

Aus der Klinik für Hämatologie und Onkologie

Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Nikolas von Bubnoff

Bereich Experimentelle Onkologie, Palliativmedizin und Ethik in der Onkologie

Bereichsleiter: Prof. Dr. med. Frank Gieseler

***Extrazelluläre Vesikel als Biomarker für Tumorprogression
und Gerinnungsaktivierung bei Krebspatienten***

-"from bench to bedside"

Kumulative Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Corinna Steidel geb. Plattfaut

aus Soest

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Frank Gieseler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Melchior Lauten

Tag der mündlichen Prüfung 7.11.2022

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 7.11.2022

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	4
EINLEITUNG	5
EXTRAZELLULÄRE VESIKEL	5
<i>Subpopulationen</i>	5
EV BEI TUMOR & GERINNUNG	5
ALLGEMEINE METHODIK	6
PROBENAUFBEREITUNG	6
DURCHFLUSSZYTOMETRIE	7
NANOPARTIKLE-TRACKING.ANALYSE	8
RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE	8
TF-AKTIVITÄT	8
PS-KONZENTRATION	9
ZELLKULTUR COLO357	9
EV-INDUZIERTE ERK-PHOSPHORYLIERUNG	9
EV-INDUZIERTE TUMORZELLMIGRATION	10
<i>xCELLigence RTCA DP (Roche, Basel, Schweiz)</i>	10
<i>Oris</i>	11
STATISTISCHE AUSWERTUNG	12
PUBLIKATION 1	12
EXTRACELLULAR VESICLES FROM MALIGNANT EFFUSIONS INDUCE TUMOR CELL MIGRATION: INHIBITORY EFFECT OF LMWH TINZAPARIN	12
<i>Fragestellung:</i>	12
<i>Methoden:</i>	12
<i>Ergebnisse:</i>	13
<i>Diskussion</i>	14
PUBLIKATION 2	14
HETEROGENEITY OF MICROVESICLES FROM CANCER CELL LINES UNDER INFLAMMATORY STIMULATION WITH TNFALPHA	14
<i>Fragestellung</i>	15
<i>Methoden</i>	15
<i>Ergebnisse</i>	16
<i>Diskussion</i>	18
PUBLIKATION 3	19
TISSUE FACTOR ACTIVITY ON MICROVESICLES FROM CANCER PATIENTS	19
<i>Fragestellung</i>	19
<i>Methoden</i>	19
<i>Ergebnisse</i>	19
<i>Diskussion</i>	20
PUBLIKATION 4	21
BIOLOGICALLY ACTIVE TISSUE FACTOR-BEARING LARGER ECTOSOME-LIKE EXTRACELLULAR VESICLES IN MALIGNANT EFFUSIONS FROM OVARIAN CANCER PATIENTS: CORRELATION WITH INCIDENCE OF THROMBOSIS	21
<i>Fragestellung</i>	21
<i>Methoden</i>	21
<i>Ergebnisse</i>	22
<i>Diskussion</i>	23
DISKUSSION	24
ANHANG	25
LITERATURVERZEICHNIS	25

DANKSAGUNG	27
PUBLIKATIONEN MIT MEINER BETEILIGUNG	28

Abkürzungsverzeichnis

CFDA	Carboxy-fluoresceindiacetat-acetoxymethylester
CFDA-SE	Carboxy-fluoresceindiacetat-Succinimidylester
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases
EV	Extrazelluläre Vesikel
FCS	Fetal Calf Serum, fetales Kälberserum
FX	Gerinnungsfaktor X, Thrombokinas
hsEV	high-speed EV
ISEV	International Society for Extracellular Vesicles
lsEV	low-speed EV
MVB	Multi-Vesicular Bodies, Multivesikelkörperchen
NTA	Nano-particle Tracking Analysis
PAR2	Proteinase-Activated-Receptor 2
PBS	Phosphate Buffered Saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PS	Phosphatidylserin
TF	Gewebethromboplastin, Tissue Factor
TF+ EV	TF-tragende EV
TFPI	TF Pathway Inhibitor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung der sequentiellen Zentrifugation	7
Abbildung 2 CIM-Plate 16 des xCELLigence für Echtzeit Zellinvasion/Migration Analyse	10
Abbildung 3 Schematische Darstellung des Oris TM Migrations Assays, ©Platypus Technologies, LLC	11
Abbildung 4: hsEV-Quantifizierung mittels hochauflösender Durchflusszytometrie ..	17
Abbildung 5: Einfluss der entzündlichen Stimulation auf TF-Aktivität (links) und EV-induzierte Tumorzellmigration (rechts) unstimuliert TNFalpha-stimuliert n.s. nicht signifikant * p<0,01 ** p<0,001	17
Abbildung 6: Hemmung der EV-induzierten Migration durch den spezifischen PAR2-Inhibitor GB88.....	18
Abbildung 7 Korrelation zwischen TF und ERK-Phosphorylierung von EV von gesunden Probanden (links) und Krebspatienten (rechts)	20
Abbildung 8 Korrelation von erhöhten extrazellulären Vesikeln mit Thromboembolien (n=20)	22
Abbildung 9 EV-induzierte ERK-Phosphorylierung (links) und Tumorzellmigration (rechts) (n=20)	23

Einleitung

Extrazelluläre Vesikel

Subpopulationen

Das Forschungsgebiet der extrazellulären Vesikel (EV) ist vergleichsweise jung, was unter anderem daran zu erkennen ist, dass eine einheitliche Nomenklatur für die Vesikel bislang fehlt. Aktuell ist auch aufgrund fehlender spezifischer Marker der EV-Sub-Populationen eine Gruppierung nach der Größe üblich, wobei man davon ausgeht, dass die Größe gleichzeitig eine Aussage über den Ursprung des Vesikels erlaubt. Kleine Vesikel (30-150 nm) werden den Exosomen zugeordnet, größere Vesikel (50-1000 nm), den Ektosomen (auch Mikropartikel/Mikovesikel genannt) und apoptotische Körperchen, welche überwiegend größer als 1000 nm sind und bei irreparablen Zellschaden entstehen (1). Exosomen werden intrazellulär in Multivesikelkörperchen ("*multi vesicular bodies*", MVB) gebildet und können mittels Zellmembranfusion das Zellinnere verlassen. Ektosomen entstehen dagegen durch Ausknospung und Teilung der äußeren Zellmembran: Ausgehend von einer Veränderung des intrazellulären Calciumspiegels erfolgt über die Aktivierung verschiedener Enzyme (z.B. Translocasen, Scramblasen etc.) eine Verschiebung von Phosphatidylserinen (PS) auf die äußere Zellmembranseite. Dies resultiert in einer Umstrukturierung des Zytoskeletts und letztlich Ausknospung und Abtrennung der Vesikel (2). Diese Vesikelpopulation (Ektosomen) war der Fokus der vorgelegten Studien, da sie im Hinblick auf die Verwendung als Biomarker aufgrund ihrer Entstehung die Strukturen der Tumorzell-Membran widerspiegeln. Aufgrund ihrer Charakterisierung durch die Größe, wird diese Population in der aktuellen englischsprachigen Nomenklatur auch "*larger ectosome-like EVs*" genannt.

EV unterscheiden sich aber nicht nur in ihrer Größe, sondern insbesondere auch durch ihren Aufbau, wobei die Membranstruktur für diese Arbeit eine besondere Rolle spielt. Die größeren Vesikel, die der äußeren Zellmembran entstammen (Ektosomen), weisen häufig eine "chaotische" Membranstruktur mit der Präsentation von negativ geladenen PS auf, die normalerweise lediglich auf der intrazellulären Membranseite zu finden sind (3).

EV bei Tumor & Gerinnung

Die Annahme, es handle sich bei den EVs lediglich um zelluläre Abfallprodukte, ist längst überholt. Für fast jede Zellart konnte die fein regulierte Bildung und Freisetzung von EV nachgewiesen werden (4). Tumorzellen setzen

Gewebethromboplastin (TF)-tragende EV frei, welche den extrinsischen Weg der Gerinnungskaskade aktivieren können (5). Die Zirkulation prokoagulativer Vesikel könnte eine Komponente der erhöhten Anfälligkeit von Tumorpatienten für thromboembolische Ereignisse darstellen. Einige Studien konnten eine Korrelation zwischen erhöhten TF⁺-EV-Werten und Thromboembolien nachweisen (6), diese Korrelation konnte aber nicht für alle Tumorentitäten nachgewiesen werden (7). Eine Ursache für die unterschiedlichen Studienergebnisse könnten unterschiedliche methodische Herangehensweisen sein. Der Einsatz von funktionellen anstelle quantitativer Messungen könnte die Sensitivität hinsichtlich der Vorhersage thromboembolischer Ereignisse erhöhen (8). Darüber hinaus sind EV in der Lage über die Aktivierung von Zellrezeptoren wie z.B. Proteinase-aktivierte-Rezeptoren (PAR) intrazelluläre Signalkaskaden zu stimulieren und somit interzelluläre Kommunikation zu ermöglichen (9).

Allgemeine Methodik

Probenaufbereitung

Das Probenmaterial (Plasma, Aszites oder Zellkulturüberstand) wurde bei 470xg für 10 Minuten zentrifugiert, um Zellen zu entfernen und der Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Da die Vesikel in angereicherter Form sehr instabil sind, erfolgte die weitere Aufreinigung stets unmittelbar vor Verwendung der im weiteren Verlauf beschriebenen Experimente.

Die extrazellulären Vesikel wurden anhand des von der International Society of Thrombosis and Haemostasis veröffentlichten Protokolls durch sequentielle Zentrifugation angereichert (10). Die Proben wurden bei 2500xg für 15 Minuten zentrifugiert, die Überstände gesammelt und erneut bei 2500xg für 15 Minuten zentrifugiert. Die daraus gewonnen Überstände bezeichneten wir als low-speed-EV (lsEV).

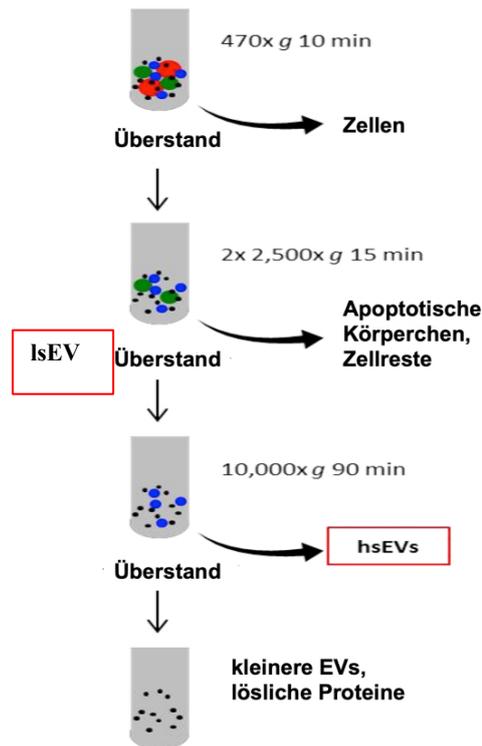


Abbildung 1 Schematische Darstellung der sequentiellen Zentrifugation

Zur spezifischen Anreicherung der größeren Vesikelsubpopulation erfolgte im Anschluss eine sog. „high-speed“ Zentrifugation bei 10.000xg für 90 Minuten, in Anlehnung an das von Muralidharan-Chari et al. publizierte Protokoll (11).

Durchflusszytometrie

Die Quantifizierung der angereicherten Vesikel erfolgte mittels hochauflösender Durchflusszytometrie, zur besseren Detektierbarkeit und Abgrenzung von zerstörten Zellmembranresten erfolgte zuvor eine CFSE-Färbung. Hierzu wurden die Vesikel für 60 Minuten bei 4°C im Dunkeln mit CFDA-SE inkubiert, welches durch die Membran diffundiert und intrazellulär an der inneren Lipidmembran enzymatisch in das fluoreszierende CFSE umgesetzt wurde. Dadurch war eine Unterscheidung zwischen intakten Vesikeln von zerstörten Membranresten innerhalb des gleichen Größenbereichs möglich (12) (13). Es erfolgte eine sequentielle Selektion der detektierten Ereignisse. Als Triggerchannel diente der FITC-Kanal des Durchflusszytometers, sodass nur CFSE⁺ events aufgezeichnet wurden. Diese wurden anschließend im Forward/Side-Scatter bezüglich der Größe selektioniert.

Das Größengate von 0,1-0,9µm wurde mithilfe der Megamix beads (Biocytex, Marseille, France) bestimmt (14).

Zum Nachweis der Doppellipidmembranstruktur der Vesikel führten wir eine Antikörperfärbung gegen die Tetraspanine CD9, CD63 und CD81 durch, die Antikörper waren alle mit dem Farbstoff PE gekoppelt. Isotypen-Kontrollen wurden zum Ausschluss unspezifischer Hintergrundfärbung durchgeführt. Die Antikörperfärbung wurde unmittelbar vor der „high-speed“-Zentrifugation durchgeführt, um nicht-gebundene Antikörper aus der Probe zu entfernen.

Nanopartikel-Tracking-Analyse

Mit dem NS300 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) wurden Nanopartikel-Tracking-Analysen zur Überprüfung der Größe der durch das sequentielle Zentrifugationsprotokoll angereicherten Vesikel durchgeführt. Basierend auf der Brownschen Molekularbewegung wurden Partikel einer Größe zwischen 10-1000nm in einer Suspension mittels Laserstrahl visualisiert und die aufgenommene Videosequenz analysiert. Das durch die Partikel entstehende Streulicht wird im 90°-Winkel von einer hochsensitiven Kamera erfasst und ausgewertet.

Rasterelektronenmikroskopie

Die angereicherten Vesikel wurden mit Glutaraldehyd bei einer Endkonzentration von 2,5% in filtriertem PBS fixiert und bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Nach Homogenisierung wurden 10-20µl jeder Probe auf einen Thermanox coverslip (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany) aufgetragen und für 90-120 min in einer Feuchtigkeitskammer ruhen gelassen. Anschließend erfolgte eine Dehydratation mit Bad in Aceton-Bädern steigender Konzentration und vollständige Trocknung mittels CO₂, um Schrumpfungseffekten vorzubeugen. Die dehydrierten Proben wurden mit Goldpartikeln besprenkelt und mit einem EVO LS 15 Rasterelektronenmikroskop (ZEISS, Oberkochen, Germany) analysiert.

TF-Aktivität

Die Aktivität des EV-gebundenen Gewebethromboplastins wurde mithilfe des Zymphen MP-TF-Assay (Aniara, West Chester, OH, USA) nach Herstellerangaben analysiert. In Kürze, der in den Proben enthaltenen TF wurde von der mit TF-Antikörpern beschichteten Platte gebunden. Nach einem Waschvorgang wurden die Gerinnungsfaktoren FX und FVII hinzugefügt und für 2 Stunden inkubiert, anschließend wurde ein chromogenes FXa-Substrat hinzugefügt. Nach erneuter 2-stündiger Inkubation wurde die Reaktion durch die Zugabe von Zitronensäure

gestoppt und die veränderte optische Dichte bei 405 nm gemessen. Die Konzentration des TF in pg/ml wurde anhand einer im Kit enthaltenen Standardtitration bestimmt.

PS-Konzentration

Die Menge der Phosphatidylserine (PS) auf den EV wurde mithilfe des Zymophen MP-Activity-Assay (Aniara, West Chester, OH, USA) nach Herstellerangaben bestimmt. In Kürze, das in den Proben enthaltene PS wurde von der mit Annexin V-beschichteten Platte gebunden, überschüssiges Material wurde nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde ausgewaschen. Anschließend wurden FVa, FXa, Calcium und Prothrombin hinzugefügt, welche mit PS als Kofaktor Prothrombin zu Thrombin aktivieren. Nach 10 Minuten wurde chromogenes Thrombin-Substrat hinzugefügt und der Substratumsatz nach 3 Minuten durch Zugabe von Zitronensäure gestoppt. Die Veränderung der optischen Dichte wurde bei 405 nm gemessen. Das Ergebnis war proportional zu der in der Probe enthaltenen Menge an PS, die Konzentration wurde anhand einer im Kit enthaltenen Standardtitration bestimmt.

Zellkultur Colo357

Als Testzelllinie für die zellulären Effekte der untersuchten EV verwendeten wir die Pankreaskarzinomzelllinie Colo357 (15). Diese Zelllinie wurde aufgrund der stabilen PAR1- und PAR2-Expression ausgewählt und bilden einen adhärenter Monolayer mit einer Verdopplungszeit von 21 Stunden (16). Die Zellen wurden serumfrei in RPMI1640-Kulturmedium (Lonza, Basel, Schweiz) mit 10% Panexin (Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland), 1% Penicillin, Streptomycin mit Glutamin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) und 1% Natriumpyruvat (Biochrom, Berlin, Deutschland) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die serumfreie Kultivierung erfolgte, um Verunreinigungen durch im fetalen Kälberserum enthaltenen EV vorzubeugen (17).

EV-induzierte ERK-Phosphorylierung

Die Aktivität des intrazellulären ERK-Signalwegs in der Testzelllinie Colo357 wurde mittels des Ray Bio Cell-based Human/Mouse ERK1/2 Phosphorylation ELISA (Ray Biotech Inc., Norcross, GA, USA) gemessen. Die Zellen wurden 24 Stunden vor Start der Stimulation bei 10% Panexingehalt des Mediums in die Testplatte eingesät und die letzten 3h wurden die Zellen einem ‚Hungermedium‘ mit nur 1% Panexin ausgesetzt. Die Stimulation der Zellen mit den EV bzw. den Kontrollen erfolgte für 10

Minuten. Anschließend wurden die Zellen nach Herstellerangaben fixiert, „quenched“ und blockiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit monoklonalem Anti ERK1/2 oder Anti phosphoERK1/2-Antikörper. Nach abwaschen des ungebundenen Antikörpers wurde ein sekundärer, mit Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelter Antikörper hinzugegeben, dessen Bindung durch den Umsatz eines chromogenen HRP-Substrats bei 450 nm nachgewiesen wurde. Der Umsatz des HRP-Substrats war somit proportional zu der Menge phosphoryliertem bzw. nativem ERK.

EV-induzierte Tumorzellmigration

Die Auswirkung der isolierten Vesikel auf die Migrationsaktivität der Testzelllinie Colo357 kamen zwei verschiedene Testsystem zum Einsatz. In beiden Systemen dienten TGF β 1 und ein direkter PAR2-Agonist als Positivkontrollen, PBS wurde als Negativkontrolle verwendet.

xCELLigence RTCA DP (Roche, Basel, Schweiz)

Wir verwendeten die Echtzeit-Zell-Analyse des xCelligence Systems entsprechend der Publikation von Mandel et al (18).

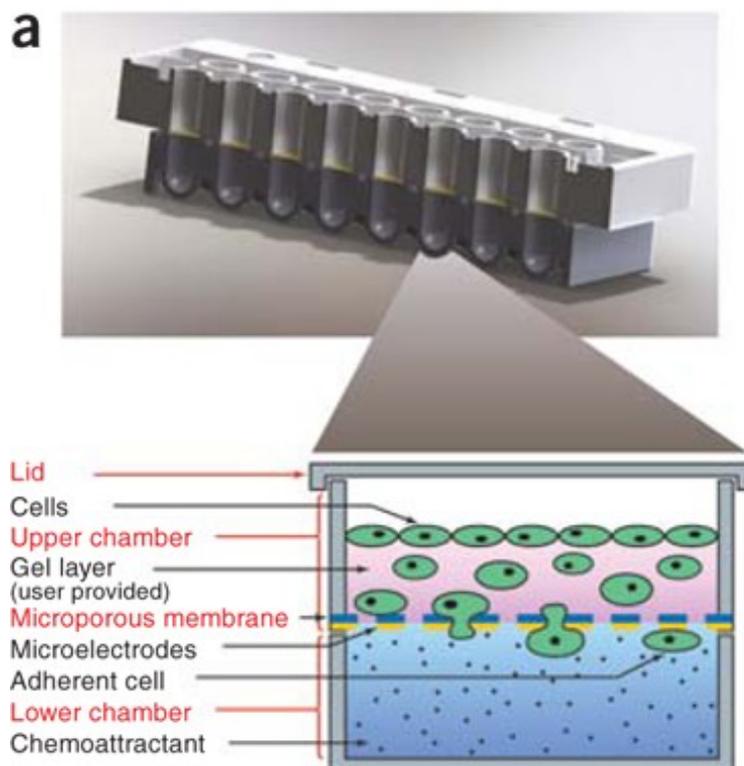


Abbildung 2 CIM-Plate 16 des xCELLigence für Echtzeit Zellinvasion/Migration Analyse

Quelle: adaptiert nach Nature Methods ISSN1548-7105 (online)

In Kürze, eine Lösung aus 50% Zellkulturmedium und 50% angereicherten EV wurden in die obere und untere Kammer gegeben und 6×10^4 Zellen in die obere Kammer eingesät. Die Zellen können durch eine mikroporöse Membran in die untere Kammer gelangen. Die Veränderung des dimensionslosen Cell-Index (CI) über die Zeit wurde gemessen, ein Kontakt der Zellen an der Elektrode zwischen den beiden Kammern, führte zu einem Anstieg des CI-Signals.

Oris™ Pro Cell Migration Assay (Platypus Technologies LLC, Madison, WI, USA)

Zur Endpunktmessung der Migration nutzten wir das Oris™ System, welches gegenüber dem xCELLigence System für uns den Vorteil hatte, dass die Tumorzellmigration und die veränderte Zellmorphologie direkt mittels Mikroskopie beobachtet werden konnte.

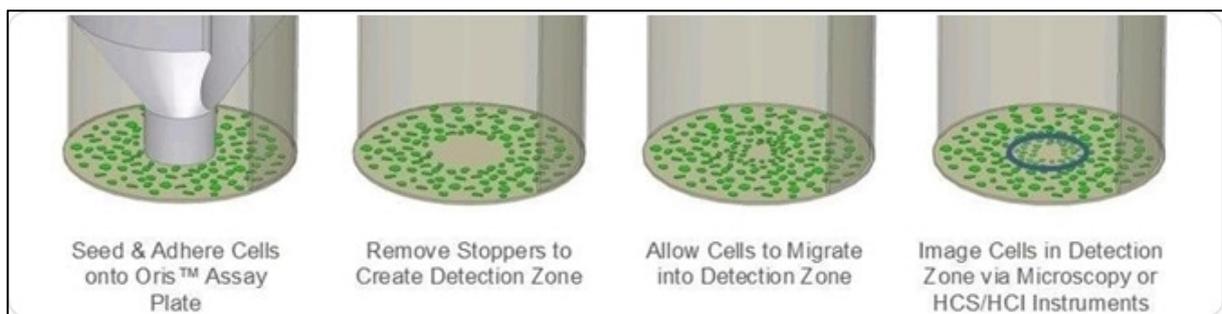


Abbildung 3 Schematische Darstellung des Oris™ Migrations Assays, ©Platypus Technologies, LLC

3×10^4 Zellen der Testzelllinie wurden in einer speziellen 96-well-Platte eingesät, wobei die mittlere Fläche (im weiteren Detektionszone genannt) durch einen Silikonstopfen blockiert wurde. Nach Bildung eines adhärenen Monolayers nach 24 Stunden wurde der Silikonstopfen entfernt und nicht-adhärenente Zellen abgespült. Im Anschluss wurde die Stimulation begonnen. Die Proben wurden jeweils 1:2 mit Zellkulturmedium verdünnt, nach 24h Stimulationszeit erhielten alle Ansätze eine zusätzliche Gabe Zellkulturmedium. Die Zellen wurden nach 48 Stunden Stimulationszeit fixiert, gefärbt und unter Verwendung der Oris™ Detektionsmaske mit einer 5G Megapixel Kamera (Point Grey, Richmond, Kanada) unter einem Axioskop Mikroskop (ZEISS, Oberkochen, Germany) fotografiert, wobei nur die Detektionszone abgebildet wurde. Die Bildauswertung erfolgte mit der Fiji Image J Software, das Programm zählte jeden Pixel unterhalb eines Schwellenwertes. Diese Pixelanzahl wurde von einem Nullwert, welcher aus einem direkt zum Zeitpunkt des

Stimulationsstarts (t=0) fixierten wells bestimmt wurde, subtrahiert. Das Ergebnis war die Migrationsfläche in Pixel².

Statistische Auswertung

Die Experimente wurden mindestens in Triplikaten ausgeführt, um die intra-experimentelle Variation gering zu halten, es wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet sowie der Median und die obere und untere Quartilen. Für die Auswertungen wurden Microsoft Excel for MAC 2011 und Graph Pad Prism Version 8.2.1. (San Diego, CA,USA) verwendet.

Publikation 1

Extracellular vesicles from malignant effusions induce tumor cell migration: inhibitory effect of LMWH Tinzaparin

Hans Gamperl, Corinna Plattfaut, Annika Freund, Tabea Quecke, Friederike Theophil, Frank Gieseler

Cell Biology International 2016: 40,1050-1061

Fragestellung:

Kann Tinzaparin die EV-induzierte Migration von Tumorzellen beeinflussen?

Methoden:

Die Analyse der hier verwendeten Proben wurde durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck (AZ 11-206, 22.04.2013) bewilligt. Das in dieser Studie verwendet Probenmaterial wurde im Rahmen therapeutischer Punktionen der malignen Ergüsse von Tumorpatienten unterschiedlicher Entitäten (Kolorektales Karzinom, Mammakarzinom und kleinzelliges Lungenkarzinom) gesammelt und wie im allgemeinen Methodenteil beschrieben verarbeitet.

Alle Untersuchungen wurden mit der lsEV-Fraktion durchgeführt, die durchflusszytometrische Quantifikation und Analyse der TF-Aktivität wurde zusätzlich mit der hsEV-Fraktion durchgeführt.

Die EV-Menge wurde durchflusszytometrisch quantifiziert, wie im allgemeinen Methodenteil beschrieben, die Analyse erfolgte mit dem Cytoflex S1373 (Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland), eine CFSE-Färbung erfolgte nicht.

Die EV wurden hinsichtlich ihrer TF-Aktivität und des Potenzials eine ERK-Aktivierung und eine Tumorzellmigration im xCelligence-Testsystem zu induzieren untersucht.

Als Positivkontrollen wurden TGFbeta sowie direkte Agonisten der Rezeptoren PAR1 und 2 verwendet. Zur Inhibition des ERK-Signalwegs wurde U0126 eingesetzt, GB88 wurde zur Hemmung des PAR2-Rezeptors eingesetzt. Tinzaparin wurde in einer Konzentration von 0,4-2,0 IU/ml, welche dem Bereich des Plasmaspitzenpiegels nach s.c. Gabe entspricht, verwendet und 3h vor Stimulationsbeginn dem Medium der Testzelllinie hinzugesetzt. TFPI wurden in klinisch relevanten Dosierungen (100ng/ml) eingesetzt.

Zur Messung der TFPI-Konzentration in den Zellkulturüberständen der mit Tinzaparin (0,4; 0,8 oder 2,0 IU/ml) stimulierten Tumorzellen wurde der IMUBIND® Total TFPI ELISA (American Diagnostica Inc., Stamford, CT, USA) nach Herstellerangaben verwendet.

Ergebnisse:

Die untersuchten Malignen Ergüsse enthielten große Mengen an EV ($13.438 \pm 1.001,4$). High-speed-Zentrifugation resultierte in einer deutlichen Reduktion der Vesikel $<0,5\mu\text{m}$ im Vergleich zur low-speed-Zentrifugation.

In allen Ergüssen war eine EV-assoziierte TF-Aktivität nachweisbar. Die TF-Aktivität war signifikant höher in der hsEV-Fraktion (hsEV $27,69 \pm 4,89$ pg TF / 10^6 EV; Überstand $8,9 \pm 0,5$ pg TF/ 10^6 EV).

Die LsEV der malignen Ergüsse konnten eine signifikante Aktivierung des ERK-Signalwegs in der verwendeten Testzelllinie induzieren. Die Koinkubation von rekombinanten TFPI oder dem ERK-Inhibitor U0126 waren in der Lage diesen Effekt der EV signifikant zu hemmen.

LsEV aus allen untersuchten Proben konnten eine signifikante Erhöhung der basalen Tumorzellmigration induzieren (200-260 % der basalen Zellmigration). Eine Stimulation der Testzelllinie mit direkten PAR1 und 2-Agonisten resultierte ebenfalls in einem signifikanten Anstieg der Migration, wobei der Effekt des PAR2-Agonisten deutlich stärker war. Der PAR2-Inhibitor GB88 alleine hatte keinen Effekt auf das basale Migrationslevel der Testzelllinie, war aber in der Lage die EV-induzierte Migrationsaktivierung partiell zu reduzieren. Die Hemmung des ERK-Signalwegs

mittels U0126 resultierte in einer vollständigen Hemmung der EV-induzierten Tumorzellmigration auf das Basalniveau.

Die EV-induzierte erhöhte Tumorzellmigration konnte durch eine Vorinkubation der Testzelllinien mit Tinzaparin signifikant reduziert, jedoch nicht vollständig antagonisiert werden.

Eine Zugabe von rekombinanten TFPI konnte die EV-induzierte Tumorzellmigration ebenfalls signifikant jedoch nicht vollständig auf das Niveau der Negativkontrolle reduzieren. Eine Dosis-bezogene Reduktion der EV-stimulierten Tumorzellmigration konnte für TFPI nicht nachgewiesen werden, es zeigte sich vielmehr ein on/off-Effekt. Die Inkubation mit Tinzaparin induzierte in der Testzelllinie Colo357 einen linearen Anstieg der TFPI-Konzentration im Zellkulturüberstand innerhalb der ersten 8 Stunden. Der TFPI-Anstieg war proportional zur verwendeten Zellzahl. Ein linearer Zusammenhang zwischen der TFPI-Konzentration und der verwendeten Tinzaparin-Dosierungen (0,4, 0,8, und 2,0 IU/ml) konnte nicht festgestellt werden.

Diskussion

Der Nachweis der EV-assoziierten TF-Aktivität und deren promigratorischer Effekt können ein pathophysiologischer Ansatzpunkt für die enge Verzahnung von thromboembolischen Komplikationen und dem Progress des Karzinomwachstums sein. Die Hemmbarkeit der EV-assoziierten ERK-Aktivierung und Tumorzellmigration durch TFPI scheint die Bedeutung der TF-EV zu unterstreichen. Die signifikante Reduktion der zellbiologischen EV-Effekte durch spezifische PAR2 und ERK-Antagonisten ist ein weiteres Indiz für die Bedeutung des PAR2-ERK-Signalwegs im Hinblick auf EV-induzierte Tumorzellmigration. Die inhibitorische Wirkung des Tinzaparins könnte auf eine erhöhte TFPI-Ausschüttung in den Testzelllinien zurückzuführen sein, welche PAR-aktivierende TF-Komplexe blockiert.

Publikation 2

Heterogeneity of microvesicles from cancer cell lines under inflammatory stimulation with TNFalpha

Frank Gieseler, Corinna Plattfaut, Tabea Quecke, Annika Freund, Hendrik Ungefroren, Fanny Ender

Cell Biology International 2018: 42, 1533-1544

Fragestellung

Hat ein entzündliches Milieu Einfluss auf die Zusammensetzung und Effekte der EV von Tumorzellen?

Methoden

Die fünf verwendeten Zelllinien verschiedener Tumorentitäten wurden mit serumfreiem Kulturmedium mit 10% Pannexin bei 37°C und 5% CO₂-Zufuhr kultiviert.

Name der Zelllinie	Tumorentität
Colo357	Pankreas-Adenokarzinom
Ovcar 3	Ovarial-Karzinom
A549	Lungenkarzinom
CaCo2	Kolon-Adenokarzinom
MDA-MB-231	Mammakarzinom

Tabelle 1 Übersicht der verwendeten Zelllinien

Die entzündliche Stimulation der Zellen erfolgte durch TNF α , welches sich in Vorexperimenten als die potenteste Methode zur entzündlichen EV-Stimulation erwiesen hatte. 9×10^5 Zellen wurden in eine T75-Flasche eingesät und mit serumfreiem Zellkulturmedium +/- 100ng/ml TNF α inkubiert. Nach 96 Stunden wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und nach einer Zentrifugation von 1300g zur Beseitigung zellulärer Verunreinigungen bei -20°C eingefroren. Die Zellen wurden mittels Biotase abgelöst und mittels Tryptan-Blau-Färbung auf ihre Vitalität hin überprüft.

Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurden je 3×10^5 Zellen in eine T25-Flasche eingesät und mit serumfreiem Medium inkubiert, wobei der Hälfte TNF α hinzugesetzt wurde. Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden wurden die Überstände von jeweils 3 Flaschen pro Ansatz gesammelt und die Zellen mittels Biotase gelöst. Die Quantifizierung der Zellzahl erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

Um die Apoptose innerhalb des Versuchsaufbaus zu überprüfen, führten wir nach 96 Stunden Inkubationszeit unter den gleichen Bedingungen wie die vorangegangenen Experimente einen Caspase-3-Assay nach Herstellerangaben durch.

Die Anreicherung der EV aus den Zellkulturüberständen erfolgte anhand des im allgemeinen Methodenteil beschriebenen sequentiellen Zentrifugationsprotokolls. Für die Analysen in dieser Studie wurde die hsEV-Fraktion verwendet.

Die Größe der angereicherten Vesikel wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie kontrolliert.

Die Quantifizierung der hsEV erfolgte durchflusszytometrisch am Novocyte (ACEA Biosciences Inc., San Diego, CA, USA).

Der Phosphatidylserin-Gehalt der EV wurde mittels Zymuphen MP-Activity-Assay nach Herstellerangaben bestimmt, die Proben wurden zuvor 1:20 mit gefiltertem PBS verdünnt.

Die Messung der EV-assoziierte TF-Aktivität wurde mittels Zymuphen MP-TF-Assay nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Proben wurden zuvor 1:10 mit filtriertem PBS verdünnt.

Die Ergebnisse der Phosphatidylserin- und der TF-Konzentration wurden in Relation gesetzt zu den jeweils in der Probe gemessenen Konzentration an hsEV (Aktivität / 10^6 hsEV).

Zur Analyse der Tumorzellmigration verwendeten wir den Oris Migrationsassay. Die Stimulation erfolgte mit den angereicherten hsEV aus den Zellkulturüberständen +- Zugabe des PAR2-Inhibitors GB88.

Die statistische Analyse wurde mit Microsoft Excel durchgeführt. Alle Daten wurden mittels two-tailed student's T-Test ausgewertet, wobei $p < 0,05$ als signifikant gewertet wurde. Alle Daten sind als Mittelwert +- Standardabweichung dargestellt.

Ergebnisse

Die entzündliche Stimulation aller Zelllinien führte zu einer Reduktion der Proliferationsrate, welche in der Zelllinie Colo357 am meisten ausgeprägt war (unstimuliert: $24,34 \pm 1,28 \times 10^5$ Zellen vs. TNFalpha-Stimulation: $18,12 \pm 0,41 \times 10^5$ Zellen, $p < 0,05$). Caspase-3-Messungen nach 96 Stunden zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den TNF-alpha-stimulierten und den unstimulierten Zellen (unstimuliert: $25,9 \pm 2,27$ vs. TNFalpha: $27,43 \pm 1,14$).

Entzündlich stimulierte Zellen bildeten im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen signifikant mehr hsEV in allen getesteten Zelllinien ($p < 0,001$). Eine Ausnahme war die Lungenkarzinom-Linie, welche auch unstimuliert eine sehr hohe EV-Produktion zeigte.

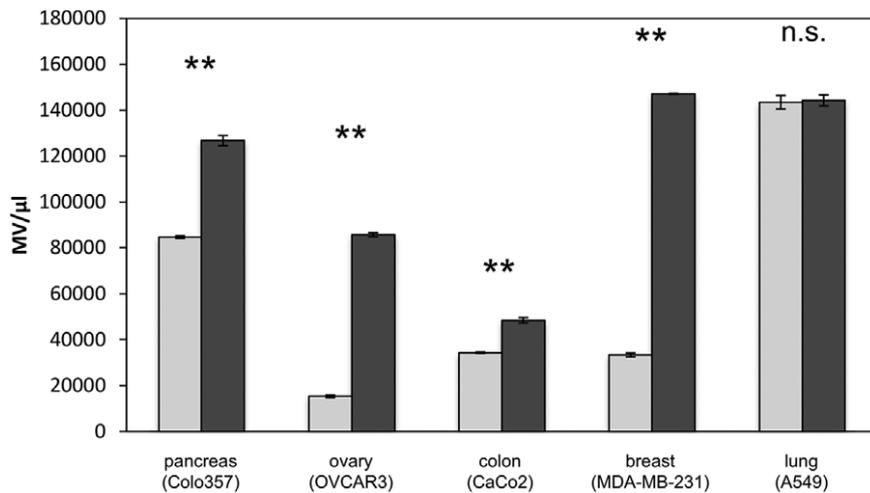


Abbildung 4: hsEV-Quantifizierung mittels hochauflösender Durchflusszytometrie

□ unstimuliert ■ TNFalpha.stimuliert n.s. nicht signifikant ** $p < 0,001$

In der durchflusszytometrischen Analyse der hsEV lagen sowohl bei den nativen als auch bei den stimulierten Ansätzen 96 % der detektierten Ereignisse im festgelegten Größengate (0,16-0,9 µm). Elektronenmikroskopisch konnte nach entzündlicher Stimulation eine veränderte Morphologie der Vesikel sowie ebenfalls eine erhöhte Konzentration gezeigt werden.

Entzündliche Stimulation führte zu einer Zunahme der Phosphatidylserin-Konzentration der hsEV in allen Zelllinien ($p < 0,01$). Die hsEV-assoziierten TF-Aktivität war nach entzündlicher Stimulation bei den Kolon-, Pankreas- und Lungenkarzinomzelllinie erhöht, wohingegen die gynäkologischen Zelllinien von Brust- und Eierstockkarzinom eine signifikante Reduktion der TF-Aktivität zeigten.

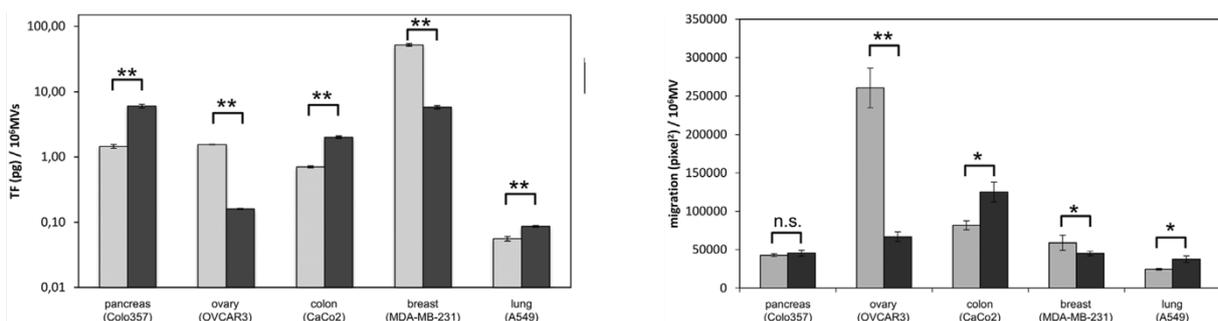


Abbildung 5: Einfluss der entzündlichen Stimulation auf TF-Aktivität (links) und EV-induzierte Migration (rechts)

□ unstimuliert ■ TNFalpha-stimuliert n.s. nicht signifikant * $p < 0,01$ ** $p < 0,001$

Hinsichtlich der Tumorzellmigration zeigten die hsEV aus den TNFalpha-stimulierten Zelllinien im Vergleich zur nativen Zellkultur unterschiedliche Effekte. Erneut induzierten die hsEV der entzündlich stimulierten Kolon-, Pankreas- und Lungenkarzinomzelllinien einen Anstieg der Migrationsaktivität, der jedoch bei der Pankreaszelllinie nicht statistisch signifikant war. Die hsEV der gynäkologischen

Zelllinien induzierten nach entzündlicher Stimulation eine geringere Migration als die aus Nativkultur stammenden hsEV.

Eine Hemmung des PAR2-Rezeptors mittels GB88 hatte bei den aus Nativkultur stammenden hsEV keinen signifikanten Effekt auf die Tumorzellmigration. Bei den hsEV entzündlichen Ursprungs zeigte sich für alle Zelllinien eine Reduktion der durch die EV-induzierten Tumorzellmigration, wobei diese bei den gynäkologischen Zelllinien nicht statistisch signifikant war.

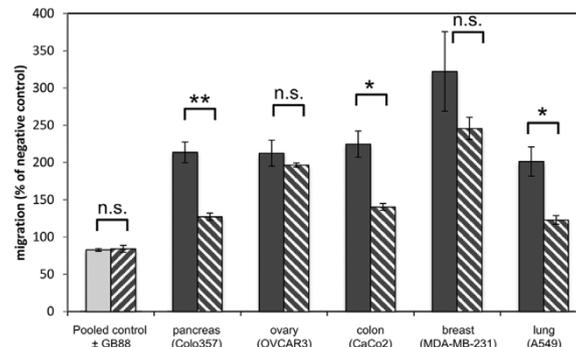


Abbildung 6: Hemmung der EV-induzierten Migration durch den spezifischen PAR2-Inhibitor GB88

□ unstimuliert ■ TNFalpha-stimuliert ▨ +GB88 n.s. nicht signifikant * $p < 0,01$ ** $p < 0,001$

Diskussion

Die Daten legen nahe, dass die entzündliche Stimulation eine Veränderung des Zellmetabolismus bewirkt, welche die Proliferation zugunsten einer erhöhten EV-Produktion reduziert und die EV zudem morphologisch und funktionell verändert. Die Unterschiede zwischen den Zelllinien hinsichtlich der TF und Migrationsinduktion der hsEV aus den gynäkologischen Zelllinien im Vergleich zu den drei anderen Zelllinien sind bemerkenswert. Die EV der Zelllinien A549, CaCo2 und Colo357 zeigten eine erhöhte TF-Aktivität und induzierten eine erhöhte Tumorzellmigration, welche signifikant durch den PAR2-Inhibitor GB88 gehemmt wurde. Diese Daten legen die Relevanz des TF-PAR2-ERK-Signalwegs für diese Tumorzelllinien nahe, wohingegen dieser Effekt in den gynäkologischen Zelllinien interessanterweise überhaupt nicht vorhanden war. Ein weiteres Indiz, dass die TF-Aktivität der EV nicht nur für deren prokoagulatorischen Effekt sondern auch für zelluläre Effekte entscheidend sein könnte.

Publikation 3

Tissue factor activity on microvesicles from cancer patients

Fanny Ender, Annika Freund, Tabea Quecke, Corinna Steidel, Piet Zamzow, Nikolas von Bubnoff, Frank Gieseler

Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 2020: 146, 467-475

Fragestellung

Finden sich Unterschiede zwischen den Serum-EV von Tumorpatienten im Vergleich zu derer gesunder Probanden?

Methoden

Blutplasmaproben von je 28 gesunden Probanden und Patienten mit fortgeschrittenen, in 93% metastasierten malignen Tumoren unterschiedlicher Entitäten wurde nach vorheriger Aufklärung und Einverständniserklärung gesammelt. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck genehmigt (AZ 15-320).

Das mittlere Alter der gesunden Probanden war 29+-5 Jahre, das der Patientengruppe 70+-14 Jahre.

Die EV wurden anhand des im allgemeinen Methodenteils erläuterten sequentiellen Zentrifugationsprotokolls angereichert, für die Experimente wurde die hsEV-Fraktion verwendet (in der Publikation wurde der Begriff MV verwendet).

Die Quantifizierung der in den Proben enthaltenen hsEV erfolgte durchflusszytometrisch am Cytoflex S (Beckmann Coulter, Krefeld, Germany). Zur Kontrolle des Größenspektrums erfolgte zudem eine Rasterelektronenmikroskopie der Proben.

Die TF-Aktivität wurde in unverdünnten hsEV-Proben gemessen.

Der Einfluss der angereicherten unverdünnten hsEV auf den intrazellulären ERK-Signalweg wurde mittels des im allgemeinen Methodenteil beschriebenen ERK-ELISA gemessen.

Ergebnisse

Die durchflusszytometrischen und elektronenmikroskopischen Messungen zeigten eine selektive Anreicherung größerer Vesikel überwiegend in dem Größengate 0,5-1 µm. Die Konzentration der hsEV in der gesunden Probandengruppe war $0,68 \times 10^5 \pm 1,03 \times 10^5$. In der Patientengruppe zeigte sich eine enorme inter-individuelle

Variabilität, sodass ein statistisch signifikanter Unterschied zu der Probandengruppe nicht feststellbar war ($1,73 \times 10^5 \pm 3,33 \times 10^5$).

Die Aktivität des hsEV-assoziierten TF war in der Patientengruppe sehr variabel aber insgesamt signifikant höher ($1,41 \pm 0,75$ pg/ml) als in der Gruppe gesunder Probanden ($1,01 \pm 0,22$ pg/ml) ($p < 0,01$).

Plasma-hsEV der Krebspatienten löste eine signifikant stärkere ERK-Phosphorylierung aus verglichen mit den hsEV der gesunden Probanden ($p < 0,0001$).

Nach Normierung der TF-Aktivität und der ERK-Phosphorylierung auf 10^6 hsEV zeigte sich eine lineare Korrelation zwischen den beiden Parametern mit einem Korrelationskoeffizienten von $> 0,8$ für die hsEV sowohl der gesunden Probanden als auch in der Krebspatientengruppe.

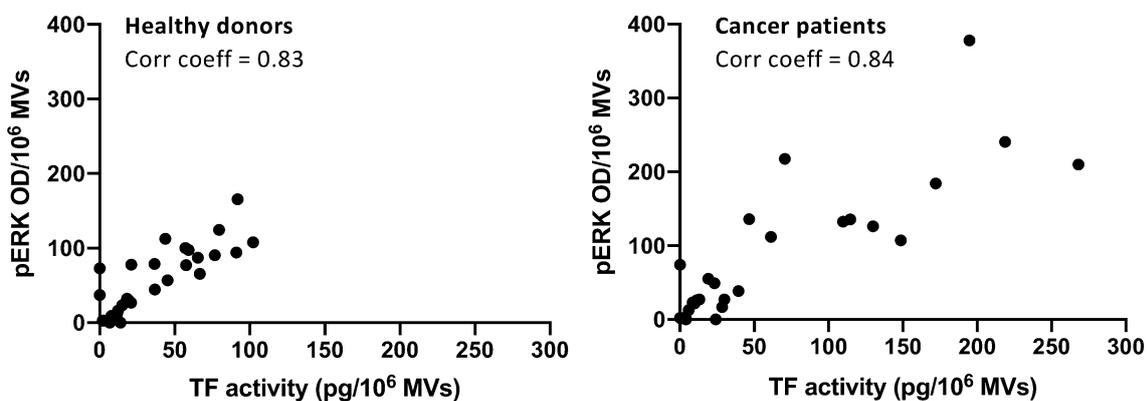


Abbildung 7 Korrelation zwischen TF und ERK-Phosphorylierung von EV von gesunden Probanden (links) und Krebspatienten (rechts)

Diskussion

Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass eine reine Quantifizierung der hsEV unzureichend ist, um Unterschiede zwischen einer Gruppe gesunder Probanden und kranker Patienten zu finden. Vielmehr sollte eine Quantifizierung durch eine im klinischen Setting durchführbare TF-Aktivitätsbestimmung der angereicherten Vesikel ergänzt werden. Die lineare Korrelation der normierten TF-Aktivität und der ERK-Phosphorylierung legt eine entscheidende Rolle des Gewebethromboplastins nahe. Nicht nur hinsichtlich der prokoagulatorischen Effekte der hsEV, welche in vivo mitverantwortlich für thromboembolische Komplikationen im fortgeschrittenen Tumorstadium sein könnten, sondern auch für die zellulären Effekte der hsEV scheint TF eine entscheidende Komponente zu sein. Eine klare Trennung der beiden Gruppen war anhand der Messwerte nicht möglich, insbesondere fiel die hohe

interindividuelle Variabilität in der Patientengruppe auf. Es wäre jedoch denkbar, dass ein Monitoring der hsEV-assoziierten TF-Aktivität im Laufe einer malignen Erkrankung hilfreich sein könnte, um ein erhöhtes Risiko für thromboembolische Ereignisse frühzeitig zu erkennen und entsprechend präventive Maßnahmen, z.B. durch den Einsatz niedermolekularer Heparine zu ergreifen.

Publikation 4

Biologically Active Tissue Factor-Bearing Larger Ectosome-Like Extracellular Vesicles in Malignant Effusions from Ovarian Cancer Patients: Correlation with Incidence of Thrombosis

Corinna Steidel, Fanny Ender, Achim Rody, Nikolas von Bubnoff, Frank Gieseler
International Journal of Molecular Sciences 2021: 22,790

Fragestellung

Könnte die Analyse der Aszites-hsEV zur Risikostratifizierung der Eierstockkrebs-Patientinnen hinsichtlich thromboembolischer Ereignisse hilfreich sein?

Methoden

Aszitesproben von 20 Patientinnen mit fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen (*high grade* seröses Karzinom) wurden zwischen 2013 und 2017 in Kooperation mit der Klinik für Gynäkologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Lübeck gesammelt. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck genehmigt (AZ 13-206) und alle Patientinnen gaben nach vorheriger Aufklärung ihr Einverständnis zur Untersuchung des Probenmaterials, der Nachverfolgung anhand der medizinischen Akte und einer anonymisierten Veröffentlichung der Daten. Das mittlere Alter der Studienteilnehmerinnen war 69 ± 9 Jahre. Die Aszitesproben wurden im Rahmen von therapeutischen Punktionen oder während der OP bei Erstdiagnose gesammelt. Die Patientenakte wurde für zwei Jahre nach Probenentnahme hinsichtlich des Auftretens thromboembolischer Ereignisse nachverfolgt. Die extrazellulären Vesikel der Aszitesproben wurden entsprechend des im allgemeinen Methodenteils beschriebenen sequentiellen Zentrifugationsprotokolls angereichert, für die Studie wurde die hsEV-Fraktion verwendet.

Die hsEV wurden mittels hochauflösender Durchflusszytometrie im Novocyte (ACEA Biosciences Inc., San Diego, CA, USA) quantifiziert. Die Oberflächenstruktur wurde mithilfe von Antikörperfärbungen gegen Tetraspanine analysiert. Die Größe der angereicherten Vesikel wurde mittels Nanoparticle-Tracking-Analyse überprüft. Die prokoagulatorische Eigenschaft der Vesikel wurde anhand der TF-Aktivität bestimmt. Des Weiteren untersuchten wir die Effekte der hsEV auf die ERK-Phosphorylierung und Tumorzellmigration im Oris-Testsystem auf die Testzelllinie, wie im allgemeinen Methodenteil beschrieben.

Ergebnisse

Die Auswertung der Patientenakten ergab, dass 35 % (7 von 20) der Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom innerhalb der Nachbeobachtungszeit ein thromboembolisches Ereignis erlitten, was eine ungewöhnlich hohe Rate darstellte. Aus allen Aszitesproben konnte durch die sequentielle Zentrifugation intakte extrazelluläre Vesikel im determinierten Größenbereich angereichert werden, die interindividuelle Variabilität war dabei sehr hoch (min $3,8 \times 10^5$, max. $4,9 \times 10^7$, Median 6×10^6 CFSE⁺ events/ml). Zusätzlich wurde die Größenverteilung der Vesikel mittels Nanoparticle-Tracking-Analyse überprüft und es bestätigte eine selektive Anreicherung größerer Vesikel zwischen 100 – 500 nm. Die untersuchten Tetraspanine zum Nachweis der spezifischen Doppellipidmembran waren in unterschiedlichen Konzentrationen auf den angereicherten hsEV nachweisbar (CD 9⁺ 0,53 - 27,09 %; CD63⁺ 1,00 - 12,50 %; CD81⁺ 4,18 - 26,25 %) und somit nicht auf allen Vesikeln sondern auf einer Subpopulation vorhanden. Die TF-Aktivität der angereicherten Vesikel war hoch und sehr heterogen (Median 80 pg/ml, Minimum 0 pg/ml, Maximum 509 pg/ml).

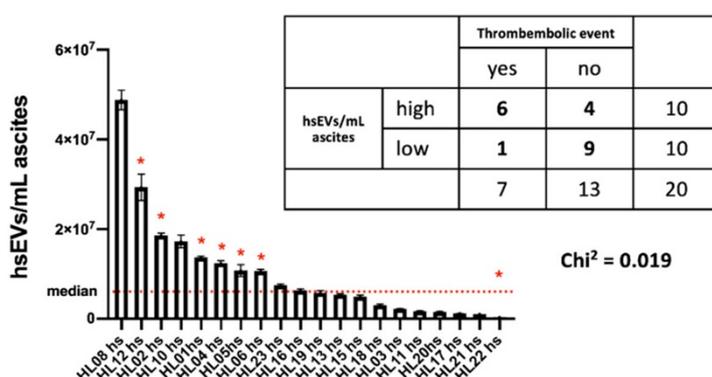


Abbildung 8 Korrelation von erhöhten extrazellulären Vesikeln mit Thromboembolien (n=20)

Interessanterweise fanden wir bei der Korrelation der Daten eine signifikante Assoziation der Thromboserate mit der gemessenen hsEV-Menge. 6 von 7 thromboembolischen Ereignisse traten bei Patientinnen auf, die erhöhte hsEV-Werte oberhalb des Medians von $6 \times 10^6/\text{ml}$ hatten (Abbildung 8)

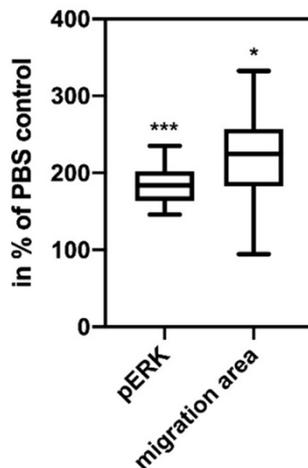


Abbildung 9 EV-induzierte ERK-Phosphorylierung (links) und Tumorzellmigration (rechts) (n=20)

Die aus den Aszitesproben angereicherten hsEV induzierten eine signifikant erhöhte ERK-Phosphorylierung von bis zu 184 % in unserer Testzelllinie im Vergleich zur basalen Phosphorylierungsrate der Negativkontrolle (Abbildung 9). Auch die Migrationsaktivität der Testzelllinie wurde durch die Inkubation mit den hsEV signifikant erhöht (Abbildung 9).

Diskussion

Die Studie konnte eine große Menge stark prokoagulatorisch aktiver Vesikel in dem untersuchten Patientenmaterial nachweisen. Interessanterweise konnte trotz der geringen Fallzahl eine statistisch signifikante Assoziation zwischen der Menge an hsEV aus den Proben und der klinischen Rate an thromboembolischen Ereignissen, welche einen negativen Prognosefaktor für die Patientinnen darstellen, festgestellt werden. Da thromboembolische Ereignisse eine häufige Todesursache in diesem Patientenkollektiv darstellen, könnte eine Analyse der hsEV-Menge im Aszites zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nach diesen Daten ein sinnvolles Hilfskriterium zur Entscheidung über eine prophylaktische Antikoagulation der Patientinnen darstellen. Um die Beobachtung aus dieser Studie weiter zu validieren, braucht es sicherlich zuvor jedoch eine Studie mit einem deutlich größeren Patientenkollektiv, um die Hypothese zu überprüfen. Abgesehen von der prokoagulatorischen Aktivität der Vesikel konnten wir zudem *in vitro* eine Induktion von ERK-Phosphorylierung und

Tumorzellmigration nachweisen, welche potenziell die schlechtere Prognose der Patientinnen in vivo beeinflussen könnte.

Diskussion

Vesikel-TF-Thrombose-Prognose

1856 beschrieb Rudolf Virchow die Assoziation von Thrombembolien und Tumorerkrankungen (20). Thromboembolische Komplikationen sind weiterhin ein großes Problem in der Tumorthherapie und ein schlechter Prognoseparameter (21).

PS- und TF-tragende EV scheinen sowohl einen Einfluss auf die Aktivierung des Gerinnungssystems als auch auf die Tumoraktivität zu haben (8). Die Ergebnisse scheinen die Hypothese, dass TF⁺ EV eine wichtige Rolle bei der Progression von malignen Erkrankungen spielen könnten, zu unterstützen. Allerdings handelt es sich bei den vorgestellten Publikationen lediglich um in vitro Versuche und die Patientenkollektive in den Studien waren insgesamt sehr klein. Aus den Ergebnissen lassen sich keine allgemeinen Schlussfolgerungen ableiten, doch sie dienen als „proof of principle“ Analysen, um darauf größere Studien aufzubauen. Interessant wäre z.B. die Veränderung der Vesikelkomposition im zeitlichen Verlauf bei Patienten/-innen mit malignen Erkrankungen zu untersuchen, um zu sehen, ob thromboembolische Ereignisse oder Tumorprogression sich vorzeitig durch eine Veränderung der EV ankündigen.

Anpassung der Vesikel-Nomenklatur

Bei der Studie meiner Publikationen fällt auf, dass sich die Nomenklatur in den letzten Jahren geändert hat, obwohl die Methodik, mit der die Vesikel gewonnen wurden und werden, sich nur wenig unterscheidet. Der initial gebräuchliche pauschale Begriff "Exosomen" oder "Mikropartikel" gilt mittlerweile als zu ungenau, da damit nicht den unterschiedlichen Sub-Populationen Rechnung getragen wird. Mit der Zunahme an wissenschaftlichen Publikationen zu diesem Thema wurde die Vielfältigkeit der Vesikel immer deutlicher und damit wuchs auch die Notwendigkeit einer schärferen Trennung der Begrifflichkeiten. 2018 veröffentlichte die „*International Society for Extracellular Vesicles*“ (ISEV) ein Positionspapier, in dem die Minimalanforderung für Vesikelstudien festgesetzt wurden, verbunden mit dem Hinweis, dass eine komplette Trennung von Exosomen und Ektosomen aufgrund der überlappenden

Größenbereiche und fehlenden universellen Oberflächenmarkern methodisch zurzeit noch nicht möglich ist (19).

Für die hier vorgelegte Arbeit war die Namensgebung lediglich hinsichtlich der Nomenklatur wichtig; ich hatte nie den Anspruch ausschließlich Ektosomen zu untersuchen, sondern es ging um die Frage, ob die Beschaffenheit der Vesikel Einfluss auf das komplexe Zusammenspiel von Malignomen, dem Entzündungssystem und der Gerinnungskaskade haben können. In vivo wird es sich ebenfalls stets um ein Gemisch verschiedener Vesikelpopulationen handeln, sodass eine Trennung lediglich akademisch wäre.

2018 schlug die ISEV eine Nomenklatur vor, die die physikalischen Charakteristika, die biochemische Zusammensetzung und den zellulären Ursprung miteinschließt. Alternativ kann nach den entsprechenden Zentrifugationsschritten - z.B. "low-speed EV" (lsEV) oder "high-speed EV" (hsEV), oder anhand der gefundenen Oberflächenmarker (19) unterschieden werden. Diese geänderte Nomenklatur lässt sich auch anhand der vorgelegten Publikationen nachverfolgen, dort wurden die Vesikel zuletzt als „tissue-factor bearing larger ectosome-like extracellular vesicles“ bezeichnet - zugegeben ein etwas sperriger Begriff, der die Eigenschaften der Vesikel beschreibt, damit aber die Diskussion, ob es sich um Exosomen oder Ektosomen handelt, umgeht.

Anhang

Literaturverzeichnis

1. **Kalra, H., Drummen, G.P.C. and Mathivanan, S.** Focus on extracellular vesicles: introducing the next small big thing. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016, 17:170.
2. **Colombo, M., Raposo, G. and Thery, C.** Biogenesis, secretion and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014, 30:255-289.
3. **Rak, J.** Microparticles in cancer. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2010, 36:888-906.
4. **Colombo, M., Raposo, G. and Thery, C.** Biogenesis, secretion and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014, 30:255-289.
5. **Tesselaar, M., et al.** Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost*. 2007, 5(3):520-527.
6. **Geddings, J.E and Mackman, N.** Tumor-derived tissue-factor positive microparticles and venous thrombosis in cancer patients. *Blood*. 2013, Vols. 122(11):1873-1880.

7. **Thaler, J., Ay, C. and Pabinger, I.** Clinical significance of circulating microparticles for venous thrombo-embolism in cancer patients. *Hämostaseologie*. 2012, Vols. 32(02):127-131.
8. **Graf, C. and Ruf, F.** Tissue factor as a mediator of coagulation and signaling in cancer and chronic inflammation. *Thromb Res*. 2018, 164, S143-S147.
9. **Robbins, P.D. and Morelli, A.E.** Regulation of immune response by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol*. 2014, 14(3):195 .
10. **Lacroix, R., et al.** Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: Results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2013.
11. **Muralidharan-Chari, V., et al.** ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Journal of Cellular Sciences*. 2009, pp. 10,1875-1885.
12. **Ender, F., et al.** Detection and Quantification of Extracellular Vesicles via FACS: Membrane Labeling Matters! *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, pp. 21,291.
13. **Arraud, N., et al.** A simple flow cytometry method improves the detection of phosphatidylserine-exposing extracellular vesicles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2015, pp. 13,237-247.
14. **Poncelet, P., et al.** Standardized counting of circulating platelet microparticles using currently available flow cytometers and scatter based triggering: forward of side scatter? *Cytometry Part A, Journal of the International Society for Advancement of Cytometry*. 2016, pp. 148-158.
15. **Morgan, R., et al.** Human cell line (COLO357) of metastatic pancreatic adenocarcinoma. *International Journal of Cancer*. 1980, 25(5): 591-598.
16. **Meitner, P.A., et al.** Colo357, a human pancreatic adenosquamous carcinoma: growth in artificial capillary culture and in nude mice. *Cancer Research*. 43(12 Part 1): 5978-5985.
17. **Théry, C., et al.** Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids . *Current Protocols Cell Biol*. 2006, 30(1):3-22.
18. **Mandel, K., et al.** Characterization of spontaneous and TGF-beta induced cell motility of primary human normal and neoplastic mammary cells in vitro using novel real time technology. *PLoS ONE*. 2013, 8: e56591.
19. **Théry, C., et al.** Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV 2018): A position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2018, 7, 1535750.
20. **Virchow, R.** Weitere Untersuchungen über die Verstopfung der Lungenarterie und ihre Folgen. *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medizin*. Frankfurt am Main : Meidinger Sohn, 1856.
21. **Abdulla, A., et al.** Case Fatality Rate of Recurrent Venous Thromboembolism and Major Bleeding Events Among Patients Treated for Cancer-Associated Venous Thromboembolism: A Systematic Review. *Blood*. 2018, 132, 2528.

Danksagung

Ich möchte als erstes meinem Doktorvater Prof. Gieseler danken für die tolle und lehrreiche Zeit, die ich im Rahmen meiner Arbeit in der Arbeitsgruppe erleben durfte. Danke für die Unterstützung bei der Auswertung und im Verlauf auch Planung der Experimente und Projekte. Ich möchte mich für das Vertrauen bedanken, dass du mir entgegengebracht hast, als ich quasi die Leitung der experimentellen Laborarbeit übernommen habe. Danke für die unglaublichen Erfahrungen, die ich im Rahmen der nationalen und internationalen Kongresse erleben durfte, unvergessen werden natürlich immer die kanadischen Wildgänse in Toronto bleiben.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an Monica Vollmert für die Einarbeitung und technische Unterstützung bei der Durchführung der Experimente. Sowohl im Labor als auch abseits davon bei Handballspielen, Sushi-Abenden etc. hatte ich eine tolle Zeit. Danke Sylvia Grammerstorf für die technische Unterstützung und für den Frohsinn, den du stets ins Labor gebracht hast.

Danke Maren Hicken für die Unterstützung bei der Durchführung der Migrations-Experimente und der Zellkultur.

Ein großer Dank geht auch an die Klinik für Gynäkologie und dem Klinikdirektor Prof. Rody, der das Projekt stets unterstützt hat.

Ein weiterer Dank gilt der AG von Prof. Klinger im Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck, die die elektronenmikroskopischen Untersuchungen für uns durchführten. Ebenso möchte ich mich bei der AG Riemekasten für die gute und erfolgreiche Kooperation bedanken, aus der hervorragende Publikationen entstanden sind.

Last but not least möchte ich meiner Familie danken, meinen Eltern, die mich stets unterstützt haben und die beharrlich mich dazu angehalten haben, immer neugierig zu bleiben und nicht den Mut zu verlieren. Danke auch an meinen Ehemann Timo, der mir zur Vollendung dieser Dissertation den Rücken frei gehalten hat.

Publikationen mit meiner Beteiligung

Peer-reviewed Artikel

1. Gamperl H, Plattfaut C, Freund A, Quecke T, Theophil F, Gieseler F: Extracellular vesicles from malignant effusions induce tumor cell migration: inhibitory effect of LMWH tinzaparin. *Cell Biol Int* 40 (2016) 1050– 1061
2. Cabral-Marques O, Marques A, Gill LM, De Vito R, Rademacher J, Günther J, Lange T, Humrich JY, Klapa S, Schinke S, Schimke LF, Marschner G, Pitann S, Adler S, Dechend R, Müller DN, Braicu I, Sehouli J, Schulze-Forster K, Trippel T, Scheibenbogen C, Staff A, Mertens PR, Löbel M, Mastroianni J, Plattfaut C, Gieseler F, Dragun D, Engelhardt BE, Fernandez-Cabezudo MJ, Ochs HD, al-Ramadi BK, Lamprecht P, Mueller A, Heidecke H & Riemekasten G: GPCR-specific autoantibody signatures are associated with physiological and pathological immune homeostasis. *Nature communications*, 9(1), (2018) 1-14.
3. Gieseler F, Plattfaut C, Quecke T, Freund A, Ungefroren H & Ender F: Heterogeneity of microvesicles from cancer cell lines under inflammatory stimulation with TNF- α . *Cell biology international*, 42(11), (2018) 1533-1544
4. Kappes L, Amer RL, Sommerlatte S, Bashir G, Plattfaut C, Gieseler F, Gemoll T, Busch H, Altahrawi A, Al-Sbiei A, Haneefa SM, Arafat K, Schimke LF, El Khawanky N, Schulze-Forster K, Heidecke H, Kerstein-Staehle A, Marschner G, Pitann S, Ochs HD, Mueller A, Attoub S, Fernandez-Cabezudo MJ, Riemekasten G, al-Ramadi BK & Cabral-Marques O: Ambrisentan, an endothelin receptor type A-selective antagonist, inhibits cancer cell migration, invasion, and metastasis. *Sci Rep* 10, (2020) 15931
5. Ender F, Freund A, Quecke T, Steidel C, Zamzow P, von Bubnoff N & Gieseler F: Tissue factor activity on microvesicles from cancer patients. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 146(2) (2020), 467-475.
6. Steidel C, Ender F, Rody A, von Bubnoff N & Gieseler F: Biologically Active Tissue Factor-Bearing Larger Ectosome-Like Extracellular Vesicles in Malignant Effusions from Ovarian Cancer Patients: Correlation with Incidence of Thrombosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), (2021) 790.

Poster

7. Gieseler F, Plattfaut C, Gamperl H, Quecke T, Winkelmann P, Rody A, Ungefroren H: Cellular microparticles captured from malignant effusions show concomitant tissue factor and factor X activity. Kongress der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung, 12.-15. Februar 2014, Wien, Österreich
8. Plattfaut C, Quecke T, Gamperl H, Rody H, Gieseler F: FXa-associated PAR-activation by cellular microparticles derived from cancer patients. Bayer TRGSF Rivaroxaban Science Forum, 6.-8. November 2014, Berlin, Deutschland
9. Plattfaut C, Gamperl H, Quecke T, Schwenke M, Gieseler F: Inhibition of microparticle-induced PAR-activation by Rivaroxaban. Deutscher Krebskongress, 24.-27. Februar 2016, Berlin, Deutschland

10. Freund A, Hicken M, Plattfaut C, Quecke T, Haas C, Gieseler F. Catch me if you can! – Herausforderungen bei der Isolation und Charakterisierung Extrazellulärer Vesikel. Uni im Dialog 2016, 08. Juni 2016, Lübeck, Deutschland
11. Freund A, Plattfaut C, Quecke T, Riemekasten G, Haas C, Gieseler F. Extracellular vesicles in plasma and urine of patients and healthy donors: loss of TFPI and increased tenase activity after kidney passage. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, 14. – 18. Oktober 2016, Leipzig, Deutschland
12. Plattfaut C, Freund A, Sass I, Gieseler F. Characterization of Extracellular Vesicles from different tumor cell lines. International Society for Extracellular Vesicles, 17. – 21. Mai 2017, Toronto, Canada

Vorträge

13. Plattfaut C: Strukturelle und funktionelle Unterschiede zellulärer Mikropartikel in Aszitesproben von Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Therapeutische Implikationen? Kongress der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, 9.-13. Oktober 2015, Basel, Schweiz
14. Plattfaut C: Catching microparticles – a methodical comparison. Kongress der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung, 15.-18. Februar 2017, Basel, Schweiz