, Niere; T24, Blase; VCap, Prostata) Zelllinien untersucht (Abbildung 18, Anhang Abbildung 50). Die Daten zur Expression von Zellmarkern, Exosomenmarkern (Abbildung 18, Tabelle 23, Anhang Abbildung 50) und der

Haushaltsproteine (Abbildung 18) zeigen, dass die Exosomen mit hoher Reinheit isoliert wurden und die Proteinmengen im Blot gleichmäßig verteilt sind.

Tabelle 23: Quantifizierung und Vergleich der Expression von Zell-, Exosomen- und Tumormarkern in verschiedenen Zelllinien. „-“ = keine Expression; „+“ = niedrige Expression; „++“ = moderate Expression; „+++“ = hohe Expression; n.u.= nicht untersucht

	Zellen						Exosomen					
	786O	HEK	T24	HCV29	VCap	BPH	786O	HEK	T24	HCV29	VCap	BPH
GM130	+++	++	+++	+	+++	+++	-	-	+	-	-	-
Calretikulin	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	+	-	-	-
CD9	-	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Syntenin	+	+	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CD63	+	-	+	+	+	-	+++	+++	+++	+++	+++	++
CD81	-	-	-	-	-	-	+	++	+	+	+	+
Alix	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
CD147	++	++	++	++	+	+++	++	++	+	-	-	+
CA9	+	+	+	++	+	+	-	-	+	-	-	++
CD70	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-

Beim Vergleich der Expression zellspezifischer Proteine fiel auf, dass Calretikulin in allen benignen und malignen Zelllinien gleichermaßen exprimiert wurde. Die Expression von GM130 unterschied sich in den malignen Zelllinien dadurch, dass eine Doppelbande detektiert wurde, während die benignen Zelllinien eine Einfachbande aufwiesen. Die Detektion der Exosomenmarker (CD63, CD9, CD81, Syntenin) zeigte in den Exosomenproben eine starke Expression, und in den Zellproben eine moderate bis schwache Expression. Bei der Betrachtung exosomenspezifischer Proteine war besonders auffällig, dass die detektierten Molekulargewichte von CD63 bei VCap (35-48 kDa) und BPH (48-63 kDa) in verschiedenen Größenbereichen lagen.

Die detektierten Signale für die exprimierten Haushaltsgene β -Aktin und GAPDH, die als Ladekontrolle im Westernblot eingesetzt wurden, befanden sich alle im selben Größenbereich. Dieser war zugleich der Größenbereich, der für das jeweilige Protein charakteristisch ist. Die Signalintensität war bei β -Aktin innerhalb der Zellproben und innerhalb der Exosomenproben gleich stark. Bei den Exosomenproben war eine Abschwächung des Signals bezogen auf die Signalintensität in den Zellproben zu erkennen. Die Signalintensität von GAPDH war sowohl

innerhalb der Zell- und Exosomenproben als auch zwischen diesen gleichermaßen intensiv. Einzig bei T24 war eine Abweichung der Signalintensität hin zu höheren Werten in den Zell- und Exosomenproben detektiert worden.

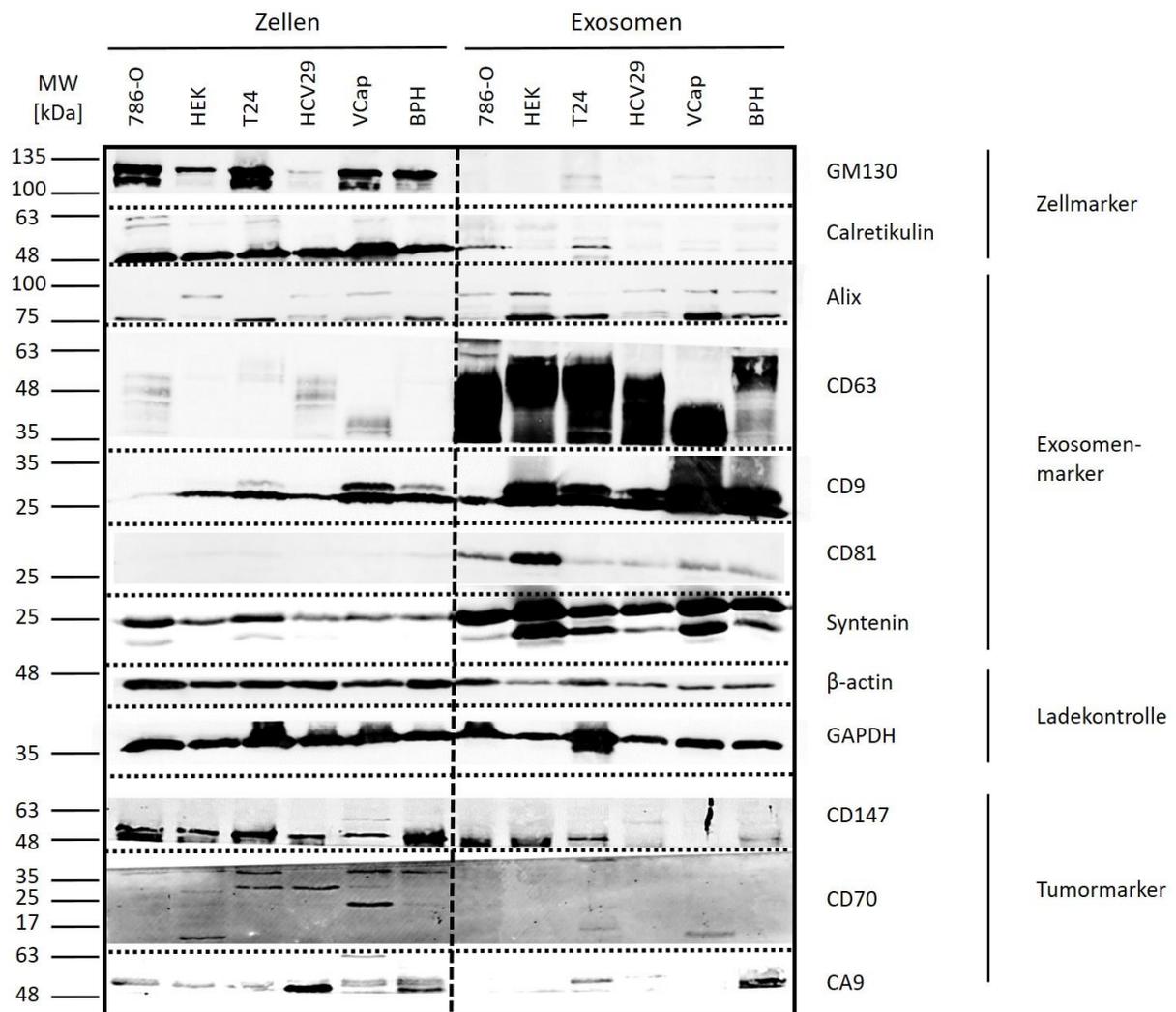


Abbildung 18: Western-Blot-Analyse von Proteinproben aus Zellen und Exosomen aus malignen Zelllinien von Niere (786-O), Blase (T24), Prostata (VCap), sowie aus benignen Zelllinien von Niere (HEK), Blase (HCV29), Prostata (BPH). Isolation der Exosomen erfolgte durch Ultrazentrifugation des Zellkulturüberstandes. Expression zellspezifischer Marker (GM130, Calretikulin), exosomenspezifischer Marker (CD63, CD9, CD81, Syntenin), tumorspezifischer Marker (CD147, CD70, CA9) und Proteinen als Ladekontrolle (β -Aktin, GAPDH). MW = Molekulargewicht; kDa = Kilodalton.

Die Expression der Tumormarker (CD147, CD70, CA9) war sehr divers (Abbildung 18, Anhang Abbildung 50). CD70 wurde in den Exosomenproben von T24 und VCap und in den Zellproben von HEK sehr schwach exprimiert und als Einzelbande bei circa 17 kDa detektiert. Der Vergleich von tumorspezifischen Proteinen zeigte, dass alle getesteten Tumorproteine bei der Mehrheit der Zelllinien nicht in deren Exosomen exprimiert wurden. CD147 war in den

Exosomen der malignen 786-O- und T24-, sowie der benignen HEK-Zelllinie nachweisbar. Für CA9 war dies bei der malignen T24-Zelllinie und der benignen BPH-Zelllinie der Fall. In allen anderen Exosomen von benignen und malignen Zelllinien war die Expression der Tumormarker sehr schwach oder nicht nachweisbar (Abbildung 18).

4.2. Charakterisierung von Exosomen aus Gewebe

Um Exosomen direkt aus menschlichen Gewebeproben zu isolieren, wurde ein spezifisches Protokoll entwickelt, das einen Saccharose-Dichtegradienten mit Ultrazentrifugation kombiniert (Abbildung 7). Die TEM-Bilder bestätigten sphärische Partikelformen mit Doppelmembranen und einer Größe zwischen 36 und 120 nm in allen NZK-Tumorgewebeproben (Abbildung 19, 20). Die Verunreinigungen nahmen mit zunehmender Dichte des Gradienten ab; somit erhöhte sich die Reinheit der isolierten Exosomen (Abbildung 20).

4.2.1 TEM-Aufnahmen von Gewebe-Exosomen

Zur Etablierung eines geeigneten Verfahrens zur Isolierung von Exosomen aus humanen Gewebeproben von Patienten mit Nierenzellkarzinom wurden ausgewählte Gewebeproben vorbehandelt und die so gewonnenen Gewebesuspensionen mittels Ultrazentrifugation behandelt (Details siehe Kapitel 3.3.2). Dabei wurden diese einmal ohne Gradienten, einmal mit einem gestuften Gradienten aus Saccharose (ansteigende Konzentration von F1 nach F3) und einmal mit einer einfachen Schicht aus 30 % Saccharose zentrifugiert.

Ohne Gradient war die Anzahl an extrazellulären Vesikeln nach der Ultrazentrifugation sehr gering. Zudem war der Grad an Kontaminationen mit undefinierbaren Strukturen sehr hoch (Abbildung 19, Bildausschnitt links aussen).

Beim abgestuften Gradienten zeigten sich im ersten Gradienten F1 viele extrazelluläre Vesikel und viele nicht-vesikuläre, sphärische Strukturen sowie weitere organische und anorganische Ablagerungen. Im zweiten Gradienten F2 zeigten sich vereinzelte extrazelluläre Vesikel im Größenbereich von 30 – 150 nm und wenige Kontaminationen mit nicht-extrazellulären Strukturen. Im dritten Gradienten F3 zeigten sich mehrere extrazelluläre Vesikel im Größenbereich von 30 – 150 nm und sehr wenige Kontaminationen mit nicht-extrazellulären Strukturen (Abbildung 19, Bildausschnitt Mitte).

Bei der einfachen Schicht aus 30% Saccharose zeigten sich keine Kontaminationen mit undefinierbaren Partikeln, oder organischen und anorganischen Strukturen. Die Aufnahmen

zeigten wenige extrazelluläre Vesikel im Bereich von 30 – 150 nm Durchmesser und sehr viele Vesikel mit einem Durchmesser von unter 30 nm (Abbildung 19, rechts aussen).

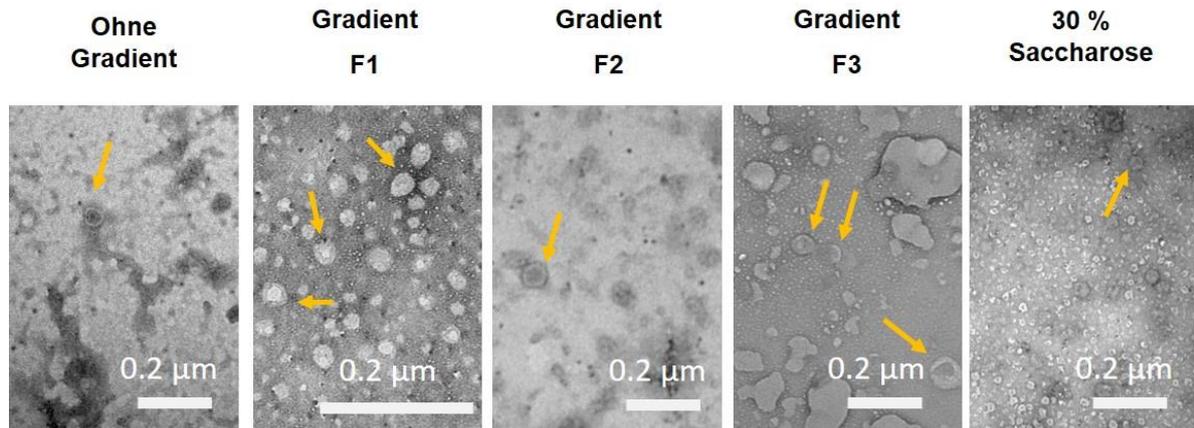


Abbildung 19: Exosomen aus Tumorgewebe nach Verdauung und Ultrazentrifugation ohne Gradienten, mit dreischichtigem Saccharosegradient (F1-F3) oder einer einfachen Saccharoseschicht (30% Saccharose), die mittels Transelektronenmikroskopie (TEM) nachgewiesen wurden. Gelbe Pfeile zeigen exemplarisch auf fixierte extrazelluläre Vesikel.

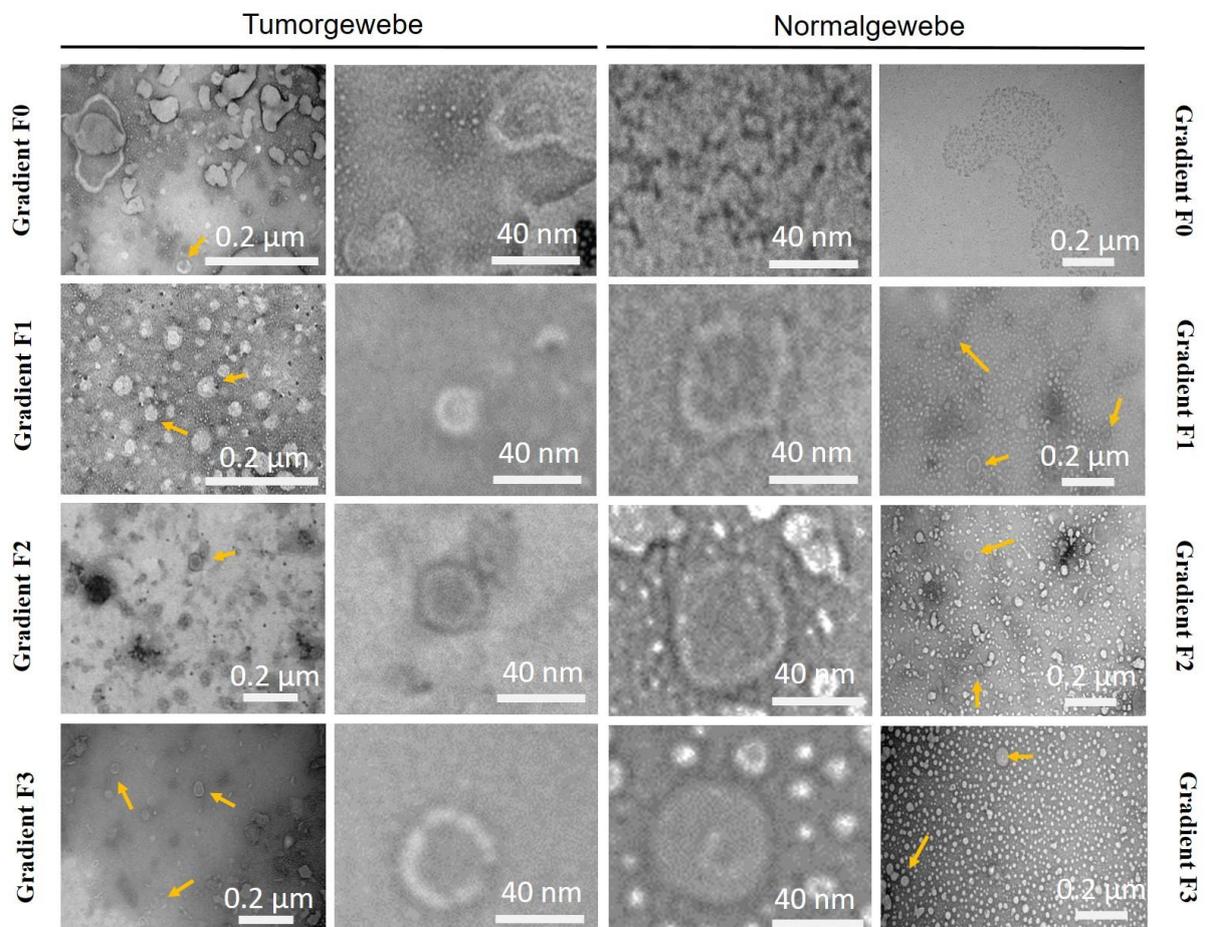


Abbildung 20: Exosomen aus Tumor- und Normalgeweben in verschiedenen Gradientenfraktionen, die mittels Transelektronenmikroskopie (TEM) nachgewiesen wurden. Spalte 1 und 4: Übersichtsaufnahme. Spalte 2 und 3: Vergrößerung einzelner Exosomen. Adaptiert von Himbert *et al.* [278]

Die Aufnahmen der einzelnen Fraktionen von Gewebesuspensionen aus Tumorgewebe und Normalgewebe von Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom zeigte eine von der Fraktion abhängige Konzentration an extrazellulären und nicht-extrazellulären Partikeln. Partikel und Strukturen, die nicht die Merkmale von extrazellulären Partikeln aufwiesen (Doppelmembran, sphärische Struktur) wurden als unspezifische Ablagerungen definiert. (Abbildung 20).

In Fraktion F0 fanden sich in der Tumorgewebeprobe viele unspezifische Ablagerungen und nur vereinzelt Strukturen, die mit zellulären Membranen assoziiert werden können. In der Normalgewebeprobe waren sehr wenige unspezifische Ablagerungen und keine extrazelluläre Partikel zu sehen.

In Fraktion F1 zeigten sich sowohl in den Tumorgewebeproben als auch in Normalgewebeproben wenige unspezifische Ablagerungen und viele extrazelluläre Partikel über 20 nm und unter 100 nm Durchmesser.

In Fraktion F2 waren sowohl in den Tumorgewebeproben als auch in den Normalgewebeproben sehr wenige unspezifische Ablagerungen und viele extrazelluläre Partikel über 30 nm und unter 100 nm Durchmesser vorhanden.

In Fraktion F3 wurden in den Tumorgewebeproben fast keine unspezifischen Ablagerungen und viele extrazelluläre Partikel über 30 nm und unter 100 nm Durchmesser detektiert. In den Normalgewebeproben fanden sich fast keine unspezifischen Ablagerungen, viele extrazelluläre Partikel über 30 nm und unter 100 nm Durchmesser sowie sehr viele extrazelluläre Partikel mit einer Größe von unter 20 nm.

4.2.2 NTA von Gewebeexosomen

Die NTA detektierte Partikel in Tumorgewebeproben mit einer Größe zwischen 50 nm und 431 nm, und in Normalgewebeproben mit einer Größe zwischen 34 nm und 752 nm (Abbildung 21, A–H, Tabelle 24).

Eine Abhängigkeit der Größe der Vesikel vom Gewebetyp war vor allem in den Fraktionen F1 und F2 festzustellen. In diesen beiden Fraktionen gab es in den Normalgewebeproben eine stärkere Tendenz hin zu größeren Vesikeln als in den Tumorgewebeproben.

Die Fraktionen F0 und F3 ähnelten in ihrer Anzahl an Maxima und den Größen der Vesikel der Fraktion F2. Mit drei Maxima kamen in Fraktion F2 bei beiden Gewebetypen, den Tumorgewebeproben und den Normalgewebeproben, die meisten Vesikel mit einer exosomentypischen Größe von 30 bis 150 nm vor. In der Tumorgewebeprobe kamen diese Vesikel viermal in Fraktion F0 vor.

Tabelle 24: Berechnung der Partikelgrößen gemittelt über drei Einzelmessungen mit je 30 Sekunden Messdauer. Gemessen wurden Exosomensuspensionen aus Tumor- und Normalgewebe von Patienten mit einem Nierenzellkarzinom.

	F0		F1		F2		F3	
Maxima	Tumor	Normal	Tumor	Normal	Tumor	Normal	Tumor	Normal
1	57 nm	76 nm	29 nm	112 nm	51 nm	34 nm	66 nm	30 nm
2	91 nm	-	70 nm	177 nm	73 nm	79 nm	141 nm	78 nm
3	125 nm	-	151 nm	218 nm	124 nm	126 nm	193 nm	241 nm
4	146 nm	-	-	263 nm	163 nm	194 nm	211 nm	-
5	184 nm	-	-	306 nm	235 nm	268 nm	258 nm	-
6	194 nm	-	-	349 nm	262 nm	459 nm	315 nm	-
7	234 nm	-	-	-	352 nm	752 nm	431 nm	-
8	331 nm	-	-	-	386 nm	-	-	-
9	-	-	-	-	419 nm	-	-	-

Die Konzentration der Vesikel war abhängig von der Fraktion und nahm entlang des Gradienten von Fraktion F0 bis F3 ab. Dies konnte bei Proben aus Tumorgewebe und bei Proben aus Normalgewebe beobachtet werden. Ausgenommen war Fraktion F0 des Normalgewebes, hier waren in der Gewebesuspension verglichen mit den anderen Fraktionen am wenigsten Vesikel vorhanden (Abbildung 21, Tabelle 25).

Die Konzentration von Vesikeln war in Proben aus Tumorgewebe in allen Fraktionen höher als in Normalgewebeproben. In der Gewebesuspension, Fraktion F0, waren 33-mal mehr Vesikel, in Fraktion F1 siebenmal mehr, in Fraktion F2 dreimal mehr und in Fraktion F3 viermal mehr Vesikel vorhanden. Das könnte auf eine erhöhte Produktion und Freisetzung von Exosomen in Tumorgewebe hindeuten (Abbildung 21, Tabelle 25).

Tabelle 25: Berechnung der Partikelkonzentrationen gemittelt über drei Einzelmessungen mit je 30 Sekunden Messdauer. Gemessen wurden Exosomensuspensionen aus Tumor- und Normalgewebe von Patienten mit Nierenzellkarzinom. Angabe der Partikelkonzentrationen in Partikel/ml. Die abgelesenen Partikelkonzentrationen wurden entsprechend ihrer Verdünnung auf die Konzentration in einem Milliliter umgerechnet.

	F0		F1		F2		F3	
Max	Tumor	Normal	Tumor	Normal	Tumor	Normal	Tumor	Normal
1	$2,5 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^8$	$2,4 \times 10^{10}$	$0,7 \times 10^{10}$	$1,19 \times 10^{10}$	$5,9 \times 10^9$	$0,35 \times 10^{10}$	$3,2 \times 10^8$
2	$2,1 \times 10^{10}$	-	$1,5 \times 10^{10}$	$0,1 \times 10^{10}$	$1,21 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^9$	$1,18 \times 10^{10}$	$1,1 \times 10^8$
3	$0,5 \times 10^{10}$	-	$0,2 \times 10^{10}$	$0,05 \times 10^{10}$	$0,42 \times 10^{10}$	$3,0 \times 10^9$	$0,45 \times 10^{10}$	$3,5 \times 10^8$
4	$0,25 \times 10^{10}$	-	-	$0,01 \times 10^{10}$	$0,43 \times 10^{10}$	$0,8 \times 10^9$	$0,45 \times 10^{10}$	-
5	$0,25 \times 10^{10}$	-	-	$0,01 \times 10^{10}$	$0,22 \times 10^{10}$	$0,3 \times 10^9$	$0,2 \times 10^{10}$	-
6	$0,1 \times 10^{10}$	-	-	$<0,01 \times 10^{10}$	$0,18 \times 10^{10}$	$<0,01 \times 10^9$	$0,35 \times 10^{10}$	-
7	$0,25 \times 10^{10}$	-	-	-	$<0,01 \times 10^{10}$	$<0,01 \times 10^9$	$0,15 \times 10^{10}$	-
8	$<0,01 \times 10^{10}$	-	-	-	$0,18 \times 10^{10}$	-	-	-
9	-	-	-	-	$<0,01 \times 10^{10}$	-	-	-

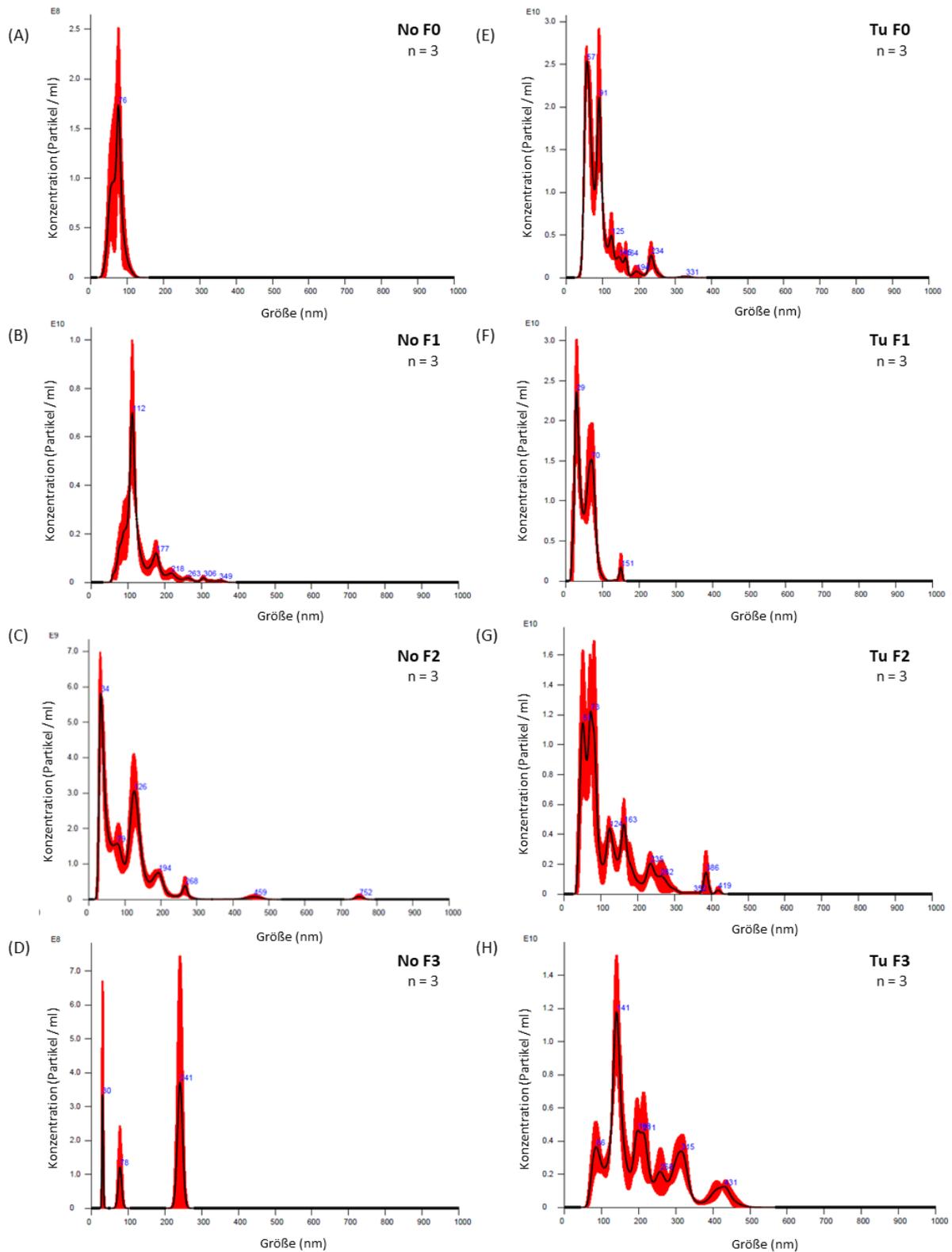


Abbildung 21: Nano-Tracking-Analyse von Exosomen aus einer primären Normalgewebeprobe (A – D) und aus einer primären Tumorgewebeprobe (E -H), die jeweils durch einen Saccharosegradienten isoliert wurden. Die Größenverteilung der Fraktionen F0-F3 (A-D, E-H) ist als Mittelwert aus drei Messungen dargestellt. Die roten Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte aus drei Messungen. No = Normalgewebe, Tu = Tumorgewebe. Adaptiert von Himbert *et al.* [278]

4.2.3 Charakterisierung von Proteinen auf Exosomen aus Gewebe

Die zur Etablierung einer geeigneten Isolationsmethode zur Gewinnung von Exosomen in hoher Konzentration und Reinheit aus Gewebe verwendeten Protokolle (Ultrazentrifugation ohne Gradienten, mit dreistufigem Saccharosegradient oder mit einstufigem Saccharosegradient) zeigten, dass alle drei Methoden für die Isolation von Exosomen geeignet sind. Auch die Wahl des Enzyms Kollagenase I oder Kollagenase III zeigte keine großen Unterschiede beim Vergleich der Expressionsmuster innerhalb des jeweiligen Protokolls.

4.2.3.1 Vergleich verschiedener Isolationsmethoden zur Gewinnung von Exosomen aus Gewebe

Beide Kollagenasetypen führten zu den gleichen Expressionsleveln von Zellmarkern in allen angewendeten Isolationsprotokollen. GM130 wurde im Lysat vom Tumorgewebe und auch nach dem Verdau mit Kollagenase Typ III im Homogenat detektiert. Nach dem Verdau mit Kollagenase Typ I konnte kein GM130 im Homogenat nachgewiesen werden. In allen Proben konnte nach Durchführung aller drei Protokolle kein GM130 nachgewiesen werden, unabhängig davon, welcher Kollagenase-Typ vorher verwendet wurde (Abbildung 22, A). Die Isolierung und das Etablierungsverfahren sind im Detail im Methodenteil beschrieben.

Beide Kollagenasetypen führten zu den gleichen Expressionsleveln und Expressionsmustern von Exosomenmarkern und Tumormarkern in allen angewendeten Isolationsprotokollen. Einziger Unterschied ist im Zelllysat bei der Detektion von GM130 zu sehen, hier war nach dem Verdau (=Homogenat) beim Kollagenasetyp I kein GM130 detektierbar. Das deutet auf höhere enzymatische Aktivität und einen aggressiveren Verdau hin. Folglich wurden für die weiterführenden Versuche der Kollagenasetyp III verwendet.

Von den drei getesteten Isolationsverfahren führte nach den Ergebnissen der Versuche (Abbildungen 19, 20 (TEM), Abbildung 21 (NTA) Abbildung 22 WB) nach zu urteilen die Methode mit dem dreischichtigen Saccharosegradienten zu dem, für weitere Untersuchungen, günstigsten Verhältnis aus Konzentration und Reinheit der isolierten Vesikel.

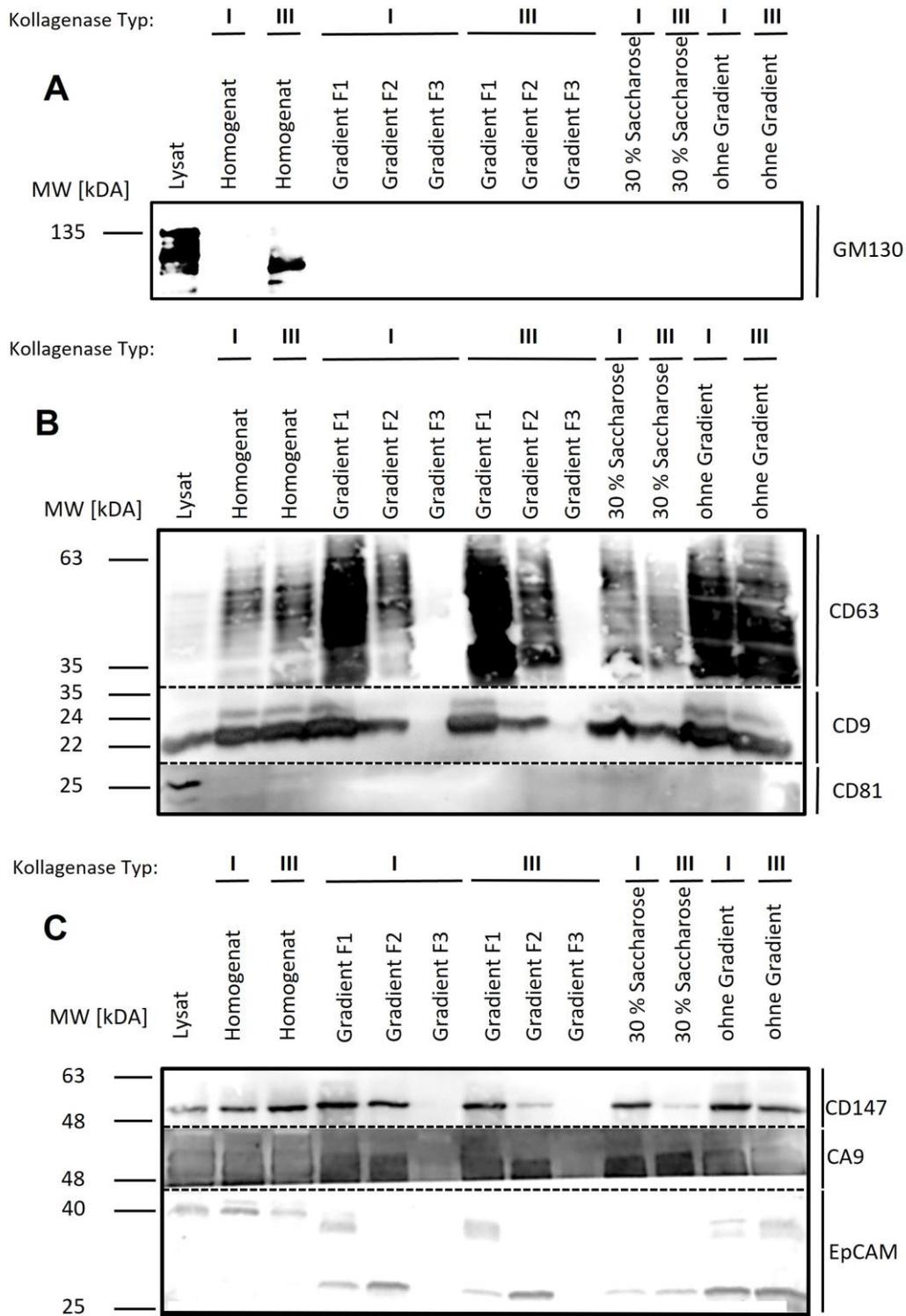


Abbildung 22: Vergleich Kollagenase Typ I und Kollagenase Typ III. Western-Blot-Analyse von Proteinproben aus Gewebe eines Patienten mit diagnostiziertem Nierenzellkarzinom vor Verdau (Lysat), nach Verdau (Homogenat), sowie nach Verdau und Ultrazentrifugation mit dreischichtigem Saccharosegradient (F1-F3), einer einfachen Saccharoseschicht (30% Saccharose) oder ohne Gradienten. A: Expression zellspezifischer Marker (GM130). B: Expression exosomenspezifischer Marker (CD63, CD9, CD81). C: Expression tumorspezifischer Marker (CD147, CA9, EpCAM). MW = Molekulargewicht; kDa = Kilodalton.

4.2.3.2 Expression von Zell- und Exosomenmarkern in Tumor- und Normalgewebe

Die Daten zur Expression von Zellmarkern, Exosomenmarkern und der Haushaltsproteine zeigten, dass die Exosomen mit hoher Reinheit isoliert wurden und die Proteinmengen im Blot gleichmäßig verteilt waren. Zusätzlich zu den drei Tetraspaninen wurde Syntenin getestet, ein vesikelassoziiertes Protein. Syntenin wurde in den exosomal Fraktionen erhöht vorgefunden. Syntenin war in allen exosomal Fraktionen von Tumor- und Normalgewebeprobe nachweisbar (Abbildung 23).

In den Tumorproben war die Expression von CD63 und Syntenin in den Exosomen stärker ausgeprägt als in den korrespondierenden Normalgewebeprobe. CD9 wiederum wurde in den Exosomenproben des Normalgewebes stärker exprimiert als in den vergleichbaren Tumorgewebeprobe. Daraus lässt sich schließen, dass Tumorgewebe mehr CD63-positive und Syntenin-positive Vesikel freisetzt, während Normalgewebe mehr CD9-positive Vesikel freisetzt. Nimmt man alle Exosomenmarker und alle Fraktionen (F0-F3) zusammen in Betracht und geht von Kollokationen aller Markerproteine auf den Vesikeln aus, so deuten die Ergebnisse darauf hin, dass im Tumorgewebe insgesamt mehr Vesikel freigesetzt werden als im Normalgewebe.

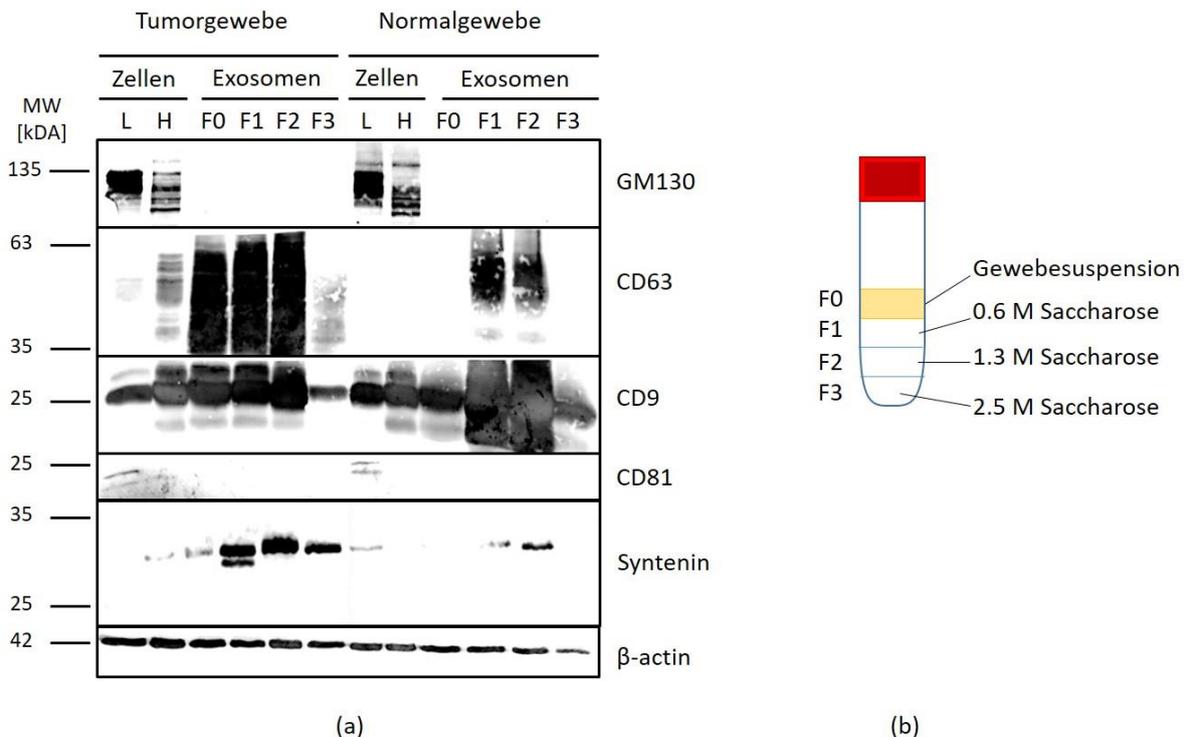


Abbildung 23: Western-Blot-Analyse von exosomal und zellulären Proteinen, isoliert aus Tumor- und Normalgewebe. Zell- (GM130) sowie Exosomen-Marker (CD63, CD9 und CD81) wurden nachgewiesen. L = Lysat, H = Homogenat, F0–F3 = Fraktion F0–F3 (Fraktionen nach Saccharosegradient). MW= Molekulargewicht; kDa=Kilodalton. Adaptiert von Himbert *et al.* [278]

4.2.3.3 Expression von Tumormarkern in Tumor- und Normalgewebe

CD147 wurde in den Zelllysaten und Exosomen in 8/8 primären Tumorgewebeprobe stark exprimiert. CD147 wurde ebenso in 4/4 Zelllysaten und in 2/4 Exosomenlysaten von vier primären Normalgewebeprobe nachgewiesen. Die Expression war in Tumorprobe im Vergleich zu Normalgewebe erhöht (Abbildung 24, Tabellen 26 und 27). Der Vergleich von Tumor- und Normalgewebeprobe zeigte, dass die Signalintensität in zellulären und exosomal Probe von Tumorgewebe höher war als die Signalintensität in den korrespondierenden Normalgewebeprobe. In der Fraktion F2 war die Signalintensität, bezogen auf die zellulären Probe, deutlich erhöht. Innerhalb der Normalgewebeprobe war das Signal für CD147 in F1 und F2, bezogen auf die zellulären Probe, deutlich erhöht. (Abbildung 24).

CA9 wurde in allen primären Tumorgeweben (6/6) und deren Exosomen (7/7) nachgewiesen. In Normalgewebe wurde CA9 in 2/4 Zellprobe, und in 3/4 Exosomenprobe nachgewiesen (Abbildung 24, Tabellen 26 und 27). Die Intensität war in Lysat und Homogenat in beiden Gewebetypen schwach, wies aber in den Probe des Tumorgewebes eine leicht erhöhte Intensität auf.

CD70 zeigte je nach Patientenprobe unterschiedliche Expressionsmuster zwischen Tumorgeweben (8/8) und ihren EVs (5/8). Die CD70-Expression war in Tumorprobe im Vergleich zu normalem Gewebe erhöht. Im Normalgewebe wurde CD70 in $\frac{3}{4}$ Gewebe und $\frac{1}{4}$ EVs nachgewiesen (Abbildung 24, Tabellen 26 und 27).

In primären Tumorgewebeprobe wurde EpCAM in 5/7 zellulären und 5/8 EV-Fractionen exprimiert, mit erhöhten Konzentrationen von gespaltenen Fragmenten in allen vier Fractionen. In normalem Gewebe wurde es ausser in der Exosomenfraktion 2 (F2) nicht nachgewiesen (Abbildung 24, Tabellen 26 und 27).

Von den vier getesteten Tumormarkern sind vor allem CA9 und CD70 im Tumorgewebe und deren Vesikel stärker exprimiert als im gesunden Gewebe und deren Vesikel. Bei CD147 sind die Unterschiede zwischen Tumorgewebe und Tumorgewebeexosomen auf der einen Seite, und Normalgewebe und Normalgewebeexosomen auf der anderen Seite, ebenfalls zu sehen, allerdings sind diese nicht so ausgeprägt wie bei CA9 und CD70. EpCAM ist in den untersuchten Fällen im Tumorgewebe nicht überrepräsentiert (Abbildung 24, Tabellen 26 und 27).

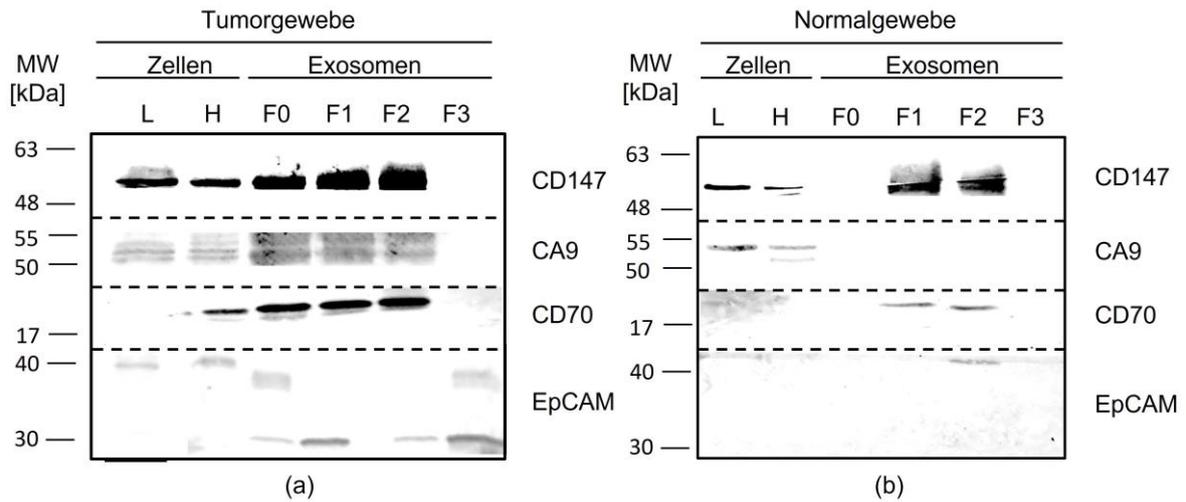


Abbildung 24: Western-Blot-Analyse von tumorassoziierten Markern (CD147, CA9, CD70, EpCAM) in Proben aus Nierentumoren und gesundem (normalen) Gewebe (NTB1175 und NTB1302). L = Lysat, H = Homogenat, F0–F3 = Fraktionen 0–3 (Fraktionen nach Saccharosegradient). MW = Molekulargewicht, kDa=Kilodalton. Adaptiert von Himbert *et al.* [278]

Tabelle 26: Der Nachweis von tumorassoziierten Markern (CD147, CA9, CD70 und EpCAM) durch Western Blot in Zellen und tumor-abgeleiteten Exosomen aus Patientenproben. Die Anzahl der positiven Proben bezieht sich auf die Gesamtzahl der analysierten Proben. Es handelte sich hier ausschließlich um Tumorgewebe. Adaptiert von Himbert *et al.* [278]

Herkunft	CA9	CD147	CD70	EpCAM
Zellen	6/6	8/8	8/8	5/7
Exosomen	7/7	8/8	5/8	5/8

Tabelle 27: Quantifizierung und Vergleich von Expressionsmustern in normalen Gewebeproben. „-“ = keine Expression; „+“ = niedrige Expression; „++“ = moderate Expression; „+++“ = hohe Expression; n.u. = nicht untersucht. Adaptiert von Himbert *et al.* [278]

Fallnummer	Zellen				Exosomen			
	CA9	CD147	CD70	EpCAM	CA9	CD147	CD70	EpCAM
NTB1126	n.u.	+	+	n.u.	+	-	-	-
NTB1302	++	+	-	n.u.	+	+++	-	n.u.
NTB1161	n.u.	+	+	n.u.	-	-	-	-
NTB1175	+	+	+	-	+	++	+	-

4.3 Immunhistochemie Gewebe

Um den zellulären Ursprung der analysierten Markerproteine zu identifizieren, wurde eine Immunhistochemie (IHC) an einer größeren Serie (n = 13) von Patienten mit einem klarzelligen Nierentumor durchgeführt, einschließlich der entsprechenden Gewebeschnitte, die durch Western-Blotting analysiert wurden (Abbildung 25). Die Erhebung sowie quantitative und qualitative Analyse der Daten wurde durch Herrn Dr. med. Philip Zeuschner durchgeführt.

Tabelle 28: Quantifizierung und Vergleich von Expressionsmustern in Gewebeproben. Gewichtung: „-“ = keine Expression; „+“ = niedrige Expression; „++“ = moderate Expression; „+++“ = hohe Expression. Erhebung, sowie quantitative und qualitative Analyse der Daten durch Herrn Dr. med. Philip Zeuschner. n.u. = nicht untersucht

Fall	EpCAM				CD147				CA9				CD70			
	Tumor		Tubuli		Tumor		Tubuli		Tumor		Tubuli		Tumor		Tubuli	
NTB	%	Intensität	%	Intensität												
1194	0	0	40	++	10	+	10	++	100	+++	80	++	40	+	0	0
1132	60	++	0	0	20	++	0	0	100	+++	0	0	70	++	0	0
1160	70	++	100	++	30	++	30	+	100	+++	40	0	70	++	0	0
1304	0	0	50	+	70	++	0	0	100	+++	20	+	90	++	0	0
1233	60	++	80	++	10	++	70	++	100	+++	50	+	0	0	0	0
1125	70	++	100	+++	20	++	0	0	100	+++	0	0	80	+	0	0
1288	30	++	90	+++	30	++	30	++	100	+++	60	++	70	++	0	0
1161	40	++	70	++	20	++	20	+	90	+++	20	+	20	+	0	0
1302	50	++	80	++	80	++	20	++	100	+++	30	+	90	++	0	0
1272	30	++	30	++	60	++	0	0	100	+++	40	++	70	++	0	0
1208	20	++	20	++	60	++	20	+	40	++	20	+	0	0	0	0
1197	10	+	40	++	20	++	0	0	80	++	10	+	70	++	0	0
1175	20	++	80	++	90	+++	10	+	100	+++	40	+	80	+++	0	0

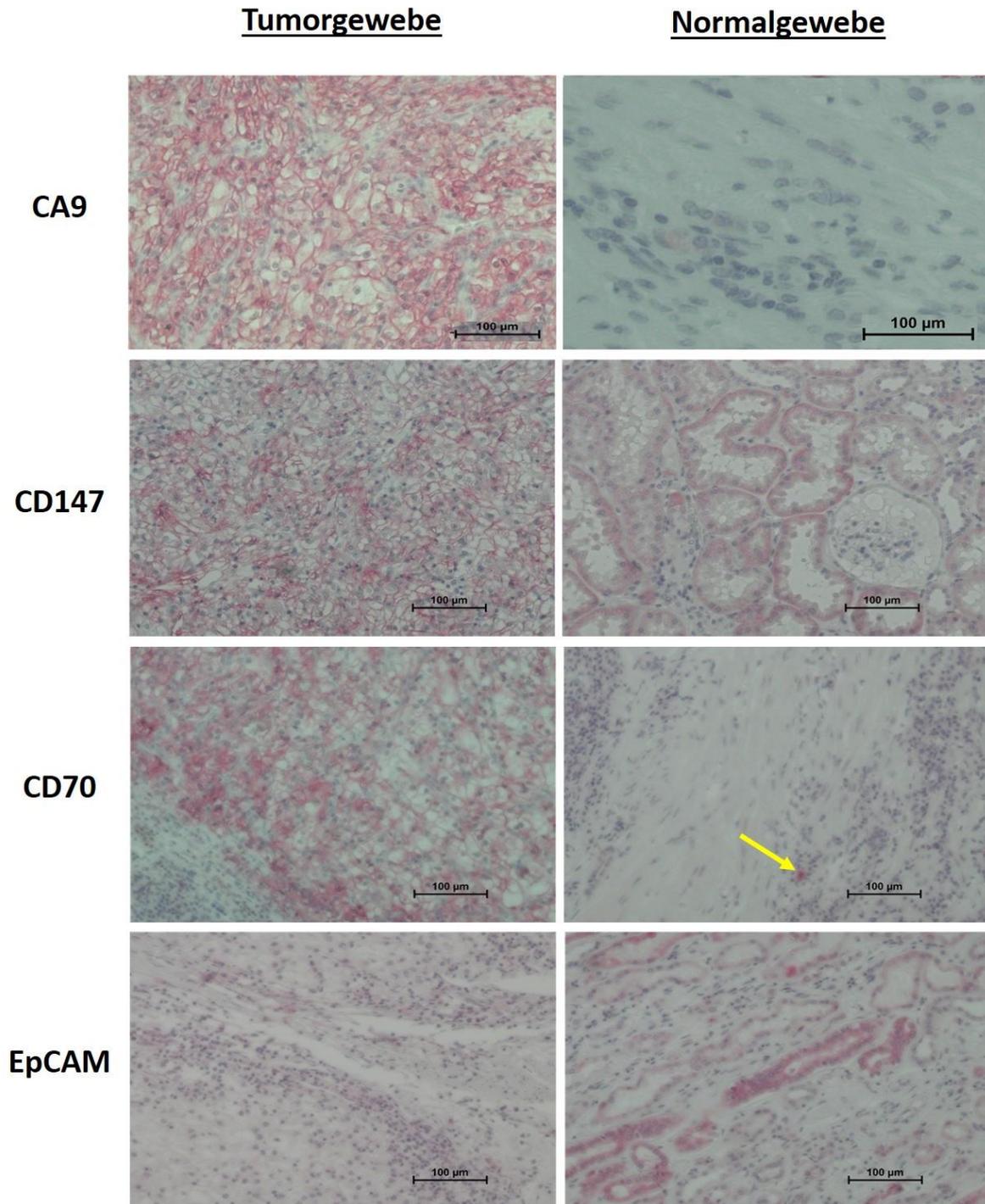


Abbildung 25: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung von Tumormarkern (CA9, CD147, CD70 und EpCAM) auf formalinfixierten, paraffin-eingebetteten (FFPE) Schnitten von Tumor- und normalen Primärgewebebeobachten von Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom (ccRCC=*clear cell renal cell carcinoma*). Gelber Pfeil zeigt eine infiltrierende Immunzelle an. Maßstabsbalken = 100 µm. Färbung und Dokumentation der IHC-Daten durch Herrn Dr. med. Philip Zeuschner. Adaptiert von Himbert *et al.* [278]

CA9 wurde in allen Fällen in Tumorzellen stark exprimiert und in normalem Gewebe mäßig exprimiert, was die Western-Blot-Ergebnisse bestätigt. Die Tumorzellen zeigten eine gleichmäßige intensive Färbung von CA9. In normalen Zellen wurde die Expression in 11 von

13 Fällen durch IHC überwiegend mit geringer oder mäßiger Expression nachgewiesen (Tabellen 28 und 29).

CD147 wurde im Normalgewebe in Nierentubuli und in Tumorzellen exprimiert. Es wurde eine höhere Signalintensität in Tumorzellen nachgewiesen. Sowohl Tumor- als auch Normalgewebe zeigten eine homogene Färbung. In den Tumorzellen wurde CD147 in allen Fällen durch IHC (moderate Färbung) nachgewiesen, wie es auch im Western Blot gezeigt wurde. In Normalgewebe wurde eine Expression in 8 von 13 Fällen durch IHC nachgewiesen, überwiegend mit schwacher Expression, was die Western-Blot-Ergebnisse bestätigte (Tabellen 28 und 29).

CD70 wurde in allen Fällen in Tumorzellen stark exprimiert, jedoch nicht in normalem Gewebe (Tabellen 28 und 29). Infiltrierende Immunzellen in normalen Geweben zeigten ein starkes CD70-Signal (Abbildung 25, gelber Pfeil).

EpCAM wurde in normalen Tubulus- und Tumorzellen auf einem ähnlichen, heterogenen Expressionsniveau exprimiert. Einige Proben hatten ein sehr schwaches oder kein Signal innerhalb von Tumoren, im Gegensatz zu angrenzendem Normalgewebe mit einer in einigen Fällen sehr ausgeprägten Expression (Tabelle 27). In den Tumorzellen wurde in 11 von 13 Fällen eine mäßige oder starke Expression von EpCAM durch IHC nachgewiesen. Es wurden 12 von 13 Normalgewebeproben mit unterschiedlichen Intensitäten EpCAM-positiv gefärbt (Tabellen 28 und 29).

Tabelle 29: Histopathologische Eigenschaften und Western-Blot-Ergebnisse von Tumorgewebeproben. Semiquantitative Auswertung: „-“ = keine Expression; „+“ = geringe Expression; „++“ = gemäßigte Expression; „+++“ = hohe Expression; n.b. = nicht bestimmt. TNM = Tumorknotenmetastasen-Klassifikation maligner Tumoren. Erhebung, sowie quantitative und qualitative Analyse der Daten durch Herrn Dr. med. Philip Zeuschner. Adaptiert von Himbert *et al.* [278]

Fallnummer	Zellen				Exosomen				TNM	Grad
	CA9	CD147	CD70	EpCAM	CA9	CD147	CD70	EpCAM		
NTB1126	<i>n.b.</i>	+	+	<i>n.b.</i>	+++	+	-	-	pT3acN0cM0	unbekannt
NTB1302	+++	++	+	<i>n.b.</i>	+++	+++	-	<i>n.b.</i>	pT3acN0cM0	G3
NTB1161	<i>n.b.</i>	+	+	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	+	-	<i>n.b.</i>	pT1bcN0cM0	G2
NTB1208	+	+	+	+	++	+	++	+	pT4cN0cM1	G3
NTB1175	++	+	+	-	+++	++	++	-	pT3acN0cM0	G3
NTB1288	++	+	+	-	++	+	+++	-	pT3acN0M0	G3
NTB1304	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	++	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	++	pT3bpN0M0	G2
NTB1132	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	+	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	+++	pT1bcN0cM0	G2
NTB1197	++	+	+	+	+++	+++	+++	++	pT1bcN0cM0	G2
NTB1272	+++	+	+	++	+++	++	++	+	pT1bcN0cM0	G2

4.4 Plasma-Exosomen

Die nachfolgend gezeigten Daten zu Exosomen in Plasma wurden in Kooperation mit Frau Jadzia Sonnleithner, und im Rahmen der Arbeiten für das Promotionsprojekt von Frau Jadzia Sonnleithner über PD-L1 auf Plasmaexosomen, erhoben. Es werden ausschließlich solche Daten gezeigt, die dazu geeignet sind, die in dieser Dissertation über die Etablierung eines Verfahrens zur Anreicherung von Extrazellulären Vesikel bisher gewonnenen Daten und Erkenntnisse über tumorspezifische Marker (CD147, CD70, CA9) auf Exosomen in urologischen Tumoren in einen größeren Zusammenhang zu setzen und einordnen zu können.

4.4.1 NTA bei Plasma-Exosomen

Im Blutplasma von drei ausgewählten Patienten mit Nierenzellkarzinom wurde die NTA entweder nach der Behandlung des Plasmas mit einem Exosomen-Präzipitationskit oder Ultrazentrifugation durchgeführt. Es zeigten sich sowohl beim Vergleich zwischen Kit und Ultrazentrifugation als auch beim Vergleich der drei Patientenproben Unterschiede in der Größenverteilung der isolierten Partikel (Abbildung 26).

Tabelle 30: Berechnung der Partikelkonzentrationen gemittelt über drei Einzelmessungen mit je 30 Sekunden Messdauer. Gemessen wurden Exosomensuspensionen aus Blutplasma von drei Fällen mit diagnostiziertem Nierenzellkarzinom. Vergleich von Exosomen aus Ultrazentrifugation mit Exosomen nach Behandlung mit einem Isolationskit für Blutplasmaexosomen.

	Fall 1		Fall 2		Fall 3	
Maxima	Kit	UZ	Kit	UZ	Kit	UZ
1	60 nm	52 nm	31 nm	47 nm	28 nm	169 nm
2	117 nm	96 nm	48 nm	87 nm	47 nm	426 nm
3	169 nm	151 nm	80 nm	165 nm	76 nm	483 nm
4	271 nm	165 nm	103 nm	196 nm	109 nm	577 nm
5	-	252 nm	206 nm	235 nm	170 nm	778 nm
6	-	-	233 nm	328 nm	190 nm	-
7	-	-	264 nm	593 nm	392 nm	-
8	-	-	345 nm	-	-	-
9	-	-	476 nm	-	-	-
10	-	-	837 nm	-	-	-

Tabelle 31: Berechnung der Partikelkonzentrationen gemittelt über drei Einzelmessungen mit je 30 Sekunden Messdauer. Gemessen wurden Exosomensuspensionen aus Blutplasma von drei Fällen mit diagnostiziertem Nierenzellkarzinom. Vergleich von Exosomen aus Ultrazentrifugation mit Exosomen nach Behandlung mit einem Isolationskit für Blutplasmaexosomen. Angabe der Partikelkonzentrationen in Partikel/ml. Die Werte wurden aus Abbildung 26 entnommen und entsprechend ihrer Verdünnung auf die Konzentration in einem Milliliter umgerechnet

	Fall 1		Fall 2		Fall 3	
Max	Kit	UZ	Kit	UZ	Kit	UZ
1	$2,8 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^{10}$	$0,2 \times 10^{10}$	$2,6 \times 10^9$	$1,4 \times 10^{10}$	$2,05 \times 10^{10}$
2	$0,5 \times 10^{10}$	$0,4 \times 10^{10}$	$0,15 \times 10^{10}$	$0,5 \times 10^9$	$3,1 \times 10^{10}$	$0,2 \times 10^{10}$
3	$0,3 \times 10^{10}$	$0,3 \times 10^{10}$	$0,24 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^9$	$2,7 \times 10^{10}$	$0,1 \times 10^{10}$
4	$0,1 \times 10^{10}$	$0,1 \times 10^{10}$	$0,62 \times 10^{10}$	$1,1 \times 10^9$	$1,2 \times 10^{10}$	$<0,01 \times 10^{10}$
5	-	$<0,01 \times 10^{10}$	$<0,01 \times 10^{10}$	$0,8 \times 10^9$	$0,6 \times 10^{10}$	$<0,01 \times 10^{10}$
6	-	-	$<0,01 \times 10^{10}$	$0,5 \times 10^9$	$0,15 \times 10^{10}$	-
7	-	-	$<0,01 \times 10^{10}$	$0,1 \times 10^9$	$<0,01 \times 10^{10}$	-
8	-	-	$<0,01 \times 10^{10}$	-	-	-
9	-	-	$<0,01 \times 10^{10}$	-	-	-
10	-	-	$<0,01 \times 10^{10}$	-	-	-

Somit betrug der Verlust an Partikeln durch die Ultrazentrifugation 35,1 - 74,3 % verglichen mit der Kit-Isolation. Die Größen und Konzentrationen der isolierten Partikel unterschieden sich sowohl zwischen den Isolationsmethoden als auch zwischen den Fällen.

Im direkten Vergleich der beiden Methoden war die Kit-Methode effizienter darin möglichst viele Partikel aus der Lösung zu isolieren. Bezüglich der Qualität, also bezogen auf die effektive Isolierung von Partikeln, die im Größenbereich von Exosomen liegen [88], wurden durch die UZ-Methode tendenziell größere Partikel isoliert. (Abbildung 26, Tabellen 30 und 31).

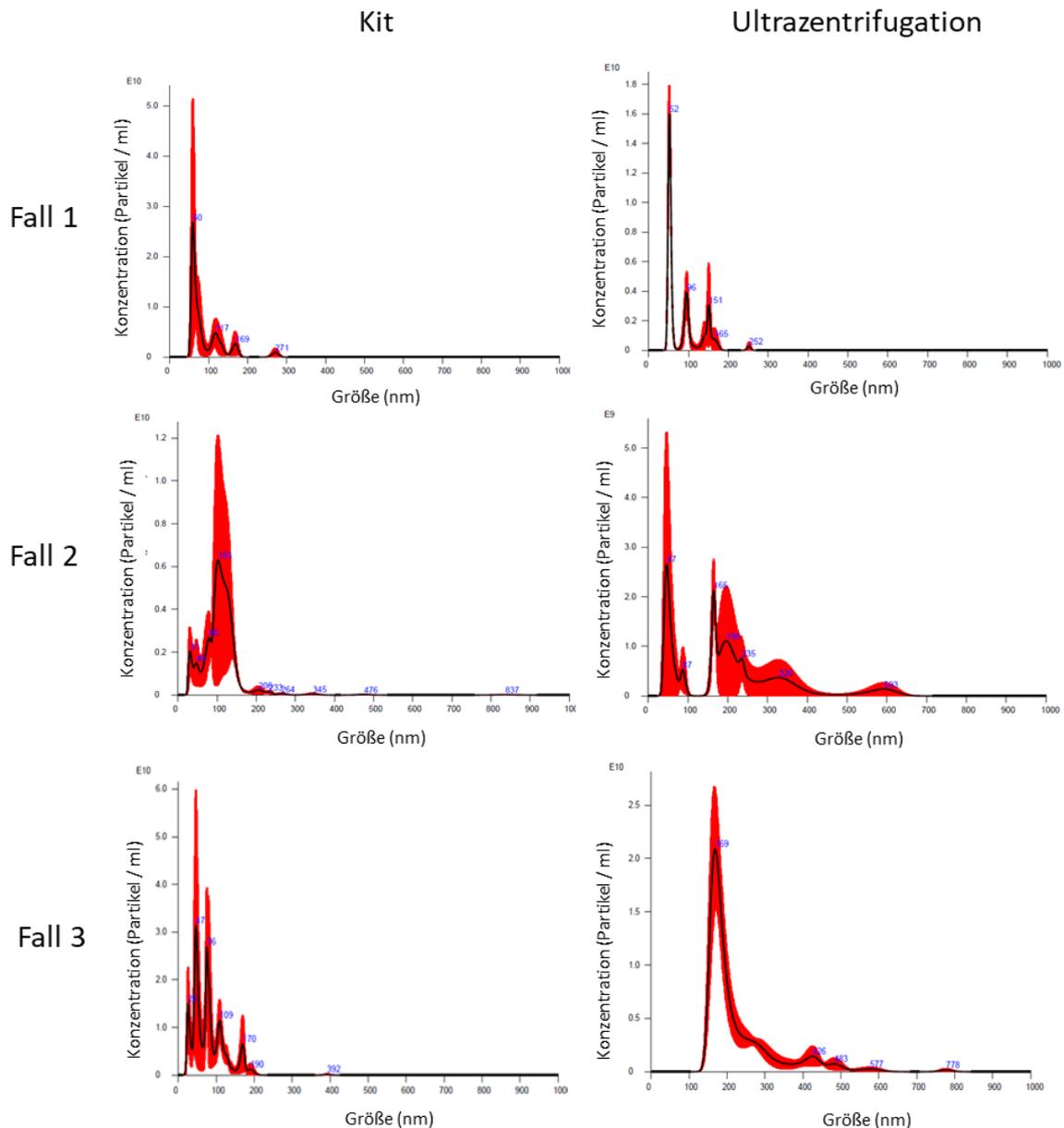


Abbildung 26: Untersuchung des Verdünnungseffektes auf die Ergebnisse des Nanotracking-Analyseverfahrens (NTA). Bestimmung von Größe und Größenverteilung von Exosomen aus Plasma von Patienten mit diagnostiziertem Nierenzellkarzinom (drei Fälle: Fall 1 = 1197, Fall 2 = 1302, Fall 3 = 1208). Fall 1 und 2 in 1:100-Verdünnung, Fall 3 in 1:500-Verdünnung. Vergleich zweier Isolationsmethoden (Präzipitationskit, Ultrazentrifugation).

Quantitativ scheint die Kit-Methode der UZ-Methode im Vorteil zu sein (Abbildung 26, Tabellen 30 und 31). Qualitativ zeigten die NTA-Daten bessere Ergebnisse durch die Kit-Methode, während die TEM-Aufnahmen auf eine höhere Qualität durch die UZ-Methode hindeuteten (Abbildung 27). Aufgrund der geringen Probenanzahl weisen diese Ergebnisse auf eine Tendenz hin. Für eine valide Aussage über Effizienz und Effektivität dieser Methoden bedarf es einer belastbaren Datengrundlage und damit mehr zu untersuchende Proben.

4.4.2 TEM von Plasma-Exosomen

Die Bildung mittels Transelektronenmikroskopie (TEM) zeigte, dass nach Behandlung des Blutplasmas mit dem Exosomen-Präzipitationskit eine hohe Konzentration an Partikeln mit einer Größe von unter 100 nm isoliert wurden. Dabei wurden hauptsächlich kleinste Partikel mit einem Durchmesser von unter 30 nm und solche mit einem Durchmesser zwischen 30 – 100 nm nachgewiesen. Nach der Ultrazentrifugation wurde auf den TEM-Aufnahmen eine hohe Konzentration von Partikeln mit einer Größe von 30 – 100 nm nachgewiesen. Diese Partikel wiesen eine sphärische Struktur und eine Doppelmembran auf. Vereinzelt waren unspezifische Ablagerungen auf dem kohlebeschichteten Kupfergitter erkennbar (Abbildung 27).

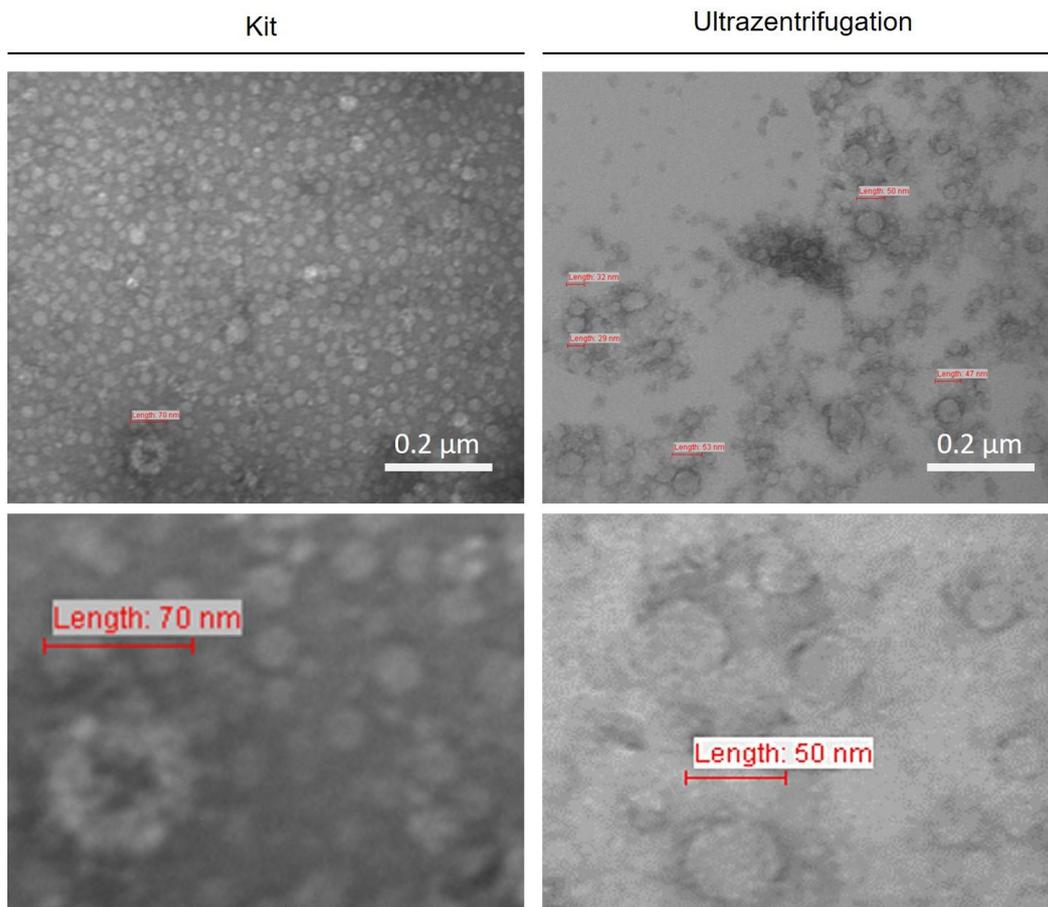


Abbildung 27: Transelektronenmikroskopie (TEM). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Exosomenproben aus Blutplasma nach Behandlung mit einem Präzipitationskit für Exosomen aus Plasma, und nach Ultrazentrifugation. Obere Reihe: Übersichtsaufnahme. Untere Reihe: Detailaufnahme

4.5 Chip-Technik

Die Quantifizierung der Detektionssignale zeigte, dass die Anzahl der detektierten Exosomen abhängig von der Verdünnung der Probe, der Probenherkunft (Plasma oder Zellkulturüberstand nach Ultrazentrifugationsprotokoll) oder den verwendeten Fluoreszenzantikörpern (Tetraspaninmarker oder Tumormarker) war (siehe Anhang, Abbildung 51). Neben der Ultrazentrifugation und der Kit-Isolation ist die Chip-Technik die dritte Methode für die Isolierung von EVs und eignet sich zusätzlich für die biochemische Charakterisierung. Die verschiedenen Methoden zur Isolierung und anschließender Untersuchung der isolierten Vesikel führten zu ähnlichen Ergebnissen im Bezug auf deren Größe. Die Betrachtung des kompletten Spektrums und der Größenverteilung aber offenbarte Unterschiede, die sich auf die Methode der Bildgebung (NTA oder TEM) oder der Isolierung (UZ oder Nano-Chip) zurückführen lassen (siehe Anhang, Abbildung 49).

4.5.1 Etablierung an Zelllinien von Nierenzellkarzinom und Prostatafibroblasten

Durch den Einsatz von Chips, die gezielt mit Antikörpern gegen exosomen-typische (CD63, CD81, CD9) oder andere Proteine (PSMA, CD147) beschichtet wurden, konnten kleinste Partikel aus biologischen Proben isoliert werden. Nachfolgend wurden diese abgefangenen Partikel hinsichtlich ihrer Größe, Größenverteilung und ihrer Oberflächenproteine untersucht. Alle biologischen Proben stammten aus Zellkulturüberständen, die das Protokoll der Ultrazentrifugation zur Isolierung von extrazellulären Vesikeln durchlaufen hatten (Details siehe Kapitel 3.3.1). Für die Etablierung dieser Methode wurden zunächst Exosomenproben der Zelllinien 786-O, Caki2, PNF und PTF vorisoliert und dann jeweils auf einen Chip aufgetragen (Details siehe Kapitel 3.5.2). Auf jedem einzelnen Chip befanden sich voneinander abgegrenzte Antikörperpunkte, auf denen Antikörper gegen die exosomalen Proteine CD63, CD81, CD9, gegen PSMA oder gegen IgG aufgedruckt waren.

Die Rohdaten wurden in Zusammenarbeit mit Frau Jacqueline Kessler von der Universität des Saarlandes sowie Andrew Malloy und George Daaboul von der Firma Nanoview Biosciences erhoben.

Die Signale für EpCAM auf den Prostatafibroblasten wiesen auf eine Übersättigung der Exosomensubpopulationen mit Exosomenmarkern oder auf die Übersättigung der Tetraspaninbindungsstellen mit Exosomen hin (Anhang, Abbildung 51).

Dabei hatten an den exosomalen Antikörpern Partikel von allen vier verwendeten Zelllinien gebunden, während an dem Antikörper gegen das prostata-spezifische Protein PSMA ausschließlich Partikel der Prostatafibroblastenzelllinien PNF und PTF gebunden hatten. Die Isotopenkontrolle zeigte, dass nur wenige extrazelluläre Vesikel durch unspezifische

Bindungen auf dem Chip gebunden hatten. Bei Caki2, PNF und PTF waren CD81 und CD9 in etwa gleich häufig vertreten. Bei 786-O, Caki2 und PTF waren CD63-positive Exosomen am häufigsten vertreten. Bei 786-O war die Verteilung der tetraspanin-positiven Subpopulationen sehr heterogen, bei PNF sehr homogen (Abbildung 28).

Im nächsten Schritt wurden Zellkulturüberstände vor Ultrazentrifugation, nach Ultrazentrifugation (=Exosomenprobe) und Blutplasma von Patienten mit Nierenzellkarzinom an dem System getestet und die Ergebnisse dokumentiert. Die Färbung mit fluoreszierenden Tetraspanin-Antikörpern ermöglicht die Quantifizierung aller Tetraspanin-positiven Partikel, unabhängig von ihrer Größe. Jedes Partikel, das eines der drei exosomalen Marker (CD63, CD81 oder CD9) exprimiert, wurde gezählt. Die Konzentration an Tetraspanin-positiven Vesikeln in den gereinigten Vesikelproben im Vergleich zu den Überständen war 1000-mal höher. Der Tetraspanin-Phänotyp der beiden Proben blieb nach der Reinigung konsistent, was darauf hindeutet, dass die Zentrifugation nicht zum Verlust einer spezifischen Tetraspanin-EV-Subpopulation führt (Abbildung 29).

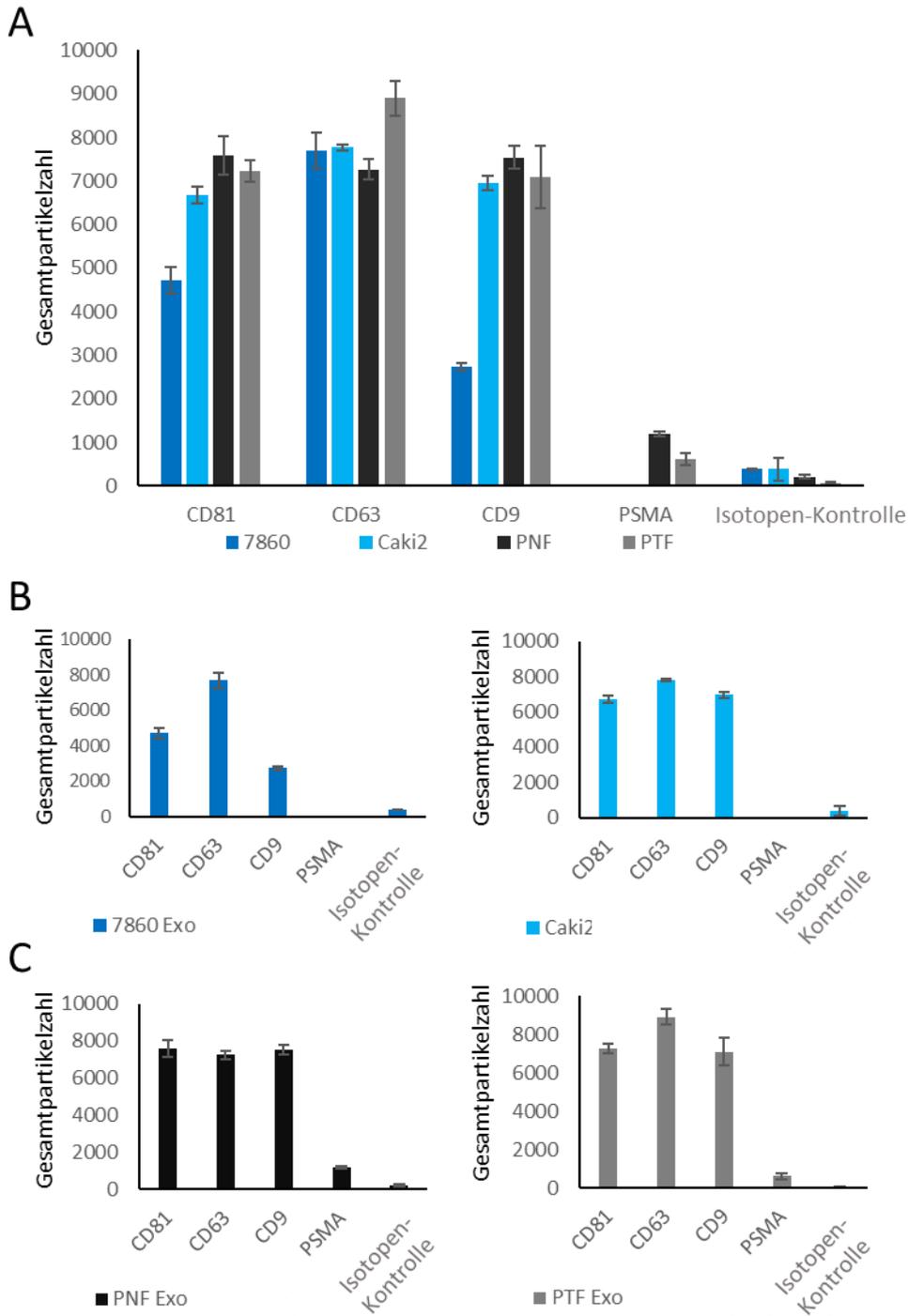


Abbildung 28: Bestimmung der Gesamtpartikelzahl von Exosomenisolaten der Nierenzellkarzinomzelllinien 786-O und Caki2, sowie der Prostatafibroblastenzelllinien PNF und PTF. Exosomenpopulationen wurden mittels Antikörper gegen CD81, CD63, CD9, PSMA, die auf dem Chip aufgebracht waren, aus der Exosomensuspension isoliert. Exosomensuspensionen wurden aus Zellkulturüberständen durch Ultrazentrifugation gewonnen. A: Gesamtbild/ Übersicht. B, C: Einzelübersichten der Partikelzählungen der einzelnen Zelllinienexosomen.

4.5.2 Vergleich zwischen Zellkulturüberständen, isolierten Exosomenproben und unbehandelten Plasmaproben

Zur weiteren Etablierung der Methode wurden Proben von Zellkulturüberständen (786-O, Caki2), Exosomenproben aus Zellkultur nach Ultrazentrifugation (786-O, Caki2), sowie unbehandelte Plasmaproben von zwei Patienten mit Nierenzellkarzinom (NTB1197, NTB1208) getestet. Es wurden die vom Chiphersteller etablierten Fluoreszenzantikörper gegen die drei Exosomenmarker CD63, CD81 und CD9, sowie der eigens bestellte Fluoreszenzantikörper gegen den Tumormarker CD147 getestet. Dabei wurden auch die Verdünnungen für die einzelnen Probenotypen getestet (Tabelle 6, Seite 46).

Die Proben wurden an die europäische Niederlassung der Firma *NanoView Bioscience* in England geschickt und nach Absprache analysiert. Die Daten wurden von der Firma bereitgestellt. Verantwortliche dort war Frau Alex Shephard.

4.5.2.1 Vergleich der Expression von Tetraspaninen auf Exosomen aus Plasma und Zellkultur

Die gemessenen Partikelgrößen aus den Zellkulturüberständen lagen zwischen 56 – 62 nm, die der entsprechenden Exosomensuspensionen aus UZ lagen zwischen 58 – 65 nm und waren damit etwas größer. Die Partikelgrößen der fixierten Exosomen aus Plasmaproben waren mit 61 – 80 nm noch etwas größer (Abbildung 29, A1 und A2, B1 und B2, C1 und C2). Die Partikel lagen demnach, unter Berücksichtigung der geringen Stichprobengröße (n=2), nah beieinander.

Die Quantifizierung der Häufigkeiten von tetraspanin-positiven Partikeln zeigte die Anzahl der positiven Signale für jedes exprimierte Protein. Die Exosomen aus Plasmaproben hoben sich durch eine hohe Zahl von CD9-positiven Partikeln von den Zellkulturproben ab und lagen mit ihrer Gesamtpartikelzahl zwischen den Zellkulturüberständen und den Exosomensuspensionen nach UZ. Die Verteilung der Subpopulationen in Proben der Zelllinien 786-O und Caki2 war nahezu identisch, unterschied sich aber in absoluten Partikelzahlen um mehrere Größenordnungen (Abbildung 29, D und E).

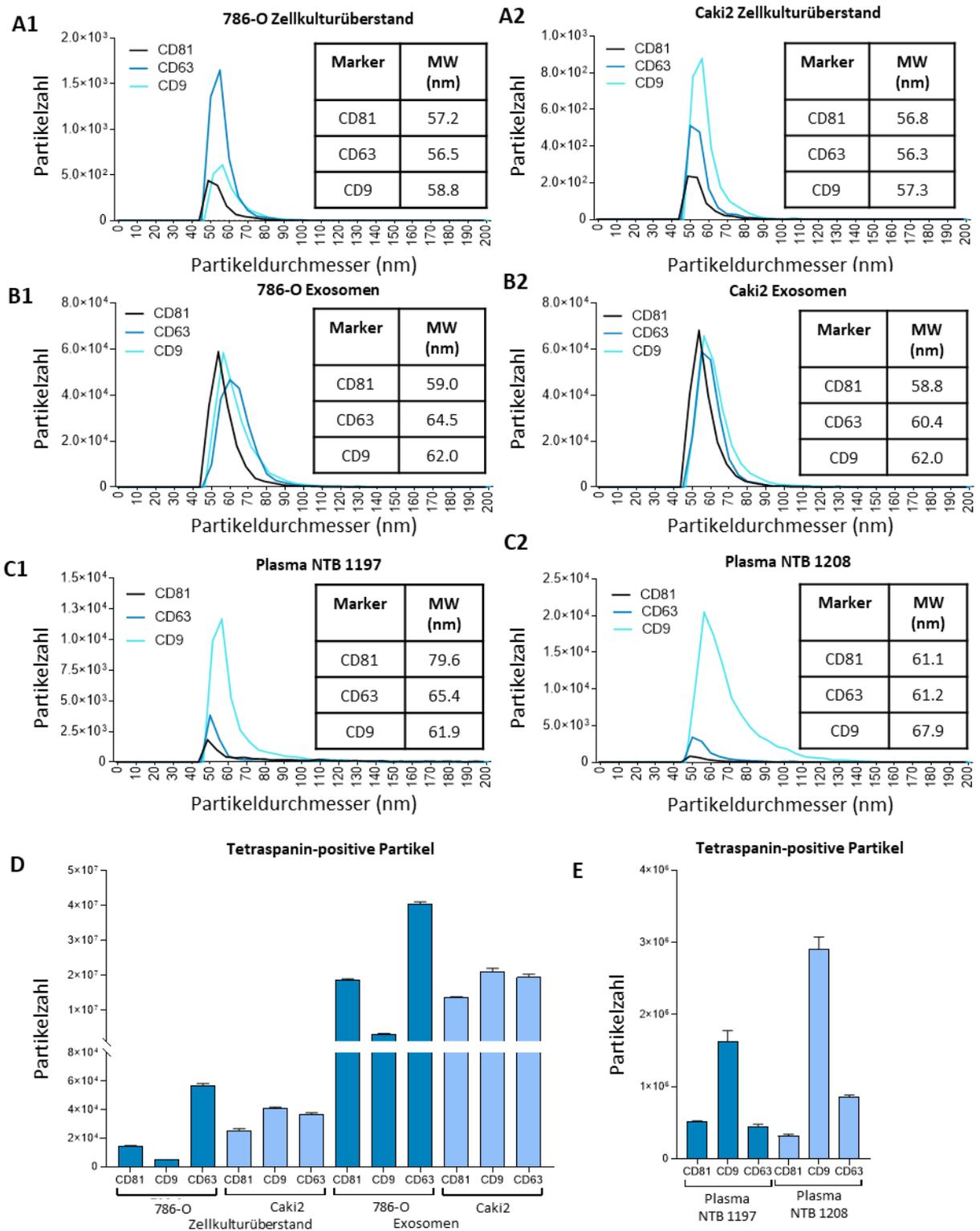


Abbildung 29: Charakterisierung von Exosomen nach Fixierung auf, mit Antikörpern gegen Exosomenmarker (CD81, CD9, CD81) dotierten, Nano-Chips. Verwendet wurden Zellkulturüberstände und durch Ultrazentrifugation gewonnene Exosomen von zwei Nierenzellkarzinomzelllinien (786-O, Caki2). Weiter wurden Plasmaproben von zwei Patienten (NTB1197 / 1208) mit diagnostiziertem Nierenzellkarzinom verwendet. A-C: Bestimmt wurden Größe und Größenverteilung der Exosomen aus Zellkulturüberständen (A1, A2), Exosomensuspensionen (B1, B2), und Plasmaproben, mittels differenzieller Lichtstreuung.

Zu Abbildung 29: Berechnet wurde zudem die mittlere Größe der Vesikel auf den einzelnen Antikörperstellen (=MW). D, E: Charakterisierung von Exosomen auf CD9-Dotierungsstelle. Nachweis der Expression von Tetraspaninen (CD81, CD9, CD81) in Zellkulturüberständen und Exosomensuspensionen von 786-O und Caki2 (D), sowie in zwei Plasmaproben (E), mittels fluoreszierender Antikörper. MW=Mittelwert

4.5.2.2 Vergleich der Expression und Kolo-kalisation von CD147 auf Exosomen

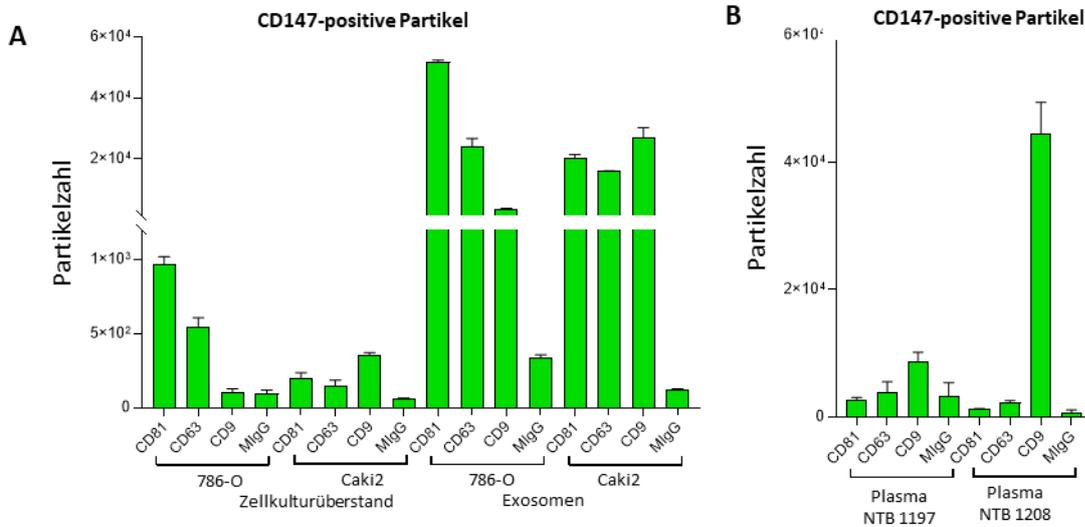


Abbildung 30: Expression von CD147 auf CD81-positiven, CD63-positiven und CD9-positiven Exosomen. MlgG=Negativkontrolle. A: Detektion von CD147 auf Exosomenpopulationen aus Zellkulturüberständen von Nierenzellkarzinomzelllinien (786-O, Caki2) ohne Ultrazentrifugation (=Zellkulturüberstand) und nach Ultrazentrifugation (=Exosomen). B: Detektion von CD147 auf Exosomen aus Plasmaproben von zwei Patienten (NTB1197 / 1208) mit diagnostiziertem Nierenzellkarzinom.

Die Quantifizierung des prozentualen Anteils der Ko-Expression von CD147 (Abbildung 31, A1 -A3; B1 – B3) verdeutlichte, dass der Isolationsprozess einen Effekt auf die Häufigkeit von CD147-positiven Exosomen hatte und dass der prozentuale Anteil von CD147 auf den tetraspanin-positiven Subpopulationen in den Proben aus Zellkulturüberständen höher war als in den Proben aus den Exosomen-Isolaten. Die Ko-Expression von CD147 und Tetraspaninen war in Plasmaproben stark patientenabhängig.

Die Quantifizierung der Häufigkeiten von CD147-positiven Partikeln zeigte die Anzahl der positiven Signale für jedes exprimierte Protein (Abbildung 30, A und B). Die Verteilung der Exosomensubpopulationen die CD147 exprimierten war zwischen den korrespondierenden Zellkulturüberständen und Exosomensuspensionen nach UZ sehr ähnlich. Sie unterschied sich, analog zu den Ergebnissen aus Kapitel 4.5.2.1, in absoluten Partikelzahlen, die um mehrere Größenordnungen auseinander lagen (Abbildung 30, A). In den Plasmaproben war eine sehr starke Kolo-kalisation von CD147 mit CD9 zu erkennen (Abbildung 30, A; 31, B2).

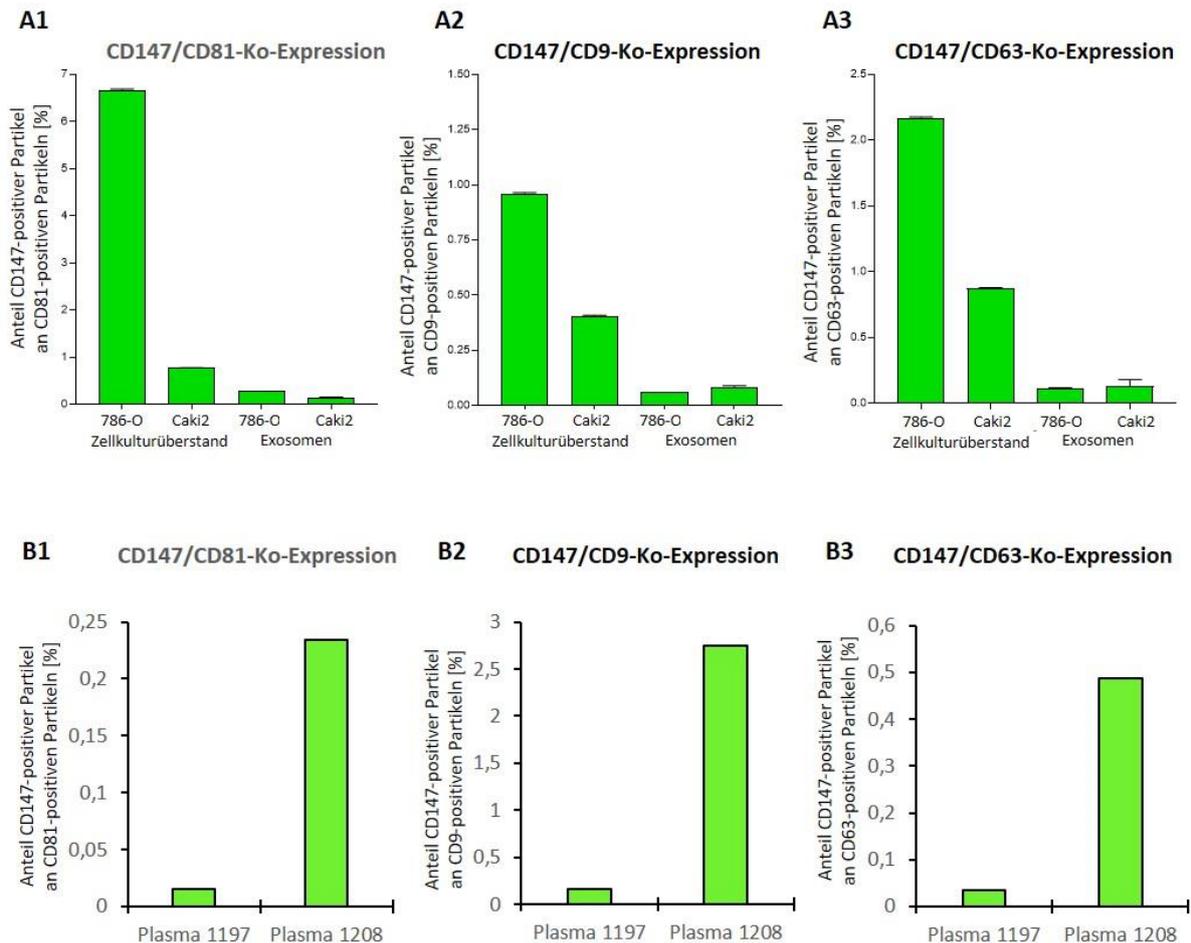


Abbildung 31: Ko-Expression von CD147. A: Ko-Expression von CD147 auf CD81-positiven (A1), CD9-positiven (A2) und CD63-positiven (A3) Exosomen aus Zellkulturüberständen, sowie Exosomensuspension gewonnen durch Ultrazentrifugation von Zellkulturüberständen, der Nierenzellkarzinomzelllinien 786-O und Caki2. B: Ko-Expression von CD147 auf CD81-positiven (B1), CD9-positiven (B2) und CD63-positiven (B3) Exosomen aus Plasmaproben zweier Patienten mit diagnostiziertem Nierenzellkarzinom (Plasma 1197/1208).

4.5.3 Expression und Kolokalisation von Tetraspaninen und Tumormarkern auf Exosomen aus Blutplasma und Zellkultur mit Bezug zum klarzelligen Nierenzellkarzinom

Zur weiteren Etablierung der Methode wurde der Versuch mit Exosomenproben aus Zellkultur nach Ultrazentrifugation (Caki2) sowie unbehandelten Plasmaproben von fünf Patienten mit diagnostiziertem Nierenzellkarzinom (Plasma 1-5) wiederholt. Es wurden die vom Chiphersteller etablierten Fluoreszenzantikörper gegen die drei Exosomenmarker CD63, CD81 und CD9, sowie der eigens bestellt Fluoreszenzantikörper gegen die Tumormarker CD147, CA9 und PD-L1 getestet. Dabei wurden auch die Verdünnungen für die einzelnen Proben typen getestet (Tabelle 7, Seite 47).

Anders als in Kapitel 4.5.2 wurde der Versuch und die Auswertung von Anfang bis Ende in Eigenregie durchgeführt. Dazu wurde ein Kit mit einem Chipsatz von 16 Nano-Chips samt den erforderlichen Chemikalien und Antikörpern beim Hersteller (siehe Kapitel 3.9) bestellt und der

Versuch an dem für diese Technik essenziellen Gerät (siehe Kapitel 3.7) bei den Kolleginnen und Kollegen des Forschungslabors iLung der Universität Marburg durchgeführt.

Die gewonnenen Daten wurden mit der Analysesoftware des Herstellers qualitativ und quantitativ ausgewertet. IM (Interferenzmikroskopie) bezog sich dabei auf Partikel, die mittels dieser Technik detektiert wurden, aber keine der Exosomenmarker aufwiesen.

4.5.3.1 Vergleich der Expression und Kollokalisierung von Tetraspaninen auf Exosomen aus Blutplasma

Der Einsatz von Plasma in einem Verdünnungsverhältnis von 1:25 zeigte auf den CD63-dotierten, CD81-dotierten und CD9-dotierten Chip-Bereichen sehr viele, sehr intensive Signale, die den kompletten Beobachtungsbereich fast lückenlos ausfüllten. Auf dem MIgG-dotierten Bereich wurden vereinzelte, zum Teil sehr intensive Signale, vor allem für CD9-positive Partikel, beobachtet (Abbildung 32, Fluoreszenzaufnahmen, linke Spalte). Details sind der Abbildung 32, Tortendiagramme für Chip 40, zu entnehmen.

Der Einsatz von Plasma in einem Verdünnungsverhältnis von 1:125 auf den CD63-dotierten, CD81-dotierten und CD9-dotierten Chip-Bereichen führte zu vielen, intensiven Signale, die den kompletten Beobachtungsbereich ausfüllen. Im Vergleich zur 1:25-Verdünnung war die Signaldichte und damit die Intensität der Fluoreszenzsignal weit weniger hoch. Auf dem MIgG-dotierten Bereich wurden vereinzelte, wenig intensive Signale, vor allem für CD9-positive Partikel, beobachtet (Abbildung 32, Fluoreszenzaufnahmen, rechte Spalte). Die Sättigung der Tetraspaninbindungsstellen lag im Falle der 1:125 verdünnten Probe bei $3\text{-}4 \times 10^5$ Vesikel, während im Falle der 1:25 verdünnten Probe $3,1\text{-}5,2 \times 10^5$ Vesikel auf der gleichen Fläche gebunden hatten. Ebenso banden nach 1:25-Verdünnung doppelt so viele Partikel auf der MIgG-Bindungsstelle (Tabelle 32).

Tabelle 32: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaprobe in 1:125- und 1:25-Verdünnung (Abbildung 33, Chip 49, 40).

Verdünnung	CD63-Dotierung	CD81-Dotierung	CD9-Dotierung	MIgG-Dotierung
1:125	3×10^5 Partikel	3×10^5 Partikel	4×10^5 Partikel	$0,15 \times 10^5$ Partikel
1:25	$3,1 \times 10^5$ Partikel	$4,8 \times 10^5$ Partikel	$5,2 \times 10^5$ Partikel	$0,3 \times 10^5$ Partikel

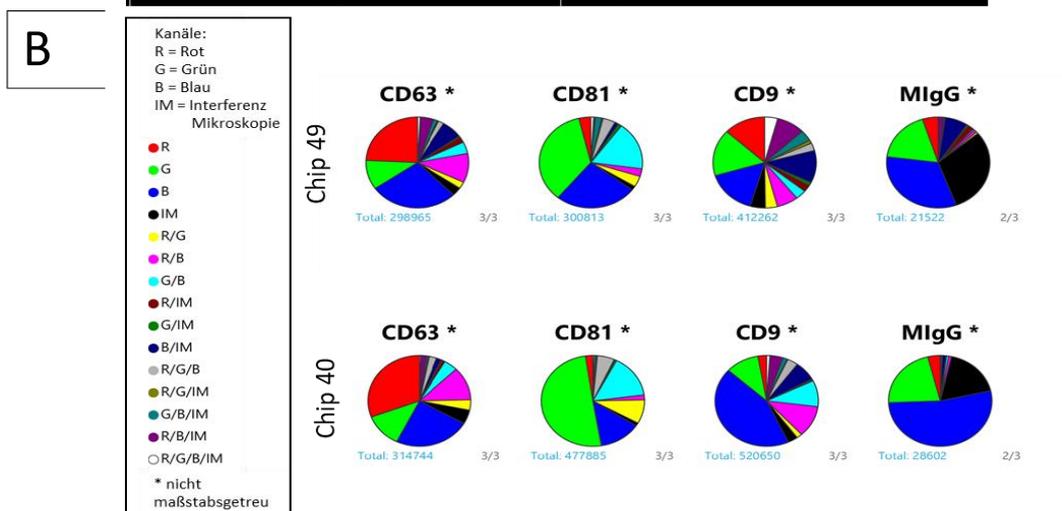
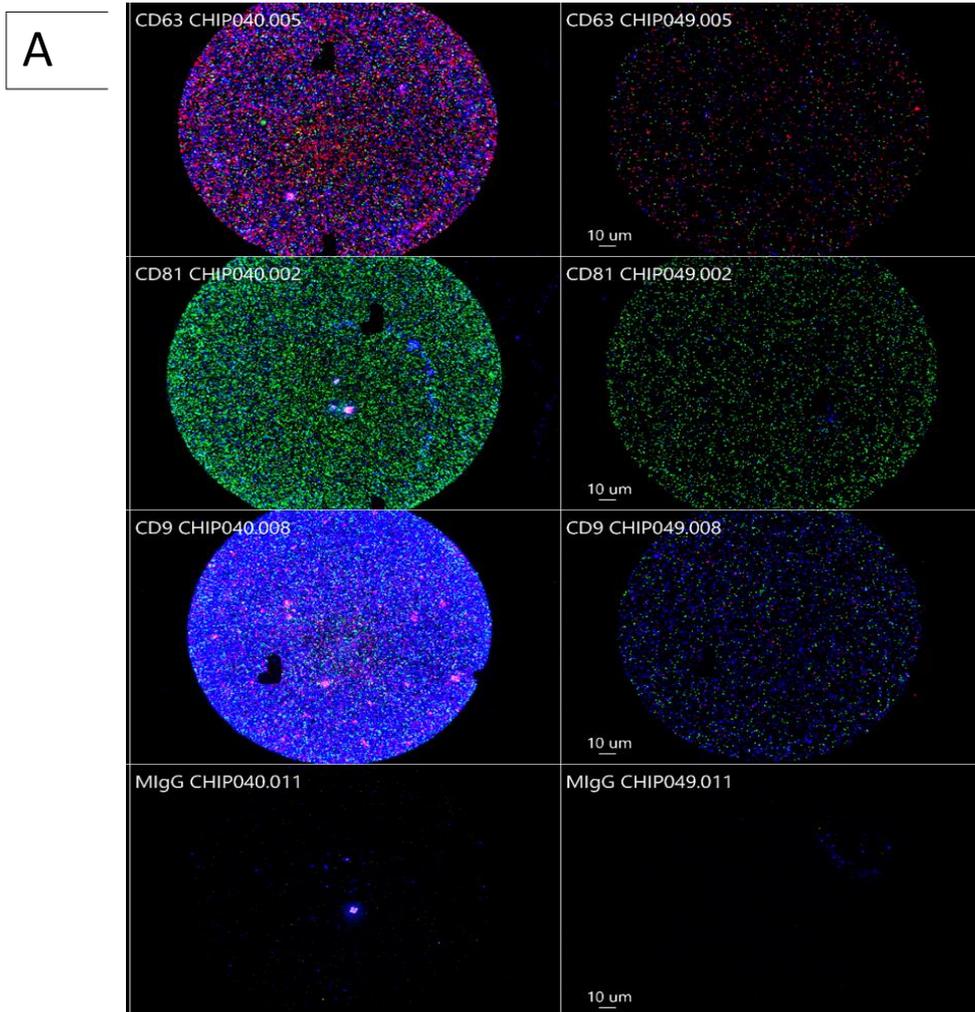


Abbildung 32: Aufnahmen und Quantifizierung der Fluoreszenzmessungen von extrazellulären Vesikeln (EV) aus einer Plasmaprobe in 1:25-Verdünnung (Chip 40) und 1:125-Verdünnung (Chip 49) auf antikörper-dotierten Stellen je eines Nano-Chips. Dotierung des Nano-Chips mit Antikörpern gegen CD63, CD81, CD9, MIgG. EVs wurden mit fluorophorgekoppelten Antikörpern gegen drei Exosomenmarker (CD63, CD81, CD9) inkubiert. Anregung mit Licht der Wellenlängen 488 (CD9), 555 (CD81), 647 (CD63) nm und Detektion der Emission im blauen, grünen und roten Kanal. A: Mikroskopaufnahme. B: Quantifizierung. Der relative Anteil der EV-Populationen ist als Tortendiagramm dargestellt. MIgG-Antikörper = Negativkontrolle

Tabelle 33: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaprobe in 1:125-Verdünnung (Abbildung 33, Chip 49).

Marker	CD63-Dotierung	CD81-Dotierung	CD9-Dotierung
CD63	1,4x10⁵	0,4x10 ⁵	1,8x10 ⁵
CD81	0,6x10 ⁵	2x10⁵	2,3x10 ⁵
CD9	1,8x10 ⁵	1,7x10 ⁵	1,8x10⁵
nicht fluoreszierend	0,5x10 ⁵	0,15x10 ⁵	0,15x10 ⁵

Tabelle 34: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaprobe in 1:25-Verdünnung (Abbildung 33, Chip 40).

Marker	CD63-Dotierung	CD81-Dotierung	CD9-Dotierung
CD63	1,7x10⁵	0,8x10 ⁵	1,3x10 ⁵
CD81	0,7x10 ⁵	4x10⁵	1,4x10 ⁵
CD9	1,5x10 ⁵	1,7x10 ⁵	4,2x10⁵
nicht fluoreszierend	0,3x10 ⁵	0,1x10 ⁵	0,8x10 ⁵

Vergleicht man die Anzahl tetraspanin-positiver gebundener Vesikel nach 1:25 und 1:125 - Verdünnung so waren auf der CD63-dotierten Stelle 21 % mehr CD63-positive Vesikel, auf der CD81-dotierten Stelle 100 % mehr CD81-positive Vesikel und auf der CD9-dotierten Stelle 134 % mehr CD9-positive Vesikel (Tabelle 33 und 34, fett markierte Daten). Auf der CD63-dotierten Stelle gab es ansonsten keine großen Unterschiede in der Ko-Expression der anderen Exosomenmarker. Auf der CD81-dotierten Stelle hatte die Verdünnung keine Auswirkung auf die Anzahl CD9-positiver Vesikel. Auf der CD9-dotierten Stelle war der gegenteilige Effekt zu verzeichnen. Hier nahm die Anzahl CD63-positiver und CD81-positiver Vesikel bei niedriger Verdünnung um 28-39 % ab (Tabelle 33 und 34).

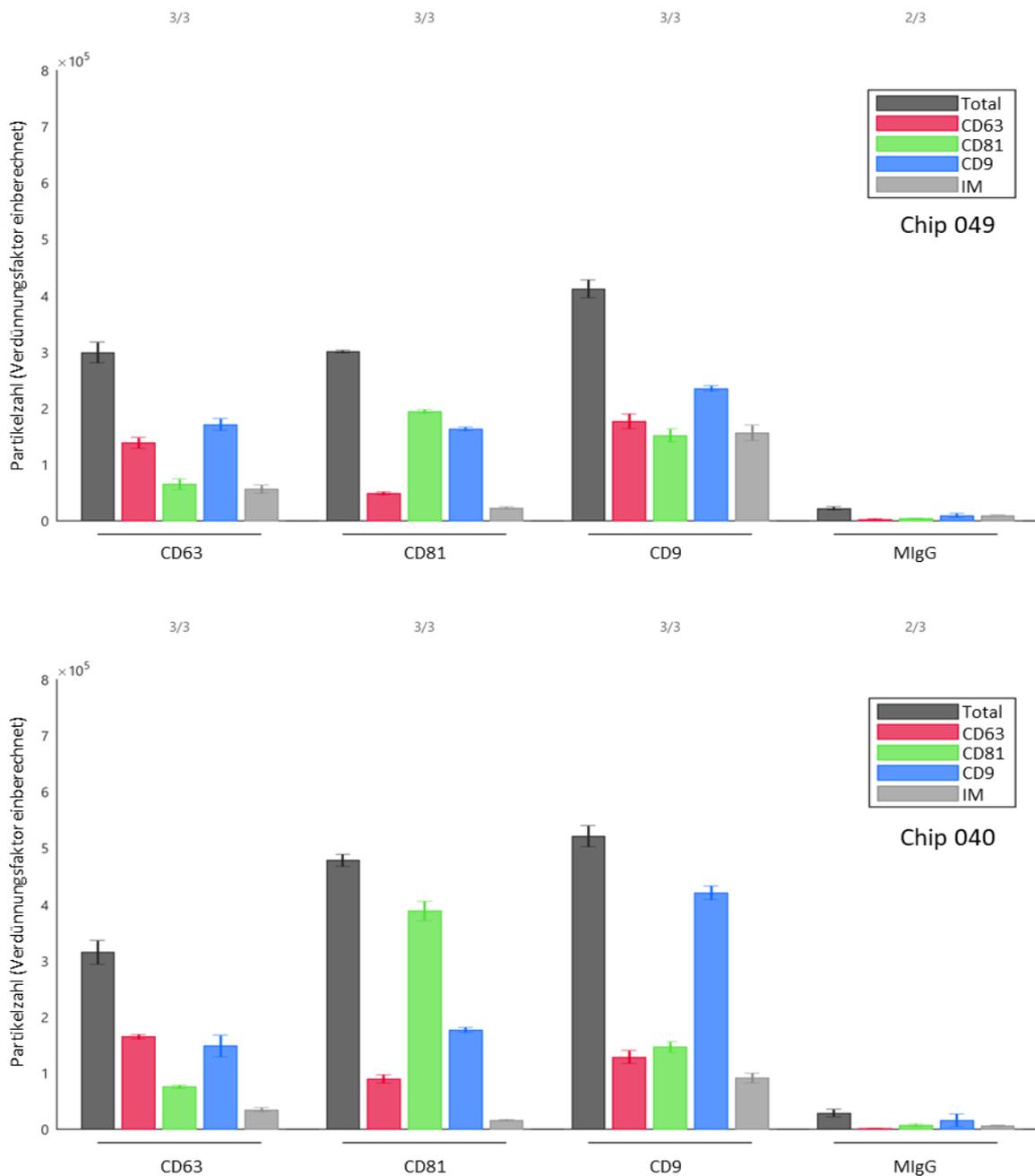


Abbildung 33: Quantifizierung der Fluoreszenzmessungen von extrazellulären Vesikeln (EV) aus einer Plasmaprobe in 1:25-Verdünnung (Chip 40) und 1:125-Verdünnung (Chip 49) auf antikörper-dotierten Stellen je eines Nano-Chips. Dotierung des Nano-Chips mit Antikörpern gegen CD63, CD81, CD9, MlgG. EVs wurden mit fluorophorgekoppelten Antikörpern gegen drei Exosomenmarker (CD63, CD81, CD9) inkubiert. Anregung mit Licht der Wellenlängen 488 (CD9), 555 (CD81), 647 (CD63) nm und Detektion der Emission im blauen, grünen und roten Kanal. Bestimmung der Vesikel ohne gebundenen Fluoreszenz-Antikörper (IM, hellgrauer Balken) durch Subtraktion der fluoreszierenden Vesikel von der, durch differenzielle Lichtstreuung bestimmten, Gesamtpartikelzahl (Total, dunkelgrauer Balken). MlgG-Antikörper = Negativkontrolle

Nachdem die 1:25-Verdünnung von Plasma in Kombination mit Fluoreszenzmarkern gegen Tetraspanine zu einer Übersättigung auf den Nano-Chips führte, wurde für diese Kombination eine Verdünnung von 1:125 festgelegt. Im nächsten Versuch erfolgte in diesem Sinne eine Messung mit einer Plasmaprobe eines anderen Patienten mit diagnostiziertem Nierenzellkarzinom, um etwaige patientenspezifische Unterschiede in der Exosomensynthese zu untersuchen (Abbildung 34).

Der Einsatz von Plasma in einem Verdünnungsverhältnis von 1:125 auf den CD63-dotierten, CD81-dotierten und CD9-dotierten Chip-Bereichen zeigte viele, intensive Signale, die den kompletten Beobachtungsbereich ausfüllten. Auf dem MlgG-dotierten Bereich wurden vereinzelte, wenig intensive Signale, vor allem für CD9-positive und CD81-positive Partikel, beobachtet (Abbildung 34, A).

Die Sättigung der Tetraspaninbindungsstellen lag im Falle dieser 1:125 verdünnten Probe bei $2,7-3,4 \times 10^5$ Partikeln (Tabelle 35). Auf allen Dotierungsstellen waren CD81-positive Vesikel am häufigsten vertreten. Ihr Anteil machte 46 % der gebundenen Vesikel auf der CD63-dotierten Stelle, 82 % auf der CD81-dotierten Stelle und 64 % auf der CD9-dotierten Stelle aus (Tabelle 36). Im vorangegangenen Versuch waren CD9-positive Vesikel ebenfalls sehr dominant, bildeten aber nicht die Mehrheit (Tabelle 33).

Die Daten waren verglichen mit den Daten der ersten Messreihe (Abbildung 33; Chip 49) nur teilweise kongruent. Die absoluten Zahlen der gebundenen Partikel pro Dotierungsstelle lag in beiden Versuchen zwischen $2,5 - 4,5 \times 10^5$ Partikeln. Das Expressionsmuster der Tetraspanine zeigte markante Unterschiede. Gemeinsam war, dass auf den Dotierungsstellen dasjenige Tetraspanin besonders stark exprimiert wurde, mit dem auch abgefangen wurde. Am auffälligsten unterschieden sich diese Proben auf der CD9-Dotierungsstellen. Während im ersten Fall (Chip 49) die Expression der drei Tetraspanine fast gleich verteilt waren, so war im zweiten Fall CD63 deutlich unterrepräsentiert und CD81 etwas stärker noch als CD9 exprimiert (Abbildung 32, B und Abbildung 34, B). Für eine präzisere Darstellung der Expression von Tetraspaninen auf Exosomen aus Blutplasma bedarf es weiterer Untersuchungen mit einer größeren Probenzahl.

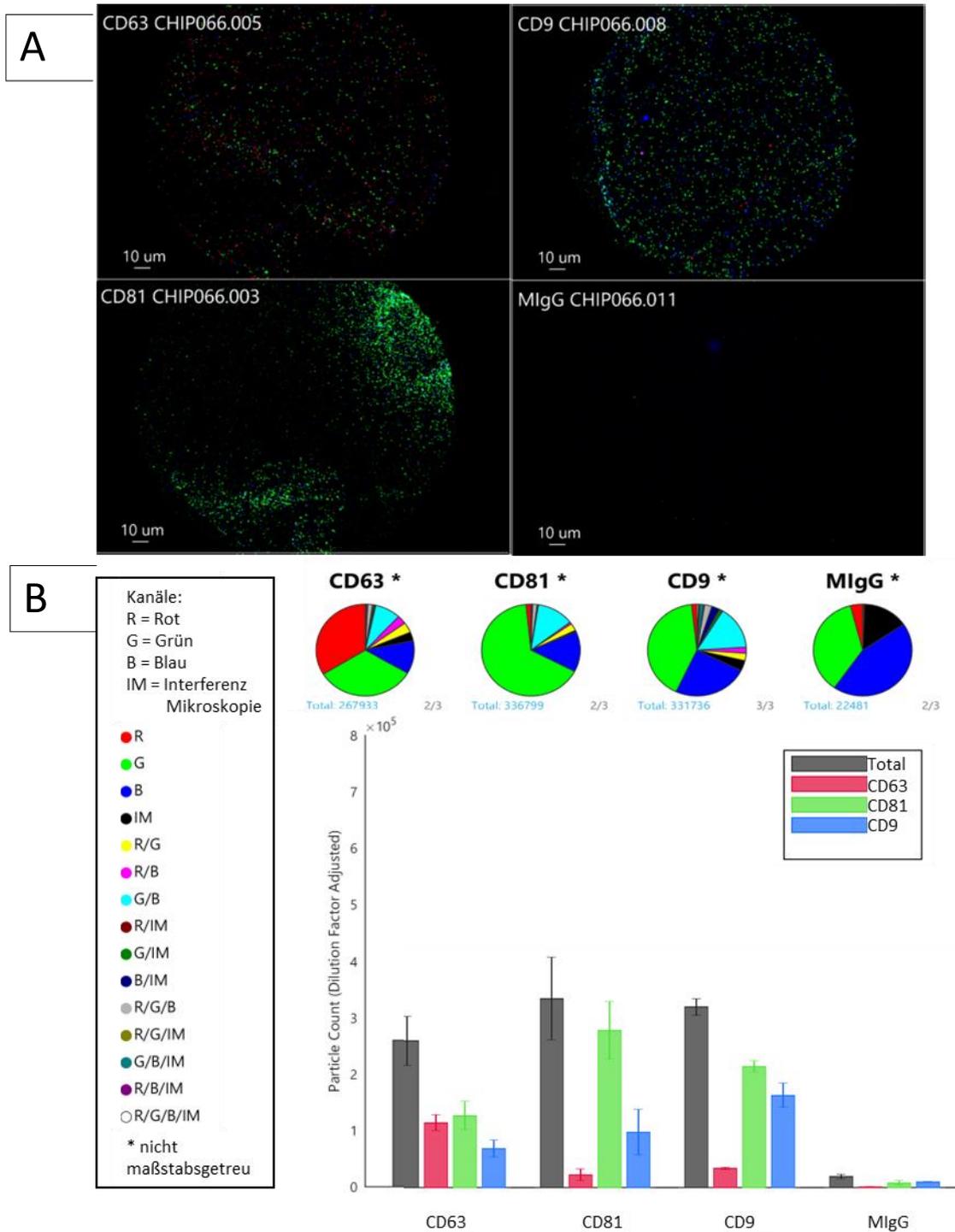


Abbildung 34: Quantifizierung der Fluoreszenzmessungen von extrazellulären Vesikeln (EV) aus einer Plasmaprobe (Chip 66) auf antikörper-dotierten Stellen eines Nano-Chips. Dotierung des Nano-Chips mit Antikörpern gegen CD63, CD81, CD9, MIgG. EVs wurden mit Fluorophorgekoppelten Antikörpern gegen drei Exosomenmarker (CD63, CD81, CD9) inkubiert. Anregung mit Licht der Wellenlängen 488 (CD9), 555 (CD81), 647 (CD63) nm und Detektion der Emission im blauen, grünen und roten Kanal. A: Mikroskopaufnahme. B: Quantifizierung. Total=Gesamtpartikelzahl. Bestimmung der Gesamtpartikelzahl als Summe aller fluoreszierenden Vesikel (dunkelgrauer Balken). Der relative Anteil der EV-Populationen ist als Tortendiagramm dargestellt. MIgG-Antikörper = Negativkontrolle

Tabelle 35: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaprobe in 1:125-Verdünnung (Abbildung 34, B).

Verdünnung	CD63-Dotierung	CD81-Dotierung	CD9-Dotierung	MlgG-Dotierung
1:125	2,7x10 ⁵ Partikel	3,4x10 ⁵ Partikel	3,3x10 ⁵ Partikel	0,25x10 ⁵

Tabelle 36: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaprobe in 1:125-Verdünnung (Abbildung 34, B).

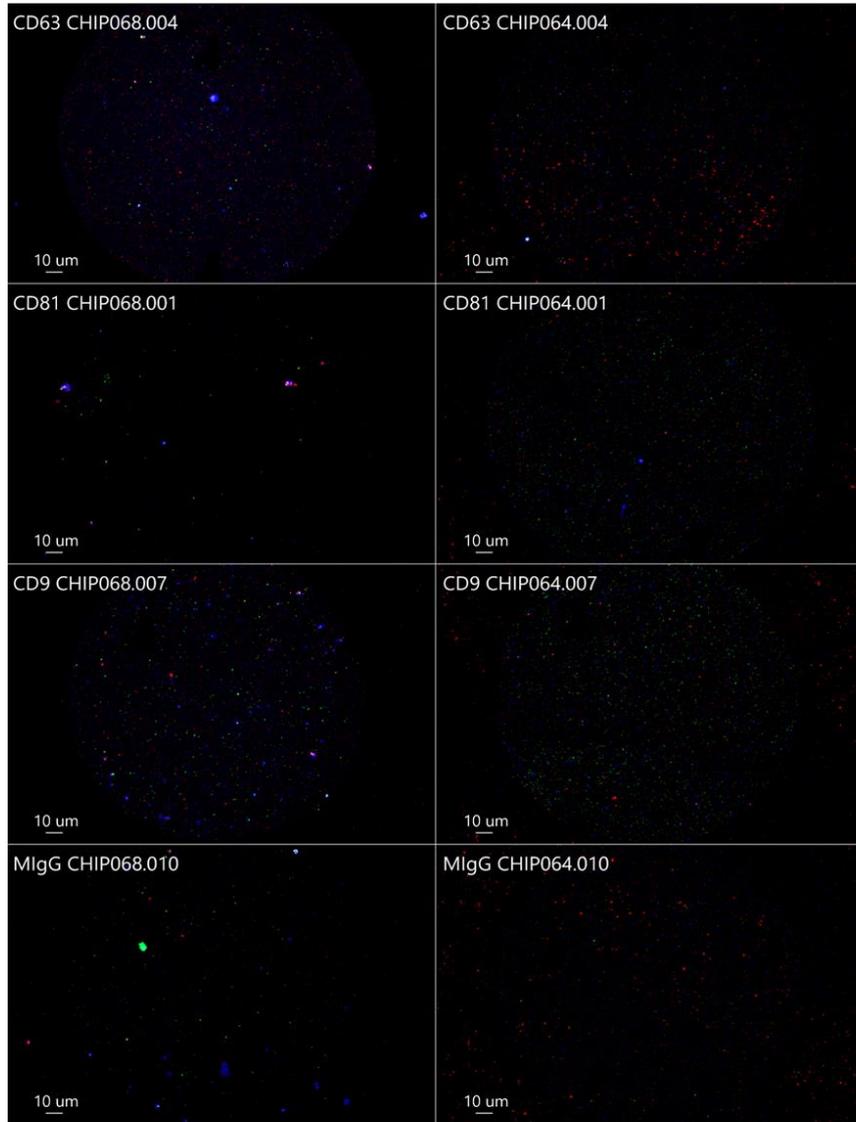
Marker	CD63-Dotierung	CD81-Dotierung	CD9-Dotierung	MlgG-Dotierung
CD63	1,1x10 ⁵	0,3x10 ⁵	0,4x10 ⁵	-
CD81	1,25x10⁵	2,8x10⁵	2,1x10⁵	0,1x10 ⁵
CD9	0,6x10 ⁵	0,9x10 ⁵	1,68x10 ⁵	0,15x10 ⁵

4.5.3.2 Vergleich der Expression und Koloalisation von Tumormarkern auf Exosomen aus Blutplasma und Zellkultur mit Bezug zum klarzelligen Nierenzellkarzinom

Zur Untersuchung der Expression bestimmter tumorassoziiertes Proteine wurde eine Plasmaprobe in 1:1-Verdünnung und eine Exosomenprobe aus Zellkultur von Caki2 in 1:5 Verdünnung auf je einen Chip (Chip064, Chip068) aufgetragen und die Expression von ausgewählten Proteinen (CA9, CD147, PD-L1) mittels fluoreszierender Antikörper auf den fixierten Partikeln detektiert. Die Expression von PD-L1 auf Exosomen wurde im Rahmen einer anderen Projektreihe innerhalb des Forschungslabors detektiert und ist nicht Bestandteil dieser Forschungsarbeit. Da es sich aber um einen Antikörpercocktail von drei Fluoreszenzantikörper handelte, der alle drei mit dem genutzten Gerät messbaren Wellenlängenbereiche (rot, grün, blau) abdeckte, wurde die Expression von PD-L1 mit aufgezeichnet. Auf PD-L1 wird folglich kein detaillierter Bezug genommen.

Der Einsatz von Caki2-Exosomen in einem Verdünnungsverhältnis von 1:5 auf den CD63-dotierten, CD81-dotierten und CD9-dotierten Chip-Bereichen zeigte viele, moderate Signale, die den kompletten Beobachtungsbereich ausfüllen. Auf dem CD81-Spot war die geringste Signaldichte, auf dem CD63-Spot eine moderate Dichte, und auf dem CD9-Spot die höchste Signaldichte zu sehen. Auf dem MlgG-dotierten Bereich wurden vereinzelte, meist wenig intensive Signale, für CA9-positive, CD147-positive und PD-L1-positive Partikel, detektiert (Abbildung 35, A, linke Spalte). Der Einsatz von Plasma in einem Verdünnungsverhältnis von 1:1 auf den CD63-/CD81-/CD9-dotierten Chip-Bereichen zeigte viele, intensive Signale, die den kompletten Beobachtungsbereich ausfüllten. Auf allen Tetraspanin-Spots war die Signaldichte in etwa gleich hoch. Auf dem MlgG-dotierten Bereich wurden einige, wenig intensive Signale, vor allem für PD-L1-positive und CA9-positive Partikel, detektiert (Abbildung 35, A, rechte Spalte).

A



B

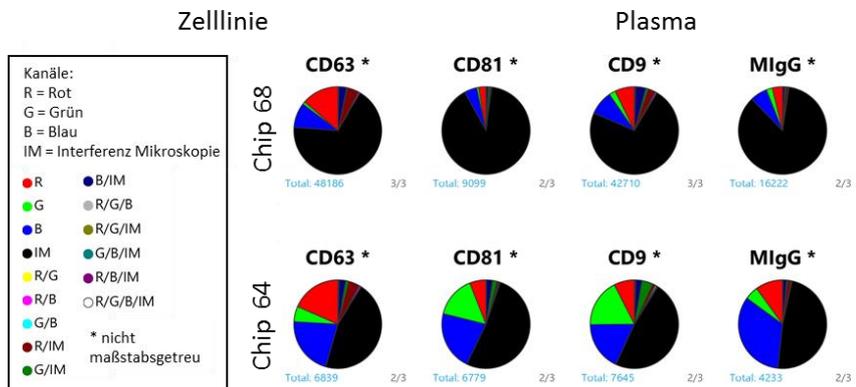


Abbildung 35: Aufnahmen und Quantifizierung der Fluoreszenzmessungen von extrazellulären Vesikeln (EV) aus einer Plasmaprobe (Chip 64) und einer Zellkulturprobe (Chip 68, Caki2-Zellkulturüberstand nach Ultrazentrifugation) auf antikörper-dotierten Stellen je eines Nano-Chips. Dotierung des Nano-Chips mit Antikörpern gegen CD63, CD81, CD9, MlgG. EVs wurden mit fluorophorgekoppelten Antikörpern gegen drei Tumormarker (CA9, CD147, PD-L1) inkubiert. Anregung mit Licht der Wellenlängen 488 (CA9), 555 (CD147), 647 (PD-L1) nm und Detektion der Emission im blauen, grünen und roten Kanal. Der relative Anteil der EV-Populationen ist als Tortendiagramm dargestellt. MlgG-Antikörper = Negativkontrolle

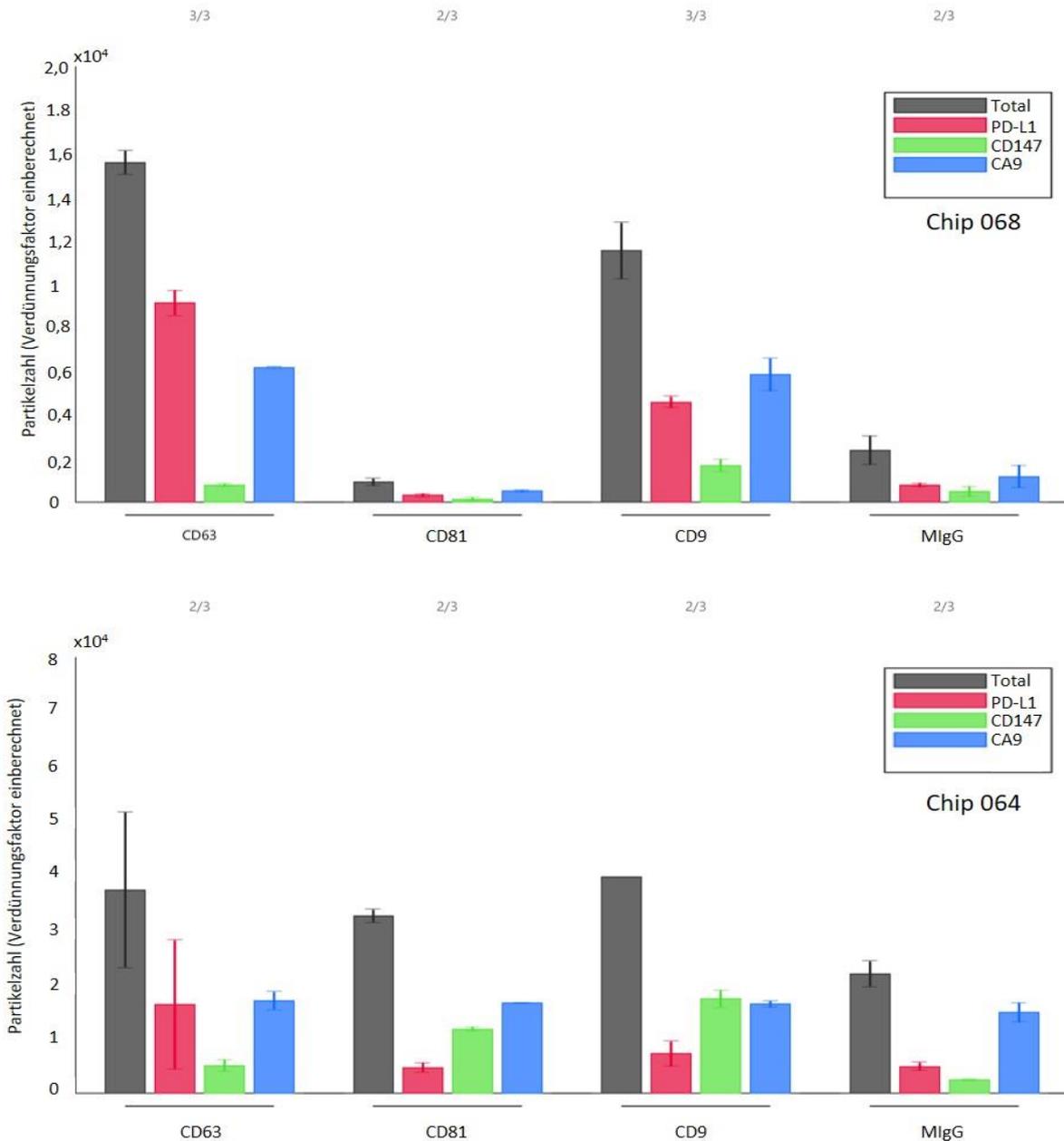


Abbildung 36: Quantifizierung der Fluoreszenzmessungen von extrazellulären Vesikeln (EV) aus einer Plasmaprobe (Chip 64) und einer Zellkulturprobe (Chip 68, Caki2-Zellkulturüberstand nach Ultrazentrifugation) auf antikörper-dotierten Stellen je eines Nano-Chips. Dotierung des Nano-Chips mit Antikörpern gegen CD63, CD81, CD9, MlgG. EVs wurden mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gegen drei Tumormarker (CA9, CD147, PD-L1) inkubiert. Anregung mit Licht der Wellenlängen 488 (CA9), 555 (CD147), 647 (PD-L1) nm und Detektion der Emission im blauen, grünen und roten Kanal. Bestimmung der Gesamtpartikelzahl als Summe aller fluoreszierenden Vesikel (Total, dunkelgrauer Balken). MlgG-Antikörper = Negativkontrolle

Es wurden drei-bis viermal so viele CD63- und CD9-positive Partikel, und mehr als zehnmals so viele CD81-positive Partikel in der Blutplasmaprobe als in der Zellkulturprobe detektiert (Abbildung 35, B; 36; Tabelle 37).

In der Blutplasmaprobe wurde auf der MIgG-Stelle eine hohe Zahl an Fluoreszenzsignalen im blauen Kanal festgestellt. Nach Abzug dieser falschpositiven Signale gab es kaum oder keine Expression von CA9 auf Partikeln im Blutplasma. In der Zelllinie wurde keine Expression von CA9 auf CD81-positiven Partikeln, aber eine hohe Expression auf CD63-positiven und CD9-positiven Partikeln gemessen. Im Gegensatz dazu, und unter Berücksichtigung der Fluoreszenzsignale der Negativkontrolle wurde in der Zellkulturprobe kein CA9 auf CD81-positiven Partikeln, und viel CA9 auf CD63- und CD9-positiven Partikeln exprimiert (Abbildung 36, Tabelle 38, 39).

Unter Berücksichtigung der Fluoreszenzsignale der Negativkontrolle wurde in der Zellkulturprobe kein CD147 auf CD81-positiven Partikeln, eine geringe Expression auf CD63-positiven Partikeln und eine moderate Expression auf CD9-positiven Partikeln festgestellt. Im Vergleich dazu wurde in der Blutplasmaprobe CD147 auf CD81- und CD9-positiven Partikeln stark exprimiert (Abbildung 36, Tabelle 38, 39).

Damit war die Koloalisation von CD147 auf Vesikeln in Probe aus der Zellkultur verglichen mit der Blutplasmaprobe unterschiedlich, aber in beiden Fällen klar nachweisbar. Für CA9 galt dies nur für die Probe aus der Zellkultur. Um sicher nachzuweisen, dass CA9 auf Vesikeln des Blutplasmas nicht exprimiert wird, muss der Ursache der falschpositiven Fluoreszenzsignale im blauen Wellenlängenspektrum auf den Grund gegangen werden und diese Signale nach Möglichkeit entfernt werden. Dazu müsste die Methode optimiert oder diese Signale müssten rausgerechnet werden.

Tabelle 37: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Proben aus Zellkultur und Plasma (Abbildung 36, Chip 68, 64).

Probe	CD63-Dotierung	CD81-Dotierung	CD9-Dotierung	MIgG-Dotierung
Caki2	1,6x10 ⁴ Partikel	0,1x10 ⁴ Partikel	1,2x10 ⁴ Partikel	0,3x10 ⁴ Partikel
Plasma	3,8x10 ⁴ Partikel	3,2x10 ⁴ Partikel	3,9x10 ⁴ Partikel	2x10 ⁴ Partikel

Tabelle 38: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Caki2-Zellkulturprobe (Abbildung 36, Chip 68).

Marker	CD63-Dotierung	CD81-Dotierung	CD9-Dotierung	MIgG-Dotierung
PD-L1	0,9x10 ⁴	<0,05x10 ⁴	0,42x10 ⁴	0,08x10 ⁴
CD147	0,1x10 ⁴	<0,05x10 ⁴	0,2x10 ⁴	0,04x10 ⁴
CA9	0,6x10 ⁴	0,05x10 ⁴	0,6x10 ⁴	0,12x10 ⁴

Tabelle 39: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaprobe in 1:1-Verdünnung (Abbildung 36, Chip 64).

Marker	CD63-Dotierung	CD81-Dotierung	CD9-Dotierung	MIgG-Dotierung
PD-L1	1,6x10 ⁴	0,4x10 ⁴	0,8x10 ⁴	0,5x10 ⁴
CD147	0,5x10 ⁴	1,2x10 ⁴	1,9x10 ⁴	0,2x10 ⁴
CA9	1,7x10 ⁴	1,8x10 ⁴	1,8x10 ⁴	1,6x10 ⁴

4.5.3.3 Expression von CA9 und CD147 auf Exosomen aus Blutplasma eines Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom

Zum Vergleich der Expression von Tumormarkern innerhalb einer Patientenprobe wurden Plasmaproben desselben Patienten mit dem Chip inkubiert und die fixierten Partikel mit fluoreszierenden Antikörpern gegen CA9 oder CD147 gefärbt.

Für CA9 wurde Plasma in einem Verdünnungsverhältnis von 1:1 aufgetragen, die darin enthaltenen Exosomen auf einem Chip fixiert und mit Antikörpern gegen CA9, die mit dem Fluorophor Alexa-488 gekoppelt waren, inkubiert (Abbildung 37).

Auf den CD63-dotierten Chip-Bereichen wurden sehr wenige, auf den CD9-dotierten wenige, und auf den CD81-dotierten sehr viele Fluoreszenzsignale detektiert, die den kompletten Beobachtungsbereich ausfüllten. Auf dem MIgG-dotierten Bereich wurden vereinzelte, wenig intensive Signale, vor allem für CA9-positive Vesikel, detektiert (Abbildung 37, A, Chip 48).

Der Anteil von CA9-positiven Vesikeln an der Gesamtzahl der fluoreszierenden Vesikel betrug 100 %. CA9 war in dieser Probe stark auf CD81-positiven Vesikeln vertreten. Auf CD9-positiven und CD63-positiven Vesikeln wurden weit weniger CA9-positive Vesikel detektiert (Tabelle 40).

Tabelle 40: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaprobe in 1:1-Verdünnung (Abbildung 37, B, Chip 48).

Vesikelzahl	CD63-Dotierung	CD81-Dotierung	CD9-Dotierung	MIgG-Dotierung
Gesamtzahl fluoreszierender Vesikel	0,24x10 ⁴	1,85x10 ⁴	0,6x10 ⁴	0,1x10 ⁴
davon CA9-positiv	0,24x10 ⁴	1,85x10 ⁴	0,6x10 ⁴	0,1x10 ⁴

Für CD147 wurde Plasma in einem Verdünnungsverhältnis von 1:25 aufgetragen, die darin enthaltenen Exosomen auf einem Chip fixiert und mit Antikörpern gegen CD147, die mit dem Fluorophor Phyco-Erythrin gekoppelt waren, inkubiert (Abbildung 38).

Der Einsatz von Plasma in einem Verdünnungsverhältnis von 1:25 zeigte auf den CD63-dotierten Chip-Bereichen sehr wenige, auf den CD81-dotierten wenige, und auf den CD81-dotierten viele Fluoreszenzsignale, die eine geringe Intensität aufwiesen und den kompletten Beobachtungsbereich ausfüllten. Auf dem MIgG-dotierten Bereich wurden vereinzelte, wenig intensive Signale, vor allem für CD147-positive Partikel, detektiert (Abbildung 38, A, Chip 47).

Der Anteil von CD147-positiven Vesikeln an der Gesamtzahl der fluoreszierenden Vesikel betrug 71 % auf CD63-positiven Vesikeln, 97 % auf CD81-positiven Vesikeln und 94 % auf CD9-positiven Vesikeln. CD147 war in dieser Probe schwach mit CD63-positiven Vesikeln assoziiert. Auf CD9-positiven und CD81-positiven Vesikeln wurden weit mehr CD147-positive Vesikel detektiert (Tabelle 41).

Tabelle 41: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaprobe in 1:25-Verdünnung (Abbildung 38, B, Chip 47).

Vesikelzahl	CD63-Dotierung	CD81-Dotierung	CD9-Dotierung	MIgG-Dotierung
Gesamtzahl fluoreszierender Vesikel	0,7x10 ⁴	3,8x10 ⁴	3,5x10 ⁴	0,3x10 ⁴
davon CD147-positiv	0,5x10 ⁴	3,7x10 ⁴	3,3x10 ⁴	0,2x10 ⁴
davon blau-fluoreszierend	0,2x10 ⁴	0,1x10 ⁴	0,2x10 ⁴	0,1x10 ⁴

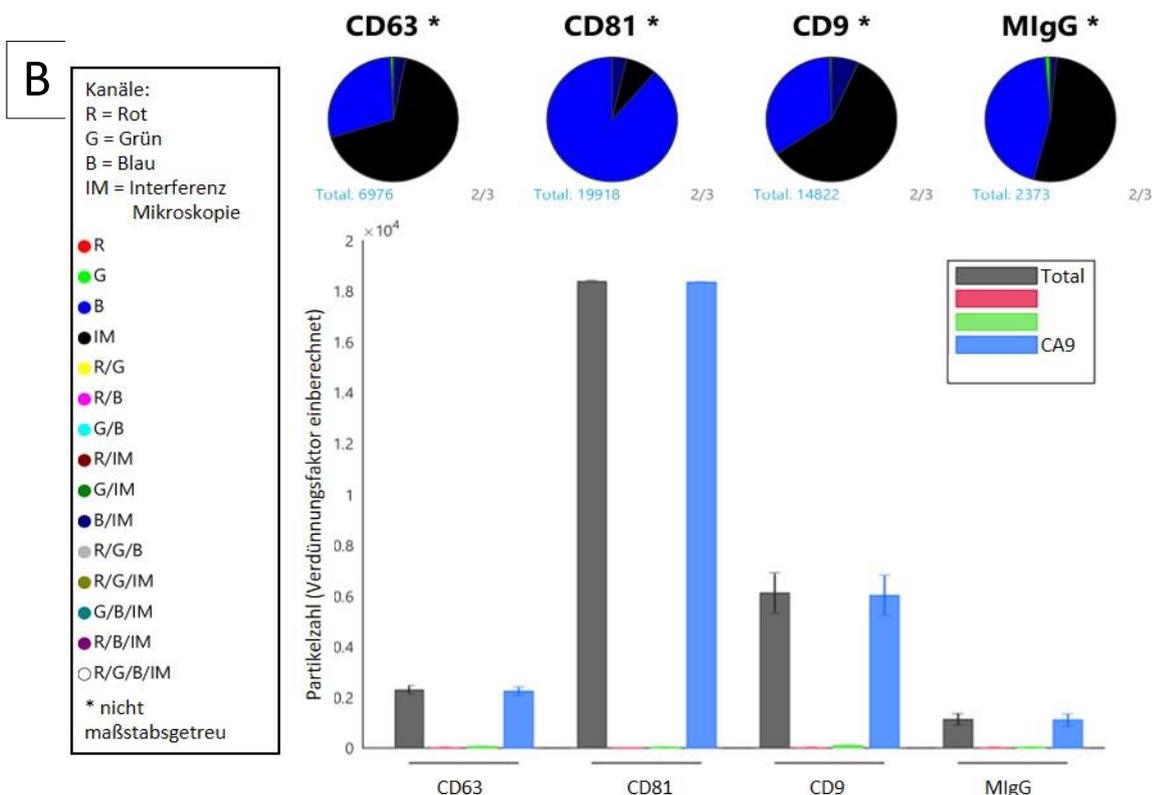
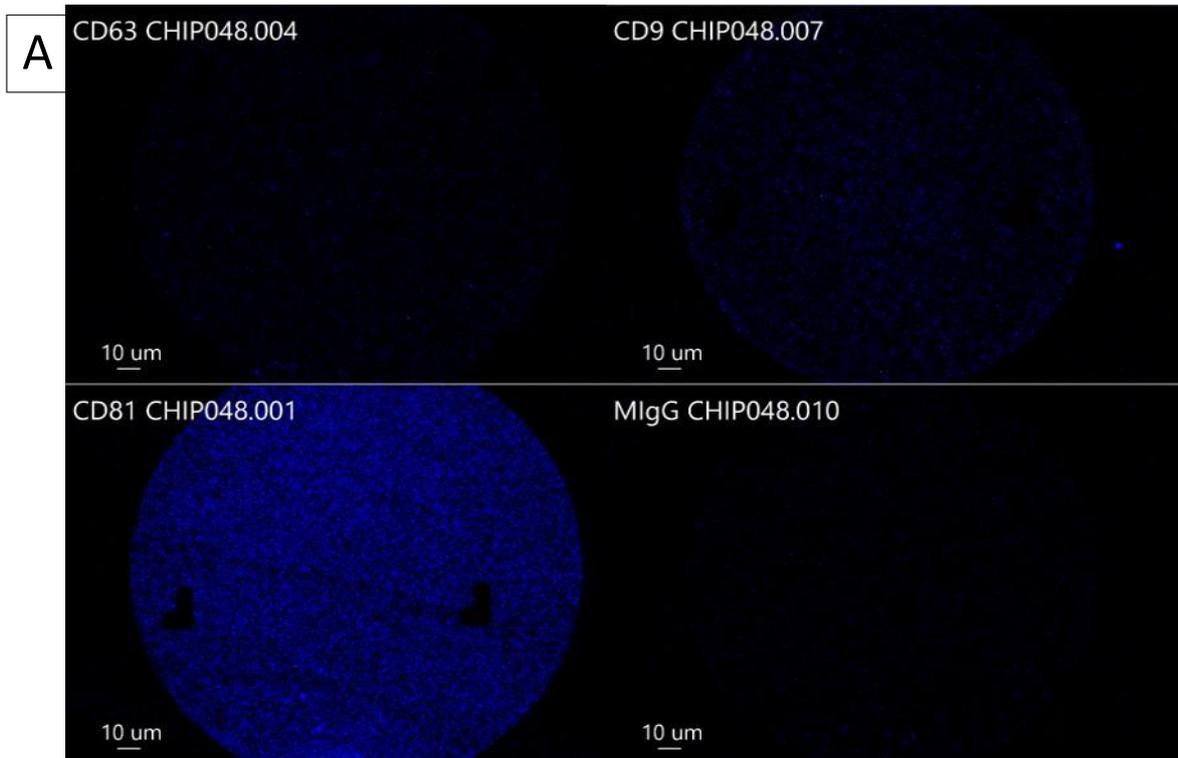


Abbildung 37: Fluoreszenzmessungen von extrazellulären Vesikeln (EV) aus einer Plasmaprobe auf antikörper-dotierten Stellen eines Nano-Chips. Dotierung des Nano-Chips mit Antikörpern gegen CD63, CD81, CD9, MIgG. EVs wurden mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gegen den Tumormarker CA9 inkubiert. Anregung mit Licht der Wellenlängen 488, 555, 647 nm und Detektion der Emission im blauen, grünen und roten Kanal. A: Mikroskopaufnahme. B: Quantifizierung. Total=Gesamtpartikelzahl (dunkelgrauer Balken). Der relative Anteil der EV-Populationen ist als Tortendiagramm dargestellt. MIgG-Antikörper = Negativkontrolle

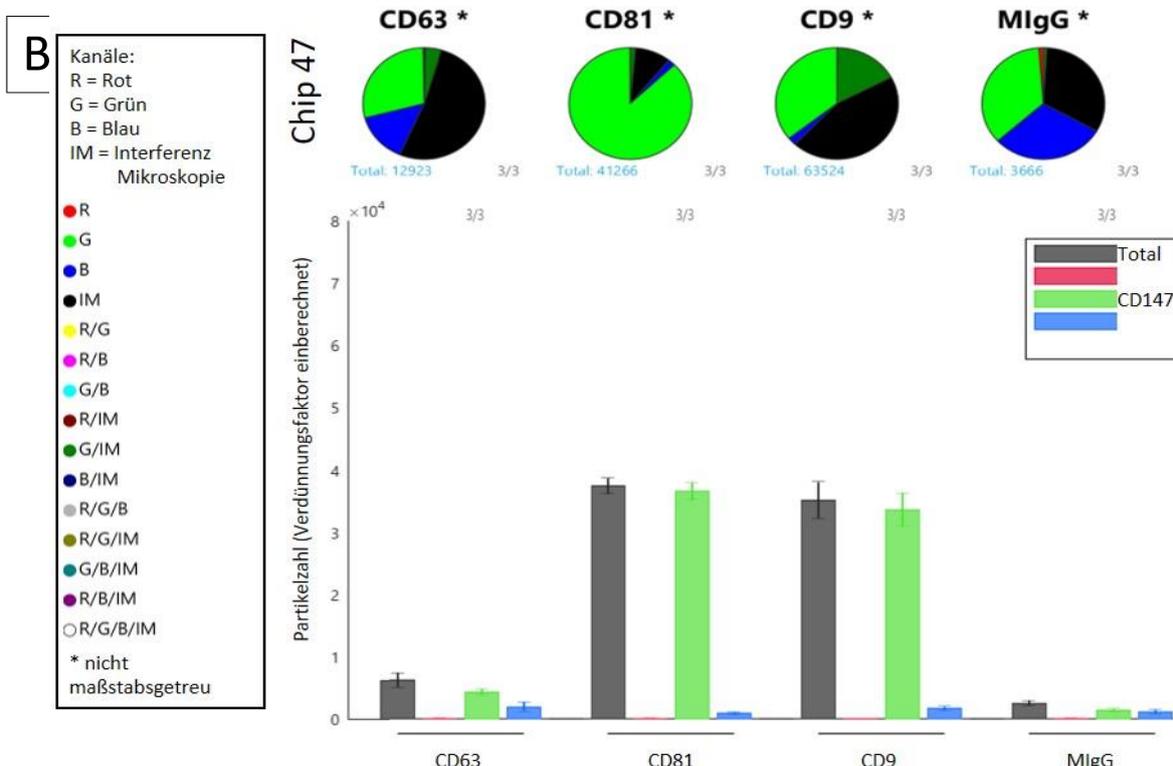
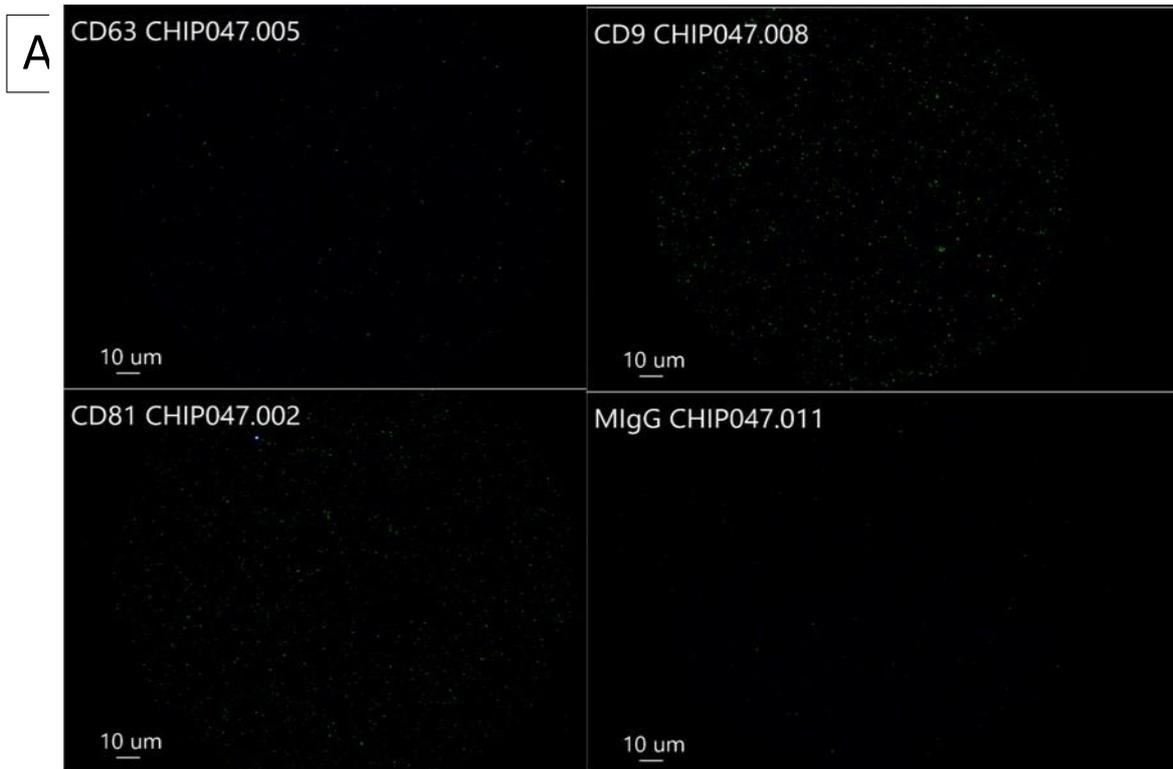


Abbildung 38: Fluoreszenzmessungen von extrazellulären Vesikeln (EV) aus einer Plasmaprobe auf antikörper-dotierten Stellen eines Nano-Chips. Dotierung des Nano-Chips mit Antikörpern gegen CD63, CD81, CD9, MlgG. EVs wurden mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gegen den Tumormarker CD147 inkubiert. Anregung mit Licht der Wellenlängen 488 nm, 555 nm, 647 nm und Detektion der Emission im blauen, grünen und roten Kanal. A: Mikroskopaufnahme. B: Quantifizierung. Total=Gesamtpartikelzahl (dunkelgrauer Balken). Der relative Anteil der EV-Populationen ist als Tortendiagramm dargestellt. MlgG-Antikörper = Negativkontrolle

4.5.3.4 Vergleich der Expression von Exosomenmarkern auf Exosomen aus Plasma von Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom

Zum Vergleich der Expression von Exosomenmarkern innerhalb eines Patientenkollektivs wurden Plasmaproben von drei Patienten (Fall 1 – 3) in 1:25-Verdünnung mit dem Chip (Chip 002, 017, 040) inkubiert und die fixierten Partikel mit fluoreszierenden Antikörpern gegen CD63, CD81 und CD9 gefärbt.

Tabelle 42: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaproben von drei Patienten (Fall 1 – 3) in 1:25-Verdünnung (Abbildung 39, Chip 002, 017, 040).

Verdünnung	CD63-Dotierung	CD81-Dotierung	CD9-Dotierung	MIgG-Dotierung
Fall 1	$2,7 \times 10^5$	$3,4 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$	$0,2 \times 10^5$
Fall 2	$3,2 \times 10^5$	$3,1 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$0,17 \times 10^5$
Fall 3	3×10^5	3×10^5	$4,1 \times 10^5$	$0,2 \times 10^5$

Die Anzahl der detektierten Vesikel mit exprimierten Exosomenmarkern lag in den Fällen 1-3 mit $9,7 \times 10^5$ (Fall 1), $9,6 \times 10^5$ (Fall 2) und $10,1 \times 10^5$ (Fall 3) detektierten Vesikel nah zusammen. Ebenso lag die Negativkontrolle mit $0,17-0,20 \times 10^5$ Vesikeln auf einem vergleichbaren niedrigen Niveau. In allen Fällen war die Anzahl der CD9-positiven Vesikel am höchsten (Tabelle 42).

Tabelle 43: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaprobe Fall 1 (Abbildung 39, Chip 002).

Marker	CD63-Dotierung	CD81-Dotierung	CD9-Dotierung	MIgG-Dotierung
CD63	$1,2 \times 10^5$	$0,8 \times 10^5$	$0,9 \times 10^5$	-
CD81	$1,25 \times 10^5$	$2,25 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$<0,05 \times 10^5$ CD81
CD9	$1,2 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	$0,1 \times 10^5$
nicht fluoreszierend	$0,3 \times 10^5$	$0,2 \times 10^5$	$0,9 \times 10^5$	$0,05 \times 10^5$

Im Fall 1 waren auf CD63-positiven Subpopulationen alle drei getesteten Exosomenmarker gleich stark exprimiert. CD63 war auf CD81- und CD9-positiven Subpopulationen am schwächsten kolokalisiert. CD81 war auf CD81-positiven Subpopulationen, CD9 auf CD9-positiven Subpopulationen am stärksten vertreten (Tabelle 43).

Tabelle 44: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaprobe Fall 2 (Abbildung 39, Chip 017).

Marker	CD63-Dotierung	CD81-Dotierung	CD9-Dotierung	MIgG-Dotierung
CD63	1,6x10 ⁵	0,8x10 ⁵	1,2x10 ⁵	-
CD81	0,9x10 ⁵	2x10 ⁵	1x10 ⁵	-
CD9	1,7x10 ⁵	1,6x10 ⁵	2,2x10 ⁵	0,15x10 ⁵
nicht fluoreszierend	0,4 x10 ⁵	0,2 x10 ⁵	1x10 ⁵	0,02 x10 ⁵

Im Fall 2 wurden die drei getesteten Exosomenmarker unterschiedlich stark in den drei Subpopulationen exprimiert. CD63 war auf CD81-positiven Subpopulationen am schwächsten kolokalisiert. Umgekehrt war CD81 auf CD63-positiven Vesikeln am schwächsten kolokalisiert. CD81 war auf CD81-positiven Subpopulationen und CD9 auf CD9-positiven Subpopulationen am stärksten vertreten (Tabelle 44).

Tabelle 45: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaprobe Fall 3 (Abbildung 39, Chip 040).

Marker	CD63-Dotierung	CD81-Dotierung	CD9-Dotierung	MIgG-Dotierung
CD63	1,2x10 ⁵	0,4x10 ⁵	1,7x10 ⁵	-
CD81	0,5x10 ⁵	1,9x10 ⁵	1,5x10 ⁵	-
CD9	1,6x10 ⁵	1,6x10 ⁵	2,3x10 ⁵	0,1x10 ⁵
nicht fluoreszierend	0,4 x10 ⁵	0,2 x10 ⁵	1,5 x10 ⁵	0,1 x10 ⁵

Im Fall 3 wurden die drei getesteten Exosomenmarker unterschiedlich stark in den drei Subpopulationen exprimiert. CD63 war auf CD81-positiven Subpopulationen am schwächsten kolokalisiert. Umgekehrt war CD81 auf CD63-positiven Vesikeln am schwächsten kolokalisiert. CD81 war auf CD81-positiven Subpopulationen und CD9 auf CD9-positiven Subpopulationen am stärksten vertreten (Tabelle 45).

Fall 2 und Fall 3 wiesen ein ähnliches Expressionsmuster von CD63, CD81 und CD9 auf den CD63-positiven, CD81-positiven und CD9-positiven Subpopulationen auf.

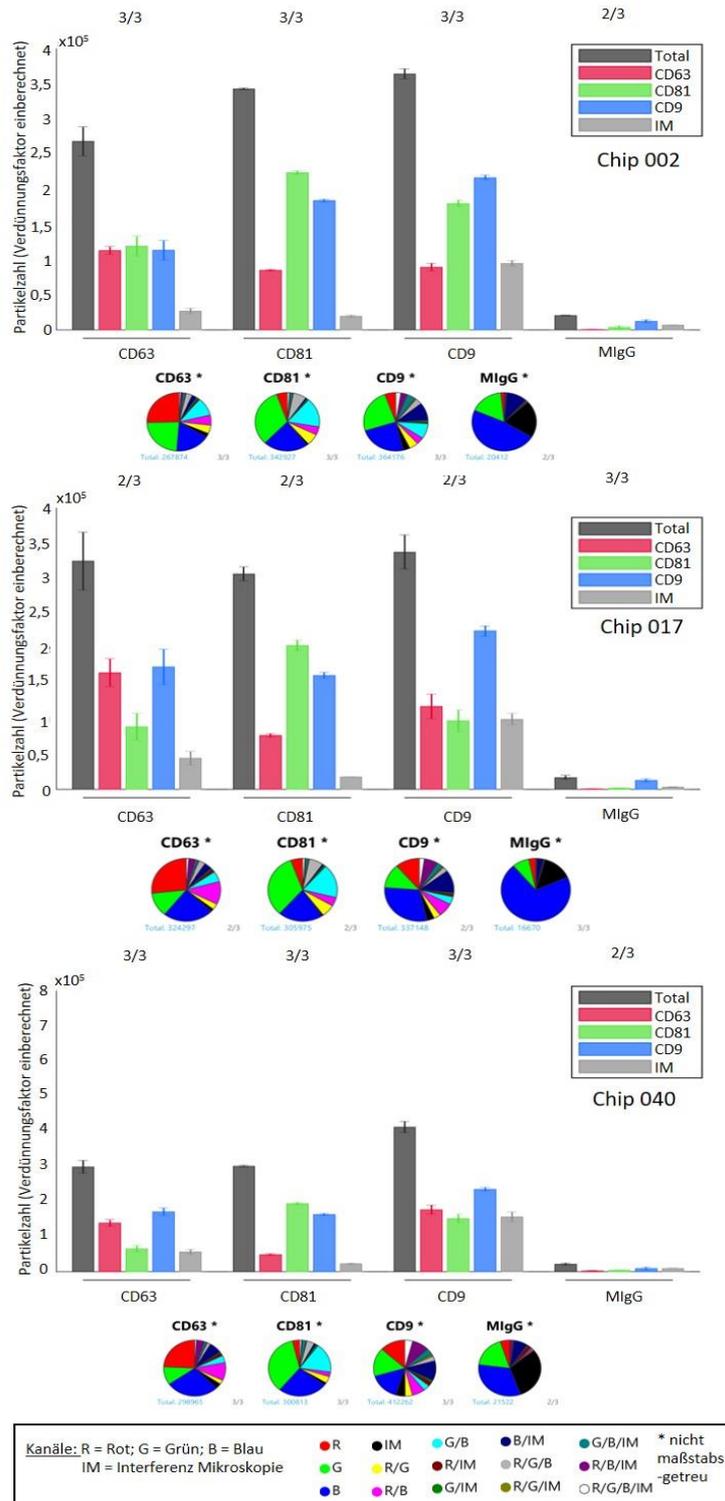


Abbildung 39: Fluoreszenzmessungen von extrazellulären Vesikeln (EV) aus drei unabhängigen Plasmaproben auf antikörper-dotierten Stellen von drei Nano-Chips. Dotierung des Nano-Chips mit Antikörpern gegen CD63, CD81, CD9, MlgG. EVs wurden mit fluorophorgekoppelten Antikörpern gegen drei Exosomenmarker (CD63, CD81, CD9) inkubiert. Anregung mit Licht der Wellenlängen 488 (CD9), 555 (CD81), 647 (CD63) nm und Detektion der Emission im blauen, grünen und roten Kanal. Bestimmung der Vesikel ohne gebundenen Fluoreszenz-Antikörper (IM, hellgrauer Balken) durch Subtraktion der fluoreszierenden Vesikel von der, durch differenzielle Lichtstreuung bestimmten, Gesamtpartikelzahl (Total, dunkelgrauer Balken). Der relative Anteil der EV-Populationen ist als Tortendiagramm dargestellt. MlgG-Antikörper = Negativkontrolle

4.5.3.5 Vergleich der Expression von CD147 auf Exosomen aus Plasma von Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzinom

Zum Vergleich der Expression von CD147 auf Exosomen innerhalb eines Patientenkollektivs wurden Plasmaproben von drei Patienten (Fall 1 – 3) in 1:25-Verdünnung mit dem Chip (Chip 004, 019, 042) inkubiert und die fixierten Partikel mit fluoreszierenden Antikörpern gegen CD147 gefärbt.

Tabelle 46: Quantifizierung der CD147-positiven Partikel in den Plasmaproben von drei Patienten (Fall 1 – 3) in 1:25-Verdünnung (Abbildung 40, Chip 004, 019, 042).

Verdünnung	CD63-Dotierung	CD81-Dotierung	CD9-Dotierung	MIgG-Dotierung
Fall 1	$0,5 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$5,1 \times 10^4$	$<0,1 \times 10^4$
Fall 2	$0,25 \times 10^4$	$0,35 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$0,1 \times 10^4$
Fall 3	$0,18 \times 10^5$	$0,42 \times 10^5$	$0,9 \times 10^5$	$<0,05 \times 10^5$

Tabelle 47: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaprobe Fall 1 (Abbildung 40, Chip 004).

Vesikelzahl	CD63-Dotierung	CD81-Dotierung	CD9-Dotierung	MIgG-Dotierung
Gesamtzahl fluoreszierender Vesikel	$1,9 \times 10^4$	$2,9 \times 10^4$	$9,9 \times 10^4$	$0,4 \times 10^4$
davon CD147-positiv	$0,5 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$5,1 \times 10^4$	$<0,1 \times 10^4$
davon blau-fluoreszierend	$0,2 \times 10^4$	$0,1 \times 10^4$	$0,3 \times 10^4$	$0,2 \times 10^4$
nicht fluoreszierend	$0,8 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$5,8 \times 10^4$	$0,25 \times 10^4$

Tabelle 48: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaprobe Fall 2 (Abbildung 40, Chip 019).

Vesikelzahl	CD63-Dotierung	CD81-Dotierung	CD9-Dotierung	MIgG-Dotierung
Gesamtzahl fluoreszierender Vesikel	1,9x10 ⁴	1,4x10 ⁴	4,4x10 ⁴	1,1x10 ⁴
davon CD147-positiv	0,25x10 ⁴	0,35x10 ⁴	1,6x10 ⁴	0,1x10 ⁴
davon blau-fluoreszierend	0,8x10 ⁴	0,35x10 ⁴	1,4x10 ⁴	0,35x10 ⁴
nicht fluoreszierend	0,8x10 ⁴	0,6x10 ⁴	2x10 ⁴	0,4x10 ⁴

Tabelle 49: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaprobe Fall 3 (Abbildung 40, Chip 042).

Vesikelzahl	CD63-Dotierung	CD81-Dotierung	CD9-Dotierung	MIgG-Dotierung
Gesamtzahl fluoreszierender Vesikel	0,4x10 ⁵	0,8x10 ⁵	1,9x10 ⁵	0,3x10 ⁵
davon CD147-positiv	0,18x10 ⁵	0,42x10 ⁵	0,9x10 ⁵	<0,05x10 ⁵
davon blau-fluoreszierend	0,05x10 ⁵	<0,05x10 ⁵	0,17x10 ⁵	<0,05x10 ⁵
nicht fluoreszierend	0,2x10 ⁵	0,43x10 ⁵	1,2x10 ⁵	0,22x10 ⁵

Die Auswertung der Expressionsdaten für CD147 zeigte, dass auf den Partikeln aus Fall 1 zwei- bis dreimal so viele CD147-positive Signale detektiert wurde als in den Fällen 2 und 3. In den Proben von Fall 2 und Fall 3 wurden ähnlich viele CD147-positive Signale auf den einzelnen Dotierungsstellen detektiert. Auf den Partikeln aus Fall 2 wurde die höchste Zahl an Fluoreszenzsignalen im blauen Kanal aufgezeichnet. In den Fällen 1 und 3 waren diese vergleichsweise gering.

In allen drei Fällen wurden auf den CD63-positiven Partikeln die wenigsten, auf den CD81-positiven Partikeln mehr und auf den CD9-positiven Partikeln die meisten CD147-positiven Partikeln detektiert. Damit wird, nach Auswertung dieser Kohorte, CD147 auf Vesikeln aus

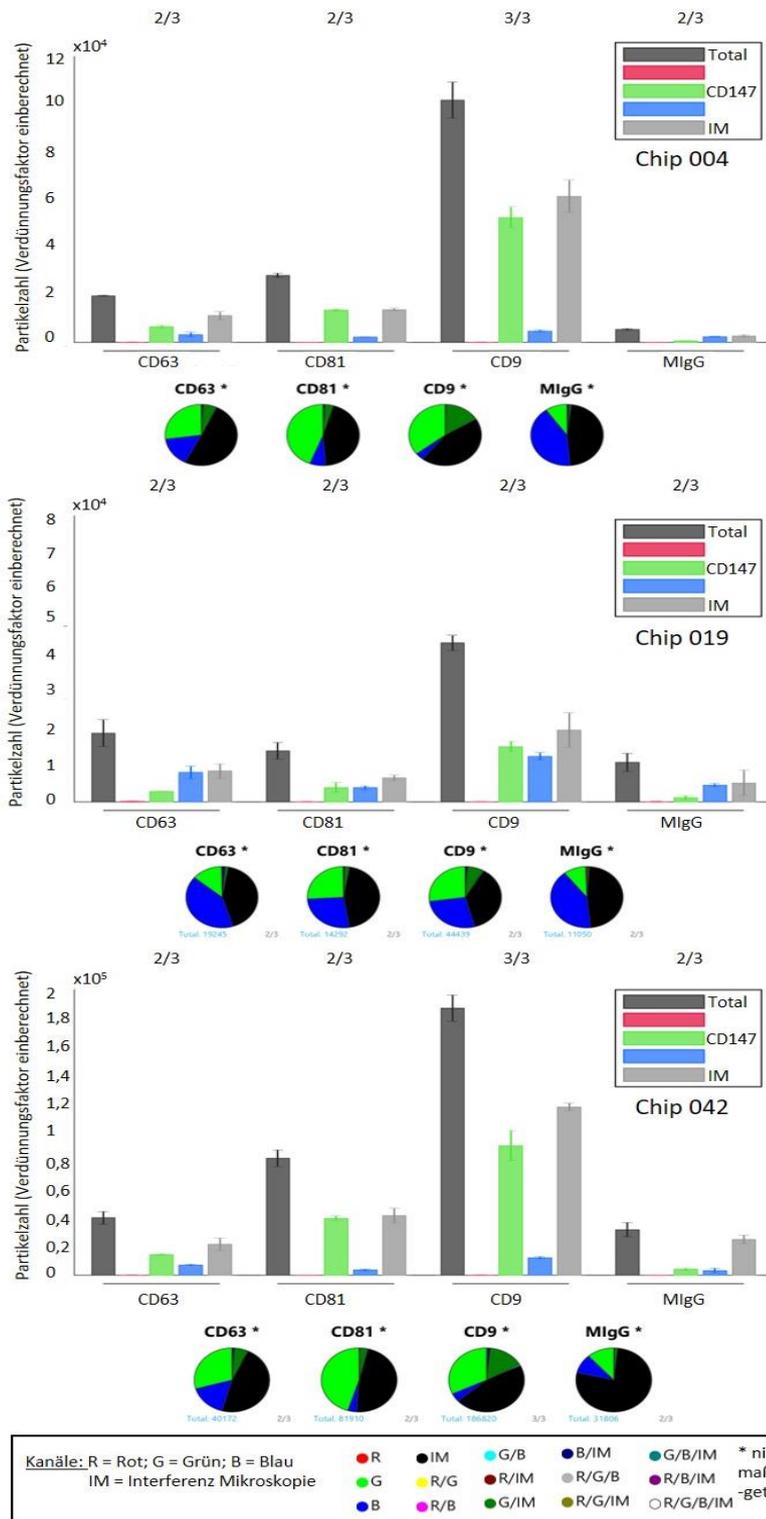


Abbildung 40: Fluoreszenzmessungen von extrazellulären Vesikeln (EV) aus drei unabhängigen Plasmaproben auf antikörper-dotierten Stellen von drei Nano-Chips. Dotierung des Nano-Chips mit Antikörpern gegen CD63, CD81, CD9, MlgG. EVs wurden mit PE-gekoppelten Antikörpern gegen den Tumormarker CD147 inkubiert. Anregung mit Licht der Wellenlängen 488, 555, 647 nm und Detektion der Emission im blauen, grünen und roten Kanal. Bestimmung der Vesikel ohne gebundenen Fluoreszenz-Antikörper (IM, hellgrauer Balken) durch Subtraktion der fluoreszierenden Vesikel von der, durch differenzielle Lichtstreuung bestimmten, Gesamtpartikelzahl (Total, dunkelgrauer Balken). Der relative Anteil der EV-Populationen ist als Tortendiagramm dargestellt. MlgG-Antikörper = Negativkontrolle

Blutplasma nachweislich exprimiert und ist stark mit CD9 kolokalisiert (Abbildung 40, Tabellen 46-49).

4.6 Anreicherung von Exosomen durch magnetische *Beads*

Um Exosomen gezielt aus biologischen Proben zu isolieren, wurden magnetische *Beads* mit Antikörpern gegen Exosomenmarker (CD63) oder gegen Tumormarker (CD147) gekoppelt. Damit wurden dann Exosomen aus Zellkulturüberständen und Plasmaproben angereichert und charakterisiert (Details siehe Kapitel 3.5.1).

4.6.1 Anreicherung von Exosomen aus Zellkulturproben mittels *Beads*

Zur Etablierung dieser Methode wurden Zellkulturüberstände vor und nach Ultrazentrifugation in verschiedenen Verdünnungen mit den modifizierten magnetischen *Beads* behandelt und nachfolgend mittels TEM und Westernblot charakterisiert.

4.6.1.1 CD63 als Zielprotein

Die Bildgebung zeigte zahlreiche sphärische Partikel mit einer Größe zwischen 50 und 100 nm, die sich über den kompletten Beobachtungsabschnitt ausbreiteten. Die Partikel kamen dabei überwiegend verstreut und solitär vor, waren aber häufig auch kettenartig und teilweise ringförmig angeordnet. Die Oberfläche des kohlebeschichteten Kupfergitters war ansonsten frei von jeglicher Art von Kontaminationen oder Anhaftungen anderer Partikel und Lösungsmittelrückständen (Abbildung 41; A, B; gelbe Pfeile).

Bei näherer Betrachtung eines der ringförmigen Strukturen zeigte sich, dass diese mehrheitlich aus sphärischen Partikel mit einer Doppelmembran und einer Größe zwischen 40 und 70 nm zusammengesetzt, und mit kleineren, gleichartigen Partikeln mit einer Größe kleiner als 40 nm, assoziiert waren (Abbildung 42).

Die Anreicherung wurde an verschiedenen Mischungsverhältnissen von Probe zu *Beads* bei verschiedenen Proben-Verdünnungen gemessen und mittels Westernblot semi-quantitativ analysiert. Zelllysat und konzentrierte Exosomen aus Zellkultur dienten als Positivkontrolle. Unkonditioniertes Medium, dass mit den *Beads* inkubiert wurde diente als Negativkontrolle.

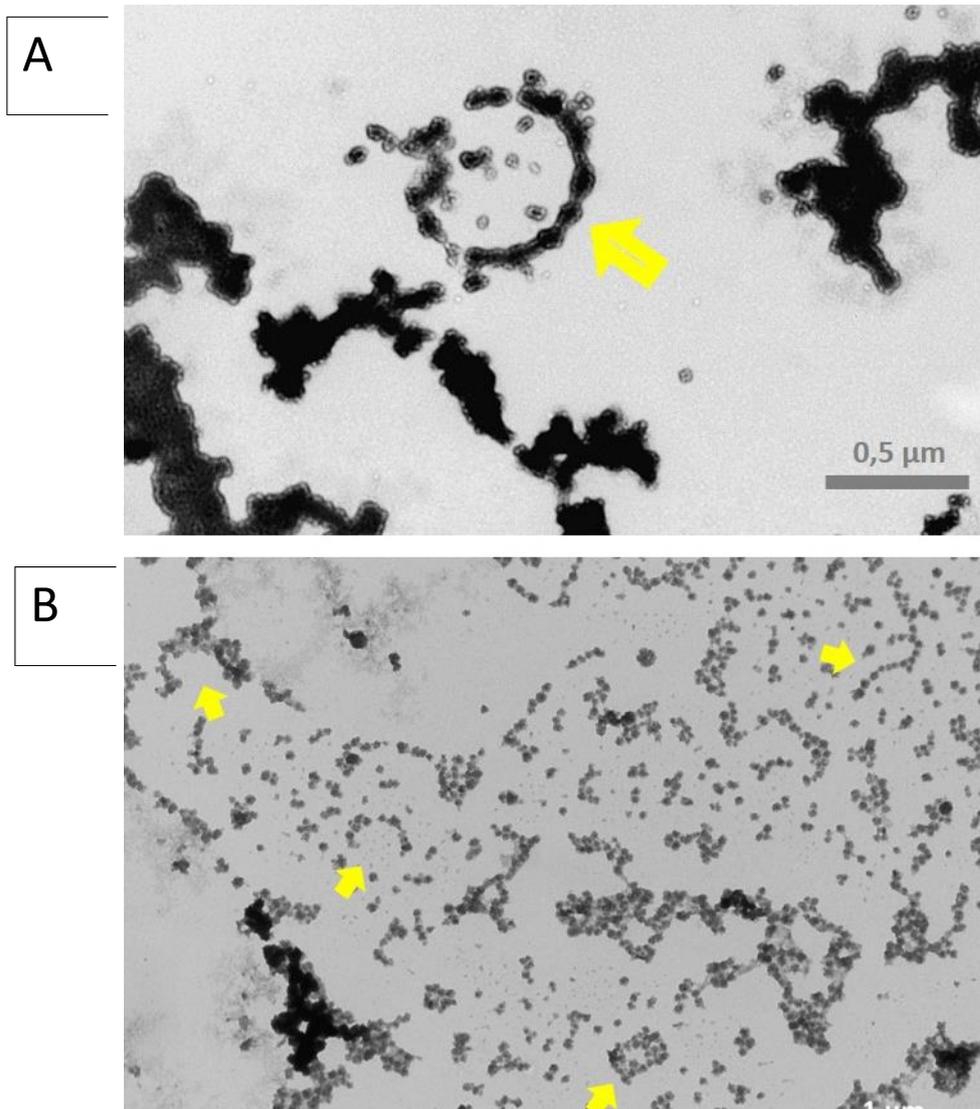


Abbildung 41: Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Aufnahme von Exosomen aus Nierenzellkarzinomzelllinien als qualitativer Nachweis der Isolation von extrazellulären Partikeln mittels CD63-positiver *Beads*. A: Einzelaufnahme von kreisförmig angeordneten, sphärischen Partikeln. B: Übersichtsaufnahme von sphärischen Partikeln mit einer Größe von unter 200 nm. Gelbe Pfeile deuten auf Überbleibsel von kreisförmigen Anordnungen dieser Partikel.

Der Einsatz einer unverdünnten und einer 1:10-verdünnten Exosomenprobe in einem Probe-zu-*Bead*-Verhältnis von 1:1 mit einem verwendeten Volumen von 100 μl CD63-positiver *Beads* führte zu den höchsten Konzentrationen angereicherter CD63-positiver Exosomensubpopulationen.

Es konnten mit diesem Anreicherungsverfahren Exosomen in geringer Konzentration aus Zellkulturüberstand ohne vorausgehende Ultrazentrifugation isoliert werden.

CD9-positiv Subpopulationen wurden durch die Anreicherung mit CD63-gekoppelten *Beads* stark diskriminiert (Abbildung 43).

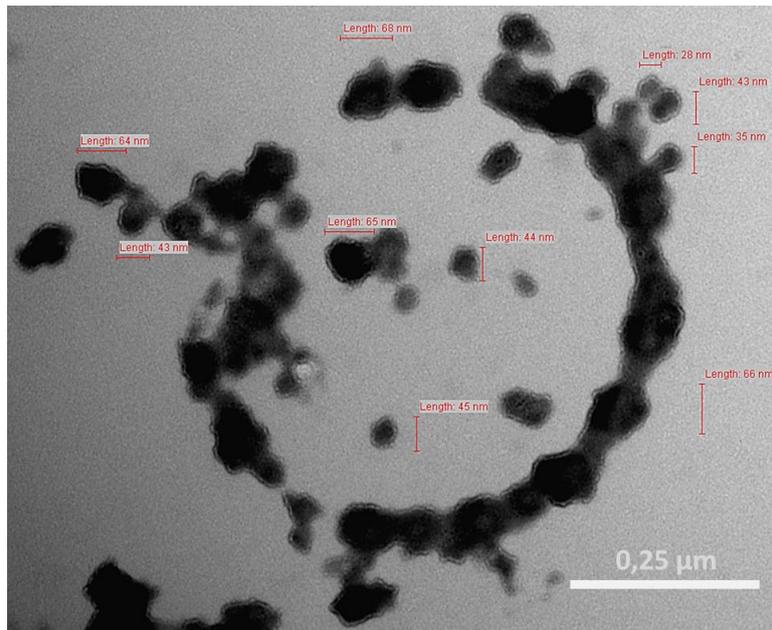


Abbildung 42: Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Aufnahme von Exosomen aus Nierenzellkarzinomzelllinien als qualitativer Nachweis der Isolation von extrazellulären Partikeln mittels CD63-positiver Beads. Vergrößerung aus Abbildung 41, A.

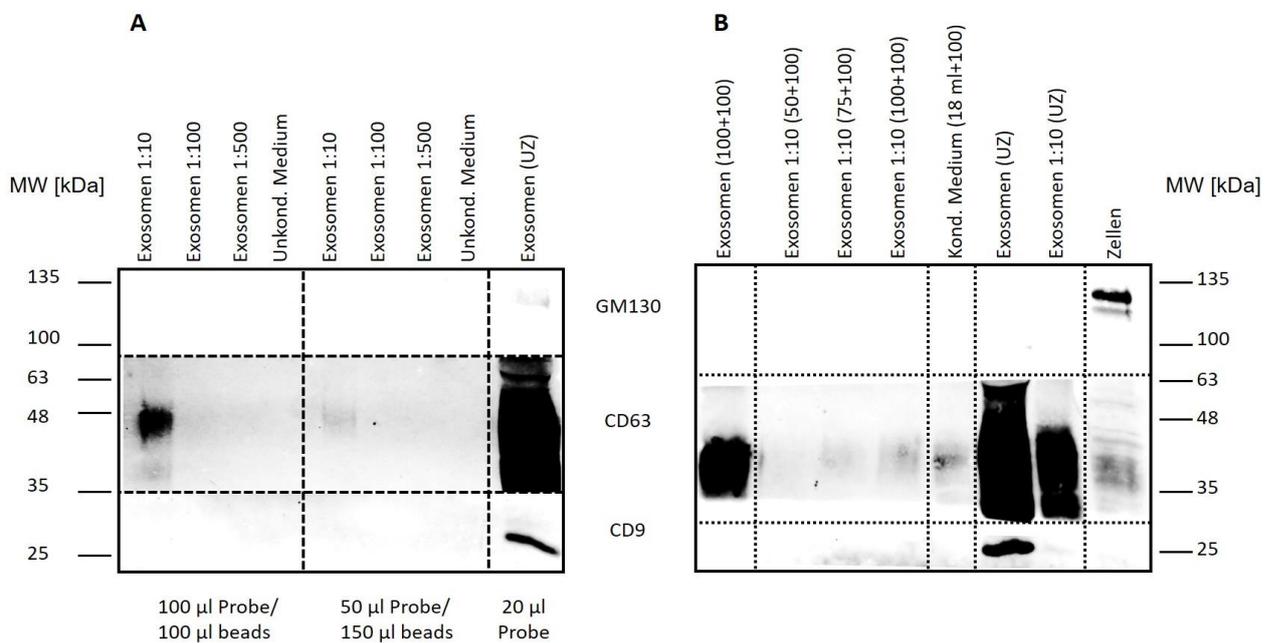


Abbildung 43: Western-Blot-Analyse von Proteinen aus Exosomen, isoliert aus einer Nierenzellkarzinomzelllinie (786-O) mittels CD63-positiver, magnetischer *Beads*. Exosomen, bzw. Extrazelluläre Vesikel, wurden aus Zellkulturüberständen mittels Ultrazentrifugation vorisoliert und danach in verschiedenen Verdünnungsstufen mit den entsprechenden *Beads* inkubiert. Ebenso wurde der Zellkulturüberstand der Nierenzellkarzinomzelllinie vor der Ultrazentrifugation mit den CD63-positiven *Beads* inkubiert. Als Positivkontrolle dienten die Exosomen aus Zellkulturüberstand nach Ultrazentrifugation und vor *Bead*-Inkubation, sowie das Zelllysat. **A:** Exosomenproben wurden 1:10, 1:100 oder 1:500 verdünnt und im Verhältnis 1:1 oder 1:3 mit der *Bead*-Suspension inkubiert. **B:** Unverdünnte Exosomenproben, 1:10 verdünnte Exosomenproben und konditioniertes Medium wurden in verschiedenen Mischungsverhältnissen mit *Beads* behandelt und mit unbehandelten Zell- und Exosomenlysaten verglichen. UZ=Ultrazentrifugation, MW=Molekulargewicht, kDa = Kilodalton

4.6.1.2 CD147 als Zielprotein

Konzentrierte unverdünnte Exosomenproben, 1:10 verdünnte Exosomenproben und konditioniertes Medium wurden mittels CD63-positiver *Beads* angereichert und zusammen mit unverdünnten Exosomenproben, 1:10 verdünnten Exosomenproben und Zelllysaten auf die Expression von Zellmarkern (GM130), Exosomenmarkern (CD63, CD81) und Tumormarkern (CD147, CD70) hin untersucht (Abbildung 44).

Der Zellmarker GM130 wurde im Zelllysate detektiert. GM130 und Calretikulin wurden weder in Exosomen von 786-O und Caki2, die mit CD63-positiven *Beads* angereichert wurden, noch in Exosomen von 786-O, die mit CD147-positiven *Beads* angereichert wurden, detektiert. Der Exosomenmarker CD63 wurde in der konzentrierten Exosomenprobe vor der Behandlung mit *Beads* im Bereich von 35 – 63 kDa, sowie in der konzentrierten Exosomenprobe nach der Behandlung mit *Beads* im Bereich von 48 – 63 kDa detektiert. In den anderen Proben war CD63 nicht nachweisbar. Der Exosomenmarker CD9 war in keiner Probe nachweisbar (Abbildung 44, A; Abbildung 45, B).

Der Tumormarker CD147 wurde in der konzentrierten Exosomenprobe vor der Behandlung mit *Beads* sowie im Zelllysate nachgewiesen. In den anderen Proben war CD147 nicht nachweisbar. Der Tumormarker CD70 war in keiner Probe nachweisbar (Abbildung 45, B).

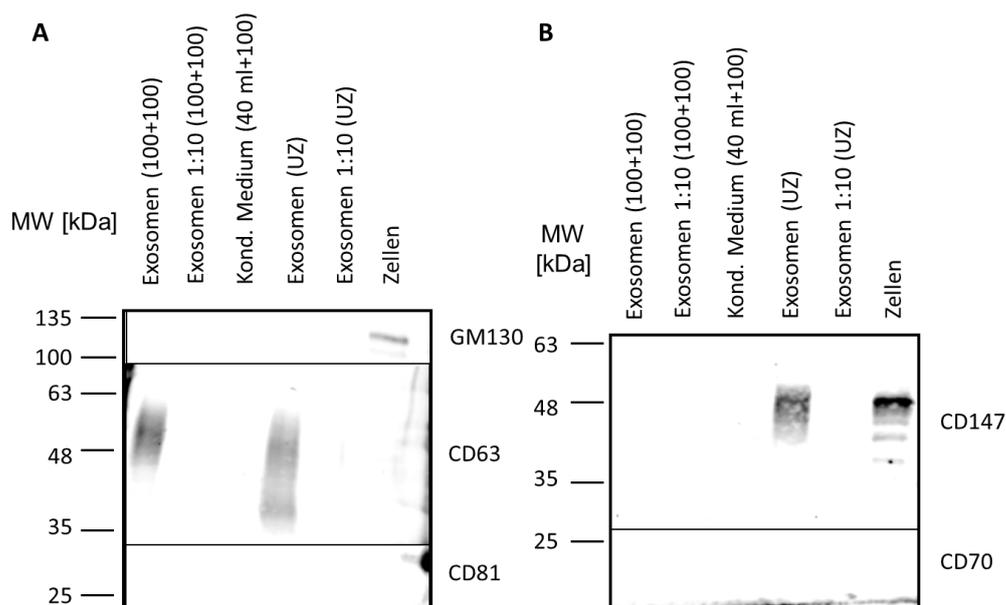


Abbildung 44: Western-Blot-Analyse von Proteinen aus Exosomen, isoliert aus einer Nierenzellkarzinomzelllinie (786-O) mittels CD63-positiver, magnetischer *Beads*. Exosomen, bzw. extrazelluläre Vesikel, wurden aus Zellkulturüberständen mittels Ultrazentrifugation vorisoliert und danach unverdünnt oder in 1:10-Verdünnung mit den entsprechenden *Beads* inkubiert. Ebenso wurde der Zellkulturüberstand der Nierenzellkarzinomzelllinie vor der Ultrazentrifugation mit den CD63-positiven *Beads* inkubiert. Als Positivkontrolle dienten die Exosomen aus Zellkulturüberstand nach Ultrazentrifugation und vor *Bead*-Inkubation (unverdünnt und 1:10-verdünnt), sowie das Zelllysate. UZ=Ultrazentrifugation, MW=Molekulargewicht, kDa=Kilodalton

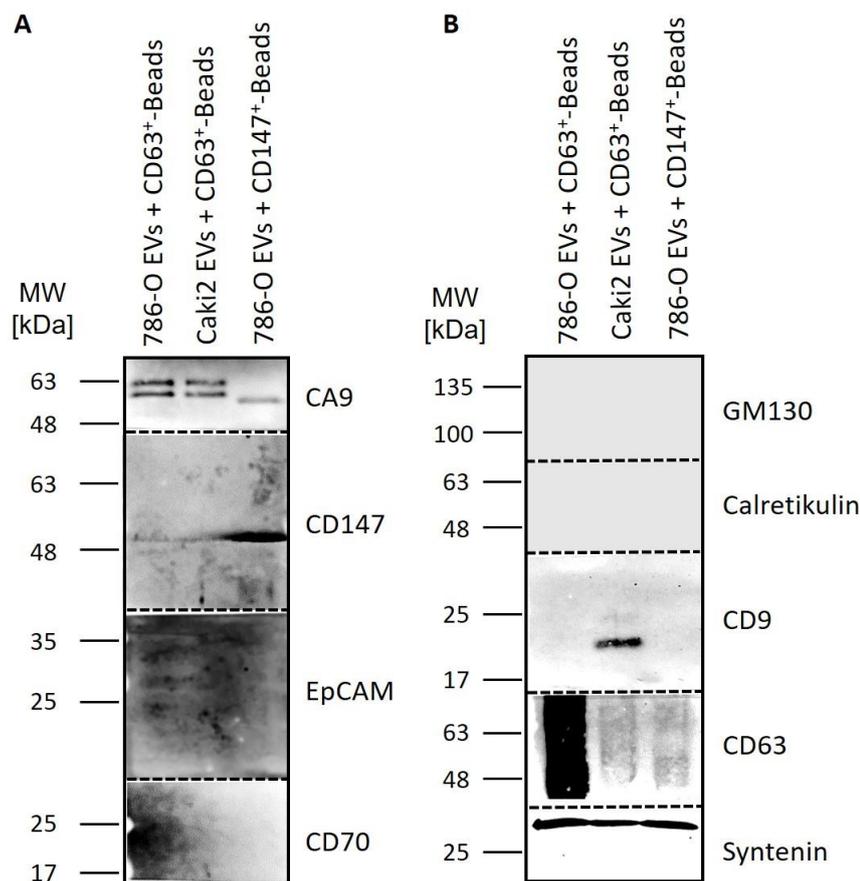


Abbildung 45: Western-Blot-Analyse von Proteinen aus Exosomen, isoliert aus Nierenzellkarzinomzelllinien (786-O, Caki2) mittels CD63-positiver oder CD147-positiver, magnetischer *Beads*. Exosomen, bzw. extrazelluläre Vesikel, wurden aus Zellkulturüberständen mittels Ultrazentrifugation vorisoliert und danach mit den entsprechenden *Beads* angereichert. A: Detektion von Tumormarkern (CA9, CD147, EpCAM, CD70). B: Detektion von Zellmarkern (GM130, Calretikulin) und Exosomenmarkern (CD9, CD63, Syntenin). EV = Extrazelluläre Vesikel bzw. Exosomen

Mit CD63- und CD147-positiven *Beads* konnten gezielt Exosomen angereichert werden, bei denen die Tumormarker CA9 und CD147 nachweislich exprimiert wurden. CA9 wurde erstmals in dieser Arbeit in einer Exosomenprobe der Zelllinie 786-O nachgewiesen. Die mit CD63-positiven *Beads* angereicherten Exosomen enthielten zwei Formen von CA9, die CD147-positiven Subpopulationen nur eine Form (Abbildung 45).

4.6.2 Anreicherung von Exosomen aus Plasmaproben mittels *Beads*

Die Anreicherungsversuche wurden mit CD63-positiven *Beads* an Plasma eines gesunden Probanden (Kontrolle) und eines Patienten durchgeführt und die Expression von zell-, exosomen-, sowie tumorspezifischen Proteine in den Isolaten mit der Expression in Zelllysaten

und Exosomenlysaten von 786-O verglichen. Die Plasmaproben wurden unverdünnt in einem Mischungsverhältnis von 1:1 mit den *Beads* inkubiert.

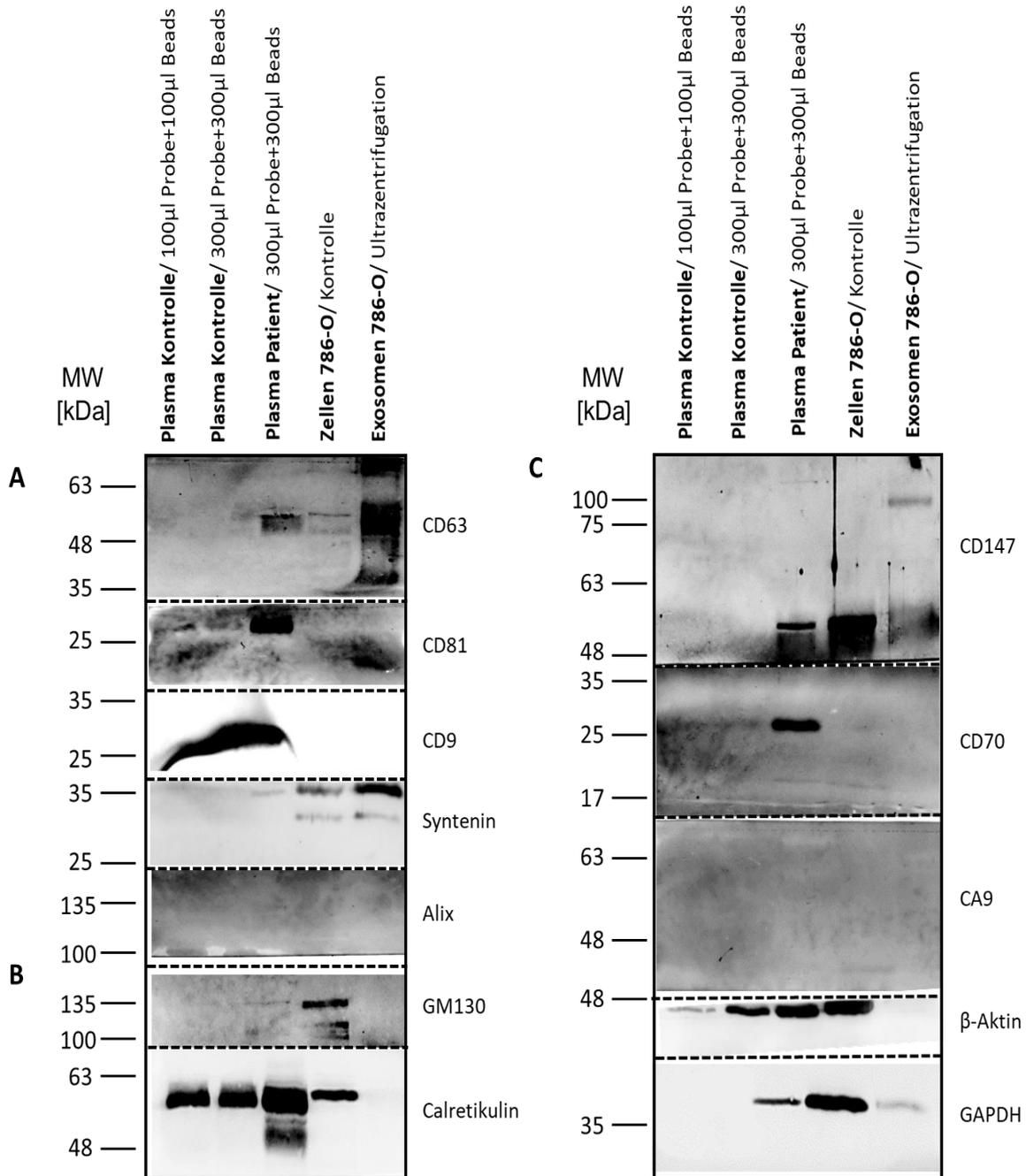


Abbildung 46: Western-Blot-Analyse von exosomen-spezifischen (A: CD63, CD81, CD9, Syntenin, Alix), zellulären (B: GM130, Calretikulin) und tumorassoziierten (C: CD70, CD147, CA9) Proteinen in Exosomen, isoliert aus Plasma und einer Nierenzellkarzinomzelllinie (786-O) mittels CD63-positiver, magnetischer *Beads*. Als Ladekontrolle dienten GAPDH und β-Aktin (C). Als Positivkontrolle wurden Zelllysate der Nierenkarzinomzelllinien 786-O, sowie Lysate von Exosomen aus Zellkulturüberstand dieser Zelllinie nach differenzieller Ultrazentrifugation, aufgetragen. UZ=Ultrazentrifugation; Plasma Kontrolle = Plasma eines gesunden Probanden; Plasma Patient = Plasma eines Probanden mit diagnostiziertem Nierenzellkarzinom.

Das Haushaltsgen β -Aktin wurde beim Einsatz von 100 μ l Probenvolumen Plasma sehr schwach, beim Einsatz von 300 μ l sehr stark, im Zelllysate von 786-O sehr stark und im Exosomenlysate von 786-O nicht exprimiert (Abbildung 46, C).

Der Einsatz von 100 μ l und 300 μ l Probenvolumen zeigte, außer bei β -Aktin, keine Unterschiede bei den detektierten Signalen der anderen untersuchten Proteine. Der Zellmarker Calretikulin wurde, anders als der Zellmarker GM130, in den Exosomenproben des Plasmas festgestellt (Abbildung 46, B). Eine hohe Reinheit der isolierten Exosomen kann somit nicht garantiert werden. Die Tumormarker CD147 und CD70 wurden in der Patientenprobe stärker exprimiert als in der Kontrolle, ähnliches wurde auch bei den Exosomenmarkern CD63, CD81 und CD9 beobachtet (Abbildung 46 A, C). Dies kann auf Unterschiede zwischen Patientenprobe und der Vergleichsprobe, oder in einer unterschiedlichen Anreicherungs-effizienz begründet sein. Eine Wiederholung dieses Versuches und eine größere Kohorte sind für eine Bestätigung und Einordnung dieser Ergebnisse nötig.

Weitere Anreicherungsversuche wurden mit CD63-positiven und CD9-positiven *Beads* an Plasma eines gesunden Probanden durchgeführt und die Expression von zell-, exosomen-, sowie tumorspezifischen Proteinen in den Isolaten mit der Expression in Zelllysaten und Exosomenlysaten von Caki2 verglichen. Die Plasmaproben wurden unverdünnt und 1:10 verdünnt in einem Mischungsverhältnis von 1:1 mit den *Beads* inkubiert (Abbildung 47).

Der Exosomenmarker Alix zeigte in der Plasmaprobe, die unverdünnt mit CD63-positiven *Beads* behandelt wurde, sowie in der Plasmaprobe, die 1:10 verdünnt mit CD63-positiven *Beads* behandelt wurde, und in der Plasmaprobe, die unverdünnt mit CD9-positiven *Beads* behandelt wurde, kein Signal. In der Plasmaprobe, die 1:10 verdünnt mit CD9-positiven *Beads* behandelt wurde, wurde ein sehr schwaches Signal für Alix detektiert. Im Zelllysate von Caki2 wurde ein schwaches Signal für Alix detektiert. In der Exosomenprobe von Caki2 wurde ein starkes Signal für Alix nachgewiesen.

Eine Vorbehandlung der Plasmaproben durch differenzielle Zentrifugation (DZ) führte zu keiner Verbesserung des Anreicherungsverfahrens für Extrazelluläre Vesikel aus Blutproben (siehe Anhang, Abbildung 48).

In den Exosomenproben die mittels CD63-positiver *Beads* aus Plasma angereichert wurden, war im Westernblot für CD63 ein einzelnes, scharf abgegrenztes Signal bei 63 kDa zu sehen, im Gegensatz zu den diffusen Signalen zwischen 48 – 63 kDa der Exosomenproben die nur mittels Ultrazentrifugation isoliert wurden (siehe Anhang Abbildung 48).

Die in den Chip-Experimenten beobachtete Häufigkeit von CD9-positiven Exosomen im Plasma sollte in diesem Versuch dazu genutzt werden, das Anreicherungsverfahren von

Exosomen durch den Einsatz CD9-positiver *Beads* zu verbessern. Es konnte verglichen mit der Anreicherung durch CD63-positive *Beads* keine Verbesserung im Sinne einer erhöhten Reinheit oder einer erhöhten Konzentration der Exosomen nachgewiesen werden. Weitere Versuche oder eine Optimierung der Synthese der CD9-positiven *Beads* sind zu empfehlen.

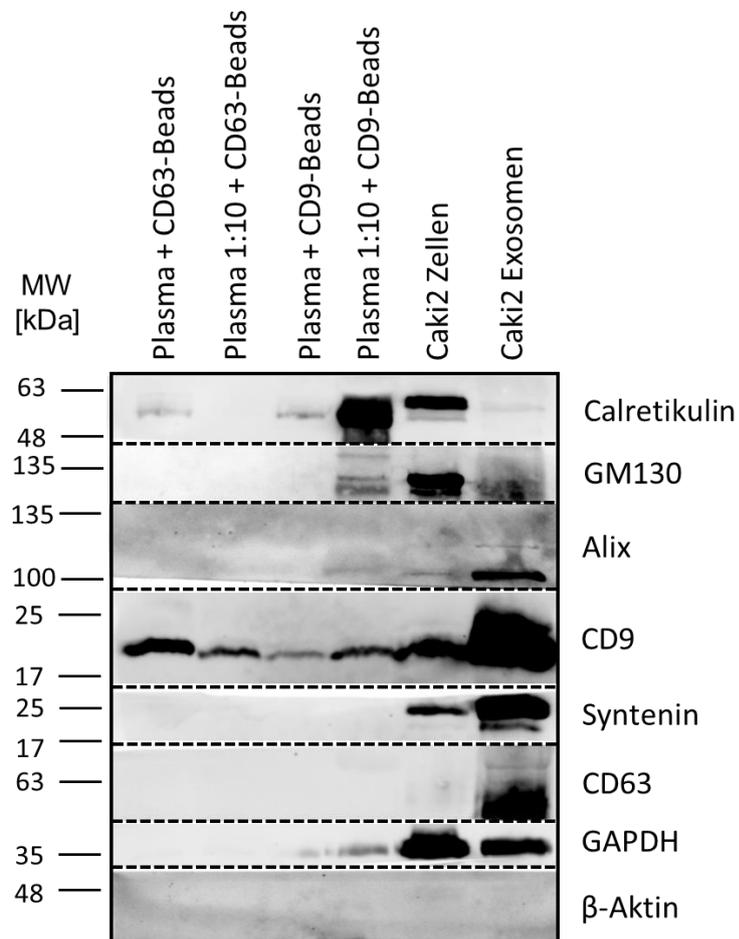


Abbildung 47: Western-Blot-Analyse von exosomalen und zellulären Proteinen, isoliert aus Plasma mittels CD9-positiver oder CD63-positiver, magnetischer *Beads*. Zell- (GM130, Calretikulin) sowie Exosomen-Marker (Alix, CD9, Syntenin und CD63) wurden nachgewiesen. GAPDH und β-Aktin dienten als Ladekontrolle. Als Positivkontrolle wurden Zelllysate der Nierenkarzinomzelllinie Caki2, sowie Lysate von Exosomen aus Zellkulturüberstand von Caki2 nach differenzieller Ultrazentrifugation, aufgetragen.

5. Diskussion

5.1 Charakterisierung von Exosomen aus Zellkultur

Ziel dieser Studie war es, tumorspezifische Proteine auf Exosomen als potenzielle Biomarker für die gezielte Anreicherung tumorspezifischer Exosomen aus Flüssigbiopsien zu identifizieren. Die Isolierung von Exosomen stellt, aufgrund ihrer geringen Größe und des hohen Kontaminationsrisikos mit Zellfragmenten und Lipoproteinkomplexen, eine große Herausforderung dar. Darüber hinaus ist es von grosser Bedeutung, Exosomen von anderen Vesikeln zu unterscheiden. Zu diesen zählen solche, die zum Beispiel durch Apoptose oder Membranknospung entstehen. Um die Isolierung von Exosomen zu optimieren, wurde ein standardisiertes Protokoll mit Ultrazentrifugation als Trennverfahren für zelluläre Partikel auf vier verschiedenen NZK-Zelllinien erstellt. Die Grössenverteilungen innerhalb der isolierten Partikelproben waren zelllinienabhängig (wie durch NTA nachgewiesen), ebenso die typischen Proteinexpressionsmuster von Exosomenmarkern.

Die Unterschiede bezüglich der gemessenen Größen der Exosomen, die mittels TEM und NTA festgestellt wurden, resultieren vermutlich aus der effektiveren Bündelung kleiner Exosomen auf dem für die TEM verwendeten Kohle-Kupfer-Gitter. Daher ist NTA die bevorzugte Methode zur Bestimmung der Größenverteilung von Exosomen in Lösung, da Partikel nicht durch diesen Effekt diskriminiert werden. Weil CD9 nicht in allen NZK-Zelllinien in Exosomen exprimiert wurde, kann es nicht als allgemeiner Marker für Exosomen aus Tumorzellen dienen. CD81 stellte auch keinen geeigneten, allgemeingültigen Exosomenmarker für das klarzellige Nierenzellkarzinom in Zellkultur dar, da seine Expression zwischen den Zelllinien sehr unterschiedlich war und in Exosomen fehlte. Es wurde jedoch eine stabile Expression von CD63 festgestellt, was seinen Wert als universeller Exosomenmarker gemäß den aktuellen Richtlinien der *International Society of Extracellular Vesicles* zur Isolierung von Exosomen [88] bestätigt. Gemäß diesen Richtlinien sollen mindestens drei positive Proteinmarker für EVs, darunter mindestens ein Transmembran-/Lipid-gebundenes Protein und ein zytosolisches Protein, sowie mindestens ein negativer Proteinmarker nachgewiesen werden.

Da sich die Zelllinien in Morphologie und Stoffwechsel unterscheiden, ist es wahrscheinlich, dass sich ihre Exosomen auch in Größe, Anzahl und Oberflächenmarkern unterscheiden. Diese Heterogenität spiegelte sich auch in der Expression von Tumormarkern wider. Die Wahl der drei mutmaßlichen Tumormarker und EpCAM als Epithelzellmarker resultierten aus der Recherche der verfügbaren Literatur. CD70 wurde nur in Gestalt von Mehrfachbanden (Vielfache des erwarteten Molekulargewichts) nachgewiesen. Solche Mehrfachbanden wurden auch von den Herstellern der Antikörper [223, 224] als Erwartungswerte angegeben. In anderen Publikationen wurden für CD70 im Western Blot Einfachbanden im Bereich von 21

– 30 kDa [225, 226] und Mehrfachbanden [227] beschrieben. Mehrfachbanden können aufgrund der Bildung von Multimeren entstehen und wurden ausschließlich in den Zellproben festgestellt. In 786-O- und Caki2-Exosomen wurden hingegen keine CD70-Proteine exprimiert.

CA9 wurde nur in der Caki2-Zelllinie exprimiert und in ihren Exosomen weiter angereichert. Das Molekulargewicht variierte zwischen der Zellprobe und der Exosomenprobe, was auf die zwei Hauptformen, die es von diesem Protein gibt, zurück zu führen ist. Eine dieser Hauptformen ist ein zellassoziertes Transmembranprotein, das auf Western Blots als Doppelbande von 54/58 kDa erscheint. Das andere ist ein lösliches Protein mit einem Molekulargewicht von 50/54 kDa, das höchstwahrscheinlich aus der proteolytischen Spaltung des extrazellulären Teils von Transmembran- und intrazellulären Sequenzen resultiert [228-229]. Nur CD147 zeigte eine starke Expression, sowohl in 786-O- als auch in Caki2-Zellen. Es wurde daher an zwei anderen NZK-Zelllinien (Caki1 und RCC53) getestet. Die Westernblotdaten bestätigten, dass CD147 in allen NZK-Zelllinien und ihren Exosomen prominent exprimiert wurde. Das Molekulargewicht variierte zwischen den Zelllinien, was auf unterschiedliche Glykosylierungsmuster zurückzuführen ist [166]. Abgesehen von der Kontrollzelllinie MCF7 war die Expression von EpCAM sehr gering oder unterhalb der Nachweisgrenzen.

In Blasenkarzinomzelllinien sind die Zellmarker GM130 und Calretikulin sowie die Exosomenmarker CD9, Syntenin und CD63 als Qualitätskontrolle für den Isolationsprozess von Exosomen geeignet. CD81 ist dafür nur bedingt, Alix gar nicht geeignet. Die Sekretion von Exosomen ist auch im Blasenkarzinom hinreichend beschrieben. Dabei hängt die Zusammensetzung der Exosomenmarker sowie deren Expression maßgeblich von der Herkunft der Exosomen und dem Tumorstadium ab [230]. So zeigt sich auch hier, dass für einen validen Nachweis von Exosomen ein möglichst breites Spektrum an Markern vonnöten ist, da Exosomen bestimmter Zelllinien gewisse Marker nicht exprimieren bzw. so schwach exprimieren, dass diese mittels Westernblot nicht detektierbar sind.

Abhängig von der Zusammensetzung der Proteine, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate und Lipide spielen Exosomen von Blasentumoren eine bedeutende Rolle in der Tumorphyse, bis hin zur Veränderung gesunder Zellen des Urothels [231]. CA9 kann nur sicher in Exosomen von 253J-BV nachgewiesen werden. Ansonsten konnte CA9 mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden, obgleich es schon in Exosomen beschrieben wurde [232-234].

CD147 hingegen kommt in allen Zelllysaten vor und scheint auch in den Exosomen von J82 und 253J-BV schwach exprimiert zu werden. Die CD147-Überexpression wurde schon als ein unabhängiger prognostischer Faktor beschrieben. So konnte in anderen Arbeiten gezeigt

werden, dass die Überexpression von CD147 eine wichtige Rolle beim Fortschreiten von Blasenkarzinomen spielt und CD147 ein potenzielles Ziel der Therapie des Blasenkarzinoms sein könnte. Zum Beispiel können durch Herunterregulierung von CD147 die Sekretion von MMP-2 und MMP-9 und die Expression von VEGF in diesen Zellen verringert werden [235].

EpCAM und CD70 kamen als Markerproteine nicht in Betracht. CD70 wurde bisher vor allem mit dem Nierentumor in Verbindung gebracht [116], für Blasentumoren gibt es bis dato keine Hinweise. Die EpCAM-Expression in Geweben von Nierentumoren ist stark abhängig vom histologischen Subtyp. Das klarzellige Nierenzellkarzinom ist überwiegend EpCAM-negativ. Beim nicht klarzelligem Nierenzellkarzinom hingegen ist in mehr als der Hälfte der Fälle eine EpCAM-Überexpression beschrieben, und nur ein Drittel ist EpCAM-negativ [236]. Eine erhöhte Expression von EpCAM-Molekülen wurden in Geweben und Zelllinien von Prostatakrebs auf mRNA- und Proteinebene bereits beschrieben. Eine Hochregulierung der EpCAM-Expression ist in frühen Stadien der Prostatakarzinogenese zu beobachten. Eine weitere Induktion erfolgt bei hochgradigen Tumoren und metastatischen Läsionen [237, 238].

Dagegen korreliert EpCAM im Urin mit dem Stadium und Grad des Blasenkarzinomes. Neben Grad und Stadium ist eine erhöhte EpCAM-Konzentration im Urin ein unabhängiger Indikator für das blasentumorspezifische Überleben. Ein erhöhter EpCAM-Wert im Urin ist ein unabhängiger Indikator für eine schlechte Prognose für die blasenkrebspezifische Mortalität [239, 240].

β -Aktin und GAPDH bestätigen das korrekte und gleichmäßige Laufverhalten der untersuchten Proteine in der SDS-PAGE und die gleichmäßige Ladung der Proben in alle Taschen. Die genannten Proteine verhielten sich im Laufverhalten wie β -Aktin und GAPDH. Auffällig ist, dass es zu einer verringerten Expression in den Exosomen kommt. GAPDH ist eines der fünf am häufigsten mit EVs assoziierten Proteine, es ist sowohl im Lumen von EVs als auch auf der Oberfläche der EVs präsent [241]. Zellen haben β -Aktin als Bestandteil des Zytoskeletts, wohingegen Exosomen als kleine Vesikel ohne Zytoskelett auskommen [242]. Exosomen benötigen wegen ihrer geringen Größe β -Aktin nicht primär als Zytoskelett, sondern vielmehr, um durch Interaktion mit Cortaktin und anderen Proteinen das zelluläre Zytoskelett als Transportmaschinerie zu nutzen [243]. Somit sind im direkten Vergleich mit dem Zelllysate im Exosomenlysate oft weniger oder kein β -Aktin mittels Westernblot nachweisbar.

In Prostatafibroblastenzelllinien lassen sich die Zellproben anhand der eingesetzten Exosomenmarker nicht eindeutig von den Exosomenproben abgrenzen, da sie in Exosomen annähernd gleich stark exprimiert oder teilweise sogar aussortiert werden. In der Literatur ist

die Rolle von Exosomen im Prostatakarzinom und die Interaktion mit Stromazellen sehr gut beschrieben [244, 245]. Das unerwartete Expressionsmuster von Exosomenmarkern in Zellen und Exosomen von Prostatafibroblasten könnte auf einen allgemein sehr hohen Metabolismus der Mutterzellen der Exosomen zurück zu führen sein. So wurde in anderen Studien schon beschrieben, dass Patienten mit aggressivem Prostatakarzinom höhere Mengen an mit dem Prostatakrebs in Zusammenhang stehenden Exosomen im Blut aufweisen [246]. Dafür können bestimmte Proteine (Rab27a/b- Rab3) [247, 248], die Akkumulation von intrazellulärem Ca^{2+} [249] oder der pH-Wert (intrazellulär oder interzellulär) [250, 251] verantwortlich sein.

Hier dient also vor allem der Zellmarker als Beweis, dass die zellulären Bestandteile erfolgreich entfernt wurden. EpCAM wird sehr schwach, CD147 sehr stark exprimiert.

Von tumorassoziierten Fibroblasten ist bekannt, dass sie die am häufigsten vorkommenden Komponenten des Tumorstromas sind und dass über CD147 benachbarte Fibroblasten durch CD73-Interaktion stimuliert werden können, wodurch die Sekretion von MMP-2 erhöht sowie Invasion und Metastasierung gefördert werden [252]. Die positive CD147-Expressionsrate war eng mit den klinischen Merkmalen des Prostatakarzinomes verbunden, aber aufgrund der Ergebnisse der Untergruppen sind weitere Untersuchungen erforderlich, um die divergenten Ergebnisse zu bestätigen. [253]. Eine hohe Expression von EpCAM ist in primären Karzinomen mit einer schlechten Prognose verbunden [237]. Das EpCAM-Protein ist im tumorassoziierten Stroma der Prostata, im Vergleich zu den entsprechenden normalen Geweberegionen derselben Patienten, hochreguliert [254]. Der Einfluss der EpCAM-Expression auf Signalwege im Tumormikromilieu, vor allem dem mTOR-Signalweg [255], könnte auch durch Exosomen vermittelt sein. Die Unterschiede im Expressionsverhalten in Exosomen von Prostata-Normalfibroblasten und Prostata-Tumorfibroblasten sind hier allerdings zu gering, als dass sie die These stützen können.

CA9 ist nicht vorhanden und spielt damit auch für diese Zelllinien keine Rolle. Oft beschrieben ist die extrazelluläre Ansäuerung in vielen Malignomen, hauptsächlich zurückzuführen auf die metabolischen Reprogrammierung von Tumorzellen, sowie verbunden mit der Expression von Carboanhydrasen oder Protonenpumpen durch maligne Tumorzellen. So wurde auch schon nachgewiesen, dass bei aggressiven Prostatakarzinomen, die hin zu einem anabolen Stoffwechsel umprogrammiert wurden, die extrazelluläre Ansäuerung hauptsächlich durch Stromazellen vermittelt wird [256].

Der Vergleich der Expression von zell-, exosomen- und tumorspezifischen Proteinen in Zelllinien von Tumoren der Niere, der Blase, sowie der Prostata verdeutlichte die bereits beschriebenen [257-262] Unterschiede zwischen den Entitäten. Für die urologischen

Tumorentitäten Niere, Blase, Prostata gibt es publizierte Daten, die belegen, dass Exosomen eine entscheidende Rolle bei der Tumorprogression spielen [263].

Die Qualitätskontrolle durch die Detektion der Expression eines Marker-Panels zell- und exosomenspezifischer Proteine zeigte in allen Proben, dass die Expression von zellspezifischen Proteinen in den Exosomenproben abnimmt, während die Expression von exosomenspezifischen Proteinen in Exosomenproben zunimmt – was insgesamt für eine erfolgreiche Isolation von Exosomen aus Zellkulturüberständen spricht. Die Detektion der Haushaltsproteine β -Aktin und GAPDH zeigt auch hier, dass sich die Signale im erwarteten Bereich (45 kDa und 37 kDa) befanden und somit auch für die anderen detektierten Proteine keine Verschiebung hin zu anderen, als den erwarteten, Größenbereichen zu erwarten ist. Bei Betrachtung der Stärke der Proteinexpression von β -Aktin fällt auch hier auf, dass β -Aktin innerhalb der Zellproben und innerhalb der Exosomenproben jeweils gleich stark exprimiert wurde, aber die Exosomenproben hinsichtlich der Zellproben eine verringerte Expression zeigen. Bei Betrachtung der Expressionsstärke von GAPDH zeichnet sich eine deutlich inhomogenere Expression ab. Aber auch bei GAPDH ist die Expression in den Exosomenproben etwas geringer, mit Ausnahme von T24 (Expression etwas höher) und BPH (Expression in etwa gleich). Die Unterschiede zwischen Zellen und Exosomen ergeben sich aus der Tatsache, dass Exosomen innerhalb der Zelle prozessiert werden und die Haushaltsproteine als Teil des Zytoskelettes sowie des metabolischen Komplexes [264, 265] nicht zwingend in die Exosomen eingebaut werden. Die Überexpression in 786-O- und T24-Exosomen rührt aus einer verringerten Reinheit der Exosomenisolate, erkennbar an den Expressionssignalen von Calretikulin.

Lösliches CD147 wurde in Gewebekulturüberständen als Protein mit voller Länge (*full length protein*) oder als ein Spaltprodukt, das die extrazelluläre Domäne enthält, gefunden [179]. Lösliches CD147 wurde auch schon in Mikrovesikeln (Exosomen) nachgewiesen [266 – 268]. Die Präsenz von CD147 in konditioniertem Medium ist maßgeblich auf die Freisetzung und anschließende, zeitabhängige Degradation dieser Partikel zurückzuführen. So handelt es sich bei den in Exosomen nachgewiesenen CD147-Proteinen um die lösliche oder membrangebundene und freigesetzte Form von CD147. Wobei mit dieser Methode nicht bestimmt werden kann, ob sich das lösliche CD147 frei im Lösungsmittel befindet, aus dem Lumen der lysierten Exosomen stammt oder membrangebunden ist. CD147 wird eine zentrale Funktion bei der Vesikelfreisetzung zugeschrieben [269]. Eine Freisetzung durch Proteolyse kann ausgeschlossen werden, denn bei den CD147-Proteinen, die bei in Zellkulturüberständen absedimentierten Proben detektiert wurden, handelte es sich um die intakte Form mit N- und C-Terminus [270].

CD70 wird in der einschlägigen Literatur vor allem im Zusammenhang mit der Immunantwort im Nierentumor und Prostatakarzinom beschrieben [138, 271, 272]. Das erwartete Expressionssignal für CD70 bei 21,1 – 23,4 kDa [273] ist im Zelllysate von T24 und HCV29 klar nachweisbar, im Zelllysate von HEK und VCap aber sehr schwach ausgeprägt, und im Zelllysate von 786-O und BPH nicht nachweisbar. In den Exosomen ist CD70 bei keiner dieser Zelllinien exprimiert. In Exosomen wird dieses Protein in der nativen Form (20 – 30 kDa) während der Biogenese von Exosomen aussortiert, nicht einsortiert oder gespalten. Das Signal bei unter 17 kDa, das in Exosomen von T24 und VCap sowie in Zellen von HEK detektiert wurde, könnte auf das membranständige Spaltprodukt oder die Spleißvariante von CD70, das eine Größe von circa 7 kDa [274] hat, hinweisen.

CA9 ist vor allem in Exosomen von T24 und BPH nachweisbar und kommt dort in zwei Varianten mit Molekulargewichten von 50 und 55 kDa vor. In Exosomen von HEK und HCV29 wird CA9 zum Großteil, und in Exosomen von 786-O und VCap vollständig, ausgeschlossen. Bemerkenswert ist, dass CA9 in den Zelllysaten von Nieren- und Blasen-tumorzelllinien in der 50-kDa-Form auftritt, und in den Zelllysaten der Prostata-tumorzelllinien sowohl in der 50-kDa-Form als auch in der 55-kDa-Form. Dahingegen sind in der Exosomenprobe der Blasen-tumorzelllinie T24 wieder beide Varianten vorhanden, was für eine verstärkte Einlagerung der 55-kDa-Form in T24-Exosomen spricht. CA9 ist über seine Enzymaktivität und/oder nichtkatalytische Mechanismen an vielen Schritten der Tumorentwicklung beteiligt und führt in der Tumormikroumgebung vieler Tumorentitäten zu regionaler Hypoxie und Azidose. Das führt dazu, dass Tumorzellen in die Lage versetzt werden, Angiogenese zu fördern, den eigenen Stoffwechsel umzugestalten, invasiv zu werden, die Fähigkeit zu metastasieren erwerben und Resistenzen zu entwickeln [151, 275]. Eine starke prognostische Aussagekraft hat exosomales CA9 vor allem im klarzelligen Nierenzellkarzinom [276], der hier gemachte Vergleich zwischen einzelnen Zelllinien spiegelt nicht die Heterogenität von Tumoren *in-vivo* wider.

5.2. Charakterisierung von Exosomen aus Gewebe

Obwohl etablierte Zelllinien effektive Modelle für *In-vitro*-Studien darstellen, unterscheiden sich diese Modelle aufgrund der Selektion nach Explantation der Tumoren und fehlender Kommunikation innerhalb der Tumormikroumgebung oft erheblich von *In-vivo*-Situationen. Daher wurde sich bei den nachfolgenden Untersuchungen weiter auf Primärtumorgewebe von Patienten konzentriert. Wegen der viel stärkeren Zell-Zell-Kontakte innerhalb eines Zellverbandes stellt die Extraktion und Reinigung von Exosomen aus Geweben eine große Herausforderung dar. Bisher gibt es nur wenige Daten zur Isolierung von Exosomen aus Nierengewebe. Zieren *et al.* berichteten über die Isolierung von Exosomen basierend auf

Kollagenasebehandlung, differentieller Zentrifugation und Filtration mit 800-nm- und 450-nm-Filtern, gefolgt von Ultrazentrifugation [277]. Im Gegensatz dazu basierte das in der vorliegenden Arbeit verwendete Protokoll auf einem Dichtegradienten ohne mechanische Filter. Nach bestem Wissen war dies zum Zeitpunkt der Veröffentlichung [278] der erste Bericht über die erfolgreiche Isolierung von Exosomen aus tumorösen und normalen Nierengewebeproben basierend auf Ultrazentrifugation in Kombination mit einem Saccharosegradienten. Durch die Anwendung eines Saccharosegradienten zur Verringerung der im Nierengewebe vorhandenen Verunreinigungen wurden die entsprechenden Exosomen erfolgreich in hoher Konzentration und Reinheit isoliert, wie durch Western Blot, TEM und NTA bestätigt werden konnte. Dabei etablierte sich 1,3 M Saccharose als optimale Konzentration. Der Vergleich mit Exosomen aus Zellkultur zeigte Unterschiede in der Expression der tumorspezifischen Markerproteine. Die Verifizierung der isolierten Exosomen basierte auf den aktuellen Qualitätsstandards und Richtlinien zur Charakterisierung extrazellulärer Vesikel [88]. Neben der Größe spielt die Quelle der Exosomen eine wichtige Rolle bei der Auswahl der Isolierungsmethode. Das verwendete Isolierungsprotokoll wurde optimiert, um das bestmögliche Verhältnis von Reinheit und Konzentration zu erhalten und gleichzeitig kosten- und zeiteffizient zu sein [277,279,280].

Die Expression tumorspezifischer Marker auf Exosomen spiegelt den zellulären Ursprung dieser extrazellulären Vesikel wider [281]. Um zu bestätigen, dass die durch Western Blot nachgewiesenen Proteine aus den Tumorzellen stammten, wurde eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Die Expression von EpCAM variiert jedoch signifikant in normalem Nierengewebe [282] und reichte in den untersuchten Tumorproben von mäßig bis stark, war aber in ihren Exosomen angereichert. Die hier gewonnenen Daten zeigen, dass die EpCAM-Expression in Nierentumorgeweben prinzipiell nicht stärker war als in normalem Gewebe.

Nach Verdau und Zentrifugation wurden in den einzelnen Fraktionen des Saccharosegradienten nur Spaltprodukte von EpCAM nachgewiesen. Die lösliche Form von EpCAM ist die extrazelluläre Domäne, die durch Spaltung zwischen ala243 und gly244 erzeugt wird. Diese Veränderungen wurden bereits in früheren Studien beschrieben [238 – 240, 283]. Proteinspaltung tritt häufig in Tumoren aufgrund von Dysregulation des Zellmetabolismus während der Tumorentstehung auf [284, 285]. Wahrscheinlich wird die intakte Exodomäne von EpCAM in löslicher Form wiedergewonnen und in der Exosomenfraktion im NZK angereichert. Die EpCAM-Expression nimmt jedoch während der zellulären Dedifferenzierung ab. Entsprechend konnte in einer aktuellen Studie nachgewiesen werden, dass die Expression von EpCAM auch bei aggressiveren Nierenzellkarzinomen abnimmt [286]. Da EpCAM auf Exosomen schwach exprimiert und sowohl in Tumoren als auch in normalen Geweben

heterogen exprimiert wird, ist es für den Tumornachweis unter Verwendung von Exosomen nicht geeignet.

Um diese Einschränkungen von EpCAM zu überwinden, wurden die Proteine CD147, CA9 und CD70 als potenzielle Tumormarker für das klarzellige Nierenzellkarzinom ausgewählt und auf ihr Prognosepotenzial hin getestet. CD147 ist hochgradig homolog zu Proteinen der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie, und ist über die Regulierung der Glykosylierung und die Induktion von Proteinasen an Matrixdegeneration, Tumorzellinvasion, Metastasierung und Angiogenese beteiligt [287]. Sowohl CD147 als auch sein Ligand MMP-9 (Matrix-Metalloprotease-9) werden in NZK überexprimiert [288,289]. Die Hochregulation von CD147 in Tumorzellen ist mit schlechten Prognosen verbunden [290,291]. Darüber hinaus wird CD147 bei mit Sunitinib behandelten Patienten und in Sunitinib-resistenten 786-O-Zellen überexprimiert [292]. In Übereinstimmung mit anderen Studien [293,294] deuten die hier gezeigten Daten darauf hin, dass auch Teile des normalen Gewebes CD147 exprimieren. Allerdings war die Expression in den tumorassoziierten Exosomen stark erhöht, was ihre Rolle als mutmaßlicher Marker für NZK-freigesetzte Exosomen unterstützt. Die Expression von CD147 in Exosomen normaler Zellen muss weiter untersucht werden.

CA9 ist im klarzelligen NZK gut charakterisiert [295]. Die starke Überexpression von CA9 in den untersuchten Tumorproben bestätigte die Ergebnisse früherer Studien [295]. Carboanhydrasen können die renale Ansäuerung erleichtern, da die Konzentrationen von CO₂ und HCO₃ voneinander abhängig sind. CA2 und CA4 kommen in gesunden menschlichen Nieren vor, während CA9 nur in Tumorgewebe vorhanden ist [149, 296, 297]. Obwohl in bestimmten Fällen durch Western Blot und Immunhistochemie eine schwache Expression in den Tubuli von normalem Gewebe nachgewiesen wurde, wurde festgestellt, dass CA9 auf den Exosomen von normalen Zellen schwach exprimiert wird. Im Gegensatz dazu zeigten Tumorzellen eine starke Expression von CA9, die auf den Exosomen des Tumors weiter erhöht war. IHC bestätigte die starke Expression in den NZK-Tumorproben. Die Ergebnisse von Stillebroer *et al.* zeigten, dass dieser Marker bereits als diagnostisches und therapeutisches Target genutzt werden könnte [298]. CD70 wurde auch im klarzelligen NZK exprimiert [299]. CD70 stellt einen Liganden von CD27 dar und spielt eine wichtige Rolle bei der Erzeugung und Aufrechterhaltung der T-Zell-Immunität. Nach der CD27-Bindung induziert CD70 die Proliferation ko-stimulierter T-Zellen und löst die Bildung zytolytischer T-Zellen aus [300,301]. Zusätzlich zu seiner physiologischen Funktion scheint CD70 auch mit der Tumorentstehung zu interagieren. Die konstitutive Expression von CD70 wurde bei verschiedenen soliden Tumortypen, insbesondere im klarzelligen NZK, beschrieben [302]. Innerhalb dieser Arbeit

wurde das diagnostische Potenzial von CD70 eindeutig bestätigt. Die schwache Expression von CD70 in normalem Gewebe durch Western Blot wurde durch IHC nicht bestätigt, was darauf hinweist, dass normale Epithelzellen in der Niere kein CD70 exprimierten.

5.3 Charakterisierung von Exosomen aus Blutplasma

Die Untersuchungen an Zellen und Gewebe zeigen, dass Exosomen sowohl im *In-Vitro*-Modell als auch *in-vivo* zuverlässig isoliert werden können, und dass diese Exosomen bestimmte tumorassoziierte Proteine beinhalten. Für eine potenzielle Nutzung von „Tumor-Exosomen“ als prognostische oder diagnostische Marker ist es wichtig, welche biologische Probenart gewählt wird und zu welchem Zeitpunkt die Probe genommen wird. Hier sind die bereits untersuchten Gewebeproben von den Flüssigbiopsien abzugrenzen. Der klare Vorteil von Flüssigbiopsien, wie zum Beispiel Liquor, Speichel, Blut oder Urin, ist, dass diese minimalinvasiv und ohne Operation gewonnen werden können. Das schont die Patienten und würde sich ideal zur Früherkennung oder zur postoperativen Überwachung eignen. Ein Nachteil ist, dass Exosomen, die in solchen Körperflüssigkeiten vorkommen, von mehreren Organen und Geweben stammen können – nämlich von all jenen, die direkt oder indirekt Zugang zu diesen Körperflüssigkeiten haben [303, 304]. Ein anderer Nachteil ist, dass die tumorspezifischen Exosomen starken Verdünnungseffekten unterliegen.

Zu den Körperflüssigkeiten, die sich im Zusammenhang mit urologischen Tumorerkrankungen eignen, zählen Urin und Blut. Die Wahl der Quelle, ob Blut oder Urin, richtet sich nach den physiologischen Begebenheiten. Die Größe der Exosomen ist höher als der Durchmesser der glomerulären Poren [305, 306]. Im Vergleich zu Blut ist Urin eine weniger komplexe und relativ sterile Bioflüssigkeit, wobei das einzige relativ häufig vorkommende Protein Uromodulin ist [307, 308]. Unter normalen physiologischen Bedingungen enthält Urin nur wenige Zellen: entweder Epithelzellen aus der Auskleidung des Urogenitaltrakts oder aus dem Blut stammende Zellen, wie z. B. Immunzellen. Der Urinüberstand besteht aus einer Mischung aus löslichen Faktoren, zellfreien Nukleinsäuren und extrazellulären Vesikeln (EVs) [307 - 309]. Zudem ist anzunehmen, dass krankhafte Veränderungen der Niere diese durchlässig für größere Moleküle und Partikel macht [310]. Urin ist also prinzipiell eine vielversprechende Quelle für Exosomen als Biomarker für Tumorerkrankheiten [311]. Da der Hauptfokus dieser Arbeit auf dem klarzelligen Nierentumor liegt und nicht ausgeschlossen werden kann, dass ein erheblicher Prozentsatz an EV-Subpopulationen nicht in den Urin gelangen, fällt die Wahl der Quelle für Flüssigbiopsien auf das Blutplasma. EVs können von mehreren Arten von Nierenzellen, insbesondere Podozyten und proximalen/distalen Tubulus- und Sammelrohrepithelien, in das glomeruläre Filtrat abgegeben werden [312, 313]. Dieser Mechanismus kann jedoch zu Veränderungen der Vesikelmerkmale führen [314 – 317].

Die Analyse von EVs in Plasmaproben wird maßgeblich erschwert durch große Mengen an ko-isolierten Bestandteilen. Die Isolation von Exosomen aus Blutplasma mittels Ultrazentrifugation ist hinreichend, um Exosomen in hoher Konzentration und mit hoher Reinheit zu isolieren. Ein ausführlicher Vergleich von Hina Kalra *et al.* Beschreibt, dass Exosomen durch einfache UZ-Protokolle gewonnen werden können und die Viskosität des Plasmas kein großes Problem darstellt. Darüber hinaus deuten diese Experimente darauf hin, dass Exosomen über einen Zeitraum von 90 Tagen stabil im Plasma in Lösung bleiben, ohne sich zu zersetzen [318]. Diese Blutplasmaexosomen tragen, wie viele andere EVs auch, Merkmale ihrer Mutterzellen in sich oder auf ihrer Oberfläche [319].

Die größte Herausforderung besteht darin, die Ko-Isolation von Plasma-Proteinen zu vermeiden [320]. Die differenzielle Zentrifugation kombiniert mit Ultrazentrifugation führt häufig zu einer Ko-Isolation von Albumin. Diese könnte durch eine zusätzliche Größenausschluss-Chromatographie (englisch: SEC) minimiert werden. Exosomen können durch SEC aus Blutplasma ohne signifikante Menge an Albumin isoliert werden, aber nicht durch Ultrazentrifugation. In beiden Fällen können Exosomen durch SEC oder UZ ohne signifikante Albuminkontamination, wenn auch mit geringer Vesikelausbeute, aus dem Blut isoliert werden [321, 322]. Die in einer Probe enthaltenen Proteine, hauptsächlich Albumin, die mit hoher Häufigkeit dominieren und Peptidionen unterdrücken, die von Proteinen mit geringer Häufigkeit stammen, schränken den zuverlässigen Nachweis durch proteomische Analysen ein [323, 324].

Proteine und Lipoproteinpartikel, die im Plasma enthalten sind, die physikalischen Eigenschaften dieser Matrix (z. B. Viskosität und Dichte) und eine hohe Heterogenität der EVs, die aus vielen verschiedenen Zelltypen im Blut stammen, erschweren die Suche nach aussagekräftigen Biomarkern. Die Plasma-EVs stammen mehrheitlich aus Erythrozyten und Blutplättchen [325]. Daher stellt die EV-Subpopulation, die untersucht und einem bestimmten Tumortyp zugeordnet werden soll, möglicherweise nur einen kleinen Prozentsatz der gesamten EV-Population dar, wobei dieser Prozentsatz zusätzlich von der Wahl des Isolationsverfahrens abhängt. Darüber hinaus kann es aufgrund der Beschichtung der EVs mit Glykoproteinen oder Glykolipiden zur Aggregation und zum Verlust dieser Aggregate während der Zentrifugationsschritte kommen [326].

Der Vergleich von Isolations-Kit und Ultrazentrifugation als Methoden der Wahl verdeutlicht, dass sich beide Methoden gut eignen, um Exosomen bzw. Partikel im exosomentypischen

Größenbereich zu isolieren. Aber beide Methoden können nicht verhindern, dass ein hoher Anteil an Kontaminanten in den Proben verbleibt.

Um diesen Limitationen zu begegnen, richtet sich das Hauptaugenmerk in den Kapiteln 5.4 und 5.5 auf die Etablierung alternativer Methoden zur Analyse und Anreicherung von Exosomen.

5.4 Chip-Technik

Nachdem zunächst *in vitro* die Expression von tumorassoziierten Proteinen auf Exosomen nachgewiesen werden konnte und auch der Transfer dieser Erkenntnisse *in vivo* gelungen ist, steht im nächsten Schritt, hin zur Nutzung tumorabgeleiteter Exosomen als Biomarker in *liquid biopsies*, der Transfer auf Blutplasmaproben an. Die qualitativ und semi-quantitativ nachgewiesenen Expressionsmuster von spezifischen Proteinen auf Exosomen sollen durch Verwendung einer quantitativen Messmethode untermauert werden. Aufgrund der genannten Charakteristika von Exosomen gelten für quantitative, molekularbiologische Messmethoden besondere Anforderungen. Vor allem wegen der geringen Größe, der hohen Diversität und der mitunter sehr geringen Konzentration der zu untersuchenden Exosomenpopulationen muss die Methode dazu geeignet sein, hochsensitive und spezifische Messungen durchzuführen. In den vergangenen Jahren wurden weltweit verschiedene Verfahren entwickelt, um extrazelluläre Vesikel hochauflösend und quantitativ zu untersuchen und Subpopulationen sowie Ko-Expressionen bestimmter Proteine auf Exosomen in hoher Qualität darzustellen. Die meisten Entwicklungen konzentrieren sich auf die Kombination von Antikörper-Protein-Interaktionen mit fortschrittlichen physikalischen Methoden zur EV-Erkennung, was die Charakterisierung einzelner EVs im Fokus hat und somit genauere Informationen über die Größe, Konzentration und Proteinzusammensetzung von EVs bietet [327, 328].

Das System, das ausgewählt wurde, basiert auf Nano-Chips, hochauflösenden Optiken und integrierter Analysesoftware und ist in der Lage, Exosomen aus unterschiedlichsten Lösungen effizient zu binden sowie präzise zu quantifizieren. Die hiermit im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen, dass Exosomen unabhängig von der Probenherkunft, ihrer Konzentration oder der Probenbeschaffenheit effektiv an die Chips gebunden und ausgezählt werden können. Sowohl die eingesetzten Exosomenproben aus der Zellkultur, die, nicht zuletzt durch die gestaffelten Zentrifugationsschritte, eine hohe Reinheit aufweisen, als auch die unbehandelten und mit organischen Molekülen (Lipide, Nukleinsäuren, Plasmaproteine etc.) angereicherten Blutplasmaproben können eingesetzt und auf ihre Zusammensetzung bestimmter Exosomensubpopulationen hin untersucht werden. Die Problematik, dass die Masse an Plasmaproteinen, Lipiden und vesikelähnlichen Strukturen [329] häufig einen

komplexen Versuchsaufbau mit mehreren Reinigungsschritten und verschiedenen Techniken erfordert, um die unerwünschten Bestandteile auszusortieren, ohne dabei die Untersuchungsobjekte zu verlieren, wird hiermit vermieden.

Auch aus Lösungen mit sehr geringer Exosomenkonzentration können ausreichend viele extrazelluläre Vesikel gebunden werden, um nachfolgend belastbare Untersuchungen anstellen zu können. Der Vergleich von Proben aus Zellkulturüberständen vor und nach dem Isolationsprotokoll zeigt zwar, dass aus den hochkonzentrierten Isolaten eine um drei Größenordnungen höhere Zahl an Exosomen auf den Chips gebunden wird, dennoch aber eine drei- bis vierstellige Zahl an Exosomen aus den unbehandelten Zellkulturüberständen charakterisiert werden konnte. Prinzipiell wäre diese geringe Zahl an gebundenen Exosomen dank der hohen Auflösung des Systems ausreichend für weitergehende Charakterisierungen, zumal die Expressionsmuster der Tetraspanine zwischen diesen beiden Probenarten fast identisch ist. Ähnlich sieht es bei der Analyse der CD147-Ko-Expression aus. Hier stimmen die Anteile der CD147-Expression auf den CD63-positiven, CD81-positiven und CD9-positiven Subpopulationen der Proben aus Zellkulturüberständen mit denen der Proben aus konzentrierten Zellkulturexosomen überein. Über den gleichzeitigen *Knockdown* von zwei oder drei Mitgliedern der Tetraspanin-Familie (CD9, CD81 und TSPAN12) konnte in einer anderen Arbeit bewiesen werden, dass Tetraspanine mit Proteinen der Matrix-Metalloproteasen-Familie interagieren und diese vor lysosomalen Abbau schützen sowie deren Abgabe an die Oberfläche unterstützen [330]. CD147 wiederum induziert über seine zytosolische Domäne die Expression von Matrix-Metalloproteasen. Beides zusammen genommen könnte somit ein Indiz für eine indirekte Kopplung von CD147 mit den Tetraspaninen CD9 und CD81 sein. Die Ko-Expression von CD9, CD81, CD63 und CD147 wurde bereits auf Exosomen anderer Tumorentitäten nachgewiesen [331, 332].

Der Vergleich von Zellkultur und Plasma zeigt bezüglich der Expression von Tetraspaninen, dass von einem gleichgroßen Volumen bei den Exosomenproben aus Zellkultur um den Faktor zehn mehr Exosomen gebunden werden als bei den Plasmaproben. Bemerkenswert ist, dass CD63 im Plasma, anders als in Zellkultur, nicht sehr präsent ist. Stattdessen sind CD9 und CD81 zumindest *in-vivo* aussagekräftigere Exosomenmarker. Das ist ein weiteres Indiz dafür, dass die über lange Zeit postulierte Bedeutung von CD63 als universeller Exosomenmarker weiter abnimmt [333, 334]. Vergleicht man die Ko-Expression von CD147 mit Tetraspaninen auf Exosomen aus Zellkultur mit Exosomen aus Plasma, so unterscheiden sich die totalen Partikelzahlen CD147-positiver Exosomen zwischen den beiden Patientenproben sehr stark, während sie zwischen den beiden Zelllinien nah beieinander liegen. Jedoch, in beiden Plasmaproben ist die CD147-Expression stark mit der CD9-Expression assoziiert. In der

Zellkultur spiegelt sich dies nicht wider. Hier sind in der Zelllinie Caki2 keine der drei getesteten Tetraspanine in besonderem Maße mit CD147 assoziiert. In der Zelllinie 786-O ist eine klare Abstufung von einer hohen Ko-Expression von CD147 mit CD81 über eine weniger hohe Ko-Expression mit CD63, bis hin zu einer vergleichsweise niedrigen Ko-Expression mit CD9 zu erkennen.

Das diagnostische Potenzial von CD147/CD9 doppelt-positiven Partikeln zur Überwachung des Tumorstatus nach der Operation und während der Chemotherapie oder zur Früherkennungstest wurde bereits untersucht und bestätigt [335].

Die Sekretion von Exosomen während der Differenzierung von Tumorstammzellen wird teilweise von CD147 kontrolliert, was die funktionelle Rolle von CD147 bei der Förderung der Freisetzung von Exosomen während der Tumorprogression unterstreicht [269]. Zusammen genommen bedeutet dies, dass exosomales CD147 auch beim Nierenzellkarzinom als Marker mit hohem Prognosepotential genutzt werden kann.

Die gespaltene Form von CD147 spielt unter anderem eine zentrale Rolle bei der Stimulierung von Fibroblasten zur Induktion der MMP2-Aktivität, wenn solche Zellen Zellkulturüberständen ausgesetzt werden [336]. Wobei noch zu klären wäre, inwieweit dieser Effekt von freiem CD147 oder von exosomalem CD147 herrührt.

Abweichend zu den *in vivo* Daten ist die CD147/CD81-Kolokalisation in Exosomen aus Zellkulturüberständen bezogen auf Exosomen aus Plasma überproportional ausgeprägt, was auf eine Diskriminierung von rein CD81-positiven Exosomen durch den Isolationsprozess spricht. Die Gründe für den Verlust von Exosomen durch Ultrazentrifugation können vielfältig sein. Zwar hat Ultrazentrifugation als Isolationsmethode den großen Vorteil, dass rein nach Größe und Dichte selektiert wird. So sollten sich Verluste von Exosomen auf alle Subpopulationen gleichermaßen beschränken. Doch zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die Ultrazentrifugation zu einer unvollständigen Sedimentation von Vesikeln oder der Sedimentation von nicht-vesikulären Bestandteilen führt [337].

Abgesehen von der Kolokalisation von CD147 mit CD9 in einer Plasmaprobe sind die prozentualen Anteile von CD147 auf Tetraspanin-positiven Partikeln im Vergleich zu Zellkulturproben immer geringer und zum Teil sehr niedrig. Beim *in-vitro*-Modell liegen die Unterschiede mit großer Wahrscheinlichkeit am Isolationsprozess, bei dem Subpopulationen verloren gehen können. Beim Plasma kann es an der patiententypischen Physiologie, die sich zwischen Patienten sehr stark unterscheiden kann, und der speziellen Zusammensetzung von Blutplasmaexosomen (komplexe Zusammensetzung der Subpopulationen), liegen [338].

Das Expressionsmuster von Tetraspaninen und Tumormarkern auf Exosomen im Blutplasma von Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom ist stark mit der individuellen Physiologie des Patienten gekoppelt und nicht auf ein größeres Kollektiv übertragbar.

Daher ist bei der Analyse individueller Patientenproben das richtige Verdünnungsverhältnis entscheidend, um ein aussagekräftiges Ergebnis über die Verteilung der Subpopulationen und die Kolokalisationen der Tetraspanine zu bekommen. Lediglich für CD63 spielt die Verdünnung in dem gewählten Schema keine Rolle, hier gleichen sich die absoluten Zahlen der kolokalisierten Tetraspanine und die relative Verteilung der Expression der drei Tetraspanine (CD63, CD81, CD9). Das kann daran liegen, dass CD63-positive Exosomensubpopulationen unterrepräsentiert sind und auch bei niedrigeren Verdünnungen nicht zu einer Sättigung führen. Im Falle der CD81- und CD9-Antikörperdotierungsstellen führt eine hohe Konzentration von Exosomen als Folge einer zu niedrigen Verdünnung der Probe zu einer Übersättigung mit einer Subpopulation. So ist auf der CD81-Dotierungsstellen die CD81-Expression sowie auf der CD9-Dotierungsstelle die CD9-Expression, überrepräsentiert

Die Messung mit einer Plasmaprobe eines weiteren Patienten mit Nierenzellkarzinom offenbarte Unterschiede in der Verteilung der gebundenen Subpopulationen und der Kolokalisationen der Tetraspanine auf diesen Subpopulationen. Dies verdeutlicht die Individualität des Patienten. Für das eigentliche Ziel, die individualisierte Diagnostik und Therapie, ist eine solch präzise Differenzierung auf den ersten Blick vorteilhaft. Die „klassischen“ Exosomenmarker CD9, CD63 und CD81 sind nicht gleich häufig in sEVs von allen Zelltypen vorhanden [339]. Die Heterogenität und Häufigkeit von CD9, CD63 und CD81 in Exosomen weist auf eine begrenzte Verwendung dieser Tetraspanine als Biomarker für Exosomen, die von verschiedenen Zelltypen stammen, hin [340]. Es bleibt das Dilemma, dass vor dem Einsatz exosomenbasierter Diagnostik universelle Erkenntnisse über spezifische Merkmale tumorassoziierter Exosomen gewonnen werden müssen und diese gleichzeitig zur Analyse des Gesundheitszustandes geeignet sein müssen.

Beim Transfer von *In-vitro*-Experimenten zu *In-vivo*-Experimenten gilt es ebenso zu beachten, dass es innerhalb eines Experimentes mit mehreren miteinander agierenden Komponenten bei verschiedenen Flüssigkeiten aus unterschiedlichen biologischen Quellen zu qualitativ voneinander abweichenden Ergebnissen kommen kann. Wie bei der quantitative Auswertung der Expressionsdaten der Tumormarker (PD-L1, CD147, CA9) auf Exosomen der Zelllinie Caki2 und einer Blutplasmaprobe zu erkennen ist, weichen die Expressionsraten der einzelnen Tumormarkerproteine auf den jeweiligen Exosomensubpopulationen der Zellkulturprobe und

der Plasmaprobe stark voneinander ab. Zieht man jedoch in Betracht, dass auf der MIgG-dotierten Stelle der Plasmaprobe ein sehr starkes falsch-positives Signal für CA9 gemessen wurde, so scheinen die Unterschiede zur Zellkulturprobe nicht mehr ganz so groß. Würde man diese Messunsicherheit bei diesen experimentellen Rahmenbedingungen berücksichtigen, dann lägen die absoluten Partikelzahlen näher beieinander. Man könnte so die falsch-positiven Signale in der Plasmaprobe heraus rechnen und so die relativen Expressionsmuster auf Plasmaexosomen mit denen auf Zellkulturexosomen besser vergleichen. Allerdings kann in diesem Falle auch nicht ausgeschlossen werden, dass die herausgerechneten, falsch-positiven Signale von Partikel stammen, die auf dem Chip binden, und die im gleichen Wellenlängenbereich wie die Tumormarker-Antikörper autofluoreszieren. Genauso könnten diese fluoreszierenden Tumormarkerproteine unspezifisch auf der Chipoberfläche binden. Beides hätte, neben den störenden Signalen, zur Folge, dass die Bindung von Exosomen auf den dotierten Stellen erschwert oder verhindert wird. Im Blut vorkommende Monozyten, die reich an Tetraspaninen (z.B.: CD81, CD63, CD9) sein können [341], wären mögliche unerwünschte Interaktionspartner für die Tetraspaninantikörper auf den Chips. Als Ursache der vereinzelt auftretenden falsch-positiven Signale können sie allerdings ausgeschlossen werden, da die Größenbestimmung durch Interferenzmikroskopie lediglich Partikel mit weniger als 200 nm Größe nachgewiesen hat.

Es könnte sein, dass diese Ergebnisse durch Interferenzen mit heterophilen Antikörpern verursacht werden. Heterophile Antikörper, die Immunglobuline anderer Spezies erkennen, sind in menschlichem Plasma und Zerebrospinalflüssigkeit vorhanden und können Immunoassays durch Kreuzbindung der Capture- und Detektionsantikörper des Assays stören [342]. Heterophile Antikörper sind schlecht definierte menschliche Antikörper, die durch nicht-kompetitive Bindung, hauptsächlich an die Fc-Region von Assay-Antikörpern, einer Bindung heterophiler Antikörper an andere Teile des Assay-Antikörpers (die „Scharnier“-Region), Störungen verursachen. Heterophile Antikörper werden mit Prävalenzen von 0,2–15 % bei kranken und hospitalisierten Patienten detektiert [343, 344].

Auch Interaktionen von Antikörpern in einem Gemisch aus verschiedenartigen Antikörpern sowie die Überlagerung der Fluoreszenzsignale können die Ergebnisse verzerren [345 - 347]. Es gibt vielfältige Effekte von Fluorophor-Interaktionen, die bei quantitativen zellbiologischen Messungen nicht übersehen werden dürfen. Fluorophore in einem Antikörpergemisch können eine „Selbstlöschung“ von Fluoreszenzsignalen (sogenanntes „*quenching*“) aufweisen und zu einer verringerten Antikörperaffinität führen. Dabei können sowohl dynamisches als auch statisches *Quenching* auftreten [348]. Um diese Effekte zu vermeiden oder zu minimieren sollten in einem Etablierungsprozess die einzelnen Antikörper und ihre Fluorophore systematisch getestet, sowie das Mischungs- und Verdünnungsverhältnis so angepasst

werden, dass die genannten nachteiligen Effekte möglichst vermieden werden. Das schliesst auch die Wahl alternativer Antikörper für das gleiche Antigen mit ein. Alternativ zur langwierigen Etablierung eines geeigneten Antikörpergemisches aus drei tumorassoziierten Antikörpern mit voneinander abgrenzbaren Emissionsspektren, ist die Einzelfärbung. So liefern die Färbungen von Plasmaproben ein und desselben Patienten mit Antikörpern gegen CA9 oder CD147 auf zwei separaten Chips Messergebnisse ohne große Signale aus anderen Wellenlängenbereichen und mit minimalen unspezifischen Bindungen an der MlgG-Kontrolle. In beiden Fällen ist die Kolokalisation auf CD63-positiven Subpopulationen sehr gering. Andere Arbeiten weisen zwar darauf hin, dass es im Rahmen des Glukosemetabolismus eine molekularbiologische Verbindung von CD63 und CD147 gibt [349], jedoch scheint sich diese nicht in den Exosomen widerzuspiegeln. Dagegen konnte die CA9-mRNA klar in CD63-positiven Exosomen nachgewiesen werden [232]. Die translatierte Form dieser mRNA wurde aber auch in anderen Arbeiten in geringen Konzentrationen zusammen mit CD63-Proteinen nachgewiesen [350, 351]. CA9 ist sehr stark mit CD81 kolokalisiert, während CD147, anders als bisher beobachtet, gleichermaßen stark mit CD81 und CD9 assoziiert ist. Dass CD147 vor allem mit CD9 und CD81 und nicht mit CD63 kolokalisiert ist, war auch das Ergebnis anderer Studien [330, 331]. Es sind auch um den Faktor zwei bis vier Mal mehr CD147-positive als CA9-positive Exosomen auf den korrespondierenden Dotierungsstellen vorhanden.

Um die patiententypischen Unterschiede in der Proteinexpression besser zu verstehen und die Heterogenität der Exosomen-Subpopulationen innerhalb eines Patientenkollektives zu charakterisieren, bietet es sich an, die Expression von Exosomenmarkern in Plasmaproben von mehreren Patienten zu untersuchen und zu vergleichen. Die Relationen der Exosomenmarker auf den drei Exosomen-Subpopulationen stimmen in etwa überein, wobei zwei der drei getesteten Proben (Chip 017 + 040) besonders ähnlich sind. Das gleiche gilt für die absolute Zahl der tetraspanin-positiven Vesikel. Nur eine von drei Proben (Chip 002) hat auf den CD63-positiven und CD9-positiven Subpopulationen ein anderes Expressionsmuster, sodass man sagen kann, dass die Expressionsmuster von Tetraspaninen in einem Kollektiv relativ homogen zu sein scheinen.

Trotz der Fülle vielversprechender Ansätze fehlen noch große Studien zum diagnostischen, prognostischen und/oder prädiktiven Wert exosomaler Biomarker im Plasma. Schon hinreichend beschrieben ist, dass die Expression von Tetraspaninen in pathologischen Geweben und malignen pathologischen Geweben höher als in dem angrenzenden normalen Gewebe ist [352]. Dieser Unterschied zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe sollte sich dann auch im Plasma widerspiegeln [353]. Zu diesem Zwecke müssten in einer weiteren

Versuchsreihe Plasma einer Patientenkohorte mit Plasma einer Kontrollkohorte an dem Chip getestet werden. Beim Vergleich der Expressionsmuster zwischen den Kohorten und den Probenotypen ist zu beachten, dass diese Expressionsmuster spezifisch für den Probenotyp sind, sich also das Expressionsmuster von Tetraspaninen in Biofluid und Gewebe deutlich unterscheiden kann [354]. Tetraspanine sind prinzipiell dazu geeignet, selbst als diagnostische Marker eingesetzt zu werden, jedoch erstreckt sich dieses Potenzial auf andere Tetraspanine (z.B. CD151) als die hier untersuchten [355].

Die patiententypischen Unterschiede der Proteinexpression von CD147 auf Plasmaexosomen sind innerhalb eines Patientenkollektives sowohl von quantitativer Natur als auch verbunden mit diversen relativen Häufigkeiten auf den einzelnen Subpopulationen. Alle drei Proben unterscheiden sich deutlich in der absoluten Anzahl der erfassten CD147-positiven Exosomen auf den jeweiligen Bindungsstellen und lassen sich in Gruppen zusammenfassen. Bei Betrachtung der relativen Häufigkeiten bestätigt sich hingegen, dass CD147 am stärksten mit CD9, gefolgt von CD81, kolokalisiert ist. CD63-positive Subpopulationen exprimieren wenig bis keine CD147-Proteine. Die gemessenen Signale fluktuieren alle im Bereich der durch den MlgG-Spot festgelegten Nachweisgrenze.

Ein vielversprechender Ansatz ist es, ergänzend zu diesem Versuch, das Experiment umzudrehen – also mittels CD147-Antikörper Vesikel zu binden und die Expression bestimmter Proteine zu untersuchen (siehe Kapitel 5.5). Im klarzelligen Nierenzellkarzinom konnte anhand von zirkulierenden Tumorzellen nachgewiesen werden, dass CD147 (und CA9) dazu geeignet sind, eben diese Zellen effektiv zu binden und damit klinisch zu nutzen [356].

Die gezielte Hemmung von CD147 in den Zellen reduziert seine Expressionsniveaus innerhalb der Exosomen und verringert die Fähigkeit dieser Exosomen die Tumorprogression zu fördern [357]. Der nächste Schritt wäre also, dies auch bei urologischen Tumoren zu untersuchen und zu testen, ob die Beeinflussung von exosomalen CD147 auch ein therapeutisches Potenzial eröffnet.

5.5 Anreicherung von Exosomen durch magnetische *Beads*

Die Ergebnisse der quantitativen und qualitativen Charakterisierung von tumorabgeleiteten Exosomen deuten darauf hin, dass die tumorassoziierten Proteine CD147 und CA9 auf Exosomen *in vivo* stabil exprimiert werden und sich damit als Zielproteine für ein Verfahren zur gezielten Anreicherung von Exosomen aus *liquid biopsies* von Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzinom eignen. Dazu ist es nötig, ein System zu verwenden, das in der Lage ist, spezifisch Exosomen mit dem Zielprotein in ihrer Membran zu binden und letztendlich aus der zu untersuchenden Probe anzureichern. Magnetische *Beads* lassen sich entsprechend

modifizieren und stellen ein erprobtes System, das diese Anforderungen erfüllt, dar [202, 358 - 360].

Die Isolation von Exosomen mittels antikörperdotierter, magnetischer *Beads* war erfolgreich. Die Bildgebung mittels TEM gestaltete sich allerdings von Beginn an schwierig, da es im Verlaufe des Anheftung- und Fixierungsprozesses zu Problemen kam. Die mikrometergroßen *Beads* hafteten nicht so effizient auf den kohlebeschichteten Kupfergittern wie die nanometergroßen extrazellulären Vesikel. Es hat aber den Anschein, dass sich die Exosomen erfolgreich über die Streptavidin-Biotin-Bindung an die magnetischen *Beads* gebunden haben und als ringförmige Strukturen im TEM zu sehen sind. Zumindest erscheinen auf den TEM-Aufnahmen vesikelartige Strukturen mit einer Größe von unter 100 nm. Diese scheinen fädig zusammen zu hängen und von kreisrunden Strukturen zu stammen. Es sieht so aus, als ob die mikrometergroßen *Beads* auf der Trägerschicht haften und durch die nachfolgenden Dehydrationschritte dergestalt denaturieren, dass die vormals kugelförmigen Gebilde aufreißen, verformen, oder verklumpen.

Wegen der irreversiblen Bindung der biotinylierten Antikörper an das Streptavidin der magnetischen *Beads* ist es nicht mehr möglich, die gebundenen Exosomen nach der Anreicherung wieder zu lösen, um sie nach dem bewährten Verfahren bildlich darzustellen. Alternativ bestünde die Möglichkeit, ein modifiziertes Verfahren zur Biotinylierung von Antikörpern zu verwenden, dass die enzymatische oder biochemische Trennung der Biotin-Streptavidin-Bindung zu einem beliebigen Zeitpunkt erlaubt. Damit könnten die fixierten Exosomen nach dem Anreicherungs-schritt wieder von den *Beads* gelöst werden [361].

Denkbar ist es auch, die Komponenten beizubehalten und durch Rasterelektronenmikroskopie alle Ebenen dreidimensional, statt wie hier zweidimensional, abzutasten. Oder es könnten mittels Kryoelektronenmikroskopie die Exosomen-*Bead*-Komplexe in Lösung thermisch fixiert und nahe am nativen Zustand untersucht werden [362 - 365]

Eine dritte Option bestünde darin, die Exosomen-*Bead*-Komplexe einzubetten, davon Ultradünnschnitte anzufertigen, und diese dann unter dem Elektronenmikroskop zu untersuchen. Dafür werden die Proben zunächst fixiert, dehydriert, eingebettet, in dünne Nanometer-Schnitte geschnitten und für die Bildgebung auf einem Kohlenstoffbeschichtungsgitter aufgebracht. Mit dieser Technik lassen sich zusätzlich über die Immungoldmarkierung EV-Proteine markieren und unter dem Elektronenmikroskop sichtbar machen. Auf diese Weise ließen sich sogar die Methoden der Mikroskopie und des Westernblots miteinander kombinieren [362, 364 - 366].

Mit den genannten optionalen Methoden hätten die angereicherten Exosomen grafisch dargestellt werden können. Da aber die Überprüfung des Isolationserfolges durch verschiedene Methoden (TEM, NTA, Westernblot) in diesem Projekt hinlänglich beschrieben und angewandt wurde, beschränkte sich die Überprüfung hier auf die Untersuchung der Expressionsmuster via Westernblot.

Aus den Westernblotergebnissen ist klar zu erkennen, dass die Methode, magnetische *Beads* mit gekoppelten CD63-Antikörpern zum Abfangen und Anreichern von CD63-positiven Exosomen zu nutzen, funktioniert und erfolgreich in Zellkulturexperimenten getestet werden konnte. Jedoch ist die Expression von CD147 auf diesen nicht nachweisbar bzw. äußerst schwach ausgeprägt. Auch in anderen Arbeiten, in denen Exosomen mit *Beads* abgefangen wurden, war CD147 eindeutig nachweisbar, wurde aber nicht sehr stark exprimiert [367].

Auch das Abfangen und Anreichern von CD147-positiven Subpopulationen mit gekoppelten CD147-Antikörpern funktioniert im Zellkulturexperiment. Der Vergleich von CD63-Expression auf mit CD63-positiven *Beads* angereicherten Exosomen mit der CD63-Expression auf mit CD147-positiven *Beads* angereicherten Exosomen bestätigt die Ergebnisse aus Kapitel 4.5.2, wo die Ko-Expression von CD147 und CD63 sehr gering ist. Demnach bilden CD147-positive Exosomen eine sehr kleine Subpopulation. Die Ko-Expression von CD63 und CD147 ist auf Exosomen sehr gering.

Entgegen der vorherigen Beobachtungen, aber entsprechend der Beschreibungen in der einschlägigen Literatur [350, 368 - 370] sind die CD63- und CD147-Subpopulationen aus 786-O Zelllinien klar positiv für CA9. Dabei unterscheiden sich diese Subpopulationen nochmals untereinander in ihrer CA9-Expression. In der Zellkultur werden beide Isoformen der CA9-Proteine in der CD63-Subpopulation integriert, hingegen in der CD147-Subpopulation nur die 50-kDa-Form. Die CA9-Expression in 786-O Zelllinien war, wo sie nachgewiesen werden konnte, immer sehr schwach ausgeprägt [350]. Dass diese CA9-Expression in den nur durch Ultrazentrifugation angereicherten Exosomen nicht detektiert wurde, spricht für eine Anreicherung dieser Subpopulation auf ein Maß, das über der Nachweisgrenze der Westernblotmethode liegt.

CD70 hingegen wird in den CD63-positiven Subpopulationen nicht exprimiert. Das bestätigt wiederum die Ergebnisse aus den Kapiteln 4.1.3.2 und 4.2.3.1, wonach CD70 in Zelllinien nicht nachgewiesen werden konnte, aber in den Gewebeproben bestätigt wurde. Die Auswahl

von mehreren Zelllinien spiegelt demnach bei weitem nicht die Heterogenität der Tumorgewebe wider.

Der Transfer des *In-vitro*-Modells auf ein *In-vivo*-Modell, also von Zellkulturproben auf humane Blutplasmaproben, war ebenso erfolgreich.

Die mit CD63 angereicherten Plasmaexosomen erfüllten die Vorgaben der MISEV-Guidelines. Folglich beweist das eine erfolgreiche Anreicherung. Eine Unterscheidung zwischen gesund und krank scheint möglich, denn die angereicherten Tumorexosomen aus Plasma haben allgemein einen höheren Proteingehalt bei gleichem Plasmavolumen, sowie eine höhere Expression der Tumormarker CD147 und CD70.

Beispielsweise ist eine Strahlenbehandlung in der Lage, das Ausmaß der Exosomensekretion durch Tumorzellen zu erhöhen. Das progressionsfördernde Potenzial von tumorabgeleiteten Exosomen bei Krebspatienten wird durch die Beobachtungen gestützt, dass bei Patienten mit fortgeschrittenen Karzinomen der Brust oder des Eierstockes, die Menge an zirkulierenden Exosomen mit und ohne Tumormarkern viel höher ist als bei Patienten mit weniger fortgeschrittenem Karzinom. Die Menge dieser Exosomen nimmt mit der Tumorprogression zu [371, 372].

Neben stressinduzierter Erhöhung der Vesikelsekretion durch therapeutische Maßnahmen (Strahlen- oder Chemotherapie), haben auch Liganden und Proteine einen Einfluss auf den Vesikelgehalt im Blutplasma [373, 374]. Einiges deutet darauf hin, dass der Gesamtplasmaspiegel von Exosomen bei Tumorpatienten den Krankheitsverlauf, das Tumorstadium und das Ansprechen auf die Therapie widerspiegelt [375, 376].

Alix, Syntenin sowie CA9 sind in Plasmaexosomen nicht valide nachweisbar. Syntenin ist Teil einer speziellen Maschinerie, die sowohl die Produktion als auch die Aufnahme von sekretierten Vesikeln steuert und den exosomalen Austausch unterstützt. Syntenin dient unter anderem als Schlüsselkomponente für die Internalisierung makromolekularer Fracht in Zellen [377] und spielt deshalb bei der Exosomenbiogenese eine bedeutende Rolle. Weiterhin ist bekannt, dass Phosphatidsäure mit Syntenin interagiert, was die Rekrutierung von Syndecan, CD63 und ALIX in der Membran auslöst und den Knospungsprozess von entstehenden intraluminalen Vesikeln (ILVs) innerhalb der multivesikulären Körper (*multivesicular bodies* = MVBs) stimuliert [378]. Dass Alix und Syntenin ein wesentlicher Bestandteil von Exosomen sind, gilt auch für die im peripheren Blutsystem, und sogar in der zerebrospinalen Flüssigkeit, vorhandenen Exosomen zu [379, 380]. Syntenin und Alix sollten also in einem repräsentativen Gemisch aus Exosomensubpopulationen nachweisbar sein. Ihr Fehlen spricht für die

Selektivität des Anreicherungsverfahrens, die dazu führt, dass ein beträchtlicher Teil an Subpopulationen aussortiert wird. Damit besitzen die angereicherten Subpopulationen keine Alix- und Syntenin-Proteine oder deren Konzentration ist so gering, dass sie unter der Nachweisgrenze liegen. CA9-Proteine werden nachgewiesenermaßen in Exosomen exprimiert, sie fördern zum Beispiel die Angiogenese durch Tumorgewebe im klarzelligen Nierenzellkarzinom [350, 381]. Dass sie hier nicht nachgewiesen wurden, liegt in diesem Fall offensichtlich daran, dass diese nicht mit CD63 kolokalisiert sind.

Da es sich in Kapitel 4.5 herausgestellt hatte, dass CD9 in Plasmaexosomen weit verbreitet sind, lag es nahe, beim Anreicherungsverfahren von Exosomen aus Blutplasma CD9 als Zielprotein zu nutzen.

Die Expression von Tetraspaninen im Blut variiert ortsabhängig und korreliert mit den im Blut befindlichen Zellen (z.B. B-Lymphozyten) und Vesikeln (z.B. Exosomen). Im peripheren Blut ist die Expression von CD9 in der Regel niedriger als die Expression von CD63 [382]. Im Versuchsteil Kapitel 4.6 zeichnet sich dagegen ein abweichendes Expressionsmuster ab. In den mit CD9 angereicherten, Plasmaexosomen war CD63 nicht nachweisbar, aber CD9 sehr präsent. Für dieses Ergebnis kommen mehrere Erklärungsmöglichkeiten in Betracht. Möglicherweise handelt es sich um eine Mischung aus zellulären und extrazellulären Artefakten im Blutplasma, die sich nicht entfernen ließen. Denn CD9 wird von allen wichtigen Untergruppen von Leukozyten (B-Zellen, CD4+-T-Zellen, CD8+-T-Zellen, natürliche Killerzellen, Granulozyten, Monozyten und Makrophagen sowie unreife und reife dendritische Zellen) und auch in hohem Maße von Endothelzellen exprimiert [383].

Auch die Herkunft, bzw. die Quelle, der biologischen Proben wirkt sich auf die Ergebnisse der Expressionsmessungen aus. Die CD9-Konzentrationen können zwischen konditionierten Zelllinienmedien, Krebspatienten und gesunden Spendern, erheblich variieren. In Plasmaproben spielt die Verarbeitungszeit nach der Blutentnahme eine wichtige Rolle. Zu einem späteren Zeitpunkt verarbeitete Plasmaproben weisen einen höheren Gehalt an CD9-Proteinen auf, was darauf hindeutet, dass EVs von (Blut-)Zellen freigesetzt werden [384, 385]. Es ist auch möglich, dass die Anreicherung mit CD9-positiven und CD63-positiven Beads zwar gut funktioniert hat, die Effizienz in Plasma aber so gering war, dass die Konzentration an CD63 unter der Nachweisgrenze für Westernblot liegt. Diese liegt im Falle der Westernblotmethode im hohen ng/mL-Bereich [386]. Für eine allgemein erfolgreiche Anreicherung spricht der Vergleich von CD9 mit Zellmarkern GM130. Für ein abweichendes Expressionsmuster der Tetraspanine können zudem alternative Genexpressionen der entsprechenden Gensequenzen ursächlich sein [387 - 389].

5.6 Limitationen

In dieser Arbeit gab es einige Einschränkungen. Die Menge an Gewebeprobenmaterial war begrenzt, insbesondere bei Proben des Normalgewebes. Daher konnten nicht alle Marker in allen Proben und im Vergleich zum angrenzenden Normalgewebe untersucht werden. Vergleichbares gilt für die Untersuchungen im Blutplasma. Diese wurden hauptsächlich im Rahmen der Etablierung des chipbasierten Analysesystems eingesetzt und lassen sich nur bedingt mit den, vor allem durch Westernblot, gewonnenen Erkenntnissen vergleichen.

Diese Studie stellt jedoch die bisher größte Serie zur Untersuchung von Exosomen aus primären Geweben des klarzelligen Nierenzellkarzinoms dar. Auch die Anreicherung von Exosomen aus peripheren Blutproben von Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom ist bisher einzigartig. Zukünftige Studien mit größeren Patientenkohorten, als Quelle für humane Gewebe- und Blutplasmaproben werden die Zuverlässigkeit dieser Ergebnisse erhöhen.

5.7 Fazit und Ausblick

Das zentrale Thema dieser Arbeit ist die Nutzung des diagnostischen Potenzials tumorstämmiger Exosomen in urologischen Tumoren und damit die Voraussetzungen für weitere Anwendungsfelder (z.B.: therapeutische Ansätze) zu setzen. Die für dieses Projekt initial formulierten Fragestellungen konnten hinreichend beantwortet werden.

Grundlegend musste zunächst untersucht werden, ob sich spezifische Markerproteine auf Exosomen nachweisen lassen, die dazu geeignet sind, Tumorexosomen von Exosomen gesunder Zellen zu unterscheiden.

Die Ergebnisse zeigen, dass Zelllinien geeignete Modelle darstellen, um Exosomen *in-vitro* zu charakterisieren. Die *in-vitro*- und *in-vivo*-Experimente zur Isolation von Exosomen beweisen, dass EVs mittels adaptierter und etablierter Methoden direkt aus biologischen Proben gewonnen werden können. Der Vergleich dieser Ergebnisse belegt den erfolgreichen Transfer von den Zellkulturexperimenten auf die Experimente mit Patientenproben. Insbesondere die erstmalig beschriebene Isolation von EVs aus Gewebeproben des klarzelligen Nierenzellkarzinoms ist hier hervorzuheben. Die beobachtete Expression tumorspezifischer Marker spiegelt die Herkunft der EVs wider. Dies bestätigt die Grundannahme dieser und anderer Forschungsarbeiten, dass sich tumorassoziierte EVs von EVs gesunder Zellen unterscheiden lassen. CA9, CD70 und CD147 sind somit vielversprechende Marker für weitergehende Studien zur Anreicherung tumorspezifischer EVs beim NZK.

Eine weitere, zentrale, Fragestellung bezogen auf die Anwendungsmöglichkeit von EVs in der Diagnostik, war, ob sich Exosomen anhand dieser Biomarker gezielt aus Blut(-plasma) isolieren lassen.

Anhand von Tetraspaninen als Zielproteine lassen sich tumorstämmige Exosomen zuverlässig aus Blutplasmaproben isolieren. Die Testung der Tumormarker CA9, CD147 und CD70 als Zielproteine und Biomarker steht noch aus und sollte bei der weiteren Entwicklung dieses Ansatzes untersucht werden. Ein Markerpanel aus diesen Tumormarkern und Exosomenmarkern könnte, angesichts der diversen Expressionsmuster der vielen verschiedenen Subpopulationen, Ergebnisse mit prognostischer Aussagekraft liefern.

Die abschließende Frage dieses Projektes richtete sich an das Vermögen des gewählten Anreicherungsverfahrens, eine Tumorerkrankung durch die Analyse von detektierten Tumorexosomen festzustellen.

Diese Frage kann aufgrund der sehr geringen Stichprobengröße letzten Endes in dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Die initialen Ergebnisse der Anreicherungsversuche, zusammen mit den Ergebnissen der Charakterisierung der Expressionsmuster von Plasmaexosomen deuten aber darauf hin, dass dieser Ansatz erfolgversprechend ist und weiterverfolgt werden sollte.

Dies zugrunde legend ergeben sich für die zukünftige Forschungsarbeit interessante Ansätze für weitere Projekte, sowie vielversprechende Verwendungsmöglichkeiten.

In der Diagnostik, insbesondere der Früherkennung, kann ein weiteres, etabliertes Anreicherungsverfahren den entscheidenden Durchbruch bringen. Durch die minimal-intensive Untersuchungsmethode werden Patienten, verglichen mit Operationen oder der Bildgebung durch MRT, erheblich geschont. Zusätzlich sind die Hürden und Hemmschwellen, bei Vorsorgeuntersuchungen ab einem bestimmten Alter oder bei anderen Indikationen, herabgesetzt. Dies würde, analog zu den Erfolgen der Therapierung des Mammakarzinomes [390] oder des Prostatakarzinomes [391, 392], auch die Therapierung des klarzelligen Nierenzellkarzinomes verbessern.

In der Therapie könnten tumorassoziierte Exosomen genutzt werden, in dem diese durch RNA-induzierte [393, 394], protein-induzierte [395] oder gentechnische Depletion [396, 397] die Tumorprogression signifikant einschränken. Alternativ könnte untersucht werden, ob durch eine modifizierte Dialyse des peripheren Patientenblutes unter Verwendung des spezifischen Anreicherungsverfahrens die Tumormarker aus dem Blut entfernt werden können. Dies könnte nach einer Operation und in Kombination mit weiteren Therapiemaßnahmen geschehen. [398 - 400]

6. Literatur

1. Lexikon der Biologie, Copyright 1999 Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
2. Thompson L, Chang B, Barsky SH. Monoclonal origins of malignant mixed tumors (carcinosarcomas). Evidence for a divergent histogenesis. *Am J Surg Pathol*. 1996 Mar;20(3):277-85. doi: 10.1097/00000478-199603000-00003. PMID: 8772780.
3. Parsons BL. Multiclonal tumor origin: Evidence and implications. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2018 Jul-Sep;777:1-18. doi: 10.1016/j.mrrev.2018.05.001. Epub 2018 May 6. PMID: 30115427
4. Tanooka H. Monoclonal growth of cancer cells: experimental evidence. *Jpn J Cancer Res*. 1988 Jun;79(6):657-65. doi: 10.1111/j.1349-7006.1988.tb02217.x. PMID: 3137192; PMCID: PMC5917569.
5. Patel A. Benign vs Malignant Tumors. *JAMA Oncol*. 2020 Sep 1;6(9):1488. doi: 10.1001/jamaoncol.2020.2592. PMID: 32729930.
6. Jang SJ, Gardner JM, Ro JY. Diagnostic approach and prognostic factors of cancers. *Adv Anat Pathol*. 2011 Mar;18(2):165-72. doi: 10.1097/PAP.0b013e31820cb39e. PMID: 21326014.
7. "Defining Cancer". National Cancer Institute. 17 September 2007. Retrieved 10 June 2014. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>; letzter Aufruf am 13.08.2023
8. Cinar D, Tas D. Cancer in the elderly. *North Clin Istanb*. 2015 Apr 24;2(1):73-80. doi: 10.14744/nci.2015.72691. PMID: 28058345; PMCID: PMC5175057.
9. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2020 (<https://gco.iarc.fr/today>, accessed February 2021)
10. de Martel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford GM. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *Lancet Glob Health*. 2020 Feb;8(2):e180-e190. doi: 10.1016/S2214-109X(19)30488-7. Epub 2019 Dec 17. PMID: 31862245.
11. Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. The Development and Causes of Cancer. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>; letzter Aufruf am 13.08.2023
12. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976 Oct 1;194(4260):23-8. doi: 10.1126/science.959840. PMID: 959840.
13. WHO. ICD-11 for mortality and morbidity statistics (ICD-11 MMS), 2018 version. <https://icd.who.int/browse11/l-m/en> (accessed Dec 23, 2019).

14. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol.* 2016 Jul;70(1):106-119. doi: 10.1016/j.eururo.2016.02.028. Epub 2016 Mar 17. PMID: 26996659.
15. Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell.* 2010 Jun 15;18(6):884-901. doi: 10.1016/j.devcel.2010.05.012. PMID: 20627072; PMCID: PMC2905377.
16. Bellizzi AM. An Algorithmic Immunohistochemical Approach to Define Tumor Type and Assign Site of Origin. *Adv Anat Pathol.* 2020 May;27(3):114-163. doi: 10.1097/PAP.0000000000000256. PMID: 32205473; PMCID: PMC7700753.
17. Alderson, Meera et al. 'Histologic Variants of Urothelial Carcinoma: Morphology, Molecular Features and Clinical Implications'. 1 Jan. 2020: 107 – 122. DOI: 10.3233/BLC-190257, Journal: Bladder Cancer, vol. 6, no. 2, pp. 107-122, 2020, Received 31 October 2019, Accepted 27 February 2020, Published: 11 June 2020
18. Adam P, Quintanilla-Fend L, Fend F. Lymphome und lymphatische Leukämien im Knochenmark [Lymphomas and lymphatic leukemias in the bone marrow]. *Pathologe.* 2012 Nov;33(6):518-27. German. doi: 10.1007/s00292-012-1652-2. PMID: 23085695.
19. Luca DC. Update on Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma. *Clin Lab Med.* 2021 Sep;41(3):405-416. doi: 10.1016/j.cll.2021.04.003. PMID: 34304772.
20. Ahmed R, Oborski MJ, Hwang M, Lieberman FS, Mountz JM. Malignant gliomas: current perspectives in diagnosis, treatment, and early response assessment using advanced quantitative imaging methods. *Cancer Manag Res.* 2014 Mar 24;6:149-70. doi: 10.2147/CMAR.S54726. PMID: 24711712; PMCID: PMC3969256.
21. Dunbar SF, Marks LB, Sober AJ, Rosenberg A, Suit HD. Connective tissue tumors in patients with cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 1994 Aug;31(2 Pt 1):216-9. doi: 10.1016/s0190-9622(94)70150-4. PMID: 8040404.
22. Barnes, B.; Kraywinkel, K.; Nowossadeck, E.; Schönfeld, I.; Starker, A.; Wienecke, A.; Wolf, U.; Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016 Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD), Robert Koch-Institut (RKI), Gesundheitsberichterstattung-Hefte (Stand: 2019); DOI: 10.17886/rkipubl-2016-014
23. Global Burden of Disease Cancer Collaboration; Fitzmaurice C, Akinyemiju TF, Al Lami FH, Alam T, Alizadeh-Navaei R, Allen C, Alsharif U, Alvis-Guzman N, Amini E, Anderson BO, Aremu O, Artaman A, Asgedom SW, Assadi R, Atey TM, Avila-Burgos L, Awasthi A, Ba Saleem HO, Barac A, Bennett JR, Bensenor IM, Bhakta N, Brenner H, Cahuana-Hurtado L, Castañeda-Orjuela CA, Catalá-López F, Choi JJ, Christopher DJ, Chung SC, Curado MP, Dandona L, Dandona R, das Neves J, Dey S, Dharmaratne SD, Doku DT,

- Driscoll TR, Dubey M, Ebrahimi H, Edessa D, El-Khatib Z, Endries AY, Fischer F, Force LM, Foreman KJ, Gebrehiwot SW, Gopalani SV, Grosso G, Gupta R, Gyawali B, Hamadeh RR, Hamidi S, Harvey J, Hassen HY, Hay RJ, Hay SI, Heibati B, Hiluf MK, Horita N, Hosgood HD, Ilesanmi OS, Innos K, Islami F, Jakovljevic MB, Johnson SC, Jonas JB, Kasaeian A, Kassa TD, Khader YS, Khan EA, Khan G, Khang YH, Khosravi MH, Khubchandani J, Kopec JA, Kumar GA, Kutz M, Lad DP, Lafranconi A, Lan Q, Legesse Y, Leigh J, Linn S, Lunevicius R, Majeed A, Malekzadeh R, Malta DC, Mantovani LG, McMahon BJ, Meier T, Melaku YA, Melku M, Memiah P, Mendoza W, Meretoja TJ, Mezgebe HB, Miller TR, Mohammed S, Mokdad AH, Moosazadeh M, Moraga P, Mousavi SM, Nangia V, Nguyen CT, Nong VM, Ogbo FA, Olagunju AT, Pa M, Park EK, Patel T, Pereira DM, Pishgar F, Postma MJ, Pourmalek F, Qorbani M, Rafay A, Rawaf S, Rawaf DL, Roshandel G, Safiri S, Salimzadeh H, Sanabria JR, Santric Milicevic MM, Sartorius B, Satpathy M, Sepanlou SG, Shackelford KA, Shaikh MA, Sharif-Alhoseini M, She J, Shin MJ, Shiue I, Shrimme MG, Sinke AH, Sisay M, Sligar A, Sufiyan MB, Sykes BL, Tabarés-Seisdedos R, Tessema GA, Topor-Madry R, Tran TT, Tran BX, Ukwaja KN, Vlassov VV, Vollset SE, Weiderpass E, Williams HC, Yimer NB, Yonemoto N, Younis MZ, Murray CJL, Naghavi M. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* 2018 Nov 1;4(11):1553-1568. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.2706. PMID: 29860482; PMCID: PMC6248091.
24. Sim HG, Cheng CW. Changing demography of prostate cancer in Asia. *Eur J Cancer.* 2005 Apr;41(6):834-45. doi: 10.1016/j.ejca.2004.12.033. PMID: 15808953.
 25. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016 Jan;25(1):16-27. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-15-0578. Epub 2015 Dec 14. PMID: 26667886.
 26. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2019). *World Population Prospects 2019: Highlights (ST/ESA/SER.A/423)*.
 27. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2020). *World Population Ageing 2019 (ST/ESA/SER.A/444)*.
 28. Kanasi E, Ayilavarapu S, Jones J. The aging population: demographics and the biology of aging. *Periodontol 2000.* 2016 Oct;72(1):13-8. doi: 10.1111/prd.12126. PMID: 27501488.
 29. Wacholder S. Precursors in cancer epidemiology: aligning definition and function. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013 Apr;22(4):521-7. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0084. PMID: 23549395; PMCID: PMC3738010.

30. Au WW, Salama SA. Use of biomarkers to elucidate genetic susceptibility to cancer. *Environ Mol Mutagen*. 2005 Mar-Apr;45(2-3):222-8. doi: 10.1002/em.20114. PMID: 15690341.
31. Parascandola M, Weed DL. Causation in epidemiology. *J Epidemiol Community Health*. 2001 Dec;55(12):905-12. doi: 10.1136/jech.55.12.905. PMID: 11707485; PMCID: PMC1731812.
32. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-86. doi: 10.1002/ijc.29210. Epub 2014 Oct 9. PMID: 25220842.
33. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol*. 2016 Jul;70(1):93-105. doi: 10.1016/j.eururo.2016.02.029. Epub 2016 Feb 28. PMID: 26935559.
34. Ljungberg B, Bensalah K, Canfield S, Dabestani S, Hofmann F, Hora M, Kuczyk MA, Lam T, Marconi L, Merseburger AS, Mulders P, Powles T, Staehler M, Volpe A, Bex A. EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update. *Eur Urol*. 2015 May;67(5):913-24. doi: 10.1016/j.eururo.2015.01.005. Epub 2015 Jan 21. PMID: 25616710.
35. Garcia JA, Cowey CL, Godley PA. Renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol*. 2009 May;21(3):266-71. doi: 10.1097/CCO.0b013e32832a05c8. PMID: 19339887.
36. Sültmann H, von Heydebreck A, Huber W, Kuner R, Bunes A, Vogt M, Gunawan B, Vingron M, Füzési L, Poustka A. Gene expression in kidney cancer is associated with cytogenetic abnormalities, metastasis formation, and patient survival. *Clin Cancer Res*. 2005 Jan 15;11(2 Pt 1):646-55. PMID: 15701852.
37. Lobo N, Shariat SF, Guo CC, Fernandez MI, Kassouf W, Choudhury A, Gao J, Williams SB, Galsky MD, Taylor JA 3rd, Roupret M, Kamat AM. What Is the Significance of Variant Histology in Urothelial Carcinoma? *Eur Urol Focus*. 2020 Jul 15;6(4):653-663. doi: 10.1016/j.euf.2019.09.003. Epub 2019 Sep 15. PMID: 31530497.
38. Richters A, Aben KKH, Kiemeneij LALM. The global burden of urinary bladder cancer: an update. *World J Urol*. 2020 Aug;38(8):1895-1904. doi: 10.1007/s00345-019-02984-4. Epub 2019 Nov 1. PMID: 31676912; PMCID: PMC7363726.
39. Chang SS, Boorjian SA, Chou R, Clark PE, Daneshmand S, Konety BR, Pruthi R, Quale DZ, Ritch CR, Seigne JD, Skinner EC, Smith ND, McKiernan JM. Diagnosis and Treatment of Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: AUA/SUO Guideline. *J Urol*. 2016 Oct;196(4):1021-9. doi: 10.1016/j.juro.2016.06.049. Epub 2016 Jun 16. PMID: 27317986.

40. Witjes JA, Bruins HM, Cathomas R, Compérat EM, Cowan NC, Gakis G, Hernández V, Linares Espinós E, Lorch A, Neuzillet Y, Rouanne M, Thalmann GN, Veskimäe E, Ribal MJ, van der Heijden AG. European Association of Urology Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Summary of the 2020 Guidelines. *Eur Urol*. 2021 Jan;79(1):82-104. doi: 10.1016/j.eururo.2020.03.055. Epub 2020 Apr 29. PMID: 32360052.
41. Lenis AT, Lec PM, Chamie K, Mshs MD. Bladder Cancer: A Review. *JAMA*. 2020 Nov 17;324(19):1980-1991. doi: 10.1001/jama.2020.17598. PMID: 33201207.
42. Barr RD, Ferrari A, Ries L, Whelan J, Bleyer WA. Cancer in Adolescents and Young Adults: A Narrative Review of the Current Status and a View of the Future. *JAMA Pediatr*. 2016 May 1;170(5):495-501. doi: 10.1001/jamapediatrics.2015.4689. PMID: 26999630.
43. Glazer AM, Rigel DS, Winkelmann RR, Farberg AS. Clinical Diagnosis of Skin Cancer: Enhancing Inspection and Early Recognition. *Dermatol Clin*. 2017 Oct;35(4):409-416. doi: 10.1016/j.det.2017.06.001. Epub 2017 Aug 7. PMID: 28886797.
44. Ott JJ, Ullrich A, Miller AB. The importance of early symptom recognition in the context of early detection and cancer survival. *Eur J Cancer*. 2009 Nov;45(16):2743-8. doi: 10.1016/j.ejca.2009.08.009. Epub 2009 Sep 16. PMID: 19765977.
45. Jones CE, Maben J, Jack RH, Davies EA, Forbes LJ, Lucas G, Ream E. A systematic review of barriers to early presentation and diagnosis with breast cancer among black women. *BMJ Open*. 2014 Feb 12;4(2):e004076. doi: 10.1136/bmjopen-2013-004076. PMID: 24523424; PMCID: PMC3927711.
46. Jones D, Friend C, Dreher A, Allgar V, Macleod U. The diagnostic test accuracy of rectal examination for prostate cancer diagnosis in symptomatic patients: a systematic review. *BMC Fam Pract*. 2018 Jun 2;19(1):79. doi: 10.1186/s12875-018-0765-y. PMID: 29859531; PMCID: PMC5985061.
47. Armstrong AJ, Eisenberger MA, Halabi S, Oudard S, Nanus DM, Petrylak DP, Sartor AO, Scher HI. Biomarkers in the management and treatment of men with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol*. 2012 Mar;61(3):549-59. doi: 10.1016/j.eururo.2011.11.009. Epub 2011 Nov 12. PMID: 22099611; PMCID: PMC3445625.
48. Du M, Van Ness S, Gordeuk V, Nouraie SM, Nekhai S, Gladwin M, Steinberg MH, Sebastiani P. Biomarker signatures of sickle cell disease severity. *Blood Cells Mol Dis*. 2018 Sep;72:1-9. doi: 10.1016/j.bcmd.2018.05.001. Epub 2018 May 16. PMID: 29778312; PMCID: PMC6087499.
49. Mankarious M, Matthews NC, Snowden JA, Alfred A. Extracorporeal Photopheresis (ECP) and the Potential of Novel Biomarkers in Optimizing Management of Acute and

- Chronic Graft vs. Host Disease (GvHD). *Front Immunol.* 2020 Jan 31;11:81. doi: 10.3389/fimmu.2020.00081. PMID: 32082329; PMCID: PMC7005102.
50. Ignatiadis M, Sledge GW, Jeffrey SS. Liquid biopsy enters the clinic - implementation issues and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol.* 2021 May;18(5):297-312. doi: 10.1038/s41571-020-00457-x. Epub 2021 Jan 20. PMID: 33473219.
 51. Corcoran RB. Liquid biopsy versus tumor biopsy for clinical-trial recruitment. *Nat Med.* 2020 Dec;26(12):1815-1816. doi: 10.1038/s41591-020-01169-6. PMID: 33230339.
 52. Zavridou M, Strati A, Bournakis E, Smilkou S, Tserpeli V, Lianidou E. Prognostic Significance of Gene Expression and DNA Methylation Markers in Circulating Tumor Cells and Paired Plasma Derived Exosomes in Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer. *Cancers (Basel).* 2021 Feb 13;13(4):780. doi: 10.3390/cancers13040780. PMID: 33668490; PMCID: PMC7918693.
 53. Liu HE, Vuppalapaty M, Wilkerson C, Renier C, Chiu M, Lemaire C, Che J, Matsumoto M, Carroll J, Crouse S, Hanft VR, Jeffrey SS, Di Carlo D, Garon EB, Goldman J, Sollier E. Detection of EGFR Mutations in cfDNA and CTCs, and Comparison to Tumor Tissue in Non-Small-Cell-Lung-Cancer (NSCLC) Patients. *Front Oncol.* 2020 Oct 8;10:572895. doi: 10.3389/fonc.2020.572895. PMID: 33117705; PMCID: PMC7578230.
 54. Lennon AM, Buchanan AH, Kinde I, Warren A, Honushesky A, Cohain AT, Ledbetter DH, Sanfilippo F, Sheridan K, Rosica D, Adonizio CS, Hwang HJ, Lahouel K, Cohen JD, Douville C, Patel AA, Hagmann LN, Rolston DD, Malani N, Zhou S, Bettegowda C, Diehl DL, Urban B, Still CD, Kann L, Woods JI, Salvati ZM, Vadakara J, Leeming R, Bhattacharya P, Walter C, Parker A, Lengauer C, Klein A, Tomasetti C, Fishman EK, Hruban RH, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N. Feasibility of blood testing combined with PET-CT to screen for cancer and guide intervention. *Science.* 2020 Jul 3;369(6499):eabb9601. doi: 10.1126/science.abb9601. Epub 2020 Apr 28. PMID: 32345712; PMCID: PMC7509949.
 55. Dama E, Colangelo T, Fina E, Cremonesi M, Kallikourdis M, Veronesi G, Bianchi F. Biomarkers and Lung Cancer Early Detection: State of the Art. *Cancers (Basel).* 2021 Aug 3;13(15):3919. doi: 10.3390/cancers13153919. PMID: 34359818; PMCID: PMC8345487.
 56. Shankar GM, Balaj L, Stott SL, Nahed B, Carter BS. Liquid biopsy for brain tumors. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017 Oct;17(10):943-947. doi: 10.1080/14737159.2017.1374854. Epub 2017 Sep 6. PMID: 28875730; PMCID: PMC5856481.
 57. Žilovič D, Čiurlienė R, Sabaliauskaitė R, Jarmalaitė S. Future Screening Prospects for Ovarian Cancer. *Cancers (Basel).* 2021 Jul 30;13(15):3840. doi: 10.3390/cancers13153840. PMID: 34359740; PMCID: PMC8345180.

58. Hur JY, Lee KY. Characteristics and Clinical Application of Extracellular Vesicle-Derived DNA. *Cancers (Basel)*. 2021 Jul 29;13(15):3827. doi: 10.3390/cancers13153827. PMID: 34359729; PMCID: PMC8345206.
59. Carnino JM, Hao Kwok Z, Jin Y. Extracellular Vesicles: A Novel Opportunity for Precision Medicine in Respiratory Diseases. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Jul 23;8:661679. doi: 10.3389/fmed.2021.661679. PMID: 34368181; PMCID: PMC8342920.
60. Barefoot ME, Loyfer N, Kiliti AJ, McDeed AP 4th, Kaplan T, Wellstein A. Detection of Cell Types Contributing to Cancer From Circulating, Cell-Free Methylated DNA. *Front Genet*. 2021 Jul 27;12:671057. doi: 10.3389/fgene.2021.671057. PMID: 34386036; PMCID: PMC8353442.
61. Hendriks RJ, van Oort IM, Schalken JA. Blood-based and urinary prostate cancer biomarkers: a review and comparison of novel biomarkers for detection and treatment decisions. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2017 Mar;20(1):12-19. doi: 10.1038/pcan.2016.59. Epub 2016 Dec 6. PMID: 27922627.
62. Poulet, G.; Massias, J.; Taly, V. Liquid Biopsy: General Concepts. *Acta Cytol*. 2019, 63, 449–455. doi: 10.1159/000499337. Epub 2019 May 15. PMID: 31091522.
63. Dinges SS, Hohm A, Vandergrift LA, Nowak J, Habbel P, Kaltashov IA, Cheng LL. Cancer metabolomic markers in urine: evidence, techniques and recommendations. *Nat Rev Urol*. 2019 Jun;16(6):339-362. doi: 10.1038/s41585-019-0185-3. PMID: 31092915.
64. CHARGAFF E, WEST R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem*. 1946 Nov;166(1):189-97. PMID: 20273687.
65. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*. 1967 May;13(3):269-88. doi: 10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x. PMID: 6025241.
66. Chen P, Wang L, Fan X, Ning X, Yu B, Ou C, Chen M. Targeted delivery of extracellular vesicles in heart injury. *Theranostics*. 2021 Jan 1;11(5):2263-2277. doi: 10.7150/thno.51571. PMID: 33500724; PMCID: PMC7797669.
67. Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Apr 18;13(5):328-35. doi: 10.1038/nrm3335. PMID: 22510790; PMCID: PMC3738855.
68. D'Acunzo P, Pérez-González R, Kim Y, Hargash T, Miller C, Alldred MJ, Erdjument-Bromage H, Penikalapati SC, Pawlik M, Saito M, Saito M, Ginsberg SD, Neubert TA, Goulbourne CN, Levy E. Mitovesicles are a novel population of extracellular vesicles of mitochondrial origin altered in Down syndrome. *Sci Adv*. 2021 Feb 12;7(7):eabe5085. doi: 10.1126/sciadv.abe5085. PMID: 33579698; PMCID: PMC7880603.].
69. Elsharkawi F, Elsabab M, Shabayek M, Khaled H. Urine and Serum Exosomes as Novel Biomarkers in Detection of Bladder Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019 Jul

- 1;20(7):2219-2224. doi: 10.31557/APJCP.2019.20.7.2219. PMID: 31350988; PMCID: PMC6745236.
70. Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jul;1820(7):940-8. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.03.017. Epub 2012 Apr 1. PMID: 22503788.
 71. Li M, Zeringer E, Barta T, Schageman J, Cheng A, Vlassov AV. Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014 Sep 26;369(1652):20130502. doi: 10.1098/rstb.2013.0502. PMID: 25135963; PMCID: PMC4142023.
 72. Ståhl AL, Johansson K, Mossberg M, Kahn R, Karpman D. Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases. *Pediatr Nephrol*. 2019 Jan;34(1):11-30. doi: 10.1007/s00467-017-3816-z. Epub 2017 Nov 27. PMID: 29181712; PMCID: PMC6244861.
 73. Qin J, Xu Q. Functions and application of exosomes. *Acta Pol Pharm*. 2014 Jul-Aug;71(4):537-43. PMID: 25272880.
 74. Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Sep 7;101(36):13368-73. doi: 10.1073/pnas.0403453101. Epub 2004 Aug 23. PMID: 15326289; PMCID: PMC516573.
 75. Baumgart S, Hölter S, Ohlmann CH, Bohle R, Stöckle M, Ostenfeld MS, Dyrskjøt L, Junker K, Heinzelmann J. Exosomes of invasive urothelial carcinoma cells are characterized by a specific miRNA expression signature. *Oncotarget*. 2017 May 4;8(35):58278-58291. doi: 10.18632/oncotarget.17619. PMID: 28938555; PMCID: PMC5601651.
 76. Zeuschner P, Linxweiler J, Junker K. Non-coding RNAs as biomarkers in liquid biopsies with a special emphasis on extracellular vesicles in urological malignancies. *Expert Rev Mol Diagn*. 2020 Feb;20(2):151-167. doi: 10.1080/14737159.2019.1665998. Epub 2019 Sep 18. PMID: 31499007.
 77. Junker K, Heinzelmann J, Beckham C, Ochiya T, Jenster G. Extracellular Vesicles and Their Role in Urologic Malignancies. *Eur Urol*. 2016 Aug;70(2):323-31. doi: 10.1016/j.eururo.2016.02.046. Epub 2016 Feb 28. PMID: 26924769.
 78. Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*. 2019 Jul 15;8(7):727. doi: 10.3390/cells8070727. PMID: 31311206; PMCID: PMC6678302.
 79. Lischnig A, Bergqvist M, Ochiya T, Lässer C. Quantitative Proteomics Identifies Proteins Enriched in Large and Small Extracellular Vesicles. *Mol Cell Proteomics*. 2022

- Sep;21(9):100273. doi: 10.1016/j.mcpro.2022.100273. Epub 2022 Jul 30. Erratum in: Mol Cell Proteomics. 2023 Mar;22(3):100516. PMID: 35918030; PMCID: PMC9486130.]
80. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020 Feb 7;367(6478):eaau6977. doi: 10.1126/science.aau6977. PMID: 32029601; PMCID: PMC7717626.
 81. Rajagopal C, Harikumar KB. The Origin and Functions of Exosomes in Cancer. *Front Oncol*. 2018 Mar 20;8:66. doi: 10.3389/fonc.2018.00066. PMID: 29616188; PMCID: PMC5869252.
 82. Saad MG, Beyenal H, Dong WJ. Exosomes as Powerful Engines in Cancer: Isolation, Characterization and Detection Techniques. *Biosensors (Basel)*. 2021 Dec 16;11(12):518. doi: 10.3390/bios11120518. PMID: 34940275; PMCID: PMC8699402.
 83. Momen-Heravi F. Isolation of Extracellular Vesicles by Ultracentrifugation. *Methods Mol Biol*. 2017;1660:25-32. doi: 10.1007/978-1-4939-7253-1_3. PMID: 28828645.
 84. Brennan K, Martin K, FitzGerald SP, O'Sullivan J, Wu Y, Blanco A, Richardson C, McGee MM. A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. *Sci Rep*. 2020 Jan 23;10(1):1039. doi: 10.1038/s41598-020-57497-7. PMID: 31974468; PMCID: PMC6978318.
 85. Ramirez MI, Amorim MG, Gadelha C, Milic I, Welsh JA, Freitas VM, Nawaz M, Akbar N, Couch Y, Makin L, Cooke F, Vettore AL, Batista PX, Freezor R, Pezuk JA, Rosa-Fernandes L, Carreira ACO, Devitt A, Jacobs L, Silva IT, Coakley G, Nunes DN, Carter D, Palmisano G, Dias-Neto E. Technical challenges of working with extracellular vesicles. *Nanoscale*. 2018 Jan 18;10(3):881-906. doi: 10.1039/c7nr08360b. PMID: 29265147.
 86. Cvjetkovic A, Lötvall J, Lässer C. The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2014 Mar 25;3. doi: 10.3402/jev.v3.23111. PMID: 24678386; PMCID: PMC3967015.
 87. Sidhom K, Obi PO, Saleem A. A Review of Exosomal Isolation Methods: Is Size Exclusion Chromatography the Best Option? *Int J Mol Sci*. 2020 Sep 4;21(18):6466. doi: 10.3390/ijms21186466. PMID: 32899828; PMCID: PMC7556044.
 88. 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.; et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018 Nov 23;7(1):1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750. PMID: 30637094; PMCID: PMC6322352.

89. Willms E, Cabañas C, Mäger I, Wood MJA, Vader P. Extracellular Vesicle Heterogeneity: Subpopulations, Isolation Techniques, and Diverse Functions in Cancer Progression. *Front Immunol.* 2018 Apr 30;9:738. doi: 10.3389/fimmu.2018.00738. PMID: 29760691; PMCID: PMC5936763.
90. Carnino JM, Lee H, Jin Y. Isolation and characterization of extracellular vesicles from Broncho-alveolar lavage fluid: a review and comparison of different methods. *Respir Res.* 2019 Oct 30;20(1):240. doi: 10.1186/s12931-019-1210-z. PMID: 31666080; PMCID: PMC6822481.
91. Serrano-Pertierra E, Oliveira-Rodríguez M, Rivas M, Oliva P, Villafani J, Navarro A, Blanco-López MC, Cernuda-Morollón E. Characterization of Plasma-Derived Extracellular Vesicles Isolated by Different Methods: A Comparison Study. *Bioengineering (Basel).* 2019 Jan 17;6(1):8. doi: 10.3390/bioengineering6010008. PMID: 30658418; PMCID: PMC6466225.
92. Phillips W, Willms E, Hill AF. Understanding extracellular vesicle and nanoparticle heterogeneity: Novel methods and considerations. *Proteomics.* 2021 Jul;21(13-14):e2000118. doi: 10.1002/pmic.202000118. Epub 2021 May 3. PMID: 33857352; PMCID: PMC8365743.
93. Lässer C, Eldh M, Lötvall J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J Vis Exp.* 2012 Jan 9;(59):e3037. doi: 10.3791/3037. PMID: 22257828; PMCID: PMC3369768.
94. D'Acunzo P, Kim Y, Ungania JM, Pérez-González R, Goulbourne CN, Levy E. Isolation of mitochondria-derived mitovesicles and subpopulations of microvesicles and exosomes from brain tissues. *Nat Protoc.* 2022 Nov;17(11):2517-2549. doi: 10.1038/s41596-022-00719-1. Epub 2022 Aug 12. PMID: 35962195; PMCID: PMC9633367.
95. Goshō M, Nagashima K, Sato Y. Study designs and statistical analyses for biomarker research. *Sensors (Basel).* 2012;12(7):8966-86. doi: 10.3390/s120708966. Epub 2012 Jun 29. PMID: 23012528; PMCID: PMC3444086.
96. Properzi F, Logozzi M, Fais S. Exosomes: the future of biomarkers in medicine. *Biomark Med.* 2013 Oct;7(5):769-78. doi: 10.2217/bmm.13.63. PMID: 24044569.
97. He C, Zheng S, Luo Y, Wang B. Exosome Theranostics: Biology and Translational Medicine. *Theranostics.* 2018 Jan 1;8(1):237-255. doi: 10.7150/thno.21945. PMID: 29290805; PMCID: PMC5743472.
98. Huda MN, Nafiujjaman M, Deaguero IG, Okonkwo J, Hill ML, Kim T, Nurunnabi M. Potential Use of Exosomes as Diagnostic Biomarkers and in Targeted Drug Delivery: Progress in Clinical and Preclinical Applications. *ACS Biomater Sci Eng.* 2021 Jun

- 14;7(6):2106-2149. doi: 10.1021/acsbiomaterials.1c00217. Epub 2021 May 14. PMID: 33988964; PMCID: PMC8147457.
99. Mege D, Panicot-Dubois L, Ouaiissi M, Robert S, Sielezneff I, Sastre B, Dignat-George F, Dubois C. The origin and concentration of circulating microparticles differ according to cancer type and evolution: A prospective single-center study. *Int J Cancer*. 2016 Feb 15;138(4):939-48. doi: 10.1002/ijc.29837. Epub 2015 Oct 1. PMID: 26341361.
 100. Bamankar S, Londhe VY. The Rise of Extracellular Vesicles as New Age Biomarkers in Cancer Diagnosis: Promises and Pitfalls. *Technol Cancer Res Treat*. 2023 Jan-Dec;22:15330338221149266. doi: 10.1177/15330338221149266. PMID: 36604966; PMCID: PMC9830000.
 101. Mathew B, Mansuri MS, Williams KR, Nairn AC. Exosomes as Emerging Biomarker Tools in Neurodegenerative and Neuropsychiatric Disorders-A Proteomics Perspective. *Brain Sci*. 2021 Feb 19;11(2):258. doi: 10.3390/brainsci11020258. PMID: 33669482; PMCID: PMC7922222.
 102. Wang YH, Ji J, Wang BC, Chen H, Yang ZH, Wang K, Luo CL, Zhang WW, Wang FB, Zhang XL. Tumor-Derived Exosomal Long Noncoding RNAs as Promising Diagnostic Biomarkers for Prostate Cancer. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(2):532-545. doi: 10.1159/000488620. Epub 2018 Mar 26. PMID: 29614511.
 103. Urabe F, Kosaka N, Ito K, Kimura T, Egawa S, Ochiya T. Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2020 Jan 1;318(1):C29-C39. doi: 10.1152/ajpcell.00280.2019. Epub 2019 Nov 6. PMID: 31693397.
 104. Tominaga N, Yoshioka Y, Ochiya T. A novel platform for cancer therapy using extracellular vesicles. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015 Dec 1;95:50-5. doi: 10.1016/j.addr.2015.10.002. Epub 2015 Oct 19. PMID: 26482189.
 105. Saldana C, Majidipur A, Beaumont E, Huet E, de la Taille A, Vacherot F, Firlej V, Destouches D. Extracellular Vesicles in Advanced Prostate Cancer: Tools to Predict and Thwart Therapeutic Resistance. *Cancers (Basel)*. 2021 Jul 28;13(15):3791. doi: 10.3390/cancers13153791. PMID: 34359692; PMCID: PMC8345194.]
 106. Piao XM, Cha EJ, Yun SJ, Kim WJ. Role of Exosomal miRNA in Bladder Cancer: A Promising Liquid Biopsy Biomarker. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 8;22(4):1713. doi: 10.3390/ijms22041713. PMID: 33567779; PMCID: PMC7915637.
 107. Ji L, Fu J, Hao J, Ji Y, Wang H, Wang Z, Wang P, Xiao H. Proteomics analysis of tissue small extracellular vesicles reveals protein panels for the reoccurrence prediction of colorectal cancer. *J Proteomics*. 2021 Aug 9:104347. doi: 10.1016/j.jprot.2021.104347. Epub ahead of print. PMID: 34384913.

108. Schnell U, Cirulli V, Giepmans BN. EpCAM: structure and function in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Aug;1828(8):1989-2001. doi: 10.1016/j.bbame.2013.04.018. Epub 2013 Apr 23. PMID: 23618806.
109. Nagao K, Zhu J, Heneghan MB, Hanson JC, Morasso MI, Tessarollo L, Mackem S, Udey MC. Abnormal placental development and early embryonic lethality in EpCAM-null mice. *PLoS One*. 2009 Dec 31;4(12):e8543. doi: 10.1371/journal.pone.0008543. PMID: 20046825; PMCID: PMC2796178.
110. Herlyn M, Steplewski Z, Herlyn D, Koprowski H. Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Mar;76(3):1438-42. doi: 10.1073/pnas.76.3.1438. PMID: 286328; PMCID: PMC383267.
111. Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, Dirnhofer S. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol*. 2004 Jan;35(1):122-8. doi: 10.1016/j.humpath.2003.08.026. PMID: 14745734.
112. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)*. 1995;154(1):8-20. doi: 10.1159/000147748. PMID: 8714286.
113. Zhang W, Ni M, Su Y, Wang H, Zhu S, Zhao A, Li G. MicroRNAs in Serum Exosomes as Potential Biomarkers in Clear-cell Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol Focus*. 2018 Apr;4(3):412-419. doi: 10.1016/j.euf.2016.09.007. Epub 2016 Oct 14. PMID: 28753793.
114. van der Gun BT, Melchers LJ, Ruiters MH, de Leij LF, McLaughlin PM, Rots MG. EpCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly. *Carcinogenesis*. 2010 Nov;31(11):1913-21. doi: 10.1093/carcin/bgq187. Epub 2010 Sep 13. PMID: 20837599.
115. Zhao Z, Liao G, Li Y, Zhou S, Zou H, Fernando S. Prognostic value of carbonic anhydrase IX immunohistochemical expression in renal cell carcinoma: a meta-analysis of the literature. *PLoS One*. 2014 Nov 26;9(11):e114096. doi: 10.1371/journal.pone.0114096. PMID: 25426861; PMCID: PMC4245260.
116. Adam PJ, Terrett JA, Steers G, Stockwin L, Loader JA, Fletcher GC, Lu LS, Leach BI, Mason S, Stamps AC, Boyd RS, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL. CD70 (TNFSF7) is expressed at high prevalence in renal cell carcinomas and is rapidly internalised on antibody binding. *Br J Cancer*. 2006 Aug 7;95(3):298-306. doi: 10.1038/sj.bjc.6603222. PMID: 16892042; PMCID: PMC2360640.
117. Mori Y, Masuda T, Kosugi T, Yoshioka T, Hori M, Nagaya H, Maeda K, Sato Y, Kojima H, Kato N, Ishimoto T, Katsuno T, Yuzawa Y, Kadomatsu K, Maruyama S. The clinical relevance of plasma CD147/basigin in biopsy-proven kidney diseases. *Clin Exp Nephrol*. 2018 Aug;22(4):815-824. doi: 10.1007/s10157-017-1518-2. Epub 2017 Dec 12. PMID: 29234893.

118. Kashii Y, Giorda R, Herberman RB, Whiteside TL, Vujanovic NL. Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. *J Immunol.* 1999 Nov 15;163(10):5358-66. PMID: 10553060.
119. Gruss HJ. Molecular, structural, and biological characteristics of the tumor necrosis factor ligand superfamily. *Int J Clin Lab Res.* 1996;26(3):143-59. doi: 10.1007/BF02592977. PMID: 8905447.
120. Hintzen RQ, Lens SM, Koopman G, Pals ST, Spits H, van Lier RA. CD70 represents the human ligand for CD27. *Int Immunol.* 1994 Mar;6(3):477-80. doi: 10.1093/intimm/6.3.477. PMID: 8186199.
121. Bowman MR, Crimmins MA, Yetz-Aldape J, Kriz R, Kelleher K, Herrmann S. The cloning of CD70 and its identification as the ligand for CD27. *J Immunol.* 1994 Feb 15;152(4):1756-61. PMID: 8120384.
122. Lens SM, de Jong R, Hooibrink B, Koopman G, Pals ST, van Oers MH, van Lier RA. Phenotype and function of human B cells expressing CD70 (CD27 ligand). *Eur J Immunol.* 1996 Dec;26(12):2964-71. doi: 10.1002/eji.1830261223. PMID: 8977292.
123. O'Neill RE, Du W, Mohammadpour H, Alqassim E, Qiu J, Chen G, McCarthy PL, Lee KP, Cao X. T Cell-Derived CD70 Delivers an Immune Checkpoint Function in Inflammatory T Cell Responses. *J Immunol.* 2017 Nov 15;199(10):3700-3710. doi: 10.4049/jimmunol.1700380. Epub 2017 Oct 18. PMID: 29046346; PMCID: PMC5687300.
124. Borst J, Hendriks J, Xiao Y. CD27 and CD70 in T cell and B cell activation. *Curr Opin Immunol.* 2005 Jun;17(3):275-81. doi: 10.1016/j.coi.2005.04.004. PMID: 15886117.
125. Goodwin RG, Alderson MR, Smith CA, Armitage RJ, VandenBos T, Jerzy R, Tough TW, Schoenborn MA, Davis-Smith T, Hennen K, et al. Molecular and biological characterization of a ligand for CD27 defines a new family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *Cell.* 1993 May 7;73(3):447-56. doi: 10.1016/0092-8674(93)90133-b. PMID: 8387892.
126. Wyzgol A, Müller N, Fick A, Munkel S, Grigoleit GU, Pfizenmaier K, Wajant H. Trimer stabilization, oligomerization, and antibody-mediated cell surface immobilization improve the activity of soluble trimers of CD27L, CD40L, 41BBL, and glucocorticoid-induced TNF receptor ligand. *J Immunol.* 2009 Aug 1;183(3):1851-61. doi: 10.4049/jimmunol.0802597. Epub 2009 Jul 13. PMID: 19596991.
127. Camerini D, Walz G, Loenen WA, Borst J, Seed B. The T cell activation antigen CD27 is a member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor gene family. *J Immunol.* 1991 Nov 1;147(9):3165-9. PMID: 1655907.
128. Hintzen RQ, van Lier RA, Kuijpers KC, Baars PA, Schaasberg W, Lucas CJ, Polman CH. Elevated levels of a soluble form of the T cell activation antigen CD27 in cerebrospinal

- fluid of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* 1991 Dec;35(1-3):211-7. doi: 10.1016/0165-5728(91)90175-7. PMID: 1659587.
129. Grewal IS. CD70 as a therapeutic target in human malignancies. *Expert Opin Ther Targets.* 2008 Mar;12(3):341-51. doi: 10.1517/14728222.12.3.341. PMID: 18269343.
130. Hintzen RQ, de Jong R, Lens SM, van Lier RA. CD27: marker and mediator of T-cell activation? *Immunol Today.* 1994 Jul;15(7):307-11. doi: 10.1016/0167-5699(94)90077-9. PMID: 8086099.
131. Lens SM, Tesselaar K, van Oers MH, van Lier RA. Control of lymphocyte function through CD27-CD70 interactions. *Semin Immunol.* 1998 Dec;10(6):491-9. doi: 10.1006/smim.1998.0154. PMID: 9826582.
132. Junker K, Hindermann W, von Eggeling F, Diegmann J, Haessler K, Schubert J. CD70: a new tumor specific biomarker for renal cell carcinoma. *J Urol.* 2005 Jun;173(6):2150-3. doi: 10.1097/01.ju.0000158121.49085.ba. PMID: 15879877.
133. Agematsu K, Hokibara S, Nagumo H, Komiyama A. CD27: a memory B-cell marker. *Immunol Today.* 2000 May;21(5):204-6. doi: 10.1016/s0167-5699(00)01605-4. PMID: 10782048.
134. Venugopal S, Daver N, Ravandi F. An Update on the Clinical Evaluation of Antibody-Based Therapeutics in Acute Myeloid Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep.* 2021 Feb;16(1):89-96. doi: 10.1007/s11899-021-00612-w. Epub 2021 Feb 25. PMID: 33630233.
135. Flieswasser T, Van den Eynde A, Van Audenaerde J, De Waele J, Lardon F, Riether C, de Haard H, Smits E, Pauwels P, Jacobs J. The CD70-CD27 axis in oncology: the new kids on the block. *J Exp Clin Cancer Res.* 2022 Jan 6;41(1):12. doi: 10.1186/s13046-021-02215-y. PMID: 34991665; PMCID: PMC8734249.
136. Wang DR, Wu XL, Sun YL. Therapeutic targets and biomarkers of tumor immunotherapy: response versus non-response. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Sep 19;7(1):331. doi: 10.1038/s41392-022-01136-2. PMID: 36123348; PMCID: PMC9485144.
137. van de Ven K, Borst J. Targeting the T-cell co-stimulatory CD27/CD70 pathway in cancer immunotherapy: rationale and potential. *Immunotherapy.* 2015;7(6):655-67. doi: 10.2217/imt.15.32. Epub 2015 Jun 22. PMID: 26098609.
138. Oflazoglu E, Boursalian TE, Zeng W, Edwards AC, Duniho S, McEarchern JA, Law CL, Gerber HP, Grewal IS. Blocking of CD27-CD70 pathway by anti-CD70 antibody ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *J Immunol.* 2009 Sep 15;183(6):3770-7. doi: 10.4049/jimmunol.0901637. Epub 2009 Aug 26. PMID: 19710474

139. Boleto G, Allanore Y, Avouac J. Targeting Costimulatory Pathways in Systemic Sclerosis. *Front Immunol.* 2018 Dec 18;9:2998. doi: 10.3389/fimmu.2018.02998. PMID: 30619351; PMCID: PMC6305435.
140. Wang D, Du J, Song Y, Wang B, Song R, Hao Y, Zeng Y, Xiao J, Zheng H, Zeng H, Zhao H, Kong Y. CD70 contributes to age-associated T cell defects and overwhelming inflammatory responses. *Aging (Albany NY).* 2020 Jun 19;12(12):12032-12050. doi: 10.18632/aging.103368. Epub 2020 Jun 19. PMID: 32559178; PMCID: PMC7343466.
141. Pastorek J, Pastoreková S, Callebaut I, Mornon JP, Zelník V, Opavský R, Zat'ovicová M, Liao S, Portetelle D, Stanbridge EJ, et al. Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene.* 1994 Oct;9(10):2877-88. PMID: 8084592.
142. Závada J, Zavadová Z, Pastoreková S, Ciampor F, Pastorek J, Zelník V. Expression of MaTu-MN protein in human tumor cultures and in clinical specimens. *Int J Cancer.* 1993 May 8;54(2):268-74. doi: 10.1002/ijc.2910540218. PMID: 8486430.
143. Pastoreková S, Zavadová Z, Kostál M, Babusíková O, Závada J. A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two-component system. *Virology.* 1992 Apr;187(2):620-6. doi: 10.1016/0042-6822(92)90464-z. PMID: 1312272.
144. Maren TH. Carbonic anhydrase: chemistry, physiology, and inhibition. *Physiol Rev.* 1967 Oct;47(4):595-781. doi: 10.1152/physrev.1967.47.4.595. PMID: 4964060.
145. Meldrum NU, Roughton FJ. Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. *J Physiol.* 1933 Dec 5;80(2):113-42. doi: 10.1113/jphysiol.1933.sp003077. PMID: 16994489; PMCID: PMC1394121.
146. Tashian RE. The carbonic anhydrases: widening perspectives on their evolution, expression and function. *Bioessays.* 1989 Jun;10(6):186-92. doi: 10.1002/bies.950100603. PMID: 2500929.
147. Davenport HW. Gastric carbonic anhydrase. *J Physiol.* 1939 Nov 14;97(1):32-43. doi: 10.1113/jphysiol.1939.sp003790. PMID: 16995148; PMCID: PMC1393981.
148. Vollrath, L. Über Entwicklung und Funktion der Belegzellen der Magendrüsen. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie.* 1959; 1: 36-60. Doi: 10.1007/BF00342653
149. Purkerson JM, Schwartz GJ. The role of carbonic anhydrases in renal physiology. *Kidney Int.* 2007 Jan;71(2):103-15. doi: 10.1038/sj.ki.5002020. Epub 2006 Dec 13. PMID: 17164835.
150. Nógrádi A. The role of carbonic anhydrases in tumors. *Am J Pathol.* 1998 Jul;153(1):1-4. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65537-X. PMID: 9665457; PMCID: PMC1852947.

151. Pastorekova S, Gillies RJ. The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: links to hypoxia, acidosis, and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* 2019 Jun;38(1-2):65-77. doi: 10.1007/s10555-019-09799-0. PMID: 31076951; PMCID: PMC6647366.
152. Becker HM. Carbonic anhydrase IX and acid transport in cancer. *Br J Cancer.* 2020 Jan;122(2):157-167. doi: 10.1038/s41416-019-0642-z. Epub 2019 Dec 10. PMID: 31819195; PMCID: PMC7051959.
153. Luong-Player A, Liu H, Wang HL, Lin F. Immunohistochemical reevaluation of carbonic anhydrase IX (CA IX) expression in tumors and normal tissues. *Am J Clin Pathol.* 2014 Feb;141(2):219-25. doi: 10.1309/AJCPVJDS28KNYZLD. PMID: 24436269.
154. Ingels A, Hew M, Algaba F, de Boer OJ, van Moorselaar RJ, Horenblas S, Zondervan P, de la Rosette JJ, Pilar Laguna Pes M. Vimentin over-expression and carbonic anhydrase IX under-expression are independent predictors of recurrence, specific and overall survival in non-metastatic clear-cell renal carcinoma: a validation study. *World J Urol.* 2017 Jan;35(1):81-87. doi: 10.1007/s00345-016-1854-y. Epub 2016 May 20. PMID: 27207480.
155. Soltysova A, Breza J, Takacova M, Feruszova J, Hudecova S, Novotna B, Rozborilova E, Pastorekova S, Kadasi L, Krizanova O. Deregulation of energetic metabolism in the clear cell renal cell carcinoma: A multiple pathway analysis based on microarray profiling. *Int J Oncol.* 2015 Jul;47(1):287-95. doi: 10.3892/ijo.2015.3014. Epub 2015 May 19. PMID: 25998032.
156. Supuran CT. Inhibition of carbonic anhydrase IX as a novel anticancer mechanism. *World J Clin Oncol.* 2012 Jul 10;3(7):98-103. doi: 10.5306/wjco.v3.i7.98. PMID: 22787577; PMCID: PMC3394083.
157. Cianchi F, Vinci MC, Supuran CT, Peruzzi B, De Giuli P, Fasolis G, Perigli G, Pastorekova S, Papucci L, Pini A, Masini E, Puccetti L. Selective inhibition of carbonic anhydrase IX decreases cell proliferation and induces ceramide-mediated apoptosis in human cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010 Sep 1;334(3):710-9. doi: 10.1124/jpet.110.167270. Epub 2010 Jun 2. PMID: 20519553.
158. Lindskog S. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol Ther.* 1997;74(1):1-20. doi: 10.1016/s0163-7258(96)00198-2. PMID: 9336012.
159. van Oostenbrugge TJ, Langenhuijsen JF, Oosterwijk E, Boerman OC, Jenniskens SF, Oyen WJG, Fütterer JJ, Mulders PFA. Follow-up imaging after cryoablation of clear cell renal cell carcinoma is feasible using single photon emission computed tomography with ¹¹¹In-girentuximab. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2020 Jul;47(8):1864-1870. doi: 10.1007/s00259-019-04613-z. Epub 2019 Nov 25. PMID: 31768601; PMCID: PMC7299921.

160. Hekman MC, Rijpkema M, Muselaers CH, Oosterwijk E, Hulsbergen-Van de Kaa CA, Boerman OC, Oyen WJ, Langenhuijsen JF, Mulders PF. Tumor-targeted Dual-modality Imaging to Improve Intraoperative Visualization of Clear Cell Renal Cell Carcinoma: A First in Man Study. *Theranostics*. 2018 Mar 8;8(8):2161-2170. doi: 10.7150/thno.23335. PMID: 29721070; PMCID: PMC5928878.
161. Merckx RIJ, Rijpkema M, Franssen GM, Kip A, Smeets B, Morgenstern A, Bruchertseifer F, Yan E, Wheatcroft MP, Oosterwijk E, Mulders PFA, Heskamp S. Carbonic Anhydrase IX-Targeted α -Radionuclide Therapy with ²²⁵Ac Inhibits Tumor Growth in a Renal Cell Carcinoma Model. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022 May 2;15(5):570. doi: 10.3390/ph15050570. PMID: 35631396; PMCID: PMC9142961.
162. Kaname T, Miyauchi T, Kuwano A, Matsuda Y, Muramatsu T, Kajii T. Mapping basigin (BSG), a member of the immunoglobulin superfamily, to 19p13.3. *Cytogenet Cell Genet*. 1993;64(3-4):195-7. doi: 10.1159/000133573. PMID: 8404035.
163. Muramatsu T. Basigin (CD147), a multifunctional transmembrane glycoprotein with various binding partners. *J Biochem*. 2016 May;159(5):481-90. doi: 10.1093/jb/mvv127. Epub 2015 Dec 18. PMID: 26684586; PMCID: PMC4846773.
164. Kanekura T, Miyauchi T, Tashiro M, Muramatsu T. Basigin, a new member of the immunoglobulin superfamily: genes in different mammalian species, glycosylation changes in the molecule from adult organs and possible variation in the N-terminal sequences. *Cell Struct Funct*. 1991 Feb;16(1):23-30. doi: 10.1247/csf.16.23. PMID: 2032306.
165. Li R, Huang L, Guo H, Toole BP. Basigin (murine EMMPRIN) stimulates matrix metalloproteinase production by fibroblasts. *J Cell Physiol*. 2001 Mar;186(3):371-9. doi: 10.1002/1097-4652(2000)9999:999<000::AID-JCP1042>3.0.CO;2-8. PMID: 11169976.
166. Bai Y, Huang W, Ma LT, Jiang JL, Chen ZN. Importance of N-glycosylation on CD147 for its biological functions. *Int J Mol Sci*. 2014 Apr 15;15(4):6356-77. doi: 10.3390/ijms15046356. PMID: 24739808; PMCID: PMC4013633.
167. Fadool JM, Linser PJ. Evidence for the formation of multimeric forms of the 5A11/HT7 antigen. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Dec 4;229(1):280-6. doi: 10.1006/bbrc.1996.1793. PMID: 8954119.
168. Cui HY, Guo T, Wang SJ, Zhao P, Dong ZS, Zhang Y, Jiang JL, Chen ZN, Yu XL. Dimerization is essential for HAb18G/CD147 promoting tumor invasion via MAPK pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Mar 16;419(3):517-22. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.02.049. Epub 2012 Feb 15. PMID: 22366034.
169. Wang WJ, Li QQ, Xu JD, Cao XX, Li HX, Tang F, Chen Q, Yang JM, Xu ZD, Liu XP. Interaction between CD147 and P-glycoprotein and their regulation by ubiquitination in

- breast cancer cells. *Chemotherapy*. 2008;54(4):291-301. doi: 10.1159/000151225. Epub 2008 Aug 8. PMID: 18689982.
170. Halestrap AP. The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization. *IUBMB Life*. 2012 Jan;64(1):1-9. doi: 10.1002/iub.573. Epub 2011 Nov 30. PMID: 22131303.
171. Kirk P, Wilson MC, Heddle C, Brown MH, Barclay AN, Halestrap AP. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J*. 2000 Aug 1;19(15):3896-904. doi: 10.1093/emboj/19.15.3896. PMID: 10921872; PMCID: PMC306613.
172. Wilson MC, Meredith D, Fox JE, Manoharan C, Davies AJ, Halestrap AP. Basigin (CD147) is the target for organomercurial inhibition of monocarboxylate transporter isoforms 1 and 4: the ancillary protein for the insensitive MCT2 is EMBIGIN (gp70). *J Biol Chem*. 2005 Jul 22;280(29):27213-21. doi: 10.1074/jbc.M411950200. Epub 2005 May 24. PMID: 15917240.
173. Mannowetz N, Wandernoth P, Wennemuth G. Basigin interacts with both MCT1 and MCT2 in murine spermatozoa. *J Cell Physiol*. 2012 May;227(5):2154-62. doi: 10.1002/jcp.22949. PMID: 21792931.
174. Mauris J, Woodward AM, Cao Z, Panjwani N, Argüeso P. Molecular basis for MMP9 induction and disruption of epithelial cell-cell contacts by galectin-3. *J Cell Sci*. 2014 Jul 15;127(Pt 14):3141-8. doi: 10.1242/jcs.148510. Epub 2014 May 14. PMID: 24829150; PMCID: PMC4095856.
175. Rodriguez-Teja M, Gronau JH, Minamidate A, Darby S, Gaughan L, Robson C, Mauri F, Waxman J, Sturge J. Survival Outcome and EMT Suppression Mediated by a Lectin Domain Interaction of Endo180 and CD147. *Mol Cancer Res*. 2015 Mar;13(3):538-47. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0344-T. Epub 2014 Nov 7. PMID: 25381222.
176. Peng F, Li H, You Q, Li H, Wu D, Jiang C, Deng G, Li Y, Li Y, Wu Y. CD147 as a Novel Prognostic Biomarker for Hepatocellular Carcinoma: A Meta-Analysis. *Biomed Res Int*. 2017;2017:5019367. doi: 10.1155/2017/5019367. Epub 2017 Mar 12. PMID: 28386553; PMCID: PMC5366185.
177. Landras A, Reger de Moura C, Jouenne F, Lebbe C, Menashi S, Mourah S. CD147 Is a Promising Target of Tumor Progression and a Prognostic Biomarker. *Cancers (Basel)*. 2019 Nov 16;11(11):1803. doi: 10.3390/cancers11111803. PMID: 31744072; PMCID: PMC6896083.
178. Hu X, Su J, Zhou Y, Xie X, Peng C, Yuan Z, Chen X. Repressing CD147 is a novel therapeutic strategy for malignant melanoma. *Oncotarget*. 2017 Apr 11;8(15):25806-25813. doi: 10.18632/oncotarget.15709. PMID: 28445958; PMCID: PMC5421970.

179. Grass GD, Toole BP. How, with whom and when: an overview of CD147-mediated regulatory networks influencing matrix metalloproteinase activity. *Biosci Rep*. 2015 Nov 24;36(1):e00283. doi: 10.1042/BSR20150256. PMID: 26604323; PMCID: PMC4718507.
180. Tang W, Chang SB, Hemler ME. Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1. *Mol Biol Cell*. 2004 Sep;15(9):4043-50. doi: 10.1091/mbc.e04-05-0402. Epub 2004 Jun 16. PMID: 15201341; PMCID: PMC515339.
181. Huang W, Luo WJ, Zhu P, Tang J, Yu XL, Cui HY, Wang B, Zhang Y, Jiang JL, Chen ZN. Modulation of CD147-induced matrix metalloproteinase activity: role of CD147 N-glycosylation. *Biochem J*. 2013 Jan 15;449(2):437-48. doi: 10.1042/BJ20120343. PMID: 23005037.
182. Sato M, Nakai Y, Nakata W, Yoshida T, Hatano K, Kawashima A, Fujita K, Uemura M, Takayama H, Nonomura N. EMMPRIN promotes angiogenesis, proliferation, invasion and resistance to sunitinib in renal cell carcinoma, and its level predicts patient outcome. *PLoS One*. 2013 Sep 20;8(9):e74313. doi: 10.1371/journal.pone.0074313. PMID: 24073208; PMCID: PMC3779201.
183. Han ZD, Bi XC, Qin WJ, He HC, Dai QS, Zou J, Ye YK, Liang YX, Zeng GH, Chen ZN, Zhong WD. CD147 expression indicates unfavourable prognosis in prostate cancer. *Pathol Oncol Res*. 2009 Sep;15(3):369-74. doi: 10.1007/s12253-008-9131-z. PMID: 19048397.
184. Veerman RE, Teeuwen L, Czarnewski P, Güclüler Akpınar G, Sandberg A, Cao X, Pernemalm M, Orre LM, Gabrielsson S, Eldh M. Molecular evaluation of five different isolation methods for extracellular vesicles reveals different clinical applicability and subcellular origin. *J Extracell Vesicles*. 2021 Jul;10(9):e12128. doi: 10.1002/jev2.12128. Epub 2021 Jul 22. PMID: 34322205; PMCID: PMC8298890.]
185. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018 Apr;19(4):213-228. doi: 10.1038/nrm.2017.125. Epub 2018 Jan 17. PMID: 29339798.
186. Palviainen M, Saari H, Kärkkäinen O, Pekkinen J, Auriola S, Yliperttula M, Puhka M, Hanhineva K, Siljander PR. Metabolic signature of extracellular vesicles depends on the cell culture conditions. *J Extracell Vesicles*. 2019 Apr 4;8(1):1596669. doi: 10.1080/20013078.2019.1596669. PMID: 31007875; PMCID: PMC6461113.
187. Reiner AT, Witwer KW, van Balkom BWM, de Beer J, Brodie C, Corteling RL, Gabrielsson S, Gimona M, Ibrahim AG, de Kleijn D, Lai CP, Lötvall J, Del Portillo HA, Reischl IG, Riazifar M, Salomon C, Tahara H, Toh WS, Wauben MHM, Yang VK, Yang Y, Yeo RWY, Yin H, Giebel B, Rohde E, Lim SK. Concise Review: Developing Best-Practice Models for the Therapeutic Use of Extracellular Vesicles. *Stem Cells Transl Med*. 2017

- Aug;6(8):1730-1739. doi: 10.1002/sctm.17-0055. Epub 2017 Jul 17. PMID: 28714557; PMCID: PMC5689784.
188. Clayton A, Court J, Navabi H, Adams M, Mason MD, Hobot JA, Newman GR, Jasani B. Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. *J Immunol Methods*. 2001 Jan 1;247(1-2):163-74. doi: 10.1016/s0022-1759(00)00321-5. PMID: 11150547.
189. Kim H, Shin S. ExoCAS-2: Rapid and Pure Isolation of Exosomes by Anionic Exchange Using Magnetic Beads. *Biomedicines*. 2021 Jan 2;9(1):28. doi: 10.3390/biomedicines9010028. PMID: 33401715; PMCID: PMC7824726.
190. Greening DW, Xu R, Ji H, Tauro BJ, Simpson RJ. A protocol for exosome isolation and characterization: evaluation of ultracentrifugation, density-gradient separation, and immunoaffinity capture methods. *Methods Mol Biol*. 2015;1295:179-209. doi: 10.1007/978-1-4939-2550-6_15. PMID: 25820723.
191. Théry C, Boussac M, Véron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, Amigorena S. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol*. 2001 Jun 15;166(12):7309-18. doi: 10.4049/jimmunol.166.12.7309. PMID: 11390481.
192. Ohtsu Y, Ohba R, Imamura Y, Kobayashi M, Hatori H, Zenkoh T, Hatakeyama M, Manabe T, Hino M, Yamaguchi Y, Kataoka K, Kawaguchi H, Watanabe H, Handa H. Selective ligand purification using high-performance affinity beads. *Anal Biochem*. 2005 Mar 15;338(2):245-52. doi: 10.1016/j.ab.2004.10.006. PMID: 15745744.
193. Guttenberg Z, Bausch A R, Bin Hu, Bruinsma R, Moroder L, and Sackmann E. Measuring Ligand–Receptor Unbinding Forces with Magnetic Beads: Molecular Leverage *Langmuir* 2000 July 28; 2000, 16, 23, 8984–8993. doi: <https://doi.org/10.1021/la000279x>
194. Wang C, Zhang D, Yang H, Shi L, Li L, Yu C, Wei J, Ding Q. A light-activated magnetic bead strategy utilized in spatio-temporal controllable exosomes isolation. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022 Sep 6;10:1006374. doi: 10.3389/fbioe.2022.1006374. PMID: 36147530; PMCID: PMC9486319.
195. Verhelst SH, Fonović M, Bogyo M. A mild chemically cleavable linker system for functional proteomic applications. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2007;46(8):1284-6. doi: 10.1002/anie.200603811. PMID: 17205587.
196. Moran IW, Sprachman MM, Bachman JL, Dahlhauser SD, Anslyn EV, Carter DJD. Capture and Release of Protein-Nanoparticle Conjugates by Reversible Covalent Molecular Linkers. *Bioconjug Chem*. 2020 Sep 16;31(9):2191-2200. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00372. Epub 2020 Aug 14. PMID: 32786373.

197. Modh H, Scheper T, Walter JG. Aptamer-Modified Magnetic Beads in Biosensing. *Sensors (Basel)*. 2018 Mar 30;18(4):1041. doi: 10.3390/s18041041. PMID: 29601533; PMCID: PMC5948603
198. Jiawei S, Zhi C, Kewei T, Xiaoping L. Magnetic bead-based adsorption strategy for exosome isolation. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022 Aug 16;10:942077. doi: 10.3389/fbioe.2022.942077. PMID: 36051582; PMCID: PMC9424818.
199. Sioud M. RNA interference: mechanisms, technical challenges, and therapeutic opportunities. *Methods Mol Biol*. 2015;1218:1-15. doi: 10.1007/978-1-4939-1538-5_1. PMID: 25319642.
200. Crescitelli R, Lässer C, Jang SC, Cvjetkovic A, Malmhäll C, Karimi N, Höög JL, Johansson I, Fuchs J, Thorsell A, Gho YS, Olofsson Bagge R, Lötvall J. Subpopulations of extracellular vesicles from human metastatic melanoma tissue identified by quantitative proteomics after optimized isolation. *J Extracell Vesicles*. 2020 Feb 11;9(1):1722433. doi: 10.1080/20013078.2020.1722433. PMID: 32128073; PMCID: PMC7034452.
201. Buscail E, Chauvet A, Quincy P, Degrandi O, Buscail C, Lamrissi I, Moranvillier I, Caumont C, Verdon S, Brisson A, Marty M, Chiche L, Laurent C, Vendrely V, Moreau-Gaudry F, Bedel A, Dabernat S. CD63-GPC1-Positive Exosomes Coupled with CA19-9 Offer Good Diagnostic Potential for Resectable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Transl Oncol*. 2019 Nov;12(11):1395-1403. doi: 10.1016/j.tranon.2019.07.009. Epub 2019 Aug 7. PMID: 31400579; PMCID: PMC6699195.
202. Pedersen KW, Kierulf B, Neurauter A. Specific and Generic Isolation of Extracellular Vesicles with Magnetic Beads. *Methods Mol Biol*. 2017;1660:65-87. doi: 10.1007/978-1-4939-7253-1_7. PMID: 28828649.
203. Kabe Y, Sakamoto S, Hatakeyama M, Yamaguchi Y, Suematsu M, Itonaga M, Handa H. Application of high-performance magnetic nanobeads to biological sensing devices. *Anal Bioanal Chem*. 2019 Mar;411(9):1825-1837. doi: 10.1007/s00216-018-1548-y. Epub 2019 Jan 9. PMID: 30627798; PMCID: PMC6453870.
204. Kricka LJ. Microchips, microarrays, biochips and nanochips: personal laboratories for the 21st century. *Clin Chim Acta*. 2001 May;307(1-2):219-23. doi: 10.1016/s0009-8981(01)00451-x. PMID: 11369361.
205. Raju D, Bathini S, Badilescu S, Ghosh A, Packirisamy M. Microfluidic Platforms for the Isolation and Detection of Exosomes: A Brief Review. *Micromachines (Basel)*. 2022 Apr 30;13(5):730. doi: 10.3390/mi13050730. PMID: 35630197; PMCID: PMC9147043.
206. Xiong H, Huang Z, Yang Z, Lin Q, Yang B, Fang X, Liu B, Chen H, Kong J. Recent Progress in Detection and Profiling of Cancer Cell-Derived Exosomes. *Small*. 2021

- Sep;17(35):e2007971. doi: 10.1002/sml.202007971. Epub 2021 Jun 2. PMID: 34075696.
207. Davydova A, Vorobyeva M. Aptamer-Based Biosensors for the Colorimetric Detection of Blood Biomarkers: Paving the Way to Clinical Laboratory Testing. *Biomedicines*. 2022 Jul 6;10(7):1606. doi: 10.3390/biomedicines10071606. PMID: 35884911; PMCID: PMC9313021.
208. Guzman NA, Guzman DE. A Two-Dimensional Affinity Capture and Separation Mini-Platform for the Isolation, Enrichment, and Quantification of Biomarkers and Its Potential Use for Liquid Biopsy. *Biomedicines*. 2020 Jul 30;8(8):255. doi: 10.3390/biomedicines8080255. PMID: 32751506; PMCID: PMC7459796.
209. Lv X, Geng Z, Su Y, Fan Z, Wang S, Fang W, Chen H. Label-Free Exosome Detection Based on a Low-Cost Plasmonic Biosensor Array Integrated with Microfluidics. *Langmuir*. 2019 Jul 30;35(30):9816-9824. doi: 10.1021/acs.langmuir.9b01237. Epub 2019 Jul 16. PMID: 31268344.
210. Martins TS, Vaz M, Henriques AG. A review on comparative studies addressing exosome isolation methods from body fluids. *Anal Bioanal Chem*. 2023 Mar;415(7):1239-1263. doi: 10.1007/s00216-022-04174-5. Epub 2022 Jul 15. PMID: 35838769.
211. Gattuso G, Crimi S, Lavoro A, Rizzo R, Musumarra G, Gallo S, Facciponte F, Paratore S, Russo A, Bordonaro R, Isola G, Bianchi A, Libra M, Falzone L. Liquid Biopsy and Circulating Biomarkers for the Diagnosis of Precancerous and Cancerous Oral Lesions. *Noncoding RNA*. 2022 Aug 10;8(4):60. doi: 10.3390/ncrna8040060. PMID: 36005828; PMCID: PMC9414906.
212. Bargahi N, Ghasemali S, Jahandar-Lashaki S, Nazari A. Recent advances for cancer detection and treatment by microfluidic technology, review and update. *Biol Proced Online*. 2022 Apr 28;24(1):5. doi: 10.1186/s12575-022-00166-y. PMID: 35484481; PMCID: PMC9052508.
213. Fang X, Wang Y, Wang S, Liu B. Nanomaterials assisted exosomes isolation and analysis towards liquid biopsy. *Mater Today Bio*. 2022 Jul 22;16:100371. doi: 10.1016/j.mtbio.2022.100371. PMID: 35937576; PMCID: PMC9352971.
214. Gheinani AH, Vögeli M, Baumgartner U, Vassella E, Draeger A, Burkhard FC, Monastyrskaya K. Improved isolation strategies to increase the yield and purity of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Sci Rep*. 2018 Mar 2;8(1):3945. doi: 10.1038/s41598-018-22142-x. PMID: 29500443; PMCID: PMC5834546.
215. Li M, Soder R, Abhyankar S, Abdelhakim H, Braun MW, Trinidad CV, Pathak HB, Pessetto Z, Deighan C, Ganguly S, Dawn B, McGuirk J, Dunavin N, Godwin AK. WJMSC-derived small extracellular vesicle enhance T cell suppression through PD-L1. *J Extracell*

- Vesicles. 2021 Feb;10(4):e12067. doi: 10.1002/jev2.12067. Epub 2021 Feb 8. PMID: 33598108; PMCID: PMC7869022.
216. Arab T, Mallick ER, Huang Y, Dong L, Liao Z, Zhao Z, Gololobova O, Smith B, Haughey NJ, Pienta KJ, Slusher BS, Tarwater PM, Tosar JP, Zivkovic AM, Vreeland WN, Paulaitis ME, Witwer KW. Characterization of extracellular vesicles and synthetic nanoparticles with four orthogonal single-particle analysis platforms. *J Extracell Vesicles*. 2021 Apr;10(6):e12079. doi: 10.1002/jev2.12079. Epub 2021 Apr 6. PMID: 33850608; PMCID: PMC8023330.
217. Tiwari S, Kumar V, Randhawa S, Verma SK. Preparation and characterization of extracellular vesicles. *Am J Reprod Immunol*. 2021 Feb;85(2):e13367. doi: 10.1111/aji.13367. Epub 2020 Nov 16. PMID: 33118232.
218. Lee KY, Seo Y, Im JH, Rhim J, Baek W, Kim S, Kwon JW, Yoo BC, Shin SH, Yoo H, Park JB, Gwak HS, Kim JH. Molecular Signature of Extracellular Vesicular Small Non-Coding RNAs Derived from Cerebrospinal Fluid of Leptomeningeal Metastasis Patients: Functional Implication of miR-21 and Other Small RNAs in Cancer Malignancy. *Cancers (Basel)*. 2021 Jan 8;13(2):209. doi: 10.3390/cancers13020209. PMID: 33430103; PMCID: PMC7828086.
219. Vella LJ, Scicluna BJ, Cheng L, Bawden EG, Masters CL, Ang CS, Williamson N, McLean C, Barnham KJ, Hill AF. A rigorous method to enrich for exosomes from brain tissue. *J Extracell Vesicles*. 2017 Jul 26;6(1):1348885. doi: 10.1080/20013078.2017.1348885. PMID: 28804598; PMCID: PMC5533148.
220. Witt, L. Etablierung eines Anreicherungsverfahrens von tumorassoziierten Exosomen aus Nierenzellkarzinomgeweben. Master's Thesis, Saarland University, Saarbrücken, Germany, 2018.
221. Kim A, Ng WB, Bernt W, Cho NJ. Validation of Size Estimation of Nanoparticle Tracking Analysis on Polydisperse Macromolecule Assembly. *Sci Rep*. 2019 Feb 25;9(1):2639. doi: 10.1038/s41598-019-38915-x. PMID: 30804441; PMCID: PMC6389903.
222. Graham Colm, Copyright Wikimedia Commons. [<https://www.ccber.ucsb.edu/ucsb-natural-history-collections-botanical-plant-anatomy/transmission-electron-microscope>] letztes Abrufdatum: 13.08.2023
223. Abcam plc.: Discovery Drive, Cambridge, Biomedical Campus, Cambridge, CB2 0AX, UK, +44 (0) 1223 696 000; abcam.com „Recombinant Anti-CD70 antibody [EPR26536-122] (ab300083)“ <https://www.abcam.com/products/primary-antibodies/cd70-antibody-epr26536-122-ab300083.html> ; letztes Abrufdatum: 20.06.2023

224. Cell Signaling Technology, Inc Danvers, Massachusetts, Vereinigte Staaten „CD70 (E3Q1A) Rabbit mAb #69209“ <https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/cd70-e3q1a-rabbit-mab/69209>; letztes Abrufdatum: 20.06.2023
225. Pich C, Teiti I, Sarrabayrouse G, Gallardo F, Gence R, Tilkin-Mariamé AF. Melanoma Expressed-CD70 Is Regulated by RhoA and MAPK Pathways without Affecting Vemurafenib Treatment Activity. *PLoS One*. 2016 Feb 1;11(2):e0148095. doi: 10.1371/journal.pone.0148095. PMID: 26828592; PMCID: PMC4734704.
226. Shiomi M, Matsuzaki S, Serada S, Matsuo K, Mizuta-Odani C, Jitsumori M, Nakae R, Matsuzaki S, Nakagawa S, Hiramatsu K, Miyoshi A, Kobayashi E, Kimura T, Ueda Y, Yoshino K, Naka T, Kimura T. CD70 antibody-drug conjugate: A potential novel therapeutic agent for ovarian cancer. *Cancer Sci*. 2021 Sep;112(9):3655-3668. doi: 10.1111/cas.15027. Epub 2021 Jul 8. PMID: 34117815; PMCID: PMC8409415.
227. Ryan MC, Kostner H, Gordon KA, Duniho S, Sutherland MK, Yu C, Kim KM, Nesterova A, Anderson M, McEarchern JA, Law CL, Smith LM. Targeting pancreatic and ovarian carcinomas using the auristatin-based anti-CD70 antibody-drug conjugate SGN-75. *Br J Cancer*. 2010 Aug 24;103(5):676-84. doi: 10.1038/sj.bjc.6605816. Epub 2010 Jul 27. PMID: 20664585; PMCID: PMC2938259.
228. Závada J, Zavadová Z, Pastorek J, Biesová Z, Jezek J, Velek J. Human tumour-associated cell adhesion protein MN/CA IX: identification of M75 epitope and of the region mediating cell adhesion. *Br J Cancer*. 2000 Jun;82(11):1808-13. doi: 10.1054/bjoc.2000.1111. PMID: 10839295; PMCID: PMC2363230.
229. Závada J, Zavadová Z, Zát'ovicová M, Hyršl L, Kawaciuk I. Soluble form of carbonic anhydrase IX (CA IX) in the serum and urine of renal carcinoma patients. *Br J Cancer*. 2003 Sep 15;89(6):1067-71. doi: 10.1038/sj.bjc.6601264. PMID: 12966427; PMCID: PMC2376963.
230. Georgantzoglou N, Pergaris A, Masaoutis C, Theocharis S. Extracellular Vesicles as Biomarkers Carriers in Bladder Cancer: Diagnosis, Surveillance, and Treatment. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 9;22(5):2744. doi: 10.3390/ijms22052744. PMID: 33803085; PMCID: PMC7963171.
231. Geng H, Zhou Q, Guo W, Lu L, Bi L, Wang Y, Min J, Yu D, Liang Z. Exosomes in bladder cancer: novel biomarkers and targets. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2021 May 15;22(5):341-347. doi: 10.1631/jzus.B2000711. PMID: 33973417; PMCID: PMC8110466.
232. Wen J, Yang T, Mallouk N, Zhang Y, Li H, Lambert C, Li G. Urinary Exosomal CA9 mRNA as a Novel Liquid Biopsy for Molecular Diagnosis of Bladder Cancer. *Int J Nanomedicine*. 2021 Jul 14;16:4805-4811. doi: 10.2147/IJN.S312322. PMID: 34285483; PMCID: PMC8286733.

233. Klatte T, Seligson DB, Rao JY, Yu H, de Martino M, Kawaoka K, Wong SG, Beldegrun AS, Pantuck AJ. Carbonic anhydrase IX in bladder cancer: a diagnostic, prognostic, and therapeutic molecular marker. *Cancer*. 2009 Apr 1;115(7):1448-58. doi: 10.1002/cncr.24163. PMID: 19195047.
234. de Martino M, Lucca I, Mbeutcha A, Wiener HG, Haitel A, Susani M, Shariat SF, Klatte T. Carbonic anhydrase IX as a diagnostic urinary marker for urothelial bladder cancer. *Eur Urol*. 2015 Oct;68(4):552-4. doi: 10.1016/j.eururo.2015.06.015. Epub 2015 Jun 30. PMID: 26138037.
235. Xue YJ, Lu Q, Sun ZX. CD147 overexpression is a prognostic factor and a potential therapeutic target in bladder cancer. *Med Oncol*. 2011 Dec;28(4):1363-72. doi: 10.1007/s12032-010-9582-4. Epub 2010 May 28. PMID: 20509007.
236. Spizzo G, Fong D, Wurm M, Ensinger C, Obrist P, Hofer C, Mazzoleni G, Gastl G, Went P. EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. *J Clin Pathol*. 2011 May;64(5):415-20. doi: 10.1136/jcp.2011.090274. Epub 2011 Mar 17. PMID: 21415054; PMCID: PMC3088404.
237. Massoner P, Thomm T, Mack B, Untergasser G, Martowicz A, Bobowski K, Klocker H, Gires O, Puhr M. EpCAM is overexpressed in local and metastatic prostate cancer, suppressed by chemotherapy and modulated by MET-associated miRNA-200c/205. *Br J Cancer*. 2014 Aug 26;111(5):955-64. doi: 10.1038/bjc.2014.366. Epub 2014 Jul 3. PMID: 24992580; PMCID: PMC4150273.
238. de Wit S, Manicone M, Rossi E, Lampignano R, Yang L, Zill B, Rengel-Puertas A, Ouhlen M, Crespo M, Berghuis AMS, Andree KC, Vidotto R, Trapp EK, Tzschaschel M, Colomba E, Fowler G, Flohr P, Rescigno P, Fontes MS, Zamarchi R, Fehm T, Neubauer H, Rack B, Alunni-Fabbroni M, Farace F, De Bono J, IJzerman MJ, Terstappen LWMM. EpCAM high and EpCAM low circulating tumor cells in metastatic prostate and breast cancer patients. *Oncotarget*. 2018 Nov 2;9(86):35705-35716. doi: 10.18632/oncotarget.26298. PMID: 30479699; PMCID: PMC6235023
239. Bryan RT, Regan HL, Pirrie SJ, Devall AJ, Cheng KK, Zeegers MP, James ND, Knowles MA, Ward DG. Protein shedding in urothelial bladder cancer: prognostic implications of soluble urinary EGFR and EpCAM. *Br J Cancer*. 2015 Mar 17;112(6):1052-8. doi: 10.1038/bjc.2015.21. PMID: 25719831; PMCID: PMC4366887.
240. Bryan RT, Shimwell NJ, Wei W, Devall AJ, Pirrie SJ, James ND, Zeegers MP, Cheng KK, Martin A, Ward DG. Urinary EpCAM in urothelial bladder cancer patients: characterisation and evaluation of biomarker potential. *Br J Cancer*. 2014 Feb 4;110(3):679-85. doi: 10.1038/bjc.2013.744. Epub 2013 Nov 28. PMID: 24292452; PMCID: PMC3915119.

241. Dar GH, Mendes CC, Kuan WL, Speciale AA, Conceição M, Görgens A, Uliyakina I, Lobo MJ, Lim WF, El Andaloussi S, Mäger I, Roberts TC, Barker RA, Goberdhan DCI, Wilson C, Wood MJA. GAPDH controls extracellular vesicle biogenesis and enhances the therapeutic potential of EV mediated siRNA delivery to the brain. *Nat Commun.* 2021 Nov 18;12(1):6666. doi: 10.1038/s41467-021-27056-3. Erratum in: *Nat Commun.* 2021 Dec 16;12(1):7357. PMID: 34795295; PMCID: PMC8602309.
242. Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci.* 2018 Jan;75(2):193-208. doi: 10.1007/s00018-017-2595-9. Epub 2017 Jul 21. PMID: 28733901; PMCID: PMC5756260.
243. Jadli AS, Ballasy N, Edalat P, Patel VB. Inside(sight) of tiny communicator: exosome biogenesis, secretion, and uptake. *Mol Cell Biochem.* 2020 Apr;467(1-2):77-94. doi: 10.1007/s11010-020-03703-z. Epub 2020 Feb 22. PMID: 32088833.
244. Shephard AP, Yeung V, Clayton A, Webber JP. Prostate cancer exosomes as modulators of the tumor microenvironment. *J Cancer Metastasis Treat* 2017;3:288-301. <http://dx.doi.org/10.20517/2394-4722.2017.32>
245. Pan J, Ding M, Xu K, Yang C, Mao LJ. Exosomes in diagnosis and therapy of prostate cancer. *Oncotarget.* 2017 Jun 17;8(57):97693-97700. doi: 10.18632/oncotarget.18532. PMID: 29228644; PMCID: PMC5722596.
246. Mizutani K, Terazawa R, Kameyama K, Kato T, Horie K, Tsuchiya T, Seike K, Ehara H, Fujita Y, Kawakami K, Ito M, Deguchi T. Isolation of prostate cancer-related exosomes. *Anticancer Res.* 2014 Jul;34(7):3419-23. PMID: 24982349.
247. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, Moita CF, Schauer K, Hume AN, Freitas RP, Goud B, Benaroch P, Hacohe N, Fukuda M, Desnos C, Seabra MC, Darchen F, Amigorena S, Moita LF, Thery C. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol.* 2010 Jan;12(1):19-30; sup pp 1-13. doi: 10.1038/ncb2000. Epub 2009 Dec 6. PMID: 19966785.
248. Hsu C, Morohashi Y, Yoshimura S, Manrique-Hoyos N, Jung S, Lauterbach MA, Bakhti M, Grønborg M, Möbius W, Rhee J, Barr FA, Simons M. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J Cell Biol.* 2010 Apr 19;189(2):223-32. doi: 10.1083/jcb.200911018. PMID: 20404108; PMCID: PMC2856897.
249. Savina A, Furlán M, Vidal M, Colombo MI. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem.* 2003 May 30;278(22):20083-90. doi: 10.1074/jbc.M301642200. Epub 2003 Mar 14. PMID: 12639953.
250. Parolini I, Federici C, Raggi C, Lugini L, Palleschi S, De Milito A, Coscia C, Iessi E, Logozzi M, Molinari A, Colone M, Tatti M, Sargiacomo M, Fais S. Microenvironmental pH

- is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem*. 2009 Dec 4;284(49):34211-22. doi: 10.1074/jbc.M109.041152. Epub 2009 Sep 30. PMID: 19801663; PMCID: PMC2797191.
251. Logozzi M, Spugnini E, Mizzoni D, Di Raimo R, Fais S. Extracellular acidity and increased exosome release as key phenotypes of malignant tumors. *Cancer Metastasis Rev*. 2019 Jun;38(1-2):93-101. doi: 10.1007/s10555-019-09783-8. PMID: 30715644.
252. Aoki M, Koga K, Miyazaki M, Hamasaki M, Koshikawa N, Oyama M, Kozuka-Hata H, Seiki M, Toole BP, Nabeshima K. CD73 complexes with emmprin to regulate MMP-2 production from co-cultured sarcoma cells and fibroblasts. *BMC Cancer*. 2019 Sep 12;19(1):912. doi: 10.1186/s12885-019-6127-x. PMID: 31510956; PMCID: PMC6739984.
253. Peng F, Li H, Ning Z, Yang Z, Li H, Wang Y, Chen F, Wu Y. CD147 and Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016 Sep 29;11(9):e0163678. doi: 10.1371/journal.pone.0163678. PMID: 27684938; PMCID: PMC5042541.
254. Mukherjee S, Richardson AM, Rodriguez-Canales J, Ylaya K, Erickson HS, Player A, Kawasaki ES, Pinto PA, Choyke PL, Merino MJ, Albert PS, Chuaqui RF, Emmert-Buck MR. Identification of EpCAM as a molecular target of prostate cancer stroma. *Am J Pathol*. 2009 Dec;175(6):2277-87. doi: 10.2353/ajpath.2009.090013. Epub 2009 Oct 22. PMID: 19850885; PMCID: PMC2789605.
255. Yang L, Wang Q, Zhao Q, Yang F, Liu T, Huang X, Yan Q, Yang X. Deglycosylated EpCAM regulates proliferation by enhancing autophagy of breast cancer cells via PI3K/Akt/mTOR pathway. *Aging (Albany NY)*. 2022 Jan 4;14(1):316-329. doi: 10.18632/aging.203795. Epub 2022 Jan 4. PMID: 34983878; PMCID: PMC8791205.
256. Fiaschi T, Giannoni E, Taddei ML, Cirri P, Marini A, Pintus G, Nativi C, Richichi B, Scozzafava A, Carta F, Torre E, Supuran CT, Chiarugi P. Carbonic anhydrase IX from cancer-associated fibroblasts drives epithelial-mesenchymal transition in prostate carcinoma cells. *Cell Cycle*. 2013 Jun 1;12(11):1791-801. doi: 10.4161/cc.24902. Epub 2013 May 8. PMID: 23656776; PMCID: PMC3713137.
257. Wang YT, Shi T, Srivastava S, Kagan J, Liu T, Rodland KD. Proteomic Analysis of Exosomes for Discovery of Protein Biomarkers for Prostate and Bladder Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020 Aug 19;12(9):2335. doi: 10.3390/cancers12092335. PMID: 32825017; PMCID: PMC7564640.
258. Polo A, Marchese S, De Petro G, Montella M, Ciliberto G, Budillon A, Costantini S. Identifying a panel of genes/proteins/miRNAs modulated by arsenicals in bladder, prostate, kidney cancers. *Sci Rep*. 2018 Jul 10;8(1):10395. doi: 10.1038/s41598-018-28739-6. PMID: 29991691; PMCID: PMC6039466.

259. Zhou Y, Lih TM, Pan J, Höti N, Dong M, Cao L, Hu Y, Cho KC, Chen SY, Egeuz RV, Gabrielson E, Chan DW, Zhang H, Li QK. Proteomic signatures of 16 major types of human cancer reveal universal and cancer-type-specific proteins for the identification of potential therapeutic targets. *J Hematol Oncol.* 2020 Dec 7;13(1):170. doi: 10.1186/s13045-020-01013-x. PMID: 33287876; PMCID: PMC7720039.
260. Chen F, Zhang Y, Bossé D, Lalani AA, Hakimi AA, Hsieh JJ, Choueiri TK, Gibbons DL, Ittmann M, Creighton CJ. Pan-urolologic cancer genomic subtypes that transcend tissue of origin. *Nat Commun.* 2017 Aug 4;8(1):199. doi: 10.1038/s41467-017-00289-x. PMID: 28775315; PMCID: PMC5543131.
261. Zhao L, Ma X, Yu J. Exosomes and organ-specific metastasis. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2021 Jun 4;22:133-147. doi: 10.1016/j.omtm.2021.05.016. PMID: 34485600; PMCID: PMC8397835.
262. Logozzi M, Angelini DF, Giuliani A, Mizzoni D, Di Raimo R, Maggi M, Gentilucci A, Marzio V, Salciccia S, Borsellino G, Battistini L, Sciarra A, Fais S. Increased Plasmatic Levels of PSA-Expressing Exosomes Distinguish Prostate Cancer Patients from Benign Prostatic Hyperplasia: A Prospective Study. *Cancers (Basel).* 2019 Sep 27;11(10):1449. doi: 10.3390/cancers11101449. PMID: 31569672; PMCID: PMC6826376.
263. Song Q, Yu H, Han J, Lv J, Lv Q, Yang H. Exosomes in urological diseases - Biological functions and clinical applications. *Cancer Lett.* 2022 Sep 28;544:215809. doi: 10.1016/j.canlet.2022.215809. Epub 2022 Jun 28. PMID: 35777716.
264. Rezaeian, A., Esmaeili Tarki, F., Karimi Taheri, K. Exosomes and Urological Cancers. *Translational Research in Urology*, 2022; 4(3): 112-119. doi: 10.22034/tru.2022.357141.1124
265. Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, Higginbotham JN, Zhang Q, Zimmerman LJ, Liebler DC, Ping J, Liu Q, Evans R, Fissell WH, Patton JG, Rome LH, Burnette DT, Coffey RJ. Reassessment of Exosome Composition. *Cell.* 2019 Apr 4;177(2):428-445.e18. doi: 10.1016/j.cell.2019.02.029. PMID: 30951670; PMCID: PMC6664447.
266. Taylor PM, Woodfield RJ, Hodgkin MN, Pettitt TR, Martin A, Kerr DJ, Wakelam MJ. Breast cancer cell-derived EMMPRIN stimulates fibroblast MMP2 release through a phospholipase A(2) and 5-lipoxygenase catalyzed pathway. *Oncogene.* 2002 Aug 22;21(37):5765-72. doi: 10.1038/sj.onc.1205702. PMID: 12173047.
267. Millimaggi D, Mari M, D'Ascenzo S, Carosa E, Jannini EA, Zucker S, Carta G, Pavan A, Dolo V. Tumor vesicle-associated CD147 modulates the angiogenic capability of endothelial cells. *Neoplasia.* 2007 Apr;9(4):349-57. doi: 10.1593/neo.07133. PMID: 17460779; PMCID: PMC1854851.

268. Sidhu SS, Mengistab AT, Tauscher AN, LaVail J, Basbaum C. The microvesicle as a vehicle for EMMPRIN in tumor-stromal interactions. *Oncogene*. 2004 Jan 29;23(4):956-63. doi: 10.1038/sj.onc.1207070. PMID: 14749763.
269. Lucchetti D, Colella F, Perelli L, Ricciardi-Tenore C, Calapà F, Fiori ME, Carbone F, De Maria R, Sgambato A. CD147 Promotes Cell Small Extracellular Vesicles Release during Colon Cancer Stem Cells Differentiation and Triggers Cellular Changes in Recipient Cells. *Cancers (Basel)*. 2020 Jan 21;12(2):260. doi: 10.3390/cancers12020260. PMID: 31973205; PMCID: PMC7072373.
270. Aoki M, Koga K, Hamasaki M, Egawa N, Nabeshima K. Emmprin, released as a microvesicle in epithelioid sarcoma, interacts with fibroblasts. *Int J Oncol*. 2017 Jun;50(6):2229-2235. doi: 10.3892/ijo.2017.3986. Epub 2017 May 8. PMID: 28498412.
271. Bak SP, Barnkob MS, Bai A, Higham EM, Wittrup KD, Chen J. Differential requirement for CD70 and CD80/CD86 in dendritic cell-mediated activation of tumor-tolerized CD8 T cells. *J Immunol*. 2012 Aug 15;189(4):1708-16. doi: 10.4049/jimmunol.1201271. Epub 2012 Jul 13. PMID: 22798683; PMCID: PMC4060810.
272. Bernstein MB, Garnett CT, Zhang H, Velcich A, Wattenberg MM, Gameiro SR, Kalnicki S, Hodge JW, Guha C. Radiation-induced modulation of costimulatory and coinhibitory T-cell signaling molecules on human prostate carcinoma cells promotes productive antitumor immune interactions. *Cancer Biother Radiopharm*. 2014 May;29(4):153-61. doi: 10.1089/cbr.2013.1578. Epub 2014 Apr 2. PMID: 24693958; PMCID: PMC4024843.
273. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000125726-CD70>; letzter Aufruf: 13.08.2023
274. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000125726-CD70/structure>; letzter Aufruf: 13.08.2023
275. Masuda N, Ogawa O, Park M, Liu AY, Goodison S, Dai Y, Kozai L, Furuya H, Lotan Y, Rosser CJ, Kobayashi T. Meta-analysis of a 10-plex urine-based biomarker assay for the detection of bladder cancer. *Oncotarget*. 2018 Jan 3;9(6):7101-7111. doi: 10.18632/oncotarget.23872. PMID: 29467953; PMCID: PMC5805539.
276. Li G, Mallouk N, Flandrin P, Garcin A, Lambert C, Berremila SA, Habchi H, Mottet N. Presence of Urinary Exosomes for Liquid Biopsy of Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Protocol for a Pilot Feasibility Study. *JMIR Res Protoc*. 2021 Jul 20;10(7):e24423. doi: 10.2196/24423. PMID: 34283029; PMCID: PMC8335600.
277. Zieren RC, Dong L, Pierorazio PM, Pienta KJ, de Reijke TM, Amend SR. Extracellular vesicle isolation from human renal cancer tissue. *Med Oncol*. 2020 Mar 14;37(4):28. doi: 10.1007/s12032-020-1346-1. PMID: 32172294.
278. Himbert D, Zeuschner P, Ayoubian H, Heinzelmann J, Stöckle M, Junker K. Characterization of CD147, CA9, and CD70 as Tumor-Specific Markers on Extracellular

- Vesicles in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Diagnostics* (Basel). 2020 Dec 2;10(12):1034. doi: 10.3390/diagnostics10121034. PMID: 33276608; PMCID: PMC7761541.
279. Li J, He X, Deng Y, Yang C. An Update on Isolation Methods for Proteomic Studies of Extracellular Vesicles in Biofluids. *Molecules*. 2019 Sep 27;24(19):3516. doi: 10.3390/molecules24193516. PMID: 31569778; PMCID: PMC6803898.
280. Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics*. 2017 Jan 26;7(3):789-804. doi: 10.7150/thno.18133. PMID: 28255367; PMCID: PMC5327650.
281. Tai YL, Chen KC, Hsieh JT, Shen TL. Exosomes in cancer development and clinical applications. *Cancer Sci*. 2018 Aug;109(8):2364-2374. doi: 10.1111/cas.13697. Epub 2018 Jul 13. PMID: 29908100; PMCID: PMC6113508.
282. Trzpis M, Popa ER, McLaughlin PM, van Goor H, Timmer A, Bosman GW, de Leij LM, Harmsen MC. Spatial and temporal expression patterns of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM/EGP-2) in developing and adult kidneys. *Nephron Exp Nephrol*. 2007;107(4):e119-31. doi: 10.1159/000111039. Epub 2007 Nov 15. PMID: 18025791.
283. Gires O. EGFR-Dependent Regulated Intramembrane Proteolysis of EpCAM-Letter. *Cancer Res*. 2017 Apr 1;77(7):1775-1776. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2456. Epub 2017 Mar 22. PMID: 28330930.
284. Wu CJ, Feng X, Lu M, Morimura S, Udey MC. Matriptase-mediated cleavage of EpCAM destabilizes claudins and dysregulates intestinal epithelial homeostasis. *J Clin Invest*. 2017 Feb 1;127(2):623-634. doi: 10.1172/JCI88428. Epub 2017 Jan 17. PMID: 28094766; PMCID: PMC5272188.
285. Denzel S, Maetzel D, Mack B, Eggert C, Bähr G, Gires O. Initial activation of EpCAM cleavage via cell-to-cell contact. *BMC Cancer*. 2009 Nov 19;9:402. doi: 10.1186/1471-2407-9-402. PMID: 19925656; PMCID: PMC2784796.
286. Seligson DB, Pantuck AJ, Liu X, Huang Y, Horvath S, Bui MH, Han KR, Correa AJ, Eeva M, Tze S, Belldegrun AS, Figlin RA. Epithelial cell adhesion molecule (KSA) expression: pathobiology and its role as an independent predictor of survival in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004 Apr 15;10(8):2659-69. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-1132-03. PMID: 15102668.
287. Iacono KT, Brown AL, Greene MI, Saouaf SJ. CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology. *Exp Mol Pathol*. 2007 Dec;83(3):283-95. doi: 10.1016/j.yexmp.2007.08.014. Epub 2007 Sep 7. PMID: 17945211; PMCID: PMC2211739.

288. Tsai WC, Chao YC, Lee WH, Chen A, Sheu LF, Jin JS. Increasing EMMPRIN and matriptase expression in hepatocellular carcinoma: tissue microarray analysis of immunohistochemical scores with clinicopathological parameters. *Histopathology*. 2006 Oct;49(4):388-95. doi: 10.1111/j.1365-2559.2006.02516.x. PMID: 16978202.
289. Tsai WC, Sheu LF, Nieh S, Yu CP, Sun GH, Lin YF, Chen A, Jin JS. Association of EMMPRIN and fascin expression in renal cell carcinoma: correlation with clinicopathological parameters. *World J Urol*. 2007 Mar;25(1):73-80. doi: 10.1007/s00345-006-0110-2. Epub 2006 Sep 23. PMID: 17021824.
290. Du ZM, Hu CF, Shao Q, Huang MY, Kou CW, Zhu XF, Zeng YX, Shao JY. Upregulation of caveolin-1 and CD147 expression in nasopharyngeal carcinoma enhanced tumor cell migration and correlated with poor prognosis of the patients. *Int J Cancer*. 2009 Oct 15;125(8):1832-41. doi: 10.1002/ijc.24531. PMID: 19582878.
291. Pértiga-Gomes N, Vizcaíno JR, Miranda-Gonçalves V, Pinheiro C, Silva J, Pereira H, Monteiro P, Henrique RM, Reis RM, Lopes C, Baltazar F. Monocarboxylate transporter 4 (MCT4) and CD147 overexpression is associated with poor prognosis in prostate cancer. *BMC Cancer*. 2011 Jul 25;11:312. doi: 10.1186/1471-2407-11-312. PMID: 21787388; PMCID: PMC3157459.
292. Qu X, Wang C, Zhang J, Qie G, Zhou J. The roles of CD147 and/or cyclophilin A in kidney diseases. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:728673. doi: 10.1155/2014/728673. Epub 2014 Dec 17. PMID: 25580061; PMCID: PMC4281390.
293. Fisel P, Stühler V, Bedke J, Winter S, Rausch S, Hennenlotter J, Nies AT, Stenzl A, Scharpf M, Fend F, Kruck S, Schwab M, Schaeffeler E. MCT4 surpasses the prognostic relevance of the ancillary protein CD147 in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2015 Oct 13;6(31):30615-27. doi: 10.18632/oncotarget.5593. PMID: 26384346; PMCID: PMC4741556.
294. Han ZD, He HC, Bi XC, Qin WJ, Dai QS, Zou J, Ye YK, Liang YX, Zeng GH, Zhu G, Chen ZN, Zhong WD. Expression and clinical significance of CD147 in genitourinary carcinomas. *J Surg Res*. 2010 May 15;160(2):260-7. doi: 10.1016/j.jss.2008.11.838. Epub 2008 Dec 10. PMID: 19286191.
295. Baniak N, Flood TA, Buchanan M, Dal Cin P, Hirsch MS. Carbonic anhydrase IX (CA9) expression in multiple renal epithelial tumour subtypes. *Histopathology*. 2020 Oct;77(4):659-666. doi: 10.1111/his.14204. Epub 2020 Sep 12. PMID: 32639054.
296. Tostain J, Li G, Gentil-Perret A, Gigante M. Carbonic anhydrase 9 in clear cell renal cell carcinoma: a marker for diagnosis, prognosis and treatment. *Eur J Cancer*. 2010 Dec;46(18):3141-8. doi: 10.1016/j.ejca.2010.07.020. Epub 2010 Aug 13. PMID: 20709527.

297. Soyupak B, Erdoğan S, Ergin M, Seydaoğlu G, Kuzgunbay B, Tansuğ Z. CA9 expression as a prognostic factor in renal clear cell carcinoma. *Urol Int.* 2005;74(1):68-73. doi: 10.1159/000082713. PMID: 15711113.
298. Stillebroer AB, Mulders PF, Boerman OC, Oyen WJ, Oosterwijk E. Carbonic anhydrase IX in renal cell carcinoma: implications for prognosis, diagnosis, and therapy. *Eur Urol.* 2010 Jul;58(1):75-83. doi: 10.1016/j.eururo.2010.03.015. Epub 2010 Mar 23. PMID: 20359812.
299. Jilaveanu LB, Sznol J, Aziz SA, Duchon D, Kluger HM, Camp RL. CD70 expression patterns in renal cell carcinoma. *Hum Pathol.* 2012 Sep;43(9):1394-9. doi: 10.1016/j.humpath.2011.10.014. Epub 2012 Mar 7. PMID: 22401771; PMCID: PMC3374042.
300. Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci.* 2002 Jan;27(1):19-26. doi: 10.1016/s0968-0004(01)01995-8. PMID: 11796220.
301. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001 Feb 23;104(4):487-501. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00237-9. PMID: 11239407.
302. Tesselaar K, Xiao Y, Arens R, van Schijndel GM, Schuurhuis DH, Mebius RE, Borst J, van Lier RA. Expression of the murine CD27 ligand CD70 in vitro and in vivo. *J Immunol.* 2003 Jan 1;170(1):33-40. doi: 10.4049/jimmunol.170.1.33. PMID: 12496380.
303. Bahmani L, Ullah M. Different Sourced Extracellular Vesicles and Their Potential Applications in Clinical Treatments. *Cells.* 2022 Jun 21;11(13):1989. doi: 10.3390/cells11131989. PMID: 35805074; PMCID: PMC9265969.
304. Huang MB, Xia M, Gao Z, Zhou H, Liu M, Huang S, Zhen R, Wu JY, Roth WW, Bond VC, Xiao J, Leng J. Characterization of Exosomes in Plasma of Patients with Breast, Ovarian, Prostate, Hepatic, Gastric, Colon, and Pancreatic Cancers. *J Cancer Ther.* 2019 May;10(5):382-399. doi: 10.4236/jct.2019.105032. Epub 2019 May 29. PMID: 33833900; PMCID: PMC8025783.
305. Jarad G, Miner JH. Update on the glomerular filtration barrier. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2009 May;18(3):226-32. doi: 10.1097/mnh.0b013e3283296044. PMID: 19374010; PMCID: PMC2895306.
306. Wiwanitkit V. Glomerular pore size corresponding to albumin molecular size, an explanation for underlying structural pathology leading to albuminuria at nanolevel. *Ren Fail.* 2006;28(1):101. doi: 10.1080/08860220500461344. PMID: 16526328.
307. Micanovic R, LaFavers K, Garimella PS, Wu XR, El-Achkar TM. Uromodulin [Tamm-Horsfall protein]: guardian of urinary and systemic homeostasis. *Nephrol Dial Transplant.*

- 2020 Jan 1;35(1):33-43. doi: 10.1093/ndt/gfy394. PMID: 30649494; PMCID: PMC8205501.
308. Hortin GL, Sviridov D. Diagnostic potential for urinary proteomics. *Pharmacogenomics*. 2007 Mar;8(3):237-55. doi: 10.2217/14622416.8.3.237. PMID: 17324112.
309. Sheridan C. Exosome cancer diagnostic reaches market. *Nat Biotechnol*. 2016 Apr;34(4):359-60. doi: 10.1038/nbt0416-359. PMID: 27054974.
310. Ota K, Ota Z, Shikata K, Makino H. The ultrastructural disruption of the glomerular basement membrane in diabetic nephropathy revealed by "tissue negative staining method". *J Diabetes Complications*. 1995 Oct-Dec;9(4):285-7. doi: 10.1016/1056-8727(95)80023-8. PMID: 8573748.
311. Erozenci LA, Böttger F, Bijnsdorp IV, Jimenez CR. Urinary exosomal proteins as (pan-)cancer biomarkers: insights from the proteome. *FEBS Lett*. 2019 Jul;593(13):1580-1597. doi: 10.1002/1873-3468.13487. PMID: 31198995.
312. Miranda KC, Bond DT, McKee M, Skog J, Păunescu TG, Da Silva N, Brown D, Russo LM. Nucleic acids within urinary exosomes/microvesicles are potential biomarkers for renal disease. *Kidney Int*. 2010 Jul;78(2):191-9. doi: 10.1038/ki.2010.106. Epub 2010 Apr 28. PMID: 20428099; PMCID: PMC4451567.
313. Hogan MC, Manganelli L, Woollard JR, Masyuk AI, Masyuk TV, Tammachote R, Huang BQ, Leontovich AA, Beito TG, Madden BJ, Charlesworth MC, Torres VE, LaRusso NF, Harris PC, Ward CJ. Characterization of PKD protein-positive exosome-like vesicles. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Feb;20(2):278-88. doi: 10.1681/ASN.2008060564. Epub 2009 Jan 21. PMID: 19158352; PMCID: PMC2637052.
314. Kwon SH, Woollard JR, Saad A, Garovic VD, Zand L, Jordan KL, Textor SC, Lerman LO. Elevated urinary podocyte-derived extracellular microvesicles in renovascular hypertensive patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2017 May 1;32(5):800-807. doi: 10.1093/ndt/gfw077. PMID: 27190371; PMCID: PMC5837786.
315. Ichii O, Otsuka-Kanazawa S, Horino T, Kimura J, Nakamura T, Matsumoto M, Toi M, Kon Y. Decreased miR-26a expression correlates with the progression of podocyte injury in autoimmune glomerulonephritis. *PLoS One*. 2014 Oct 17;9(10):e110383. doi: 10.1371/journal.pone.0110383. PMID: 25329154; PMCID: PMC4201534.
316. Kwon SH, Tang H, Saad A, Woollard JR, Lerman A, Textor SC, Lerman LO. Differential Expression of microRNAs in Urinary Extracellular Vesicles Obtained From Hypertensive Patients. *Am J Kidney Dis*. 2016 Aug;68(2):331-332. doi: 10.1053/j.ajkd.2016.01.027. Epub 2016 Mar 16. PMID: 26994684; PMCID: PMC5124492.

317. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013 Feb 18;200(4):373-83. doi: 10.1083/jcb.201211138. PMID: 23420871; PMCID: PMC3575529.
318. Kalra H, Adda CG, Liem M, Ang CS, Mechler A, Simpson RJ, Hulett MD, Mathivanan S. Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma. *Proteomics.* 2013 Nov;13(22):3354-64. doi: 10.1002/pmic.201300282. Epub 2013 Oct 18. PMID: 24115447.
319. Tutanov O, Shtam T, Grigor'eva A, Tupikin A, Tsentalovich Y, Tamkovich S. Blood Plasma Exosomes Contain Circulating DNA in Their Crown. *Diagnostics (Basel).* 2022 Mar 30;12(4):854. doi: 10.3390/diagnostics12040854. PMID: 35453902; PMCID: PMC9027845.
320. Lobb RJ, Becker M, Wen SW, Wong CS, Wiegmanns AP, Leimgruber A, Möller A. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J Extracell Vesicles.* 2015 Jul 17;4:27031. doi: 10.3402/jev.v4.27031. PMID: 26194179; PMCID: PMC4507751
321. Baranyai T, Herczeg K, Onódi Z, Voszka I, Módos K, Marton N, Nagy G, Mäger I, Wood MJ, El Andaloussi S, Pálincás Z, Kumar V, Nagy P, Kittel Á, Buzás EI, Ferdinandy P, Giricz Z. Isolation of Exosomes from Blood Plasma: Qualitative and Quantitative Comparison of Ultracentrifugation and Size Exclusion Chromatography Methods. *PLoS One.* 2015 Dec 21;10(12):e0145686. doi: 10.1371/journal.pone.0145686. PMID: 26690353; PMCID: PMC4686892.
322. An M, Wu J, Zhu J, Lubman DM. Comparison of an Optimized Ultracentrifugation Method versus Size-Exclusion Chromatography for Isolation of Exosomes from Human Serum. *J Proteome Res.* 2018 Oct 5;17(10):3599-3605. doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00479. Epub 2018 Sep 19. PMID: 30192545; PMCID: PMC6292670.
323. Pietrowska M, Wlosowicz A, Gawin M, Widlak P. MS-Based Proteomic Analysis of Serum and Plasma: Problem of High Abundant Components and Lights and Shadows of Albumin Removal. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1073:57-76. doi: 10.1007/978-3-030-12298-0_3. PMID: 31236839.
324. Kelley MR, Emanuele MA, Tentler J, Emanuele NV. Cross-reaction of albumin with polyclonal LH antibody on western blots. *Endocr Res.* 1990;16(4):477-91. doi: 10.1080/07435809009107119. PMID: 2102467.
325. Dean WL, Lee MJ, Cummins TD, Schultz DJ, Powell DW. Proteomic and functional characterisation of platelet microparticle size classes. *Thromb Haemost.* 2009 Oct;102(4):711-8. doi: 10.1160/TH09-04-243. PMID: 19806257; PMCID: PMC2861410.

326. Xu R, Greening DW, Zhu HJ, Takahashi N, Simpson RJ. Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application. *J Clin Invest*. 2016 Apr 1;126(4):1152-62. doi: 10.1172/JCI81129. Epub 2016 Apr 1. PMID: 27035807; PMCID: PMC4811150.
327. Hartjes TA, Mytnyk S, Jenster GW, van Steijn V, van Royen ME. Extracellular Vesicle Quantification and Characterization: Common Methods and Emerging Approaches. *Bioengineering (Basel)*. 2019 Jan 16;6(1):7. doi: 10.3390/bioengineering6010007. PMID: 30654439; PMCID: PMC6466085.
328. Kwon, Y., Park, J. Methods to analyze extracellular vesicles at single particle level. *Micro and Nano Syst Lett* 10, 14 (2022). <https://doi.org/10.1186/s40486-022-00156-5>
329. Holcar M, Kandušer M, Lenassi M. Blood Nanoparticles - Influence on Extracellular Vesicle Isolation and Characterization. *Front Pharmacol*. 2021 Nov 10;12:773844. doi: 10.3389/fphar.2021.773844. PMID: 34867406; PMCID: PMC8635996.
330. Lafleur MA, Xu D, Hemler ME. Tetraspanin proteins regulate membrane type-1 matrix metalloproteinase-dependent pericellular proteolysis. *Mol Biol Cell*. 2009 Apr;20(7):2030-40. doi: 10.1091/mbc.e08-11-1149. Epub 2009 Feb 11. PMID: 19211836; PMCID: PMC2663921.
331. Tian Y, Ma L, Gong M, Su G, Zhu S, Zhang W, Wang S, Li Z, Chen C, Li L, Wu L, Yan X. Protein Profiling and Sizing of Extracellular Vesicles from Colorectal Cancer Patients via Flow Cytometry. *ACS Nano*. 2018 Jan 23;12(1):671-680. doi: 10.1021/acsnano.7b07782. Epub 2018 Jan 8. PMID: 29300458.
332. Marimpietri D, Petretto A, Raffaghello L, Pezzolo A, Gagliani C, Tacchetti C, Mauri P, Melioli G, Pistoia V. Proteome profiling of neuroblastoma-derived exosomes reveal the expression of proteins potentially involved in tumor progression. *PLoS One*. 2013 Sep 19;8(9):e75054. doi: 10.1371/journal.pone.0075054. PMID: 24069378; PMCID: PMC3777909.
333. Jørgensen M, Bæk R, Pedersen S, Søndergaard EK, Kristensen SR, Varming K. Extracellular Vesicle (EV) Array: microarray capturing of exosomes and other extracellular vesicles for multiplexed phenotyping. *J Extracell Vesicles*. 2013 Jun 18;2. doi: 10.3402/jev.v2i0.20920. PMID: 24009888; PMCID: PMC3760630.
334. Karimi N, Dalirfardouei R, Dias T, Lötval J, Lässer C. Tetraspanins distinguish separate extracellular vesicle subpopulations in human serum and plasma - Contributions of platelet extracellular vesicles in plasma samples. *J Extracell Vesicles*. 2022 May;11(5):e12213. doi: 10.1002/jev2.12213. PMID: 35524458; PMCID: PMC9077141.
335. Yoshioka Y, Kosaka N, Konishi Y, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H, Nonaka R, Yamamoto H, Ishii H, Mori M, Furuta K, Nakajima T, Hayashi H, Sugisaki H, Higashimoto H, Kato T, Takeshita F, Ochiya T. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles

- using ExoScreen. *Nat Commun.* 2014 Apr 7;5:3591. doi: 10.1038/ncomms4591. PMID: 24710016; PMCID: PMC3988821.
336. Hatanaka M, Higashi Y, Fukushige T, Baba N, Kawai K, Hashiguchi T, Su J, Zeng W, Chen X, Kanekura T. Cleaved CD147 shed from the surface of malignant melanoma cells activates MMP2 produced by fibroblasts. *Anticancer Res.* 2014 Dec;34(12):7091-6. PMID: 25503136.
337. Popovic, Milica; DE MARCO, Ario. Canonical and selective approaches in exosome purification and their implications for diagnostic accuracy. *Transl Cancer Res*, 2018, 7. Jg., S. S209-S25.
338. Kok VC, Yu CC. Cancer-Derived Exosomes: Their Role in Cancer Biology and Biomarker Development. *Int J Nanomedicine.* 2020 Oct 19;15:8019-8036. doi: 10.2147/IJN.S272378. PMID: 33116515; PMCID: PMC7585279.
339. Garcia-Martin R, Brandao BB, Thomou T, Altindis E, Kahn CR. Tissue differences in the exosomal/small extracellular vesicle proteome and their potential as indicators of altered tissue metabolism. *Cell Rep.* 2022 Jan 18;38(3):110277. doi: 10.1016/j.celrep.2021.110277. PMID: 35045290; PMCID: PMC8867597.
340. Kugeratski FG, Hodge K, Lilla S, McAndrews KM, Zhou X, Hwang RF, Zanivan S, Kalluri R. Quantitative proteomics identifies the core proteome of exosomes with syntenin-1 as the highest abundant protein and a putative universal biomarker. *Nat Cell Biol.* 2021 Jun;23(6):631-641. doi: 10.1038/s41556-021-00693-y. Epub 2021 Jun 9. PMID: 34108659; PMCID: PMC9290189.
341. Champion TC, Partridge LJ, Ong SM, Malleret B, Wong SC, Monk PN. Monocyte Subsets Have Distinct Patterns of Tetraspanin Expression and Different Capacities to Form Multinucleate Giant Cells. *Front Immunol.* 2018 Jun 8;9:1247. doi: 10.3389/fimmu.2018.01247. PMID: 29937768; PMCID: PMC6002745.
342. Sehlin D, Sölvander S, Paulie S, Brundin R, Ingelsson M, Lannfelt L, Pettersson FE, Englund H. Interference from heterophilic antibodies in amyloid- β oligomer ELISAs. *J Alzheimers Dis.* 2010;21(4):1295-301. doi: 10.3233/jad-2010-100609. PMID: 21504116.
343. Pradip Datta, Chapter 6 - Immunoassay Design and Mechanisms of Interferences, Editor(s): Amitava Dasgupta, Jorge L. Sepulveda, *Accurate Results in the Clinical Laboratory*, Elsevier, 2013, Pages 63-73, ISBN 9780124157835, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415783-5.00006-2>.
344. Bennett, J. E., Dolin, R., & Blaser, M. J. (2019). *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*, Chapter: Epstein-Barr Virus–Associated Malignant Diseases, and Other Diseases) by Eric C. Johannsen und Kenneth M. Kaye. Elsevier Health Sciences.

345. Fritschy JM. Is my antibody-staining specific? How to deal with pitfalls of immunohistochemistry. *Eur J Neurosci*. 2008 Dec;28(12):2365-70. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06552.x. PMID: 19087167.
346. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol*. 2005 Jul;42(4):405-26. doi: 10.1354/vp.42-4-405. PMID: 16006601.
347. Lewis Carl SA, Gillete-Ferguson I, Ferguson DG. An indirect immunofluorescence procedure for staining the same cryosection with two mouse monoclonal primary antibodies. *J Histochem Cytochem*. 1993 Aug;41(8):1273-8. doi: 10.1177/41.8.7687266. PMID: 7687266.
348. Szabó Á, Szendi-Szatmári T, Ujlaky-Nagy L, Rádi I, Vereb G, Szöllősi J, Nagy P. The Effect of Fluorophore Conjugation on Antibody Affinity and the Photophysical Properties of Dyes. *Biophys J*. 2018 Feb 6;114(3):688-700. doi: 10.1016/j.bpj.2017.12.011. PMID: 29414714; PMCID: PMC5985035.
349. Najy AJ, Jung YS, Kim S, Fridman R, Kim HC. Regulation of Tumor Metabolism and Extracellular Acidosis by the TIMP-10-CD63 Axis in Breast Carcinoma. *Cells*. 2021 Oct 12;10(10):2721. doi: 10.3390/cells10102721. PMID: 34685701; PMCID: PMC8535136.
350. Horie K, Kawakami K, Fujita Y, Sugaya M, Kameyama K, Mizutani K, Deguchi T, Ito M. Exosomes expressing carbonic anhydrase 9 promote angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Oct 21;492(3):356-361. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.08.107. Epub 2017 Aug 26. PMID: 28851650.
351. Takacova M, Barathova M, Zatovicova M, Golias T, Kajanova I, Jelenska L, Sedlakova O, Svastova E, Kopacek J, Pastorekova S. Carbonic Anhydrase IX-Mouse versus Human. *Int J Mol Sci*. 2019 Dec 30;21(1):246. doi: 10.3390/ijms21010246. PMID: 31905844; PMCID: PMC6982145.
352. Khushman M, Bhardwaj A, Patel GK, Laurini JA, Roveda K, Tan MC, Patton MC, Singh S, Taylor W, Singh AP. Exosomal Markers (CD63 and CD9) Expression Pattern Using Immunohistochemistry in Resected Malignant and Nonmalignant Pancreatic Specimens. *Pancreas*. 2017 Jul;46(6):782-788. doi: 10.1097/MPA.0000000000000847. PMID: 28609367; PMCID: PMC5494969.
353. Holdenrieder S, Pagliaro L, Morgenstern D, Dayyani F. Clinically Meaningful Use of Blood Tumor Markers in Oncology. *Biomed Res Int*. 2016;2016:9795269. doi: 10.1155/2016/9795269. Epub 2016 Nov 30. PMID: 28042579; PMCID: PMC5155072.
354. Okada-Tsuchioka M, Kajitani N, Omori W, Kurashige T, Boku S, Takebayashi M. Tetraspanin heterogeneity of small extracellular vesicles in human biofluids and brain tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 2022 Oct 30;627:146-151. doi: 10.1016/j.bbrc.2022.08.025. Epub 2022 Aug 13. PMID: 36037746.

355. Malla RR, Pandrangi S, Kumari S, Gavara MM, Badana AK. Exosomal tetraspanins as regulators of cancer progression and metastasis and novel diagnostic markers. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2018 Dec;14(6):383-391. doi: 10.1111/ajco.12869. Epub 2018 Mar 25. PMID: 29575602.
356. Liu S, Tian Z, Zhang L, Hou S, Hu S, Wu J, Jing Y, Sun H, Yu F, Zhao L, Wang R, Tseng HR, Zhau HE, Chung LW, Wu K, Wang H, Wu JB, Nie Y, Shao C. Combined cell surface carbonic anhydrase 9 and CD147 antigens enable high-efficiency capture of circulating tumor cells in clear cell renal cell carcinoma patients. *Oncotarget*. 2016 Sep 13;7(37):59877-59891. doi: 10.18632/oncotarget.10979. PMID: 27494883; PMCID: PMC5312355.
357. Fahs A, Hussein N, Zalzali H, Ramadan F, Ghamloush F, Tamim H, El Homsy M, Badran B, Boulos F, Tawil A, Ghayad SE, Saab R. CD147 Promotes Tumorigenesis via Exosome-Mediated Signaling in Rhabdomyosarcoma. *Cells*. 2022 Jul 22;11(15):2267. doi: 10.3390/cells11152267. PMID: 35892564; PMCID: PMC9331498.
358. Song Z, Mao J, Barrero RA, Wang P, Zhang F, Wang T. Development of a CD63 Aptamer for Efficient Cancer Immunochemistry and Immunoaffinity-Based Exosome Isolation. *Molecules*. 2020 Nov 27;25(23):5585. doi: 10.3390/molecules25235585. PMID: 33261145; PMCID: PMC7730289.
359. Fang X, Chen C, Liu B, Ma Z, Hu F, Li H, Gu H, Xu H. A magnetic bead-mediated selective adsorption strategy for extracellular vesicle separation and purification. *Acta Biomater*. 2021 Apr 1;124:336-347. doi: 10.1016/j.actbio.2021.02.004. Epub 2021 Feb 10. PMID: 33578055.
360. Chen J, Xu Y, Lu Y, Xing W. Isolation and Visible Detection of Tumor-Derived Exosomes from Plasma. *Anal Chem*. 2018 Dec 18;90(24):14207-14215. doi: 10.1021/acs.analchem.8b03031. Epub 2018 Nov 13. PMID: 30372048.
361. Li H, Frankenfield AM, Houston R, Sekine S, Hao L. Thiol-Cleavable Biotin for Chemical and Enzymatic Biotinylation and Its Application to Mitochondrial TurboID Proteomics. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2021 Sep 1;32(9):2358-2365. doi: 10.1021/jasms.1c00079. Epub 2021 Apr 28. PMID: 33909971; PMCID: PMC8898397.
362. Jung MK, Mun JY. Sample Preparation and Imaging of Exosomes by Transmission Electron Microscopy. *J Vis Exp*. 2018 Jan 4;(131):56482. doi: 10.3791/56482. PMID: 29364263; PMCID: PMC5908436.
363. Emelyanov A, Shtam T, Kamyshinsky R, Garaeva L, Verlov N, Miliukhina I, Kudrevatykh A, Gavrilov G, Zabrodskaia Y, Pchelina S, Konevega A. Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles from cerebrospinal fluid. *PLoS One*. 2020 Jan 30;15(1):e0227949. doi: 10.1371/journal.pone.0227949. PMID: 31999742; PMCID: PMC6991974.

364. Choi, Hyosun; Mun, Ji Young (2017): Structural Analysis of Exosomes Using Different Types of Electron Microscopy. In: *AM* 47 (3), S. 171–175. DOI: 10.9729/AM.2017.47.3.171.
365. Chuo ST, Chien JC, Lai CP. Imaging extracellular vesicles: current and emerging methods. *J Biomed Sci.* 2018 Dec 24;25(1):91. doi: 10.1186/s12929-018-0494-5. PMID: 30580764; PMCID: PMC6304785.
366. Ailuno G, Baldassari S, Lai F, Florio T, Caviglioli G. Exosomes and Extracellular Vesicles as Emerging Theranostic Platforms in Cancer Research. *Cells.* 2020 Dec 1;9(12):2569. doi: 10.3390/cells9122569. PMID: 33271820; PMCID: PMC7761021.
367. Perez-Hernandez D, Gutiérrez-Vázquez C, Jorge I, López-Martín S, Ursa A, Sánchez-Madrid F, Vázquez J, Yáñez-Mó M. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J Biol Chem.* 2013 Apr 26;288(17):11649-61. doi: 10.1074/jbc.M112.445304. Epub 2013 Mar 5. PMID: 23463506; PMCID: PMC3636856
368. Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G, Merrill MJ, Proescholdt MA, Oldfield EH, Lee J, Zavada J, Waheed A, Sly W, Lerman MI, Stanbridge EJ. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol.* 2001 Mar;158(3):905-19. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64038-2. PMID: 11238039; PMCID: PMC1850340.
369. Courcier J, de la Taille A, Nourieh M, Leguerney I, Lassau N, Ingels A. Carbonic Anhydrase IX in Renal Cell Carcinoma, Implications for Disease Management. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 28;21(19):7146. doi: 10.3390/ijms21197146. PMID: 32998233; PMCID: PMC7582814.
370. Duivenvoorden WC, Hopmans SN, Gallino D, Farrell T, Gerdes C, Glennie D, Lukka H, Pinthus JH. Inhibition of carbonic anhydrase IX (CA9) sensitizes renal cell carcinoma to ionizing radiation. *Oncol Rep.* 2015 Oct;34(4):1968-76. doi: 10.3892/or.2015.4184. Epub 2015 Aug 7. PMID: 26252502.
371. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2008 Jul;110(1):13-21. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.04.033. Erratum in: *Gynecol Oncol.* 2010 Jan;116(1):153. PMID: 18589210.
372. Toth B, Nieuwland R, Liebhardt S, Ditsch N, Steinig K, Stieber P, Rank A, Göhring P, Thaler CJ, Friese K, Bauerfeind I. Circulating microparticles in breast cancer patients: a comparative analysis with established biomarkers. *Anticancer Res.* 2008 Mar-Apr;28(2A):1107-12. PMID: 18507061.

373. Lespagnol A, Duflaut D, Beekman C, Blanc L, Fiucci G, Marine JC, Vidal M, Amson R, Telerman A. Exosome secretion, including the DNA damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice. *Cell Death Differ.* 2008 Nov;15(11):1723-33. doi: 10.1038/cdd.2008.104. Epub 2008 Jul 11. PMID: 18617898.
374. Yu X, Harris SL, Levine AJ. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res.* 2006 May 1;66(9):4795-801. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4579. PMID: 16651434.
375. Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, García-Santos G, Ghajar C, Nitadori-Hoshino A, Hoffman C, Badal K, Garcia BA, Callahan MK, Yuan J, Martins VR, Skog J, Kaplan RN, Brady MS, Wolchok JD, Chapman PB, Kang Y, Bromberg J, Lyden D. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med.* 2012 Jun;18(6):883-91. doi: 10.1038/nm.2753. Erratum in: *Nat Med.* 2016 Dec 6;22(12):1502. PMID: 22635005; PMCID: PMC3645291.
376. Theodoraki MN, Yerneni SS, Brunner C, Theodorakis J, Hoffmann TK, Whiteside TL. Plasma-derived Exosomes Reverse Epithelial-to-Mesenchymal Transition after Photodynamic Therapy of Patients with Head and Neck Cancer. *Oncoscience.* 2018 Apr 29;5(3-4):75-87. doi: 10.18632/oncoscience.410. PMID: 29854876; PMCID: PMC5978437.
377. Kashyap R, Balzano M, Lechat B, Lambaerts K, Egea-Jimenez AL, Lembo F, Fares J, Meeussen S, Kügler S, Roebroek A, David G, Zimmermann P. Syntenin-knock out reduces exosome turnover and viral transduction. *Sci Rep.* 2021 Feb 18;11(1):4083. doi: 10.1038/s41598-021-81697-4. PMID: 33602969; PMCID: PMC7892569.
378. Donoso-Quezada J, Ayala-Mar S, González-Valdez J. The role of lipids in exosome biology and intercellular communication: Function, analytics and applications. *Traffic.* 2021 Jul;22(7):204-220. doi: 10.1111/tra.12803. Epub 2021 Jun 11. PMID: 34053166; PMCID: PMC8361711.
379. Verweij FJ, Revenu C, Arras G, Dingli F, Loew D, Pegtel DM, Follain G, Allio G, Goetz JG, Zimmermann P, Herbomel P, Del Bene F, Raposo G, van Niel G. Live Tracking of Inter-organ Communication by Endogenous Exosomes In Vivo. *Dev Cell.* 2019 Feb 25;48(4):573-589.e4. doi: 10.1016/j.devcel.2019.01.004. Epub 2019 Feb 7. PMID: 30745143.
380. Saint-Pol J, Gosselet F, Duban-Deweere S, Pottiez G, Karamanos Y. Targeting and Crossing the Blood-Brain Barrier with Extracellular Vesicles. *Cells.* 2020 Apr 1;9(4):851. doi: 10.3390/cells9040851. PMID: 32244730; PMCID: PMC7226770.

381. Aslan C, Maralbashi S, Salari F, Kahroba H, Sigaroodi F, Kazemi T, Kharaziha P. Tumor-derived exosomes: Implication in angiogenesis and antiangiogenesis cancer therapy. *J Cell Physiol*. 2019 Aug;234(10):16885-16903. doi: 10.1002/jcp.28374. Epub 2019 Feb 22. PMID: 30793767.
382. Barrena S, Almeida J, Yunta M, López A, Fernández-Mosteirín N, Giralt M, Romero M, Perdiguier L, Delgado M, Orfao A, Lazo PA. Aberrant expression of tetraspanin molecules in B-cell chronic lymphoproliferative disorders and its correlation with normal B-cell maturation. *Leukemia*. 2005 Aug;19(8):1376-83. doi: 10.1038/sj.leu.2403822. PMID: 15931266.
383. Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci*. 2001 Aug;58(9):1189-205. doi: 10.1007/PL00000933. PMID: 11577978.
384. Vitale SR, Helmijr JA, Gerritsen M, Coban H, van Dessel LF, Beije N, van der Vlugt-Daane M, Vigneri P, Sieuwerts AM, Dits N, van Royen ME, Jenster G, Sleijfer S, Lolkema M, Martens JWM, Jansen MPH. Detection of tumor-derived extracellular vesicles in plasma from patients with solid cancer. *BMC Cancer*. 2021 Mar 24;21(1):315. doi: 10.1186/s12885-021-08007-z. PMID: 33761899; PMCID: PMC7992353.
385. Yang X, Tang Y, Alt RR, Xie X, Li F. Emerging techniques for ultrasensitive protein analysis. *Analyst*. 2016 Jun 21;141(12):3473-81. doi: 10.1039/c6an00059b. Epub 2016 Feb 22. PMID: 26898911.
386. Higashi SL, Yagyu K, Nagase H, Pearson CS, Geller HM, Katagiri Y. Ultra-High-Speed Western Blot using Immunoreaction Enhancing Technology. *J Vis Exp*. 2020 Sep 26;(163):10.3791/61657. doi: 10.3791/61657. PMID: 33044451; PMCID: PMC8504990.
387. Higgins JP, Shinghal R, Gill H, Reese JH, Terris M, Cohen RJ, Fero M, Pollack JR, van de Rijn M, Brooks JD. Gene expression patterns in renal cell carcinoma assessed by complementary DNA microarray. *Am J Pathol*. 2003 Mar;162(3):925-32. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63887-4. PMID: 12598325; PMCID: PMC1868114.
388. Lapointe J, Li C, Higgins JP, van de Rijn M, Bair E, Montgomery K, Ferrari M, Egevad L, Rayford W, Bergerheim U, Ekman P, DeMarzo AM, Tibshirani R, Botstein D, Brown PO, Brooks JD, Pollack JR. Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jan 20;101(3):811-6. doi: 10.1073/pnas.0304146101. Epub 2004 Jan 7. PMID: 14711987; PMCID: PMC321763.
389. Merino Bonilla JA, Torres Tabanera M, Ros Mendoza LH. Breast cancer in the 21st century: from early detection to new therapies. *Radiologia*. 2017 Sep-Oct;59(5):368-379. English, Spanish. doi: 10.1016/j.rx.2017.06.003. Epub 2017 Jul 14. PMID: 28712528.
390. Kashyap D, Pal D, Sharma R, Garg VK, Goel N, Koundal D, Zaguia A, Koundal S, Belay A. Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures.

- Biomed Res Int. 2022 Apr 18;2022:9605439. doi: 10.1155/2022/9605439. PMID: 35480139; PMCID: PMC9038417.
391. Barry MJ, Simmons LH. Prevention of Prostate Cancer Morbidity and Mortality: Primary Prevention and Early Detection. *Med Clin North Am.* 2017 Jul;101(4):787-806. doi: 10.1016/j.mcna.2017.03.009. PMID: 28577627.
392. Cuzick J, Thorat MA, Andriole G, Brawley OW, Brown PH, Culig Z, Eeles RA, Ford LG, Hamdy FC, Holmberg L, Ilic D, Key TJ, La Vecchia C, Lilja H, Marberger M, Meyskens FL, Minasian LM, Parker C, Parnes HL, Perner S, Rittenhouse H, Schalken J, Schmid HP, Schmitz-Dräger BJ, Schröder FH, Stenzl A, Tombal B, Wilt TJ, Wolk A. Prevention and early detection of prostate cancer. *Lancet Oncol.* 2014 Oct;15(11):e484-92. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70211-6. PMID: 25281467; PMCID: PMC4203149.
393. Bobrie A, Krumeich S, Reyat F, Recchi C, Moita LF, Seabra MC, Ostrowski M, Théry C. Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression. *Cancer Res.* 2012 Oct 1;72(19):4920-30. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0925. Epub 2012 Aug 3. PMID: 22865453.
394. Li J, Chen J, Wang S, Li P, Zheng C, Zhou X, Tao Y, Chen X, Sun L, Wang A, Cao K, Tang S, Zhou J. Blockage of transferred exosome-shuttled miR-494 inhibits melanoma growth and metastasis. *J Cell Physiol.* 2019 Sep;234(9):15763-15774. doi: 10.1002/jcp.28234. Epub 2019 Feb 5. PMID: 30723916.
395. Catalano M, O'Driscoll L. Inhibiting extracellular vesicles formation and release: a review of EV inhibitors. *J Extracell Vesicles.* 2019 Dec 19;9(1):1703244. doi: 10.1080/20013078.2019.1703244. PMID: 32002167; PMCID: PMC6968539.
396. Chen J, Song Y, Miao F, Chen G, Zhu Y, Wu N, Pang L, Chen Z, Chen X. PDL1-positive exosomes suppress antitumor immunity by inducing tumor-specific CD8+ T cell exhaustion during metastasis. *Cancer Sci.* 2021 Sep;112(9):3437-3454. doi: 10.1111/cas.15033. Epub 2021 Jul 29. PMID: 34152672; PMCID: PMC8409314.
397. Paskeh MDA, Entezari M, Mirzaei S, Zabolian A, Saleki H, Naghdi MJ, Sabet S, Khoshbakht MA, Hashemi M, Hushmandi K, Sethi G, Zarrabi A, Kumar AP, Tan SC, Papadakis M, Alexiou A, Islam MA, Mostafavi E, Ashrafizadeh M. Emerging role of exosomes in cancer progression and tumor microenvironment remodeling. *J Hematol Oncol.* 2022 Jun 28;15(1):83. doi: 10.1186/s13045-022-01305-4. PMID: 35765040; PMCID: PMC9238168.
398. Kapustin AN, Chatrou ML, Drozdov I, Zheng Y, Davidson SM, Soong D, Furmanik M, Sanchis P, De Rosales RT, Alvarez-Hernandez D, Shroff R, Yin X, Muller K, Skepper JN, Mayr M, Reutelingsperger CP, Chester A, Bertazzo S, Schurgers LJ, Shanahan CM.

Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circ Res.* 2015 Apr 10;116(8):1312-23. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305012. Epub 2015 Feb 23. PMID: 25711438.

399. Musante L, Tataruch DE, Holthofer H. Use and isolation of urinary exosomes as biomarkers for diabetic nephropathy. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014 Sep 26;5:149. doi: 10.3389/fendo.2014.00149. PMID: 25309511; PMCID: PMC4176463.
400. Trincianti C, Meleca V, La Porta E, Bruschi M, Candiano G, Garbarino A, Kajana X, Preda A, Lugani F, Ghiggeri GM, Angeletti A, Esposito P, Verrina E. Proteomics and Extracellular Vesicles as Novel Biomarker Sources in Peritoneal Dialysis in Children. *Int J Mol Sci.* 2022 May 18;23(10):5655. doi: 10.3390/ijms23105655. PMID: 35628461; PMCID: PMC9144397.

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung aus der Gewebedatenbank (Biobanking)	32
Tabelle 2: Beschreibung der verwendeten Zelllinien und Auflistung der Nährmedien	33
Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper.	42
Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper. HRP = horse reddish peroxidase	42
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten biotinylierten Antikörper.....	43
Tabelle 6:Protokoll der Messreihe eines Kits mit 12 Nano-Chips.....	46
Tabelle 7:Protokoll der Messreihe eines Kits mit insgesamt 16 Nano-Chips.....	47
Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien	49
Tabelle 9: Geräte.....	49
Tabelle 10: Reagenzien und Lösungen.....	50
Tabelle 11: Chemikalien.....	51
Tabelle 12: Zellkulturmedien und Zusätze.....	52
Tabelle 13: Kits.....	52
Tabelle 14: Enzyme.....	52
Tabelle 15: Geräte- und Computersoftware	53
Tabelle 16: Vesikelgrößen und Größenverteilungen von isolierten Vesikeln von 786-O-Zellen.....	56
Tabelle 17: Messung der Partikelgrößen von Exosomensuspensionen aus vier Nierenzellkarzinomzelllinien.....	58
Tabelle 18: Partikelkonzentrationen von Exosomensuspensionen aus vier Nierenzellkarzinomzelllinien.	59
Tabelle 19: Mittlere Partikelgröße und Gesamtpartikelkonzentration.	59
Tabelle 20: Quantifizierung und Vergleich der Expression von Zell- und Exosomenmarkern in verschiedenen Zelllinien.	62
Tabelle 21: Quantifizierung und Vergleich der Expression von Tumormarkern in verschiedenen Zelllinien.....	64
Tabelle 22: Quantifizierung und Vergleich der Expression von Zell-, Exosomen und Tumormarkern in verschiedenen Zelllinien.....	66
Tabelle 23: Quantifizierung und Vergleich der Expression von Zell-, Exosomen und Tumormarkern in verschiedenen Zelllinien.....	67
Tabelle 24: Partikelgrößen in Exosomensuspensionen aus Tumor- und Normalgewebe.	72
Tabelle 25: Partikelkonzentrationen in Exosomensuspensionen aus Tumor- und Normalgewebe.....	72
Tabelle 26: Nachweis von tumorassoziierten Markern in Zellen und tumor-abgeleiteten Exosomen	78
Tabelle 27: Quantifizierung und Vergleich von Expressionsmustern in normalen Gewebeproben.	78
Tabelle 28: Quantifizierung und Vergleich von Expressionsmustern in Gewebeproben.....	79
Tabelle 29: Histopathologische Eigenschaften und Western-Blot-Ergebnisse an Tumorgewebeproben.	82
Tabelle 30: Partikelkonzentrationen in Exosomensuspensionen aus Blutplasma.....	83
Tabelle 31: Vergleich von Ultrazentrifugation und Isolationskit für Blutplasmaexosomen.	83
Tabelle 32: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaprobe in 1:125- und 1:25-Verdünnung	93
Tabelle 33: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaprobe in 1:125-Verdünnung (Chip 49).	95
Tabelle 34: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaprobe in 1:25-Verdünnung (Chip 40).	95

Tabelle 35: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaprobe in 1:125-Verdünnung.	99
Tabelle 36: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaprobe in 1:125-Verdünnung .	99
Tabelle 37: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Proben aus Zellkultur und Plasma (Chip 68, 64).	102
Tabelle 38: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Caki2-Zellkulturprobe (Chip 68).	102
Tabelle 39: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaprobe in 1:1-Verdünnung (Chip 64).	103
Tabelle 40: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaprobe in 1:1-Verdünnung (Chip 48).	103
Tabelle 41: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaprobe in 1:25-Verdünnung (Chip 47).	104
Tabelle 42: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaproben von drei Patienten (Chip 002, 017, 040).	107
Tabelle 43: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaproben Fall 1 (Chip 002).	107
Tabelle 44: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaproben Fall 2 (Chip 017).	108
Tabelle 45: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaproben Fall 3 (Chip 040).	108
Tabelle 46: Quantifizierung der CD147-positiven Partikel in den Plasmaproben von drei Patienten (Chip 004, 019, 042).	110
Tabelle 47: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaproben Fall 1 (Chip 004).	110
Tabelle 48: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaproben Fall 2 (Chip 019).	111
Tabelle 49: Quantifizierung der Versuchsergebnisse der Plasmaproben Fall 3 (Chip 042).	111

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs).....	10
Abbildung 2: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2016.	10
Abbildung 3: Intrazelluläre Biogenese und Sekretion extrazellulärer Vesikel.....	14
Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines Exosomes.....	16
Abbildung 5: Schematische Darstellung verschiedener, sphärischer, Partikel zellulären Ursprungs.	25
Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines magnetischen Beads	27
Abbildung 7: Schematischer Arbeitsablauf für die Exosomenisolierung aus primärem Nierengewebe.....	37
Abbildung 8: Prinzipien der Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA).	40
Abbildung 9: Vereinfachtes Diagramm eines Transmissionselektronenmikroskops.	40
Abbildung 10: Schematischer Ablauf der Isolierung und Anreicherung von Extrazellulären Vesikeln (EVs) mittels magnetischer Beads.	44
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des Nano-Chip-Systems ..	45
Abbildung 12: Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Aufnahme von Exosomen aus Nierenzellkarzinomzelllinien als qualitativer Nachweis der Isolation von EVs	55
Abbildung 13: Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA) von Exosomen, die aus der humanen klarzelligen Nierenkarzinom-Zelllinie (ccRCC = clear cell renal cell carcinoma) 786-O stammen.	57
Abbildung 14: Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA) von Exosomen, die aus humanen klarzelligen Nierenkarzinomzelllinien (ccRCC = clear cell renal cell carcinoma)	

stammen	60
Abbildung 15: Western-Blot-Analyse von exosomalen und zellulären Proteinen aus Zelllinien des klarzelligen Nierenzellkarzinoms (786-O, Caki2, Caki1 und RCC53) und Kontrollzelllinien (MCF7).....	62
Abbildung 16 : Western-Blot-Analyse von tumorassoziierten Markern.....	63
Abbildung 17: Western-Blot-Analyse von Proteinproben aus Zellen und Exosomen von Blasenkarzinomzelllinien (J82, 253J-BV, T24).	65
Abbildung 18: Western-Blot-Analyse von Proteinproben aus Zellen und Exosomen aus malignen Zelllinien von Niere (786-O), Blase (T24), Prostata (VCap), sowie aus benignen Zelllinien von Niere (HEK), Blase (HCV29), Prostata (BPH). ...	68
Abbildung 19: Exosomen aus Tumorgewebe nach Verdau und Ultrazentrifugation.	70
Abbildung 21: Nano-Tracking-Analyse von Exosomen aus einer primären Normalgewebeprobe und aus einer primären Tumorgewebeprobe, die durch einen Saccharosegradienten isoliert wurden.	73
Abbildung 22: Vergleich Kollagenase Typ I und Kollagenase Typ III.	75
Abbildung 23: Western-Blot-Analyse von exosomalen und zellulären Proteinen, isoliert aus Tumor und Normalgewebe.	76
Abbildung 24: Western-Blot-Analyse von tumorassoziierten Markern (CD147, CA9, CD70, EpCAM) in Proben aus Nierentumoren und gesundem (normal) Gewebe	78
Abbildung 25: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung von Tumormarkern (CA9, CD147, CD70 und EpCAM) auf formalinfixierten, paraffin-eingebetteten (FFPE) Schnitten von Tumor- und normalen Primärgewebeproben von Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom.....	80
Abbildung 26: Untersuchung des Verdünnungseffektes auf die Ergebnisse des Nanotracking-Analyseverfahrens (NTA).	84
Abbildung 27: Transelektronenmikroskopie (TEM). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Exosomenproben aus Blutplasma nach Behandlung mit einem Präzipitationskit für Exosomen aus Plasma, und nach Ultrazentrifugation.	85
Abbildung 28: Bestimmung der Gesamtpartikelzahl von Exosomenisolaten der Nierenzellkarzinomzelllinien 786-O und Caki2, sowie der Prostatafibroblastenzelllinien PNF und PTF.	88
Abbildung 29: Charakterisierung von Exosomen nach Fixierung auf, mit Antikörpern gegen Exosomenmarker (CD81, CD9, CD81) dotierten Nano-Chips.	90
Abbildung 30: Expression von CD147 auf CD81-positiven, CD63-positiven und CD9-positiven Exosomen.....	91
Abbildung 31: Ko-Expression von CD147	92
Abbildung 32: Aufnahmen und Quantifizierung der Fluoreszenzmessungen von extrazellulären Vesikeln (EV) aus einer Plasmaprobe in 1:25-Verdünnung (Chip 40) und 1:125- Verdünnung (Chip 49) auf antikörper-dotierten Stellen je eines Nano-Chips.	94
Abbildung 33: Quantifizierung der Fluoreszenzmessungen von extrazellulären Vesikeln (EV) aus einer Plasmaprobe in 1:25-Verdünnung (Chip 40) und 1:125-Verdünnung (Chip 49) auf antikörper-dotierten Stellen je eines Nano-Chips.	96
Abbildung 34: Quantifizierung der Fluoreszenzmessungen von extrazellulären Vesikeln (EV) aus einer Plasmaprobe (Chip 66) auf antikörper-dotierten Stellen eines Nano-Chips.	98
Abbildung 35: Aufnahmen und Quantifizierung der Fluoreszenzmessungen von extrazellulären Vesikeln (EV) aus einer Plasmaprobe (Chip 64) und einer Zellkulturprobe (Chip 68, Caki2-Zellkulturüberstand nach Ultrazentrifugation) auf antikörper-dotierten Stellen je eines Nano-Chips.	100
Abbildung 36: Quantifizierung der Fluoreszenzmessungen von extrazellulären Vesikeln (EV)	

aus einer Plasmaprobe (Chip 64) und einer Zellkulturprobe (Chip 68, Caki2-Zellkulturüberstand nach Ultrazentrifugation) auf antikörper-dotierten Stellen je eines Nano-Chips.	101
Abbildung 37: Fluoreszenzmessungen von extrazellulären Vesikeln (EV) aus einer Plasmaprobe auf antikörper-dotierten Stellen eines Nano-Chips.....	105
Abbildung 38: Fluoreszenzmessungen von extrazellulären Vesikeln (EV) aus einer Plasmaprobe auf antikörper-dotierten Stellen eines Nano-Chips.....	106
Abbildung 39: Fluoreszenzmessungen von extrazellulären Vesikeln (EV) aus drei unabhängigen Plasmaproben auf antikörper-dotierten Stellen von drei Nano-Chips. ..	109
Abbildung 40: Fluoreszenzmessungen von extrazellulären Vesikeln (EV) aus drei unabhängigen Plasmaproben auf antikörper-dotierten Stellen von drei Nano-Chips. ..	112
Abbildung 41: Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Aufnahme von Exosomen aus Nierenzellkarzinomzelllinien als qualitativer Nachweis der Isolation von extrazellulären Partikeln mittels CD63-positiver <i>Beads</i>	114
Abbildung 42: Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Aufnahme von Exosomen aus Nierenzellkarzinomzelllinien als qualitativer Nachweis der Isolation von extrazellulären Partikeln mittels CD63-positiver <i>Beads</i>	115
Abbildung 43: Western-Blot-Analyse von Proteinen aus Exosomen, isoliert aus einer Nierenzellkarzinomzelllinie (786-O) mittels CD63-positiver, magnetischer <i>Beads</i> . .	115
Abbildung 44: Western-Blot-Analyse von Proteinen aus Exosomen, isoliert aus einer Nierenzellkarzinomzelllinie (786-O) mittels CD63-positiver, magnetischer <i>Beads</i> . .	116
Abbildung 45: Western-Blot-Analyse von Proteinen aus Exosomen, isoliert aus Nierenzellkarzinomzelllinien (786-O, Caki2) mittels CD63-positiver oder CD147-positiver, magnetischer <i>Beads</i>	117
Abbildung 46: Western-Blot-Analyse von exosomen-spezifischen, zellulären und tumorassoziierten Proteinen in Exosomen, isoliert aus Plasma und einer Nierenzellkarzinomzelllinie mittels CD63-positiver, magnetischer <i>Beads</i>	118
Abbildung 47: Western-Blot-Analyse von exosomalen und zellulären Proteinen, isoliert aus Plasma mittels CD9-positiven oder CD63-positiven, magnetischen <i>Beads</i> ..	120
Abbildung 48: Western-Blot-Analyse von zellulären (GM130, Calretikulin), exosomen-spezifischen (Syntenin, Alix, CD63, CD9) und tumorassoziierten (CD70, CD147, CA9) Proteinen in Exosomen, isoliert aus Plasma und Nierenzellkarzinomzelllinien (786-O, Caki2) mittels CD63-positiver, magnetischer <i>Beads</i>	193
Abbildung 49: Vergleich von Nanotracking Analysis (NTA), Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Nano-Chips (Nanoview) als Methode zur Bestimmung von Größe und Größenverteilung extrazellulärer Vesikel.	194
Abbildung 50: Western-Blot-Analyse von Proteinproben aus Zellen und Exosomen von Nierenzellkarzinomzelllinien (Caki1, Caki2) und Prostatafibroblastenzelllinien (PNF, PTF).....	195
Abbildung 51: Fluoreszenzmessungen von EpCAM auf CD81-positiven, CD63-positiven, CD9-positiven und PSMA-positiven extrazellulären Vesikeln aus Zelllinien des Nierenzellkarzinoms (786-O, Caki2) und des Prostatakarzinoms (PNF, PTF).....	194
Abbildung 52: Gesamtpartikelzahl aller mittels differenzieller Lichtstreuung detektierten Partikel auf jeweils vier Antikörper-Dotierungen auf 16 Nano-Chips.	196

9. Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
CA	Carboanhydrase
ccRCC	Clear cell renal cell carcinom = klarzelliges Nierenzellkarzinom
CD	Cluster of differentiation
CTC´s	circulating tumor cells
ctDNA	circulating tumor DNA
diff.	differenziell
DNA	desoxyribonucleic acid
EAU	European Association of Urology
ED-FKS	exosomen-depletiertes Fetales Kälberserum
ESE	early sorting endosome
EV	Extrazellulärer Vesikel
FDA	Food and Drug Administration
FKS	Fetales Kälberserum
HDL	High Density Lipoprotein
ICD	Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
MCF7	Michigan Cancer Foundation – 7
kDa	Kilodalton
Chipnr.	Chipnummer
HRP	Horse reddish peroxidase
bFGF	basic fibroblast growth factor
H	Hydrogenium, Wasserstoff
Na	Natrium
LDL	Low Densitiy Lipoprotein
LSE	late sorting endosome
MVB	multivesicular body
MW	Molekulargewicht
Nr.	Nummer
NTA	Nanopartikel-Tracking-Analyse oder Nanotrackinganalyseverfahren
NZK	Nierenzellkarzinom
PBS	Phosphate buffered saline
PNF	Prostata-Normal-Fibroblasten

PTF	Prostata-Tumor-Fibroblasten
sEVs	small extracellular vesicles = Exosomen
IEVs	large extracellular vesicles = Mikrovesikel
TEM	Transelectronenmikroskopie
TMB	Tumormutationslast, engl.: tumour mutational burden
TMB	3,3',5',5'-tetramethylbenzidine
UZ-Röhrchen	Ultrazentrifugenröhrchen
Abb.	Abbildung
Kb	Kilobasen
FFPE	Formalinfixiert und paraffin-eingebettet
MMP	Matrix-Metalloprotease
MCT	monocarboxylate transporter
EMMPRIN	extrazellulärer Matrix-Metalloproteinase-Induktor
AML	Akute Myeloische Leukämie
EMT	epithelialer-mesenchymaler Transfer
C.S.	Cell Signaling
exomiR	exosomal miRNA
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHL	Von-Hippel-Lindau Syndrom
VLDL	Very low density lipoprotein
ZfKD	Zentrum für Krebsregisterdaten

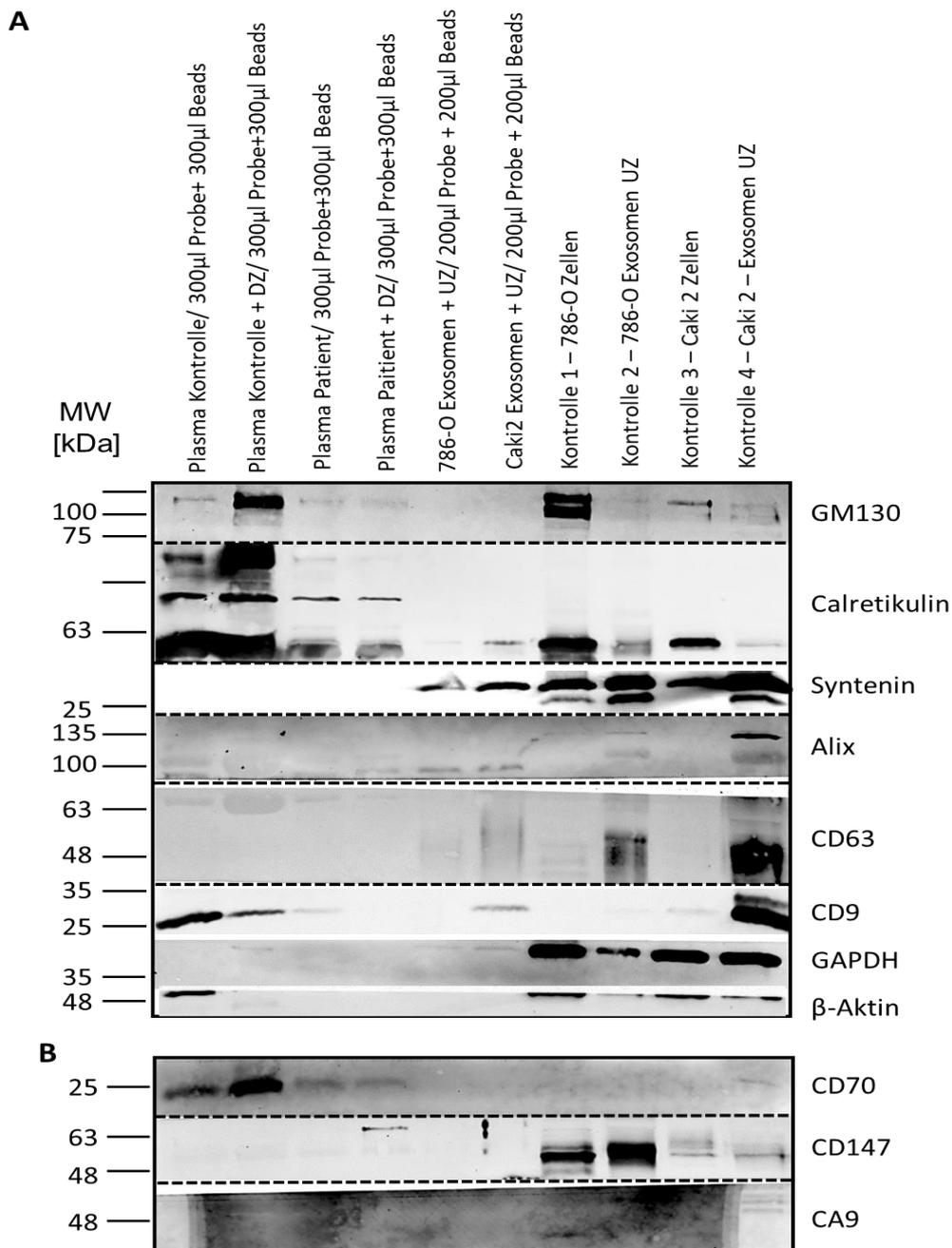


Abbildung 48: Western-Blot-Analyse von zellulären (GM130, Calretikulin), exosomen-spezifischen (Syntenin, Alix, CD63, CD9) und tumorassoziierten (CD70, CD147, CA9) Proteinen in Exosomen, isoliert aus Plasma und Nierenzellkarzinomzelllinien (786-O, Caki2) mittels CD63-positiver, magnetischer *Beads*. Als Ladekontrolle dienten GAPDH und β-Aktin. Als Positivkontrolle wurden Zellysate der Nierenkarzinomzelllinien 786-O und Caki2, sowie Lysate von Exosomen aus Zellkulturüberstand dieser Zelllinien nach differenzieller Ultrazentrifugation, aufgetragen. DZ=differenzielle Zentrifugation; UZ=Ultrazentrifugation; Plasma Kontrolle=Plasma eines gesunden Probanden; Plasma Patient=Plasma eines Probanden mit diagnostiziertem Nierenzellkarzinom.

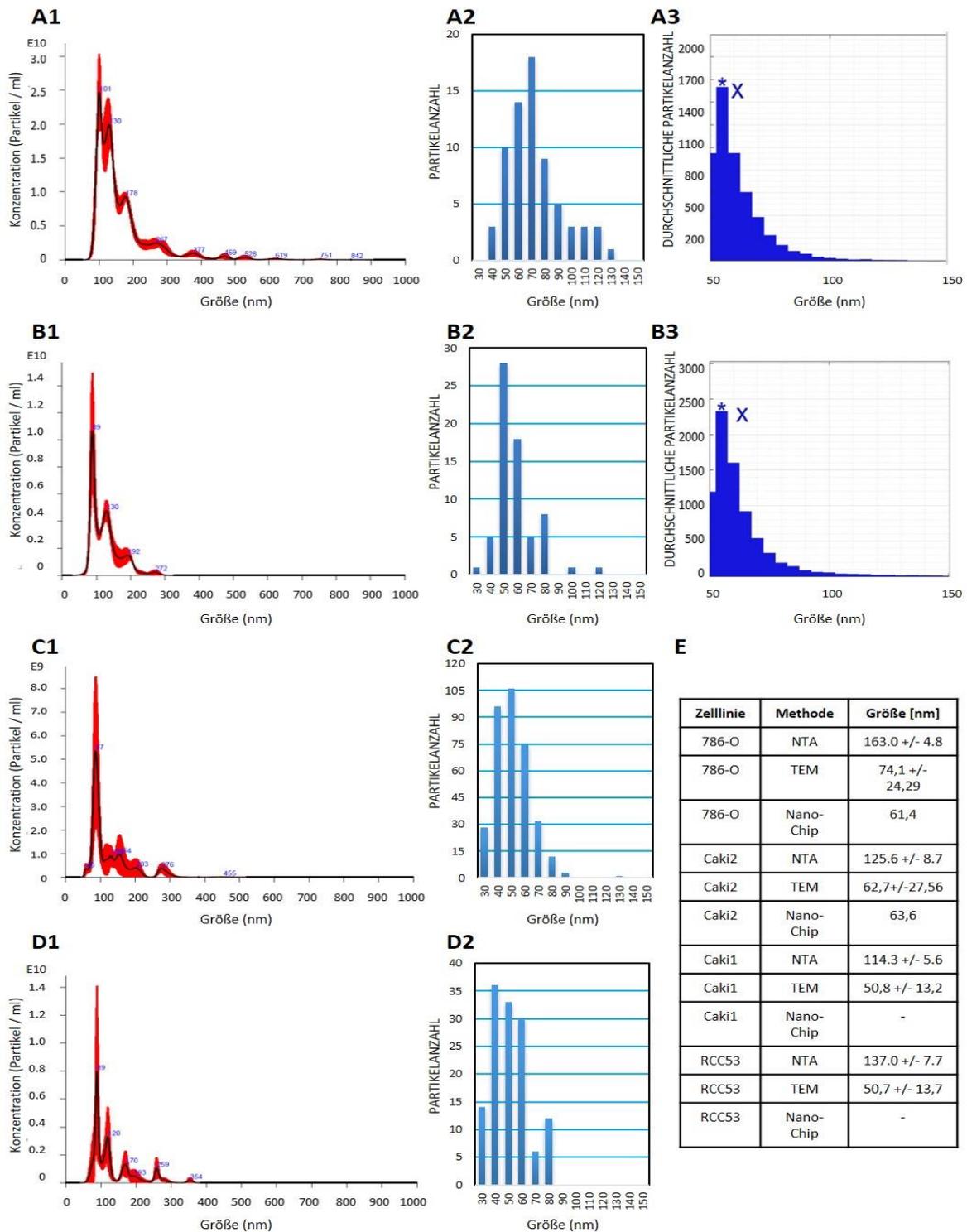


Abbildung 49: Vergleich von Nanotracking Analysis (NTA), Transelektronenmikroskopie (TEM) und Nano-Chips (Nanoview) als Methode zur Bestimmung von Größe und Größenverteilung extrazellulärer Vesikel. A1-D1: NTA-Messungen von Proben der Zelllinien 786-O (A1), Caki2 (B1), Caki1 (C1) und RCC53 (D1) nach Exosomenisolierung durch Ultrazentrifugation. A2-D2: Größenprofile der unter dem Elektronenmikroskop aufgenommen extrazellulären Vesikel. A3, B3) Zählung der Partikel und Bestimmung der Größenverteilung mittels Lichtstreuung von auf Nano-Chips fixierten extrazellulären Vesikeln. E: Tabellarischer Vergleich der Bestimmung der durchschnittlichen Größe von extrazellulären Vesikeln aus vier verschiedenen Zelllinien mit drei unterschiedlichen Methoden.

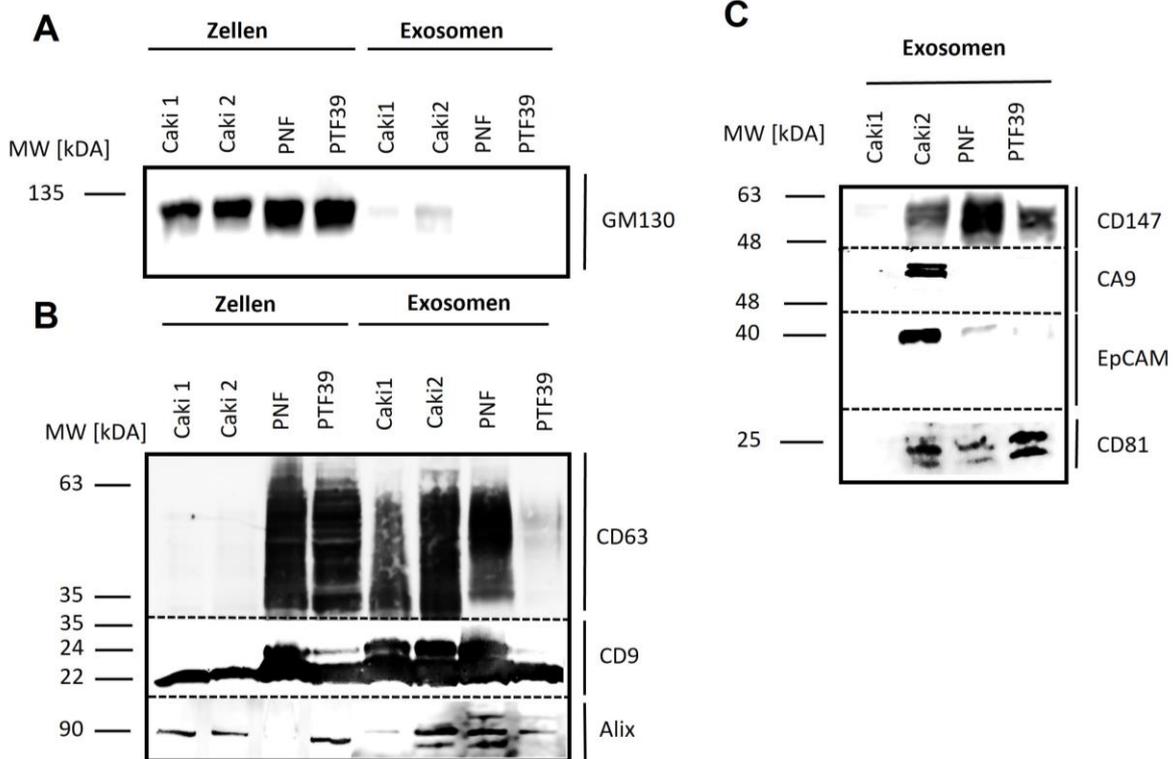


Abbildung 50: Western-Blot-Analyse von Proteinproben aus Zellen und Exosomen von Nierenzellkarzinomzelllinien (Caki1, Caki2) und Prostatafibroblastenzelllinien (PNF, PTF). Isolation der Exosomen erfolgte durch Ultrazentrifugation des Zellkulturüberstandes. A: Expression zellspezifischer Marker (GM130). B: Expression exosomenspezifischer Marker (CD63, CD9, Alix). C: Expression tumorspezifischer Marker (CD147, CA9, EpCAM) und exosomenspezifischer Proteine (Alix, CD81). MW = Molekulargewicht; kDa = Kilodalton.

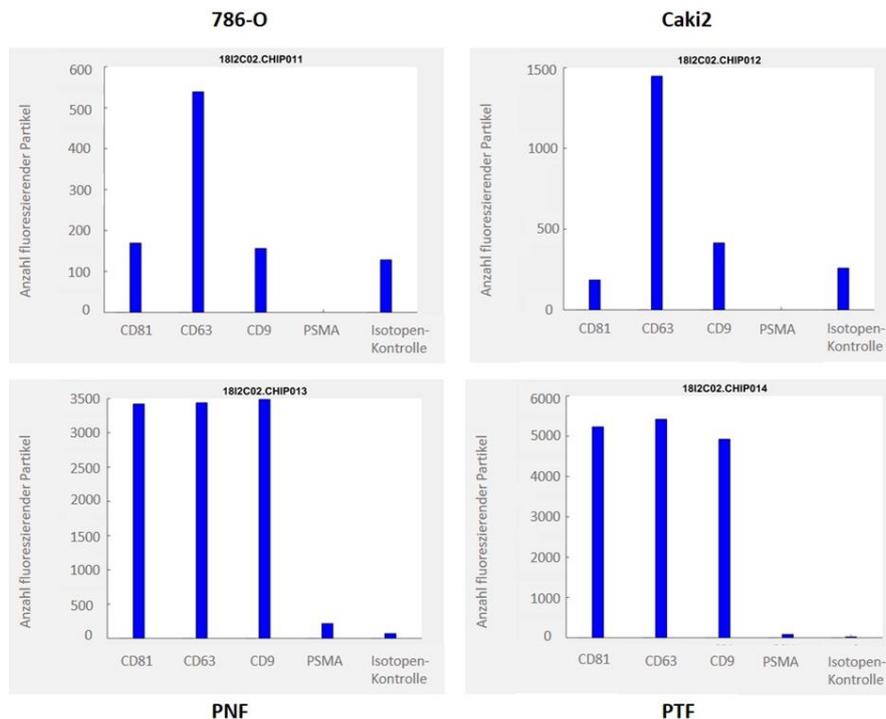


Abbildung 51: Fluoreszenzmessungen von EpCAM auf CD81-positiven, CD63-positiven, CD9-positiven und PSMA-positiven extrazellulären Vesikeln aus Zelllinien des Nierenzellkarzinoms (786-O, Caki2) und des Prostatakarzinoms (PNF, PTF).



Abbildung 52: Gesamtpartikelzahl aller mittels differenzieller Lichtstreuung detektierten Partikel auf jeweils vier Antikörper-Dotierungen auf 16 Nano-Chips, und nach Einberechnung des Verdünnungsfaktors.

11. Publikationen und Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Aufsicht von Frau Prof. Kerstin Junker von Februar 2018 bis August 2023 an der Klinik für Urologie und Kinderurologie der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes erstellt. Die Fortschritte und Fertigstellung wurden von Herrn Professor a.D. Friedrich Grässer wissenschaftlich begleitet. Teile dieser Arbeit wurden bereits in den in 7.1.1 – 7.1.3 aufgeführten wissenschaftlichen Beiträgen, sowie in den Fortschrittsberichten für die Drittmittelgeberin (Dr. Rolf M. Schwiete Stiftung), veröffentlicht.

11.1 Auflistung der wissenschaftlichen Beiträge

11.1.1 Veröffentlichungen in Fachzeitschriften nach *peer-review*-Verfahren

- Himbert D, Zeuschner P, Ayoubian H, Heinzelmann J, Stöckle M, Junker K. Characterization of CD147, CA9, and CD70 as Tumor-Specific Markers on Extracellular Vesicles in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Diagnostics* (Basel). 2020 Dec 2;10(12):1034. doi: 10.3390/diagnostics10121034. PMID: 33276608; PMCID: PMC7761541.
- Linxweiler J, Kolbinger A, Himbert D, Zeuschner P, Saar M, Stöckle M, Junker K. Organ-Specific Uptake of Extracellular Vesicles Secreted by Urological Cancer Cells. *Cancers* (Basel). 2021 Sep 30;13(19):4937. doi: 10.3390/cancers13194937. PMID: 34638418; PMCID: PMC8508228.

11.1.2 Vorträge auf nationalen und internationalen Fachkonferenzen

- „Arbeitstreffen des Deutschen Netzwerks Nierenzelltumoren“, 17/18.05.2019, Erfurt, Deutschland
- „71. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie e.V.“, 18.09.-21. 09.2019, Messe in Hamburg, Deutschland
- „26th Meeting of the EAU Section of Urological Research“, 10.-12.10.2019, Porto, Portugal
- „7. Symposium Nierenzelltumoren (NZK)“, 07. - 08. Mai 2021, Virtuelle Konferenz
- „27th Meeting of the EAU Section of Urological Research“, 08.-09.10.2021, Virtuelle Konferenz

11.1.3 Posterbeiträge auf nationalen und internationalen Fachkonferenzen

- „25th Meeting of the EAU Section of Urological Research in collaboration with the EAU Section of Uropathology“, 04.-06.10.2018, Athen, Griechenland
- „Autumn Meeting 2018 of the German Society for Extracellular Vesicles (GSEV)“, 15.-16.

November, Philipps Universität Marburg, Deutschland

- „20th International AEK Cancer Congress“, 27.02.-01. 03.2019, EMBL Advanced Training Centre in Heidelberg, Deutschland
- „Conference on Extracellular Vesicles in Cancer“, 02.08.-04. 08.2019, Vanderbilt University in Nashville/Tennessee, USA
- „Annual Meeting of the AUA (American Urological Association)“, 15.-18.05.2020, Virtuelle Konferenz
- „10th Annual Meeting of International Society for Extracellular Vesicles“, 18.05.-21. 05.2021, Virtuelle Konferenz
- „61. Jahrestagung der Südwestdeutschen Gesellschaft für Urologie e.V.“, 09.06.-11. 06.2021, Virtuelle Konferenz
- „Autumn Meeting 2021 of the German Society for Extracellular Vesicles (GSEV)“, 03.+04.10.2021, Freiburg im Breisgau, Deutschland

11.1.4 Auszeichnungen und Preise

- Reisestipendium des DAAD im Rahmen des „GradUS Global“-Programmes der Universität des Saarlandes (Oktober 2018, 665 €)
- Stipendium der Vize-Präsidentin für europäische und internationale Angelegenheiten im Rahmen des „GradUS Global“-Programmes der Universität des Saarlandes (August 2019, 1000 €)
- Schlüsselkompetenzzertifikat des ZeLL (Zentrum für lebenslanges Lernen) der Universität des Saarlandes, Schwerpunkt „Projektmanagement und Netzwerkmanagement“

11.2 Danksagung

Die Promotion als besondere Form der Weiterbildung ist in den meisten Fällen mit einem Marathon oder einer sehr langen Reise zu vergleichen. Auf dem eigenen Lebensweg diese Abzweigung zu wählen war eine gewagte Entscheidung! Ohne Hilfe wäre dieses Unterfangen nicht zu einem glücklichen Ende gekommen. Deshalb sage ich: „Danke!“

Ein großer Dank geht an meine Doktoreltern Frau Prof. Kerstin Junker und Herrn Prof. a.D. Friedrich August Grässer. Beiden danke ich gleichermaßen für Ihre Geduld und Nachsicht, vor allem im Hinblick auf die holprigen und zäheren Phasen meiner Promotion. In diesem Sinne danke auch der Dr. Rolf M. Schwiete Stiftung, die mit Ihrer finanziellen Unterstützung dieses Projekt möglich gemacht hat und auch in den schwierigen Phasen während der Pandemie für Planungssicherheit garantiert hat.

Kerstin danke ich von Herzen dafür, dass Sie mich so nachhaltig und mit Langmut gefordert und gefördert hat. Sie hat den Rahmen dafür geschaffen, dass ich mich in den vielen Jahren in vielen Bereichen persönlich und fachlich entfalten konnte. So hatte ich meist große Freiheiten, wenn es darum ging wissenschaftliche Fragestellungen umzusetzen und neue Wege zu gehen. Ein offenes Ohr und immer ein offenes Zeitfenster für Fragen und Besprechungen waren garantiert. Und die nötigen Freiräume für ehrenamtliches Engagement und zahlreiche Weiterbildungskurse wurden stets wohlwollend gewährt – großartig!

Herrn Grässer danke ich für seine doktorväterliche Fürsorge, dafür, dass er stets die Hand über mich gehalten hat und wenn es Not tat immer mit Rat und Tat zur Stelle war. Gerade am Ende des langen Weges zur Promotion war er sehr präsent und mir eine große Stütze. Für das seelische und moralische Gleichgewicht und die nötige Erdung sorgte der Mittwochsstammtisch, der mich schon seit dem Masterstudium begleitet und kurzzeitig verrückterweise dienstags stattfand. Kraft tanken konnte die eigene Psyche während der jährlichen Teilnahme an den Freizeiten der katholischen Pfarreiengemeinde Saarbrücken-St. Johann – das war sehr gut! Lob und Anerkennung möchte ich auch an alle Mitwirkenden der Gradiuertenzentren der Universität des Saarlandes (GradUS) und der Universität Trier (GUT) aussprechen. Namentlich und stellvertretend war Dr. Theo Jäger eine wichtige Anlaufstelle in Saarbrücken. Wenn es um Weiterbildungen, Förderungen oder Hilfe beim Aufbau des Doktorandenstammtisches ging, half er schnell und unkompliziert. Aus Trier möchte ich ausdrücklich Tobias Schank, Lisa Schneider und Marianne Hettrich würdigen, die mit viel persönlichem Engagement die Schreibwochen leiteten und durch ihren Einsatz mir an einigen steinigem Streckenabschnitten den Weg geebnet und das Weiterkommen erleichtert haben.

Meine Dankbarkeit gilt auch für alle ärztlichen, naturwissenschaftlichen und anderen Kolleginnen und Kollegen, die mich mit ehrlicher Freundlichkeit durch diese Zeit begleitet haben.

Herzlichen Dank meiner Verlobten, dass sie dieses und andere große Projekte all die Jahre an meiner Seite durch- und überstanden hat.

12. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

