

Aus der Klinik für Urologie und Urochirurgie der Medizinischen Fakultät Mannheim
der Universität Heidelberg

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Maurice Stephan Michel

Extrazelluläre Vesikel und ihr Integrinprofil im metastasierten Prostatakarzinom: von der Zellkultur zur klinischen Erprobung

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades an der
Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg

vorgelegt von
Lisa Frey

aus
Frankfurt am Main

2023

Dekan: Prof. Dr. Sergij Goerd

Referent: Prof. Dr. med. Jost von Hardenberg

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	3
1.1 Das Prostatakarzinom.....	3
1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie, Risikofaktoren.....	3
1.1.2 Symptome und Metastasierung	4
1.1.3 Diagnostik und Klassifikation	4
1.1.4 Therapie.....	7
1.2 Integrine und extrazelluläre Vesikel	9
1.2.1 Integrine	9
1.2.2 Extrazelluläre Vesikel.....	10
1.2.3 EV in der Tumorbilogie, Diagnostik und Therapie	14
1.2.4 EV und Integrine	15
1.3 Fragestellungen	17
2 MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Material.....	18
2.1.1 Geräte	18
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	19
2.1.3 Chemikalien, Puffer.....	20
2.1.4 Antikörper.....	20
2.1.5 Beads.....	21
2.1.6 Kits	21
2.1.7 Software.....	22
2.1.8 Zelllinie.....	22
2.1.9 Probanden- und Patientenproben.....	23
2.1.10 Kohorten- <i>in silico</i> Analysen.....	26
2.2 Methoden	27
2.2.1 Zellkultur	27

2.2.1.1	Zellkultivierung	27
2.2.1.2	Zellen einfrieren	27
2.2.1.3	Bestimmung der Zellzahl	27
2.2.1.4	Herstellung von EV-Produktionsmedium	28
2.2.1.5	Zellkultivierung zur Partikelisolation mittels Ultrazentrifugation	28
2.2.2	Blutaufbereitung Patientenproben	29
2.2.2.1	EV-Isolation aus Patientenplasma mittels exoEasy Kit.....	30
2.2.3	Nanopartikel Tracking Analysis (NTA)	31
2.2.4	Durchflusszytometrie	31
2.2.4.1	Kompensationsbeads	32
2.2.4.2	Zellfärbung für durchflusszytometrische Analysen	33
2.2.4.3	Partikelfärbung	33
2.2.5	Elektronenmikroskopie.....	34
2.2.6	Statistische Auswertungen.....	34
3	ERGEBNISSE	36
3.1	Kohorten- <i>in silico</i> Analysen	36
3.2	Methodenetablierung	38
3.2.2	Qualitätskontrolle der erfolgreichen EV-Isolation aus Zelllinien mittels EM und NTA-Analysen	39
3.2.3	Etablierung der Durchflusszytometrie	42
3.2.4	Unterschiede in der Einzel - und Mehrfachfärbung.....	46
3.2.5	Nachweis von EV-Markern auf EV von PC3-Zellen gekoppelt an verschiedene Dynabeads	48
3.2.6	Nachweis von EV-Markern auf EV von Probanden gekoppelt an verschiedene Dynabeads	49
3.2.7	Einfluss der Lagerungszeit auf die Partikelgröße – und zahl.....	50
3.2.8	Einfluss eines zusätzlichen Filterschritts auf Partikelgröße – und zahl	51
3.2.9	Charakterisierung der isolierten EV aus Plasmaproben gesunder Probanden, Patienten mit BPH und lokalisiertem PCa	52
3.2.10	Analyse des Markerpanels an gesunden Probanden	56
3.2.11	Analyse des Markerpanels an Patienten mit lokalisiertem PCa.....	57
3.2.12	Analyse des Markerpanels an Patienten mit lokalisiertem PCa und ossär metastasiertem PCa.....	58
3.3	Analyse der Neutax-Kohorte.....	60
3.3.1	Analyse der Patienten mit mCRPC	62

4 DISKUSSION	68
4.1 Diskussion der Methodik	69
4.1.1 Ist die Anreicherung der EV mit dem exoEasy Kit ein geeignetes Verfahren?	69
4.1.2 Limitationen der Durchflusszytometrie	70
4.2 Partikelkonzentration und Partikelgröße	72
4.2.1 Abfall Partikelkonzentration bei gleichbleibender Partikelgröße nach Verwendung eines zusätzlichen Filterschrittes	72
4.2.2 Partikelkonzentration gesunder Probanden und Patienten mit PCa	72
4.2.3 Partikelkonzentrationen und -größe im Hinblick auf das Auftreten einer VM.....	73
4.2.4 Partikelkonzentrationen und -größe unter Chemotherapie	75
4.3 Integrine	75
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	78
6 LITERATURVERZEICHNIS	80
7 PUBLIKATIONEN	89
8 TABELLARISCHER ANHANG	90
9 LEBENS LAUF	98
10 DANKSAGUNG	99

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AS	Active Surveillance/Aktive Überwachung
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
ATCC	American Type Culture Collection
BPH/BPS	Benigne Prostatahyperplasie/benignes Prostatasyndrom
BV	Brilliant Violet
CD	Cluster of Differentiation
CRPC/mCRPC	kastrationsresistentes Prostatakarzinom /metasta- siertes CRPC
CT	Computertomografie
DFS	disease free survival (deutsch: krankheitsfreies Überleben)
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENO1	Enolase 1
ESCRT	Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
EV	extrazelluläre Vesikel
FACS	Fluorescence-Activated-Cell-Sorting
FASN	Fatty Acid Synthase/Fettsäure-Synthase
FBS	Fetal Bovine Serum (fetales Kälberserum)
FcR	Fc-Rezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GS	Gleason Score
GTP	Guanosintriphosphat
HDR/LDR Brachytherapie	High-Dose-/Low-Dose-Rate Brachytherapie
Hsp	Hitzeschockprotein
IGF	Insulin-Like Growth Factor

ILV	intraluminale Vesikel
ISEV	International Society for Extracellular Vesicles
LHRH	Luteinisierendes-Hormon-Releasing-Hormon
mpMRT	multiparametrische Magnetresonanztomografie
MSKCC	Memorial Sloan Kettering Cancer Center
MVB	multivesicular Bodies
MW	Mittelwert
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PC	Prostatakarzinom
PDCD6IP	Programmed Cell Death 6 Interacting Protein
PE	Phycoerythrin
PE-Cy	PE-Cyanin
PSA	prostataspezifisches Antigen
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
m, miRNA	messenger-, micro-RNA
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rPx	radikale Prostatektomie
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SNARE-Komplexe	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
TCGA	The Cancer Genome Atlas Program
TNM-Klassifikation	Ankronym für T-tumor, N-odulus, M-metastase
TSG	Tumorsuszeptibilitätsgen
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UV	Ultraviolett
VM	viszerale Metastasierung
WW	Wachful Waiting/beobachtendes Abwarten
XPO1	Exportin 1

1 EINLEITUNG

1.1 Das Prostatakarzinom

1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie, Risikofaktoren

Das Prostatakarzinom (PCa) ist mit einer Inzidenz von ca. 59.000 Neuerkrankungen pro Jahr (Stand 2017, entsprechend 23% aller soliden Krebserkrankungen, das häufigste Karzinom des Mannes in Deutschland (Krebs in Deutschland, 2017). Nach dem Bronchialkarzinom ist das metastasierte PCa die zweithäufigste krebsassoziierte Todesursache. Das Risiko im Laufe des Lebens an einem PCa zu erkranken, beträgt in westlichen Industrienationen rund 40 % und steigt mit zunehmendem Alter. Das mittlere Erkrankungsalter liegt aktuell bei 69 Jahren (Krebs in Deutschland, 2017). Bei 10 % der erkrankten Männer wird das PCa symptomatisch und 3 % versterben an den direkten Folgen der Krebserkrankung (Bott et al., 2003). Das Überleben von Patienten mit einem metastasierten kastrationsresistente Prostatakarzinom (mCRPC), die eine Chemotherapie mit Docetaxel erhalten haben, ist abhängig vom Ort der Metastasierung. Eine ausschließlich lymphogene Metastasierung geht mit einem mittleren Überleben von 31,6 Monaten einher und reduziert sich bei Vorliegen von ossären Metastasen auf 21,3 Monate. Die schlechteste Prognose weisen Patienten mit einer viszeralen Metastasierung (VM) auf. Liegt eine pulmonale Metastasierung vor, beträgt das mittlere Überleben 19,4 Monate und reduziert sich bei Lebermetastasen auf 13,5 Monate (Halabi et al., 2016).

Die Ätiologie des PCa ist weitgehend ungeklärt und wird kontrovers diskutiert. Als wichtigster Risikofaktor gilt das steigende Alter. Als weiterer gesicherter Risikofaktor gilt zudem eine positive Familienanamnese (Cuzick et al., 2014; Zeegers et al., 2003). Studien aus Nordamerika konnten zeigen, dass Männer schwarzafrikanischer Herkunft häufiger und Asiaten seltener erkranken als Europäer (Grönberg, 2003). Zudem konnte innerhalb Europas ein Nord-Süd-Gefälle gezeigt werden (Grönberg, 2003). Als mögliche Ursachen kommen sozioökonomische Faktoren sowie Ernährungsgewohnheiten in Betracht. Phytoöstrogene und Antioxidantien, wie das in Tomaten enthaltene Lycoplen, konnte eine protektive Wirkung zugesprochen werden (Bostwick et al., 2004; Giovannucci et al., 2002; Ozasa et al., 2004). Ungesättigte Fettsäuren, ein erhöhter Body-Mass-Index, ionisierende- und UV-Strahlung, ein Vitamin-D-Mangel, erhöhte

IGF-Spiegel sowie eine chronische Inflammation des Urogenitaltraktes scheinen die Entstehung eines PCa zu begünstigen (Armstrong and Doll, 1975; Bostwick et al., 2004; Cuzick et al., 2014; Dennis et al., 2002). Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Tabakkonsum oder hohen Testosteronspiegeln und der Entstehung eines PCa konnte trotz zahlreicher Studien bisher nicht einheitlich dargestellt werden (Bostwick et al., 2004; Cuzick et al., 2014).

Als Ursachen für die Entstehung eines kastrationsrefraktären Prostatakarzinoms (CRPC), eines Tumors mit Resistenz gegen eine Androgentherapie, werden unterschiedliche Mechanismen, wie die Amplifikation, Überexpression und Mutation des Androgenrezeptors, eine ligandenunabhängige Hormonproduktion sowie eine veränderte Expression von Koaktivatoren des Androgenrezeptors, diskutiert (Maughan and Antonarakis, 2015).

1.1.2 Symptome und Metastasierung

Zu Beginn der Erkrankung bleibt das PCa in der Regel asymptomatisch. Durch lokale Größenzunahme kann es im Verlauf zu obstruktiven und irritativen Miktionsstörungen kommen. Hämaturie und Harnstauungsnieren stellen weitere Symptome dar. In lokal fortgeschrittenen Stadien kann es zu Nervenläsionen und in der Folge zu erektiler Dysfunktion kommen. Das PCa metastasiert lokal in die pelvinen Lymphknotenstation und im Rahmen der Fernmetastasierung hauptsächlich in das Skelettsystem. Bevorzugt bildet es osteoplastische Läsionen in der lumbosakralen Wirbelsäule. Symptomatisch stehen Knochenschmerzen und Allgemeinsymptome, wie Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust im Vordergrund. Eine VM in Leber oder Lunge ist selten und geht mit einer schlechten Prognose einher (S3 Leitlinie, 2019).

1.1.3 Diagnostik und Klassifikation

Der Großteil der Tumore wird in lokalisierten Stadien entdeckt und ist gut therapierbar. Dies ist nicht zuletzt auf die gesetzlichen Früherkennungsprogramme zurückzuführen (Krebs in Deutschland, 2017). Die aktuelle S3-Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) empfiehlt Männern ohne Risikofaktoren eine erste Vorsorgeuntersuchung ab dem 45. Lebensjahr. Ziel der Vorsorgeuntersuchung ist es diejenigen Männer in frühen Stadien zu finden, die an

einem aggressiven Tumor leiden und eine mutmaßliche Lebenserwartung von mindestens 10 Jahren haben (S3 Leitlinie, 2019). Eine Serumbestimmung von prostata-spezifischem Antigen (PSA) ist aufgrund der kontroversen Studienlage nicht Bestandteil des routinemäßigen, gesetzlich geförderten Screenings (S3 Leitlinie, 2019; Hoffman, 2011; Ilic et al., 2013; Schröder et al., 2014). Das Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG) kommt in seinem Abschlussbericht zu dem Ergebnis, dass die PSA-Bestimmung als Screeninginstrument mehr Männern durch Überdiagnose schade, als Nutzen bringe (IQWiG, 2019). Um Überdiagnose und Übertherapie durch ungerichtete PSA-Bestimmungen zu vermeiden, sollte auf eine bedachte Patientenauswahl und Interpretation der gewonnenen Werte geachtet werden (Draisma et al., 2009; Loeb et al., 2014). Benigne Erkrankungen, wie die benigne Prostatahyperplasie (BPH) und die Prostatitis, aber auch die digitale Manipulation der Prostata vor der Blutentnahme, können zu einer unspezifischen PSA Elevation führen (Balk et al., 2003). Die Suche nach sensitiveren und spezifischeren Laborparametern zur sicheren Früherkennung eines klinisch relevanten PCa für den klinischen Alltag ist bisher erfolglos (Cuzick et al., 2014).

Nach aktueller S3-Leitlinie werden Patienten, die einen kontrollierten PSA-Wert über 4 ng/ml oder einen deutlichen PSA-Anstieg oder ein karzinomverdächtiges Areal in der digital-rektalen Untersuchung aufweisen einer ultraschallgesteuerten systematischen Prostatastanzbiopsie (unter Entnahme von mindestens 10-12 Stanzzyllindern) zugeführt. Eine multiparametrische Magnetresonanztomografie der Prostata (mpMRT) der Prostata sollte in der Primärdiagnostik und bei PCa Verdacht trotz negativer systematischer Biopsie erfolgen (S3 Leitlinie, 2019).

Die histologische Klassifikation erfolgt anhand des Gradings nach Gleason, welches den Differenzierungsgrad der Drüsenmorphologie beschreibt (Gleason-Grad 1: gut differenziert; Gleason-Grad 5: undifferenziert). Nach einer Stanzbiopsie berechnet sich der Gleason-Score aus den beiden am häufigsten vorkommenden Drüsenarchitekturen und nach einer Prostatektomie wird unter Betrachtung des gesamten Resektates der Gleason-Score aus dem am häufigsten vorkommenden Drüsenmuster und dem am schlechtesten differenzierten Drüsenmuster gebildet (Epstein et al., 2005).

Die Einteilung des PCa nach TNM-Stadien (T-tumor, N-odulus, M-etastase) erfolgt anhand der aktuellen Union internationale contre le cancer (UICC) - Klassifikation (siehe Tab. 1 und 2).

Tab. 1: TNM Klassifikation des Prostatakarzinoms (PCa), (Tabelle nach Wittekind, Klimpfinger, Sobin, TNM-Atlas, Springer, 5. Auflage, 2005).

TNM	Ausdehnung	klinische Einteilung
T1	klinisch nicht erkennbarer Tumor, weder tast- noch sichtbar. T1a: PCa in <5% des untersuchten Präparates (Zufallsbefund) T1b: PCa in >5% des untersuchten Präparates (Zufallsbefund) T1c: PCa in Stanzbiopsie bei nicht tastbarem Tumor	lokal begrenztes PCa
T2	auf die Prostata begrenzt, Prostatakapsel intakt. T2a: Befall von <50% eines Seitenlappens T2b: Befall von >50% eines Seitenlappens T2c: Befall beider Seitenlappen	
T3	extraprostatitisches Tumorwachstum, Tumor durchbricht Prostatakapsel. T3a: extrakapsuläre Ausbreitung T3b: Samenblaseninfiltration	lokal fortgeschrittenes PCa
T4	Infiltration von Nachbarorganen: Harnblase, Rektum, Schließmuskel, Beckenwand	
N1	regionärer Lymphknotenbefall	fortgeschrittenes bzw. metastasiertes PCa
M1	Fernmetastasen M1a: extraregionäre Lymphknotenmetastasen M1b: Knochenmetastasen M1c: andere Fernmetastasen	

Tab. 2: Union Internationale Contre le Cancer (UICC-Stadien) des PCa (Tab. nach Bierley *et al.*)

UICC-Stadium	TNM
I	bis T2a
II	T2b oder T2c
III	T3
IV	T4 oder N1 oder M1

Im klinischen Alltag kann das lokal begrenzte PCa, z.B. unter Berücksichtigung von PSA-Wert, Gleason-Score im Biopsat und klinischem Tumorstadium, bezüglich des Progressions- und Rezidivrisikos stratifiziert werden (D'Amico et al., 1998). Bei Patienten mit niedrigem Risiko (PSA \leq 10 ng/ml und Gleason 6 und cT1c/2a) kann auf eine bildgebende Staginguntersuchung aufgrund der geringen Wahrscheinlichkeit eines organüberschreitenden Wachstums oder einer Metastasierung verzichtet werden. Patienten mit einem hohen Risiko (PSA $>$ 20 ng/ml oder Gleason \geq 8 oder cT2c) sollten vor Einleitung einer Therapie ein Staging der Beckenorgane mittels MRT oder Computertomografie (CT) bekommen. Patienten mit Knochenschmerzen, einem PSA $>$ 10 ng/ml, einem Gleason $>$ 7 oder einem T3/4 Tumor wird eine Skelettszintigraphie geraten (Abuzallouf et al., 2004; S3 Leitlinie, 2019).

In der klinischen Nachsorge wird zur frühzeitigen Detektion eines biochemischen Rezidivs die regelmäßige Kontrolle des PSA-Wertes empfohlen, um ein solches Rezidiv möglichst vor dem Entstehen klinischer Symptome und Metastasierung zu erkennen (Freedland, 2011).

Eine der zentralen Schlüsselpunkte liegt in der Differenzierung von aggressiven Tumorformen, die in der Primärsituation einer raschen Therapie und in der Nachsorge einer intensiven Überwachung bedürfen, von indolenten, möglicherweise klinisch stets insignifikanten Formen (Taylor et al., 2010). In fortgeschrittenen Stadien gelingt die Detektion von viszeralen Metastasen bisher nur durch bildgebende Diagnostik, wenn die Metastasen eine ausreichende Größe erreicht haben. Diagnostische Parameter, wie die Entwicklung verschiedener Scores auf der Basis von Genexpressionsprofilen, um eine viszerale Metastasierung zu erkennen bevor sie makroskopisch in der Schnittbildgebung oder Sonografie sichtbar wird oder um ihr zukünftiges Auftreten vorherzusagen, konnten sich bisher nicht etablieren (Amaro et al., 2014). Die Entwicklung diagnostischer Marker für ein gezieltes, personalisiertes Diagnostik- und Therapieregime könnten neben der schnelleren Therapieeinleitung unnötige Belastungen für Patient und das Gesundheitswesen zukünftig reduzieren.

1.1.4 Therapie

Um für den Patienten ein individuelles, stadiengerechtes Therapieregime zu planen, spielen neben der gängigsten Risikostratifizierung nach D'Amico (D'Amico et al., 1998), die voraussichtliche Lebenserwartung des Patienten, seine Komorbiditäten und

Wünsche sowie das Nebenwirkungsprofil der einzelnen Behandlungsoptionen eine entscheidende Rolle.

Im Allgemeinen stehen folgende Therapieoptionen zur Verfügung:

- Watchful Waiting (WW) / beobachtendes Abwarten
- Active Surveillance (AS) / aktive Überwachung
- radikale Prostatektomie (rPx)
- perkutane Radiotherapie
- Low-Dose- (LDR-) und High-Dose- (HDR-) Brachytherapie
- Hormonablative Therapie
- Chemotherapie
- Transurethrale Resektion

Für Patienten mit niedrigem Risikoprofil kommen AS oder ein WW (bei einer Lebenserwartung von weniger als zehn Jahren) in Frage. Bei Befundverschlechterung werden die Patienten im Behandlungsmodell der AS einer kurativen Therapie zugeführt, wohingegen eine klinische Verschlechterung bei WW palliativ therapiert wird (S3 Leitlinie, 2019). Das lokalisierte PCa kann in kurativer Intention in allen Risikogruppen mittels rPx mit ggf. Lymphadenektomie (offen, laparoskopisch oder roboterassistiert) oder perkutaner Radiotherapie, je nach Risikokonstellation in Kombination mit einer hormonablativen Therapie und/oder LDR-Brachytherapie, behandelt werden. Je nach Risikokonstellation stehen Patienten mit einem lokal begrenzten PCa verschiedene Varianten der alleinigen Brachytherapie zur Verfügung (S3 Leitlinie, 2019). Zudem kann bei unvollständiger Resektion oder lokal fortgeschrittenen Stadien eine adjuvante Radiotherapie und/oder hormonablative Therapie nötig sein (S3 Leitlinie, 2019).

Für Patienten mit primär metastasiertem PCa stehen als palliative Therapieoptionen Varianten der hormonablativen Therapie ggf. in Kombination mit einer taxan-basierten Chemotherapie (Docetaxel) oder Abirateron (plus Prednison/Prednisolon) oder die neuen Antiandrogene Apalutamid und Enzalutamid zur Verfügung. Die Androgenprivation kann mittels luteinisierendem-Hormon-Releasing-Hormon- (LHRH) Agonisten, Gonadotropin-Releasing-Hormon- (GnRH) Antagonisten, Hemmern der Androgensynthese, klassischen Antiandrogenen oder durch bilaterale subkapsuläre Orchiektomie erfolgen (S3 Leitlinie, 2019).

Liegt ein CRPC oder androgenunabhängiges metastasiertes PCa vor, bleiben als palliative Therapiemöglichkeiten die Gabe von Abirateron (plus Prednison/Prednisolon), Docetaxal und Enzalutamid. Als Zweitlinien-Chemotherapie kann Cabazitaxel eingesetzt werden und auch nuklearmedizinische Verfahren wie die Behandlung mit PSMA-Ligandentherapie oder Radium-223 haben ihren Stellenwert. Weitere zielgerichtete Substanzen befinden sich aktuell in der Erprobungsphase und haben noch experimentellen Charakter (S3 Leitlinie, 2019).

Knochenmetastasen können präventiv mit Denosumab oder Bisphosphonaten und symptomatisch durch medikamentöse Schmerztherapie, Radiatio oder operative Intervention therapiert werden (Cornford et al., 2017; S3 Leitlinie, 2019; Fizazi et al., 2017; Gravis et al., 2013).

1.2 Integrine und extrazelluläre Vesikel

1.2.1 Integrine

Integrine sind transmembranäre Proteine, welche die extrazelluläre Matrix mit dem intrazellulären Zytoplasma verbinden. Aufgebaut sind sie als Heterodimere aus je einer α - und β -Untereinheit. Bisher sind 18 α - und 8 β -Untereinheiten bekannt, die sich zu 24 verschiedenen Adhäsions-Rezeptoren mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften und unterschiedlicher Gewebeverteilung zusammensetzen können (Campbell and Humphries, 2011). Sie sind an diversen physiologischen und pathophysiologischen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt. Unter anderem haben sie Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus und somit auf Zelldifferenzierung, Proliferation und Zelltod (Cooper and Giancotti, 2019; Giancotti and Ruoslahti, 1999; Salemi et al., 2021; Sun et al., 2014). Des Weiteren spielen sie eine Rolle bei der Zellmigration, Genexpression und Aktivierung von Wachstumsfaktoren (Goel et al., 2008). Bei der Tumorgenese führt eine veränderte Integrinexpression zu einer verstärkten Tumorzellmigration und -invasion. Integrine sind somit an den wesentlichen Schritten der Tumorprogression, von der Entwicklung des Primarius bis zur Metastasierung, beteiligt (Hamidi and Ivaska, 2018; Valdembri and Serini, 2021). Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass veränderte Integrinprofile eine entscheidende Rolle bei der Progression des PCa spielen. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigten sich im PCa reduzierte Level der Integrine $\alpha 5$ und $\alpha 7$ sowie erhöhte Konzentration der Integrine $\alpha \beta 1$, $\alpha \beta 3$, $\alpha \beta 6$ und

$\alpha\beta 1$ (Drivalos et al., 2016; Fedele et al., 2015; Krishn et al., 2019; Lu et al., 2018; Zhang et al., 2019). Neben der Tumorprogression können Integrine Einfluss auf die Entwicklung einer Chemotherapieresistenz (Gasca et al., 2020), Angiogenese (Krishn et al., 2020), Metastasierung (Connell et al., 2020) und die Entstehung einer neuroendokrinen Differenzierung (Quaglia et al., 2020) haben.

1.2.2 Extrazelluläre Vesikel

Aufgrund eines bisher uneinheitlichen Begriffsgebrauchs ist die Einordnung und Vergleichbarkeit der erhobenen Daten zum Thema extrazelluläre Vesikel (EV) unter verschiedenen Arbeitsgruppen schwierig. Neben dem uneinheitlichen Sprachgebrauch ist eine klare Klassifizierung aufgrund der zum Teil unklaren Biogenese der EVs erschwert.

In dieser Studie wird der Begriff EV und Exosomen analog der Definition der International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) und deren 2018 aktualisierten Positionspapier „*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*“, verwendet.

Die Einteilung und Differenzierung der EV beruht auf deren physikalischen und morphologischen Eigenschaften, wie Größe und Dichte, ihrer biochemischen Zusammensetzung und ihrem Entstehungsort bzw. ihrer Funktion. Sie können mittels Ultrazentrifugation bei mindestens 100.000 x g pelletiert werden, reichern sich in einem Sucrose-Gradienten bei einer Dichte zwischen 1,13 bis 1,19 g/ml an und können in der Elektronenmikroskopie sowie mittels massenspektrometrischer und Antikörper-basierter Verfahren identifiziert und spezifiziert werden (Thery et al., 2018).

EV sind von einer Lipiddoppelschicht, ähnlich einer Zellmembran, umhüllt und enthalten Proteine, Lipide und Nukleinsäuren (miRNA, RNA, nicht-kodierende RNA). Sie sind als Informationsträger in Körperflüssigkeiten, wie Blut, Speichel, Urin und Muttermilch nachweisbar (Vlassov et al., 2012).

Biogenese, Aufbau, Funktion und deren Implikation für Diagnostik und Therapie diverser onkologischer und chronischer Erkrankungen sind in der letzten Dekade zunehmend Gegenstand aktueller Forschung geworden (. 1).

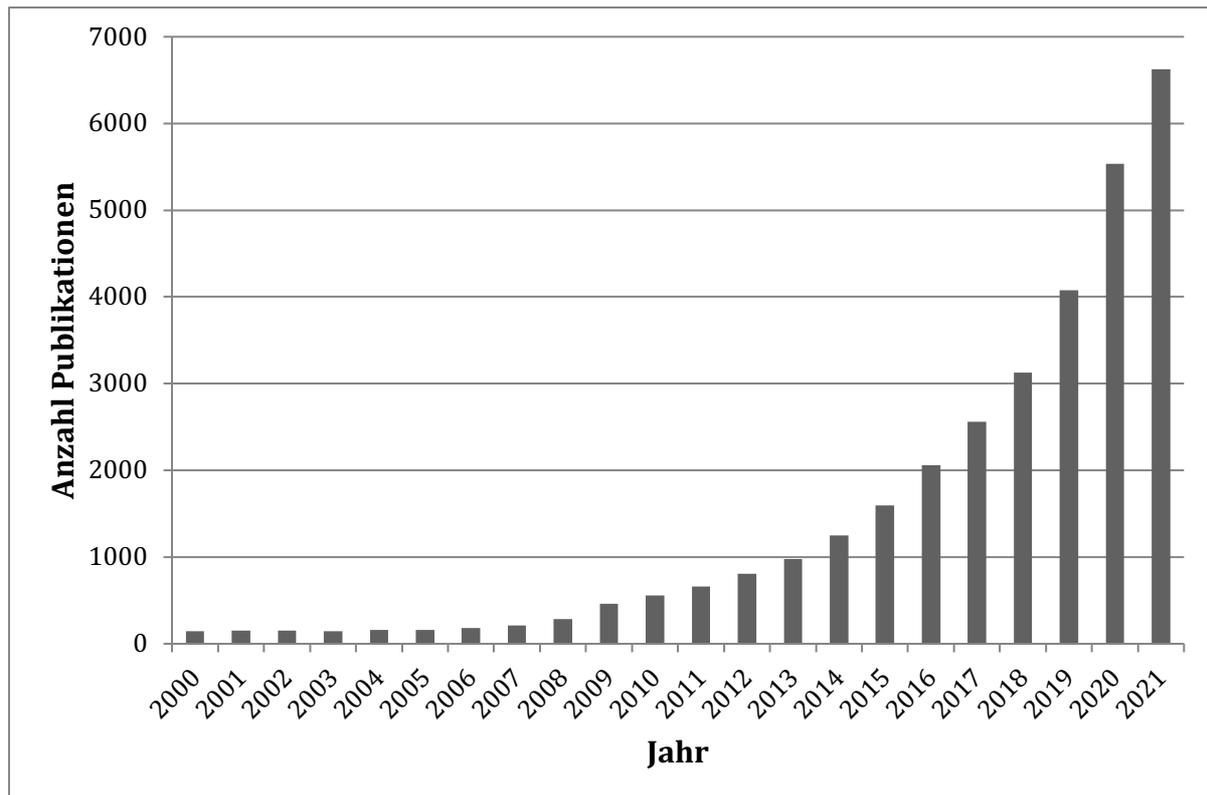


Abb. 1: zeitlicher Verlauf der wissenschaftlichen Publikationen zu „extrazellulären Vesikeln“ bei PubMed zwischen 2000 und 2021 (zugegriffen am 25.09.2022)

Zur Gruppe der EV gehören neben Mikrovesiklen (100 nm – 1000 nm), die aus Abschnürungen der Plasmamembran entstehen, auch kleinere Membranvesikel, die sogenannten Exosomen (30 nm – 150 nm). Sie entstehen durch die Fusion von multivesikulären Endosomen zu multivesikulären Körperchen (MVB, multivesicular bodies). Wenn diese zytosolisch gelegenen MVB mit der Zellmembran fusionieren, werden die Exosomen in den Extrazellulärraum freigesetzt (They et al., 2018). MVBs entstehen unter dem Einfluss von Komponenten des Endosomal Sorting Complexes Required For Transport (ESCRT). Nach der Identifizierung ubiquitinylierter Proteine reichern sie diese an der endosomalen Membran an, erzeugen Membraneinstülpungen und initiieren die Vesikelabschnürung. In die ESCRT-unabhängige Entstehungsmechanismen der MVBs sind Lipide, Tetraspanine und Hitzeschockproteine involviert (Colombo et al., 2013). Der Abbau der MVBs, die nicht mit der Zellmembran fusionieren, erfolgt durch die Fusion mit Lysosomen (Kowal et al., 2014). Die intrazellulären Vorgänge bei der Vesikelgenese sind in Abb. 2 dargestellt.

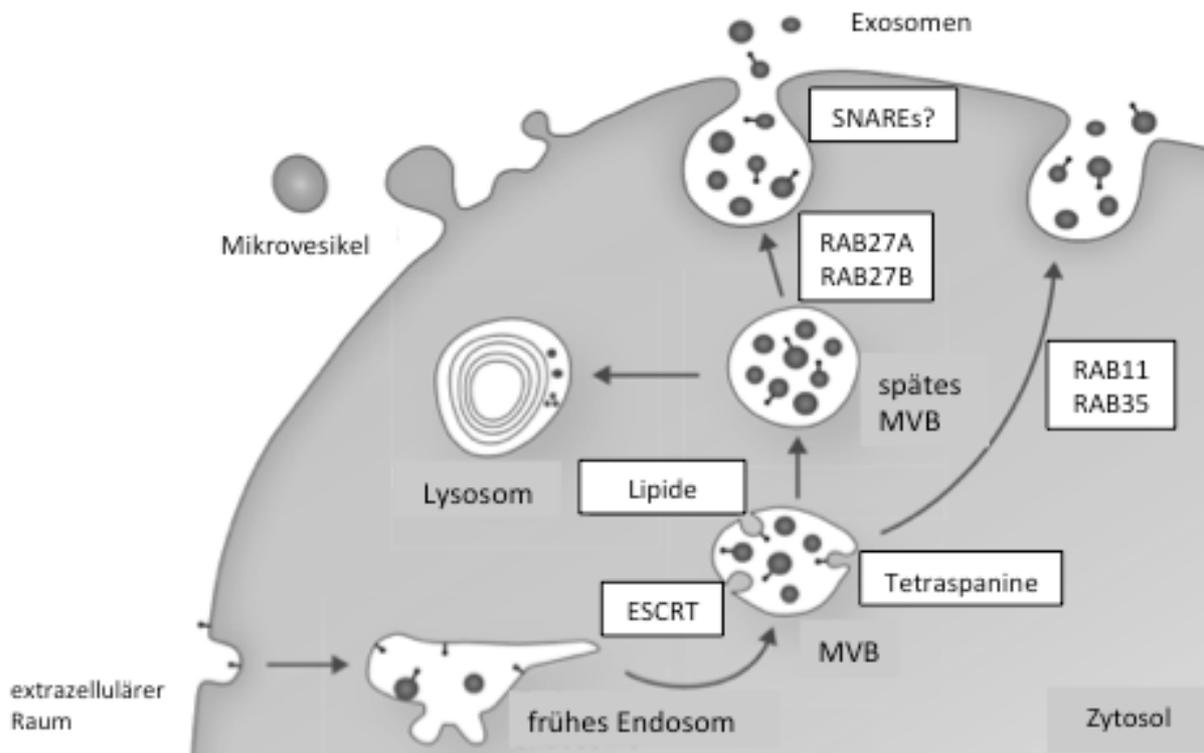


Abb. 2: Intrazelluläre Mechanismen der exosomal Biogenese und Sekretion (Abbildung und Beschreibung modifiziert nach Kowal *et al.*, 2014). Schematische Darstellung der Herkunft und Freisetzung von Exosomen aus eukaryotischen Zellen. Exosomen werden als intraluminal Vesikel (ILV) durch die Ausknospung an der Membran von frühen Endosomen und an Multivesicular Bodies (MVB) gebildet. An der Biogenese der ILVs sind diverse Moleküle, wie die Endosomal Sorting Complexes Required For Transport (ESCRT)-Komponenten, Lipide (u.a. Ceramide) und Tetraspanine beteiligt. Die MVBs fusionieren entweder mit Lysosomen oder mit der Zellmembran, wodurch sie ihren Inhalt ins extrazelluläre Milieu entlassen. In den Transport der MVBs und die Freisetzung der Exosomen sind zahlreiche Rab-Proteine (RAB11, RAB27, RAB35) involviert. Die löslichen N-Ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptors (SNARE) - Komplexe sind vermutlich an der Fusion der MVBs mit der Plasmamembran beteiligt. Andere sekretierte Partikel werden direkt an der Plasmamembran abgeschnürt und werden als Mikrovesikel oder Mikropartikel bezeichnet.

Aufgrund ihres endosomalen Ursprungs zeigen EV ein typisches Merkmalsprofil (Tab. 3).

Tab. 3: Typische Protein- und Lipidzusammensetzung von Exosomen (They et al., 2018; Vlassov et al., 2012).

Proteine	Lipide
Transport- und Membranproteine (z.B. Guanintriphosphat (GTP) -bindendes Protein, Annexin, Flotillin)	Cholesterol Sphingolipiden (bspw. Ceramide)
Tetraspanine (z.B. CD9, CD63, CD81, CD82)	Phosphoglyceriden
Hitzeschockproteine (z.B. Hsp 70, Hsp 90)	
Proteine zur Bildung multivesikulärer Endosomen (z.B. Alix, Tumor susceptibility gene (TSG) 101)	

Interzelluläre Kommunikation kann neben direktem Zell-Zell-Kontakt oder über sekretierte Moleküle auch durch EV stattfinden. EV ermöglichen durch den Transport von Nukleinsäuren den interzellulären Informationsaustausch zwischen weit entfernten Körperkompartimenten (Belting and Wittrup, 2008). Exosomen haben abhängig von ihren Ursprungszellen und deren Situation unterschiedliche physiologische und pathophysiologische Funktionen. Nach Aufnahme in die Zielzelle können sie durch Beeinflussung von Transkription, Translation und post-translationaler Modifikation, Metabolismus und Homöostase der Zielzelle verändern. Neben den physiologischen Funktionen im Rahmen der Immunmodulation, Proliferation, dem programmierten Zelltod, der Koagulation und Angiogenese spielen sie in diesen und weiteren Bereichen auch bei pathophysiologischen Vorgängen eine Rolle (Vlassov et al., 2012).

Dadurch können Tumorexosomen im Rahmen der Fernmetastasierung über Integrine, durch die Interaktion mit residenten Zellen im Zielorgan zur Ausbildung einer prämetastatischen Nische dienen (Hoshino et al., 2015). Durch Ausbildung einer solchen Nische wird es zirkulierenden Tumorzellen erleichtert sich in einem spezifischen Organ anzusiedeln. Zudem können sie Zielzellen morphologisch und funktionell so verändern, dass es zu einer malignen Progression kommen kann (Lugini et al., 2016).

1.2.3 EV in der Tumorbilogie, Diagnostik und Therapie

Trotz zahlreicher wissenschaftlicher Erfolge hat sich für maligne Erkrankungen der Prostata bisher kein zuverlässiger, spezifischer Tumormarker etablieren können. Besonders fehlen Marker, die Patienten in frühen Stadien erkennen und zur Rezidiv- und Progressionsdiagnostik genutzt werden können. Biomarker, die eine potentielle Metastasierung mit Vorhersage der Lokalisation der Metastasierung voraussagen, fehlen gänzlich. Das PSA als Marker in der Diagnostik und Nachsorge des PCa wird seit Jahren kontrovers diskutiert, da es aufgrund seiner niedrigen Spezifität immer wieder zu Fehl- und Überdiagnosen (schlechte Diskrimination von benignen Prostataerkrankungen zu malignen Erkrankungen) und infolgedessen zu Übertherapie mit den bekannten Nebenwirkungen der etablierten Therapiemethoden kommt (Hoffman, 2011; IQWiG, 2019).

Da EV tumorspezifische Signaturen tragen können, gelten sie als Hoffnungsträger in der Tumordiagnostik und Therapieüberwachung. Da auch gesunde Zellen EV sezernieren, ist die Anreicherung von krebsspezifischen EV erforderlich, um einen möglichst aussagekräftigen Biomarker zu identifizieren. Ein weiterer Vorteil von EV besteht in der einfachen, kaum invasiven Gewinnung aus leicht zugänglichen Körperflüssigkeiten, wie Blut und Urin (Cappello et al., 2017).

Logozzi et al. konnten zeigen, dass Plasmaproben von Patienten, die an einem malignen Melanom erkrankten im Vergleich zu Plasmaproben von gesunden Probanden erhöhte Exosomenkonzentrationen aufwiesen (Logozzi et al., 2009). Untersuchungen von Patienten mit PCa, hämatologischen Tumoren und kolorektalen Karzinomen kamen zu vergleichbaren Ergebnissen und zeigten, dass insbesondere diese EV in erhöhter Konzentration vorlagen, die Marker exprimierten, die auf ihren zellulären Ursprung (Tumor) verwiesen (Caivano et al., 2015; Duijvesz et al., 2015; Nawaz et al., 2014; Silva et al., 2012). Die Veränderung der Menge zirkulierender EV könnte zudem Hinweise auf die Effektivität einer medikamentösen Tumorthherapie liefern (Cappello et al., 2017).

Als vielversprechender Biomarker für das Pankreaskarzinom konnte das exosomale Proteoglykan Glypican 1 identifiziert werden. Es korreliert mit der Höhe der Tumormarkierung und kann zwischen gesunden Probanden, benignen Pankreaserkrankungen sowie zwischen frühen und späten Stadien des Pankreaskarzinom differenzieren (Melo et al., 2015). Die Isolation von EV aus PCa-Zelllinien und aus Patientenplasma konnte diverse Proteine, wie Claudin 3, „programmed cell death 6 interacting protein“

(PDCD6IP), Fettsäure-Synthase (FASN), Exportin 1 (XPO1) und Enolase 1 (ENO1) als potentielle Biomarker für das PCa identifizieren (Duijvesz et al., 2013; Worst et al., 2017).

Patienten, die an einem fortgeschrittenen, metastasierten PCa litten, zeigten im Vergleich zu Patienten ohne Metastasierung oder gesunden Probanden eine höhere Plasmakonzentration von CD9 und PSMA positiven Exosomen (Mizutani et al., 2014). Im Urin von Patienten mit PCa konnten nach der digital rektalen Manipulation erhöhte Konzentration an CD9, CD63 und PSA positiver Exosomen gemessen werden (Duijvesz et al., 2015). Als potentielle Kandidaten sind auch Nukleinsäuren, wie die mRNA-Biomarker PCA-3 und TMPRSS2:ERG sowie miR-10a-5p, miR-29b-3p, miR-375 und miR-1290 beim PCa von Interesse (Huang et al., 2015; Nilsson et al., 2009; Worst et al., 2019).

Neben den diagnostischen Möglichkeiten könnten EV auch als Vehikel für neue Therapeutika dienen, die zielgerichtet ihren Inhalt (bspw. Medikament) zu einer Zielzelle transportieren und dort freigegeben (Fais et al., 2016; Fang et al., 2014; Lener et al., 2015).

1.2.4 EV und Integrine

Nicht nur die zelluläre Integrinexpression, sondern insbesondere die Präsenz auf EV trägt zur Organotropie der Metastasierung bei (Hoshino et al., 2015). Hoshino et al. konnten zeigen, dass die Integrinbeladung der Tumorexosomen zur Modifikation der Zielzellen und Ausbildung einer prämetastatischen Nische beiträgt und dadurch den Gewebeorganotropismus festlegt. Durch die Ausbildung einer prämetastatischen Nische können sich Tumorzellen, die sich normalerweise eher in anderen Geweben ansiedeln, im Gewebe ansiedeln und Tumormetastasen bilden. Integrine auf EV fusionieren zielgerichtet mit spezifischen Geweben und aktivieren Signalwege, die eine Umgebung schaffen (erhöhte Gefäßpermeabilität, proangiogenetische Faktoren, Inflammation, etc.), die es den Tumorzellen erleichtert sich anzusiedeln. In Pankreas- und Mammakarzinomzelllinien konnten sie zeigen, dass bestimmte exosomale Integrine mit spezifischen Metastasierungsorten assoziiert sind. Eine Überexpression der Integrine $\alpha 6$ und deren Partner $\beta 1$ und $\beta 4$ führt zu einer Organotropie in die Lunge. Die Integrine αv und $\beta 5$ sind vorzugsweise in Tumorexosomen mit Lebertropismus exprimiert (Abb. 3).

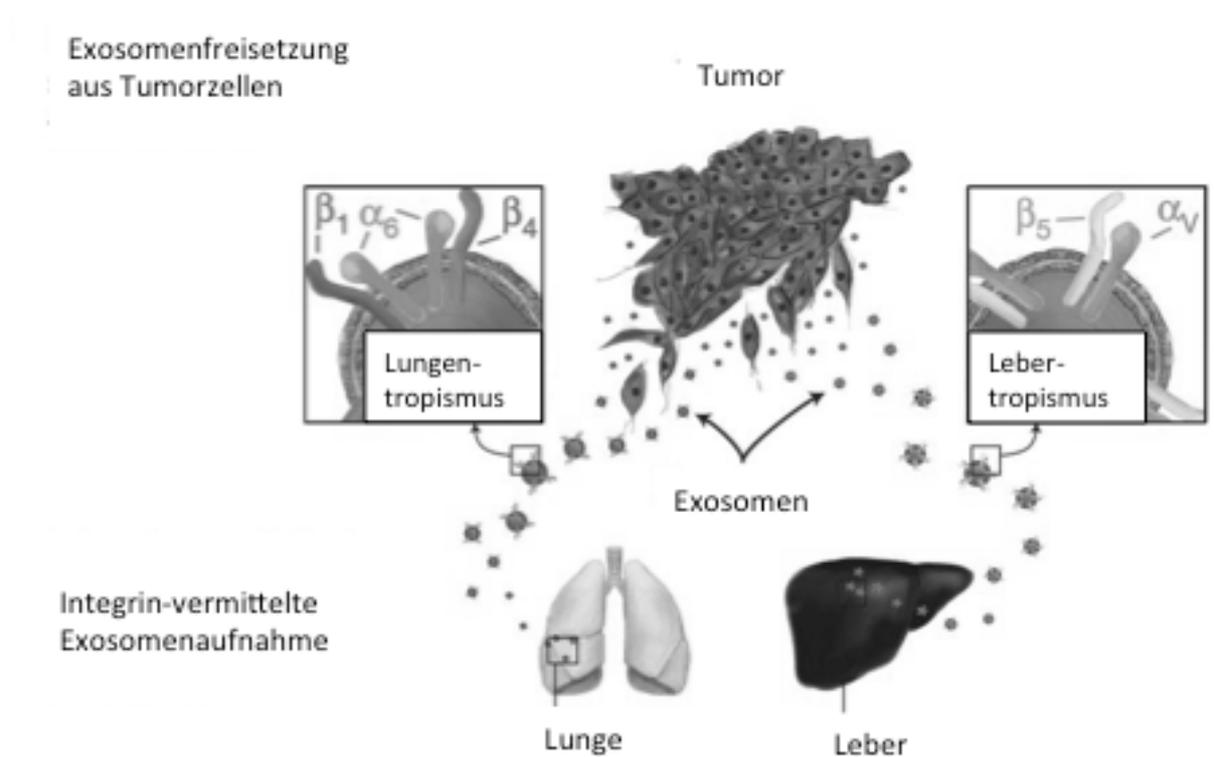


Abb. 3: Exosomale Integrinexpression als potentieller Prädiktor der organesepezifischen Metastasierung. Abbildung und Beschreibung nach Hoshino et al., (2015). Schematische Darstellung der von Exosomen vermittelten organotropen Tumorausbreitung. Tumorexosomen werden abhängig von ihrem Integrinprofil in residente Zielzellen zukünftiger Organmetastasen aufgenommen.

Durch den exosomalen Transport können Integrine, wie die Integrine $\alpha\beta_6$ und $\alpha\beta_3$ nicht nur in der Zelle wirken in der sie synthetisiert werden, sondern auch durch Aufnahme in weit entfernten Zellen mit niedriger oder fehlender Expression von Integrin $\alpha\beta_6$ - bzw. $\alpha\beta_3$. So könnten sie durch die Beeinflussung von Zelladhäsion und -migration zur Tumorprogression und Metastasierung des PCa beitragen (Fedele et al., 2015; Krishn et al., 2019). Eine erhöhte Expression von $\alpha\beta_3$ mündet zudem in der Ausbildung von metastatischen Läsionen im Knochen (Krishn et al., 2019). Vermittelt durch die exosomal transportierte miR-1247-3p hochmaligner Leberzellkarzinomzellen kommt es zur Aktivierung des β_1 -Integrin-NF κ B Signalweges in Fibroblasten und zur Ausbildung einer prämetastatischen Nische im Lungengewebe (Fang et al., 2018).

1.3 Fragestellungen

Im Gegensatz zu EV aus benignen Prostatazellen besitzen EV aus PCa-Zellen die Fähigkeit die Krankheitsprogression zu beschleunigen (Abd Elmageed et al., 2014). Die prometastatischen Eigenschaften der EV von Patienten mit einem PCa könnten in der veränderten Vesikelbeladung oder in der erhöhten Sekretion begründet liegen.

Ein besseres Verständnis der Rolle des Integrinprofils von EV für die Organotropie im PCa könnte dazu beitragen neue diagnostische Marker und therapeutische Mechanismen zur Beeinflussung der Krankheitsprogression zu entwickeln. Daher stellen sich folgende Fragen:

- Ist die Durchflusszytometrie eine geeignete Methodik zur Analyse der Oberflächensignaturen auf EV?
- Unterscheiden sich die Konzentrationen und Größenverteilungen der EV aus Blutproben von Patienten mit viszeral metastasiertem PCa, Patienten mit ossären Metastasen, Patienten ohne Metastasen und benignen Kontrollpatienten?
- Finden sich Unterschiede in Konzentration und Größenverteilung im Hinblick auf das Auftreten von Leber-, Lungen- und Knochenmetastasen?
- Verändern sich Konzentrations- und Größenverteilung der EV unter medikamentöser Therapie mit Docetaxel?
- Sind die Konzentrations- und Größenverteilung der EV mit den klinischen Endpunkten PSA-Ansprechen und krebsspezifisches Überleben assoziiert?
- Sind die Integrine CD51 (α v), CD29 (β 1) und CD104 (β 4) auf EV aus dem Blutplasma von Patienten mit metastasiertem PCa nachweisbar?
- Unterscheiden sich die Integrinsignaturen der EV im Hinblick auf das Auftreten von Leber-, Lungen- und Knochenmetastasen?

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wird die Eignung der EV und die Rolle von Integrinen für die Prädiktion viszeraler Metastasierungsmuster untersucht. Ziel ist es ein besseres Verständnis der unterschiedlichen Expression bestimmter Integrine auf EV bei der Entstehung von Fernmetastasen. Dies ist notwendig für weitere diagnostische Fortschritte, zur besseren Risikostratifizierung, Therapieüberwachung und Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

In dieser Arbeit wurden folgende Geräte verwendet (Tab. 4).

Tab. 4: verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Analysenwaage Sartorius LC 2200 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
CO ₂ -Inkubator Binder Serie CB210	Binder, Tuttlingen, Deutschland
FACS Canto TM II	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Gefrierschrank -80°C	Ewald Innovationstechnik, Rodenberg, Deutschland
Kühl- und Gefrierschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlkammer 4°C	Viessmann, Allendorf, Deutschland
Lichtmikroskop Zeiss Axio Vert.A1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
LUNA-FL TM Dual Fluorescence Cell Counter	logos biosystems, Südkorea
Magnetischer Separator MagneSphere®	Promega, Wisconsin, USA
Magnetrührer RCT basic	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland
Minizentrifuge Sprout	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Manuelle Pipetten 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe (akku-betrieben) Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Sorvall TM Zentrifuge RC 6 Plus	Thermo Fisher, Waltham, USA
Standautoklav Tuttnauer 5075 ELV	Tuttnauer, Breda, Niederlande
Taumelschüttler Biometra WT12	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Tischzentrifuge Heraeus TM Labofuge TM 400R	Thermo Fisher, Waltham, USA
Tischzentrifuge Universal 30RF	Hettich AG, Bäch, Schweiz

Ultrazentrifuge Discovery 100SE Festwinkelrotor T-865	Thermo Fisher, Waltham, USA
Ultrazentrifuge Optima XPN-80 Festwinkelrotor Typ 45 Ti	Beckman Coulter, Kalifornien, USA
Vibrationsschüttler Sunlab SU1900	Sunlab Sustainable Lab Instruments, Mannheim, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zellkulturwerkbank Herasafe TM KSP18	Thermo Fisher, Waltham, USA
ZetaView® TWIN	Particle Metrix GmbH, Inning am Ammersee, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

In dieser Arbeit wurden folgende Materialien verwendet (Tab. 5 - 10).

Tab. 5: verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Filterpipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Starlab, Hamburg, Deutschland & Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kryoröhrchen 2 ml	Thermo Fisher, Waltham, USA
Parafilm	Bemis, Wisconsin, USA
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
serologische Pipettenspitzen 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Spritzen 1 ml, 10 ml	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Spritzenfilter Rotilabo® 220 nm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ultrazentrifugenröhrchen Polycarbonat 26,3 ml	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Zentrifugenröhrchen Rundboden 5 ml	Corning, New York, USA

2.1.3 Chemikalien, Puffer

Tab. 6: verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Albumin bovine fraction V (BSA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMEM mit 4,5 g/l D-Glucose, L-Glutamin	Thermo Fisher, Waltham, USA
Dulbecco-PBS (DPBS) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Thermo Fisher, Waltham, USA
Ethanol vergällt	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
McCoy's 5A Medium	Thermo Fisher, Waltham, USA
RPMI 1640 Medium	Thermo Fisher, Waltham, USA
Metribolone (R1881)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypan Blue Stain 0,4 %	Thermo Fisher, New Jersey, USA
Trypsin/EDTA 0,25 %	Thermo Fisher, Waltham, USA

Tab. 7: verwendete Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Assay Puffer	DPBS + 0,1 % BSA
Einfriermedium	DMEM + 10 % FBS + 10 % DMSO
Färbepuffer	DPBS + 1 % FBS

2.1.4 Antikörper

Tab. 8: verwendete Antikörper

Antikörper	Clone	Hersteller
AlexaFluor®647 Mouse Anti-Human CD51	NKI-M9	Becton Dickinson, New Jersey, USA
BV421 Rat Anti-Human CD104	439-9B	Becton Dickinson, New Jersey, USA
BV510 Mouse Anti-Human CD29	MAR4	Becton Dickinson, New Jersey, USA
FcR Blocking Reagent human		Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

FITC Mouse Anti-Human CD81	JS-81	Becton Dickinson, New Jersey, USA
PE-Cy TM 7 Mouse Anti-Human CD63	H5C6	Becton Dickinson, New Jersey, USA
PE Mouse Anti-Human CD9	M-L13	Becton Dickinson, New Jersey, USA

2.1.5 Beads

Tab. 9: verwendete Beads

Beads	Hersteller
BD TM CompBeads Set Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control Compensation Particles Set	Becton Dickinson, New Jersey, USA
BD TM CompBeads Set Anti-Rat and Anti-Hamster Ig, κ/Negative Control Compensation Particles Set	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Exosome-Human CD9 Flow Detection	Invitrogen, ThermoFisher, New Jersey, USA
Exosome-Human CD63 Isolation/Detection	Invitrogen, ThermoFisher, New Jersey, USA
Exosome-Human CD81 Flow Detection	Invitrogen, ThermoFisher, New Jersey, USA
Polystyrolbeads ZetaView 100 nm	Particle Metrix GmbH, Inning am Ammersee, Deutschland
UltraComp TM eBeads Compensation Beads	Invitrogen, ThermoFisher, New Jersey, USA

2.1.6 Kits

Tab. 10: verwendetes Kit

Kit	Hersteller
exoEasy Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.7 Software

In dieser Arbeit wurden folgende Programme verwendet (Tab. 11).

Tab. 11: verwendete Software

Software	Hersteller
FlowJo Single Cell Analysis Software v10	Becton Dickinson, New Jersey, USA
GraphPad Prism 5®	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
SAS JMP 14®	SAS Institute, Cary NC, USA

2.1.8 Zelllinie

In dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet (Tab. 12).

Tab. 12: verwendete Zelllinien

Zelllinie	Hersteller	Medium	Wachstumsverhalten in Kultur	Merkmale
BPH1	ATCC, Wesel, Deutschland	RPMI + 10 % FBS + R1881	adhärente Monolayer	aus Gewebeprobe mit benigner Prostatahyperplasie (BPH), immortalisiert mit Simian Virus SV40, nicht tumorigen, PSA (-), Androgenrezeptor (-) (Hayward et al., 1995)
DU145	ATCC, Wesel, Deutschland	DMEM + 10 % FBS	adhärente Monolayer	fortgeschrittenes Adenokarzinom der Prostata, isoliert aus einer zentralnervösen Metastase, moderates metastatisches Potential, Androgen-Rezeptor-Status (+), nicht hormon-sensitiv, PSA (-) (Pulukuri et al., 2005; Stone et al., 1978)
HCT116	ECACC, Porton Down, UK	McCoy's + 10 % FBS	adhärente Monolayer	Kolonkarzinomzelllinie (Brattain et al., 1981)

LNCaP	ATCC, Wesel, Deutsch- land	RPMI + 10 % FBS	In losen Zell- clustern	Adenokarzinom der Prostata, iso- liert aus supraklavikulären Lymph- knoten, niedriges metastatisches Potential, Androgenrezeptor (+), Östrogenrezeptor (+), hormonsen- sitiv, PSA (+) (Horoszewicz et al., 1983; Pulukuri et al., 2005)
PANC1	ATCC, Wesel, Deutsch- land	DMEM + 10 % FBS	adhärente Monolayer	fortgeschrittenes, metastasiertes duktales Adenokarzinom des Pan- kreas (Deer et al., 2010; Lieber et al., 1975)
PC3	ATCC, Wesel, Deutsch- land	DMEM + 10 % FBS	adhärente Mo- nolayer	fortgeschrittenes Adenokarzinom der Prostata, isoliert aus Knochen- metastase, hohes metastatisches Potential, PSA (-), Androgen resis- tent (Kaighn et al., 1979; Pulukuri et al., 2005)

2.1.9 Probanden- und Patientenproben

Die Probenacquiritung erfolgte im Rahmen der NEUTAX-Studie (von Hardenberg et al., 2017; von Hardenberg et al., 2018), einer prospektiven, multizentrischen Beobachtungsstudie in verschiedenen urologischen Kliniken und Praxen (Klinik für Urologie und Urochirurgie Mannheim, Klinik für Urologie der Universitätsmedizin Göttingen, Klinik für Urologie am Klinikum Ludwigshafen, Onkologische Schwerpunktpraxis Heidelberg (Dr. med. Stefan Fuxius), Urologie Herzberg (Dr. med. Thorsten Werner)). Eingeschlossen wurden Patienten mit metastasiertem PCa vor Beginn einer Chemotherapie mit Docetaxel. Blutentnahmen erfolgten je 7 Tage vor dem ersten Zyklus, 7 Tage vor dem dritten Zyklus und 7 Tage vor dem sechstem Zyklus Chemotherapie. Ein EDTA-Plasma Röhrchen wurde für spätere experimentelle Analysen bei -80°C im Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) und im urologischen Forschungszentrum der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg gelagert. Die Studie wurde durch die Medizinische Ethikkommission II der Universität Heidelberg genehmigt

(2011-387N-MA). Weitere Proben von gesunden Probanden und Patienten mit BPH, lokalisiertem und metastasiertem PCa wurden im Rahmen des Biobank-Projektes der Klinik für Urologie und Urochirurgie Mannheim (Ethikvotum 2015-549N-MA) gewonnen. Die Nutzung der Daten wurde gemäß der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Einen Überblick über die Charakteristika der verwendeten Patientenproben liefern die Tab. 13 -15.

Tab. 13.: Probanden- und Patientencharakteristika von Patienten mit benigner Prostat hyperplasie (BPH) und lokalisiertem (lok.) PCa

	lok. PCa (n = 6)	BPH (n = 5)	Probanden (n = 8)
Alter (Jahre) MW ± SD	57,8 ± 9,3	66 ± 7,8	30,5 ± 7,2
Vitalitätsstatus in %	100	100	100
PSA (ng/ml) MW ± SD	27,3 ± 53,9	11,6 ± 8,7	n.a.
Gleason Score (GS) 6	2 (33 %)	n.a.	n.a.
GS 7	3 (50 %)		
GS 8	0 (0 %)		
GS 9	1 (17 %)		

Tab. 14: Patientencharakteristika der Neutax-Kohorte (*Mehrfachnennung möglich)

Patientencharakteristika (n = 12)		n (%)
Alter (Jahre)	MW ± SD	71,8 ± 7,3 (61 – 88)
Gleason Score	7	2 (22 %)
	8	3 (33 %)
	9	4 (44 %)
	keine Angaben	3
PSA (ng/ml)	MW ± SD	199,3 ± 219,9 (7,1 – 636,5)
Metastasierung	viszerale Metastasierung (VM)	6 (50%)
	ohne VM	6 (50 %)
Fernmetastasen*	Knochen	7 (64 %)
	Lebermetastasen	3 (27 %)
	Lungenmetastasen	2 (18 %)
	keine Angaben	1

Tab. 15: Patientencharakteristika der Patienten mit metastasierte PCa (*Mehrfach-nennung möglich)

Patientencharakteristika (n = 20)		n (%)
Alter (Jahre)	MW ± SD	72,4 ± 7,7,2 (60 – 83)
Gleason-Score	7	6 (30 %)
	8	4 (20 %)
	9	9 (45 %)
	10	1 (5 %)
PSA (ng/ml)	MW ± SD.	752,9 ± 1246,1 (0,02 – 4580)
Metastasierung	VM	15 (75 %)
	ohne VM	5 (25 %)
Fernmetastasen*	Knochen	19 (95 %)
	Lebermetastasen	12 (60 %)
	Lungenmetastasen	6 (30 %)
neuroendokrine Differenzierung		4 (20 %)

2.1.10 Kohorten- *in silico* Analysen

Neben der Literaturrecherche zur Auswahl geeigneter Integrine auf EV, die eine mögliche Rolle bei der Entstehung einer VM im metastasierten PCa spielen könnten, wurden publizierte Microarray-Datensätze reanalysiert.

Die Datensätze mehrerer Kohorten (The Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA), Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC), Robinson et al., 2015; Taylor et al., 2010) wurden bei cBioPortal (<https://www.cbioportal.org>) bezogen. Die mRNA Expressionsdaten waren verfügbar als mRNA Z-Score. Um Überlebensanalysen zu erstellen, wurden die mRNA-Expressions-Daten als Z-Score vs. Normal mit einem Treshold von 2 aus cBioPortal exportiert (Taylor et al., 2010). Die klinischen Daten der Kohorten wurden ebenfalls von cBioPortal heruntergeladen.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zellkultivierung

Nachdem die Kryoröhrchen im 37 °C warmen Wasserbad rasch aufgetaut wurden, wurden sie anschließend bei 300 x g (5 min, Raumtemperatur (RT)) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml des entsprechenden Mediums resuspendiert und in 25 cm² großen Zellkulturflaschen mit je 5-6 ml des entsprechenden und vorgewärmten Mediums überführt. Unter regelmäßiger lichtmikroskopischer Kontrolle wurden die Zellen im Inkubator unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. Nach den ersten 24 h wurde das Medium zur Hälfte durch frisches Medium ersetzt. Bei ausreichender Konfluenz wurden die Zellen in größere Zellkulturflaschen überführt. Anschließend erfolgte der Mediumwechsel je nach Bedarf alle 2-3 Tage. Bei einer Konfluenz von 75 % erfolgte die Subkultivierung der Zellen bzw. der Wechsel auf EV-Produktionsmedium. Der Wechsel auf EV-Produktionsmedium erfolgte erst nachdem die Zellen vorher mindestens zweimal passagiert wurden. Nach Abnahme des Mediums erfolgte zum Ablösen der adhärenen Zellen die Trypsinierung bei 37°C unter lichtmikroskopischer Kontrolle. Die Reaktion wurde durch Zugabe des jeweiligen Mediums gestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 300 x g zentrifugiert (5 min, RT). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen überführt (Passagierung).

2.2.1.2 Zellen einfrieren

Bis zur Verwendung der Zellen für weitere Versuche wurden die Zellen bei -80 °C eingefroren. Hierzu wurde die trypsinierte Zellsuspension bei 300 x g (5 min, RT) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 % DMSO und 90 % des entsprechenden Mediums resuspendiert.

2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte mittels eines automatisierten Zellzählgerätes. Ermittelt wurde neben der Zellzahl pro ml, die lebenden und toten Zellen sowie die mittlere Größe der gemessenen Zellen. 10 µl der Zellsuspension wurden mit

10 µl Trypanblau vermischt. Anschließend wurden 10 µl dieser Suspension in PhotonSlides™ gegeben und im Zellzähler automatisiert analysiert. Das Trypanblau, ein Diazofarbstoff, durchdringt die Zellmembran von abgestorbenen oder perforierten Zellen und färbt diese durch Proteinbindung dunkelblau. Vitale, intakte Zellen werden nicht angefärbt (Tennant, 1964).

2.2.1.4 Herstellung von EV-Produktionsmedium

Die Herstellung des EV-Produktionsmediums erfolgte mittels Ultrazentrifugation. In einem Verhältnis von 60 % Medium und 40 % FBS erfolgte die Zentrifugation über Nacht (16 h, 4 °C) bei 110.000 x g. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und durch einen 220 nm Filter filtriert. Der partikelfreie filtrierte Überstand wurde mit frischem Medium ohne Zusätze verdünnt auf eine Konzentration von 5 % FBS.

2.2.1.5 Zellkultivierung zur Partikelisolation mittels Ultrazentrifugation

Die Zellen wurden in konventionellem Medium mit 10 % FBS in 175 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Bei einer Konfluenz von ca. 60 % wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit sterilem PBS dreimal gewaschen. Anschließend wurde das EV-Produktionsmedium (siehe 2.2.1.4) für eine Kultivierung von 72 h verwendet. Danach wurden die Überstände der Zellkulturflaschen abgenommen und in 50 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden zur Herstellung von Zellpellets für weitere Versuche genutzt (siehe 2.2.1.1). Die Aufreinigung des Überstandes zur Eliminierung größerer Partikel, Zellfragmenten und apoptotischer Zellen erfolgte in 3 Zentrifugationsschritten (Runde 1: 300 x g, 10 min, RT; Runde 2: 2.000 x g, 10 min, RT; Runde 3: 10.000 x g, 10 min, 4 °C). Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Zellpellet wurde verworfen. Der gewonnene Überstand wurde in einer Ultrazentrifuge bei 100.000 x g (120 min, 4 °C) zentrifugiert, anschließend abgenommen und verworfen. Das so gewonnene Zellpellet wurde in PBS resuspendiert und erneut bei 100.000 x g (120 min, 4 °C) zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das EV-Pellet in 50 µl PBS resuspendiert. Eine schematische Übersicht der Zentrifugationsschritte liefert Abb. 4. Die Lagerung der EV-Pellets erfolgte bei -80 °C bis zur Verwendung für weitere Analysen (siehe 2.2.3, 2.2.4 und 2.2.5).

Als Kontrollprobe fungierte für alle Versuche eine Mediumprobe, die unter gleichen Bedingungen in der Zellkultur ohne Zellen mit EV-Produktionsmedium kultiviert und anschließend ultrazentrifugiert wurde.

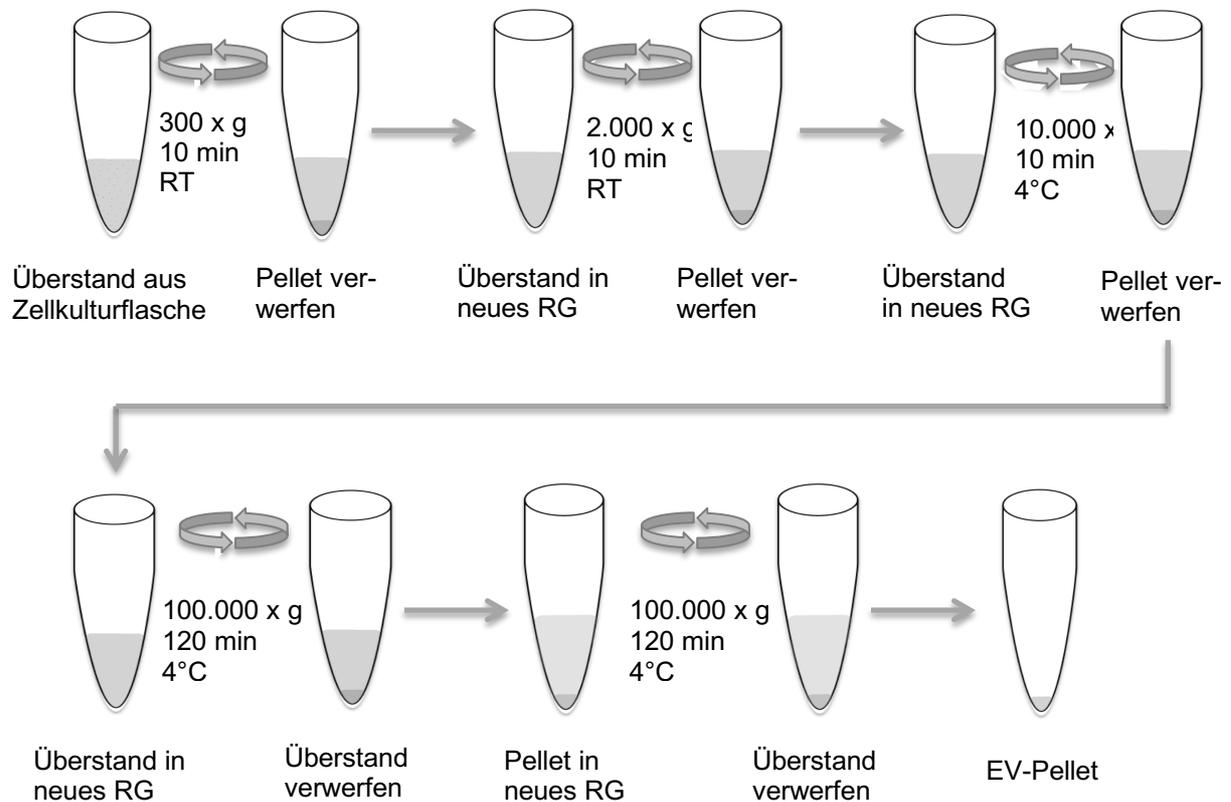


Abb. 4: EV-Isolation aus Zellkulturüberstand mittels Ultrazentrifugation. Schematische Darstellung der verschiedenen Zentrifugationsschritte bis zum Erhalt eines EV-Pellets.

2.2.2 Blutaufbereitung Patientenproben

Die Aufbereitung der Blutproben erfolgte im urologischen Forschungszentrum der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg. Die Proben wurden innerhalb von 6 h weiterverarbeitet. Bis zur Verarbeitung lagerten die Proben bei 4 °C. Nach Zentrifugation bei 2.000 x g (10 min, 4 °C) wurde das Plasma aus zwei EDTA-Röhrchen in einem Reaktionsgefäß vereint und durch Invertieren vermischt. Die Plasmaproben wurden in Aliquots mit je 1 ml bei -80 °C bis zur EV-Isolation gelagert.

2.2.2.1 EV-Isolation aus Patientenplasma mittels exoEasy Kit

Die Isolation der EV aus Patientenplasma erfolgte mittels des exoEasy Kits (Qiagen) unter Nutzung membranbasierter Säulen und spezieller Puffer. Nach Herstellerangaben wurden die Plasmaproben zunächst mittels Zentrifugation (10.000 x g, 30 min, 4 °C) und Filtration (220 nm Filter) aufgereinigt, um größere Partikel zu eliminieren. Im Verhältnis 1:1 (Puffer XBP: Patientenplasma) wurde der Puffer XBP mit dem Plasma der Patientenprobe durch mehrfaches invertieren des Reaktionsgefäßes vermischt. Die Suspension wurde auf eine membranbasierte Säule gegeben und zentrifugiert (500 x g, 1 min, RT). Der Durchfluss wurde verworfen. Durch Zugabe von XWP Puffer auf die Säule und Zentrifugation (4700 x g, 5 min, RT) wurde der restliche XBP Puffer aus der Säule gewaschen. Die Säule wurde in ein neues Sammelreaktionsgefäß überführt und nach Zugabe des Puffer XE für 1 min inkubiert. Nach Zentrifugation (500 x g, 1 min, RT) wurde das Eluat erneut auf die Säule gegeben, für 1 min inkubiert und zentrifugiert (4700 x g, 5 min, RT). Eine schematische Darstellung des Versuchsablaufes ist in Abb. 5 dargestellt. Das Eluat wurde bei -80 °C bis zur Verwendung in weiteren Analysen gelagert.

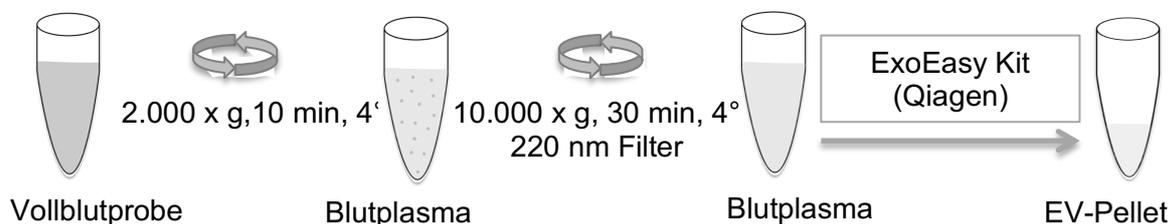


Abb. 5: EV-Isolation aus Patientenblutproben mittels ExoEasy Kit. Schematische Darstellung des Aufreinigungsprozesses von der Vollblutprobe bis zum EV-Pellet.

2.2.3 Nanopartikel Tracking Analysis (NTA)

Zur Bestimmung der Größenverteilung und Konzentration der EV in den Proben wurden diese im ZetaView® TWIN – NTA Nanopartikel Tracking - Video Mikroskop PMX-220 analysiert. Durch die Bestrahlung mit einem Laser ($\lambda = 488\text{nm}$) werden Partikel im Mikrometerbereich sichtbar gemacht.

Zunächst erfolgte die Kalibrierung des Gerätes mit 100 nm großen Polystyrolbeads. Anschließend wurde die zuvor mittels ExoEasy Kit aus Patientenplasma bzw. mittels Ultrazentrifugation aus Zelllinien isolierten Partikelsuspension analysiert. 1 μl der Probe wurde mit sterilem PBS soweit verdünnt (Verdünnung EV aus Zelllinien zwischen 1:10.000 bis 1:100.000, EV aus Blutplasmaproben 1:2.000 bis 1:10.000), dass die Partikel ohne Überlagerung in der Messkammer erkennbar waren. Für jede Messung wurden 11 Zellpositionen, jeweils 2 Zyklen unter folgenden Einstellungen: Focus: Autofokus, Kamera Sensitivität: 80, Shutter: 100, Frame Rate 30, Temperatur: RT.

2.2.4 Durchflusszytometrie

Die EV-Analysen erfolgten am BD FACSCanto II in der FlowCore Mannheim der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg.

Mittels durchflusszytometrischer Messungen werden einzelne Partikel, wie eukaryotische Einzelzellen, Bakterien oder Beads, schnell und effizient analysiert. Der spezifische Nachweis von Antigenen auf den zu untersuchenden Zielpartikeln wird durch die Verwendung Fluorochrom-gekoppelte Antikörper erreicht (Abb. 6). Die Laser, die zur Anregung der an die Partikel gekoppelten Fluorochrome genutzt werden, haben spezifische Wellenlängen und regen nur diese entsprechenden Fluorochrome an. Die verwendeten Fluorochrome mit ihren jeweiligen Bandpassfiltern und Helligkeitseigenschaften sind in Tab. 16 dargestellt. Mit dem Seitwärtsstreulicht (*Sideward Scatter* SSC) wird die Granularität der Partikel und mit dem Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*, FSC) die Größe der Partikel gemessen. Die Analyse und Darstellung der gewonnenen Daten erfolgte mit der FlowJo Software v10.

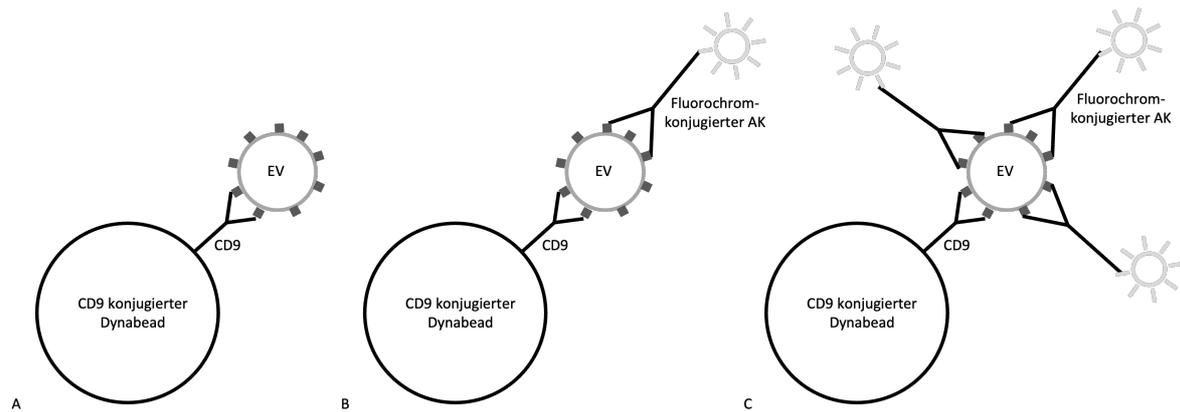


Abb. 6 Schematische Darstellung Bindung EV an CD9 konjugierte Dynabeads und fluorochromkonjugierte Antikörper (AK). A: Kopplung EV an Dynabeads (exemplarisch CD9 konjugiert, siehe 2.2.4.3). B: Bindung eines Fluorochrom-gekoppelte Antikörper an spezifische Antigene der EV (Einzelfärbung, siehe 2.2.4.3). C: Bindung mehrerer Fluorochrom-gekoppelte Antikörper an spezifische Antigene der EV (Mehrfachfärbung, siehe 2.2.4.3).

Tab. 16: verwendete Fluorochrom-gekoppelte Antikörper mit jeweiligem Bandpassfilter und Helligkeitseigenschaft

Fluorochrom gekoppelte Antikörper	Bandpass-Filter	Helligkeit
FITC Mouse Anti-Human CD81	530/ 30	moderat
PE Mouse Anti-Human CD9	585/42	hell
PE-Cy TM 7 Mouse Anti-Human CD63	780/60	hell
BV510 Mouse Anti-Human CD29	510/50	moderat
AlexaFluor®647 Mouse Anti-Human CD51	660/20	hell
BV421 Rat Anti-Human CD104	450/50	sehr hell

2.2.4.1 Kompensationsbeads

Zur Erstellung und Optimierung der Fluoreszenzkomensationseinstellungen für das zu messende Multicolour-Panel wurden polystyrole Kompensationsbeads verwendet. Die BDTMCompBeads Negative Control zeigten keine Bindungskapazitäten und wurde in einem separaten Reaktionsgefäß als Negativreferenz gemessen. Die Verwendung einer negativen Beadpopulation zur Kompensationsberechnung bietet den Vorteil, dass während der Kompensationsmessungen FSC und SSC nicht angepasst werden müssen. Nach Herstellerangaben wurde 1 Tropfen BDTMCompBeads Anti-Mouse bzw. Anti-Rat/Hamster Ig, κ mit je 1 µl des jeweiligen Fluorochrom-konjugierten Antikörpers

gemischt und für 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Bead-Antikörper-Gemisch unter Zugabe von 1 ml Färbepuffer und Zentrifugation bei 200 x g (10 min, RT) gewaschen. Die Resuspension des Bead-Antikörper-Pellets erfolgte mit 500 µl Färbepuffer. Die Kompensationsberechnung erfolgte automatisiert direkt am BD FACSCanto II mit der zugehörigen Software.

2.2.4.2 Zellfärbung für durchflusszytometrische Analysen

Um Zellen für durchflusszytometrische Analysen zu färben, wurden diese wie unter Punkt 2.2.1.1 bis 2.2.1.3 zunächst kultiviert und analysiert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml PBS vermischt, zentrifugiert (300 x g, 5 min, RT) und der Überstand verworfen. Um alle unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren, wurden pro Reaktionsgefäß 1×10^6 Zellen mit 45 µl Färbepuffer und 5 µl FcR Blocking Reagent vermischt. Nach einer Inkubation von 15 min im Dunkeln wurden die Proben mit 2 ml Färbepuffer gewaschen und zentrifugiert (300 x g, 5 min, RT). Nach Kopplung an Fluorochrom-konjugierten Antikörper inkubierten die Proben für 15 min im Dunkeln, anschließend wurden sie zweimal mit je 1 ml Färbepuffer gewaschen und zentrifugiert (500 x g, 5 min, RT). Nach Abnahme des Überstandes erfolgte die Zugabe von 300 µl Färbepuffer und das Überführen der Probe in FACS-Röhrchen.

2.2.4.3 Partikelfärbung

Da die zu untersuchenden EV mit einer Größe von unter 300 nm zu klein waren, um sie direkt im BD FACSCanto II zu analysieren, wurden sie an Dynabeads gekoppelt, die mit primären monoklonalen Antikörpern (CD9, CD63 oder CD81) konjugiert waren (Abb. 6).

Bei den verwendeten Dynabeads handelt es sich um uniforme, supramagnetische Polystyrolbeads mit einem Durchmesser von 2,7 µm (CD9- und CD81-beschichteten Dynabeads) bzw. 4,5 µm (CD63-beschichteten Dynabeads).

Zur Kopplung an die Beads wurden die zuvor isolierten EV aus Zelllinien oder Patientenplasma (siehe 2.2.1.5 und 2.2.2.1, zur eingesetzten EV-Menge siehe Ergebnisteil Methodenetablierung) nach Herstellerangaben auf einem Schüttler bei 4 °C über Nacht mit den Beads inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern (Austitrierung der optimalen Antikörpermenge

ausgehend von den Herstellerangaben). Alle Waschschritte erfolgten im magnetischen Separator mit 300 μ l Färbepuffer. Die Inkubationsschritte erfolgten bei RT, im Dunkeln auf einem Schüttler. Nach zweimaligem Waschen der Probe wurden 40 μ l FcR Blocking Reagent und 200 μ l Färbepuffer zugefügt und die Probe für 15 min inkubiert, um alle unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Nach erneutem Waschen der Probe wurde diese auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt. Ein Reaktionsgefäß stellt die ungefärbte Probe dar. Im zweiten Reaktionsgefäß erfolgte die Färbung mit den Oberflächenmarkern EV CD9-PE, CD63-PE-Cy7, CD81-FITC sowie den Integrinen β 1 CD29-BV510, β 4 CD104-BV421 und α v CD51-AlexaFluor647 für 45 min (Abb. 6). Nach zweimaligem Waschen erfolgte die Zugabe von 300 μ l Färbepuffer und das Überführen der Probe in geeignete Reaktionsgefäße für die durchflusszytometrischen Analysen, die innerhalb von 30 min durchgeführt wurden. Solange lagerten die Proben im Dunkeln bei 4 °C.

2.2.5 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Analysen wurden an einem Transmissionselektronenmikroskop EM 900 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) im DKFZ durchgeführt. 5 μ l der EV Proben wurden für 5 min auf Formvar-beschichtete Kupfer-EM-Gitter gelegt und anschließend dreimal für fünf Sekunden mit sterilem destilliertem Wasser gewaschen. Die Färbung mit 3 % Uranylacetat wurde zweimal jeweils für zwei Sekunden durchgeführt. Nachdem die Gitter getrocknet waren, wurden sie bei 30 k, 50 k und 85 k Vergrößerung analysiert.

2.2.6 Statistische Auswertungen

Die statistischen Auswertungen wurden mit SAS JMP 14® und GraphPad Prism 5® angefertigt. Die Daten wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf ihre Normalverteilung ($\alpha \leq 0,05$) untersucht. Abhängig davon wurden die Daten jeweils mittels parametrischer Tests bzw. mittels nicht-parametrischer Tests analysiert. Bei Vorliegen von zwei Gruppen wurde bei nicht-parametrisch verteilten Daten der Mann-Whitney-U-Test, bei mehr als zwei Gruppen der Kruskal-Wallis-Test, an den sich bei signifikanten Ergebnissen ($\alpha \leq 0,05$) Posthoch-Analysen nach Dunn anschlossen, verwendet. Parametrisch verteilte Daten wurden mittels t-Test und beim Vorliegen von mehr als zwei Gruppen mittels One-Way ANOVA, an den sich bei signifikanten Ergebnissen ($\alpha \leq 0,05$) Posthoch-

Analysen nach Tukey anschlossen, analysiert. Gepaarte nicht-parametrische Daten wurden bei Vorliegen von zwei Gruppen mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test und bei mehr als zwei Gruppen mittels Friedman-Test, an den sich bei signifikanten Ergebnissen ($\alpha \leq 0,05$) Posthoc-Analysen nach Dunn anschlossen, analysiert. Alle Ergebnisse mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angenommen. Zur Erstellung von Abbildungen wurde GraphPad Prism 5® verwendet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Kohorten- *in silico* Analysen

Neben der Literaturrecherche zur Auswahl geeigneter Integrine auf EV, die eine mögliche Rolle bei der Entstehung einer VM im metastasierten PCa spielen könnten, wurden publizierte Microarray-Datensätze reanalysiert.

In der TCGA-Kohorte (Expressionsdaten von 501 Patienten) korreliert die Expression von CD51/Integrin αv (Log-Rank Test $p = 0.0489$), CD29/Integrin $\beta 1$ (Log-Rank Test $p = 0.0021$) und CD104/Integrin $\beta 4$ (Log-Rank Test $p = 0.0006$) signifikant mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben (Diseases free survival (DFS)), (Abb. 7 und detaillierte Abb. VI - VII im Anhang).

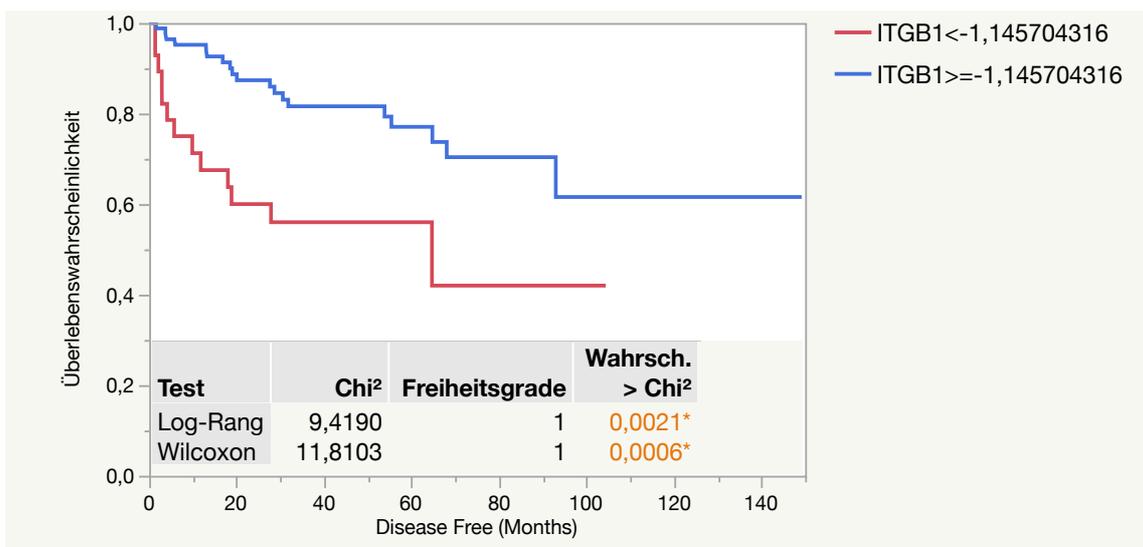
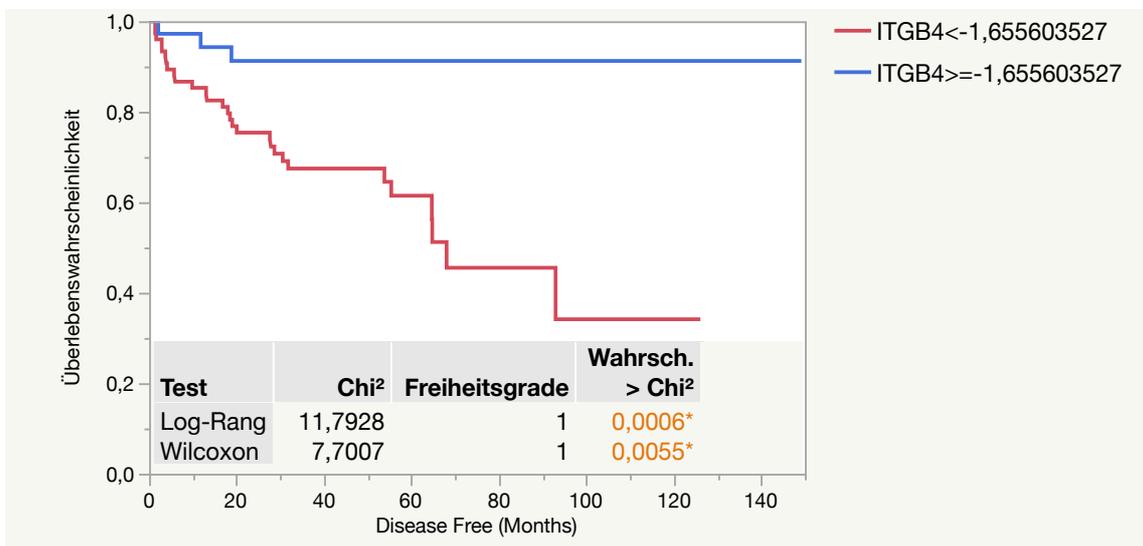
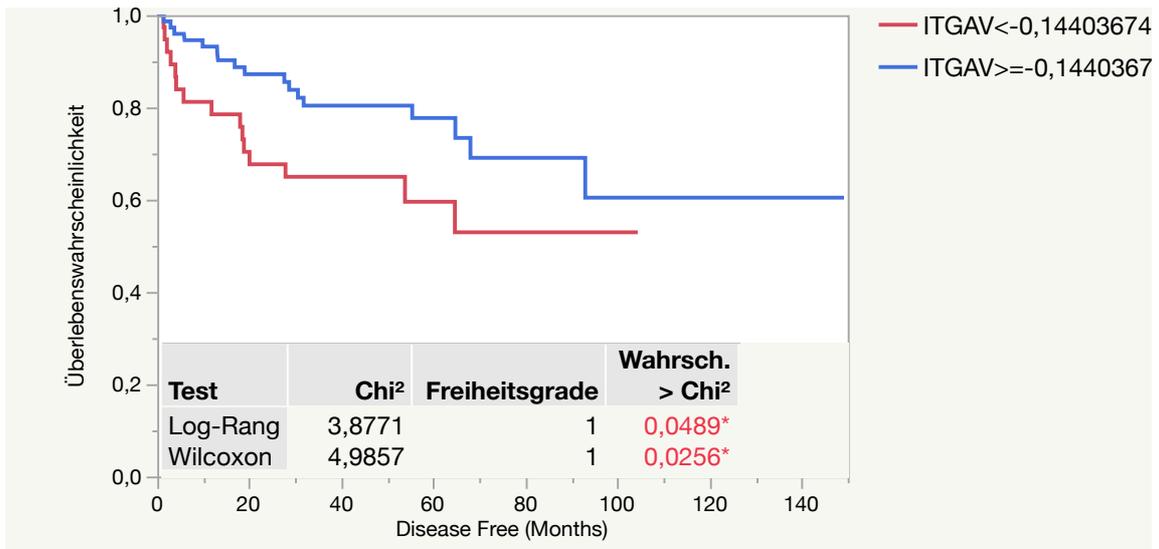


Abb. 7: Kaplan-Meier-Kurven nach Integrinexpression. Die Expression von CD51/ CD29, CD 51 und CD104 korreliert signifikant mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben. Statistische Analysen mittels Log-Rang- und Wilcoxon-Methode.

In der Transkriptomanalyse der Kohorte von Robinson et. al konnte aus Gewebeproben von Metastasenbiopsien gezeigt werden, dass CD104/Integrin $\beta 4$ signifikant höher in Prostatabiopsaten im Vergleich zu Lymphknotenmetastasen ($p = 0.0117$) und Knochenmetastasen ($p = 0.0199$) exprimiert ist sowie signifikant höher in Lebermetastasen als in Lymphknotenmetastasen ($p = 0.0158$) und Knochenmetastasen ($p = 0.0363$) nachzuweisen ist (Abb. 8 und detaillierte Abb. VIII im Anhang).

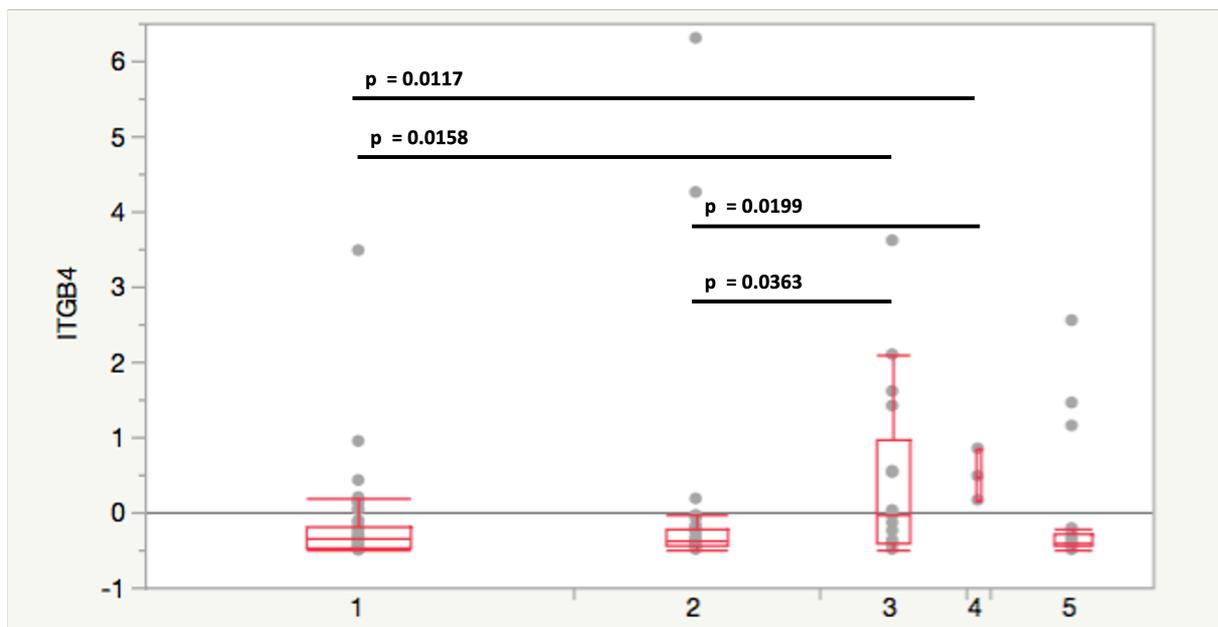


Abb. 8: Einfaktorielle Analyse von Gewebeproben aus Metastasenbiopsien. 1: Lymphknotenmetastasen (n = 50), 2: Knochenmetastasen (n = 39), 3: Lebermetastasen (n = 17), 4: Prostatabiopsat (n = 3), 5: Metastasen anderer Lokalisationen (n = 19). Statistische Analysen mittels nichtparametrischer Vergleiche für jedes Paar mittels Wilcoxon-Methode.

3.2 Methodenetablierung

Die Aufreinigung von EV durch differentielle Zentrifugation war im urologischen Forschungszentrum der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg bereits etabliert. Neben dem aufwändigen Verfahren der Ultrazentrifugation wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit ein kommerziell erhältliches Filter-basiertes System etabliert. Ziel dieser Arbeit war die Etablierung durchflusszytometrischer Analysen an EV aus Zelllinien und die Anreicherung von EV aus Patientenplasma sowie deren Analyse mittels NTA, EM und Durchflusszytometrie. Aufgrund geringer Volumina der Patientenproben der Neutax- und Biobank-Kohorte erfolgten die Etablierungsschritte an EV aus Zelllinien und Blutplasma gesunder Probanden. Vor der Messung der Proben von Patienten mit metastasiertem PCa wurden Proben von Patienten mit lokalisiertem PCa

isoliert und durchflusszytometrisch analysiert, um mögliche Unterschiede in der Aufarbeitung zwischen Zelllinien, gesunden Probanden und Patienten mit PCa festzustellen und Anpassungen vor der Analyse, der eigentlichen Proben vornehmen zu können.

3.2.2 Qualitätskontrolle der erfolgreichen EV-Isolation aus Zelllinien mittels EM und NTA-Analysen

In den durchgeführten NTA-Analysen zeigten die EV aller sechs Zelllinien (BPH1, DU145, LNCaP, PC3, PANC1, HCT116) die typischen Größenverteilungen zwischen 148 nm und 174 nm (Abb. 9).

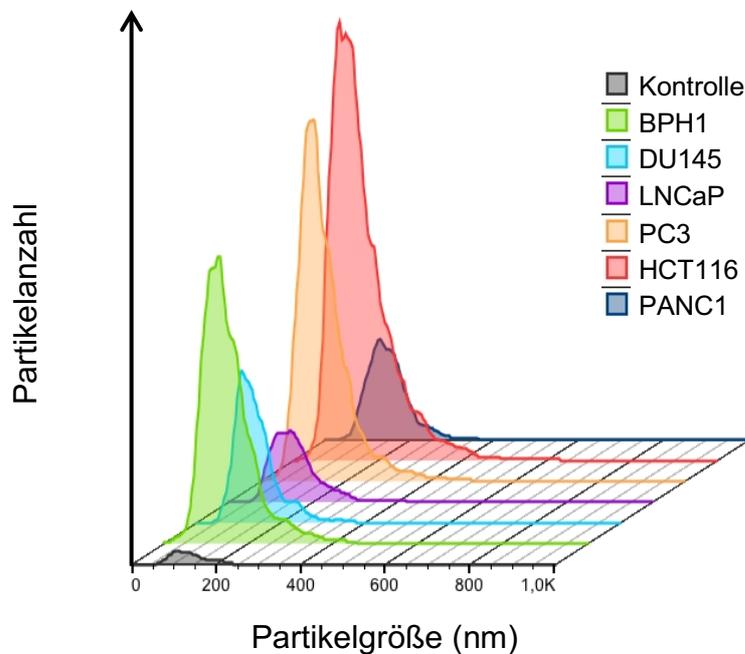


Abb. 9: Größenverteilung der EV aus Zelllinien. NTA-Ergebnisse von sechs Zelllinien (BPH1, DU145, LNCaP, PC3, PANC1, HCT116) und einer Mediumkontrolle (siehe 2.2.1.5) zeigten die typische Größenverteilung der EV. Durch die unterschiedlichen Probenverdünnungen ist mit dieser Grafik keine direkte Vergleichbarkeit der Partikelzahl zwischen den einzelnen Zelllinien untereinander und der Mediumkontrolle möglich (siehe Tabelle 17).

Der Mittelwert (MW) der Partikelgröße der Mediumkontrolle befand sich im selben Bereich, wobei der MW der Partikelkonzentration deutlich unter der Partikelkonzentration der Zelllinien lag. Die Partikelkonzentrationen der EV aus Zelllinien lagen zwischen $1,5 \times 10^{11}$ und $9,6 \times 10^{11}$ Partikel pro ml (Tab. 17).

Tab. 17: Partikelkonzentration und Partikelgröße der EV aus Zelllinien (MW-Mittelwert, SD-Standardabweichung von 3 Messungen unterschiedlicher Aufreinigungsreihen)

Zelllinie	Partikelkonzentration MW \pm SD	Partikelgröße MW \pm SD
BPH1	$1,5 \times 10^{11}/\text{ml} \pm 1,1 \times 10^{11}/\text{ml}$	148,1 nm \pm 13,8 nm
DU145	$7,4 \times 10^{11}/\text{ml} \pm 1,0 \times 10^{12}/\text{ml}$	173,6 nm \pm 26,5 nm
HCT116	$4,3 \times 10^{11}/\text{ml} \pm 3,6 \times 10^{11}/\text{ml}$	172,4 nm \pm 12,9 nm
LNCaP	$2,9 \times 10^{11}/\text{ml} \pm 7,1 \times 10^{10}/\text{ml}$	153,9 nm \pm 19,0 nm
PANC1	$9,6 \times 10^{11}/\text{ml} \pm 5,0 \times 10^{11}/\text{ml}$	157,6 nm \pm 3,5 nm
PC3	$6,2 \times 10^{11}/\text{ml} \pm 4,2 \times 10^{11}/\text{ml}$	167,6 nm \pm 22,9 nm
Mediumkontrolle	$1,4 \times 10^9/\text{ml} \pm 1,1 \times 10^9/\text{ml}$	162,8 nm \pm 29,7 nm

EM-Aufnahmen zeigten beispielhaft an zwei Prostatazelllinie (PC3 und DU145,) die typische tassenförmige Morphologie der EV (Abb. 10). In der Mediumkontrolle konnten keine vesikulären Strukturen dargestellt werden.

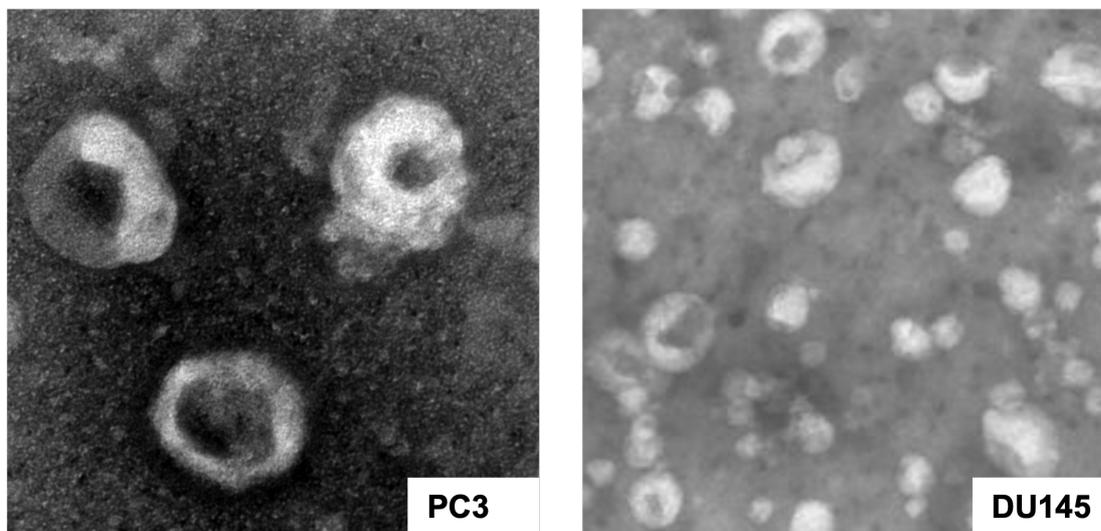


Abb. 10: TEM Aufnahmen EV von Prostatazelllinien.

In den anschließend durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen waren alle EV der vier Prostatazelllinien (PC3, DU145, LNCaP, BPH1) und die EV der PANC1- und HCT116-Zellen positiv für die typischen EV-Oberflächenmarker CD9, CD63 und CD81 (Abb.11). In der Mediumkontrolle konnten keine positiven Signale für CD9, CD63 und CD81 detektiert werden (Abb.11).

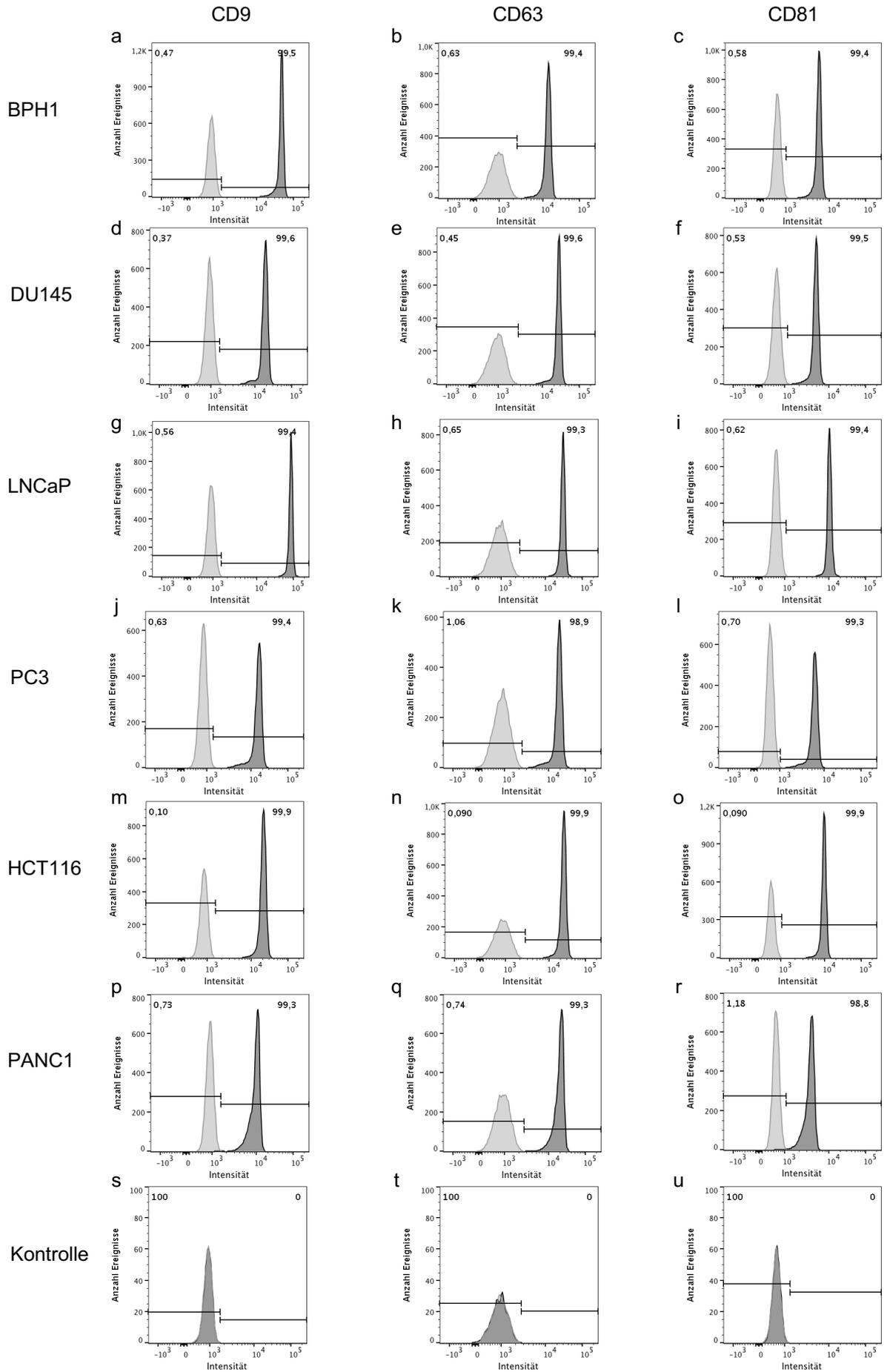


Abb. 11: Durchflusszytometrische Analysen der EV-Oberflächenmarker CD9, CD63 und CD81 auf EV aus Zelllinien. EV wurden an CD9-Dynabeads gekoppelt und anschließend gefärbt, hellgrau: ungefärbte Probe, dunkelgrau: gefärbte Probe. EV aus BPH1 (a-c) -, DU145 (d-f) -, LNCaP (g-i) -, PC3 (j-n), HCT116- (m-o) und PANC1- (p-r) Zellen zeigen positive Signale für CD9, CD63 und CD81. Die Mediumkontrolle (s-u) zeigt kein positives Signal für die Marker CD9, CD63 und CD81.

3.2.3 Etablierung der Durchflusszytometrie

Zunächst erfolgte die Etablierung der Durchflusszytometrie an Zelllinien sowie an EV der Zelllinien, die an CD9-Dynabeads gekoppelt wurden. Zellen und Partikel besitzen eine natürliche Autofluoreszenz, die bei jeder Messung eine ungefärbte Probe als Negativkontrolle benötigte. Anhand dieser Negativkontrolle wurden die Intensitätsgrenzen festgelegt, ab der ein Ereignis als positiv gewertet wurde. PC3-Zellen waren groß genug um sie mittels Durchflusszytometrie direkt darzustellen. Im Vergleich hierzu mussten EV zunächst an Beads gekoppelt werden. Da mehrere Beads an einem EV binden können, erschienen sie während der Messung als Dubletten und Tripletten. Der erste Gatingsschritt bestand darin nur EV-Bead-Singlets auszuwählen, um falsch starke Signale auszuschließen (Abb.12).

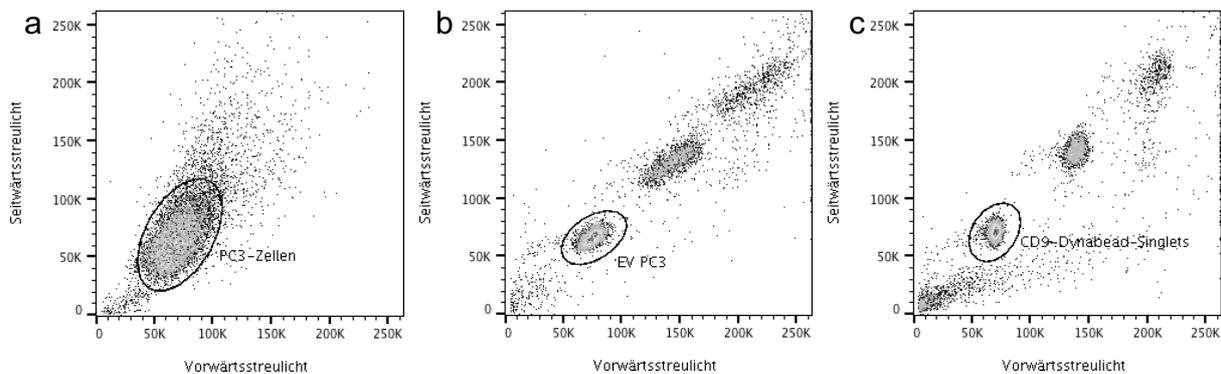


Abb. 12: PC3-Zellen, EV von PC3-Zellen und CD9-Dynabeads in der Durchflusszytometrie (a) PC3-Zellen, (b) EV aus PC3-Zellen gekoppelt an CD9-Dynabeads und (c) CD9-Dynabeads ohne Antikörper. PC3-Zellen wurden so gegatet, dass die Hauptpopulation erfasst wurde (a). Um die Größe und Granularität der CD9-Dynabeads darzustellen wurden diese ohne Kopplung an EV und ohne Antikörperzugabe gemessen (c). Der Ausschluss von zusammengelagerten Beads erfolgte anhand der Größe und Granularität im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (Area vs. Height, c). Für die weitere Gatinghierarchie wurden nur Single EV-Bead-Komplexe ausgewählt.

Weiterhin wurden möglichst niedrige Partikelmengen, die eine gute Differenzierung zwischen Negativ – und Positivpopulation ermöglichen, bestimmt. Durch schrittweise Verdünnung der Probe wurde eine optimale Partikelmenge als Einsatzvolumen austitriert. Als Negativkontrolle wurde eine ungefärbte Partikelprobe verwendet. Als Positivkontrollen wurden alle drei EV-Marker jeweils in Einzelfärbung in gleicher Konzentration (1 μ l) verwendet. Für an CD9-Dynabead gekoppelte EV aus PC3-Zellen lag die optimale Partikelmenge, bei der alle drei EV-Marker eine klare Abgrenzung zur Negativkontrolle zeigen, bei $1,5 \times 10^{10}$ Partikel/ml. Anschließend erfolgte die Austitrierung der Antikörper CD9, CD63 und CD81 an EV der Zelllinie PC3 (1 μ l pro Antikörper).

Für die Etablierung wurden zunächst PC3-Zellen gewählt, da sie als metastasierte PCa-Zelllinie ähnliche Charaktereigenschaften aufweist, wie die zu untersuchenden Patientenproben. Zudem wurde eine Zelllinie gewählt, die für die zu untersuchenden Integrine als Positivkontrolle dienen kann. Massenspektrometrische Ergebnisse aus Vorarbeiten zeigten, dass die Integrine β 1 und β 4 prädominant auf EV von PC3-Zellen exprimiert sind.

Auf PC3-Zellen konnten mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper in Einzelfärbungen CD29 (Integrine β 1), CD104 (Integrin β 4) und CD51 (Integrin α v) nachgewiesen werden (Abb. 13). Auf EV von PC3-Zellen konnten in Einzelfärbungen die Expression von CD29 und in der Hälfte der Fälle CD104, aber nicht die Expression von CD51 bestätigt werden (Abb. 13). Verdünnungsreihen der Antikörperkonzentrationen hatten keinen Einfluss auf die Nachweisbarkeit der einzelnen Integrine.

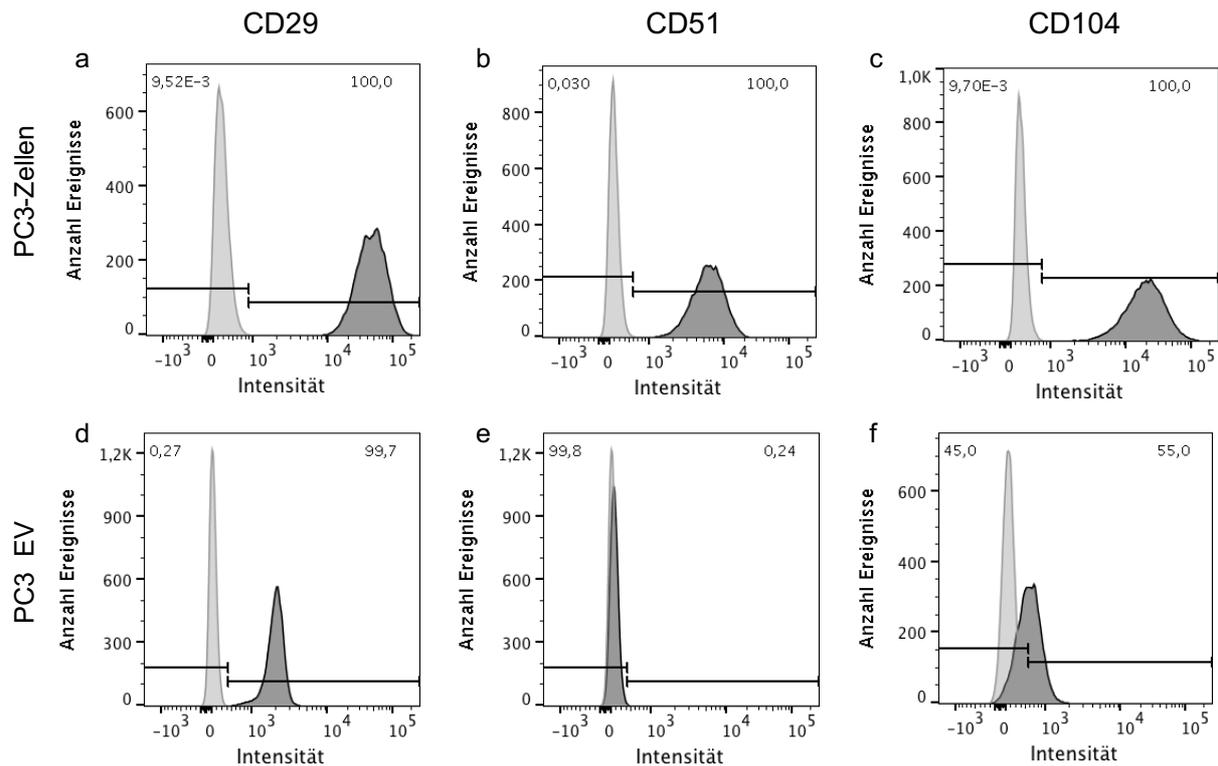


Abb. 13: Integrinsignatur auf PC3-Zellen und EV von PC3-Zellen. Darstellung der durchflusszytometrischen Analysen der Integrine CD29, CD51 und CD104 in Einzelfärbungen. EV wurden an CD9-Dynabeads gekoppelt und anschließend gefärbt. Die hellgraue Kurve zeigt jeweils die ungefärbte Probe und die dunkelgraue Kurve zeigt die gefärbte Probe. Die obere Reihe zeigt die Expression der Integrine CD29 (a), CD51 (b) und CD104 (c) auf PC3-Zellen in der Einzelfärbung. Die untere Reihe zeigt die Expression der Integrine CD29 (d), CD51 (e) und CD104 (f) auf EV isoliert aus PC3-Zellen.

Es erfolgte die EV-Isolation aus zwei weiteren PCa-Zelllinien (DU145, LNCaP), aus zwei benignen PCa-Zelllinien (BPH1, PNT1a) sowie aus einer Pankreaskarzinomzelllinie (PANC1) und einer Kolonkarzinomzelllinie (HCT116) analog der Isolation aus PC3-Zellen mittels Ultrazentrifugation. Die Expression von CD29 auf EV von PANC1-Zellen und HCT116-Zellen konnte durch durchflusszytometrische Analysen bestätigt werden. Annähernd 40 % der HCT116-Zellen waren positiv für CD104 und ca. 20 % zeigten ein positives Signal für CD51. Im Vergleich der EV aus den verschiedenen Zelllinien konnte CD104 auf EV von BPH1-Zellen am stärksten (85 % der EV von BPH1-Zellen zeigten ein positives Signal für CD104) detektiert werden. Eine zusammenfassende Darstellung der Integrinsignaturen auf den untersuchten EV gibt Abb. 14.

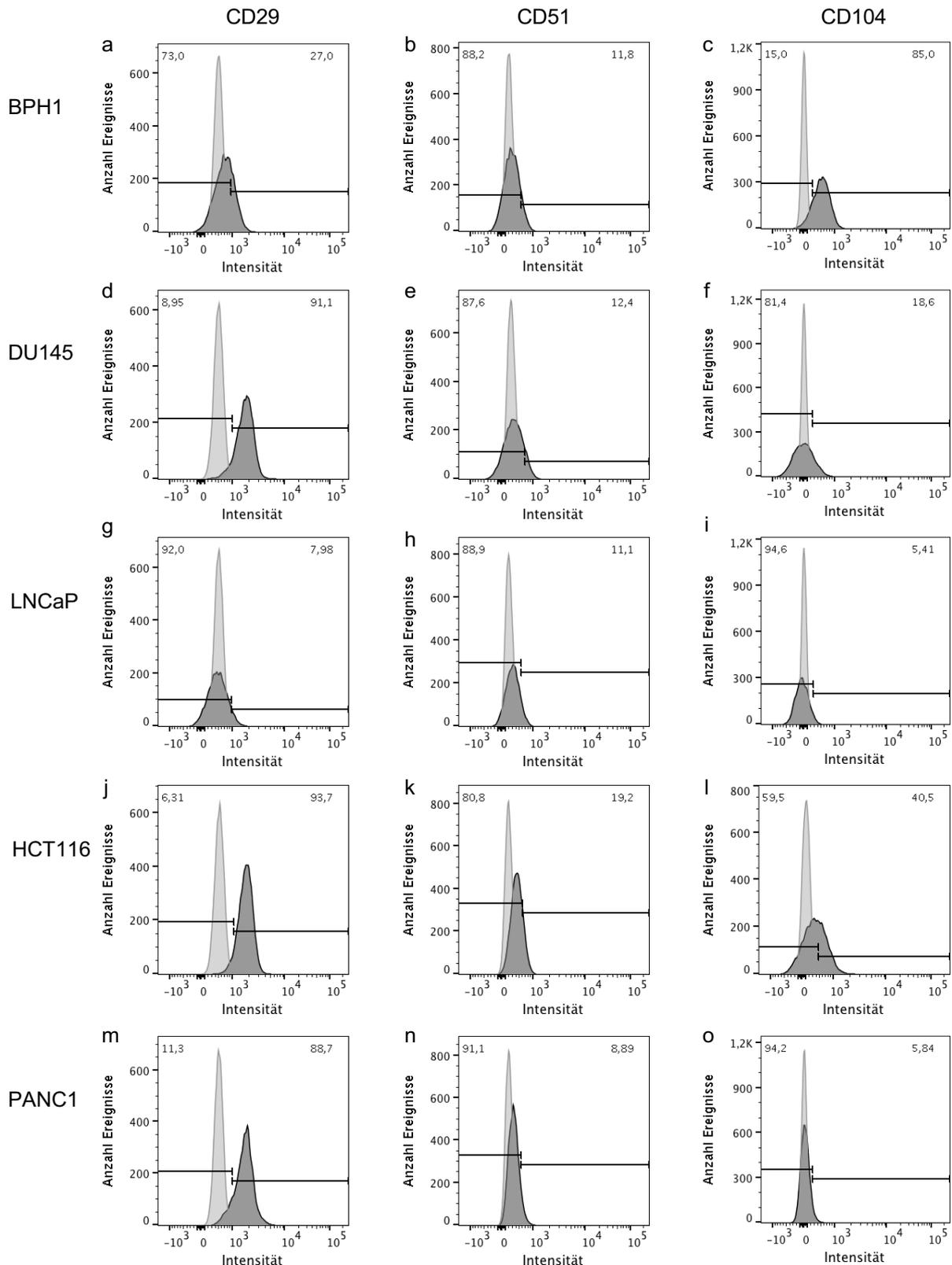


Abb. 14: Integrinsignatur auf EV von fünf Zelllinien. Durchflusszytometrische Analysen nach Mehrfachfärbung der Integrine CD29, CD51 und CD104. EV wurden an CD9-Dynabeads gekoppelt und anschließend gefärbt. Hellgrau: ungefärbte Probe, dunkelgrau: gefärbte Probe. Expression der Integrine CD29, CD51 und CD104 auf EV der Zelllinien BPH1 (a-c), DU145 (d-f), LNCaP (g-i), HCT116 (j-l) und PANC1 (m-o).

3.2.4 Unterschiede in der Einzel - und Mehrfachfärbung

Um die Ergebnisse einer Einzelfärbung mit einer Mehrfachfärbung zu vergleichen, wurden EV von PC3-Zellen unter den gleichen Bedingungen für jeden zu untersuchenden Marker einzeln gefärbt. Zeitgleich erfolgte eine Mehrfachfärbung einer Probe mit den sechs Antikörpern (CD9-PE, CD63-PE-Cy7, CD81-FITC, CD29-BV510, CD51-AF647 und CD104-BV421). Die Partikelmenge pro Einzelfärbung lag bei $1,5 \times 10^{10}$ Partikel/ml. Für die Mehrfachfärbung wurde ebenfalls eine Partikelmenge von $1,5 \times 10^{10}$ Partikel/ml gewählt. Die gleiche Detektionsrate der EV-Marker CD9, CD63 und CD81 ergab sich bei der Mehrfachfärbung und der Einzelfärbung (Abb. 15). CD29 konnte weniger klar von der Negativkontrolle abgegrenzt werden. In der Einzelfärbung zeigten 99,7 % der EV von PC3-Zellen ein positives Signal für CD29. In der Mehrfachfärbung lag der Anteil bei 92,3 %. Auch für CD104 ließ sich ein Intensitätsverlust von 26 % durch die Mehrfachfärbung verzeichnen (Abb. 15).

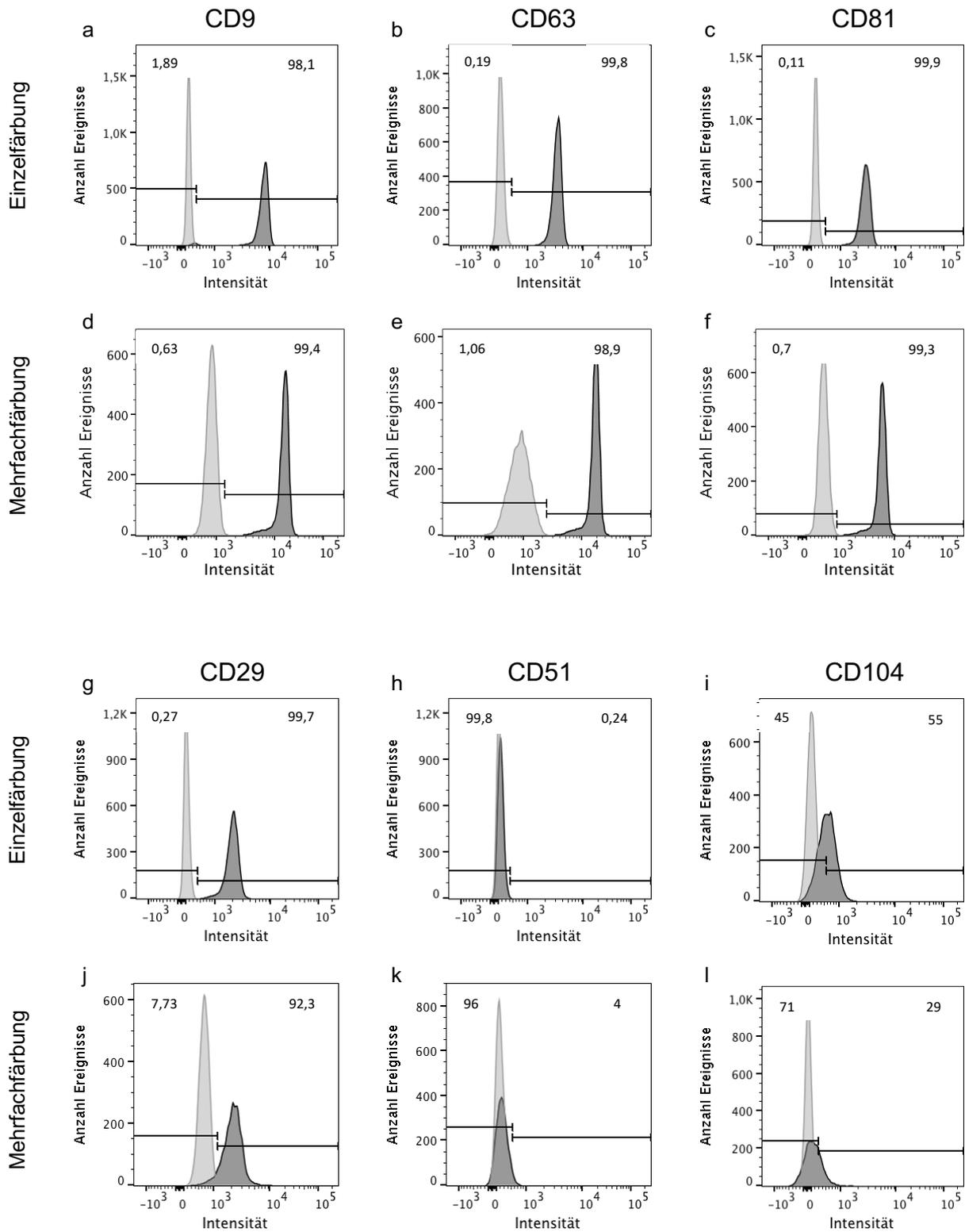


Abb. 15: Einzelfärbungen und Mehrfachfärbung der EV-Marker und Integrine auf EV von PC3-Zellen. Durchflusszytometrische Analysen der Einzel- und Sechsfachfärbung von CD9, CD63, CD81, CD29, CD51 und CD104 auf EV von PC3-Zellen, die an CD9-Dynabeads gekoppelt und anschließend gefärbt wurden. Hellgrau: ungefärbte Probe, dunkelgrau: gefärbte Probe. Expression der EV-Marker CD9, CD63 und CD81 in der Einzelfärbung (a-c) und Mehrfachfärbung (d-f). Expression der Integrine CD29, CD51 und CD104 in der Einzelfärbung (g-i) und Mehrfachfärbung (j-l).

3.2.5 Nachweis von EV-Markern auf EV von PC3-Zellen gekoppelt an verschiedene Dynabeads

Um zu überprüfen, ob die Auswahl der verwendeten Dynabeads einen Einfluss auf die Nachweisbarkeit der EV in der Durchflusszytometrie hat, wurden drei verschiedene Dynabeads, die an je einen der typischen EV-Marker CD9, CD63 oder CD81 binden, untersucht. Unabhängig an welche Dynabeads die EV von PC3-Zellen gekoppelt wurden, zeigten sie in der anschließenden Mehrfachfärbung für die EV-Marker CD9, CD63 und CD81 positive Signale (Abb. 16).

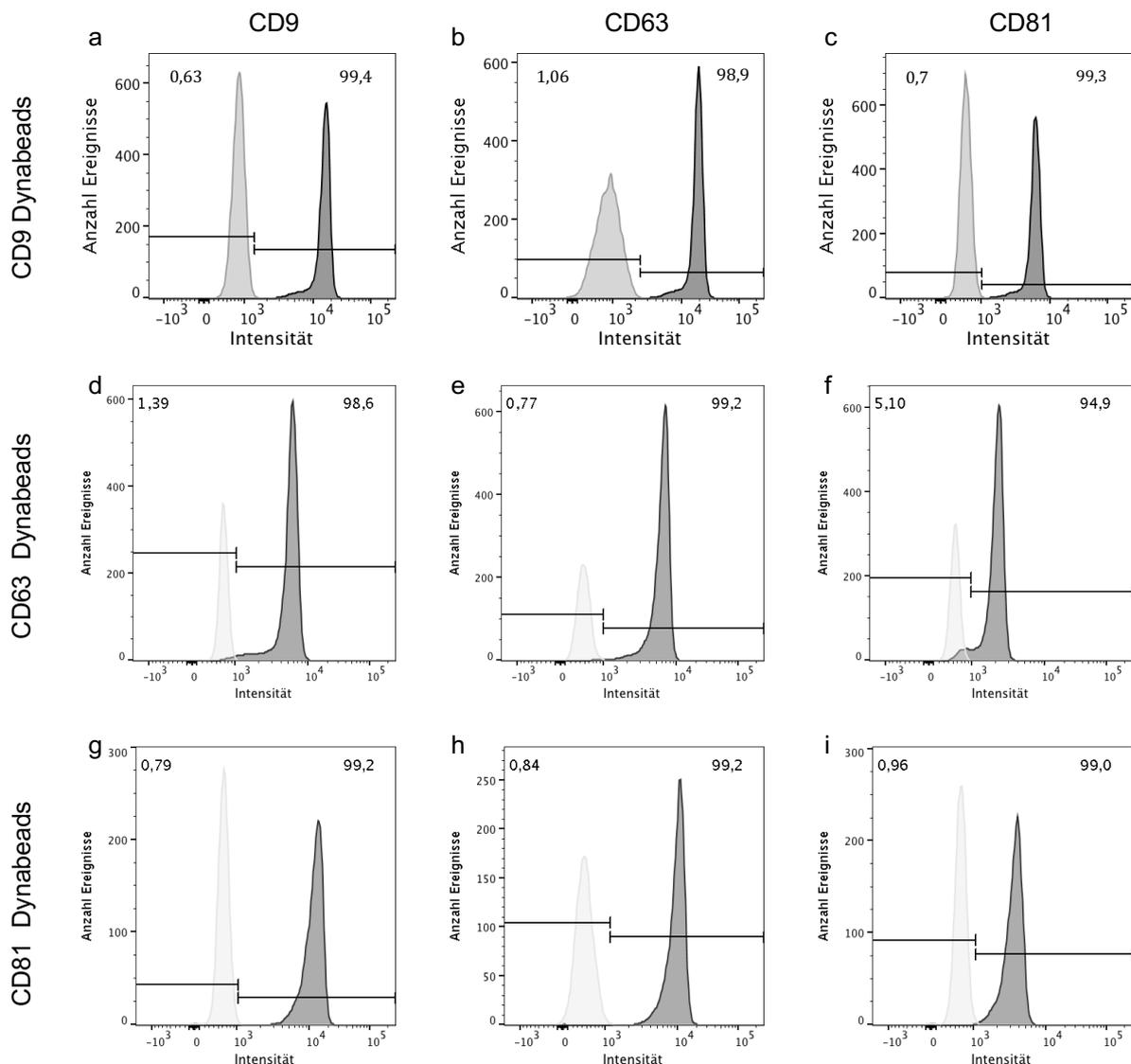


Abb. 16: Kopplung der EV von PC3-Zellen an CD9-, CD63- oder CD81-Dynabeads mit anschließender Färbung der EV-Marker. Beispielhafte durchflusszytometrische Analysen der EV von PC3-Zellen zeigten nach Kopplung an CD9- (a-c), CD63- (d-f) und CD81-Dynabeads (g-i) positive Signale für die EV-Marker CD9, CD63 und CD81 (dreifach Färbungen). hellgrau: ungefärbte Probe, dunkelgrau: gefärbte Probe.

3.2.6 Nachweis von EV-Markern auf EV von Probanden gekoppelt an verschiedene Dynabeads

Um zu überprüfen, dass die Ergebnisse der *in vitro* Versuche auf isolierte EV aus Plasmaproben von Probanden bzw. Patienten mit PCa übertragbar sind, wurden EV aus Blutproben von drei Probanden isoliert, an verschiedener Dynabeads gekoppelt und mittels Durchflusszytometrie evaluiert. Über 85 % der EV aus Plasmaproben gesunder Probanden zeigten positive Signale für CD9 nach der Kopplung an CD9- und CD81-Dynabeads. Nach Kopplung an CD63-Dynabeads konnten 3,5 % CD9 positive Vesikel nachgewiesen werden. Der Nachweis von CD63 auf EV gelang lediglich auf maximal 14 % der Vesikel nach der Kopplung an CD81-Dynabeads. Bei der Kopplung an CD9- oder CD63-Dynabeads konnten weniger Vesikel als CD63 positiv identifiziert werden (an CD9 Dynabeads gekoppelt: 1% CD63 positives Signal, an CD63 Dynabeads gekoppelt: 7,7 % CD63 positives Signal). Über 90 % der Vesikel ließen sich bei allen drei Probanden nach der Kopplung an CD81-Dynabeads positiv für CD81 darstellen. Weniger als 10 % der Vesikel zeigten sich nach Kopplung an CD9-Dynabeads positiv für CD81 und weniger als 1 % der Vesikel zeigten sich nach Kopplung an CD63-Dynabeads positiv für CD81 (Abb. 17).

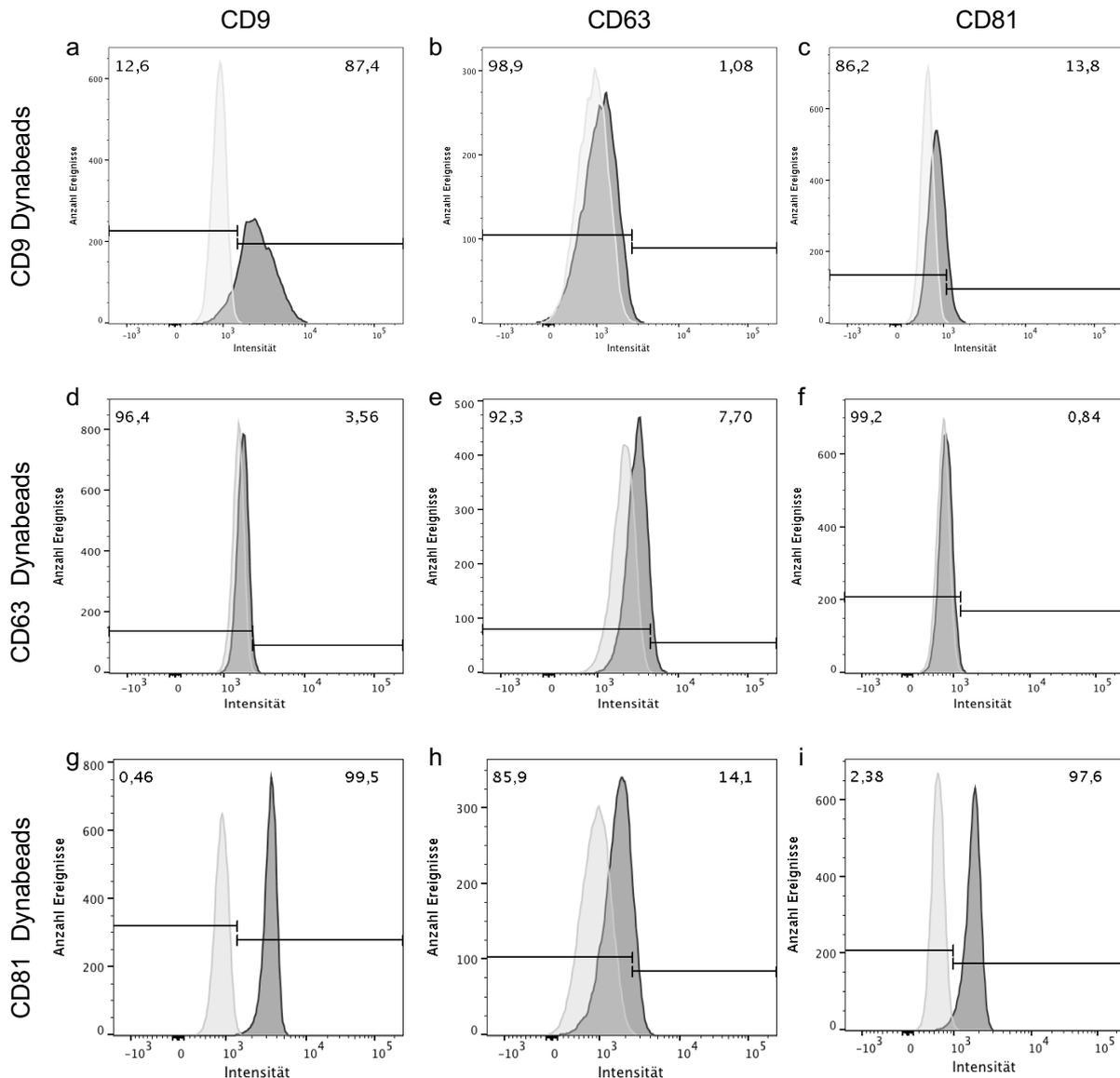


Abb. 17: Kopplung der EV eines Probanden an CD9-, CD63- oder CD81-Dynabeads und anschließende Färbung der EV-Marker. Beispielhafte durchflusszytometrische Analysen der EV von Probanden zeigten nach Kopplung an CD9-Dynabeads (a-c), CD63-Dynabeads (d-f) und CD81-Dynabeads (g-i) unterschiedliche Intensitätssignale für die EV-Marker CD9, CD63 und CD81 (dreifach Färbungen). Hellgrau: ungefärbte Probe, dunkelgrau: gefärbte Probe.

3.2.7 Einfluss der Lagerungszeit auf die Partikelgröße – und zahl

Die Plasmaproben der Neutax-Studie wurden in unterschiedlichen urologischen Kliniken und Praxen gewonnen. Um ausschließen zu können, dass eine ungekühlte Lagerung und verzögerte Verarbeitungen Einfluss auf die Partikelgröße und –zahl haben könnten, wurde eine Versuchsreihe mit vier Probandenproben durchgeführt. Plasmaröhrchen wurden bei RT für 6 h (Zeitpunkt 1), 24 h (Zeitpunkt 2) und 48 h (Zeitpunkt 3) gelagert und anschließend, wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben, aufgearbeitet. Nach

Lagerung bei -80°C erfolgte die Isolation der EV (siehe Punkt 2.2.2.1) und die Analyse mittels NTA. Sowohl für Partikelgröße als auch Partikelkonzentration ergaben sich keine signifikanten Unterschiede durch eine verzögerte Verarbeitung und Lagerung bei RT (Abb. 18). Eine detaillierte Darstellung der statistischen Ergebnisse ist im Anhang Tab. I zu finden.

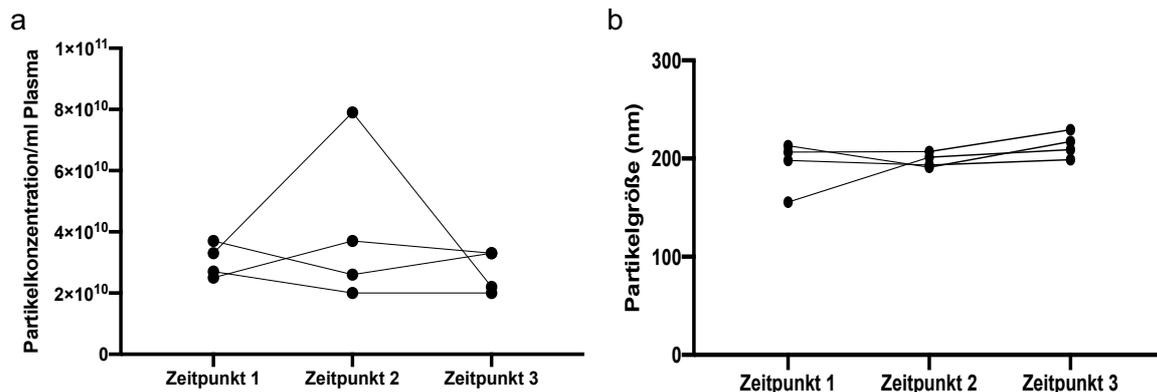


Abb. 18: Einfluss der Lagerungszeit auf Partikelgröße und Partikelkonzentration EV aus Plasmaproben gesunder Probanden nach Lagerung der Plasmaproben für 6 h (Zeitpunkt 1), 24 h (Zeitpunkt 2) und 48 h (Zeitpunkt 3) bei RT, Probanden n=4. (a) Partikelkonzentration Friedman-Test $p = 0,7778$, (b) Partikelgröße Friedman-Test $p = 0,0694$.

3.2.8 Einfluss eines zusätzlichen Filterschritts auf Partikelgröße – und zahl

An vier Probanden wurde der Einsatz eines 220 nm Filters evaluiert. Nach Zentrifugation des Plasmas bei $10.000 \times g$ (30 min, 4°C) wurde der Überstand durch einen 220 nm Filter gegeben. Zum Vergleich wurde eine zweite Probe jedes Probanden mitgeführt. Der Überstand dieses zweiten Ansatzes wurde direkt auf die Säule des exoEasy Kits gegeben (siehe Punkt 2.2.2.1). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Partikelgrößen und –konzentrationen beider Gruppen (Abb. 19). Eine detaillierte Darstellung der statistischen Ergebnisse liefert Tab. I im Anhang.

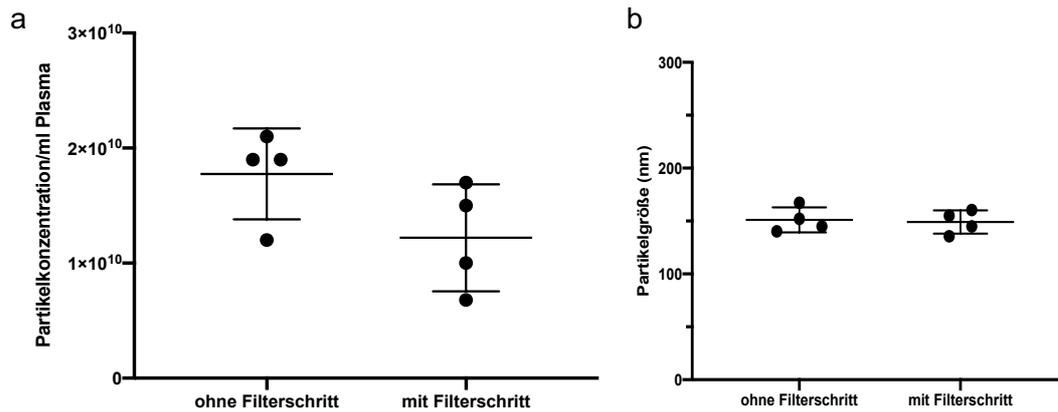


Abb. 19: Einfluss eines 220 nm Filters auf die Partikelgröße und Partikelkonzentration. Aus Plasmaproben gesunder Probanden wurden mit und ohne Filtrationsschritt (220 nm Filter) EV aufgereinigt, Probanden n = 4. (a) Partikelkonzentration ohne und mit Filterschritt, Wilcoxon matched pairs $p = 0,1250$ (b) Partikelgröße ohne und mit Filterschritt, Wilcoxon matched pairs $p > 0,9999$.

3.2.9 Charakterisierung der isolierten EV aus Plasmaproben gesunder Probanden, Patienten mit BPH und lokalisiertem PCa

In den durchgeführten NTA-Analysen zeigten die EV von acht gesunden Probanden, fünf Patienten mit BPH und sechs Patienten mit lokalisiertem PCa (jeweils 2 mit low-risk, intermediate-risk und high-risk PCa) die typische EV-Größenverteilungen zwischen 172 nm und 184 nm (Abb. 20a und Tbl. 18). Die Partikelkonzentrationen der EV (Abb. 20b) unterschieden sich in den drei Gruppen signifikant (Kruskal-Wallis-Test $p = 0,0025$). Post-hoc Analysen nach Dunn ergaben signifikant höhere Partikelkonzentration in der Gruppe der Probanden gegenüber Patienten mit lokalisiertem PCa ($p = 0,0056$). Für Probanden und Patienten mit BPH sowie zwischen Patienten mit BPH und lokalisiertem PCa konnte kein Unterschied gezeigt werden (Probanden vs. BPH: $p = 0,2518$, BPH vs. lokalisiertes PCa: $p = 0,7553$). Eine detaillierte Darstellung der statistischen Ergebnisse gibt Tab. II im Anhang.

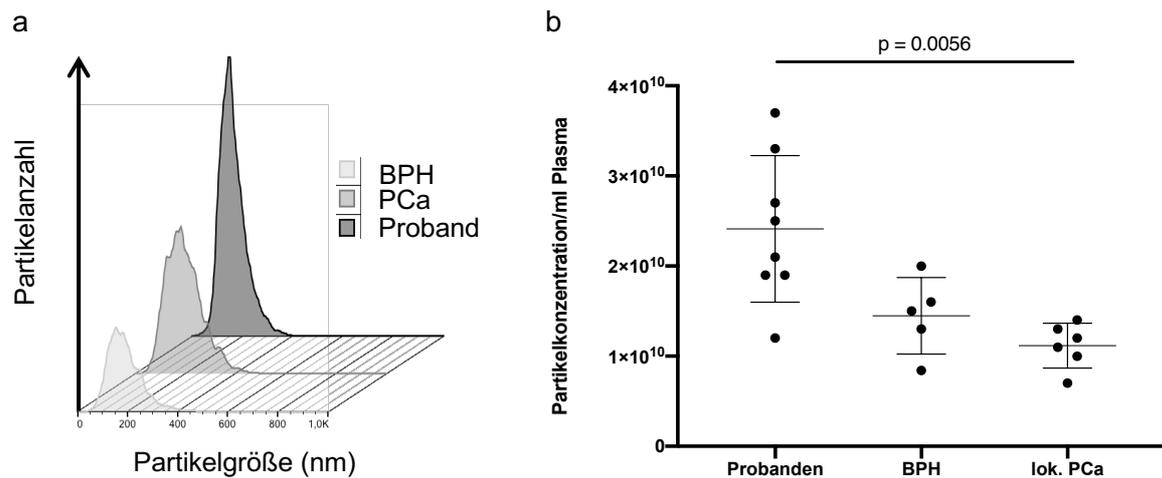


Abb. 20 Partikelgröße und –konzentration gesunder Probanden, Patienten mit BPH und lokalisiertem PCa. (a) Exemplarische Darstellung der EV-Partikelgrößen isoliert aus Plasma von einem gesunden Probanden, einem Patienten mit BPH und einem Patienten mit lokalisiertem (lok.) PCa gemessen mittels NTA. Durch die unterschiedlichen Probenverdünnungen ist mit dieser Grafik keine direkte Vergleichbarkeit der Partikelzahl zwischen den einzelnen Proben möglich. (b) Darstellung der Partikelkonzentration pro ml Plasma von Probanden (n = 8), Patienten mit BPH (n = 5) und Patienten mit lokalisiertem PCa (n = 6). Statistische Analyse der Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Test und post-hoc Analysen nach Dunn.

Tbl. 18: Partikelgröße und Partikelkonzentration der EV aus Plasmaproben gesunder Probanden, Patienten mit BPH und lokalisiertem PCa

	Partikelgröße (nm) MW ± SD	Partikelkonzentration/ml Plasma MW ± SD
Probanden	172,3 ± 29,3	2,41 x 10 ¹⁰ ± 8,13 x 10 ⁹
BPH	184,3 ± 20,3	1,45 x 10 ¹⁰ ± 4,25 x 10 ⁹
lok. PCa	181,8 ± 5,7	1,12 x 10 ¹⁰ ± 2,48 x 10 ⁹

Um die Ergebnisse der Durchflusszytometrie der Patientenproben vergleichen zu können, wurde eine einheitliche Konzentration von $0,5 \times 10^9$ EV verwendet. Ob diese Konzentration zur Detektion und Analyse der EV im Durchflusszytometer ausreichend ist, wurde an drei Probandenproben getestet. Bei der Mehrfachfärbung der drei EV-Marker CD9, CD63, CD81 und einer EV-Einsatzmengen von $0,5 \times 10^9$ Partikeln konnte für keinen EV-Marker ein positives Signal detektiert werden. Um auszuschließen, dass es sich um falsch negative Ergebnisse aufgrund einer zu geringen Probenmenge handelt, wurde die an Zelllinien austrierte EV-Konzentration ausgetestet. Bei gleichbleibenden Antikörperkonzentration konnte bei einer EV-Einsatzmengen von $0,5 \times 10^{10}$ Partikeln

pro Färbung ein positives Signal für CD9 gezeigt werden. Eine Erhöhung der EV-Mengen auf $1,5 \times 10^{10}$ Partikeln pro Färbung zeigte eine scharfe Abgrenzung der Negativkontrolle von der gefärbten Probe für den EV-Marker CD9. Eine Detektion von CD81 gelang ebenfalls. Ein eindeutig positives Signal für CD63 ließ sich nicht detektieren. Ob eine weitere Erhöhung der Partikelmenge, die Detektion von CD63 ermöglichen würde, konnte aufgrund des limitierten Probenmaterials nicht getestet werden. Die Ergebnisse der unterschiedlichen EV-Konzentrationen und deren Einfluss auf die Detektion der EV-Marker sind an einem Beispielprobanden in Abb. 21 dargestellt. Eine Konzentration von $1,5 \times 10^{10}$ Partikeln pro Färbung ist für Patientenproben aufgrund des begrenzten Probenmaterials hier nicht realisierbar.

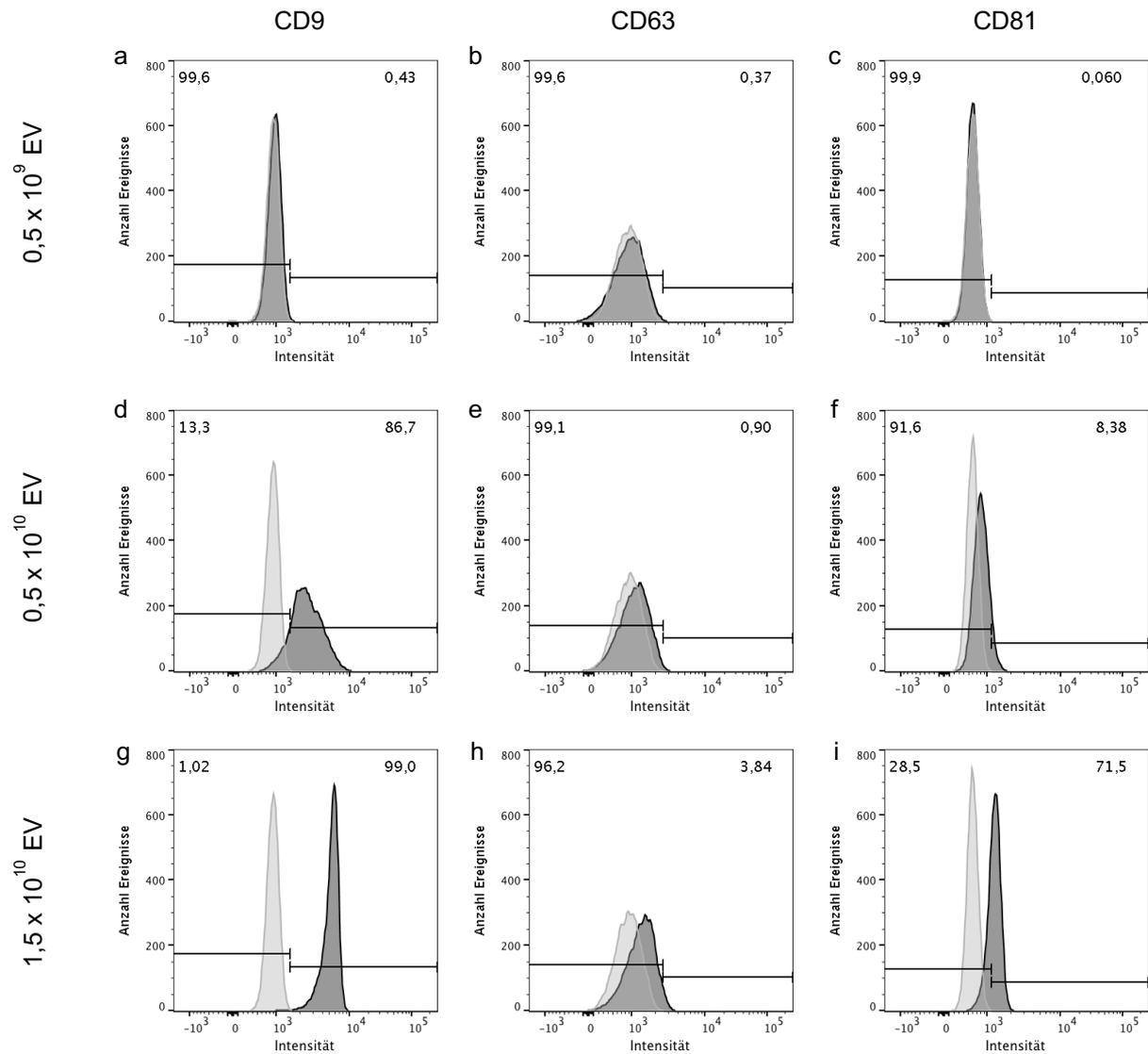


Abb. 21: Detektion der EV-Marker auf EV von Probanden bei unterschiedlichen Partikelkonzentrationen. In durchflusszytometrische Analysen wurden EV aus Probandenproben an CD9-Dynabeads gekoppelt und anschließend gefärbt (Mehrfachfärbung der EV-Marker CD9, CD63, CD81). Hellgrau: ungefärbte Probe, dunkelgrau: gefärbte Probe. Partikeleinsatz pro Färbung $0,5 \times 10^9$ (a-c), $0,5 \times 10^{10}$ (d-f) und $1,5 \times 10^{10}$ (g-i). Mit steigender Partikelmenge pro Färbung bei gleichbleibender Antikörperkonzentration zeigte sich ein detektierbarer Nachweis der EV-Marker CD9 und CD81, aber nicht CD63.

3.2.10 Analyse des Markerpanels an gesunden Probanden

Die Analyse des finalen Markerpanels bestehend aus einer Sechsfachfärbung mit den Fluorochrom-konjugierten Antikörpern CD9-PE, CD63-PE-Cy7, CD81-FITC, CD29-BV510, CD51-AF647 und CD104-BV421 erfolgte an EV aus Blutplasmaproben gesunder Probanden. Die EV-Menge betrug $0,5 \times 10^{10}$. Auf den EV von 6 gesunden Probanden konnte der EV-Marker CD9 nahezu auf allen (98,5 %) der analysierten Vesikel nachgewiesen werden. Ein partieller Nachweis von CD81 (20 %) und CD63 (22 %) ließ sich ebenfalls darstellen. Ein Nachweis von CD29 gelang auf 19,5 % und von CD104 auf 10 % der EV, wohingegen CD51 nur auf 1,3 % der EV nachgewiesen werden konnte. Eine exemplarische durchflusszytometrische Analyse ist in Abb. 22 dargestellt. In Zusammenhang mit den bekannten Partikelgrößen der Proben konnte von einer erfolgreichen Partikelanreicherung ausgegangen werden.

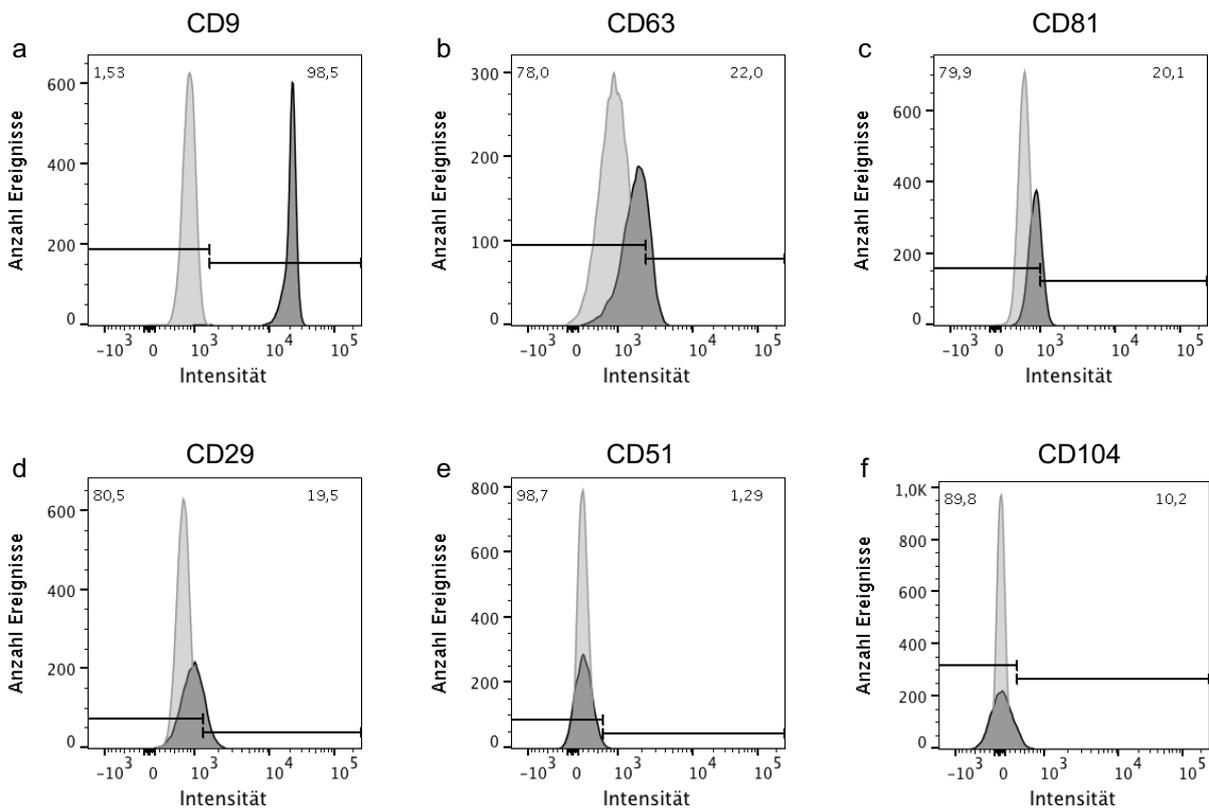


Abb. 22: EV-Marker und Integrinsignatur auf EV eines gesunden Probanden. Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse einer Mehrfachfärbung mit den EV-Markern CD9 (a), CD63 (b), CD81 (c) und den Integrinen CD29 (d), CD51 (e) und CD104 (f), EV aus Probandenplasma gekoppelt an CD9-Dynabeads und anschließend gefärbt, hellgrau: ungefärbte Probe, dunkelgrau: gefärbte Probe.

3.2.11 Analyse des Markerpanels an Patienten mit lokalisiertem PCa

An isolierten EV aus Blutplasmaprobanden von 6 Patienten, die an einem lokalisiertem PCa erkrankt waren, wurde das finale Markerpanel analog zu Punkt 3.2.10 getestet. Ein Großteil (ca. 70%) der analysierten Partikel zeigte ein positives Signal für CD9. Ein partieller Nachweis von CD81 (ca. 15 %) gelang ebenfalls. Weniger als 5 % der gemessenen Partikel zeigten ein positives Signal für CD63. Die Integrine CD29 und CD51 konnten in weniger als 2 % nachgewiesen werden. Auf 11,5 % der Partikel konnte ein CD104 positives Signal gezeigt werden (Abb. 23).

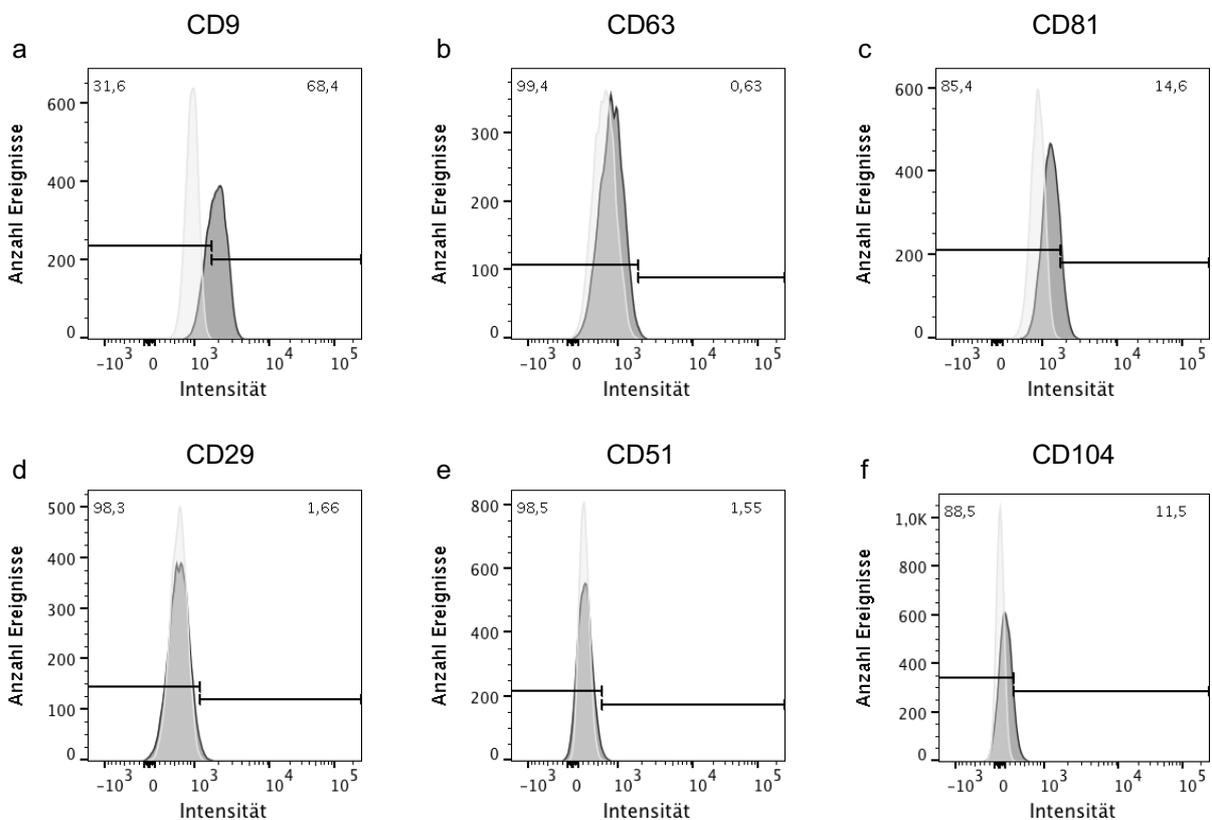


Abb. 23: EV-Marker und Integrinsignatur auf EV eines Patienten mit lokalisiertem PCa.

Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrische Analyse einer Mehrfachfärbung mit den EV-Marker CD9 (a), CD63 (b), CD81 (c) und den Integrine CD29 (d), CD51 (e) und CD104 (f), EV aus Patientenplasma gekoppelt an CD81-Dynabeads und anschließend gefärbt, hellgrau: ungefärbte Probe, dunkelgrau: gefärbte Probe.

3.2.12 Analyse des Markerpanels an Patienten mit lokalisiertem PCa und ossär metastasiertem PCa

An EV isoliert aus Plasmaproben von sechs Patienten mit lokalisiertem PCa und fünf Patientenproben mit ossärer Metastasierung eines PCa erfolgte die Sechsfachfärbung mit den Fluorochrom-konjugierten Antikörper CD9-PE, CD63-PE-Cy7, CD81-FITC, CD29-BV510, CD51-AF647 und CD104-BV421. Die eingesetzte Menge an EV betrug $0,5 \times 10^{10}$. Auf EV beider Gruppen konnte der EV-Marker CD9 auf ca. der Hälfte der analysierten Vesikel nachgewiesen werden (Abb. 24 a). Ein partieller Nachweis von CD81 (ca. 10 % der EV von Patienten mit lokalisiertem PCa und < 5 % der EV von Patienten mit ossär metastasiertem PCa) und CD63 (< 5 % in beiden Gruppen) ließ sich auf EV beider Gruppen darstellen (Abb. 24 b-c). Die EV von Patienten, die an einem lokalisierten PCa erkrankten, waren signifikant häufiger CD81 positiv als EV von Patienten mit einem ossär metastasierten PCa (Mann-Whitney-Test $p = 0,0173$). Der Nachweis der Integrine CD29, CD51 und CD104 unterschied sich in beiden Gruppen nicht signifikant (Abb.24 d-f).

Eine detaillierte Darstellung der statistischen Analysen liefert Tab. III im Anhang.

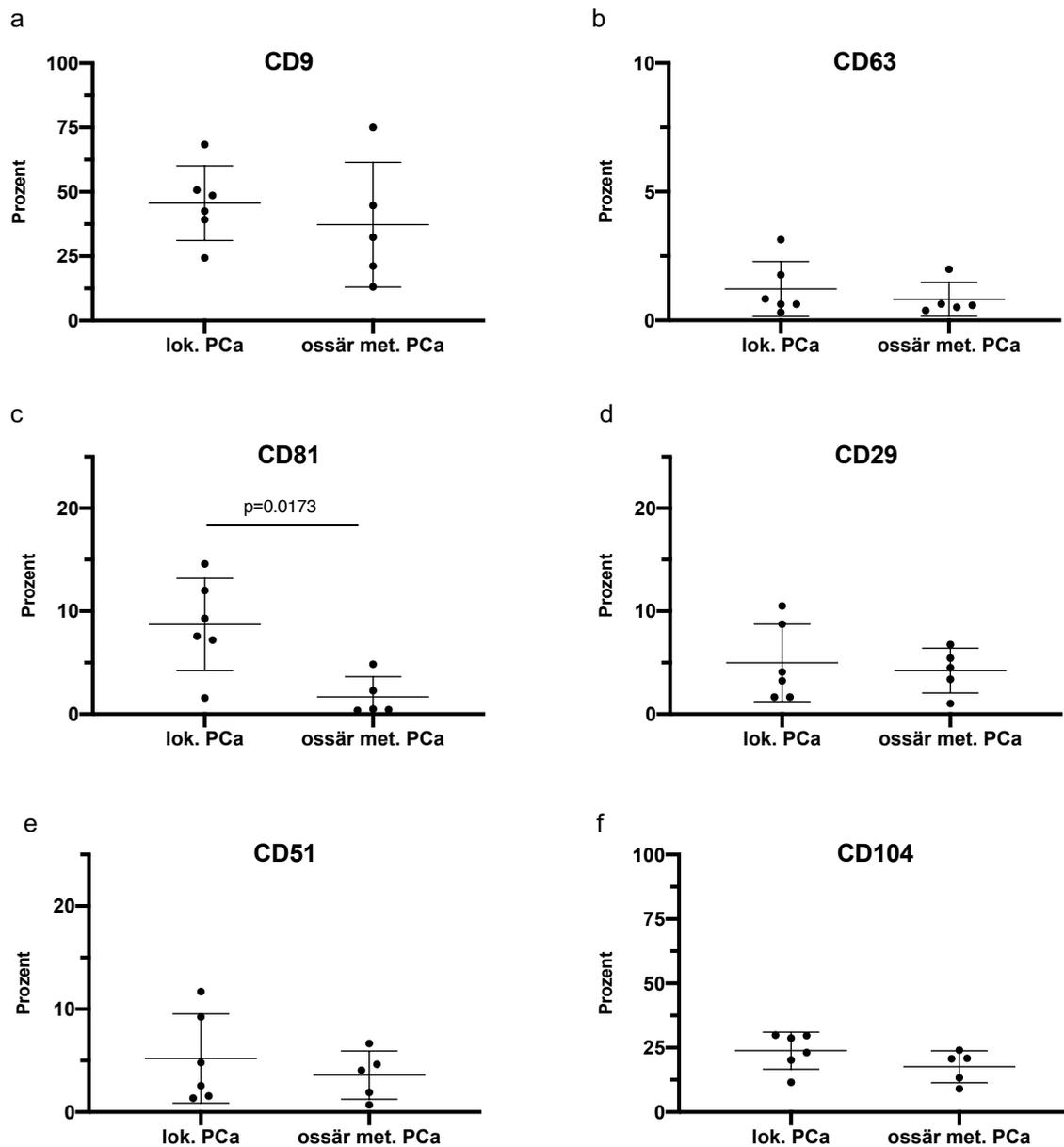


Abb 24: EV-Marker und Integrinsignatur auf EV von Patienten mit lokalisertem PCa und ossär metastasiertem PCa. Zusammenfassung der durchflusszytometrische Analysen der Mehrfachfärbung mit den EV-Markern CD9, CD63, CD81 und den Integrinen CD29, CD51 und CD104. EV aus Patientenplasma wurden an CD81-Dynabead gekoppelt und anschließend gefärbt. Proben n = 11, lokalisertes PCa n = 6, ossär metastasiertes PCa n = 5, statistische Analysen mittels Mann-Whitney-Test.

3.3 Analyse der Neutax-Kohorte

Patienten ohne VM hatten im Durchschnitt Partikelgrößen von $138,0 \text{ nm} \pm 13,4 \text{ nm}$ und Patienten mit VM von $144,3 \text{ nm} \pm 16,1 \text{ nm}$ (Abb. 25a). Die Partikelkonzentrationen bei Patienten mit VM lag im Durchschnitt bei $1,70 \times 10^{10} \pm 7,6 \times 10^9$ und somit über der Partikelkonzentration von $1,55 \times 10^{10} \pm 4,9 \times 10^9$ bei Patienten ohne VM (Abb. 25b). Unter Therapie mit Docetaxel sanken Partikelgröße und –konzentration nicht signifikant ab (Abb. 25 c-h). Im Vergleich zu Patienten mit Lungen- und Knochenmetastasen hatten Patienten mit Lebermetastasen größere Vesikel und eine höhere Vesikelanzahl pro ml Plasma (Abb. 25 i-j). Die genauen statistischen Analysen sind im Anhang in Tbl. IV zusammengefasst.

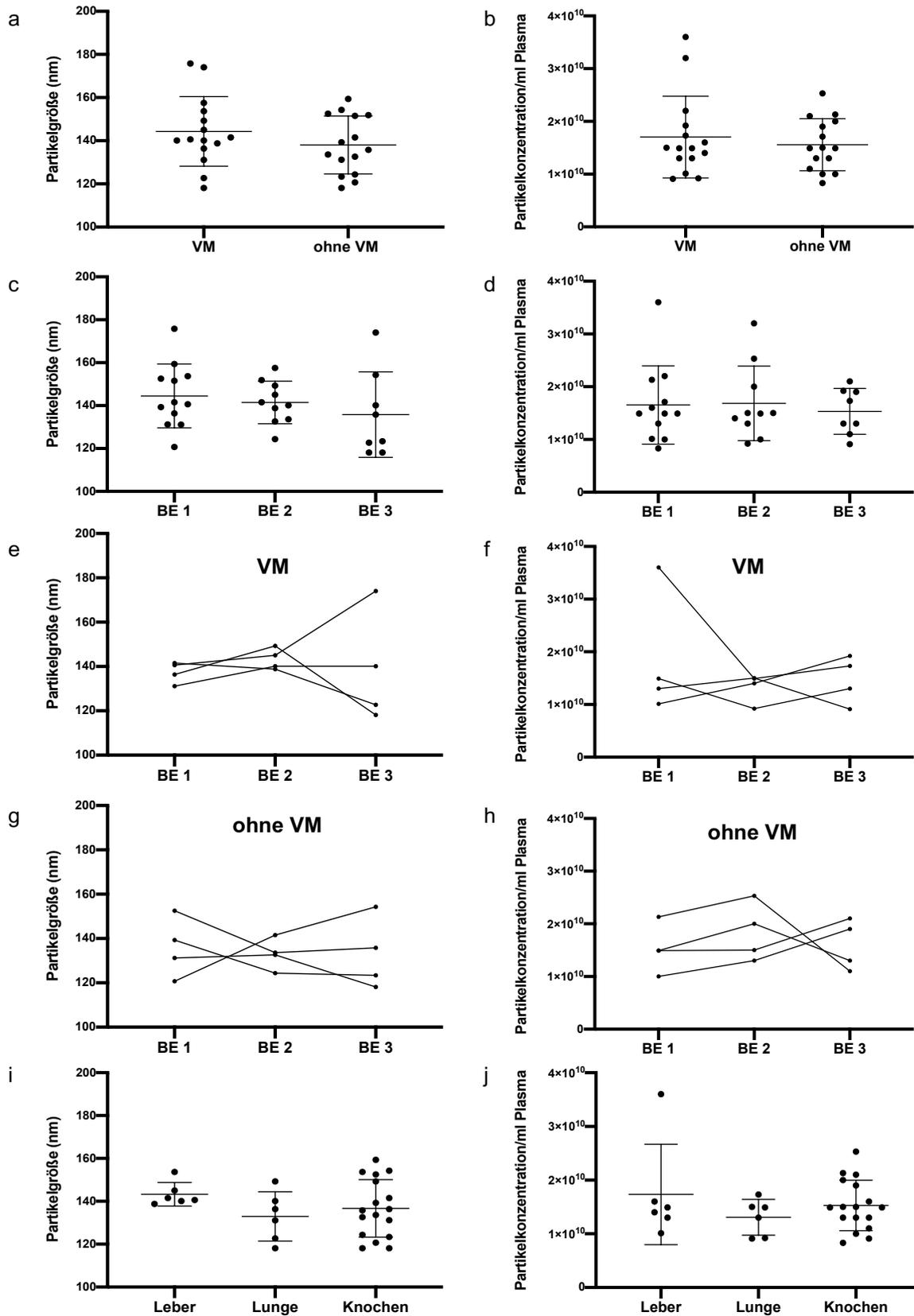


Abb. 25: Partikelgröße und Partikelkonzentration der Neutax-Kohorte.

Blutentnahme 7 Tage vor dem ersten Zyklus Docetaxel (BE1), VM n = 6, ohne VM n = 6, Blutentnahme 7 Tage vor dem dritten Zyklus Docetaxel (BE2), VM n = 5, ohne VM n = 5, Blutentnahme 7 Tage vor dem sechsten Zyklus Docetaxel (BE3), VM n = 4, ohne VM n = 4.

(a,b) Zusammengefasst alle 12 Patienten der Neutax-Kohorte zu allen 3 Zeitpunkten. (c,d) Patienten mit und ohne VM unter Therapie. (e,f) Subgruppenanalyse Patienten mit VM unter Therapie. (g,h) Subgruppenanalyse Patienten ohne VM unter Therapie. (i,j) Subgruppenanalyse in Abhängigkeit vom Ort der Metastasierung.

3.3.1 Analyse der Patienten mit mCRPC

Patienten mit einem viszeral metastasierten PCa hatten im Durchschnitt eine Partikelgröße von 165 nm und damit signifikant ($p = 0,0102$) größere EV als Patienten ohne VM, die eine durchschnittliche Partikelgröße von 142 nm aufwiesen. Die Partikelkonzentrationen von Patienten mit mCRPC mit und ohne VM unterschieden sich kaum ($p = 0,3723$). Eine grafische Darstellung der Ergebnisse ist in Abb. 26 zu sehen.

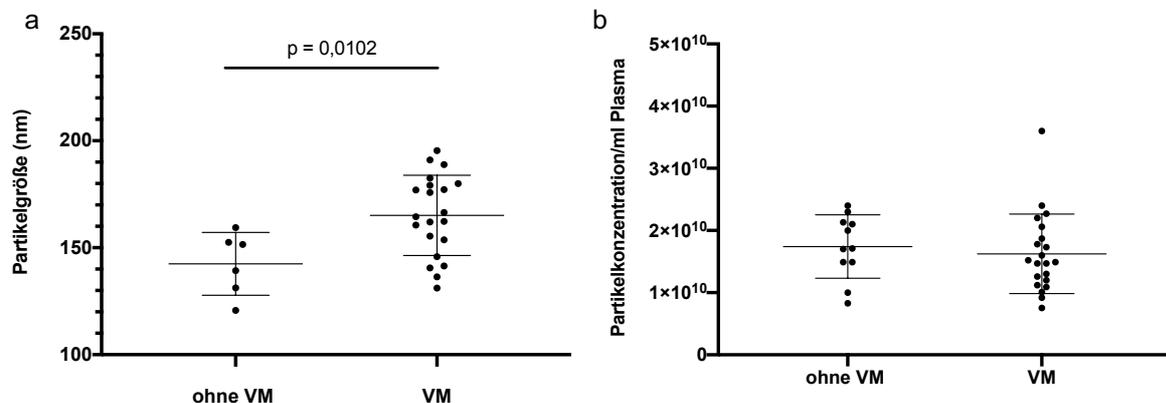


Abb. 26: Partikelgröße und Partikelkonzentration von Patienten mit metastasierten kastrationsrefraktären Prostatakarzinom (mCRPC) mit und ohne VM. (a) Partikelgröße MW \pm SD.: VM 165,1 nm \pm 18,8 nm, ohne VM 142,4 nm \pm 14,7 nm, Mann-Whitney-Test $p = 0,0102$ ($n = 27$ (VM $n = 21$, ohne VM $n = 6$), ausgeschlossen $n = 5$), (b) Partikelkonzentration MW \pm SD.: VM $1,6 \times 10^{10} \pm 6,4 \times 10^9$ Partikel/ml Plasma, ohne VM $1,7 \times 10^{10} \pm 5,1 \times 10^9$ Partikel/ml Plasma, Mann-Whitney $p = 0,3723$ ($n = 32$, VM $n = 21$, ohne VM $n = 11$)

Patienten mit lokalisiertem PCa hatten im Vergleich zu Patienten mit mCRPC und VM ($p = 0,0488$) und zu Patienten mit mCRPC ohne VM ($p = 0,0022$) größere Vesikel. Auch Patienten mit einer BPH zeigten größere Vesikel als Patienten mit einem mCRPC ohne VM ($p = 0,0043$). Zwischen Probanden und Patienten mit BPH, lokalisiertem PCa oder mCRPC mit und ohne VM konnten keine signifikanten Größenunterschiede gemessen werden. Gleiches galt für Patienten mit BPH und Patienten mit einem lokalisiertem PCa bzw. einem mCRPC mit VM. Eine zusammenfassende Darstellung liefert Abb. 27 sowie Tab. V im Anhang.

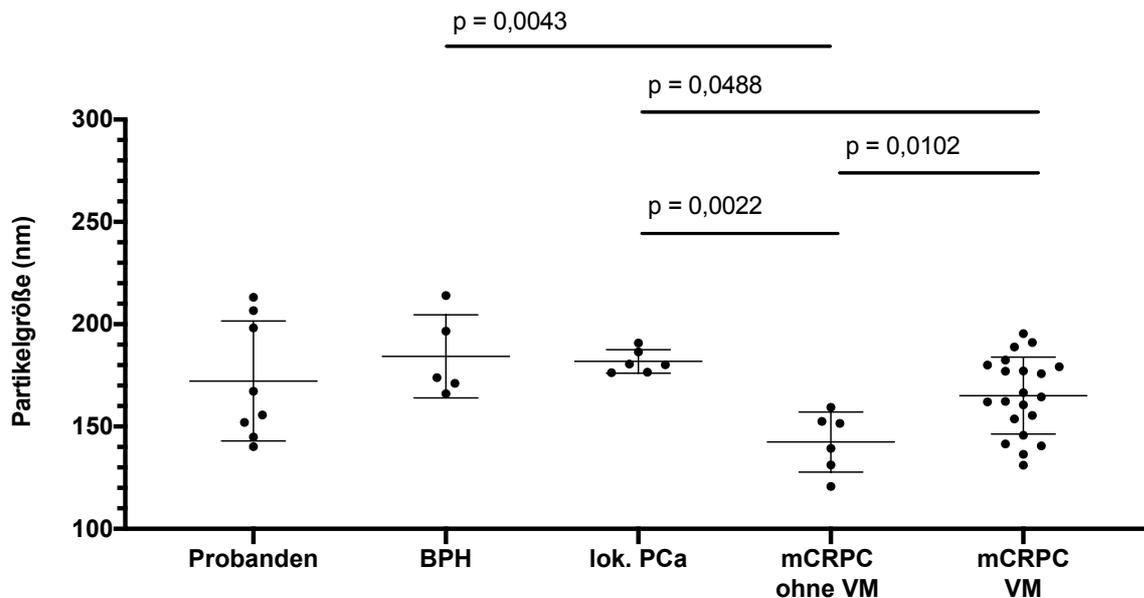


Abb. 27: Vergleich der Partikelgrößen von Probanden, Patienten mit BPH, Patienten mit lokalisiertem PCa und mCRPC mit und ohne VM. Probanden n = 8, BPH n = 5, lok. PCa n = 6, mCRPC ohne VM n = 11, mCRPC VM n = 21. Statistische Analysen zwischen zwei Gruppen mittels Mann-Whitney-Test.

Patienten mit mCRPC mit ($p = 0,0344$) und ohne VM ($p = 0,0160$) wiesen signifikant höhere Partikelkonzentrationen als Patienten mit einem lokalisiertem PCa auf. Aus Plasma von Probanden konnten signifikant mehr Vesikel angereichert werden als bei Patienten mit BPH ($p = 0,0412$), mit lokalisiertem PCa ($p = 0,0033$) und mCRPC und VM ($p = 0,0102$). Zwischen Patienten mit BPH und lokalisiertem sowie mCRPC mit und ohne VM konnten keine signifikanten Unterschiede in der Partikelkonzentration gemessen werden. Eine zusammenfassende Darstellung liefert Abb. 28.

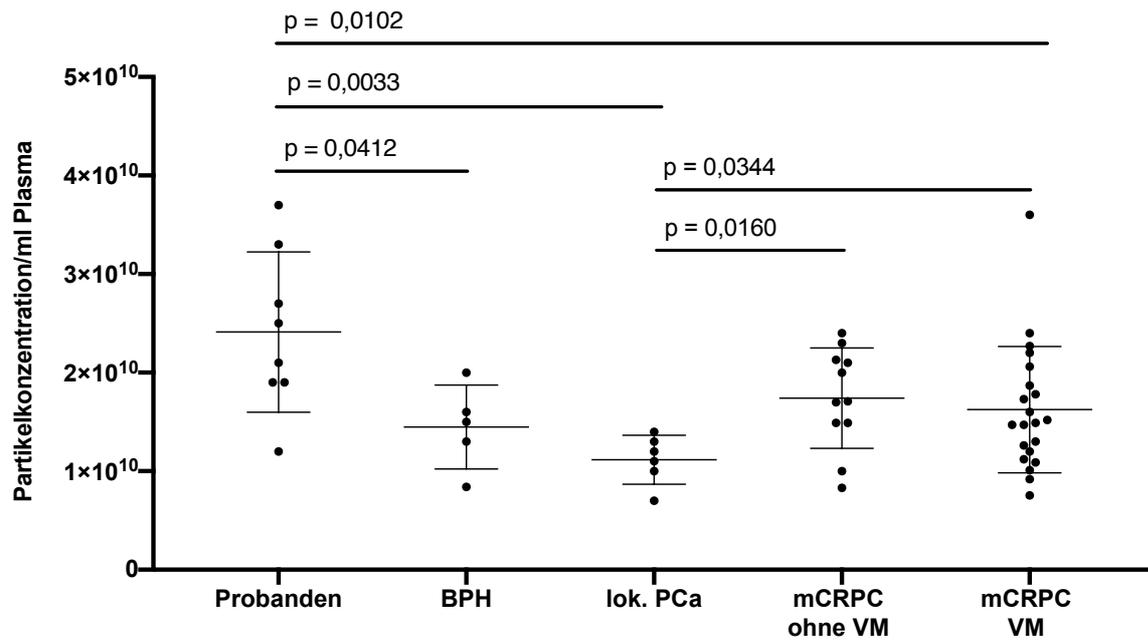


Abb. 28: Vergleich Partikelkonzentrationen von Probanden, Patienten mit BPH, Patienten mit lokalisertem PCa und mCRPC mit und ohne VM. Probanden n = 8, BPH n = 5, lok. PCa n = 6, mCRPC ohne VM n = 11, mCRPC VM n = 21. Statistische Analysen zwischen zwei Gruppen mittels Mann-Whitney-Test.

Weiterhin wurden Korrelationsanalysen zur Detektion eines möglichen Zusammenhangs zwischen PSA-Wert und Partikelkonzentration durchgeführt. Diese zeigten einen Zusammenhang zwischen steigendem PSA-Wert und höherer Partikelzahl pro ml Plasma ($p = 0,0069$. Abb.29).

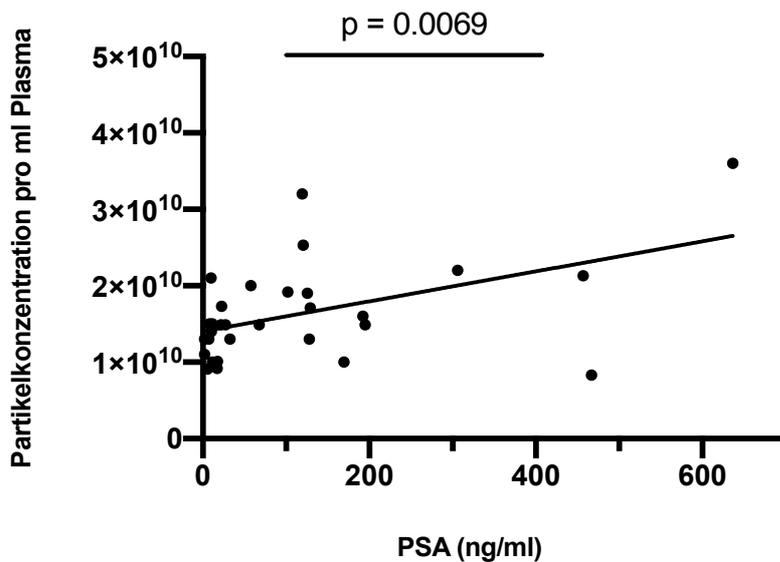


Abb. 29: Korrelation der Partikelkonzentration mit dem PSA-Wert. Mit steigendem PSA-Wert ist ein signifikanter Anstieg der Partikelkonzentration/ml Plasma zu beobachten. Korrelationsanalyse nach Pearson, Pearsons $r = 0,4825$.

Es erfolgten die Kaplan-Meier-Analysen aller Patienten mit mCRPC unabhängig vom Ort der Metastasierung und der vorangegangenen Therapien. Zum Zeitpunkt der Auswertung waren 25 Patienten verstorben. Sieben Patienten mussten aufgrund fehlender Daten ausgeschlossen werden (Abb. 30).

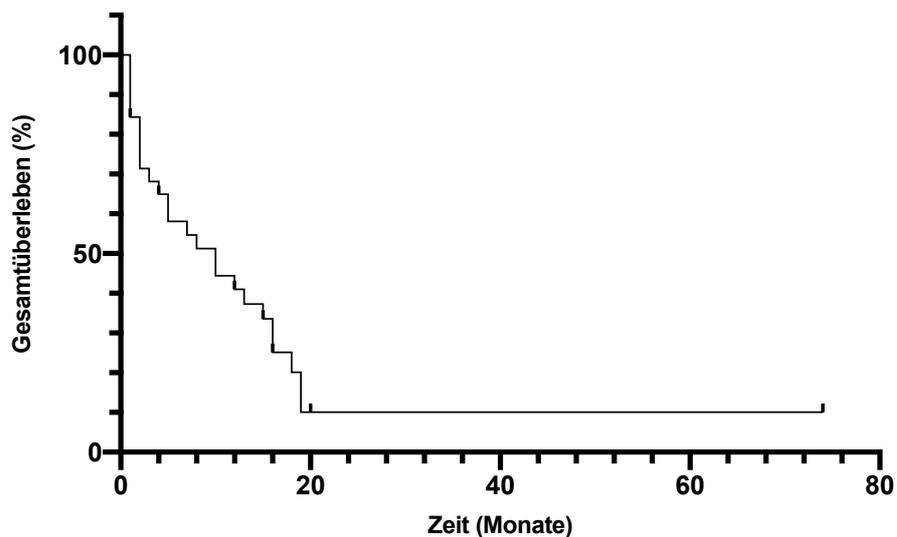


Abb 30: Kaplan-Meier-Kurve aller Patienten mit mCRPC nach Studieneinschluss (in Monaten). Kohortengröße $n = 32$, zensiert $n = 7$.

Patienten mit VM starben im Durchschnitt 6,8 Monate nach Studieneinschluss. Patienten ohne VM lebten im Mittel 4,5 Monate länger als Patienten mit VM.

Innerhalb der Gruppe der Patienten bei denen eine VM vorlag, lebten Patienten mit Lebermetastasen unabhängig davon welcher Metastasierungsort zusätzlich vorlag signifikant kürzer als Patienten ohne Lebermetastasen ($p = 0,0009$). Im Überleben von Patienten mit und ohne Lungenmetastasen ließ sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,1811$) feststellen. Eine zusammenfassende Darstellung der Überlebenszeitkurven zeigten die Abb. 31.

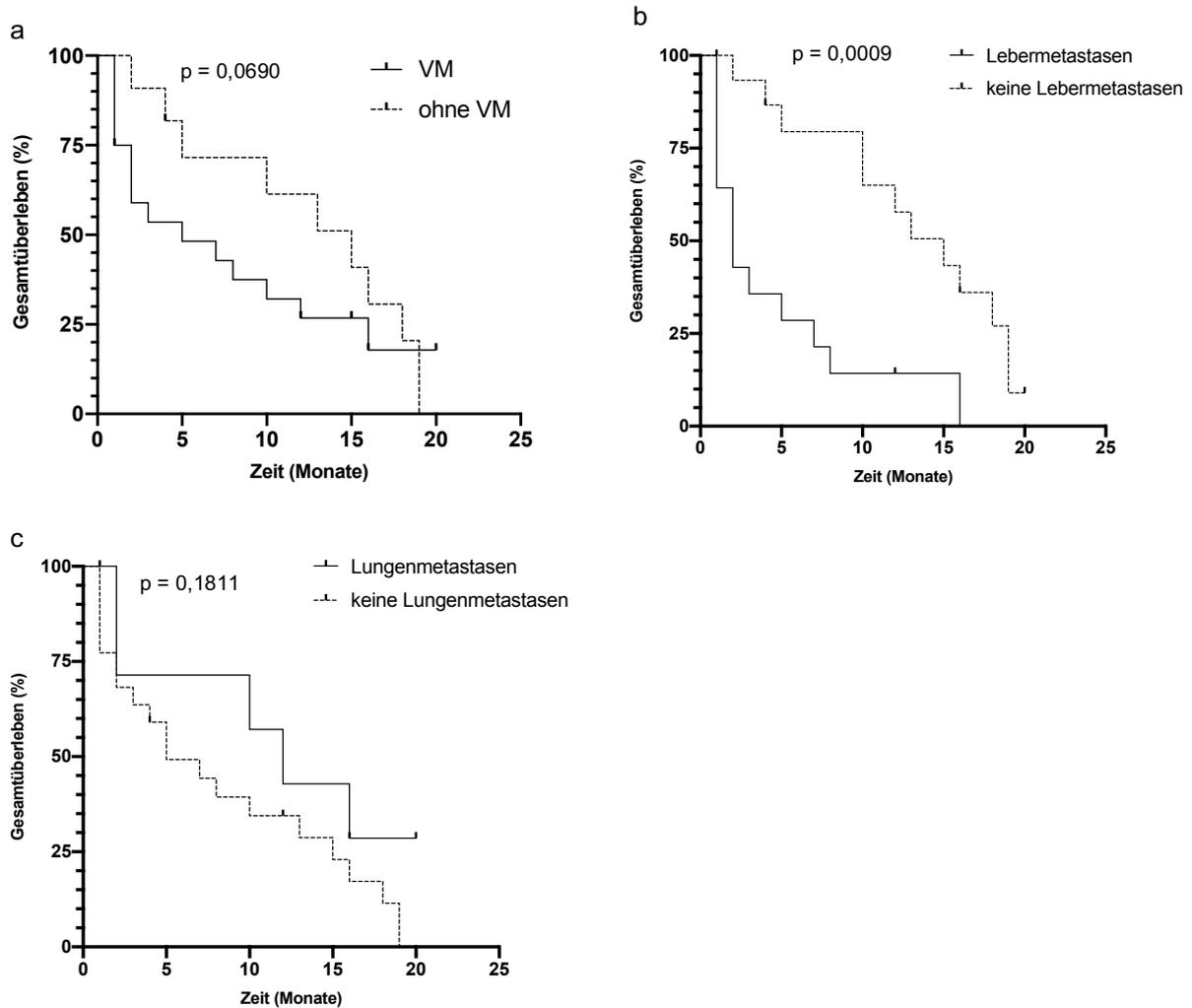


Abb 31: Kaplan-Meier-Kurve aller Patienten mit mCRPC nach Studieneinschluss (in Monaten). $n = 32$, zensiert $n = 7$. (a) Überleben seit Studieneinschluss MW \pm SD: VM $6,8 \pm 6,3$ Monate, ohne VM $11,4 \pm 6,6$ Monate. (b) Überleben seit Studieneinschluss (unabhängig davon ob zeitgleich ossäre oder pulmonale Metastasen vorlagen) MW \pm SD: mit Lebermetastasen $4,4 \pm 4,7$ Monate, ohne Lebermetastasen $11,5 \pm 6,5$ Monate. (c) Überleben seit Studieneinschluss (unabhängig davon ob zeitgleich ossäre oder hepatische Metastasen vorlagen) MW \pm SD: mit Lungenmetastasen $9,9 \pm 7,4$ Monate, ohne Lungenmetastasen $7,6 \pm 6,5$ Monate.

4 DISKUSSION

Der hohe internationale Stellenwert des PCa mit sowohl persönlichen Beeinträchtigungen aber auch die gesundheitsökonomische Relevanz ist unbestritten. In einer alternierenden Bevölkerung nimmt die Prävalenz des PCa zu. Insbesondere Patienten mit Metastasen versterben. Ob und wann ein Patient eine Metastasierung entwickelt, kann aktuell mit den vorhandenen diagnostischen Mitteln nicht vorausgesagt werden. Bei der Ausbildung einer Metastasierung spielen EV eine entscheidende Rolle. Sowohl als Diagnostikum als liquid biopsy als auch als mögliches Vehikel für Therapeutika stellen sie einen entscheidenden Ansatz dar. Gerade im Bereich der Onkologie und im Rahmen chronischer Erkrankungen entwickeln sich in den letzten Jahrzehnten zunehmend individualisierte Therapiekonzepte. Die vorhandenen Parameter für Screening und Diagnostik des PCa sind wie bereits eingehend aufgeführt unpräzise und stör anfällig. Sinnvoll erscheint auch nicht nur ein einzelner Parameter, sondern die Zusammenschau mehrerer Parameter um Patienten vor Über- und Untertherapie zu schützen, individuelle Risiko-/Progressionsaussagen treffen zu können und Patienten gezielt zu behandeln. Zahlreiche Studien heben die Relevanz EV insbesondere zur Verlaufskontrolle und Einleitung einer zeitgerechten Therapie/-eskalation hervor. Bevor jedoch EV als diagnostischen Instrument genutzt werden können, müssen diese genauer untersucht und ihre Funktionsweisen verstanden werden.

In Vorarbeiten unserer Forschungsgruppe wurde in Anlehnung an die Untersuchungen von Hoshino et al. erste Untersuchungen an EV isoliert aus Prostatazelllinien mittels Elektronenmikroskopie und Massenspektrometrie durchgeführt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Methodik der Durchflusszytometrie zunächst an EV aus Zelllinien und anschließend an EV aus Plasmaproben von Probanden und Patienten zu etablieren. Des Weiteren wurde der Einsatz eines kommerziell erwerbbaaren EV-Isolationskits im Vergleich zur etablierten Methode der Ultrazentrifugation untersucht. Zur Quantifizierung und Größenbestimmung wurde im Rahmen dieser Arbeit das NTA etabliert. Anschließend erfolgte die Subanalyse der isolierten EV bezüglich ihres Integrinprofils. Aufgrund der Aktualität der Thematik EV und insbesondere in Zusammenhang mit spezifischen Integrinprofilen war ein Rückgriff auf bereits etablierte Herangehensweisen nur limitiert möglich.

4.1 Diskussion der Methodik

Ein großes Problem der EV-Analyse liegt in den technischen Grenzen der derzeitigen Messmethoden reproduzierbare Daten zu erheben (Thery et al., 2018; Vasconcelos et al., 2019). Die etablierten Verfahren, wie sie auch in dieser Arbeit verwendet wurden, haben spezifische Vorteile und Limitationen (Abhange et al., 2021; Théry et al., 2018). Deshalb ist es besonders wichtig mehrere Verfahren zu kombinieren, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Werden ermittelte Größe, Morphologie und Expression der typischen Marker von EV zusammenfassend interpretiert, kann von einer erfolgreichen Anreicherung der EV aus Zelllinien mittels Ultrazentrifugation als auch aus Plasmaproben mittels Säulen-basierter Methode ausgegangen werden.

Mittels EM gelingt eine direkte bildliche Darstellung der Morphologie der EV, jedoch können die Fixierungsmethoden zu Artefakten führen und die wahre Größe der EV beeinflussen. Es wird davon ausgegangen, dass die typische tassenförmige Struktur der EV ein solches Schrumpfungartefakt durch Dehydratation darstellt (Chuo et al., 2018). Neben der aufwändigen Probenaufbereitung kann mittels EM keine Aussage über die Partikelkonzentrationen getroffen werden. Eine direkte Messung der EV in der konventionellen Durchflusszytometrie ist aufgrund der geringen Größe nicht möglich (Thery et al., 2018). Werden EV an Beads gekoppelt, werden nur solche EV indirekt detektiert, die an den primären monoklonalen Antikörper des jeweiligen Beads binden können. Einen Rückschluss auf die absolute Partikelanzahl und –größe ist nach der Bindung an Beads mittels konventioneller Durchflusszytometrie nicht möglich. Der große Vorteil der Analyse der EV mittels NTA ist die direkte Messung einzelner Teilchen und die Berechnung ihrer Größe und Gesamtkonzentration. Da die Vesikel sich während der Analyse in Suspension befinden, kommt es anders wie bei der EM, nicht zur Beeinflussung der realen Größe durch Schrumpfungartefakte. Der Nachteil der konventionellen NTA-Messung liegt darin, dass sie keine Informationen über die phänotypischen Eigenschaften der Vesikel liefert. Dieses Problem könnte in weiteren Analysen am ZetaView-Twin unter Verwendung von Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper umgangen werden. (Dragovic et al., 2011; Thery et al., 2018)

4.1.1 Ist die Anreicherung der EV mit dem exoEasy Kit ein geeignetes Verfahren?

Ein möglicher Nachteil in der Verwendung eines Kit-basierten Verfahrens im Gegensatz zur Ultrazentrifugation besteht in der Kontamination des EV-Eluats mit freien

Proteinen (Tang et al., 2017). Jedoch ist trotz der höheren Proteinreinheit aufgrund der hohen Einsatzmenge und des geringen Extraktionskoeffizienten der EV die Methode der Ultrazentrifugation bei klinischen Proben häufig nicht anwendbar. Zudem steht der hohe zeitliche, personelle und instrumentelle Aufwand der Ultrazentrifugation einer Etablierung als in der klinischen Diagnostik einzusetzendes Verfahren im Wege. Um Ergebnisse untereinander vergleichen zu können, ist es essentiell innerhalb einer Forschungsgruppe dieselbe Isolationsmethode zu verwenden. Bei der Vergleichbarkeit mit Ergebnissen anderer Forschungsgruppen muss stets genau hinterfragt werden, welche Methodik zur Partikelanreicherung angewandt wurde und ob die Ergebnisse überhaupt als Vergleich dienen können.

Anhand der dieser Arbeit zugrundeliegenden NTA-Ergebnisse, EM-Bilder und Nachweis von EV-Markern mittels Durchflusszytometrie ist von einer erfolgreichen Isolation von EV mittels exoEasy Kit auszugehen. Unterschiede in Partikelgröße und -konzentration zwischen Zellkulturpartikeln isoliert mittels Ultrazentrifugation und EV aus Blutplasma isoliert mittels Säulen-basierten Kit sind durch die unterschiedliche Isolationsmethodik und den unterschiedlichen Probenursprung zu erklären und liegen im Bereich des Erwarteten.

4.1.2 Limitationen der Durchflusszytometrie

Als Nachweismethode hat die Durchflusszytometrie trotz ihrer Komplexität Defizite in der Reproduzierbarkeit valider Ergebnisse sowie der Sensitivität und Spezifität. Zudem sind alle mittels Durchflusszytometrie gewonnenen Daten als relative Angaben zu verstehen und nur im Verhältnis zu Kontrollpopulationen zu interpretieren. Ein Vergleich gewonnener Daten zwischen verschiedenen Forschungsgruppen ist durch die uneinheitlichen Vorgehensweisen schwer möglich. Hinzu kommen der Einfluss der verwendeten Geräte, Beads und die Auswahl des Antikörperpanels, die sich auf die gewonnenen Ergebnisse auswirken können. Die Färbung einer Probe mit mehreren Antikörpern gleichzeitig und anschließender Analyse in der Durchflusszytometrie bieten neben Materialeinsparung einen deutlichen zeitlichen Vorteil. Bei der Auswahl der Fluorochrome ist bei Mehrfachfärbungen darauf zu achten, dass stark exprimierte Oberflächenmarker mit solchen Fluorochromen gekoppelt werden, die nicht oder kaum in andere Emissionsspektren überlappen. Schwach exprimierte Oberflächenmoleküle sollten mit „hellen“ Fluorochrome kombiniert werden, in deren Detektionskanäle möglichst wenig

einstrahlt, beim Kompensieren würden andernfalls richtig positive Signale rausgerechnet werden. Der Einsatz von Filtern während der Messung und die Auswahl der Fluorochrome können dabei helfen die überlappenden Emissionsbereiche möglichst klein zu halten. Dennoch lassen sich spektrale Überlappungen nicht vermeiden, umso mehr Fluorochrome parallel verwendet werden. Diese werden zur korrekten Darstellung bei Mehrfachfärbungen einer Probe zunächst verrechnet (kompensiert). Um zu verhindern, dass Fehler in der Kompensation durch zu schwache Signale auftreten, wird diese mit Kompensationsbeads durchgeführt. Die Limitation einer optimalen Fluorochromauswahl besteht darin, dass nicht jeder Antikörper mit jedem beliebigen Fluorochrom gekoppelt kommerziell verfügbar ist. Zudem ist bei der Etablierung neuer Antikörper vorher unbekannt, ob das entsprechende Oberflächenmolekül auf dem zu untersuchenden Target schwach oder stark exprimiert ist. Deshalb muss stets beachtet werden, dass umso mehr Antikörper simultan verwendet werden, umso mehr kompensiert werden muss und umso eher werden kaum exprimierte Oberflächensignaturen rausgerechnet. In Abb.15 ist deutlich zu erkennen, dass eine Mehrfachfärbung wenig Einfluss auf das Intensitätssignal der EV-Marker hat. Es ist davon auszugehen, dass diese auf allen EV hoch exprimiert sind. Im Gegensatz dazu sind die schon in der Einzelfärbung nur auf wenigen EV darstellbaren Integrine, in der Mehrfachfärbung deutlich schlechter von der Negativkontrolle abgrenzbar (Abb. 15). Um zu verhindern, dass es zu falsch negativen Ergebnissen kommt, wurde in dieser Arbeit auf eine Sechsfachfärbung verzichtet. Stattdessen erfolgte eine Mehrfachfärbung für die drei EV-Marker und die drei Integrine in getrennten Ansätzen. Eine weitere Option niedrig exprimierte Oberflächenmarker besser nachweisen zu können, wäre die Idee des Poolings.

Die EV aus Zelllinie sind vergleichsweise homogen. Nahezu 100 % der analysierten EV aus allen sechs Zelllinien sind positiv für alle drei EV-Marker (CD9, CD63 und CD81). Auch hier finden sich allerdings unterschiedlich starke Intensitätssignale zwischen den verschiedenen Zelllinien für die jeweiligen EV-Marker. So zeigt sich für CD9 ein stärkeres Intensitätssignal auf EV von BPH1- und LNCaP-Zellen als auf EV von DU145-, PC3-, HCT116- und PANC1-Zellen.

Eine Aussage, ob die absolute Zahl CD9 positiver Oberflächenmoleküle oder die Bindungseigenschaften des Antikörpers verändert sind, lässt sich hier nicht darstellen da es sich um relative Angaben handelt.

4.2 Partikelkonzentration und Partikelgröße

4.2.1 Abfall Partikelkonzentration bei gleichbleibender Partikelgröße nach Verwendung eines zusätzlichen Filterschrittes

Beobachtet werden konnte ein geringer Abfall der Partikelkonzentration bei Verwendung eines 220 nm Filters aber keine Änderung in der Partikelgröße.

Ein Grund hierfür könnte im Totvolumen des Filters zurückgebliebenes Material sein. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit Daten anderer Forschungsgruppen wurde dennoch vor allen EV-Isolationen mittels exoEasy Kit ein Filterschritt etabliert.

4.2.2 Partikelkonzentration gesunder Probanden und Patienten mit PCa

Einige Studien (Caivano et al., 2015; Duijvesz et al., 2015; König et al., 2017; Logozzi et al., 2009; Silva et al., 2012) zeigten eine erhöhte Konzentration der EV bei Patienten mit malignen Erkrankungen. Andere zeigten keine Unterschiede in der Konzentration der EV von Patienten mit maligner Erkrankung (Piquet et al., 2022; Théry et al., 2018). In den hier durchgeführten Analysen konnte eine erhöhte Partikelkonzentration bei gesunden Probanden im Vergleich zu erkrankten Patienten festgestellt werden. Als Ursache der differierenden Ergebnisse kommen die unterschiedlichen methodischen Vorgehensweisen in Frage. So schließen einige Autoren von der Menge an CD9, CD63 oder Caveolin-1 positiven EV auf die Gesamtkonzentration der EV. Die hier dargestellten Ergebnisse sowie zahlreiche weitere Studien (Mizutani et al., 2014) legen allerdings nahe, dass nicht alle EV die gleichen Oberflächensignaturen, inklusive EV-Marker, tragen. Den nur bedingten Nachweis von CD63 auf EV isoliert aus Blutplasma und Zelllinien bestätigten bereits mehrere Arbeitsgruppen (Jorgensen et al., 2013; Yoshioka et al., 2013). Im Vergleich zu gesunden Probanden hatten Patienten mit einem PCa zwar erhöhte CD9-Konzentrationen aber keine erhöhten CD81-Konzentrationen (Krishn et al., 2019). Ob und inwieweit die Ergebnisse anderer maligner Erkrankung auf das PCa übertragbar sind, bedarf weiterer Versuche. Anders als bei anderen malignen Erkrankungen könnte der fehlende Partikelanstieg auch darin begründet liegen, dass insbesondere das lokalisierte PCa kaum Anschluss an die Blutbahn hat.

Nach den etablierten Theorien (Hoshino et al., 2015) zirkulieren EV im Rahmen der Metastasierung in Körperflüssigkeiten und ebnen über die Ausbildung einer prämetastatischen Nische die Möglichkeit zur Absiedlung von Tumormetastasen in fernen Geweben. Eine mögliche Erklärung für die hohen Partikelkonzentrationen gesunder Probanden ist, dass diese zwar eine erhöhte Gesamtzahl EV aufweisen, diese aber nicht tumorspezifisch sind. Einen ersten Hinweis, dass die Gesamtzahl EV bei Probanden und Patienten von unterschiedlichen Subgruppen der EV gebildet wird, liefern die unterschiedlichen Partikelgrößen. Die durchflusszytometrischen Analysen der Oberflächensignaturen haben weitere Informationen diesbezüglich geliefert. Als weitere mögliche Ursache für die hohen Partikelkonzentrationen gesunder Probanden kommen die unterschiedlichen Kohortencharakteristika der Probanden und Patienten in Frage. Das mittlere Alter der Probanden lag im Durchschnitt ca. 40 Jahre unter dem mittleren Alter aller Patientenproben (Alter in Jahren MW \pm SD, Probanden: 31,8 \pm 8,1, Patienten 70,2 \pm 9,8). Im Widerspruch dazu stehen allerdings die Erkenntnisse das zirkulierende EV vermehrt von alternden Zellen freigesetzt werden (Robbins, 2017). Um auszuschließen, dass die unterschiedlichen Altersstrukturen Einfluss auf die Partikelkonzentration haben, sollten die Versuche mit altersgleiche Kontrollen wiederholt werden.

4.2.3 Partikelkonzentrationen und –größe im Hinblick auf das Auftreten einer VM

Patienten mit einem lokalisierten PCa hatten niedrigere Partikelkonzentrationen als Patienten mit mCRPC. Die erhöhte Partikelkonzentration bei Patienten mit mCRPC legt nahe, dass die Partikelkonzentration bis zu einem gewissen Grad mit der Tumormasse und Tumorprogression assoziiert ist. Da sich die Partikelgesamtanzahl von Patienten mit mCRPC mit und ohne VM jedoch nicht unterschieden, könnte durch die fehlende Sezernierung von EV aus nekrotischen oder schlecht vaskularisierten Bereichen großer Tumormassen erklärt werden (Logozzi et al., 2009).

Einen Zusammenhang zwischen Höhe des etablierten Tumormarkers (PSA) und der Partikelkonzentration konnten Silva et al. bereits für das kolorektale Karzinom und den Tumormarker CEA zeigen. Die Schlussfolgerungen von Silva et al. und Logozzi et al., die für das kolorektale Karzinom und das maligne Melanom eine Korrelation von Höhe der Tumormarker, Differenzierungsgrad, Überlebenszeit, Tumormasse und totaler

Exosomenkonzentration zeigen konnten und die totale Exosomenkonzentration als Surrogatparameter zur Überwachung des Tumorwachstums postulierten, konnten im Rahmen dieser Studie nicht bestätigt werden. Ob die Zählung der Gesamtpartikelkonzentration als Parameter bezüglich Tumorprogression und Tumorlast beim PCa genutzt werden kann, müsste gegebenenfalls an einer größeren Studienpopulation evaluiert werden. Ob und inwieweit die Zählung von spezifischen Tumor-EV eine Aussage diesbezüglich zulässt, wurde in dieser Arbeit nicht dargestellt.

Neben der Partikelkonzentration scheint die Partikelgröße eine Rolle bei der Tumorprogression zu spielen. Studien, die sich mit dem Einfluss der Partikelgröße auf das metastatische Verhalten von EV beschäftigten, gibt es aktuell nicht. So ist besonders interessant, dass Patienten mit einem mCRPC und VM signifikant größere EV sezernierten als Patienten mit einem mCRPC ohne VM. Eine mögliche Erklärung ist, dass Tumorzellen von Patienten mit VM vermehrt einen größeren Subtyp an EV sezernieren oder, dass die EV dieser Patienten einen anderen Informationsgehalt aufweisen. Dass Partikel von Tumorpatienten sich in ihren Oberflächenstrukturen und ihrem Vesikelinhalt unterscheiden, ist bekannt. Welchen Einfluss dies auf die Partikelgröße hat, wie zuverlässig die Partikelgröße zwischen Patienten mit VM und ohne VM differenzieren kann und ob die Partikelgröße als prädiktiver Marker zum Anzeigen einer VM genutzt werden kann, muss in größer angelegten klinischen Studien überprüft werden. Es ist zusehen, dass eine ansteigende Vesikelgröße möglicherweise bei bekanntem fortgeschrittenem PCa Hinweise auf eine VM liefern kann, aber anhand der Vesikelgröße ohne den klinischen Kontext keine Aussage über den Erkrankungsstatus eines Patienten getroffen werden kann.

In der Gruppe der Patienten mit VM zeigten Patienten mit Lebermetastasen eine Tendenz zu einer höheren Vesikelkonzentrationen und größeren Vesikeln im Vergleich zu Patienten mit Lungenmetastasen. Falls in größeren Kohorten ein signifikanter Unterschied dargestellt werden kann, könnten die Analysen von Partikelzahl und insbesondere von Partikelgröße bei bekanntem mCRPC als Hinweisparameter auf das Aufdecken einer hepatischen Metastasierung dienen.

Patienten mit hepatischer Metastasierung oder primären Lebertumoren, die eine transarterielle Chemoembolisation erhielten und größere EV aufwiesen, hatte eine

singnifikant schlechtere Prognose als solche mit kleineren EV. Die Partikelkonzentration stellte jedoch keinen prognostischen Faktor dar (Schöler et al., 2021).

4.2.4 Partikelkonzentrationen und -größe unter Chemotherapie

Unter Behandlung mit Chemotherapeutika konnte eine erhöhte Freisetzung der EV aus Lungenkarzinomzelllinien sowie im Plasma von Brustkrebspatientinnen beobachtet werden (König et al., 2017; Xiao et al., 2014). Eine mögliche Erklärung warum Zellen unter Stressbedingungen verstärkt EV freisetzen, ist die Ausschleusung unnötiger oder toxischer Substanzen aus den Zellen und/oder die Informationsweitergabe des aktuellen Zellzustandes an umliegende und weiter entfernte Körperkompartimente (Urbanelli et al., 2016). Jedoch zeigten sich unter Therapie mit Enzalutamid im Blut von Patienten mit PCa keine Veränderungen in den Partikelkonzentrationen (Krishn et al., 2019). Auch unter Chemotherapie mit Docetaxel konnte in dieser Studie bei Patienten mit mCRPC kein Anstieg oder Abfall der Gesamtpartikelkonzentration sowie eine Veränderung der Partikelgröße festgestellt werden.

4.3 Integrine

Ziel der Arbeit war die Untersuchung von molekularen Integrinprofilen auf EV im mCRPC. Zunächst musste ein geeignetes Integrinprofil gewählt werden. Anhand der durchgeführten Literaturrecherchen, *in silico*-Analysen und Vorarbeiten der Forschungsgruppe wurden die Integrine CD51, CD 29 und CD104 gewählt. Der erste Schritt bestand darin eine geeignete Positivkontrolle zu finden. Anhand der durchgeführten Literaturrecherchen wurde davon ausgegangen, dass EV von PC3-Zellen CD51, CD29 und CD104 exprimieren (Bijnsdorp et al., 2013; Fedele et al., 2015; Kawakami et al., 2015; Singh et al., 2016). Mittels der Durchflusszytometrie konnte jedoch lediglich die Expression von CD51 und teilweise die Expression von CD104 auf EV von PC3-Zellen bestätigt werden. Hier sind als mögliche Ursachen die technischen Limitationen des Detektionsverfahren, die Auswahl des Antikörpers/Beads, aber auch Definitionsansätze ab wann ein Nachweis eines Oberflächenmolekuls als positiver Nachweis gilt, zu nennen. Um das Ziel einer Positivkontrolle zu realisieren, wurden weitere Literaturrecherchen durchgeführt. Als geeigneter Kandidat schien die Zelllinie HCT116. Hoshino et al. zeigten in massenspektrometrische Analysen die Expression

von CD51, CD29 und CD104 auf EV von HCT116-Zellen. Mittels der durchflusszytometrischen Analysen dieser Arbeit konnte eindeutig nur die Expression von CD29 sowie teilweise die Expression von CD104 nachgewiesen werden. In geringem Maße gelang die Detektion von CD51. Bereits an EV isoliert aus Zellkulturen zeigte sich, dass mittels eines Verfahrens (Massenspektrometrie) nachgewiesene Expression eines Integrins nicht unbedingt mittels eines anderen Verfahrens (Durchflusszytometrie) reproduziert werden kann. Allerdings sollte es sich bei einer aus Zellkultur isolierten EV Probe um eine homogene Gruppe mit den gleichen Oberflächenstrukturen handeln. Inwieweit die Auswahl der Dynabeads eine Vorselektion und die Auswahl der Fluorochrom-gekoppelten Antikörper einen Einfluss auf die Nachweisbarkeit hat, sollte in weiteren Arbeiten näher untersucht werden.

Die durchgeführten *in silico*-Analysen postulierten, dass CD104 bei Patienten mit hepatischer Metastasierung im Gegensatz zu Patienten mit lymphogener oder ossärer Metastasierung höher exprimiert ist. Gleichzeitig zeigte sich der Anteil von CD104 in Prostatabiopsaten höher als in Biopsaten von Knochen- oder Lymphknotenmetastasen. Im Gegensatz hierzu stehen die Untersuchung von Hoshino et al., die eine Überexpression der von CD29 und CD104 bei der Ausbildung von pulmonalen Metastasen zeigten. In der durchgeführten Arbeit zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Konzentration von CD104 positiver EV aus Plasma von Patienten mit lokalisertem PCa und ossär metastasiertem PCa. Auch die Konzentration CD104 positiver EV bei gesunden Probanden (10 %) und Patienten mit lokalisiert oder ossär metastasiertem PCa (11,4 %) unterschieden sich nicht.

Des Weiteren zeigten die *in silico*-Analysen auf, dass die Expression von CD51, CD29 und CD104 signifikant mit einem kürzeren DFS korrelierte. EV gesunder Probanden wiesen in unseren Untersuchungen höhere Konzentrationen CD29 positiver EV (19.5 %) als EV von Patienten mit lokalisiert oder ossär metastasiertem PCa (kleiner 2 %) auf.

Der Anteil CD51 positiver EV fiel in allen Gruppen gering aus (< 2 %). Fedele et al. zeigte eine erhöhte Expression von Integrin $\alpha\beta 3$ (CD51/CD61) bei der Ausbildung ossärer Metastasierungen beim PCa auf. Auch Melanomzellen aus Lymphknotenmetastasen exprimierten $\alpha\beta 3$ (Hood et al., 2011). Weitere Arbeiten zeigten keinen Nachweis von Integrin $\alpha\beta 6$ in Prostatagewebe gesunder Probanden (Krishn et al., 2022), wohingegen Patienten, die unter einem PCa litten, erhöhte Expression von Integrin

$\alpha\beta6$ aufwiesen (Lu et al., 2016). In ossären Metastasen von Patienten mit metastasiertem PCa zeigten sich ebenfalls erhöhte Expressionen von $\alpha\beta6$ (Dutta et al., 2014). Weitere Arbeitsgruppen zeigten in Mausmodellen eine erhöhte Expression von $\alpha\beta3$ in PCa mit neuroendokriner Differenzierung. Integrin $\alpha\beta6$ ließ sich hingegen nur in Gewebe mit PCa ohne neuroendokrine Differenzierung nachweisen (Quaglia et al., 2021).

Hervorzuheben ist an dieser Stelle, dass es sich bei den Ergebnissen *der in silico*-Daten um mRNA-Expressionsdaten handelt und auch die Ergebnisse der Literaturrecherche mit diversen unterschiedlichen Methodiken akquiriert wurden. In wieweit die Ergebnisse untereinander vergleichbar sind, ist somit zum aktuellen Zeitpunkt nicht sicher zu beurteilen. Auch ist zu berücksichtigen, dass die in dieser Arbeit untersuchten EV im Sinne einer „liquid biopsy“ aus Blutplasma gewonnen wurden und nicht aus Gewebeproben.

Bei der Diskussion der gewonnenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gilt es zu berücksichtigen, dass aufgrund der geringen Detektionsrate von CD51, CD29 und CD104 auf EV von Patienten und Probanden und bei einer zu geringen und heterogenen Kohortengröße keine Aussage bezüglich einer statistischen Signifikanz hinsichtlich der Bedeutung des Nachweises spezifischer Integrinprofile auf EV auf den Ort der Metastastisierung zu erreichen war.

Es gilt zu beachten, dass biologische Proben eine heterogene Gruppe EV diverser Zelltypen und mit unterschiedlichen Molekülsignaturen enthalten. Inwieweit eine gezieltere und selektivere Auswahl oder Anreicherung von tumorspezifischen EV, wie es beispielsweise durch Mizutani et al. durch die Untersuchung nur PSMA-positiver EV erfolgte, einheitliche und klarere Ergebnisse liefert, sollte in weiteren Studien untersucht werden (Mizutani et al., 2014).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Aufgrund der hohen klinischen Relevanz des Prostatakarzinoms sind zentrale Aufgaben im klinischen Alltag das Treffen von Therapieentscheidungen sowohl im lokalisierten als auch im metastasierten Stadium. Um einen geeigneten Biomarker zur individualisierten Tumordiagnostik und Therapieüberwachung zu etablieren, ist zunächst ein besseres Verständnis der Tumorbiologie nötig. Eine entscheidende Rolle bei der Metastasierung spielt die Ausbildung einer prämetastastischen Nische durch extrazelluläre Vesikel. Extrazelluläre Vesikel enthalten Informationsmaterial der Ursprungszelle und können aus nahezu allen Körperflüssigkeiten wenig invasiv gewonnen werden. Ob die prometastatischen Eigenschaften in der veränderten Vesikelbeladung, der erhöhten Sekretion oder anderen Ursachen begründet liegen, ist bisher unzureichend untersucht. Das Integrinprofil extrazellulärer Vesikel ist in anderen Tumorentitäten entscheidend für die Ausbildung der Organotropie im Rahmen der Metastasierung. In Literaturrecherchen und *in silico*-Analysen wurden Integrine, die eine Rolle bei der Organotropie des metastasierten Prostatakarzinoms spielen könnten, herausgesucht. Als geeignete Integrine wurden identifiziert: CD51 (αv), CD29 ($\beta 1$) und CD104 ($\beta 4$). Als etablierte Exosomen-Marker wurden CD9, CD63 und CD81 gewählt. Mittels Ultrazentrifugation sowie mittels eines kommerziell erworbenen Exosomen-Isolationskits erfolgte die Isolation von extrazellulären Vesikel aus 6 verschiedenen Zelllinien sowie aus humanem Plasma. Anschließend erfolgte die Quantifizierung und Größenbestimmung mittels Nanopartikel Tracking Analyse und Elektronenmikroskopie. Zur Detektion von extrazellulären Vesikeln mittels Durchflusszytometrie erfolgte die Kopplung an Beads und Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörper (CD9, CD63, CD81, CD51, CD29 und CD104).

In Verdünnungsreihen konnte gezeigt werden, dass die Detektierbarkeit schwach exprimierter Oberflächenmoleküle von der Einsatzmenge der Vesikel abhängig ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Wahl der Fluorochrom-gekoppelten Antikörper und das Design des Panels, insbesondere bei Mehrfachfärbungen, Einfluss auf die Nachweisbarkeit einzelner Oberflächenmoleküle haben kann. Der Nachweis von CD9 gelang bei nahezu allen extrazellulären Vesikeln aus humanem Plasma. Es fiel auf, dass die extrazellulären Vesikel von Patienten mit einem lokalisierten Prostatakarzinom signifikant häufiger CD81 positiv waren als diese von Patienten mit einem ossär metastasierten Prostatakarzinom. Im Plasma von gesunden Probanden konnten signifikant

höhere Partikelkonzentration im Vergleich zu Patienten mit benigner Prostatahyperplasie und lokalisiertem Prostatakarzinom gemessen werden. Patienten mit viszeraler Metastasierung wiesen größere Partikel als Patienten ohne viszerale Metastasierung auf. Eine Tendenz zu höheren Partikelkonzentrationen bei Patienten mit viszeraler Metastasierung und insbesondere bei hepatischer Metastasierung, zeigte sich ebenfalls. Unter Chemotherapie mit Docetaxel zeigte sich kein Abfall der Partikelkonzentration oder eine Veränderung der Partikelgröße. Korrelationsanalysen zeigten einen positiven Zusammenhang zwischen steigenden PSA-Werten und höheren Partikelkonzentrationen. Bezüglich des Integrinprofils können anhand der erhobenen Daten abschließende Aussagen bezüglich eines differierenden Integrinprofils bei Patienten mit Leber- und/oder Lungenmetastasen nicht getroffen werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Abd Elmageed, Z.Y., Yang, Y., Thomas, R., Ranjan, M., Mondal, D., Moroz, K., Fang, Z., Rezk, B.M., Moparty, K., Sikka, S.C., *et al.* (2014). Neoplastic reprogramming of patient-derived adipose stem cells by prostate cancer cell-associated exosomes. *Stem Cells* 32, 983-997.

Abhange, K., Makler, A., Wen, Y., Ramnauth, N., Mao, W., Asghar, W., and Wan, Y. (2021). Small extracellular vesicles in cancer. *Bioact Mater* 6, 3705-3743.

Abuzallouf, S., Dayes, I., and Lukka, H. (2004). Baseline staging of newly diagnosed prostate cancer: a summary of the literature. *The Journal of urology* 171, 2122-2127.

Amaro, A., Esposito, A.I., Gallina, A., Nees, M., Angelini, G., Albini, A., and Pfeffer, U. (2014). Validation of proposed prostate cancer biomarkers with gene expression data: a long road to travel. *Cancer Metastasis Rev* 33, 657-671.

Armstrong, B., and Doll, R. (1975). Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *International journal of cancer* 15, 617-631.

Balk, S.P., Ko, Y.-J., and Bubley, G.J. (2003). Biology of prostate-specific antigen. *Journal of clinical oncology* 21, 383-391.

Belting, M., and Wittrup, A. (2008). Nanotubes, exosomes, and nucleic acid-binding peptides provide novel mechanisms of intercellular communication in eukaryotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol* 183, 1187-1191.

Bijnsdorp, I.V., Geldof, A.A., Lavaei, M., Piersma, S.R., van Moorselaar, R.J., and Jimenez, C.R. (2013). Exosomal ITGA3 interferes with non-cancerous prostate cell functions and is increased in urine exosomes of metastatic prostate cancer patients. *J Extracell Vesicles* 2.

Bostwick, D.G., Burke, H.B., Djakiew, D., Euling, S., Ho, S.m., Landolph, J., Morrison, H., Sonawane, B., Shifflett, T., and Waters, D.J. (2004). Human prostate cancer risk factors. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society* 101, 2371-2490.

Bott, S., Birtle, A., Taylor, C., and Kirby, R. (2003). Prostate cancer management:(1) an update on localised disease. *Postgraduate medical journal* 79, 575-580.

Brattain, M.G., Fine, W.D., Khaled, F.M., Thompson, J., and Brattain, D.E. (1981). Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res* 41, 1751-1756.

Caivano, A., Laurenzana, I., De Luca, L., La Rocca, F., Simeon, V., Trino, S., D'Auria, F., Traficante, A., Maietti, M., Izzo, T., *et al.* (2015). High serum levels of extracellular vesicles expressing malignancy-related markers are released in patients with various types of hematological neoplastic disorders. *Tumour Biol* 36, 9739-9752.

Campbell, I.D., and Humphries, M.J. (2011). Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.

Cappello, F., Logozzi, M., Campanella, C., Bavisotto, C.C., Marcilla, A., Properzi, F., and Fais, S. (2017). Exosome levels in human body fluids: A tumor marker by themselves? *Eur J Pharm Sci* 96, 93-98.

Chuo, S.T., Chien, J.C., and Lai, C.P. (2018). Imaging extracellular vesicles: current and emerging methods. *J Biomed Sci* 25, 91.

Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L.F., Thery, C., and Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci* 126, 5553-5565.

Connell, B., Kopach, P., Ren, W., Joshi, R., Naber, S., Zhou, M., and Mathew, P. (2020). Aberrant integrin αv and $\alpha 5$ expression in prostate adenocarcinomas and bone-metastases is consistent with a bone-colonizing phenotype. *Transl Androl Urol* 9, 1630-1638.

Cooper, J., and Giancotti, F.G. (2019). Integrin Signaling in Cancer: Mechanotransduction, Stemness, Epithelial Plasticity, and Therapeutic Resistance. *Cancer Cell* 35, 347-367.

Cornford, P., Bellmunt, J., Bolla, M., Briers, E., De Santis, M., Gross, T., Henry, A.M., Joniau, S., Lam, T.B., Mason, M.D., *et al.* (2017). EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Relapsing, Metastatic, and Castration-Resistant Prostate Cancer. *Eur Urol* 71, 630-642.

Cuzick, J., Thorat, M.A., Andriole, G., Brawley, O.W., Brown, P.H., Culig, Z., Eeles, R.A., Ford, L.G., Hamdy, F.C., and Holmberg, L. (2014). Prevention and early detection of prostate cancer. *The lancet oncology* 15, e484-e492.

D'Amico, A.V., Whittington, R., Malkowicz, S.B., Schultz, D., Blank, K., Broderick, G.A., Tomaszewski, J.E., Renshaw, A.A., Kaplan, I., and Beard, C.J. (1998). Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *Jama* 280, 969-974.

Deer, E.L., Gonzalez-Hernandez, J., Coursen, J.D., Shea, J.E., Ngatia, J., Scaife, C.L., Firpo, M.A., and Mulvihill, S.J. (2010). Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas* 39, 425-435.

Dennis, L.K., Lynch, C.F., and Torner, J.C. (2002). Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. *Urology* 60, 78-83.

Dragovic, R.A., Gardiner, C., Brooks, A.S., Tannetta, D.S., Ferguson, D.J., Hole, P., Carr, B., Redman, C.W., Harris, A.L., Dobson, P.J., *et al.* (2011). Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine* 7, 780-788.

Draisma, G., Etzioni, R., Tsodikov, A., Mariotto, A., Wever, E., Gulati, R., Feuer, E., and De Koning, H. (2009). Lead time and overdiagnosis in prostate-specific antigen screening: importance of methods and context. *Journal of the National Cancer Institute* 101, 374-383.

Drivalos, A., Chrisofos, M., Efstathiou, E., Kapranou, A., Kollaitis, G., Koutlis, G., Antoniou, N., Karanastasis, D., Dimopoulos, M.A., and Bamias, A. (2016). Expression of alpha5-integrin, alpha7-integrin, Epsilon-cadherin, and N-cadherin in localized prostate cancer. *Urol Oncol* 34, 165.e111-168.

Duijvesz, D., Burnum-Johnson, K.E., Gritsenko, M.A., Hoogland, A.M., Vredendregt-van den Berg, M.S., Willemsen, R., Luider, T., Pasa-Tolic, L., and Jenster, G. (2013). Proteomic profiling of exosomes leads to the identification of novel biomarkers for prostate cancer. *PLoS One* 8, e82589.

Duijvesz, D., Versluis, C.Y., van der Fels, C.A., Vredendregt-van den Berg, M.S., Leivo, J., Peltola, M.T., Bangma, C.H., Pettersson, K.S., and Jenster, G. (2015). Immuno-based detection of extracellular vesicles in urine as diagnostic marker for prostate cancer. *Int J Cancer* 137, 2869-2878.

Dutta, A., Li, J., Lu, H., Akech, J., Pratap, J., Wang, T., Zerlanko, B.J., FitzGerald, T.J., Jiang, Z., Birbe, R., *et al.* (2014). Integrin $\alpha\beta6$ promotes an osteolytic program in cancer cells by upregulating MMP2. *Cancer Res* 74, 1598-1608.

Epstein, J.I., Allsbrook Jr, W.C., Amin, M.B., Egevad, L.L., and Committee, I.G. (2005). The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma. *The American journal of surgical pathology* 29, 1228-1242.

Fais, S., O'Driscoll, L., Borrás, F.E., Buzas, E., Camussi, G., Cappello, F., Carvalho, J., Cordeiro da Silva, A., Del Portillo, H., El Andaloussi, S., *et al.* (2016). Evidence-Based Clinical Use of Nanoscale Extracellular Vesicles in Nanomedicine. *ACS Nano* 10, 3886-3899.

Fang, R.H., Hu, C.M., Luk, B.T., Gao, W., Copp, J.A., Tai, Y., O'Connor, D.E., and Zhang, L. (2014). Cancer cell membrane-coated nanoparticles for anticancer vaccination and drug delivery. *Nano Lett* 14, 2181-2188.

Fang, T., Lv, H., Lv, G., Li, T., Wang, C., Han, Q., Yu, L., Su, B., Guo, L., Huang, S., *et al.* (2018). Tumor-derived exosomal miR-1247-3p induces cancer-associated fibroblast activation to foster lung metastasis of liver cancer. *Nat Commun* 9, 191.

Fedele, C., Singh, A., Zerlanko, B.J., Iozzo, R.V., and Languino, L.R. (2015). The $\alpha\beta6$ integrin is transferred intercellularly via exosomes. *J Biol Chem* 290, 4545-4551.

Fizazi, K., Tran, N., Fein, L., Matsubara, N., Rodriguez-Antolin, A., Alekseev, B.Y., Özgüroğlu, M., Ye, D., Feyerabend, S., and Protheroe, A. (2017). Abiraterone plus prednisone in metastatic, castration-sensitive prostate cancer. *New England Journal of Medicine* 377, 352-360.

Freedland, S.J. (2011). Screening, risk assessment, and the approach to therapy in patients with prostate cancer. *Cancer* 117, 1123-1135.

Gasca, J., Flores, M.L., Jiménez-Guerrero, R., Sáez, M.E., Barragán, I., Ruíz-Borrego, M., Tortolero, M., Romero, F., Sáez, C., and Japón, M.A. (2020). EDIL3 promotes epithelial-mesenchymal transition and paclitaxel resistance through its interaction with integrin $\alpha(V)\beta(3)$ in cancer cells. *Cell Death Discov* 6, 86.

Giancotti, F.G., and Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science* 285, 1028-1033.
Giovannucci, E., Rimm, E.B., Liu, Y., Stampfer, M.J., and Willett, W.C. (2002). A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute* 94, 391-398.

Goel, H.L., Li, J., Kogan, S., and Languino, L.R. (2008). Integrins in prostate cancer progression. *Endocr Relat Cancer* 15, 657-664.

Gravis, G., Fizazi, K., Joly, F., Oudard, S., Priou, F., Esterni, B., Latorzeff, I., Delva, R., Krakowski, I., Laguerre, B., *et al.* (2013). Androgen-deprivation therapy alone or with docetaxel in non-castrate metastatic prostate cancer (GETUG-AFU 15): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 14, 149-158.

Grönberg, H. (2003). Prostate cancer epidemiology. *The Lancet* 361, 859-864.

Halabi, S., Kelly, W.K., Ma, H., Zhou, H., Solomon, N.C., Fizazi, K., Tangen, C.M., Rosenthal, M., Petrylak, D.P., and Hussain, M. (2016). Meta-analysis evaluating the impact of site of metastasis on overall survival in men with castration-resistant prostate cancer. *Journal of clinical oncology* 34, 1652.

Hamidi, H., and Ivaska, J. (2018). Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 18, 533-548.

Hayward, S.W., Dahiya, R., Cunha, G.R., Bartek, J., Deshpande, N., and Narayan, P. (1995). Establishment and characterization of an immortalized but non-transformed human prostate epithelial cell line: BPH-1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31, 14-24.

Hoffman, R.M. (2011). Clinical practice. Screening for prostate cancer. *N Engl J Med* 365, 2013-2019.

Hood, J.L., San, R.S., and Wickline, S.A. (2011). Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res* 71, 3792-3801.

Horoszewicz, J.S., Leong, S.S., Kawinski, E., Karr, J.P., Rosenthal, H., Chu, T.M., Mirand, E.A., and Murphy, G.P. (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 43, 1809-1818.

Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.-L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Mark, M.T., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., and Ceder, S. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527, 329.

Huang, X., Yuan, T., Liang, M., Du, M., Xia, S., Dittmar, R., Wang, D., See, W., Costello, B.A., Quevedo, F., *et al.* (2015). Exosomal miR-1290 and miR-375 as prognostic markers in castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol* 67, 33-41.

Ilic, D., Neuberger, M.M., Djulbegovic, M., and Dahm, P. (2013). Screening for prostate cancer. *Cochrane database of systematic reviews*.

IQWiG (2019). Prostatakrebscreening mittels PSA-Test. In IQWiG-Berichte.

Jorgensen, M., Baek, R., Pedersen, S., Sondergaard, E.K., Kristensen, S.R., and Varming, K. (2013). Extracellular Vesicle (EV) Array: microarray capturing of exosomes and other extracellular vesicles for multiplexed phenotyping. *J Extracell Vesicles* 2.

Kaighn, M.E., Narayan, K.S., Ohnuki, Y., Lechner, J.F., and Jones, L.W. (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17, 16-23.

Kawakami, K., Fujita, Y., Kato, T., Mizutani, K., Kameyama, K., Tsumoto, H., Miura, Y., Deguchi, T., and Ito, M. (2015). Integrin beta4 and vinculin contained in exosomes are potential markers for progression of prostate cancer associated with taxane-resistance. *Int J Oncol* 47, 384-390.

König, L., Kasimir-Bauer, S., Bittner, A.-K., Hoffmann, O., Wagner, B., Santos Manvailer, L.F., Kimmig, R., Horn, P.A., and Rebmann, V. (2017). Elevated levels of extracellular vesicles are associated with therapy failure and disease progression in breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. *Oncoimmunology* 7, e1376153-e1376153.

Kowal, J., Tkach, M., and Thery, C. (2014). Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol* 29, 116-125.

Krebs in Deutschland für 2013/2014., 11. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2017, ISBN: 978-3-89606-288-8, DOI: 10.17886/rkipubl-2017-007.

Krishn, S.R., Garcia, V., Naranjo, N.M., Quaglia, F., Shields, C.D., Harris, M.A., Kossenkov, A.V., Liu, Q., Corey, E., Altieri, D.C., *et al.* (2022). Small extracellular vesicle-mediated ITGB6 siRNA delivery downregulates the α V β 6 integrin and inhibits adhesion and migration of recipient prostate cancer cells. *Cancer Biol Ther* 23, 173-185.

Krishn, S.R., Salem, I., Quaglia, F., Naranjo, N.M., Agarwal, E., Liu, Q., Sarker, S., Kopenhaver, J., McCue, P.A., Weinreb, P.H., *et al.* (2020). The α V β 6 integrin in cancer cell-derived small extracellular vesicles enhances angiogenesis. *J Extracell Vesicles* 9, 1763594.

Krishn, S.R., Singh, A., Bowler, N., Duffy, A.N., Friedman, A., Fedele, C., Kurtoglu, S., Tripathi, S.K., Wang, K., Hawkins, A., *et al.* (2019). Prostate cancer sheds the alphavbeta3 integrin in vivo through exosomes. *Matrix Biol* 77, 41-57.

Lener, T., Gimona, M., Aigner, L., Borger, V., Buzas, E., Camussi, G., Chaput, N., Chatterjee, D., Court, F.A., Del Portillo, H.A., *et al.* (2015). Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles* 4, 30087.

Lieber, M., Mazzetta, J., Nelson-Rees, W., Kaplan, M., and Todaro, G. (1975). Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer* 15, 741-747.

Loeb, S., Bjurlin, M.A., Nicholson, J., Tammela, T.L., Penson, D.F., Carter, H.B., Carroll, P., and Etzioni, R. (2014). Overdiagnosis and overtreatment of prostate cancer. *European urology* 65, 1046-1055.

Logozzi, M., De Milito, A., Lugini, L., Borghi, M., Calabro, L., Spada, M., Perdicchio, M., Marino, M.L., Federici, C., Iessi, E., *et al.* (2009). High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One* 4, e5219.

Lu, H., Bowler, N., Harshyne, L.A., Craig Hooper, D., Krishn, S.R., Kurtoglu, S., Fedele, C., Liu, Q., Tang, H.Y., Kossenkov, A.V., *et al.* (2018). Exosomal alphavbeta6 integrin is required for monocyte M2 polarization in prostate cancer. *Matrix Biol* 70, 20-35.

Lu, H., Wang, T., Li, J., Fedele, C., Liu, Q., Zhang, J., Jiang, Z., Jain, D., Iozzo, R.V., Violette, S.M., *et al.* (2016). $\alpha\beta 6$ Integrin Promotes Castrate-Resistant Prostate Cancer through JNK1-Mediated Activation of Androgen Receptor. *Cancer Res* 76, 5163-5174.

Lugini, L., Valtieri, M., Federici, C., Cecchetti, S., Meschini, S., Condello, M., Signore, M., and Fais, S. (2016). Exosomes from human colorectal cancer induce a tumor-like behavior in colonic mesenchymal stromal cells. *Oncotarget* 7, 50086-50098.

Maughan, B.L., and Antonarakis, E.S. (2015). Androgen pathway resistance in prostate cancer and therapeutic implications. *Expert Opin Pharmacother* 16, 1521-1537.

Melo, S.A., Luecke, L.B., Kahlert, C., Fernandez, A.F., Gammon, S.T., Kaye, J., LeBleu, V.S., Mittendorf, E.A., Weitz, J., Rahbari, N., *et al.* (2015). Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* 523, 177-182.

Mizutani, K., Terazawa, R., Kameyama, K., Kato, T., Horie, K., Tsuchiya, T., Seike, K., Ehara, H., Fujita, Y., Kawakami, K., *et al.* (2014). Isolation of prostate cancer-related exosomes. *Anticancer Res* 34, 3419-3423.

Nawaz, M., Camussi, G., Valadi, H., Nazarenko, I., Ekstrom, K., Wang, X., Principe, S., Shah, N., Ashraf, N.M., Fatima, F., *et al.* (2014). The emerging role of extracellular vesicles as biomarkers for urogenital cancers. *Nat Rev Urol* 11, 688-701.

Nilsson, J., Skog, J., Nordstrand, A., Baranov, V., Mincheva-Nilsson, L., Breakefield, X.O., and Widmark, A. (2009). Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer. *Br J Cancer* 100, 1603-1607.

Ozasa, K., Nakao, M., Watanabe, Y., Hayashi, K., Miki, T., Mikami, K., Mori, M., Sakauchi, F., Washio, M., and Ito, Y. (2004). Serum phytoestrogens and prostate cancer risk in a nested case - control study among Japanese men. *Cancer science* 95, 65-71.

Piquet, L., Coutant, K., Mitchell, A., Ben Anes, A., Bollmann, E., Schoonjans, N., Bérubé, J., Bordeleau, F., Brisson, A., and Landreville, S. (2022). Extracellular Vesicles from Ocular Melanoma Have Pro-Fibrotic and Pro-Angiogenic Properties on the Tumor Microenvironment. *Cells* 11.

Pulukuri, S.M., Gondi, C.S., Lakka, S.S., Jutla, A., Estes, N., Gujrati, M., and Rao, J.S. (2005). RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo. *J Biol Chem* 280, 36529-36540.

Quaglia, F., Krishn, S.R., Daaboul, G.G., Sarker, S., Pippa, R., Domingo-Domenech, J., Kumar, G., Fortina, P., McCue, P., Kelly, W.K., *et al.* (2020). Small extracellular vesicles modulated by $\alpha V\beta 3$ integrin induce neuroendocrine differentiation in recipient cancer cells. *J Extracell Vesicles* 9, 1761072.

Quaglia, F., Krishn, S.R., Wang, Y., Goodrich, D.W., McCue, P., Kossenkov, A.V., Mandigo, A.C., Knudsen, K.E., Weinreb, P.H., Corey, E., *et al.* (2021). Differential expression of $\alpha V\beta 3$ and $\alpha V\beta 6$ integrins in prostate cancer progression. *PLoS One* 16, e0244985.

Robbins, P.D. (2017). Extracellular vesicles and aging. *Stem Cell Investig* 4, 98.

Robinson, D., Van Allen, E.M., Wu, Y.M., Schultz, N., Lonigro, R.J., Mosquera, J.M., Montgomery, B., Taplin, M.E., Pritchard, C.C., Attard, G., *et al.* (2015). Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell* 161, 1215-1228.

S3 Leitlinie, Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Langversion 5.1, 2019, AWMF Registernummer: 043/022OL

Salemi, Z., Azizi, R., Fallahian, F., and Aghaei, M. (2021). Integrin $\alpha 2\beta 1$ inhibition attenuates prostate cancer cell proliferation by cell cycle arrest, promoting apoptosis and reducing epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Physiol* 236, 4954-4965.

Schöler, D., Castoldi, M., Jördens, M.S., Schulze-Hagen, M., Kuhl, C., Keitel, V., Luedde, T., Roderburg, C., and Loosen, S.H. (2021). Enlarged extracellular vesicles are a negative prognostic factor in patients undergoing TACE for primary or secondary liver cancer-a case series. *PLoS One* 16, e0255983.

Schröder, F.H., Hugosson, J., Roobol, M.J., Tammela, T.L., Zappa, M., Nelen, V., Kwiatkowski, M., Lujan, M., Määttänen, L., and Lilja, H. (2014). Screening and prostate

cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up. *The Lancet* 384, 2027-2035.

Silva, J., Garcia, V., Rodriguez, M., Compte, M., Cisneros, E., Veguillas, P., Garcia, J.M., Dominguez, G., Campos-Martin, Y., Cuevas, J., *et al.* (2012). Analysis of exosome release and its prognostic value in human colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 51, 409-418.

Singh, A., Fedele, C., Lu, H., Nevalainen, M.T., Keen, J.H., and Languino, L.R. (2016). Exosome-mediated Transfer of α v β 3 Integrin from Tumorigenic to Nontumorigenic Cells Promotes a Migratory Phenotype. *Mol Cancer Res* 14, 1136-1146.

Stone, K.R., Mickey, D.D., Wunderli, H., Mickey, G.H., and Paulson, D.F. (1978). Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer* 21, 274-281.

Sun, C.-C., Qu, X.-J., and Gao, Z.-H. (2014). Integrins: players in cancer progression and targets in cancer therapy. *Anti-cancer drugs* 25, 1107-1121.

Tang, Y.T., Huang, Y.Y., Zheng, L., Qin, S.H., Xu, X.P., An, T.X., Xu, Y., Wu, Y.S., Hu, X.M., Ping, B.H., *et al.* (2017). Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum. *Int J Mol Med* 40, 834-844.

Taylor, B.S., Schultz, N., Hieronymus, H., Gopalan, A., Xiao, Y., Carver, B.S., Arora, V.K., Kaushik, P., Cerami, E., Reva, B., *et al.* (2010). Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 18, 11-22.

Tennant, J.R. (1964). EVALUATION OF THE TRYPAN BLUE TECHNIQUE FOR DETERMINATION OF CELL VIABILITY. *Transplantation* 2, 685-694.

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.* (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 7, 1535750.

Thery, 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.* (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 7, 1535750.

Urbanelli, L., Buratta, S., Sagini, K., Tancini, B., and Emiliani, C. (2016). Extracellular Vesicles as New Players in Cellular Senescence. *Int J Mol Sci* 17.

Valdembri, D., and Serini, G. (2021). The roles of integrins in cancer. *Fac Rev* 10, 45.

Vasconcelos, M.H., Caires, H.R., Ābols, A., Xavier, C.P.R., and Linē, A. (2019). Extracellular vesicles as a novel source of biomarkers in liquid biopsies for monitoring cancer progression and drug resistance. *Drug Resist Updat* 47, 100647.

Vlassov, A.V., Magdaleno, S., Setterquist, R., and Conrad, R. (2012). Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta* 1820, 940-948.

von Hardenberg, J., Schwartz, M., Werner, T., Fuxius, S., Müller, M., Frangenheim, T., Bolenz, C., Weiss, C., & Heinrich, E. (2017). Prospective Evaluation of Neuromediator Dynamics in Castration-Resistant Prostate Cancer Patients During Docetaxel. *Anti-cancer research*, 37(9), 5117–5124.

von Hardenberg, J., Worst, T. S., Westhoff, N., Erben, P., Fuxius, S., Müller, M., Bolenz, C., Weiss, C., & Heinrich, E. (2018). Cell-Free DNA and Neuromediators in Detecting Aggressive Variant Prostate Cancer. *Oncology research and treatment*, 41(10), 627–633.

Worst, T.S., Previti, C., Nitschke, K., Diessl, N., Gross, J.C., Hoffmann, L., Frey, L., Thomas, V., Kahlert, C., Bieback, K., *et al.* (2019). miR-10a-5p and miR-29b-3p as Extracellular Vesicle-Associated Prostate Cancer Detection Markers. *Cancers (Basel)* 12.

Worst, T.S., von Hardenberg, J., Gross, J.C., Erben, P., Schnolzer, M., Hausser, I., Bugert, P., Michel, M.S., and Boutros, M. (2017). Database-augmented Mass Spectrometry Analysis of Exosomes Identifies Claudin 3 as a Putative Prostate Cancer Biomarker. *Mol Cell Proteomics* 16, 998-1008.

Xiao, X., Yu, S., Li, S., Wu, J., Ma, R., Cao, H., Zhu, Y., and Feng, J. (2014). Exosomes: decreased sensitivity of lung cancer A549 cells to cisplatin. *PLoS One* 9, e89534.

Yoshioka, Y., Konishi, Y., Kosaka, N., Katsuda, T., Kato, T., and Ochiya, T. (2013). Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types. *J Extracell Vesicles* 2.

Zeegers, M.P., Jellema, A., and Ostrer, H. (2003). Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma: A meta-analysis. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society* 97, 1894-1903.

Zhang, L., Shan, X., Meng, X., Gu, T., Lu, Q., Zhang, J., Chen, J., Jiang, Q., and Ning, X. (2019). The first integrins beta3-mediated cellular and nuclear targeting therapeutics for prostate cancer. *Biomaterials* 223, 119471.

7 PUBLIKATIONEN

Worst TS, Previti C, Nitschke K, Diessl N, Gross JC, Hoffmann L, Frey L, Thomas V, Kahlert C, Bieback K, Crigna AT, Fricke F, Porubsky S, Westhoff N, Hardenberg JV, Nuhn P, Erben P, Michel MS, Boutros M. **miR-10a-5p and miR-29b-3p as Extracellular Vesicle-Associated Prostate Cancer Detection Markers.** *Cancers (Basel)*. 2019 Dec 21;12(1):43. doi: 10.3390/cancers12010043. PMID: 31877768; PMCID: PMC7017198.

Neuberger M, Frey L, Nitschke K, Wessels F, Westhoff N, Waldbillig F, Nientiedt M, Hartung F, VON Hardenberg J, Michel MS, Erben P, Nuhn P, Worst TS. **Integrin Expression in Localized Prostate Cancer: A TCGA and MSKCC Cohort-based Exploratory *In Silico* Analysis.** *Anticancer Res.* 2023 Jan;43(1):417-428. doi: 10.21873/anticancerres.16177. PMID: 36585191.

8 TABELLARISCHER ANHANG

Tab. I Einfluss der Lagerungszeit und eines zusätzlichen Filterschritts auf Partikelgröße – und zahl

Probanden- proben	Partikelgröße (nm)	Partikelkonzentration/ml Plasma
Lagerungs- zeit	Zeitpunkt 1 n=4, Zeitpunkt 2 n=4, Zeitpunkt 3 n=4 MW ± SD: Zeitpunkt 1: 193,4 ± 25,9 Zeitpunkt 2: 198,2 ± 7,3 Zeitpunkt 3: 213,7 ± 12,9 Friedman- Test p=0,0694 post-hoc Analyse nach Dunn Zeitpunkt 1 – Zeitpunkt 2: p > 0,9999 Zeitpunkt 1 – Zeitpunkt 3: p=0,1017 Zeitpunkt 2 – Zeitpunkt 3: p=0,1017	Zeitpunkt 1 n=4, Zeitpunkt 2 n=4, Zeitpunkt 3 n=4 MW ± SD: Zeitpunkt 1: 3,05 x 10 ¹⁰ ± 5,05 x 10 ⁹ Zeitpunkt 2: 4,05 x 10 ¹⁰ ± 2,66 x 10 ¹⁰ Zeitpunkt 3: 2,7 x 10 ¹⁰ ± 6,98 x 10 ¹⁰ Friedman- Test p= p 0,7778 post-hoc Analyse nach Dunn Zeitpunkt 1 – Zeitpunkt 2: p > 0,9999 Zeitpunkt 1 – Zeitpunkt 3: p > 0,9999 Zeitpunkt 2 – Zeitpunkt 3: p > 0,9999
Filterschritt	ohne Filter n=4, mit Filter n=4 MW ± SD: ohne Filterschritt: 151,1 ± 11,8 mit Filterschritt: 149,0 ± 11,0 Mann-Whitney-Test p > 0,9999 Wilcoxon-Test: p > 0,9999	ohne Filter n=4, mit Filter n=4 MW ± SD: ohne Filterschritt: 1,78 x 10 ¹⁰ ± 3,95 x 10 ⁹ mit Filterschritt: 1,22 x 10 ¹⁰ ± 4,65 x 10 ⁹ Mann-Whitney-Test p=0,0857 Wilcoxon-Test: p=0,1250

Tab. II Partikelgröße und –konzentration gesunder Probanden, Patienten mit BPH und lokalisiertem PCa

	Partikelgröße (nm)	Partikelkonzentration/ml Plasma
Proband, BPH, lok. PCa	Kruskal-Wallis-Test p=0,5703 post-hoc Analyse nach Dunn Proband – BPH: p > 0,9999 Proband – lok. PCa: p=0,9115 BPH – lok. PCa: p > 0,9999	Kruskal-Wallis-Test p=0,0025 post-hoc Analyse nach Dunn Proband – BPH: p=0,2518 <u>Proband – lok. PCa: p=0,0056</u> BPH – lok. PCa: p=0,7553

Tab. III EV-Marker und Integrinsignatur auf EV von Patienten mit lokalisiertem PCa und ossär metastasiertem PCa

lokalisiertes PCa - ossär metastasiertes PCa	
EV-Marker und Integrine	Mann-Whitney Test (p-Wert)
CD9	0,4286
CD63	0,5065
CD81	0,0173
CD29	> 0,9999
CD51	0,6623
CD104	0,2468

Tab. IV Partikelgröße und Partikelkonzentration Neutax-Kohorte

Neutax-Kohorte	Partikelgröße (nm)	Partikelkonzentration/ml Plasma
VM – ohne VM	VM n=15, ohne VM n=15 MW ± SD: VM: 144,3 nm ± 16,1 nm ohne VM: 138,0 nm ± 13,4 nm Mann-Whitney p=0,3399	VM n=15, ohne VM n=15 MW ± SD: VM: $1,70 \times 10^{10} \pm 7,6 \times 10^9$ ohne VM: $1,55 \times 10^{10} \pm 4,9 \times 10^9$ Mann-Whitney p=0,8458
VM <u>und</u> ohne VM	BE 1 n= 12, BE 2 n= 10, BE 3 n= 8 MW ± SD: BE 1: 144,48 ± 14,9 BE 2: 141,5 ± 9,9 BE 3: 135,81 ± 19,9 Kruskal-Wallis p=0,3449 Post-Hoc Dunn BE 1 - BE 2: p > 0,9999 BE 1 - BE 3: p=0,4704 BE 2 - BE 3: p=0,8076	BE 1 n= 12, BE 2 n= 10, BE 3 n= 8 MW ± SD: BE 1: $1,65 \times 10^{10} \pm 2,1 \times 10^9$ BE 2: $1,68 \times 10^{10} \pm 2,2 \times 10^9$ BE 3: $1,53 \times 10^{10} \pm 1,5 \times 10^9$ Kruskal-Wallis p=0,9670 Post-Hoc Dunn BE 1 - BE 2: p > 0,9999 BE 1 - BE 3: > 0,9999 BE 2 - BE 3: > 0,9999
VM	BE 1 n= 4, BE 2 n= 4, BE 3 n= 4 MW ± SD: BE 1: 137,4 ± 4,8 BE 2: 143,3 ± 4,8 BE 3: 138,7 ± 25,4 Friedmann-Test p=0,7778 BE 1 - BE 2: p > 0,9999 BE 1 - BE 3: p > 0,9999 BE 2 - BE 3: p > 0,9999	BE 1 n= 4, BE 2 n= 4, BE 3 n= 4 MW ± SD: BE 1: 18500000000 ± 11832441281 BE 2: 13275000000 ± 2753633963 BE 3: 14650000000 ± 4518480571 Friedmann-Test p=0,9306 BE 1 - BE 2: p > 0,9999 BE 1 - BE 3: p > 0,9999 BE 2 - BE 3: p > 0,9999

<p>ohne VM</p>	<p>BE 1 n= 4, BE 2 n= 4, BE 3 n= 4</p> <p>MW ± SD: BE 1: 135,9 ± 13,4 BE 2: 133,0 ± 7,0 BE 3: 132,9 ± 16,1</p> <p>Friedmann-Test p=0,9306 BE 1 - BE 2: p > 0,9999 BE 1 - BE 3: p > 0,9999 BE 2 - BE 3: p > 0,9999</p>	<p>BE 1 n= 4, BE 2 n= 4, BE 3 n= 4</p> <p>MW ± SD: BE 1: 15275000000 ± 4633483211 BE 2: 18325000000 ± 5503559454 BE 3: 16000000000 ± 4760952286</p> <p>Friedmann-Test p=0,4306 BE 1 - BE 2: p=0,4719 BE 1 - BE 3: p > 0,9999 BE 2 - BE 3: p > 0,9999</p>
<p>Metastasierung nach</p> <p>Leber -</p> <p>Lunge -</p> <p>Knochen</p>	<p>Leber n = 6, Lunge = 6, Knochen = 17</p> <p>MW ± SD: Leber: 143,3 ± 5,5 Lunge: 133, 0 ± 11,5 Knochen: 136,7 ± 13,4</p> <p>Kruskal-Wallis p=0,2026 Post-Hoc Dunn Leber-Lunge: p=0,2504 Leber-Knochen: p=0,4807 Lunge-Knochen p > 0,9999 0,5495</p>	<p>Leber n = 6, Lunge = 6, Knochen = 17</p> <p>MW ± SD: Leber: 17333333333 ± 9363261540 Lunge: 13083333333 ± 3337913520 Knochen: 15282352941 ± 4711320846</p> <p>Kruskal-Wallis p= 0,6870 Post-Hoc Dunn Leber-Lunge: p > 0,9999 Leber-Knochen: p > 0,9999 Lunge-Knochen p > 0,9999</p>

Tab. V Partikelgröße und Partikelkonzentration Probanden, Patienten mit BPH, Patienten mit lokalisiertem PCa und PCa Patienten mit und ohne VM

Biobank- /Neutax-Ko- horte	Partikelgröße (nm)	Partikelkonzentration/ml Plasma
	<p>Kruskal-Wallis-Test p=0,0093</p> <p>Mann-Whitney-Test</p> <p>mCRPC VM</p> <ul style="list-style-type: none"> - mCRPC ohne VM: p=0,0102 - lok. PCA: p=0,0488 - BPH: p=0,1209 - Proband: p=0,6844 <p>mCRPC ohne VM</p> <ul style="list-style-type: none"> - lok. PCA: p=0,0022 - BPH: p=0,0043 - Proband: p=0,0593 <p>lok. PCA</p> <ul style="list-style-type: none"> - BPH: p=0,6623 - Proband: p=0,4908 <p>BPH</p> <ul style="list-style-type: none"> - Proband: p=0,3543 	<p>Kruskal-Wallis-Test p=0,0079</p> <p>Mann-Whitney-Test</p> <p>mCRPC VM</p> <ul style="list-style-type: none"> - mCRPC ohne VM: p=0,3723 - lok. PCA: p=0,0344 - BPH: p=0,7887 - Proband: p=0,0102 <p>mCRPC ohne VM</p> <ul style="list-style-type: none"> - lok. PCA: p=0,0160 - BPH: p=0,2821 - Proband: p=0,0788 <p>lok. PCA</p> <ul style="list-style-type: none"> - BPH: p=0,1385 - Proband: p=0,0033 <p>BPH</p> <ul style="list-style-type: none"> - Proband: p=0,0412

Abb. VI

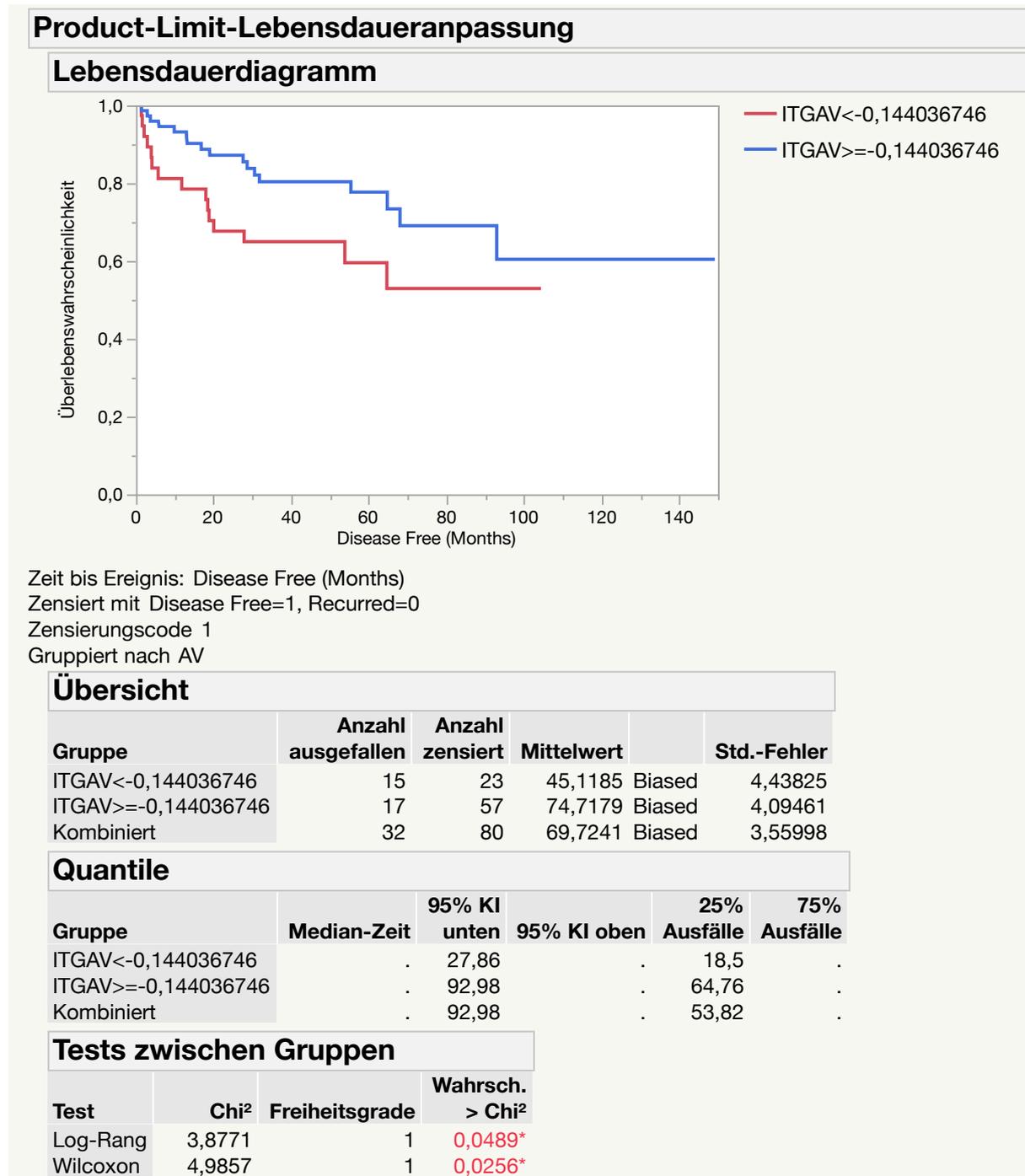


Abb. VI

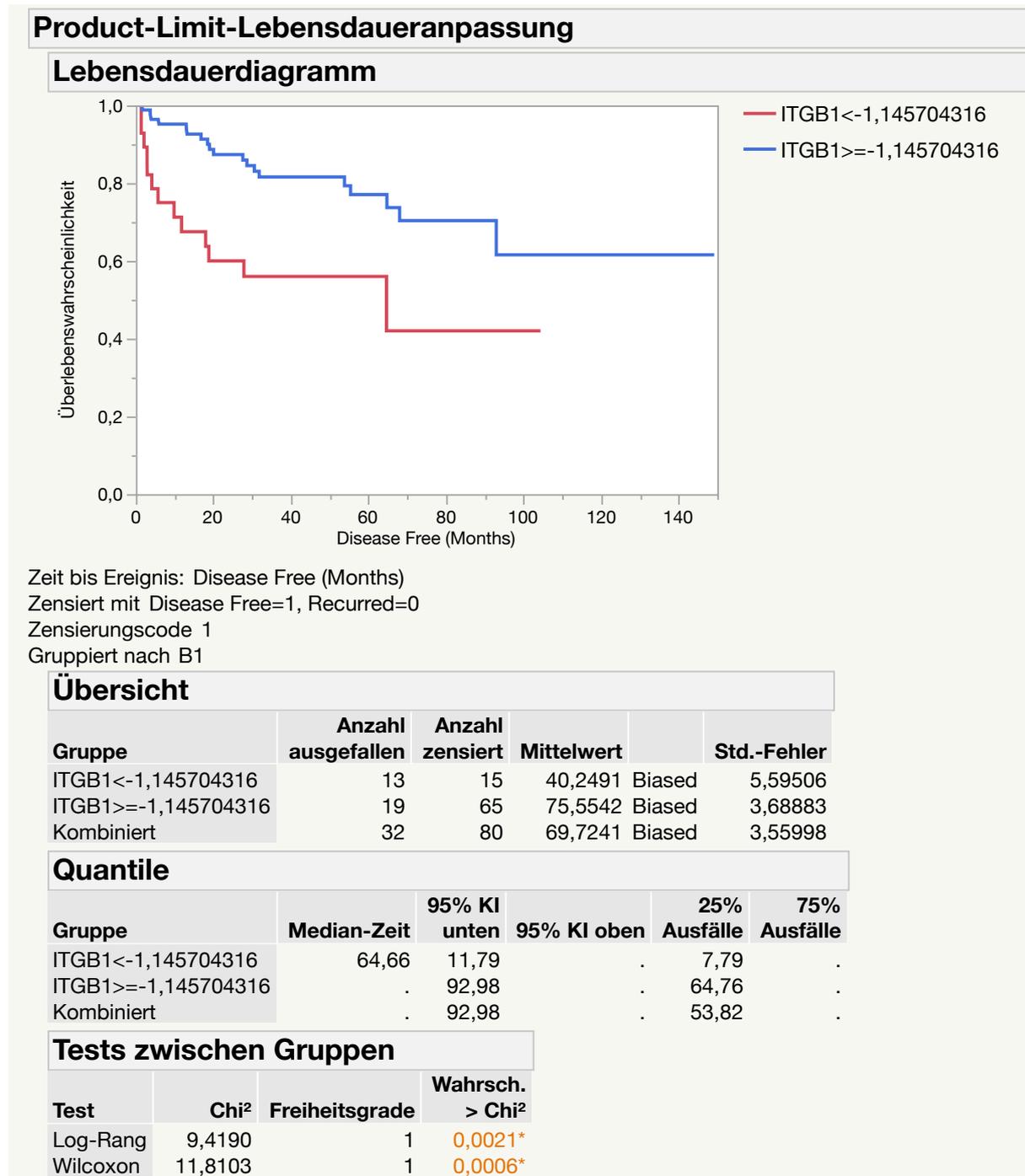


Abb. VII

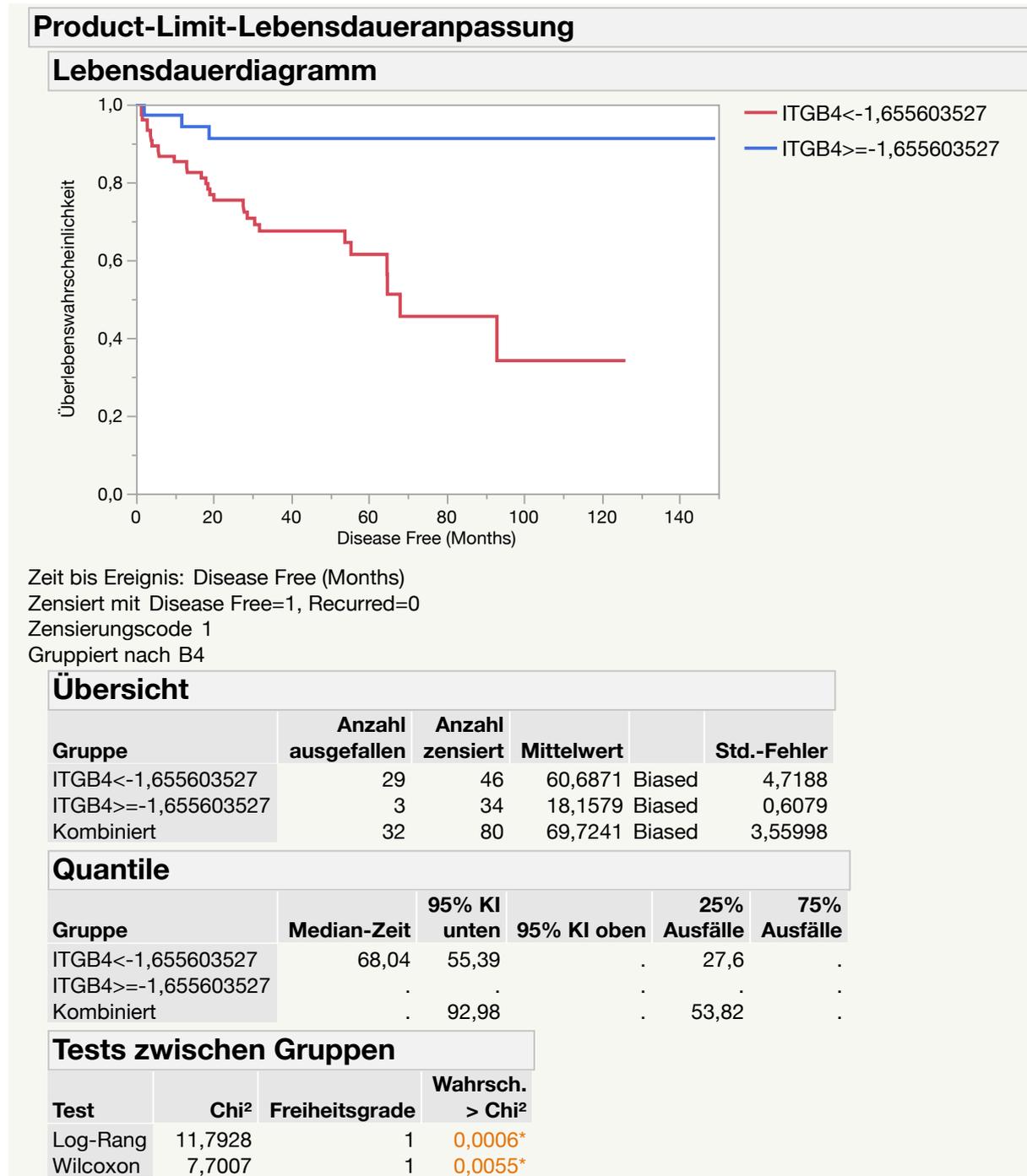
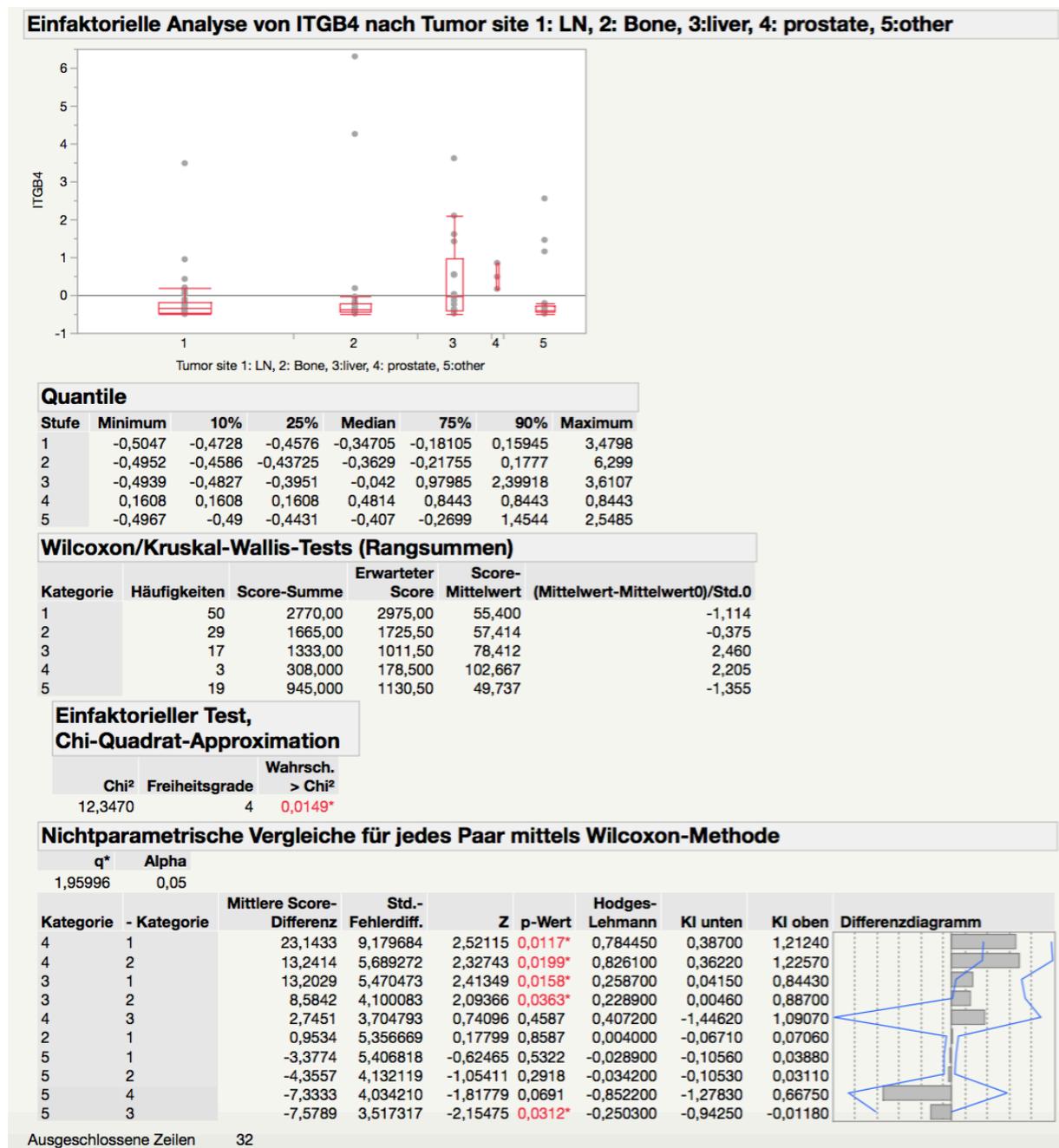


Abb. VIII



9 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Lisa Frey
Geburtsdatum: 01.02.1992
Geburtsort: Frankfurt am Main
Familienstand: ledig

SCHULISCHER WERDEGANG

1998 -2002 Grundschule: Integrative Gesamtschule Frankfurt am Main
2002 – 2009 Gymnasium: Ernst-Reuter-Schule 2 Frankfurt am Main
2009 – 2012 Gymnasium: Edith-Stein-Schule Darmstadt
06.06.2012 Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2019 Beginn des Studiums Humanmedizin
 An der Medizinischen Fakultät Mannheim der Karl-Ruprechts-
 Universität Heidelberg
05.09.2014 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
12.10.2017 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
19.06.2019 Ärztliche Abschlussprüfung (M3)
26.07.2019 Approbation als Ärztin

BERUFLICHER WERDEGANG

seit März 2020 Assistenzärztin an der Klinik und Poliklinik für Urologie und
 Kinderurologie der Universitätsmedizin Mainz

10 DANKSAGUNG

Zum Abschluss möchte ich einigen besonderen Menschen, ohne die die Durchführung meiner Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre, meinen herzlichen Dank aussprechen.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Jost von Hardenberg und meinem Betreuer Thomas Worst. Lieber Jost, lieber Thomas, Danke für die Überlassung des Themas, die tolle Betreuung und Unterstützung in allen Phasen des Projektes.

Ganz besonders hervorzuheben ist an dieser Stelle Katja Nitschke. Liebe Katja, danke für deine endlose Geduld, die jederzeitige Erreichbarkeit und wertvolle Motivation.

Danke an das gesamte Team des urologischen Forschungslabors, insbesondere Katja Nitschke und Annette Steidler für die Einarbeitung in die fremde Welt der Laborarbeit, die Arbeitsabläufe und euer immer offenes Ohr.

Philipp Erben möchte ich für die gute Betreuung, die stete Bereitschaft ihn mit zahllosen Fragen konfrontieren zu dürfen und neue Impulse zu bekommen, danken.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner wundervollen Familie bedanken. Ohne euch wäre weder das Medizinstudium noch diese Arbeit denkbar gewesen. Danke für euren bedingungslosen Rückhalt in allen Lebenslagen. Lieber Stefan, danke für deine Zuversicht, deine Rücksichtnahme und all deine Liebe.

Ohne euch wäre diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen und ich danke euch von ganzem Herzen.

EIDESSTAATLICHE VERSICHERUNG

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema: „Extrazelluläre Vesikel und ihr Integrinprofil im metastasierten Prostatakarzinom: von der Zellkultur zur klinischen Erprobung“ handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.
2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.
3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.
4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.
5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt. Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erkläre und nichts verschwiegen habe.

Ort und Datum

Unterschrift