

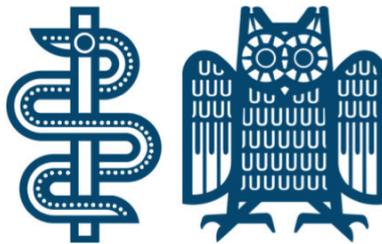
DIE BEDEUTUNG EXOSOMALER MIRNAS FÜR DAS MUSKELINVASIVE HARNBLASENKARZINOM

*Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)*

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2017



vorgelegt von Master of Science Sophie Cathleen Baumgart
geboren am 08.11.1988 in Jena

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlicher Mitteilungen und der angegebenen Quellen angefertigt habe. Alle eingesetzten Methoden wurden selbstständig etabliert. Alle weiteren Experimente und sämtliche Auswertungen wurden persönlich und selbstständig durchgeführt.

Die Arbeit wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Homburg, den 03.08.2017

Sophie Baumgart

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary.....	4
3	Einleitung	7
3.1	Das Harnblasenkarzinom	7
3.1.1	Molekulare Pathogenese des Harnblasenkarzinoms.....	9
3.2	MiRNAs.....	11
3.2.1	Biogenese und Funktion	11
3.2.2	miRNAs in Karzinomen	13
3.3	Tumormikroumgebung	14
3.4	Extrazelluläre Vesikel.....	16
3.4.1	Die Biogenese extrazellulärer Vesikel.....	17
3.4.2	Molekulare Zusammensetzung von Exosomen	19
3.4.3	Funktionelle Bedeutung von Exosomen.....	20
4	Zielstellung	26
5	Material und Methoden	28
5.1	Material	28
5.1.1	Patientenkohorte	28
5.1.2	Verwendete Zelllinien	29
5.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	30
5.1.4	Kits.....	30
5.1.5	Chemikalien.....	31
5.1.6	Antikörper, Enzyme, Medium und Primer	32
5.1.7	Allgemeine Puffer und Lösungen.....	33
5.1.8	Geräte.....	34
5.1.9	Datenbank und Computersoftware	34
5.2	Allgemeine Zellkulturmethoden	35
5.2.1	Subkultivierung von Zellen	35
5.2.2	Kryokonservierung	35
5.2.3	Auftauen von Zellen	35
5.2.4	Zellzählung	35
5.2.5	Zellvitalitätstest	36
5.2.6	Invasionsassay	37

5.3	Isolation von Exosomen.....	38
5.3.1	Herstellung von Exosomen-freien Medium	38
5.3.2	Isolation von Exosomen aus Zellkulturüberständen.....	38
5.3.3	Isolation von Exosomen aus Urinen von Harnblasenkarzinompatienten.....	39
5.4	Charakterisierung von Exosomen.....	40
5.4.1	Proteinbiochemische Analysen von UBC-Zellen und ihren sezernierten Exosomen	40
5.4.2	Nanopartikel-Tracking Analyse.....	41
5.4.3	Elektronenmikroskopie.....	42
5.5	miRNA-Expressionsanalysen	43
5.5.1	Gesamt-RNA Isolation aus Zellen und Exosomen.....	43
5.5.2	Gesamt-RNA Isolation aus Patienten-abgeleiteten Proben	43
5.5.3	MiRNA Microarray-Analyse.....	44
5.5.4	Validierung der miRNA-Expression mit qPCR	46
5.6	Interzellulärer Transport tumor-assoziiertes Exosomen auf Fibroblasten	49
5.6.1	Aufnahme fluoreszenzmarkierter tumor-assoziiertes Exosomen	49
5.6.2	Exosomaler miRNA-Transfer zwischen Harnblasenkarzinomzellen und Fibroblasten	50
5.7	Analysen des funktionellen Einflusses tumor-assoziiertes Exosomen auf normale Harnblasenfibroblasten	54
5.7.1	Einfluss tumor-assoziiertes Exosomen auf die Proliferation normaler Fibroblasten	54
5.7.2	Einfluss tumor-assoziiertes Exosomen auf die Migration normaler Harnblasenfibroblasten.....	57
6	Ergebnisse.....	61
6.1	Invasionsassay der Harnblasenkarzinomzelllinien	61
6.2	Methodische Optimierung der Isolation von Exosomen aus Zellkulturüberständen	62
6.2.1	Vitalität von Harnblasenzellen bei Kultivierung mit Exosomen-freiem Medium.....	62
6.2.2	Charakterisierung von durch Harnblasenkarzinomzelllinien sezernierten Exosomen	63
6.3	MiRNA-Expressionsanalysen von Harnblasenkarzinomzelllinien und ihren Exosomen.....	66
6.3.1	Identifizierung und Validierung invasions-assoziiertes miRNAs in Harnblasenkarzinomzelllinien und ihren Exosomen.....	66

6.3.2	Vergleich der invasions-assoziierten miRNA-Expressionsmuster von Harnblasenkarzinomzelllinien und ihren Exosomen	71
6.4	Vergleich invasions-assoziiertes miRNAs zwischen Harnblasenkarzinomzelllinien und Tumorgewebeprobe	72
6.4.1	MiRNA-Expressionsanalysen in Gewebeprobe von MIBC- und NMIBC-Patienten	73
6.4.2	Vergleich invasions-assoziiertes miRNAs zwischen Zelllinien und Gewebeprobe	73
6.4.3	Validierung ausgewählter exosomaler miRNAs in Urinexosomen von Harnblasenkarzinompatienten	74
6.5	Interzellulärer Transfer tumor-assoziiertes Exosomen auf normale Fibroblasten	76
6.5.1	Nachweis der zeitabhängigen Internalisierung tumor-assoziiertes Exosomen in normale Fibroblasten	76
6.5.2	Exosomaler miRNA-Transfer zwischen Harnblasenkarzinomzelllinien und Fibroblasten	79
6.6	Funktionelle Analysen normaler Fibroblasten nach Stimulation mit tumor-assoziiertes Exosomen	82
6.6.1	Etablierung der Proliferationsversuche unter Verwendung der Fibroblastenzelllinie hTERT	82
6.6.2	Einfluss tumor-assoziiertes Exosomen auf die Proliferation normaler Harnblasenfibroblasten	84
6.6.3	Einfluss tumor-assoziiertes Exosomen auf die Migration normaler Harnblasenfibroblasten	88
7	Diskussion	94
7.1	Methodische Optimierung der Isolation von Exosomen aus Zellkulturüberständen	94
7.2	miRNA-Expressionsanalysen im Harnblasenkarzinom	100
7.2.1	miRNA-Expressionsanalysen in Harnblasenkarzinomzellen und ihren sezernierten Exosomen	100
7.2.2	Vergleich der miRNA-Expression mit Patienten-abgeleiteten Probe	104
7.2.3	Exosomale miRNAs als potentielle Biomarker	106
7.3	Interzellulärer Transport von tumor-assoziiertes Exosomen auf Fibroblasten	109
7.4	Funktionelle Bedeutung tumor-assoziiertes Exosomen in der Interaktion zwischen Harnblasenkarzinomzellen und normalen Harnblasenfibroblasten	112
7.4.1	Etablierung der Proliferationsversuche nach Stimulation von normalen Fibroblasten mit tumor-assoziiertes Exosomen	112
7.4.2	Einfluss tumor-assoziiertes Exosomen auf das Proliferationsverhalten normaler Harnblasenfibroblasten	114

7.4.3	Einfluss tumor-assoziiertes Exosomen auf das Migrationsverhalten normaler Harnblasenfibroblasten.....	116
7.5	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	122
8	Literaturverzeichnis.....	124
9	Abbildungsverzeichnis.....	152
10	Tabellenverzeichnis.....	155
11	Abkürzungsverzeichnis.....	158
12	Anhang.....	161
	Publikationsliste.....	192
	Danksagung.....	193

1 Zusammenfassung

Die Tumorentstehung und -progression wird maßgeblich durch die Interaktion von Tumorzellen und ihrer Tumormikroumgebung beeinflusst. Exosomen und die darin verpackten miRNAs spielen eine essentielle Rolle sowohl in der lokalen Interaktion zwischen Tumor und seiner Tumormikroumgebung als auch in der systemischen Interaktion der Tumorzellen mit späteren Metastasierungsorten. Durch die systemische Sezernierung können Exosomen als potenzielle diagnostische und prognostische Biomarker in Körperflüssigkeiten verwendet werden.

Muskelinvasive Harnblasentumore sind durch invasions-assoziierte miRNA-Signaturen gekennzeichnet, die potenziell als Biomarker in Primärtumorgewebe, aber auch als nicht invasive Biomarker durch die Analyse von Exosomen aus Körperflüssigkeiten eine Anwendung finden können. Inwieweit sich invasionsabhängige miRNA-Signaturen in tumor-assoziierten Exosomen des Harnblasenkarzinoms wiederfinden lassen, ist unklar. Daher war das erste Ziel dieser Arbeit die Identifizierung von invasions-assoziierten miRNA-Mustern in Harnblasenkarzinomzelllinien und ihren sezernierten Exosomen. Darüber hinaus sollte die funktionelle Bedeutung tumor-assoziiierter Exosomen in der Interaktion zwischen Harnblasenkarzinomen und ihrer Tumormikroumgebung analysiert werden.

Dafür wurden zunächst 5 Harnblasenkarzinomzelllinien basierend auf publizierten Daten sowie Ergebnissen eines Invasionsassays in die Gruppen invasive (T24; J82; 253J-BV) und nicht invasive (RT112; 5637) Harnblasenkarzinomzellen eingeteilt. Die Optimierung der Exosomen-Isolation erfolgte für die Standardmethode Ultrazentrifugation sowie die Kit-basierte Präzipitation. Mit Hilfe beider Isolationsvarianten konnten 30-150 nm große exosomale Vesikel isoliert werden, die die typische vesikuläre Struktur und hohe Mengen der exosomal Marker CD81 und Syntenin aufwiesen. Dabei konnten keine zellulären Kontaminationen detektiert werden.

Die miRNA-Expressionsanalyse von Harnblasenkarzinomzelllinien und ihren Exosomen wurde in Abhängigkeit von der Invasivität der parentalen Zellen mit Hilfe der Microarray Technologie durchgeführt. Invasive Harnblasenkarzinomzellen sind durch 37 signifikant differentiell exprimierte miRNAs charakterisiert, wovon fünf (miR-137-3p; -141-3p; -200a-3p; -205-5p; -99a-5p) mittels qPCR verifiziert werden konnten. Ihre sezernierten Exosomen weisen verglichen zu Exosomen sezernierten von nicht invasiven Harnblasenkarzinomzellen 15 signifikant deregulierte miRNAs auf. Davon konnten ebenfalls fünf miRNAs (miR-30a-3p; -137-3p; -141-3p; -205-5p; -99a-5p) mit Hilfe der qPCR bestätigt werden. Neun miRNAs

(miR-137-3p; -141-3p; -200a-3p; -200b-3p; -200c-3p; -205-5p; -224-5p; -429-3p; -99a-5p) sind in Abhängigkeit von der Invasivität signifikant zwischen den Ausgangszellen, aber auch in ihren sezernierten Exosomen dereguliert. Weiterhin konnte eine exosomenspezifische miRNA-Signatur von sechs miRNAs sowie eine zellspezifische Signatur von 28 miRNAs detektiert werden.

Es konnte erstmals gezeigt werden, dass invasive Harnblasentumore sowohl intrazellulär als auch exosomal durch spezifische miRNA-Signaturen gekennzeichnet sind. Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Patienten-abgeleitete Proben (Primärtumore; Urinexosomen) zu prüfen, wurde ein weiteres globales Screening der miRNA-Expression an Gewebeproben von Patienten mit nicht muskelinvasiven und muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen durchgeführt. Dabei konnten 63 miRNAs identifiziert werden, die signifikant in muskelinvasiven Harnblasentumoren im Vergleich zu nicht muskelinvasiven Harnblasentumoren dereguliert sind. Sechs von 63 miRNAs (miR-141-3p; -200a-3p; -200a-5p; -200b-3p; -205-5p; -429-3p) waren ebenfalls signifikant differentiell exprimiert in invasiven Harnblasenkarzinomzelllinien. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass sich das hier angewendete in vitro Modell für die Untersuchung invasions-assoziiertes miRNA-Muster und die dadurch ausgelösten Prozesse eignet.

Anschließend wurde die Eignung der exosomalen invasions-assoziierten miRNA-Signaturen als mögliche diagnostische Biomarker in „*liquid biopsies*“ unter Verwendung von Urinexosomen aus Patienten mit einem nicht muskelinvasiven und muskelinvasiven Harnblasentumor getestet. Die miRNA miR-200a-3p konnte als einzige mit einer tendenziellen Herunterregulation in Urinexosomen von Patienten mit einem muskelinvasiven Tumor verglichen zu Patienten mit einem nicht muskelinvasiven Tumor bestätigt werden. Alle anderen sieben miRNAs (miR-27b-3p; -30a-3p; -137-3p; -141-3p; -145-5p; -200a-3p; -205-5p; -99a-5p) zeigten keine differentielle Expression. In Zukunft sollte die Identifizierung spezifischer exosomaler miRNAs direkt an Urinproben erfolgen, da in Körperflüssigkeiten neben tumor-assoziierten auch Exosomen aus anderen Zellen existieren und somit eine direkte Übertragung des in vitro Modells auf Patienten-abgeleitete Proben nicht möglich ist.

Im weiteren wurde der funktionelle Einfluss tumor-assoziiertes Exosomen auf normale Harnblasenfibroblasten als Bestandteil der Tumormikroumgebung untersucht.

Zunächst wurde mittels Fluoreszenzmarkierung die zeitabhängige Aufnahme von durch eine invasive (T24) sowie eine nicht invasive (RT112) Harnblasenkarzinomzelllinie sezernierten Exosomen in normale hTERT-immortalisierte Vorhautfibroblasten demonstriert. Exosomen

wurden unabhängig von der Invasivität der Ausgangszellen schnell und effektiv innerhalb von 6 h internalisiert und waren nach 48 h verarbeitet. Weiterhin konnte erstmalig für das Harnblasenkarzinom gezeigt werden, dass Harnblasenkarzinomzellen eine nicht humane miRNA (cel-miR-39-3p) über Exosomen auf andere Zellen (normale hTERT-immortalisierte Vorhautfibroblasten; tumor-assoziierte Fibroblasten) übertragen können. Dabei konnte unabhängig von der Invasivität der parentalen Harnblasenkarzinomzellen eine Korrelation zwischen miRNA-Expression und der eingesetzten Exosomen-Menge belegt werden.

Das letzte Ziel dieser Arbeit lag in der Analyse des funktionellen Einflusses tumor-assoziiierter Exosomen auf tumorfördernde Prozesse (Proliferation; Migration) in normalen Harnblasenfibroblasten. Nach erfolgreicher Etablierung der Proliferationsmessung unter Verwendung von hTERT-immortalisierten Vorhautfibroblasten wurde das Proliferations- und Migrationsverhalten nach Stimulation mit tumor-assoziierten Exosomen untersucht. Von normalen Harnblasenzellen sezernierte Exosomen induzierten eine signifikante Erhöhung der Proliferation von Harnblasenfibroblasten verglichen zu unbehandelten Zellen, zeigten jedoch keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten der Zielzellen. Die Proliferation und Migration von Harnblasenfibroblasten wurde unabhängig von der Invasivität der parentalen Zellen, aber zellspezifisch verglichen zu normalen Exosomen beeinflusst. In der Regel kam es zur Verstärkung beider Prozesse, wobei vor allem Exosomen der Zelllinie RT112 zu diesen Effekten führten. Der zellspezifische Einfluss war dabei unabhängig von der Stimulationszeit und für die Proliferation auch unabhängig von der eingesetzten Exosomen-Konzentration.

Von Harnblasenkarzinomzellen sezernierte Exosomen beeinflussen tumorfördernde Prozesse in Zellen ihrer Tumormikroumgebung, wodurch die Tumorprogression und Metastasierung begünstigt werden kann. Welche Mechanismen und Moleküle dafür verantwortlich sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit müssen weiterführende Analysen die Rolle der exosomalen Bestandteile in der Interaktion zwischen dem Harnblasenkarzinom und Fibroblasten analysieren.

Das dadurch gewonnene Wissen über die intrazellulären und extrazellulären Signalwege des Harnblasenkarzinoms kann zu einem besseren Verständnis der Entwicklung, Progression und Metastasierung des Harnblasenkarzinoms beitragen, welches zu einer individuellen Prognosebewertung und Therapiewahl sowie zur Entwicklung von zielgerichteten Medikamenten führen kann.

2 Summary

Tumor development and progression is influenced by the interaction of tumor cells and their tumor microenvironment. Exosomes and miRNAs packaged in exosomes play an important role in both, the local interaction of the tumor cells and the tumor microenvironment and the systemic interaction at the site of metastasis. Due to the systemic secretion exosomes, they can also be used as potential diagnostic and prognostic biomarkers in body fluids.

Muscle-invasive bladder cancer is characterized by invasion-associated miRNA signatures, which can be potentially used as biomarkers in primary tumors, but also as non-invasive biomarkers by analyzing exosomes from body fluids. However, it is not clear, to what extent the invasion-dependent miRNA signature is present in secreted exosomes. Therefore, the first aim of this study was the identification of invasion-associated miRNA signatures in urinary bladder cancer cell lines and their secreted exosomes. In addition to this, the functional relevance of tumor-associated exosomes for the interaction of urinary bladder cancer cells with fibroblasts as a part of tumor microenvironment should be analyzed.

Based on publications as well as invasion assays 5 urinary bladder cancer cell lines were initially classified into invasive (T24; J82; 253J-BV) and non-invasive (RT112; 5637) urinary bladder cancer cells. Afterwards, the exosome isolation was optimized for the standard method ultracentrifugation and for a kit-based precipitation. Using the two methods it was possible to isolate exosomal vesicles with a size distribution of 30-150 nm, typical vesicular morphology and high amounts of exosomal markers CD81 and syntenin. No cellular contamination was detected.

The analysis of miRNA expression was performed on urinary bladder cancer cells and their exosomes depending on the invasiveness of parental cells by using the microarray technology. Invasive urinary bladder cancer cells are characterized by 37 significantly differentially expressed miRNAs. Five miRNAs (miR-137-3p; -141-3p; -200a-3p; -205-5p; -99a-5p) could be verified by qPCR. Their secreted exosomes exhibit 15 significantly deregulated miRNAs compared to exosomes secreted by non-invasive urinary bladder cancer cells. Five miRNAs (miR-30a-3p; -137-3p; -141-3p; -205-5p; -99a-5p) were confirmed by qPCR. Nine miRNAs (miR-137-3p; -141-3p; -200a-3p; -200b-3p; -200c-3p; -205-5p; -224-5p; -429-3p; -99a-5p) are significantly deregulated both in urinary bladder cancer cells and their secreted exosomes depending on the invasiveness. Furthermore, an exosome-specific miRNA signature of 6 miRNAs and a cell-specific signature of 28 miRNAs were detected.

For the first time, we could demonstrate that invasive urinary bladder cancer cells are characterized by specific intracellular and exosomal miRNA signatures. In order to prove the transferability of these results to patient-derived samples a global screening of miRNA expression was performed on tissue samples obtained from patients with non muscle-invasive and muscle-invasive bladder cancer. Thereby, 63 miRNAs were identified, which are significantly deregulated in muscle-invasive bladder cancer. Six out of these 63 miRNAs (miR-141-3p; -200a-3p; -200a-5p; -200b-3p; -205-5p; -429-3p) were also significantly differentially expressed in the invasive urinary bladder cancer cell lines. So it can be concluded that the used in vitro model is suitable for the analysis of invasion-associated miRNA patterns and the processes triggered by them.

Subsequently, the suitability of the exosomal invasion-associated miRNA signature as possible diagnostic biomarker in *liquid biopsies* was examined by using urine exosomes from patients with non muscle-invasive and muscle-invasive bladder cancer. Only miRNA miR-200b-3p could be confirmed with a tendency of down-regulation in urine exosomes of muscle-invasive bladder cancer patients compared to non muscle-invasive bladder cancer patients. The other 7 miRNAs did not show any differential expression. In the future, the identification of specific exosomal miRNAs should be carried out directly by using urine samples, because body fluids also contain - additionally to tumor-associated exosomes - exosomes secreted by other cell types and therefore, the direct transferability of in vitro models to patient-derived samples is not possible.

Furthermore, the functional influence of tumor-associated exosomes on normal bladder fibroblasts as part of the tumor microenvironment was investigated.

First, the time-dependent uptake of exosomes from invasive (T24) and non-invasive (RT112) urinary bladder cancer cells into normal hTERT-immortalized foreskin fibroblasts was demonstrated by fluorescence labeling. Exosomes were rapidly and effectively internalized within 6 h, which was independent from the invasiveness of parental urinary bladder cancer cells. The exosomes were processed within 48 h. Furthermore, for the first time it could be demonstrated that urinary bladder cancer cells were able to transport miRNAs (cel-miR-39-3p) via exosomes to other cells (normal hTERT-immortalized foreskin fibroblasts; tumor-associated fibroblasts). A correlation between miRNA expression and the used amount of exosomes could be proved independently of the invasiveness of parental urinary bladder cancer cells.

The last aim of this thesis was the analysis of the functional influence of tumor-associated exosomes on tumor-promoting processes (proliferation; migration) in normal bladder fibroblasts. After successful establishment of proliferation assay using normal hTERT-immortalized foreskin fibroblasts, the ability of proliferation and migration after stimulation with tumor-associated exosomes was analyzed. Exosomes secreted by normal bladder cells induced a significant increase of proliferation of bladder fibroblasts compared to unstimulated cells, but did not affect the migration ability of recipient cells. The proliferation and migration of bladder fibroblasts was affected independently from the invasiveness of parental cells, but in a cell-specific manner compared to normal exosomes. Generally, both processes were stimulated whereby mainly exosomes of the cell line RT112 lead to these effects. The cell-specific influence was independent from the time of stimulation and for proliferation also independent from the used amount of exosomes.

Exosomes secreted by urinary bladder cancer cells affect tumor-promoting processes in tumor microenvironment cells whereby the tumor progression and metastasis can be facilitated. The underlying mechanisms and molecules of this were not investigated in this thesis. Based on the results of this thesis, further analyses will have to study the role of exosomal components in the interaction of bladder cancer and fibroblasts. The resulting knowledge about the intracellular and extracellular signaling pathways of the urinary bladder cancer could lead to a better understanding of the tumorigenesis, progression and metastasis of urinary bladder cancer resulting in an individual assessment of prognosis and therapy options as well as in the development of new targeted drugs.

3 Einleitung

3.1 Das Harnblasenkarzinom

Jährlich erkranken weltweit ca. 430.000 Menschen am Harnblasenkarzinom, es stellt damit die neunthäufigste maligne Tumorerkrankung dar [1]. Allein in Deutschland wurde nach Angaben des Robert-Koch-Institutes im Jahr 2012 bei 28.910 Menschen ein Harnblasenkarzinom diagnostiziert, wovon ca. 75 % Männer waren. Männer haben damit ein ca. 3-fach höheres Erkrankungsrisiko als Frauen. Bei den Männern ist das Harnblasenkarzinom mit 4,5 % der vierthäufigste maligne Tumor in Deutschland, wohingegen es bei Frauen mit nur 1,8 % an 14. Stelle steht. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 74 Jahren [2].

Der wichtigste exogene Risikofaktor für das Harnblasenkarzinoms ist das Rauchen [3]. Die Exposition mit Arsen, Medikamenten, ionisierender Strahlung und berufsbedingten Karzinogenen (aromatischen Aminen; Kohlenwasserstoffen) sind weitere Risikofaktoren. Chronische Entzündungen oder die Infektion mit dem Erreger *Schistosoma haematobium* zählen vor allem in Entwicklungsländern als Faktoren für die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms der Harnblase. Endogene Risikofaktoren, wie Polymorphismen des NTA2-Gens oder Sequenzvariationen auf Chromosom 4p16.3 und deren Kombination mit exogenen Faktoren werden stark für die Tumorgenese diskutiert [4].

Die schmerzlose Mikro- oder Makrohämaturie ist das Leitsymptom des Harnblasenkarzinoms. Im fortgeschrittenen Tumorstadium können Miktionsstörungen und Flanken-/Beckenschmerzen auftreten. Die Diagnose erfolgt standardmäßig über die Urethrozystoskopie und Urinzytologie, wobei die Zytologie eine niedrige Sensitivität für gut differenzierte, nicht muskelinvasive Läsionen aufweist. Daneben stellt die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), in der chromosomale Veränderungen in Zellen des Urins detektiert werden, eine gute Alternative dar [5]. Bei Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom wird der Tumor mittels transurethraler Resektion (TUR) entfernt und histopathologisch untersucht. Dabei wird der Differenzierungsgrad der Zellen anhand des Gratings, welches zwischen *low* und *high grade* unterscheidet, bestimmt [6]. Mit ca. 95 % bildet das Urothelkarzinom, welches von der äußeren Epithelschicht (Urothel) der Harnblasenwand ausgeht, den häufigsten Subtyp. Überdies treten ca. 5 % Plattenepithelkarzinome und < 1 % Adenokarzinome auf [7]. Nicht nur histologisch, sondern auch anhand ihrer Wuchsform lassen sich Harnblasenkarzinome in zwei Hauptgruppen einteilen (Abb. 1) [8].

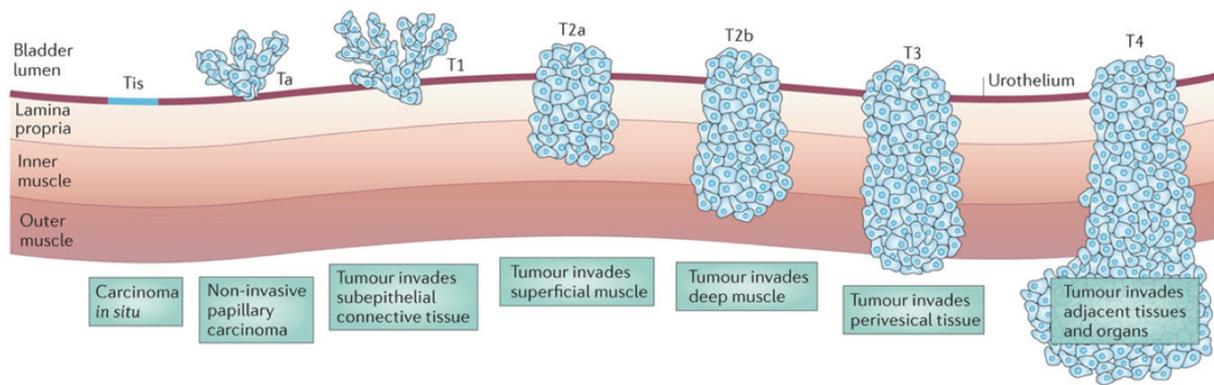


Abbildung 1: Stadieneinteilung des Harnblasentumors

Papilläre Harnblasentumore (Ta), Carcinoma in situ (CIS) und T1 entstehen aus normalem Urothel und werden zu den nicht muskelinvasiven Tumoren gezählt. Tumore, welche bereits in die Muskelschicht eingedrungen sind ($\geq T2$), werden als muskelinvasive Tumore bezeichnet. Die Stadien T3 und T4 haben bereits die Blasenwand durchbrochen (T3) oder infiltrieren benachbarte Organe (T4). (Modifiziert nach [8])

80 % der Tumoren zeigen ein papilläres Wachstum (Ta; T1) und gehören zur Gruppe der nicht muskelinvasiven Harnblasenkarzinome (NMIBC). Zu den NMIBC werden außerdem die deutlich aggressiveren Carcinoma in situ (CIS) gezählt. Diese zeichnen sich durch eine fortgeschrittene Dedifferenzierung der Zellen und ein hohes Progressionspotenzial zum muskelinvasiven Harnblasenkarzinom (MIBC) aus. Ca. 20 % der Tumore sind bereits zum Zeitpunkt der Diagnose in die Muskelschicht ($\geq T2$) eingedrungen und werden als MIBC klassifiziert. Je nach Infiltrationstiefe werden sie in unterschiedliche T-Kategorien eingeteilt, wobei im Stadium T3 bereits die Blasenwand und im Stadium T4 benachbarte Organe (z. B. Uterus; Prostata; Vagina) betroffen sind.

Die Therapie des Harnblasenkarzinoms ist abhängig vom Tumorstadium, erfolgt im nicht-metastasierten Stadium primär operativ und unterscheidet sich zwischen NMIBC und MIBC. NMIBC mit geringem Progressionsrisiko werden mittels TUR reseziert [9]. Diese Tumorentität tritt häufig multifokal auf. Im Regelfall erfolgt einige Wochen später eine Nachresektion, da nicht immer der komplette Tumor entfernt wird. Obwohl bis zu 70 % der NMIBC im Verlauf ein Rezidiv entwickeln, wovon ca. 10-15 % einen Progress zur Muskelinvasivität entwickeln, überleben über 90 % der Patienten die ersten 5 Jahre [10]. Zur Rezidivprophylaxe erfolgt standardmäßig eine einmalige intravesikale Gabe von Chemotherapeutika (Mitomycin C; Doxorubicin; Epirubicin) unmittelbar postoperativ. Bei CIS sowie high grade pTa/pT1-Tumoren ist daneben die mehrfache intravesikale Instillation eines abgeschwächten Tuberkulosebakteriums (*Bacillus Calmette-Guérin*-Therapie; BCG) Standard, deren primäres Ziel die Verhinderung einer Progression zum muskelinvasiven Stadium ist [11, 12]. Bei MIBC und rezidivierenden, BCG-refraktären pT1, G3 Tumoren stellt die radikale Zystektomie mit Lymphadenektomie der regionalen Lymphknoten die

Standardtherapie dar [13, 14]. Dabei wird beim Mann eine Zystoprostatovesikulektomie (Entfernung der Prostata; Samenblase und Samenleiter) vollzogen. Bei der Frau werden zusätzlich zur Harnblase die Gebärmutter, die Scheidenvorderwand und die Eierstöcke entfernt. Die 5-Jahresüberlebensrate von Patienten mit einem MIBC ohne pelvinen Lymphknotenbefall (pN0) beträgt ca. 60 %. Diese sinkt jedoch bei Vorliegen von regionalen Lymphknotenmetastasen (pN1) auf < 40 % [15, 16]. In bis zu 15 % der Fälle liegen bei Diagnosestellung bereits synchrone Fernmetastasen in Lunge, Leber und Knochen vor [17]. Weitere 50 % der MIBC entwickeln im Verlauf metachrone Metastasen. Dadurch sinkt die 5-Jahresüberlebensrate auf unter 10 %. Metastasierte und inoperable Tumoren werden standardmäßig palliativ mit einer systemischen Cisplatin-basierenden Chemotherapie behandelt [13, 18]. In den letzten Jahren gab es verglichen zu anderen Tumorentitäten keinen wesentlichen Fortschritt in den Diagnose- und Behandlungsmethoden des Harnblasenkarzinoms, weshalb die Metastasierung immer noch die Haupttodesursache des MIBC darstellt. Vielversprechend sind vor allem neue Therapieansätze in Form von Checkpoint-Inhibitoren (z. B. Atezolizumab; Nivolumab), die die Interaktion von PD-L1 (*programmed death-ligand 1*) und dem dazugehörigen Rezeptor (PD1) hemmen, wodurch die körpereigene Immunantwort aktiviert wird.

Zum jetzigen Zeitpunkt existieren keine zuverlässigen biologischen Marker, welche eine individuelle Risikostratifizierung von Patienten und somit die Selektion von Hochrisikopatienten für eine (neo)adjuvante Chemotherapie ermöglichen. Es ist daher von essentieller Bedeutung, die molekularen Mechanismen der Entstehung und Progression des Harnblasenkarzinoms zu verstehen und resultierend daraus neue spezifische Biomarker zu identifizieren, die sowohl eine tumorstadienabhängige Differenzierung als auch eine individuelle Prognoseeinschätzung und Therapiestrategie ermöglichen.

3.1.1 Molekulare Pathogenese des Harnblasenkarzinoms

Durch molekularbiologische Untersuchungen konnten unterschiedliche Wege in der Pathogenese des Harnblasenkarzinoms und die damit einhergehenden genetischen Alterationen identifiziert werden (Abb. 2). Über 50 % der Harnblasenkarzinome sind unabhängig von der Invasivität durch einen Verlust oder Mutationen des Chromosoms 9 gekennzeichnet. Diese genetische Veränderung kann als initialer Schritt in der Tumorgenese angesehen werden. Ca. 80 % der NMIBC, entstanden aus einer Hyperplasie oder der Kombination aus Hyperplasie und Dysplasie des Urothels, weisen eine aktivierende Mutation des FGFR3-Gens (*fibroblast growth factor receptor 3*) bzw. eine FGFR3-Überexpression auf

[19, 20]. Weitere 15 % der NMIBC sind durch eine permanente Aktivierung des Onkogens Ras (*Rat sarcoma* (HRAS, KRAS, NRAS)) gekennzeichnet, wobei die häufigste Mutation im KRAS vorliegt. Beide Mutationen führen zu einem ungehemmten Zellwachstum, das durch eine kontinuierliche Aktivierung des Ras-MAPK- (*mitogen activated protein kinase*) oder des PI3K (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*)-AKT- Signalweges induziert wird [21]. Diese Tumore werden als genetisch stabil bezeichnet und weisen entweder eine Alteration in FGFR3 oder Ras auf [8, 22, 23].

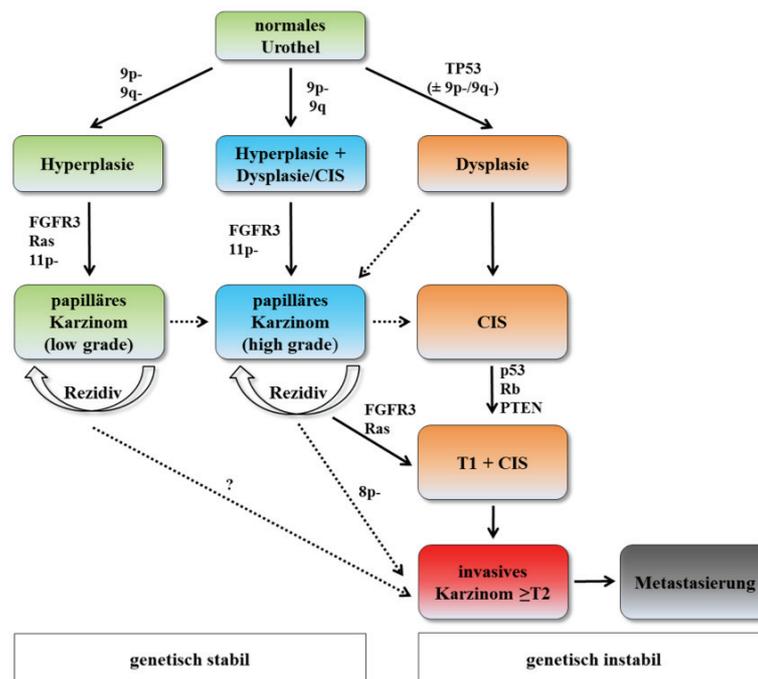


Abbildung 2: Tumorgenese und genetische Alterationen des Harnblasenkarzinoms

Das Harnblasenkarzinom weist 3 mögliche molekulare Pathogenesewege auf. Unabhängig von der Aggressivität tritt in allen Subtypen der Verlust des Chromosoms 9 auf. *Low Grade*/Nicht muskelinvasive Harnblasentumore (links, grün) entstehen aus einer Hyperplasie des Urothels und besitzen Mutationen in FGFR3 oder Ras. p53- und Rb-Mutation sind hingegen charakteristisch für muskelinvasive Harnblasentumore (rechts, rot), welche häufig aus CIS (Carcinoma in situ) und/oder T1, *high grade* Tumoren entstehen. Nicht muskelinvasive *high grade* Tumoren (mittig, blau) können sich über einen dritten Pathogeneseweg entwickeln. Häufig stammen diese aus Dysplasien des Urothels ohne p53-Mutation. Die Pfeile stellen zum einen Verbindungen mit hoher Wahrscheinlichkeit (durchgezogen) und zum anderen Verbindungen mit geringer Wahrscheinlichkeit (unterbrochen) dar. (Modifiziert nach [8, 22, 24])

Rezidivierende Tumore spiegeln nahezu identische genetische Profile des Primärtumors wieder. MIBC, CIS und hochmaligne T1 Tumore besitzen zahlreiche genetische Alterationen und sind genetisch instabil. Vorwiegend treten diese in den Tumorsuppressorgenen p53, PTEN (*phosphate and tensin homolog*) und Rb (Retinoblastom) auf [24, 25]. Durch die Inaktivierung des Rb-Gens kommt es zu einer Erhöhung der Zellproliferation. Hingegen führen Mutationen von PTEN und p53 zu Fehlern in der Zellzykluskontrolle und DNA-Reparaturmechanismen resultierend in einer verminderten Apoptose [26-28].

Aufgrund neuerer molekularer Untersuchungen konnten 3 Subtypen des MIBC definiert werden. MIBC können ähnlich der Klassifizierung des Mammakarzinoms in einen basalen, luminalen und „p53-ähnlichen“ Subtyp unterteilt werden [29-31]. Luminale Tumore sind durch die vermehrte Expression von epithelialen Markern (E-Cadherin), der microRNA (miRNA) miR-200 Familie und der Aktivierung von FGFR3- und PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) gekennzeichnet. Charakteristisch für basale Tumore, die mit einer deutlich schlechteren Prognose assoziiert sind, sind sarkomatoide Eigenschaften und eine plattenepitheliale Differenzierung. Sie weisen eine erhöhte Expression von mesenchymalen Markern (ZEB (*Zinc finger E-box-binding homeobox 1*); TWIST1/2 (*Twist-related protein 1/2*); VIM (Vimentin); SNAI2 (*Snail family transcriptional repressor 2*)) auf. Darüber hinaus wurde in den letzten Jahren gezeigt, dass die Tumorgenese sich nicht nur auf genetische Veränderungen zurückzuführen lässt, sondern auch epigenetische Regulationsmechanismen einen entscheidenden Einfluss haben [32, 33].

3.2 MiRNAs

Epigenetische Mechanismen, wie DNA-Methylierung, Histonmodifizierung und die Expression spezifischer nicht kodierender RNAs (z. B. miRNA; siRNA), spielen eine essentielle Rolle in der Genregulation [34-37]. Diese Prozesse sind reversible Veränderungen, welche durch Alterationen im Phänotyp, aber nicht im Genotyp einhergehen. Deregulationen können zur veränderten Genexpression führen, was mit einer malignen Transformation assoziiert sein kann.

MiRNAs sind kleine, ca. 22-25 Nukleotid (nt) große, nicht kodierende RNA-Moleküle, welche evolutionär hoch konserviert sind. 1993 wurde die erste miRNA lin-4 im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) entdeckt [38]. Knapp 10 Jahre später wurde nachgewiesen, dass lin-4 nicht spezifisch in *C. elegans* exprimiert wird, sondern in verschiedenen Organismen vorkommt. Bis jetzt wurden über 3000 miRNAs in tierischen Organismen identifiziert, wovon ca. 2588 humane miRNAs sind, die von etwa 1-5 % des menschlichen Genoms kodiert werden [39]. MiRNAs regulieren bis zu 30 % der Proteinkodierenden Gene, wodurch sie eine wichtige Rolle in der posttranskriptionalen Genregulation haben [40, 41].

3.2.1 Biogenese und Funktion

Startpunkt der miRNA-Biogenese ist die Transkription eines bis zu 3 kb langen Primärtranskripts (pri-miRNAs) durch die RNA-Polymerasen (Pol) II und III im Zellkern

(Abb. 3) [42]. Die pri-miRNA weist eine charakteristische Haarnadelstruktur (*Stem loop*) auf, welche eine einzelsträngige RNA-Verlängerung an beiden Enden hat. Dabei ist das 3' Ende polyadenyliert und das 5' Ende besitzt eine 7-Methylguanosin-Cap [43]. Der Mikroprozessorkomplex, bestehend aus der RNase III Drosha und dem RNA-Doppelstrang-bindenden Protein DGCR8 (*diGeorge syndrome chromosomal region 8*), prozessiert die pri-miRNA in die 60-80 nt lange pre-miRNA (*precursor miRNA*) [44, 45]. Die pre-miRNA besitzt am 3' Ende zwei überhängende Nukleotide. Durch Komplexbildung mit Ran-GTP und Exportin-5 wird sie aktiv vom Zellkern in das Zytoplasma transportiert [46, 47].

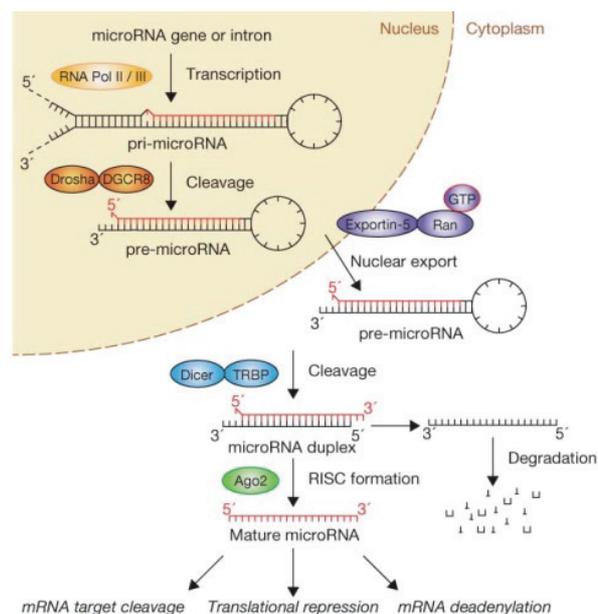


Abbildung 3: Biogenese und Funktion der miRNA

Im Zellkern erfolgt die Transkription des Primärtranskripts (pri-miRNAs) durch die RNA-Polymerase II und III. Diese wird über den Mikroprozessorkomplex, bestehend aus der RNase III Drosha und dem RNA-Doppelstrang-bindenden Protein DGCR8, in die *precursor* miRNA prozessiert. Der aktive Transport vom Zellkern in das Zytoplasma erfolgt über die Komplexbildung mit Ran-GTP und Exportin-5. Im Zytoplasma schneidet die RNase III-Endonuklease Dicer zusammen mit dem TRBP die pre-miRNA und es entsteht ein 20-25 nt langer miRNA-Duplex. Über Argonaut (Ago) 1-4 Proteine, welche Bestandteile des RISC sind, wird dieser in den funktionell aktiven Strang und den inaktiven Strang gespalten. Der inaktive Strang wird degradiert und der aktive Strang bindet zusammen mit den Ago-Proteinen an RISC. Der entstandene miRNA-RISC-Komplex bindet an die Ziel-mRNA und induziert die mRNA-Spaltung, die translationale Hemmung oder die mRNA-Deadenylierung [42].

Im Zytoplasma bindet die RNase III-Endonuklease Dicer zusammen mit dem TRBP (*TAR RNA binding protein*) an die pre-miRNA, entfernt den *Stem loop*, wodurch ein 20-25 nt langer miRNA-Duplex entsteht. Der miRNA-Duplex wird über die Argonaut 1-4 (Ago) Proteine, welche Bestandteile des RISC (*RNA-induced silencing complex*) sind, in den funktionell aktiven Strang (*guide*) und den inaktiven Strang (*passanger*) gespalten [48]. Während der inaktive Strang degradiert wird, bindet der aktive Strang zusammen mit den Ago-Proteinen an RISC und formt den miRNA-RISC-Komplex.

Die reife miRNA besitzt eine spezifische Nukleotidsequenz zwischen der 2. und 8. Stelle des 5' Endes, die sogenannte Seed-Sequenz. Dieser Sequenzabschnitt definiert die Bindungsspezifität zur 3' UTR (3' *untranslated region*) der Ziel-mRNA. In Abhängigkeit von der Bindungsaffinität zwischen miRNA und mRNA unterscheidet man 2 Arten des Gen-Silencings. Bei kompletter Komplementarität zwischen miRNA und mRNA, die vorwiegend in Pflanzen vorkommt, werden RNasen aktiviert und die Degradation der mRNA eingeleitet. Bei tierischen Organismen tritt die partielle Komplementarität zur mRNA weitaus häufiger auf. Diese führt über translationale Repression zur Inhibierung der Proteintranslation [40, 49]. Dabei kann der Silencing-Prozess in der Initiations- oder der Elongationsphase stattfinden. Weiterhin kann es zu einer vorübergehenden translationalen Inhibierung kommen, indem die miRNA, mRNA und Ago-Proteine in P-Körpern (*processing bodies*) gespeichert und dem Translationsapparat entzogen werden [40]. Später kann es zu einer Rückführung oder Degradation der mRNA kommen. Neben der translationalen Repression kann eine partielle Komplementarität eine Deadenylierung der Ziel-mRNA induzieren, dadurch geht die Stabilität verloren und der Abbau durch Exonukleasen wird eingeleitet [50]. Durch die Bindungsaffinität der Seed-Sequenz und den daraus resultierenden Paarungsmöglichkeiten kann eine miRNA hunderte von mRNAs kontrollieren, aber auch eine mRNA kann durch verschiedene miRNAs reguliert werden.

Die Hauptfunktion von miRNAs liegt in der Regulation biologischer Prozesse, vor allem in der zellulären Entwicklung und Homöostase, der Differenzierung, im Metabolismus und Zellzyklus. Alterationen in der miRNA-Expression, induziert durch Veränderungen der Biogenese wie die Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren, Protein- oder RNA-modifizierenden Proteinen, Exo- oder Endoribonukleasen, verursachen eine abnormale Proteinexpression. Folglich kann es zur Deregulation zellulärer Mechanismen und zur Entstehung von verschiedenen Erkrankungen wie neurodegenerativen Störungen, Diabetes, Entzündungen, Leukämie oder Karzinomen kommen [34, 50-52].

3.2.2 miRNAs in Karzinomen

Genomische Alterationen, epigenetische Modifizierungen oder Mutationen innerhalb des Prozessierungsapparates können in einer Verschiebung der miRNA-Expression resultieren, wodurch die Entstehung und Progression von Karzinomen begünstigt werden können [50, 53]. Ca. 50 % der miRNA-kodierenden Gene sind innerhalb oder in der Nähe von fragilen Bereichen (*fragile sites*) bzw. tumor-assoziierten genomischen Regionen lokalisiert [54]. MiRNAs können onkogene und tumorsuppressive Fähigkeiten besitzen und werden daher

häufig als „*Oncomirs*“ bezeichnet [53]. Je nach Gewebe oder Expression der Ziel-mRNA haben Oncomirs eine unterschiedliche Wirkung. Onkogene miRNAs weisen häufig eine erhöhte Expression auf, wodurch es zu einer verminderten Translation von Tumorsuppressorproteinen wie PTEN und zur Verringerung der Apoptose kommt. Im Gegensatz dazu zeigen tumorsuppressive miRNAs meist eine erniedrigte Expression resultierend in einer Anreicherung von onkogenen Proteinen wie BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*) und Ras. Nicht nur während der Tumorentstehung, sondern auch in der Tumorprogression sind sie wichtige Regulatoren. Bis heute ist eine Vielzahl an metastasierungsassoziierten miRNAs und ihren mRNAs, welche als Aktivatoren oder Suppressoren der Metastasierung wirken können, beschrieben. Dadurch kann unter anderem die Invasion, Proliferation, Migration von Tumorzellen, die Remodellierung der extrazellulären Matrix (EZM) oder auch die epitheliale mesenchymale Transition (EMT) induziert werden [34, 51, 53]. Die EMT wird vorrangig durch die miR-200 Familie (miR-141; -200a/b/c; -429) beeinflusst. Die verminderte Expression dieser miRNAs in MIBC führt zur vermehrten Translation von ZEB1/2 resultierend in einer verminderten Expression des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin. Zellen verlieren ihre epithelialen Charakteristika und gewinnen an mesenchymalen Eigenschaften, es kommt zur EMT, die eine entscheidende Rolle in der Metastasierung spielt [55-58].

MiRNAs weisen eine gewebe- und entwicklungspezifische Expression auf, weshalb miRNA-Expressionsprofile für die Charakterisierung unterschiedlicher Gewebe und Erkrankungen genutzt werden können. In einigen Tumorentitäten steht die miRNA-Expression in Korrelation mit den Tumorstadien, der Metastasierung, der Prognose, der Therapieresistenz und dem Auftreten unterschiedlicher tumor-assoziiierter Mutationen, weshalb sie sich potentiell als diagnostische und prognostische Biomarker eignen [59-64]. *Low grade* Harnblasenkarzinome weisen beispielsweise eine verminderte Expression von miR-99a/100 auf, die zum Teil in einer vermehrten Expression von FGFR3 resultieren kann [65].

Nach heutigem Kenntnisstand ist davon auszugehen, dass die Tumorgenese ein sehr komplexer Prozess ist, der durch das Zusammenspiel von Mutationen und epigenetischen Veränderungen der Tumore selbst als auch ihrer spezifischen Tumormikroumgebung (Tumorstroma; TME) begünstigt wird [66-68].

3.3 Tumormikroumgebung

Tumore werden als heterogene Komplexe bestehend aus den Tumorzellen selbst und ihrer spezifischen TME, welche sich aus verschiedenen Zelltypen zusammensetzt, verstanden. Neben zellulären Strukturen wie Immunzellen, Endothelzellen, normalen und tumor-

assoziierten Fibroblasten (TAF) enthält sie extrazelluläre Strukturen, wie die EZM (Abb. 4) [69].

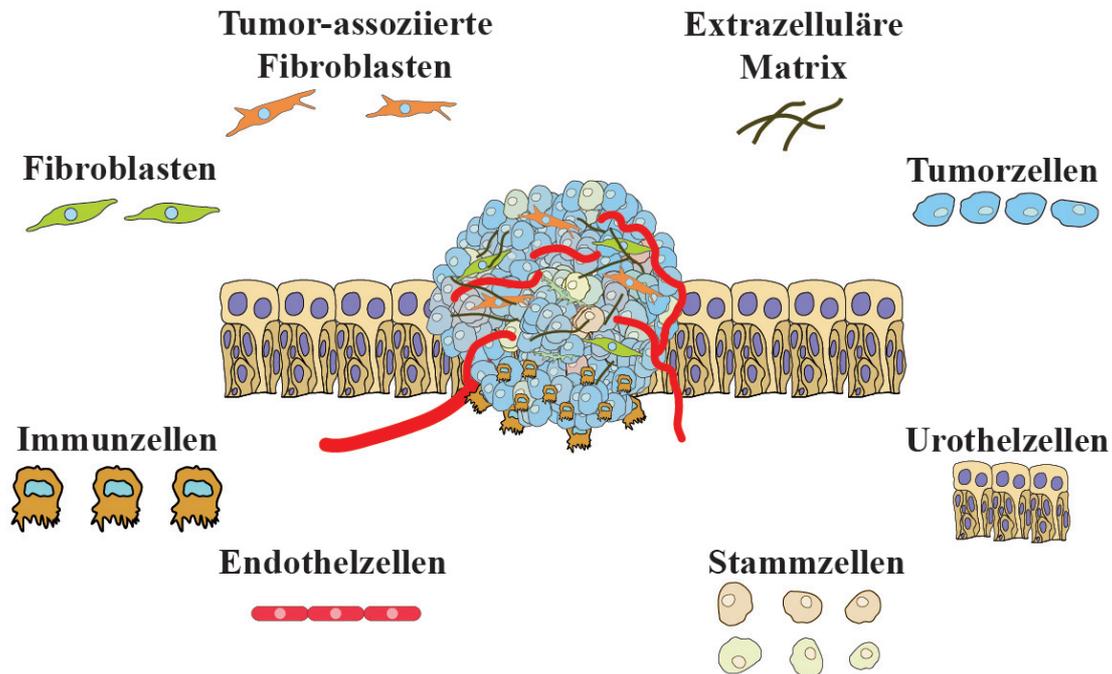


Abbildung 4: Schematische Darstellung der zellulären Zusammensetzung der Tumormikroumgebung des Harnblasenkarzinoms

Dabei ist die TME kein starres Gebilde, sondern unterliegt stetigen Umbildungen, die durch die Tumorzellen induziert werden. Durch die stark veränderte EZM sowie durch inflammatorische Zellen und TAFs lässt sich die TME vom Stroma aus normalen, gesunden Geweben deutlich abgrenzen. Tumorzellen können direkt über Zell-Zellkontakte, aber auch indirekt über die Sekretion von Stroma-modulierenden Faktoren wie FGF-2 (*fibroblast growth factor 2*), PDGF (*platelet derived growth factor*), TGF- β (*transforming growth factor beta*), pro-angiogene Faktoren (z. B. VEGF (*vascular endothelial growth factor*), IL (Interleukinen)), mit der Umgebung interagieren [68, 70, 71]. Im gesunden Gewebe besteht eine wichtige Funktion von Fibroblasten in der Wundheilung. In Folge einer Gewebeschädigung werden Immunzellen rekrutiert, die Zytokine sezernieren. Zytokine regen eine vermehrte Zellproliferation von Fibroblasten an, die wiederum zu einer erhöhten Synthese von EZM-Komponenten führt. Diese sorgen für eine schnelle Wiederherstellung der Gewebestruktur. Kommt es zu Alterationen in der zellulären Interaktion von epithelialen und stromalen Zellen, führt dies zu einem Ungleichgewicht normaler Regulationsmechanismen, wodurch wichtige Zellfunktionen beeinflusst werden können und die Tumorentstehung und -progression begünstigt werden kann [72-74]. In Tumoren besteht eine Analogie zu normalen

Geweben, mit dem Unterschied, dass Tumore eine „nicht heilende Wunde“ darstellen [75]. Das bedeutet, dass vermehrt Immunzellen rekrutiert werden, die einen Anstieg in der Produktion von entzündungsfördernden Chemokinen und Zytokinen induzieren und infolgedessen die Proliferation von Fibroblasten gesteigert wird [76, 77]. Durch die Aufnahme von Stroma-modulierenden Faktoren werden normale Fibroblasten aktiviert und vermehrt Proteine wie α SMA (*alpha smooth muscle actine*) und SDF1 (*stromal-derived factor 1*) exprimiert. Diese leiten eine Differenzierung in TAFs ein. Durch die Aktivierung steigt die Sezernierung von Proteasen (Matrix Metallo Proteasen (MMP), Cathepsin, Serinproteasen), deren Hauptaufgabe die kontinuierliche Remodellierung der EZM ist, weiter an [70, 78]. Tumor-assoziierte Alterationen wirken nicht nur auf Fibroblasten, sondern auch auf andere Zelltypen der TME wie Endothelzellen und Immunzellen. Es besteht ein permanenter Kreislauf in der Interaktion von Tumorzellen und ihrer TME, wodurch es zu einer kontinuierlichen Stimulation der Remodellierung der TME, der Sekretion von pro-angiogenen und pro-entzündlichen Faktoren einhergehend mit der Modifikation von pathologischen Prozessen wie Proliferation, Migration, Invasion, EMT und Neoangiogenese kommt [72, 76, 77, 79-83]. Durch das komplexe Zusammenspiel von Tumorzellen und der TME werden optimale Bedingungen für die Ausbreitung des Tumors lokal, aber auch für die Bildung einer prä-metastatischen Nische in entfernten Organen, generiert. Dabei spielt die TME nicht nur in der Tumorentstehung und Metastasierung eine essentielle Rolle, sondern ist auch maßgeblich an der Entwicklung von Therapieresistenzen beteiligt [73, 84, 85].

Bislang existieren kaum Studien, die die genauen Mechanismen der Tumor-TME-Interaktion im Harnblasenkarzinom analysiert haben. Man geht davon aus, dass auch Harnblasenkarzinome nicht nur indirekt über die Sekretion von löslichen Faktoren ihre Umgebung beeinflussen, sondern zelluläre Bestandteile wie miRNA, mRNA und Proteine über kleine, extrazelluläre Vesikel (EV) ausschleusen und auf Zellen in der Umgebung übertragen. Durch den Transfer von Molekülen können sie schnell und effektiv Prozesse in der Empfängerzelle beeinflussen.

3.4 Extrazelluläre Vesikel

EVs sind kleine Membranvesikel (20-5000 nm), welche sowohl von eukaryotischen als auch prokaryotischen Zellen sezerniert und in den extrazellulären Raum abgegeben werden [86]. Sie wurden erstmals im Jahre 1946 von Chargoff und West im Plasma gesunder Probanden beschrieben [87]. EVs können aber nicht nur aus allen Körperflüssigkeiten, sondern auch aus Zellkulturüberständen isoliert werden. Die EV-Forschung hat einen zunehmenden Stellenwert

in der Grundlagenforschung von physiologischen, aber auch von pathophysiologischen Mechanismen. Basierend auf der Biogenese unterscheidet man zwischen kleineren Membranvesikeln, den sogenannten Exosomen (30-150 nm), den größeren Mikrovesikeln (MV; 50-1000 nm) und apoptotischen Körpern (500-2000 nm). Im Fokus dieser Arbeit stehen die exosomalen Vesikel, weshalb im Folgenden nur partiell auf die anderen Subtypen eingegangen wird.

3.4.1 Die Biogenese extrazellulärer Vesikel

Apoptotische Körper entstehen während der Apoptose, in dem die Zellmembran nach außen gestülpt und Vesikel gebildet werden [88]. Die enthaltenen Zellfragmente apoptotischer Zellen werden durch Phagozytose abgebaut und spielen keine weitere Rolle in der interzellulären Kommunikation. Die Biogenese von Exosomen und MVs ist hingegen ein streng regulierter Prozess, in den verschiedenste Moleküle involviert sind (Abb. 5) [89].

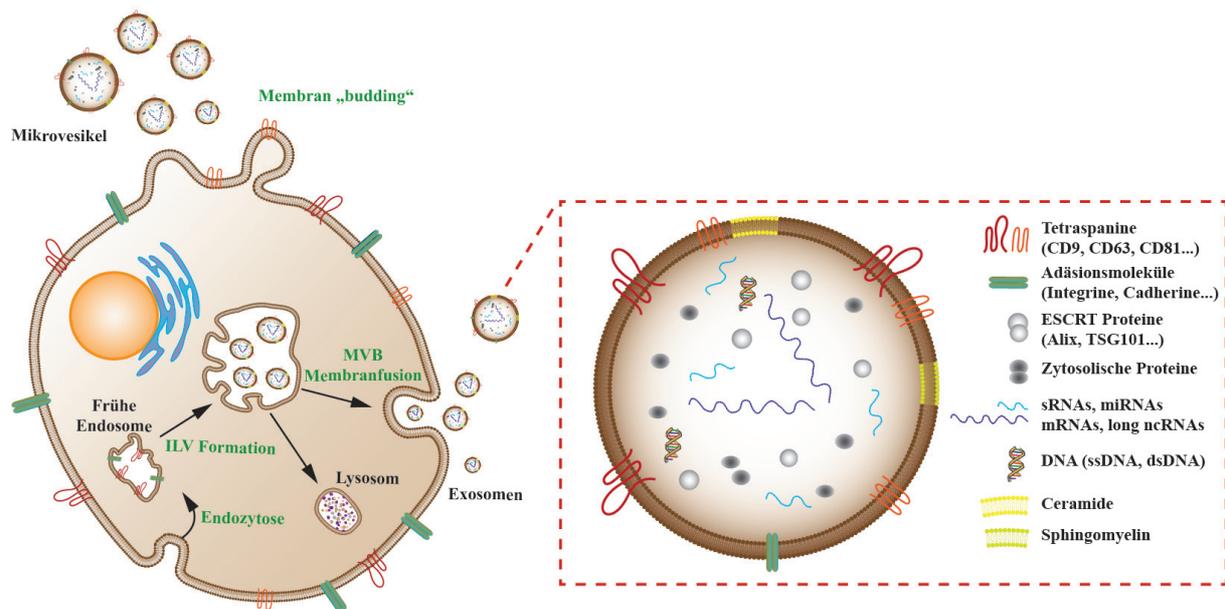


Abbildung 5: Die Biogenese von extrazellulären Vesikeln und molekulare Zusammensetzung von Exosomen

Die Biogenese von extrazellulären Vesikeln erfolgt über zwei Wege. Größere Mikrovesikel werden durch die Abschnürung der Plasmamembran (Membran „budding“) in den extrazellulären Raum abgegeben (links). Exosomale Vesikel (Exosomen) werden durch einen etwas komplexeren zweiten Weg gebildet (rechts). Durch Einstülpung der Plasmamembran nach innen (*inward budding*) werden die endozytotischen Vesikel gebildet, die zu den frühen Endosomen transportiert werden und mit der Membran verschmelzen. Während der Reifung zu späten Endosomen kommt es durch Einstülpung der Membran zur Bildung und Akkumulation von intraluminalen Vesikeln (ILV), weshalb die entstandenen Strukturen oft als multivesikuläre Bodies (MVB) bezeichnet werden. Die ILVs werden durch die Fusion der MVB mit der äußeren Plasmamembran in den extrazellulären Raum abgegeben und fortan als Exosomen bezeichnet. Im rechten Teil der Abbildung ist schematisch die molekulare Zusammensetzung von Exosomen dargestellt. (Modifiziert von [89])

Während MVs durch Ausstülpung der Plasmamembran gebildet und in den extrazellulären Raum abgegeben werden, entstehen Exosomen innerhalb der Zelle im endosomalen System [86, 90, 91]. Endozytotische Vesikel, frühe und späte Endosomen und Lysosomen bilden das endosomale System. Nachdem endozytotische Vesikel über die Clathrin-vermittelte Endozytose gebildet wurden, wandern sie zu den frühen Endosomen und verschmelzen dort mit der Plasmamembran. Während der Reifung von frühen zu späten Endosomen verändert sich nicht nur ihre Form, sondern es kommt innerhalb der späten Endosomen zur Akkumulation von Vesikeln. Diese werden durch Einstülpung der Plasmamembran (*inward budding*) gebildet und als intraluminale Vesikel (ILV) bezeichnet [92, 93]. Dabei kann die Anzahl von ILVs in Endosomen stark variieren, weshalb späte Endosomen auch als MVB (*multi vesicular bodies*) benannt werden [94, 95].

Die Bildung und Sortierung von ILVs kann durch den ESCRT-abhängigen (*endosomal sorting complex required for transport*) oder den ESCRT-unabhängigen Mechanismus erfolgen. ESCRT-Komplexe setzen sich aus ca. 30 Proteinen zusammen [86, 90, 96, 97]. Diese Proteinkomplexe lassen sich in vier Hauptgruppen (ESCRT-0; -I; -II; -III) gliedern, wobei nur ESCRT-0, -I, -II und -III Bindungsstellen für Ubiquitin besitzen. Diese Bindungsstellen sind wichtige Elemente für die Sortierung von ubiquitinierten Proteinen in Exosomen. Im ersten Schritt erkennt und bindet ESCRT-0, ein 1:1 Heterodimer aus HRS (*HGF-regulated tyrosine kinase substrate*) und STAM (*signal transducing adaptor molecule*), die ubiquitinierten Transmembranproteine [98]. Neben der Bindung ubiquitiniertes Proteine rekrutiert es über HRS den Proteinkomplex ESCRT-I aus dem Zytosol zur endosomalen Membran [99, 100]. Dieses bindet über sein Adapterprotein TSG101 (*tumor susceptibility gene 101 protein*) an ESCRT-0 [101]. Nachdem der ESCRT-1 Komplex gebunden hat, wird der ESCRT-II Komplex, welcher das Protein ALIX (*ALG-2-interacting protein X*) enthält, aktiviert [102, 103]. Durch das Zusammenspiel von ESCRT-I und -II kommt es zur Induktion des ESCRT-III Komplexes. ESCRT-III zeigt in seiner Struktur keinen Ubiquitin-bindenden Abschnitt, kann aber aktiv das Enzym DUB (*de-ubiquitylating enzyme*) rekrutieren [104, 105]. Durch DUB wird Ubiquitin von den Proteinen entfernt. Dadurch wird der Transport von Proteinen in die ILVs und die Bildung von ILV eingeleitet. Die Formation der ILV erfolgt durch das Zusammenspiel aller ESCRT-Gruppen. Anschließend wird der ESCRT-Komplex über AAA+ATPase (*ATPases Associated with diverse cellular Activities*) Vps4 in die einzelnen ESCRT-Untergruppen zerlegt, wodurch eine Wiederwendung dieser erfolgen kann [106, 107].

ILV können auch durch einen ESCRT-unabhängigen Mechanismus entstehen. Zunächst wird Sphingomyelin über das Enzym nSMase2 (*neutral sphingomyelinase 2*) katalysiert, welches dann weiter über die Kinase Sphk2 (*sphingosine kinase 2*) und Sphingosin zu S1P (*sphingosine-1-phosphate*) metabolisiert wird [108-110]. Durch S1P erfolgt die Aktivierung des Gi-gekoppelten Rezeptors, dadurch wird die Dissoziation in die Untergruppen G α i und $\beta\gamma$ induziert und führt zur Sortierung und Formation von ILV.

Die Verarbeitung von MVB kann über verschiedene Wege erfolgen. Zum einen kann der Transport zu den Lysosomen eingeleitet werden, wo sie mit der lysosomalen Membran verschmelzen und abgebaut werden [111, 112]. Zum anderen können MVB als Speicher für Membranproteine (z. B. MHC-II (*major histocompatibility complex*)) verwendet werden. Proteine werden innerhalb der MVBs gespeichert und bei Bedarf wieder von MVBs freigesetzt, wodurch sie ihre Funktion wieder aufnehmen können [113]. MVBs können unter der Kontrolle von Rab GTPasen (z. B. RAB11; RAB27a/b; RAB35) zwischen den einzelnen intrazellulären Kompartimenten bis zur Plasmamembran transportiert werden [114-116]. Dort erfolgt unter Beteiligung von SNARE (*soluble NSF-attachment protein receptor*) Proteinen die Fusion mit der Plasmamembran und die damit verbundene Freisetzung der ILVs in den extrazellulären Raum, wo sie fortan als Exosomen oder exosomale Vesikel bezeichnet werden [117]. Proteine, welche in der Sortierung und Biogenese von EVs beteiligt sind, eignen sich als molekulare Marker für die Charakterisierung der einzelnen Subgruppen.

3.4.2 Molekulare Zusammensetzung von Exosomen

Exosomen sind 30-150 nm große Membranvesikel, die von allen Zelltypen sezerniert werden, weshalb die molekulare Zusammensetzung in Abhängigkeit von der Ausgangszelle stark variiert. Sie können nicht nur in vitro aus Zellkulturüberständen, sondern auch in vivo aus Körperflüssigkeiten (z. B. Urin; Blut; Gelenkflüssigkeit) isoliert werden [118-122].

Charakteristisch für Exosomen ist eine Lipiddoppelmembran und eine Dichte zwischen 1,13-1,19 g/ml. Neben den evolutionär-konservierten Molekülen, welche als typische exosomale Marker verwendet werden, kommen auch zellspezifische Proteine vor. Bislang sind mehr als 9000 verschiedene Exosomen-assoziierte Proteine bekannt, die vorwiegend zu den Proteinen des Zytosols, der Plasma- oder Endosomenmembran gezählt werden (ExoCarta Database). Proteine aus Zellorganellen (z. B. Nucleus; Golgi-Apparat; endoplasmatischen Retikulum) kommen hingegen nie vor. Auf der Plasmamembran besitzen Exosomen spezifische Oberflächenmarker wie Transmembranproteine (z. B. LAMP1/2 (*lysosomal-associated membrane protein 1/2*)) und Adhäsionsmoleküle einschließlich Integrine und Cadherine (z. B.

ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*); Mac-1 (*Macrophage-1 antigen*), Integrin α). Tetraspanine (z. B. CD9; CD37; CD63; CD81) sind die am häufigsten auf der Oberfläche vertretene Proteinfamilie [123-125]. Neben zytosolischen Proteinen wie Tubulinen, Aktinen, Annexinen treten auch Proteine der Biogenese (z. B. TSG101; Alix; ESCRT; Rab) auf [101, 126]. Viele Exosomen enthalten auch MHC-Klasse-I und II Moleküle sowie die an der Beladung beteiligten Hitzeschockproteine (Hsp (*heat shock proteins*; Hsp70/90) [127, 128]. Signaltransduktionsproteine wie Proteinkinasen, heterotrimere G-Proteine aber auch Enzyme (z. B. Peroxidasen; Pyruvat-; Lipidkinasen) wurden ebenfalls als exosomale Bestandteile beschrieben [129].

Ein wichtiger Meilenstein in der EV-Forschung war die Entdeckung, dass neben Proteinen auch funktionell aktive RNA-Moleküle (z. B. miRNA; mRNA) in Exosomen enthalten sind und diese von einer auf die andere Zelle übertragen werden können [130, 131]. Die exosomal verpackten Moleküle sind aufgrund der Lipiddoppelschicht vor der Degradation durch Enzyme (z. B. RNasen; DNasen) geschützt, so dass sie auch über weite Distanzen transportiert werden können [132]. In den Zielzellen können sie Einfluss auf wichtige Prozesse haben, indem z. B. mRNAs in die funktionellen Proteine translatiert werden oder miRNAs die Proteinbiosynthese hemmen [133, 134]. Aufgrund des Transfers von biologisch aktiven Molekülen spielen exosomale Vesikel eine entscheidende Rolle in der interzellulären Kommunikation, in dem sie schnell und effektiv Prozesse in der Empfängerzelle beeinflussen können.

3.4.3 Funktionelle Bedeutung von Exosomen

Nach der Sezernierung von Exosomen können sie zu Zellen in der direkten Nachbarschaft oder über das Blut- oder Lymphsystem in entfernt liegende Organe transportiert werden. Dort können sie schnell durch direkte Membranfusion, aber auch über komplexe Mechanismen wie Phagozytose, Endozytose und Rezeptor-vermittelt in die Zielzellen aufgenommen werden (Abb. 6) [135].

Die Endozytose, entweder Clathrin- oder Caveolin-vermittelt, stellt den bekanntesten Aufnahmemechanismus dar [136, 137]. Dieser Prozess ermöglicht eine schnelle, aktive und energieabhängige Internalisierung, indem Exosomen über die aufeinanderfolgende Anlagerung mit Clathrin oder Caveolin ummantelt und in die Zelle transportiert werden [138, 139]. Innerhalb der Zelle erfolgt der Transport zu dem intrazellulären Kompartiment, wo sie mit der Membran verschmelzen und ihren Inhalt freisetzen.

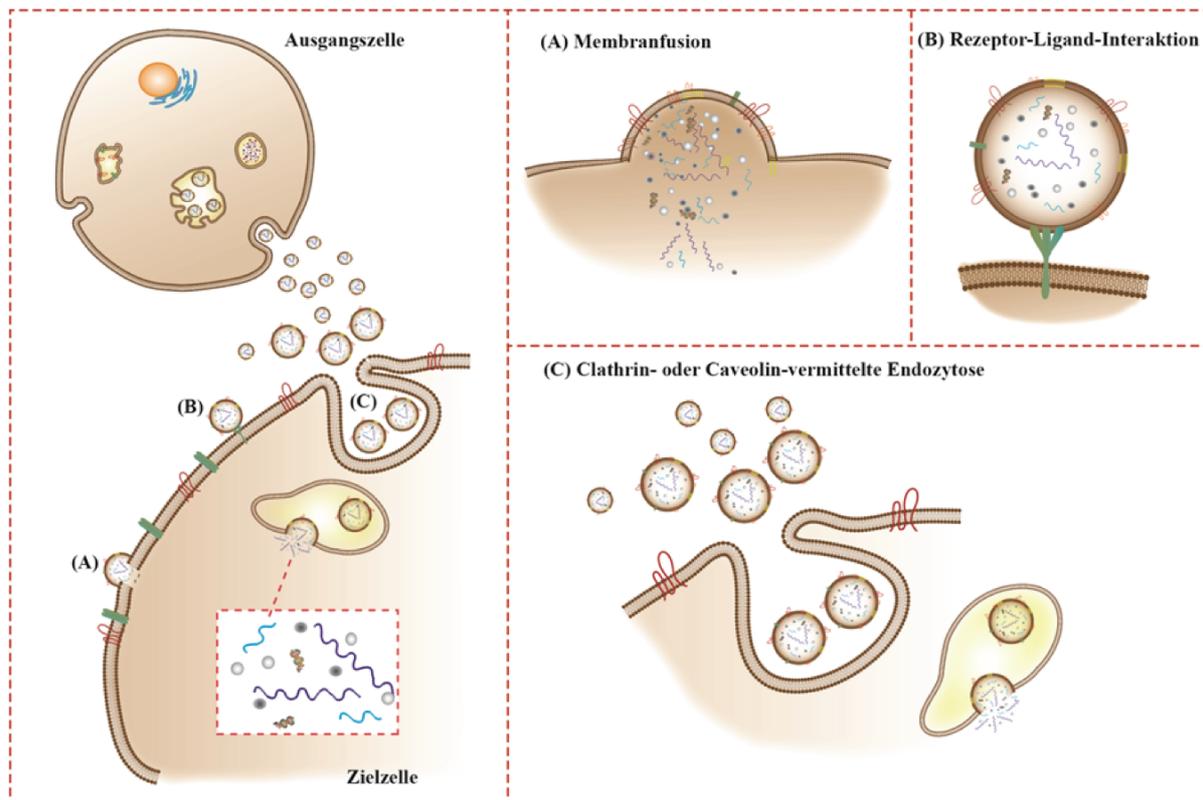


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Sezernierung von Exosomen und ihrer möglichen Aufnahmemechanismen in die Empfängerzellen

Exosomen werden von gesunden und malignen Zellen in den extrazellulären Raum sezerniert und von dort zu Zellen in der direkten Umgebung oder entfernten Orte transportiert. Dort erfolgt eine Internalisierung von Exosomen über verschiedene Mechanismen. A) Exosomen werden durch direkte Membranfusion aufgenommen. B) Rezeptor-Ligand-vermittelte Aufnahme oder Induktion von „Downstream“-Signalwegen gehören ebenfalls zu den Mechanismen der Internalisierung. C) Die Clathrin- oder Caveolin-vermittelte Endozytose stellt einen weiteren Aufnahmemechanismus dar.

Bei der Phagozytose, durch die vor allem größere Exosomen aufgenommen werden, wird durch Rezeptor-vermittelte Signale die Einstülpung der Plasmamembran induziert und MVBs werden gebildet. Die MVBs werden zu dem intrazellulären Kompartiment transportiert und verarbeitet. Exosomen können mit der Zielzelle über eine Rezeptor-Ligand-Interaktion interagieren. Zum einen wird dadurch die Einstülpung der Plasmamembran induziert, zum anderen werden Signalwege durch z. B. die Aktivierung des TLR3 (*Toll-like receptors 3*) ausgelöst [140]. Zu den weniger bekannten Mechanismen gehören die Makropinozytose und sogenannte „Lipid rafts“. Bei der Makropinozytose werden Exosomen durch kleine, eingestülpte Membranverzweigungen aufgenommen. Von diesen werden sie abgeschnürt und zum intrazellulären Kompartiment transportiert [137, 141]. *Lipid rafts* sind Sphingomyelin-, Glycosphingolipid- und Cholesterin-reiche Plasmamembranbereiche, die sich durch Lipid-Lipid-, Protein-Lipid- oder Protein-Protein-Interaktion aneinander lagern und die Aufnahme von Exosomen begünstigen. [142].

In Abhängigkeit von der Ausgangszelle und des transportierten Inhaltes können Exosomen unterschiedliche Funktionen in den Zielzellen zugeordnet werden. Im gesunden Organismus unter normalen physiologischen Bedingungen werden Prozesse wie Gewebereparatur, Blutkoagulation, Immunantwort und Stammzellendifferenzierung reguliert [143, 144]. Kommt es zur Deregulation der normalen Sekretion, kann dies pathophysiologische Prozesse wie chronische Wundheilungsstörung, Remodellierung der EZM, Alterationen im genetischen Profil der Zielzellen, begünstigen [145-148]. Folglich kann auch die Entstehung, Progression und Metastasierung von Karzinomen gefördert werden. Exosomen rücken daher immer weiter in den Fokus der aktuellen Tumorforschung, da sie neben direkten Zell-Zellkontakten und löslichen tumor-assoziierten Faktoren wichtige Regulatoren im interzellulären Informationsaustausch zwischen Tumoren und ihrer TME sind. Im Folgenden werden die unter Abbildung 7 beispielhaft gezeigten Einflüsse tumor-assoziiierter Exosomen auf Zellen der TME und ihre Bedeutung für die Tumorprogression näher erläutert.

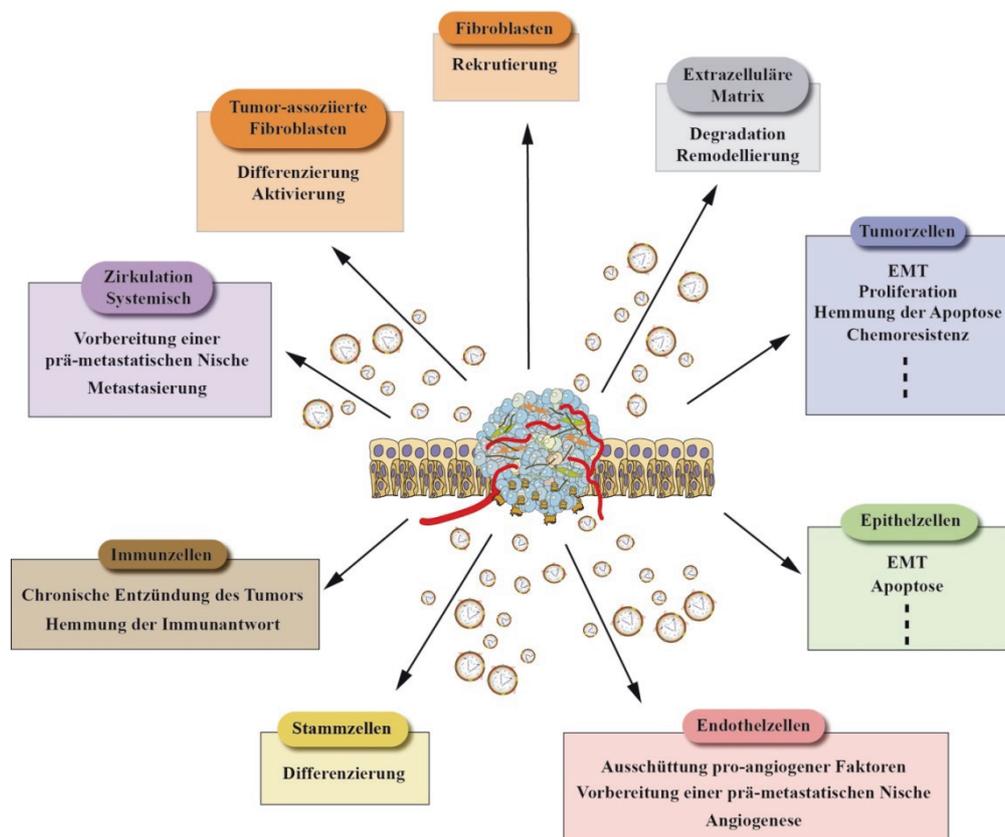


Abbildung 7: Schematische Zusammenfassung des beispielhaften Einflusses tumor-assoziiierter Exosomen auf die Tumormikroumgebung

Tumorzellen können andere Zelltypen über die Sezernierung von tumor-assoziierten Exosomen beeinflussen. Darüber hinaus kann auch die epitheliale mesenchymale Transition (EMT) in normalen Epithelzellen und Tumorzellen induziert werden. Je nach Zielzelle werden verschiedene Prozesse wie Differenzierung, Aktivierung, Hemmung oder Induktion der Angiogenese induziert. Sie wirken autokrin, parakrin und endokrin. Die Punkte in einzelnen Kästen sollen verdeutlichen, dass es mit großer Wahrscheinlichkeit noch weitere Effekte gibt.

Zwischen den Zellen des Tumors herrscht ein kontinuierlicher wechselseitiger Austausch von Faktoren über Exosomen, der die Progression lokal in Form von vermehrter Proliferation, Migration und EMT, aber auch entfernt durch Bildung einer prä-metastatischen Nische begünstigt [72, 149-152].

Tumor-assoziierte Exosomen können autokrin wirken, wodurch tumorfördernde Prozesse innerhalb der Tumorzellen beeinflusst werden. Durch die Aufnahme von tumor-assoziierten Exosomen kann es zur EMT kommen, die mit der Änderung des zellulären Phänotyps einhergeht. Die daraus resultierende vermehrte Migration und Invasion begünstigt wiederum die Tumorausbreitung und die Metastasierung. Weiterhin können Tumorzellen durch die Sezernierung von Exosomen schnell und effektiv auf sich ändernde Umgebungsbedingungen wie Hypoxie reagieren. Infolgedessen wird eine verminderte Streß-induzierte Apoptose verbunden mit einer vermehrten Tumorzellproliferation und -invasion verursacht [153]. Die Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika, Bestrahlung und zielgerichteten Therapien ist ein häufiges Problem in der Behandlung, bei der Exosomen eine ebenso bedeutende Rolle spielen [147, 154, 155].

Neben der autokrinen Wirkung können tumor-assoziierte Exosomen parakrin auf Zellen in der TME wirken. Neoplastische Transformationen, bei denen gesunde Zellen ihren normalen Phänotyp verlieren, sind ein initialer Schritt in der Tumorgenese und können durch die Internalisierung von tumor-assoziierten Exosomen induziert werden [156-158]. Folglich ändert sich der Phänotyp hin zu einem aggressiven, malignen und eine onkogenetische Transformation erfolgt [159].

Durch exosomale Stimulation kommt es zur vermehrten Rekrutierung von mesenchymalen Stammzellen (MSC) aus dem Knochenmark zum Primärtumor oder zur Bildung einer prä-metastatischen Nische [160, 161]. MSC sind eine sehr heterogene Zellpopulation, die sich in Abhängigkeit von ihrem umgebenden Gewebe und bestimmter Stimuli in verschiedene Zelltypen differenzieren. Tumor-assoziierte Exosomen sind maßgeblich an der Differenzierung von MSCs in Endothelzellen, Fibroblasten und TAFs beteiligt. Durch das vermehrte Vorhandensein von Zellen der TME wird eine vermehrte Sezernierung von tumor-assoziierten Faktoren verursacht, die wiederum zur Remodellierung und Degradation der EZM, gesteigerter Angiogenese, erhöhter Migrations- und Invasionsfähigkeit der Tumorzellen und letztendlich zur Generierung optimaler Bedingungen für die Progression des Tumors führen [146, 162-164]. Neben der Differenzierung von MSCs zu Endothelzellen stimulieren tumor-assoziierte Exosomen die Angiogenese sowohl durch den Transfer von pro-

angiogenen Faktoren (VEGF; FGF; EGFR (*epidermal growth factor receptor*); IL-6/8) als auch mRNAs und miRNAs [131, 165-167]. Unter normalen Bedingungen würde die körpereigene Immunantwort durch Makrophagen-induzierte Zerstörung der Tumorzellen oder die Aktivierung der T-Zellen die Ausbreitung des Tumors hemmen. Tumor-assoziierte Exosomen können dies durch ihre inhibitorische oder auch aktivierende Wirkung beeinflussen [144, 168-170]. Durch Sekretion von pro-entzündlichen Zytokinen kommt es zu einer chronischen Entzündung des Tumors einhergehend mit einer vermehrten Rekrutierung, Aktivierung und Proliferation von Fibroblasten [70, 78, 169]. Die kontinuierliche exosomale Sezernierung von Stroma-modulierenden Faktoren führt zur permanenten Aktivierung von TAFs, die durch vermehrte Sekretion von Proteasen dauerhaft die Remodellierung der EZM induzieren [73, 133, 171-173]. Es entsteht ein immer wiederkehrender Kreislauf, der zur Folge hat, dass der Tumor stetig seine TME verändert und somit optimale Bedingungen für die Ausbreitung generiert. Der Einfluss besteht wechselseitig, das bedeutet tumor-assoziierte Exosomen stimulieren Zellen der TME, aber Exosomen sezerniert von der TME ebenso Tumorzellen, wodurch die Tumorprogression weiter begünstigt wird [69, 133, 149, 174].

Exosomen können nicht nur in die direkte Umgebung sezerniert werden, sondern auch in die Zirkulation abgegeben werden und systemisch an entfernten Orten (z. B. Lunge; Gehirn; Leber) Prozesse beeinflussen [115, 175-178]. Dort lagern sie sich organspezifisch an und können durch den Transfer von Proteinen, miRNA und mRNAs eine Verschiebung der zellulären Bedingungen induzieren resultierend in der Vorbereitung einer prä-metastatischen Nische ähnlich der „*Seed and Soil*“-Hypothese von Paget et al. [115, 178, 179]. Die zirkulierenden Exosomen bilden dabei ein Gemisch aus Exosomen sezerniert von Tumorzellen und anderen Zellen (z. B. Immunzellen, Fibroblasten, Endothelzellen).

Tumor-assoziierte Exosomen spiegeln zum Teil die molekulare Signatur (DNA-; RNA-; Proteinebene) des Primärtumors wider, weshalb sie ein großes Potenzial als diagnostische und prognostische Biomarker auch für das Harnblasenkarzinom besitzen [121, 131, 180-182]. Sie können auch im Bereich der Tumorthherapie Anwendung finden, indem sie für zielgerichtete Therapien als natürliche Träger von Medikamenten verwendet werden [128, 183, 184].

Für das Harnblasenkarzinom sind bislang nur wenige Daten zur funktionellen Bedeutung von Exosomen bekannt. Initiale Studien demonstrieren, dass Exosomen aus aggressiven Harnblasenkarzinomen sowohl die Migration und Invasion von normalen Urothelzellen und Harnblasenkarzinomzellen als auch die Angiogenese beeinflussen, wodurch die Tumorgenese

und –progression beeinflusst werden kann [185, 186]. Inwieweit dabei die Invasivität der Harnblasenkarzinomzellen eine funktionelle Rolle in der Tumor-TME-Interaktion spielt und welchen Einfluss diese auf Zellen der TME haben, ist unbekannt. An anderen Tumorentitäten wurde bereits bestätigt, dass die molekulare Zusammensetzung der Ausgangszelle sich in ihren Exosomen widerspiegelt, wodurch sie als mögliche diagnostische oder prognostische Biomarker geeignet sein können. Die Datenlage zum Harnblasenkarzinom lässt zum jetzigen Zeitpunkt keine klaren Aussagen darüber treffen, inwieweit sich zelluläre Signaturen in Exosomen wiederfinden lassen und ob diese exosomalen Signaturen als potentielle Biomarker anwendbar sind. Neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet könnten zu einem besseren Verständnis über die Tumor-TME-Interaktion und Metastasierung des Harnblasenkarzinoms beitragen. Dies kann Ausgangspunkt für weiterführende Studien sein, in denen potenzielle Biomarker in Form von „*liquid biopsies*“ untersucht werden.

4 Zielstellung

Die Interaktion von Tumorzellen mit den Zellen der Tumormikroumgebung stellt eine essentielle Voraussetzung für die Tumorprogression und Metastasierung dar. Diese wird neben löslichen Faktoren auch über Exosomen, die von Tumorzellen aktiv sezerniert werden, gesteuert. MiRNAs, welche maßgebliche Regulatoren der posttranskriptionalen Genregulation sind, werden in hohen Mengen in Exosomen verpackt. Durch den exosomalen Transfer spielen sie eine wichtige Rolle sowohl in der lokalen Interaktion von Tumorzellen und ihrer direkten Tumormikroumgebung als auch bei der systemischen Interaktion von Tumorzellen zur Generierung einer prä-metastatischen Nische. Die in die Zirkulation sezernierten Exosomen können aus allen Körperflüssigkeiten isoliert und als potenzielle diagnostische und prognostische Biomarker verwendet werden.

Es wurden bereits einige invasions-assoziierte miRNAs in muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen identifiziert. Dagegen ist ihre funktionelle Bedeutung in der Tumorgenese und Metastasierung nur wenig untersucht. Dabei könnten sie nicht nur als Biomarker in Primärtumorgewebe, sondern auch als nicht invasive Biomarker durch die Analyse von Exosomen aus Körperflüssigkeiten eine Anwendung finden.

Zur Überprüfung dieser Hypothese ist es von essentieller Bedeutung zu untersuchen, inwieweit sich die miRNA-Signatur von Harnblasentumoren invasionsabhängig in ihren Exosomen widerspiegelt. Daher ist das erste Ziel dieser Arbeit die Identifizierung invasions-assoziiierter miRNA-Expressionssignaturen in Harnblasenkarzinomzelllinien und in den durch sie sezernierten Exosomen. Basierend darauf soll die Anwendbarkeit exosomaler miRNAs als diagnostische Biomarker in Körperflüssigkeiten (Urin) überprüft werden.

Das Verständnis der komplexen tumorbiologischen Prozesse und der zugrundeliegenden interzellulären Kommunikation, auch über Exosomen, ist eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung von neuen Therapieansätzen. Daher besteht ein weiteres Ziel darin, den funktionellen Einfluss tumor-assoziiierter Exosomen auf normale Harnblasenfibroblasten zu analysieren.

Zur Beantwortung der Fragestellungen sollen folgende Aufgaben bearbeitet werden:

1. Die Exosomen-Isolierung aus Zellkulturüberständen von Harnblasenkarzinomzelllinien soll unter Verwendung der Ultrazentrifugation und einer Kit-basierten Präzipitationsmethode optimiert werden.

2. Basierend auf miRNA-Expressionsanalysen sollen invasions-assoziierte miRNA-Signaturen von Harnblasenkarzinomzelllinien und ihren Exosomen identifiziert und validiert werden.
3. Die in vitro ermittelten, invasions-assoziierten miRNAs sollen an Patienten-abgeleiteten Tumorgewebeprobe n überprüft werden.
4. Die potentielle Eignung exosomaler miRNAs als diagnostische Biomarker soll für ausgewählte miRNAs in Urinexosomen von Harnblasenkarzinompatienten geprüft werden.
5. Die zeitabhängige Internalisierung tumor-assoziiierter Exosomen in normalen Fibroblasten soll analysiert werden.
6. Durch transiente Überexpression einer nicht humanen miRNA in den Harnblasenkarzinomzelllinien und anschließenden Ko-Kulturversuchen soll der exosomale miRNA-Transfer zwischen Harnblasenkarzinomzellen und Fibroblasten dargestellt werden.
7. Der funktionelle Einfluss tumor-assoziiierter Exosomen auf das Migrations- und Proliferationsverhalten normaler Harnblasenfibroblasten soll in Abhängigkeit vom Invasionspotenzial der Ausgangszelllinien untersucht werden.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Patientenkohorte

Die Patienten wurden aus der Datenbank der Klinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums des Saarlandes ausgewählt. In der Datenbank waren alle notwendigen klinischen Daten, wie Histologie des Tumors, TNM-Klassifizierung, weitere Erkrankungen verfügbar. In die Analysen wurden nur Patienten eingeschlossen, bei denen zum Zeitpunkt der Probengewinnung keine weiteren Tumorerkrankungen bekannt waren. Alle Patienten haben eine Einverständniserklärung zur Verwendung der Proben für Forschungszwecke abgegeben. Die Studie wurde von der Ethikkommission genehmigt und erfolgte unter Einhaltung der ethischen Richtlinien der Helsinki Vereinbarung (Ethikvoten: 141/14; 162/13). In Tabelle 1 sind die klinisch-pathologischen Charakteristika der verwendeten Patientenproben dargestellt. Für die Analyse der Primärtumore wurden Formalin-fixierte in Paraffin eingebettete (FFPE) Probenblöcke und für Urinexosomen wurde der eingefrorene Urinüberstand verwendet. Die histopathologischen Daten wurden vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes erhoben.

Tabelle 1: Klinisch-pathologische Parameter der Patientenkohorte

Probenmaterial		Tumorgewebe	Urinexosomen
Anzahl		(n = 24)	(n = 21)
Alter	Mean/Median	68/68 (48-83)	68/70 (53-83)
Geschlecht	Männlich	17	15
	Weiblich	7	6
T	pTa	10	3
	pT1	0	4
	pT2	5	5
	pT3	5	7
	pT4	4	2
N	N0	7	7
	N+	5	4
	NX	12	10
Grading	G1	4	0
	G2	7	7
	G3	13	14

5.1.2 Verwendete Zelllinien

Die *in vitro* Versuche wurden unter Verwendung verschiedener Harnblasenkarzinomzelllinien (UBC), normaler Harnblasenzellen, hTERT-immortalisierter Vorhautfibroblasten (hTERT-FB), primärer normaler Harnblasenfibroblasten (HBF), sowie TAFs durchgeführt (Tab. 2). Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit zellspezifischem Medium plus 10 % fetalem Kälberserum (FKS) (Komplett-Medium) [Sigma Aldrich] bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Dabei wurde für die Zelllinien RT112 und 5637 RPMI [Sigma Aldrich], für T24, 253J-BV, HCV29, TAFs und hTERT-FB DMEM [Sigma] und für die Zelllinie J82 MEM Medium [Sigma Aldrich] verwendet. *Low-serum* FibroLife Medium [Cellsystems] plus spezielle Zusätze wurde für die primären HBF genutzt. Die verwendeten UBC-Zelllinien stammen aus verschiedenen Primärtumoren und weisen spezifische Charakteristika auf (Tab. 2).

Tabelle 2: Charakteristika der verwendeten Harnblasenzelllinien und Fibroblasten

Transitional cell carcinoma (TCC), Mutation (Mut), Harnblasenfibroblasten (HBF), Fibroblasten (FB), Tumor-assoziierte Fibroblasten (TAF), w = weiblich, m = männlich [187-191]

Zelllinie	Patientendaten	Ursprung	Zelltyp	Besonderheiten
RT112	W kaukasisch	TCC Ta G2, low grade	Epithelzellen nicht invasiv	tumorgenetisch, TERT Mut, Amplifikation von FGFR3, FGFR3-TACC Fusion, homozygote Deletion von INK4A CN
5637	M 68 Jahre kaukasisch	TCC G2, low grade	Epithelzellen nicht invasiv	tumorgenetisch, TERT Mutation, Produktion von Wachstumsfaktoren IL-1, IL-6
T24	W 81 Jahre kaukasisch	TCC G3, high grade	Epithelzellen invasiv	TERT-Mut, Verlust der Heterozygotität von INK4A, Missenses-Mut von PTEN, p53
J82	M 58 Jahre kaukasisch	TCC T3 G3, high grade	Epithelzellen invasiv	tumorgenetisch, TERT und PTEN Mut, Kreuzkontamination mit T24 Zellen, PIK3CA Mut
253J-BV	M 53 Jahre	TCC T4, multiple Tumore G4, high grade	Epithelzellen invasiv	tumorgenetisch, generiert durch 5-malige Inokulation <i>in vivo</i> in die Maus, Ausgangszellen TERT Mut
HCV29		Urothel	Epithelzellen	Generiert aus dem normalen Harnblasenepithel einer tumortragenden Harnblase
normale HBF	M 30 Jahre kaukasisch	Urothel	Fibroblasten	
hTERT-FB		Vorhaut	Fibroblasten	Name: BJ1
TAF		Urothelkarzinom	Fibroblasten	Zell-ID: BF50

5.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Konzentration, Format	Hersteller
BD Bio Coat matrigel Invasions Chamber	6-Well	BD Biosciences
BioTrace PVDF Trägermembran	0,45 µm	PALL GmbH
CIM-Platten		OMNI Life Sciences
Deckfolien PCR-Platten		Biozym Scientific GmbH
Deckglas, eben	170 ± 55 µm	Carl Roth GmbH +Co. KG
DNA/RNA Lobind Reaktionsgefäße	0,2; 0,5; 1,5; 2; 5 ml	Eppendorf AG
Filterpapier		Serva
Gasket Slides		Agilent Technologies
Kanülen		Sarstedt AG & Co.
Kryoröhrchen		Greiner Bio-One
Oligo Microarrays miRNA 8x60k, v16		Agilent Technologies
Pasteurpipetten, Glas		Carl Roth GmbH +Co. KG
PCR-Platten 96-Well		Biozym Scientific GmbH
Pierce Concentrator (100 k)		Thermo Fisher Scientific
Pipetten		Eppendorf AG
Pipettenspitzen		Eppendorf AG
Serologische Pipette	1; 2,5; 10; 25 ml	Sarstedt AG & Co.
Skalpell		Sarstedt AG & Co.
Spritzen	2; 5; 10; 25 ml	Sarstedt AG & Co.
Sterilfilter	0,22 µm	Merck Millipore
Transwell-Inserts (Porengröße: 8 µm)	12 Well	Corning
Ultrazentrifugenröhrchen		Beckman Coulter
Zellkulturflaschen	25; 75; 150; 300 cm ²	Corning
Zellkulturplatten	6; 12; 24; 48; 96 Well	Corning
Zellzählchip		Biozym Scientific GmbH
Zentrifugenröhrchen	15; 50ml	Sarstedt AG & Co.

5.1.4 Kits

Tabelle 4: Kits

Kit	Hersteller
Cell Proliferation ELISA BrdU (Colometric)	Roche Diagnostics Deutschland GmbH
miRNA Complete Labeling and Hyb Kit	Agilent Technologie
MiRNA Spike-In Kit	Agilent Technologie
miRNeasy FFPE Kit	Qiagen
Pierce TM BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
PKH26 Red cell Linker Kit	Sigma Aldrich GmbH
RNeasy Mini Kits	Qiagen
ServaLight Polaris CL HRP WB Substrate Kit	Serva
TaqMan Gene Expression Master MixKit	Applied Biosystems
TaqMan microRNA RT Kit	Applied Biosystems
TaqMan PreAmp Master Mix Kit	Applied Biosystems
Total exosome isolation (from urine)	Life Technologies
Total exosome isolation for cell culture medium kit	Life Technologies
WST-1 Assay	Roche Diagnostics Deutschland GmbH

5.1.5 Chemikalien

Tabelle 5: Chemikalien

Chemikalie	Konzentration	Hersteller
Acid-Phenol/Chlorophorm		Ambion
Acrylamid/Bis-Lösung (30 % w/v) 37.5:1		Serva
Albumin Bovin Fraktion (BSA)		Serva
Ammoniumpersulfat (APS)		Serva
Antifade Mountain Shield Medium mit DAPI		Vector Laboratories
Aphidikulin		Calbiochem
Bromphenolblau		Serva
CHAPS		Sigma Aldrich GmbH
Coomassieblau Brilliant Blue R Lösung		Serva
Desinfektionsmittel Descocept		Dr. Schumacher GmbH
Dimethylsulfoxid		Sigma Aldrich GmbH
Dinatriumhydrogenphosphat		Sigma Aldrich GmbH
Dithiotriol (DTT)		Serva
Essigsäure	10 %	Merck
Ethanol, reinst	99,5 %	Merck
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)		Sigma Aldrich GmbH
Fetales Kälberserum		Sigma Aldrich GmbH
Gelantine		Sigma Aldrich GmbH
Glutaraldehyd		Merck Millipore
Glycin		Sigma Aldrich GmbH
Immersionsöl		Carl Zeiss GmbH
Kaliumchlorid		Sigma Aldrich GmbH
Kaliumhydrogenphosphat		Sigma Aldrich GmbH
Kristallviolett	0,1 %	Carl Roth GmbH + Co. KG
Magermilchpulver		Serva
Methanol	100 %	Merck
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamin (TEMED)		Serva
Natriumchlorid		Sigma Aldrich GmbH
Natriumdodecylsulfat (SDS)		Serva
Paraformaldehyd		Sigma Aldrich GmbH
Phosphatgebufferte Salzlösung (PBS)		Sigma Aldrich GmbH
RNase-freies Wasser, DEPC-behandelt		Ambion
Penicillin/Streptomycin		Sigma Aldrich GmbH
Triple Color Protein Standard II		Serva
Tris		Serva
Triton X-100		Sigma Aldrich GmbH
Tryphanblau		Sigma Aldrich GmbH
Tween 20		Sigma Aldrich GmbH
Uranlyoxalat		VWR
Waschpuffer 1		Agilent Technologies
Waschpuffer 2		Agilent Technologies
Xylol	100 %	Merck

5.1.6 Antikörper, Enzyme, Medium und Primer

Tabelle 6: Antikörper, Enzyme, Medium und Primer

TaqMan MicroRNA Assays	Hersteller
cel-miR-39-3p	Applied Biosystems
miR-137-3p	Applied Biosystems
miR-141-3p	Applied Biosystems
miR-145-5p	Applied Biosystems
miR-200a-3p	Applied Biosystems
miR-205-5p	Applied Biosystems
miR-27b-5p	Applied Biosystems
miR-30a-3p	Applied Biosystems
miR-99a-5p	Applied Biosystems
RNU48	Applied Biosystems
RNU6B	Applied Biosystems
Medium	Hersteller
DMEM, 4,5 g Glukose	Sigma Aldrich GmbH
Low-Serum FibroLife Complete	Cellsystems
MEM	Sigma Aldrich GmbH
OptiMEM	Gibco Invitrogen
RPMI, 2 g Glukose	Sigma Aldrich GmbH
Enzyme, Inhibitoren	Hersteller
Proteaseinhibitoren Mix HP	Serva
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher
RNase One Ribonuclease	Promega
RNaseZap	Sigma Aldrich GmbH
Trypsin/EDTA	Sigma Aldrich GmbH
Antikörper	Hersteller
Alexa Fluor 488-Phalloidin	Thermo Fisher
Alix	Abcam
Anti-Hase-HRP-gekoppelt	Cell Signaling
Anti-Maus-HRP-gekoppelt	Cell Signaling
CD63	Santa Cruz
CD81	Santa Cruz
GAPDH	Cell Signaling
Syntenin	Abcam
Transfektionsreagenzien	Hersteller
Lipofectamine 2.000	ThermoFisher Scientific
Mimic	Hersteller
miRVana mimic cel-miR-39-3p	Ambion
Cy3-scrambled miRNA	Ambion

5.1.7 Allgemeine Puffer und Lösungen

Tabelle 7: Allgemeine Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Konzentration	Reagenz
Lysepuffer ($pH = 7,6$)	50 mM 150 mM 1 % (v/v) 1 % (v/v) 0,1 % (v/v) 1 x	Tris NaCl Triton X-100 CHAPS SDS Protease-Inhibitoren Mix
4x Trenngelpuffer ($pH = 8,8$)	1,5 M	Tris
4x Sammelgelpuffer ($pH = 6,8$)	0,5 M	Tris
10x Laufpuffer	0,5 M 1,92 M 1 %	Tris Glycin SDS
6x Probenpuffer - reduziert ($pH = 6,8$)	0,5 M 30 % (v/v) 10 % (m/v) 600 mM Spatelspitze	Tris Glycin SDS DTT Bromphenolblau
6x Probenpuffer – nicht reduziert ($pH = 6,8$)	0,5 M 30 % (v/v) 10 % (m/v) Spatelspitze	Tris Glycin SDS Bromphenolblau
Sammelgel - 12,5 %iges Arcylamidgel	420 μ l 1,4 ml 625 μ l 25 μ l 3,75 μ l 15 μ l	30 % A/B ddH ₂ O 4x Sammelgelpuffer 10 % SDS TEMED 10 %APS
Trenngel - 12,5 %iges Arcylamidgel	4,20 ml 3,10 ml 2,50 ml 100 μ l 15 μ l 60 μ l	30 % A/B ddH ₂ O 4x Trenngelpuffer 10 % SDS TEMED 10 %APS
Transferpuffer	48 mM 39 mM 15 % (v/v)	Tris Glycin Methanol
10x TBS-Tween ($pH = 7,6$)	248 mM 1,37 M 1 % (v/v)	Tris NaCl Tween 20
BSA-Blocklösung	1x 1-5 %	TBS-Tween BSA
Milch-Blocklösung	1x 1-5 %	TBS-Tween Magermilchpulver
10x NETG-Blocklösung ($pH = 7,5$)	0,5 M 1,5 M 50 mM 0,5 % (v/v) 0,4 % (m/v)	Tris NaCl EDTA Tween 20 Gelantine

5.1.8 Geräte

Tabelle 8: Geräte

Gerät	Hersteller
DNA Microarray Scanner G2565BA	Agilent Technologies
Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH
Fusion SL	Vilber Lourmat
Heizblock, Thermozykler	Eppendorf AG
Hybridisierungsofen G2545A	Agilent Technologies
Infinite F200pro	Tecan
Inkubator	Memmert
Laser Scanning Mikroskop LSM780	Carl Zeiss GmbH
Lichtmikroskop	Carl Zeiss GmbH
NanoDrop ND-1000	PeqLab Biotechnology GmbH
NanoSight LM 10	Malvern
Real-time Cell Analyzer (RTCA), xCELLigence	ACEA Biosciences
Rotor Typ 70 Ti	Beckman Coulter
Schüttler	Bio-Rad Laboratories GmbH
Spektrometer Infiniti F200 pro	Tecan
StepONE Plus	Life Technologies
Thermozykler Uno II	Biometra
Trans-Blot SD semi-dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH
Transemmissionselektronenmikroskop	Carl Zeiss GmbH
Ultrazentrifuge L-80	Beckman Coulter
Vakuumzentrifuge	Chaist
Zellzählgerät Luna	Biozym Scientific GmbH
Zentrifuge	Eppendorf AG

5.1.9 Datenbank und Computersoftware

Tabelle 9: Datenbank und Computersoftware

Software	Hersteller
IBM SPSS Statistics 23	IBM SPSS GmbH
Feature Extraction	Agilent Technologies
Fusion SL	Vilber Lourmat
NTA 3.2	Malvern
Open-source xCELLigence System Data Analysis	ACEA Biosciences
Qlucore Omics Explorer 3.2	Qlucore
REST Version 2009	Qiagen
StepONE Plus v2.3	Life Technologies
TEM Software	Carl Zeiss GmbH
Zen 2012 Lite	Carl Zeiss GmbH

5.2 Allgemeine Zellkulturmethoden

5.2.1 Subkultivierung von Zellen

Die Zellen wurden bei einer maximalen Konfluenz von 80-90 % passagiert. Das Medium wurde vollständig entfernt und die Zellen mit PBS [Sigma Aldrich GmbH] gewaschen. Anschließend wurden je nach Größe der Flasche unterschiedliche Volumina von Trypsin/EDTA [Sigma Aldrich GmbH] ($25\text{ cm}^2 = 0,5\text{ ml}$; $75\text{ cm}^2 = 1,5\text{ ml}$; $150\text{ cm}^2 = 2,5\text{ ml}$; $300\text{ cm}^2 = 5\text{ ml}$) zugegeben und bis zum vollständigen Ablösen der Zellen im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden mit Komplett-Medium in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und bei 300 g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in neuem Komplett-Medium aufgenommen und in dem gewünschten Volumen in eine neue Zellkulturflasche oder in weitere Assays überführt.

5.2.2 Kryokonservierung

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen wie unter 5.2.1 abgelöst und zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in 2 ml DMEM mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) [Sigma Aldrich GmbH] und 30 % FKS resuspendiert. Die Suspension wurde in ein 2 ml Kryoröhrchen pipettiert und schnell bei -80 °C eingefroren. Für Langzeitlagerung wurde die Kryokonserven aus dem -80 °C Tiefkühlschrank in den Stickstofftank überführt.

5.2.3 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden schnell aufgetaut, in 5 ml Komplett-Medium resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen gegeben, anschließend bei 300 g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in den gewünschten Volumina Komplett-Medium resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche überführt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO_2 . Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

5.2.4 Zellzählung

Für verschiedene Untersuchungen war es notwendig, eine bestimmte Zellzahl einzusetzen, welche mit Hilfe des automatisierten Luna Zellzählers [Biozym Scientific GmbH] bestimmt wurde. Für die Messung wurden die Zellen wie unter 5.2.1 abgelöst und resuspendiert. $10\text{ }\mu\text{l}$ der Zellsuspension wurden mit $10\text{ }\mu\text{l}$ Trypanblau [Sigma Aldrich GmbH] gemischt und auf einen Zellzählchip [Biozym Scientific GmbH] gegeben. Mit Hilfe des Zellzählgerätes wurden

die Gesamt- und Lebendzellzahl der Zellen gemessen. Die Lebendzellzahl wurde für die Berechnung der Zielzellkonzentrationen verwendet.

5.2.5 Zellvitalitätstest

Für die Isolierung von Exosomen wurden die Zellen über verschiedene Zeiträume in Medium mit 10 % Exosomen-freiem FKS (ED-Medium) kultiviert. Das Exosomen-freie FKS (ED-FKS) wurde wie unter 5.3.1 beschrieben hergestellt. Nach der Zentrifugation bei so hohen Geschwindigkeiten kann es sein, dass neben Exosomen auch andere für das Zellwachstum wichtige Faktoren sedimentiert werden und sich das Wachstumsverhalten der Zellen verändern kann. Die Zellvitalität unter Verwendung von ED-Medium wurde verglichen zu Komplett-Medium mit Hilfe des WST-1 Assays [Roche Diagnostics Deutschland GmbH] untersucht.

Für die Messung wurden 5×10^3 Zellen der unterschiedlichen Zelllinien pro Well in technischen Triplikaten in eine 96-Wellplatte eingesät. Die Zellvitalität wurde über die Zeiträume 24 h, 48 h und 72 h gemessen. Dazu wurden die Zellen wie unter 5.2.1 und 5.2.4 abgelöst, gezählt und in Komplett-Medium eingesät. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Medium abgenommen und die Zellen 3-mal mit 200 µl PBS gewaschen. Danach wurden 200 µl Komplett-Medium oder ED-Medium zu den Zellen gegeben und für die entsprechenden Zeiten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Zellvitalität nach Herstellerangaben untersucht. Die Messung erfolgte bei einer Messwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm im Spektrometer Infinite F200 pro [Tecan] zum Zeitpunkt 0 h (Blank) und 2 h. Neben 3 technischen Replikaten wurden jeweils 3-5 biologische Replikate der einzelnen Zelllinien analysiert.

Für die Berechnung der Zellvitalität wurde der Mittelwert aus allen technischen Replikaten zum jeweiligen Zeitpunkt 0 h und 2 h gebildet. Anschließend wurde der Mittelwert (Blank) vom Messwert 2 h abgezogen. Die Zellvitalität unter ED-Medium verglichen zum Komplett-Medium wurde prozentual nach folgender Formel berechnet, statistisch mittels Mann-Whitney U Test mit IBM SPSS Statistics 23 [IBM SPSS GmbH] ausgewertet und in Balkendiagrammen dargestellt.

$$\text{Vitalität [\%]} = \left(\frac{\text{Absorption}_{\text{ED-Medium}}}{\text{Absorption}_{\text{Komplett-Medium}}} \right) * 100\%$$

5.2.6 Invasionsassay

Die Invasionsfähigkeit der UBC-Zellen wurde unter Verwendung der *Bio Coat Matrigel Invasion Chambers* [BD Biosciences] im 6-Well-Format durchgeführt. Dieses System besteht aus zwei Kammern, die durch eine Membran mit 8 µm großen Poren getrennt sind. In der oberen Kammer befindet sich zusätzlich eine gleichmäßige Schicht aus Matrigel über den Poren. Die Inserts mussten zunächst rehydriert werden, indem 2 ml PBS in die unteren Kammern und 2 ml PBS in die oberen Kammern gegeben wurde. Anschließend erfolgte die Rehydrierung bei 37 °C und 5 % CO₂ für 2 h.

In der Zwischenzeit wurden die UBC-Zellen wie unter 5.2.1 abgelöst und nach 5.2.4 gezählt. Das PBS wurde entfernt und die Wells wie folgt befüllt. Die untere Kammer wurde mit 2 ml Komplet-Medium gefüllt. 2 x 10⁶ UBC-Zellen wurden in 1,6 ml FKS-freiem Medium in die obere Kammer des Wells eingesät. Der dadurch entstandene FKS-Gradient diente als Chemoattraktionsmittel. Um Proliferationseinflüsse auszuschließen wurden 7 µg/ml Aphidikulin [Calbiochem] in die obere und untere Kammer hinzugegeben. Aphidikulin ist ein tetrazyklisches Diterpen, welches aus dem Pilz *Cephalosporium aphidicola* stammt. Diese Substanz blockiert die Zellteilung, indem die DNA-Polymerase reversibel gehemmt wird. Anschließend wurde die Zellkulturplatten 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Wells oben und unten 3-mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 75 %igem Ethanol für 20 min bei 4 °C fixiert. Der Boden des Inserts wurde 2-mal mit destilliertem Wasser (Aqua d.) gewaschen. Die Reste von Matrigel, Zellen und Medium in der oberen Kammer wurden entfernt. Die invadierten Zellen auf dem Boden der Inserts wurden 5 min mit 0,1 %iger Kristallviolett-Lösung gefärbt. Die Inserts wurden danach 3-mal mit Aqua d. gewaschen, um Reste des Kristallvioletts zu entfernen. Anschließend wurden die invadierten Zellen mit 800 µl 10 %igem Eisessig lysiert und jede Probe in Triplikaten gemessen. Dazu wurde je 100 µl der Lösung in ein Well einer 96-Wellplatte pipettiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm im Spektrometer Infinite F200 pro [Tecan] gemessen. Als Blank diente 10 %iger Eisessig. Der Invasionsassay wurde pro Zelllinie in mind. 3 unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt.

Für die Berechnung der Invasion wurde der Mittelwert des Blank von allen Rohwerten (Absorption) abgezogen. Die Absorptionswerte aus allen Ansätzen wurden gemittelt und deren Standardabweichung bestimmt. Die Ergebnisse wurden im Balkendiagramm dargestellt.

5.3 Isolation von Exosomen

5.3.1 Herstellung von Exosomen-freien Medium

In den durchgeführten Versuchen wurde sowohl Komplett-Medium als auch zellspezifisches Medium mit 10 % ED-FKS verwendet. FKS enthält neben Wachstumsfaktoren, Hormonen und Nährstoffen auch Exosomen. Diese Exosomen können in weiteren Analysen eine Verschiebung der Ergebnisse induzieren, weshalb sie aus dem FKS entfernt werden müssen. Das normale FKS wurde daher bei 4 °C und 200.000 g für mind. 18 h zentrifugiert, um ED-FKS herzustellen. Der Überstand wurde mit einem 0,22 µm Filter steril filtriert.

5.3.2 Isolation von Exosomen aus Zellkulturüberständen

Vor der Exosomen-Isolation wurden die Zellen in 300 cm² Zellkulturflaschen unter normalen Bedingungen kultiviert. Der Wechsel auf ED-Medium erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 40-50 %. Das Medium wurde entfernt und die Zellen 3-mal mit 10 ml PBS gewaschen. Im Anschluss wurden 30 ml ED-Medium zu jeder Flasche gegeben und für 24-72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen, welche eine Konfluenz von ca. 80-90 % hatten, wurden wie unter 5.2.1 abgelöst, zentrifugiert und konnten für eine erneute Exosomen-Isolation eingesät werden.

Der Zellkulturüberstand enthält neben Exosomen auch eine Vielzahl anderer Bestandteile, wie Zellen, Zellfragmente, apoptotische Körper, größere MV, die weiterführende Analysen verunreinigen können und vor der Isolation entfernt werden müssen. Der Zellkulturüberstand wurde deshalb differentiell zentrifugiert. Zunächst wurden Zellen und Zellfragmente durch Zentrifugation bei 2.000 g und 4 °C für 20 min entfernt. Nachdem der Zellkulturüberstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt worden war, wurde er bei 15.000 g und 30 min und 4 °C zentrifugiert. Nach der differentiellen Zentrifugation konnten die Exosomen mit Ultrazentrifugation (UC) bzw. dem Isolationsreagenz für Zellkulturmedium (Kit) isoliert werden.

5.3.2.1 Ultrazentrifugation

Für die Isolation wurden unterschiedliche Volumina (50-100 ml) des Zellkulturüberstandes verwendet, um eine ausreichende Menge an Exosomen zu erhalten. Nachdem der Zellkulturüberstand wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben zentrifugiert wurde, konnte 25 ml Überstand in ein UC-Röhrchen [Beckman Coulter] überführt und bei 100.000 g

und 4 °C für 1 h 30 min in der Ultrazentrifuge L-80 [Beckman Coulter] mit dem Rotor Typ 70 Ti [Beckman Coulter] zentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen und abermals 25 ml Zellkulturüberstand zugegeben und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt bis der gesamte Zellkulturüberstand zentrifugiert wurde. Das entstandene Exosomenpräzipitat wurde mit PBS gewaschen. Dazu wurde der Überstand restlos abgenommen und das Pellet in 25 ml PBS gelöst und erneut bei 100.000 g und 4 °C für 1 h 30 min zentrifugiert. Das PBS wurde komplett entfernt und das Exosomenpräzipitat, je nach Folgeversuch, direkt lysiert oder in 50 µl bis 1 ml PBS gelöst. Die gelösten Exosomen konnten für eine begrenzte Zeit bei 4 °C gelagert werden.

5.3.2.2 Total Exosome Isolation Kit

Exosomen wurden auch mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits isoliert. In dieser Arbeit wurde das *Total Exosome Isolation (from cell culture medium)* Kit [Life Technologies] mit einem angepassten Isolationsprotokoll verwendet. 25 ml des Zellkulturüberstandes nach 15.000 g Zentrifugation wurden 1 zu 1 mit dem Isolationsreagenz gemischt und anschließend nach Angaben des Herstellers isoliert. Das entstandene Präzipitat wurde direkt lysiert oder in PBS gelöst und konnte eine begrenzte Zeit bei 4 °C gelagert werden.

5.3.3 Isolation von Exosomen aus Urinen von Harnblasenkarzinompatienten

Das *Total Exosome Isolation (from urine)* Kit [Life Technologies] wurde mit einem angepassten Protokoll für die Isolation von Exosomen aus Urinen von MIBC- und NMIBC-Patienten verwendet. 2 ml Urin wurden bei 2.000 g und 4 °C für 20 min zentrifugiert, um Zellen zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und 30 min bei 15.000 g und 4 °C zentrifugiert. Nachdem der Überstand 1 zu 1 mit dem Isolationsreagenz gemischt wurde, erfolgte die Isolation nach Angaben des Herstellers. Das entstandene Präzipitat wurde entweder direkt lysiert oder in PBS gelöst. Die Probe konnte eine begrenzte Zeit bei 4 °C gelagert werden.

5.4 Charakterisierung von Exosomen

5.4.1 Proteinbiochemische Analysen von UBC-Zellen und ihren sezernierten Exosomen

Die Ausgangszellen und ihre sezernierten Exosomen wurden mit Hilfe von Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), gefolgt von Western Blot auf das Vorhandensein typischer exosomaler Proteinmarker (Syntenin [Abcam], CD81 [Santa Cruz], Alix [Abcam]) und möglicher zellulärer Kontamination mit dem endoplasmatischen Protein Calretikulin [Cell Signaling] untersucht. Die Zusammensetzung der unter diesem Abschnitt verwendeten Puffer, Lösungen und Gele befindet sich im Abschnitt 5.1.7.

Zunächst wurden die Zellen wie unter 5.2.1 geerntet und 3-mal mit PBS gewaschen. Die Zellpellets und Exosomen wurden mit 30-100 μ l Lysierungspuffer mit Proteaseinhibitoren [Serva] für 10 min auf Eis lysiert. Das Lysat wurde für 5 min bei 15.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und konnte bei -80 °C gelagert werden. Die Proteinkonzentration wurde mit dem PierceTM BCA Protein Assay Kit [Thermo Fisher Scientific] nach Herstellerangaben bestimmt.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit der Standardmethode SDS-PAGE, bei der Proteine der Größe nach im elektrischen Feld unter Verwendung eines 12,5 %igen Acrylamidgels aufgetrennt wurden. Für einen optimalen Nachweis der einzelnen Antikörper (AK) wurden die Proben (Proteinmenge: 20 μ g) sowohl unter reduzierten als auch nicht reduzierten Bedingungen angesetzt (Tab. 10). Reduzierte Proben wurden zusätzlich noch 5 min bei 80 °C denaturiert. Anschließend wurde die SDS-PAGE anhand gängiger Protokolle bei 20-30 mA, U_{\max} und 15 Watt für ca. 1 h durchgeführt. Zur Abschätzung der Proteingrößen wurde für jedes Gel eine Geltasche mit einem Proteinstandard (*Triple Color* Protein Standard II [Serva]) beladen. Nach erfolgreichem Gel-Lauf wurde das Gel in den Transferpuffer überführt.

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die Proteine mit Hilfe der Standardmethode *Semi-Dry* Blot aus dem Acrylamidgel auf eine Trägermembran (BioTrace PVDF, 0,45 μ m [PALL]) transferiert, um anschließend die Proteine mittels Immundetektion nachzuweisen. Für den Western Blot wurden Standardprotokolle verwendet. Dabei wurde die Membran mit einer Stromstärke von 1-2 mA/cm² für 1 h geblottet und anschließend in TBS-T überführt. Das Gel wurde mit Hilfe von Coomassieblau Brilliant Blue R Lösung [Serva] bei Raumtemperatur (RT) vollständig angefärbt und danach 3-mal mit Aqua d. gespült. Die Entfärbung des Gels

wurde über Nacht (ü. N.) in Aqua d. solange durchgeführt, bis die Proteinbanden deutlich zu sehen waren.

Nachdem Transfer der Proteine auf die Trägermembran konnte die Detektion der gewünschten Proteine mit Hilfe spezifischer Primär-AK erfolgen. Dazu wurden zunächst restliche Proteinbindungsstellen der Trägermembran in Abhängigkeit von dem Primär-AK mit unterschiedlichen Lösungen blockiert (Tab. 10). Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran in der gewünschten Primär-AK-Lösung ü. N. bei 4 °C (Tab. 10).

Tabelle 10: Primär- und Sekundär-Antikörper-Lösungen für Western Blot

Antikörper	Molekulargewicht	Bedingungen	Verdünnung	Blockierung	Verdünnung in
GAPDH (rabbit)	37 kDa	reduziert	1:1.000	5 % Milchpulver	5 % BSA
Calretikulin (rabbit)	55 kDa	reduziert	1:1.000	5 % Milchpulver	5 % BSA
Syntenin (rabbit)	32 kDa	reduziert	1:1.000	5 % Milchpulver	5 % BSA
CD81 (mouse)	22-26 kDa	nicht reduziert	1:250	NETG	5 % Milchpulver
Alix (mouse)	95 kDa	reduziert	1:1.000	5 % Milchpulver	5 % BSA
Anti-Hase-HRP-gekoppelt			1:1.000		5 % Milchpulver
Anti-Maus-HRP-gekoppelt			1:10.000		5 % Milchpulver

Nach der Inkubation des Primär-AKs wurde die Membran 3-mal für 5 min in TBS-T gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen HRP-gekoppelten Sekundär-AK für 1 h bei RT. Die Membran wurde 3-mal für 5 min in TBS-T gewaschen. Mit Hilfe des ServaLight Polaris CL HRP WB Substrate Kits [Serva] wurden die Proteinbanden über Chemilumineszenz detektiert. Die Leuchtintensität der Proteinbanden wurde im Fusion SL [Vilber Lourmat] aufgenommen und mit der Software Fusion SL [Vilber Lourmat] exportiert. Alternativ wurde noch die Röntgenfilm-Methode verwendet.

5.4.2 Nanopartikel-Tracking Analyse

Zur Bestimmung der Partikelgröße und -anzahl wurde die Nanopartikel-Tracking Analyse (NTA) verwendet. Partikel in Lösung verfügen über eine Eigenbewegung, die so genannte Brown'sche Molekularbewegung, welche mit Hilfe der Lichtstreuung an Partikeln über eine Kamera in Echtzeit aufgenommen werden kann (Abb. 8). Die aufgenommenen Bewegungen werden in der Software über mathematische Gleichungen umgerechnet [192].

Die Exosomen wurden in 1 ml PBS resuspendiert. Um einen geeignete Partikelverteilung zu erreichen, wurde die Exosomen-Lösung 1:30 und 1:100 in PBS verdünnt. Diese Suspension wurde in die Kammer des NanoSight LM 10 [Malvern] injiziert, mit Hilfe der Software NTA 3.2 [Malvern] wurden 3-5 Videos pro Probe mit einer Länge von 60 sec aufgenommen und

ausgewertet. Neben 3-5 technischen Replikaten wurden jeweils 3 biologische Replikate der einzelnen Zelllinien pro Exosomen-Isolationsmethode analysiert.

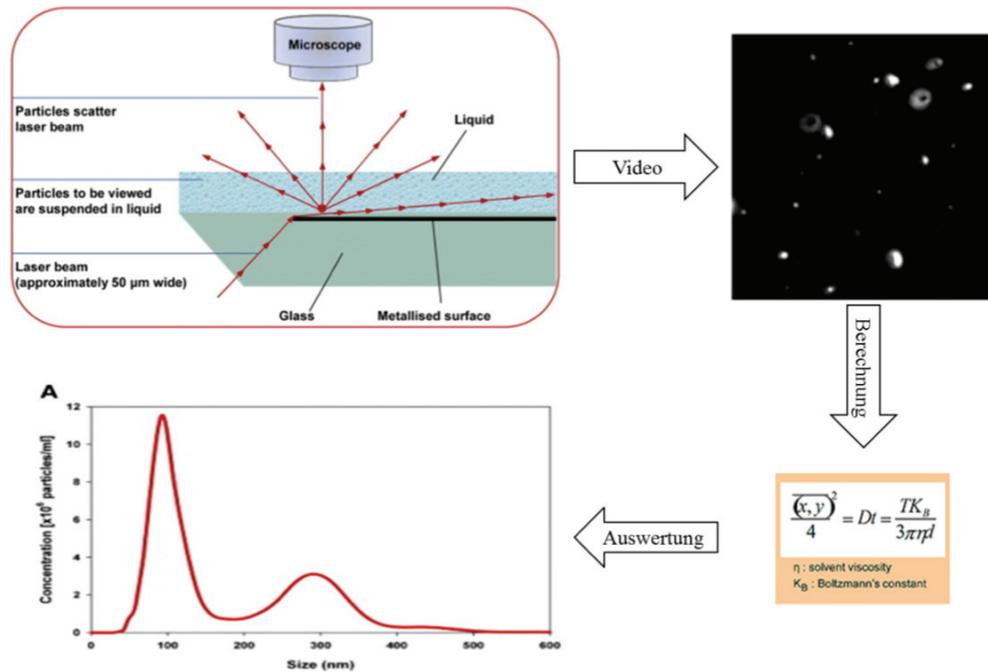


Abbildung 8: Prinzip der Nanopartikel-Tracking Analyse [192]

5.4.3 Elektronenmikroskopie

Exemplarisch wurde die Größe und Morphologie der mit Hilfe der UC und dem Kit isolierten Exosomen für die invasive UBC-Zelllinie (T24) mittels Elektronenmikroskopie analysiert. Die Exosomen wurden in 2 %iger Paraformaldehydlösung (PFA) fixiert und davon 7 µl auf ein Formvarcarbon-beschichtetes Grid gegeben. Nach 15-minütiger Inkubation wurde das Grid 3-mal in Aqua d. gewaschen. Die Nachfixierung erfolgte durch 5-minütige Inkubation mit Glutaraldehyd, welches durch 3-maliges Waschen in Aqua d. restlos entfernt wurde. Die aufgebrauchte Probe wurde mittels Uranylloxalat (pH 7) für 5 min nachkontrastiert. Anschließend wurde das Grid 3-mal gewaschen und getrocknet. Die Aufnahmen wurden bei 100 kV im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) [Carl Zeiss AG] mit der dazugehörigen TEM Software [Carl Zeiss AG] durchgeführt. Von jeder Probe wurden jeweils 3 technische Replikate aufgenommen.

5.5 miRNA-Expressionsanalysen

Für alle miRNA-Analysen wurden DNase/RNase freie Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen verwendet. Die Arbeitsflächen wurden vor allen Isolations- und Analysemethoden mit RNaseZap [Sigma Aldrich GmbH] gereinigt, so dass diese DNase/RNase frei waren. Kontaminationen mit RNase wurden im Versuchsverlauf vermieden.

5.5.1 Gesamt-RNA Isolation aus Zellen und Exosomen

Zur Bestimmung der miRNA-Expression in den UBC-Zellen und ihren sezernierten Exosomen wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kits [Qiagen] isoliert.

5.5.1.1 RNase-Behandlung

Neben der exosomalen RNA können die isolierten Exosomen mit freizirkulierender RNA kontaminiert sein. Diese muss degradiert werden, da sie in nachfolgenden Expressionsversuchen zur Verschiebung des miRNAs-Musters führen kann. Es ist bekannt, dass exosomale RNAs vor der Degradation mit RNase geschützt sind, wodurch nur die frei vorliegende RNA zerstört wird. Die in PBS gelösten Exosomen wurden mit 20 U RNase One Ribonuclease [Promega] für 30 min bei RT inkubiert. Die Inaktivierung der RNase erfolgt durch 10-minütige Inkubation des Gemisches mit 10 U RiboLock RNase Inhibitor [Thermo Scientific] bei RT. Die eingesetzten Mengen für RNase und deren Inhibitor wurden zuvor bestimmt und getestet (Anhang Abb. 44, 45).

5.5.1.2 Gesamt-RNA Isolation

Für die Gesamt-RNA-Isolation wurden die RNase-behandelten Exosomen und deren Ausgangszellen verwendet. Die Zellen und Exosomen wurden mit 700 µl Qiazol Lysierungs-Lösung [Qiagen] für 5-30 min bei RT (5 min Zellen; 30 min Exosomen) lysiert. Danach erfolgte die Isolation anhand des Herstellerprotokolls. Die Gesamt-RNA wurde mit 15-30 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die Gesamt-RNA-Konzentration und Reinheit wurde mit dem NanoDrop ND-1000 [PeqLab Biotechnology GmbH] gemessen.

5.5.2 Gesamt-RNA Isolation aus Patienten-abgeleiteten Proben

Für die Isolation von primären Harnblasenkarzinomen aus FFPE-Gewebeblöcken wurden 20 Schnitte mit einer Dicke von 7 µm angefertigt und auf einen Objektträger transferiert. Dort erfolgte mit einem Skalpell die Makrodissektion der Gewebeproben. Die Gewebeabschnitte wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Xylol (100 %) versetzt. Die Gewinnung der Gesamt-RNA erfolgte anschließend nach Herstellerangaben mit Hilfe des

miRNeasy FFPE Kit [Qiagen]. Zur Bestimmung der miRNA-Expression in Urinexosomen wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kits [Qiagen] isoliert. Die Gesamt-RNA wurde mit 15-30 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die Gesamt-RNA-Konzentration und -Reinheit wurde mit dem NanoDrop ND-1000 [PeqLab Biotechnology GmbH] gemessen.

5.5.3 MiRNA Microarray-Analyse

Dieser Versuchsteil diene zunächst der Identifizierung spezifischer miRNAs, welche zwischen invasiven und nicht invasiven UBC-Zellen unterschiedlich exprimiert werden. Im weiteren sollten miRNAs identifiziert werden, welche in Exosomen aus invasiven verglichen zu nicht invasiven UBC-Zellen unterschiedlich exprimiert werden. Für die Analyse wurden 5 verschiedene UBC-Zelllinien und deren sezernierte Exosomen verwendet (Tab. 11). Neben in vitro miRNA-Expressionsanalysen wurden das globale Screening der miRNA-Expression an 24 Tumorgewebeproben (10 NMIBC; 14 MIBC) von Harnblasenkarzinompatienten durchgeführt.

Tabelle 11: Probenverteilung für die Microarray-Analyse

In vitro Proben			
Zelllinie	Invasivität	Zellen	Exosomen
5637	nicht invasiv	2	2
RT112	nicht invasiv	2	2
T24	invasiv	2	2
J82	invasiv	2	2
253J-BV	invasiv	2	2
Gewebeproben			
NMIBC		MIBC	
10		14	

Die miRNA-Expressionsanalyse wurde unter Verwendung von miRNA Microarrays Version 16 [Agilent Technologies] und dem dazugehörigen miRNA *Complete Labeling and Hyb* Kit [Agilent Technologies] durchgeführt. Diese Version wurde nach Sanger hergestellt und beinhaltet 866 humane miRNAs und 89 human virale miRNAs. Zur Qualitätskontrolle der Markierungs- und Hybridisierungsreaktion wurden Markierungs- und Hybridisierungs-Spike-In Lösungen [Agilent Technologies] nach Angaben des Herstellers angefertigt.

5.5.3.1 miRNA-Markierung

Für die Markierungsreaktion erfolgte zuerst die Dephosphorylierung der Probe. Dazu wurden 2 µl Probe (Gesamt-RNA-Konzentration: 50 ng/µl) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 0,4 µl Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP), 0,5 µl 10X CIP-Puffer und 1,1 µl

Markierungs-Spike-In Lösung versetzt und durchmischt. Zur Aktivierung der Phosphatase wurde die Probe 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Dephosphorylierung wurde die Probe unter Zusatz von 2,8 µl 100 %igem DMSO für 7 min bei 100 °C denaturiert. Die Probe wurde anschließend sofort in ein Eisbad überführt. Bei der folgenden Markierungsreaktion wurde der denaturierten Probe 1 µl 10X T4 RNA Ligase Puffer, 3 µl Cyanine3-pCp und 0,5 µl T4 RNA Ligase zugegeben und nach Durchmischung bei 16 °C für 2 h in Dunkelheit inkubiert. Cyanine3-pCp ist ein fluoreszierender Farbstoff, welcher während der Markierungsreaktion an das 3`-Ende des RNA-Moleküls bindet und die RNA-Bereiche markiert.

5.5.3.2 miRNA-Hybridisierung

Nachdem die Probe bei 50 °C für 1 h in der Vakuumzentrifuge getrocknet wurde, erfolgte die Hybridisierungsreaktion. Dazu wurde die Probe in 17 µl RNase-freiem Wasser gelöst und mit 1 µl Hyb-Spike-In Lösung, 4,5 µl 10X GE Blocking Agent und 22,5 µl 2X Hi-RPM Hybridisierungspuffer versetzt.

Die durchmischte Probe wurde 5 min bei 100 °C und 5 min im Eisbad inkubiert. Zur Hybridisierung wurde das gesamte Probenvolumen in die Mitte der Gasket-Slides aufgetragen und die aktive Seite des Agilent Microarrays aufgelegt. Der Microarray wurde im Agilent G2545A Hybridisierungssofen 20 h bei 55 °C mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 20 rpm inkubiert. Nach 20 h wurde die Hybridisierung gestoppt und die Microarrays in Waschpuffer 1 überführt, um den Gasket-Slide vom eigentlichen Microarray zu trennen. Danach erfolgte für jeweils 5 min ein Waschschrift in Waschpuffer 1 und Waschpuffer 2 (37 °C). Nach der Reinigung des Microarrays wurde dieser mit dem Agilent Microarray Scanner [Agilent p/n G2565BA, Agilent Technologies], nach Angaben des Herstellers (Tab. 12), gescannt.

Tabelle 12: Scanvorschriften für Agilent Microarray

Scaneinstellung	Scanbereich	Scanauflösung [µm]	Scanmodus	Farbkanal	Grün PMT
Format 8x60K	61 x 21,6mm	5	1-Kanal	grün	XDR Hi 100 % XDR Lo 5 %

Die Daten wurden mit Hilfe der dazugehörigen Software Feature Extraction [Agilent Technologies] berechnet und mit der Software Qlucore Omics Explorer 3.2 [Qlucore] ausgewertet und graphisch dargestellt. Die statistische Auswertung der Rohwerte erfolgte mittels Mann-Whitney U Test unter Verwendung der Software IBM SPSS Statistics 23 [IBM SPSS GmbH].

5.5.4 Validierung der miRNA-Expression mit qPCR

Die miRNAs miR-27b-5p, 30a-3p, -99a-5p, -137, -141-3p, -145-5p, -200a-3p und -205-5p [Applied Biosystems] wurden nach den Ergebnissen der Microarray-Analysen ausgewählt und mit der quantitativen real-time PCR (qPCR) validiert. Zur Überprüfung des exosomalen miRNA-Transfers wurde der Primer für die miRNA cel-miR-39-3p [Applied Biosystems] verwendet. Neben diesen miRNAs wurde für alle Zellproben noch eine endogene Kontrolle, die Referenz-miRNA (RNU48 oder RNU6B) mitgeführt. Mit Hilfe spezifischer Primer (TaqMan[®] MicroRNA Assays [Applied Biosystems]) und dem TaqMan microRNA RT Kit [Applied Biosystems] wurde die miRNA über die Reverse Transkription in die entsprechende cDNA umgeschrieben.

Für die PCR-Reaktion der Zellkulturversuche wurden 5 µl Probe (Gesamt-RNA-Konzentration: 20 ng/µl) in einem 200 µl Reaktionsgefäß mit den Reagenzien versetzt, gründlich durchmischt und 5 min auf Eis inkubiert (Tab. 13).

Der qPCR-Ansatz für die Patientenproben (Urinexosomen) wurde nach einem neueren Protokoll mit Hilfe einer Multiplex-PCR und einem Primerpool angesetzt [193, 194]. Zunächst wurden 200 µl des RT-Primerpools hergestellt, indem 2 µl jedes zu untersuchenden RT-Primers in RNase-freiem Wasser gelöst wurde. Anschließend wurden 3 µl Probe (Gesamt-RNA-Konzentration: 2 ng/µl) in einem 200 µl Reaktionsgefäß mit den Reagenzien versetzt, gründlich durchmischt und 5 min auf Eis inkubiert (Tab. 13).

Tabelle 13: Pipettierschema und PCR-Programm für die Reverse Transkription

	Zellkulturproben	Patientenproben
Reagenzien	Volumen [µl]	Volumen [µl]
100 mM dNTPs (mit dTTP)	0,15	0,3
MultiScribe Reverse Transkriptase (50 U/µl)	1	3
10X Reverse Transkriptase Buffer	1,5	1,5
RNase Inhibitoren	0,19	0,19
RNase-freies Wasser	4,16	1,01
RT-Primer (5X)	3	0
RT-Primerpool	0	6
PCR-Programm Reverse Transkription		
Schritt	Zeit [min]	Temperatur [°C]
Primerhybridisierung	30	16
Elongation	30	42
Denaturierung	5	85

Die Umschreibung der miRNA in die cDNA erfolgte für beide Probengruppen mit dem PCR-Programm (Tab. 13) im Thermozykler Uno II [Biometra].

Die eingesetzte RNA-Konzentration für Urinexosomen war sehr gering, weshalb vor der qPCR eine Target-basierte Präamplifikation (PreAmp) der cDNA erfolgte. Dafür wurde ein PreAmp-Primerpool hergestellt, welcher sich aus je 2 µl TaqMan MicroRNA Assay Primer (20X) [Applied Biosystems] der jeweiligen zu untersuchenden Primer und RNase-freiem Wasser zusammensetzt. Das Gesamtvolumen betrug 200 µl. Für die PreAmp wurde 2,5 µl cDNA mit 1,5 µl PreAmp-Primerpool, 5 µl TaqMan PreAmp Master Mix (2X) [Applied Biosystems] und 2,5 µl RNase-freiem Wasser gemischt. Die PreAmp wurde nach dem Programm in Tabelle 14 durchgeführt. Die präamplifizierten Proben wurden im Anschluss 1:5 mit TE-Puffer [Thermo Fisher Scientific] verdünnt.

Tabelle 14: Programm für die Präamplifikation

Schritt	Zeit	Temperatur
1	10 min	95 °C
2	2 min	55 °C
3	2 min	72 °C
4	Zyklen	12
	15 sec	95 °C
	4 min	60 °C
5	10 min	100 °C
6	∞	4 °C

Danach erfolgte die qPCR mit spezifischen Primern [Applied Biosystems] und fluoreszenzmarkierten TaqMan-Sonden [Applied Biosystems] unter Verwendung des TaqMan Gene Expression Master Mix [Applied Biosystems]. Für die qPCR wurde ein 10 µl PCR-Ansatz angefertigt. Dazu wurde 1 µl cDNA mit 0,5 µl TaqMan MicroRNA Assay Primer (20X), 5 µl TaqMan Gene Mastermix und 3,5 µl Nuklease-freiem Wasser in ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert. Von jeder Probe wurden 3 technische Replikate aufgetragen. Zur Vermeidung von Verdampfungsprozessen wurde die Platte luftdicht mit einer Schutzfolie verschlossen. Anschließend wurde die Platte bei 300 g für 1 min zentrifugiert, in den StepOnePlus™ [Life Technologies] überführt und das folgende PCR-Programm durchgeführt (Tab. 15).

Tabelle 15: Programm für die qPCR

Schritt	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zyklen
Primerhybridisierung	30	16	1
Elongation	30	42	45
Denaturierung	5	85	

Während jedem PCR-Zyklus wird die cDNA in 2 identische Kopien repliziert, wodurch die Fluoreszenzintensität proportional mit dem PCR-Produkt jedes Zyklus ansteigt. Die Intensität wird nach jedem PCR-Zyklus gemessen. Für Berechnung der Expressionsunterschiede dient der „*crossing point*“ (Ct), welcher den Zeitpunkt angibt, bei dem erstmals das Fluoreszenzsignal signifikant aus dem Hintergrundrauschen hervortritt. Die Ct-Werte und deren Standardabweichung konnten mit dem Programm des StepONE Plus v2.3 [Life Technologies] ermittelt werden. Die qPCR Software REST Version 2009 [Qiagen] wurde verwendet, um die Expressionsunterschiede zu berechnen. Zur Berechnung der statistischen Signifikanzen wurde der Mann-Whitney U Test unter der Verwendung der Software IBM SPSS Statistics 23 [IBM SPSS GmbH] durchgeführt.

5.6 Interzellulärer Transport tumor-assoziiertes Exosomen auf Fibroblasten

Mit den nachfolgenden Methoden wurde im 1. Abschnitt die Aufnahme tumor-assoziiertes Exosomen in normale Vorhautfibroblasten visualisiert und im 2. Abschnitt die experimentelle Etablierung des exosomalen miRNA-Transfers von UBC-Zellen auf normale Vorhautfibroblasten und TAFs durchgeführt.

5.6.1 Aufnahme fluoreszenzmarkierter tumor-assoziiertes Exosomen

Um diesen Transport und dessen zeitliche Abhängigkeit experimentell darzustellen, wurde die Membran der Exosomen (T24; RT112) mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff (PKH26 [Sigma Aldrich GmbH]) markiert und die Exosomen anschließend mit den Zielzellen (hTERT-FB) inkubiert.

5.6.1.1 PKH26-Markierung von Exosomen

Die Exosomen wurden in 100 µl PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Exosomen-Markierung erfolgte unter Verwendung des PKH26 Red Cell Linker Kit [Sigma Aldrich GmbH] nach einem modifizierten Protokoll. Die Exosomen-Lösung wurde mit 500 µl Diluent C gemischt und auf Eis gestellt. Weiterhin wurden 2 µl PKH26 Farbstoff (1×10^{-3} M) in 500 µl Diluent C gelöst und auf Eis inkubiert. Nach 5 min wurde die PKH26-Lösung mit dem Exosomen-Gemisch in einem 2 ml Reaktionsgefäß vermengt und 5 min auf Eis inkubiert. Während der Inkubation wurde der Ansatz immer wieder durchmischt, damit sich der Farbstoff gleichmäßig an der Exosomen-Membran anlagert. Zur Beendigung der Reaktion wurden 1 ml ED-FKS zugegeben und resuspendiert. Nicht gebundener Farbstoff musste vor der Inkubation mit Zellen aus dem Ansatz entfernt werden, da er sonst unspezifisch die Zellmembran der Zielzellen färben könnte. Dazu wurden jeweils 600 µl der Exosomen-Lösung in ein PierceTM Protein Concentrator (100 k) Reaktionssäule [Thermo Fisher Scientific] überführt und 30 min bei 1.500 g und 4 °C zentrifugiert. Das Eluat der Säule wurde verworfen und der obere Teil innerhalb der Säule in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die Proteinkonzentration der markierten Exosomen-Lösung wurde mit Hilfe des PierceTM BCA Protein Assay Kit bestimmt. Die Aufnahme von Exosomen durch hTERT-FB wurde für 7 verschiedene Inkubationszeitpunkte (1 h; 2 h; 4 h; 6 h; 12 h; 24 h; 48 h) verglichen zur PBS-behandelten Kontrolle untersucht. Dazu wurden je 5×10^4 Zellen pro Well mit ED-Medium

(+ 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)) in 12-Well Objektträger-Kammern gesät und mit 100 µg Exosomen über die angegebenen Zeiträume behandelt. Nach der Inkubation wurden die Zellen 3-mal für 3 min mit PBS gewaschen und anschließend in 4 % PFA-PBS-Lösung für 20 min bei RT fixiert.

5.6.1.2 Phalloidin-Färbung

Für die Kontrolle der Lokalisation der aufgenommenen Exosomen wurde das Zytoskelett der Zellen mit Alexa Fluor 488[®]-Phalloidin [Thermo Fisher Scientific] grün angefärbt. Die Zellen wurden zunächst 3-mal für 5 min mit TBS-T gewaschen. Die Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen erfolgte durch die 20-minütige Inkubation der Zellen mit 3 % BSA-TBS-T-Lösung. Nach Entfernung der Blockierungslösung wurden die Zellen mit Alexa Fluor 488[®]-Phalloidin (1:1.000) für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3-mal für 5 min mit TBS-T gewaschen und mit Vectashield[®] Antifade Mounting Medium mit DAPI [Vector Laboratories] und speziellen Deckgläschen (170 ± 55 µm) [Carl Roth GmbH] eingedeckt.

5.6.1.3 Laser Scanning Mikroskopie

Die Proben wurden im *Laser scanning* Mikroskop LSM 780 [Carl Zeiss AG] mikroskopiert und fotografiert. Es wurden 4 verschiedene Kanäle aufgenommen (Tab. 16).

Tabelle 16: Einstellungen der einzelnen Aufnahmekanäle

Kanal	1	2	3	4
Kanalfarbe	blau	grün	weiß	rot
Anregungswellenlänge [nm]	405	561		561
Emissionswellenlänge [nm]	447	591		623

Die Aufnahmen wurden anschließend mit der Software Zen 2012 Lite [Carl Zeiss AG] bearbeitet und in Einzelbildern exportiert.

5.6.2 Exosomaler miRNA-Transfer zwischen Harnblasenkarzinomzellen und Fibroblasten

Nicht nur optisch wurde überprüft, ob Exosomen von Zielzellen aufgenommen wurden, sondern auch durch den miRNA-Transfer-Nachweis. Um den Transfer exosomaler miRNAs experimentell dazustellen, wurde ein spezieller Versuchsablauf etabliert (Abb. 9).

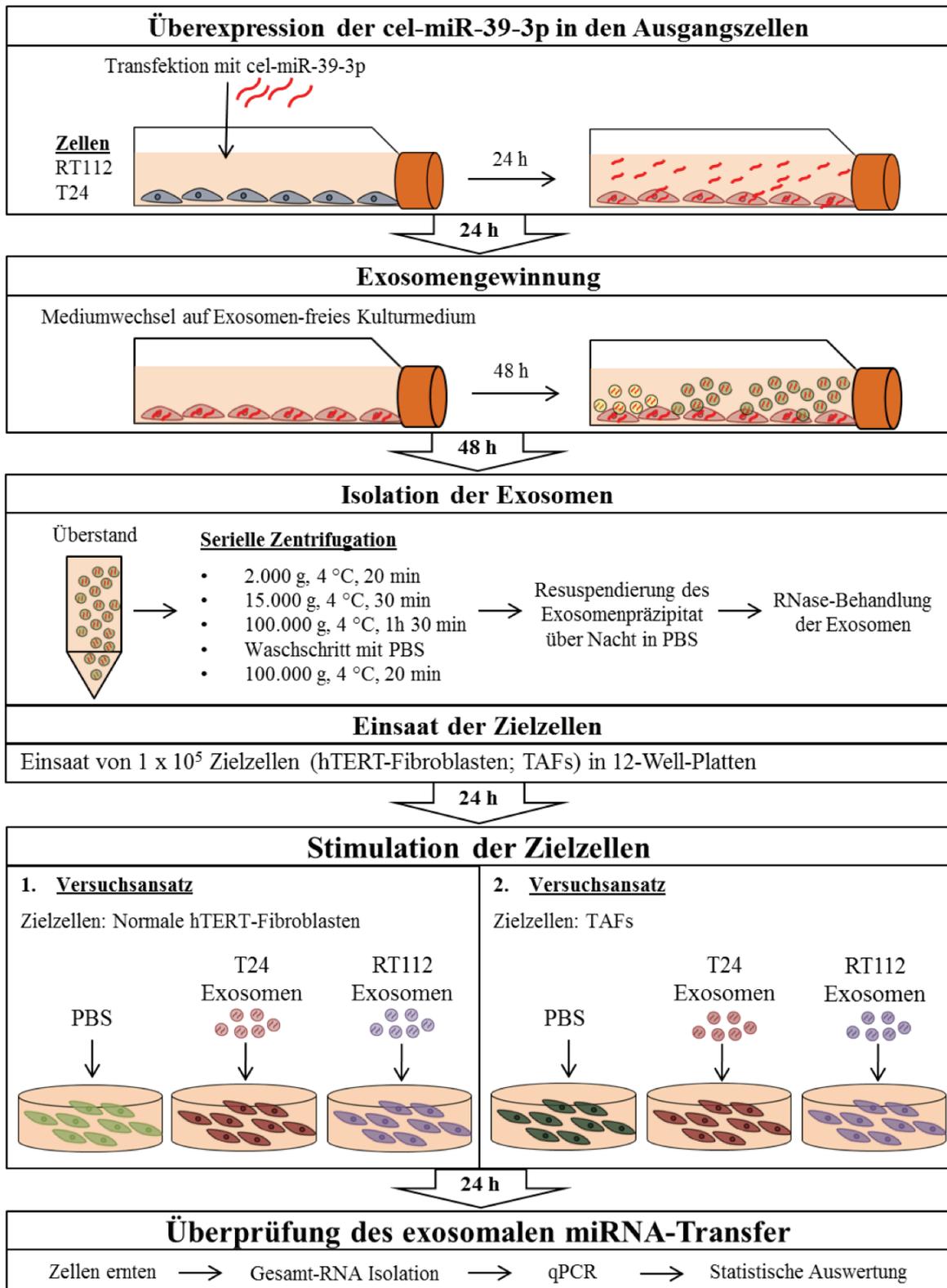


Abbildung 9: Versuchsablauf für den exosomal miRNA-Transfer von Tumorzellen auf normale und tumor-assoziierte Fibroblasten

5.6.2.1 Transiente Transfektion der Harnblasenzellen

Zunächst wurde die nicht humane miRNA cel-miR-39-3p, welche aus dem Fadenwurm *C. elegans* stammt, mit Hilfe einer transienten Transfektion in den Ausgangszellen (RT112; T24) stark über exprimiert. T24 und RT112 wurden exemplarisch für eine invasive und nicht invasive Zelllinie ausgewählt. Die Transfektion wurde unter Verwendung von Lipofectamin 2.000 [Thermo Fisher Scientific] und dem mirVana™ Mimic cel-miR-39-3p [Ambion] durchgeführt. Zunächst wurde für die Transfektion der Ansatz für die Transfektionsreagenz und der Ansatz für miRNA Mimic in 5 ml Reaktionsgefäßen vorbereitet (Tab. 17). Weiterhin wurde eine Cy3-scrambled miRNA [Ambion] verwendet, um die Transfektionseffizienz mikroskopisch zu untersuchen. Von dieser wurden 10 nM und 25 nM für die Transfektion von T24 und RT112 nach dem gleichen Schema eingesetzt (Tab. 17).

Tabelle 17: Pipettierschema für die transiente Transfektion von cel-miR-39-3p

Ansatz der Transfektionsreagenz	
Reagenz	Volumen pro Transfektion [µl]
Lipofectamin 2.000	40
OptiMEM	1.960
Ansatz miRNA Mimic (Endkonzentration 50 nM)	
Reagenz	Volumen pro Transfektion [µl]
miRNA Mimic cel-miR-39-3p (20 µM Stock)	50
OptiMEM	1.960

Die jeweiligen Ansätze wurden gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde dann in den Mimic-Ansatz überführt, durch auf und ab pipettieren gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden für die Transfektion 2×10^6 Zellen mit 16 ml Komplett-Medium in eine 150 cm² Zellkulturflasche eingesät. Nach 15-minütiger Inkubation des Transfektionsansatzes wurde dieser komplett in die Flasche gegeben und 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Des Weiteren erfolgte in einem Testversuch eine Transfektion von RT112-Zellen ohne cel-miR-39-3p nur mit Lipofectamin (Mock-Ansatz), um einen möglichen Einfluss des Transfektionsreagenz auszuschließen. Von den mittels Cy3-scrambeled miRNA transfizierten RT112- und T24-Zellen wurden mikroskopische Aufnahmen im Hellfeld und unter Fluoreszenz angefertigt.

5.6.2.2 Vorbereitung und Isolation von Exosomen

Nach 24 h wurde das Medium auf ED-Medium gewechselt, indem die Zellen 3-mal mit 10 ml PBS gewaschen wurden und 20 ml ED-Medium zugegeben wurde. Nach 48 h wurden die Exosomen wie unter 5.3.2 mittels UC isoliert. Die Exosomen wurden in 570 µl PBS resuspendiert und ü. N. im Kühlschrank aufbewahrt und am nächsten Tag wie unter 5.5.1.1 mit RNase behandelt. Die Proteinkonzentration der Exosomen-Lösung wurde mit Pierce™ BCA Protein Assay Kit [Thermo Fisher Scientific] bestimmt.

5.6.2.3 Transfer tumor-assoziiertes Exosomen auf Fibroblasten

Die Zielzellen (hTERT-FB; TAF) wurden 24 h vor der Exosomen-Behandlung in 12-Well Platten ausgesät. Es wurden 1×10^5 Zellen pro Well eingesetzt und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und die Zellen 3-mal mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Stimulation mit Exosomen, indem ED-Medium plus 1 % Pen/Strep und die jeweilige Exosomen-Menge in 200 µl PBS zugegeben wurden. In Abhängigkeit von den eingesetzten Zielzellen wurden unterschiedliche Konzentrationen von tumor-assoziierten Exosomen verwendet (hTERT-FB (10 µg; 40 µg); TAF (0,5 µg; 1 µg; 5 µg)). Als Negativ-Kontrolle dienten PBS-behandelte Zielzellen sowie hTERT-FB, welche mit Exosomen aus dem Mock-Ansatz behandelt worden sind.

Die Behandlung erfolgte über 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Danach wurden die Zellen 3-mal mit PBS gewaschen und nach 5.2.1 abgelöst. Die Gesamt-RNA wurde nach 5.5.1 isoliert und die Messung der cel-miR-39-3p Expression in den Zielzellen erfolgte nach 5.5.4. Die Expressionsunterschiede wurden mit der qPCR Software REST Version 2009 [Qiagen] ermittelt, statistisch mit der Software IBM SPSS 20 [IBM] ausgewertet und in Balkendiagrammen dargestellt.

5.7 Analysen des funktionellen Einflusses tumor-assoziiertes Exosomen auf normale Harnblasenfibroblasten

Zur Untersuchung des Einflusses tumor-assoziiertes Exosomen auf Zellen der TME wurde das Proliferations- und Migrationsverhalten normaler HBF nach unterschiedlichen Stimulationszeiträumen mit tumor-assoziiertes Exosomen, normalen Harnblasenexosomen und der PBS-behandelten Kontrolle untersucht (Abb. 10).

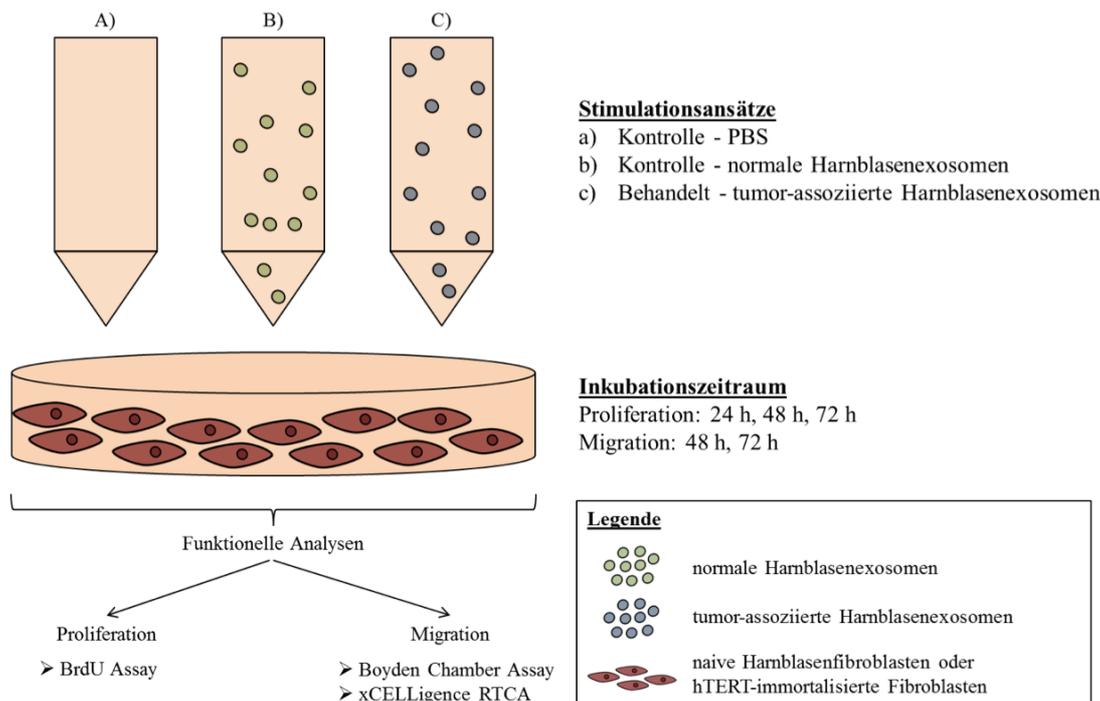


Abbildung 10: Versuchsschema der funktionellen Analysen

5.7.1 Einfluss tumor-assoziiertes Exosomen auf die Proliferation normaler Fibroblasten

Das Proliferationsverhalten normaler HBF und hTERT-FB nach Stimulation mit verschiedenen tumor-assoziiertes Exosomen (T24; RT112; 253J-BV; 5637; J82), normalen Harnblasenexosomen (HCV29) und PBS wurde für 24 h, 48 h und 72 h unter Verwendung des Cell Proliferation ELISA BrdU Assays (Colometric) [Roche Diagnostics Deutschland GmbH] im 96- und 24-Wellformat durchgeführt.

5.7.1.1 Etablierung der Stimulation mit tumor-assoziiertes Exosomen

Die Methode wurde mit der Zelllinie hTERT-FB über den Zeitraum von 48 h mit unterschiedlichen Konzentrationen (2,5-100 µg/ml) tumor-assoziiertes Exosomen (T24; RT112; 253J-BV; 5637) und zelleigener Exosomen (hTERT-FB) verglichen zu einer

unbehandelten Kontrolle etabliert. $2,5 \times 10^3$ hTERT-FB Zellen wurden mit den dazugehörigen Exosomen-PBS-Lösungen oder reinem PBS wie unter Tabelle 18 dargestellt mit einem Gesamtvolumen von 200 μl pro Well in eine 96-Wellplatte eingesät. Die gewünschte Exosomen-Konzentration wurde in 50 μl PBS resuspendiert. Jeder Ansatz wurde in 3 technischen Replikaten aufgetragen und in 1-5 unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt.

Tabelle 18: Pipettierschema zur Etablierung der Proliferationsmessung nach Exosomen-Stimulation

Bestandteil	Ansätze	
	Kontrolle	Behandelt
Zellsuspension [μl]	128	128
Exosomen-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	0	2,5; 5; 7,5; 12,5; 25; 37,5; 50; 75; 100
PBS [μl]	50	0
Exosomen-PBS-Lösung [μl]	0	50
ED-FKS [μl]	20	20
Pen/Strep [μl]	2	2

Nachdem alles zugefügt wurde, wurden die Platten 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 h wurden 20 μl BrdU *Labeling* Reagenz (10 μM) [Roche] zu jedem Well zugefügt und inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 200 μl FixDenat für 30 min bei RT fixiert. In der Zwischenzeit wurde die Anti-BrdU-POD-Lösung hergestellt, indem 10 % Anti-BrdU-Stock-Lösung zur AK-Verdünnungslösung zugefügt wurden. Die Fixierlösung wurde entfernt, 100 μl Anti-BrdU-POD-Lösung in jedes Well pipettiert und 90 min bei RT inkubiert. Vor der Absorptionsmessung wurden die Zellen 3-mal mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurden 100 μl Substrat-Lösung zu jedem Well gegeben und 20 min bei RT stehen gelassen. Als Negativ-Kontrolle (Blank) diente die Absorption der Substrat-Lösung. Anschließend wurde die Absorption im Spektrometer Infinite F200 pro [Tecan] bei einer Messwellenlänge von 360 nm und einer Referenzwellenlänge von 485 nm gemessen.

Für die Berechnung der Proliferation wurde zunächst der Mittelwert aus den technischen Replikaten gebildet und der Mittelwert des Blank abgezogen. Die prozentuale Proliferation wurde nach folgender Formel berechnet, statistisch mittels Mann-Whitney U Test unter Verwendung der Software IBM SPSS Statistics 23 [IBM SPSS GmbH] ausgewertet und in Balkendiagrammen dargestellt.

$$Proliferation [\%] = \left(\frac{Absorption_{Behandelt}}{Absorption_{Kontrolle}} \right) * 100\%$$

5.7.1.2 Stimulation normaler Harnblasenfibroblasten mit tumor-assoziierten und normalen Exosomen der Harnblase

Nach der Etablierung wurde sowohl der konzentrationsabhängige Einfluss als auch der Einfluss tumor-assoziiertes Exosomen auf normale HBF über die Stimulationszeiträume 24 h, 48 h und 72 h untersucht. $0,5 \times 10^3$ normale HBF Zellen wurden pro Well wie unter Tabelle 19 dargestellt mit den dazugehörigen Bestandteilen in 96- und 24-Wellplatten eingesät. Für die Ansätze 24 h und 48 h wurden 2-3 technische Replikate auf die Platten aufgetragen, welche in 3-5 biologischen Replikaten pro Stimulationszeitraum wiederholt wurden.

Tabelle 19: Pipettierschema für Proliferationsanalysen normaler Harnblasenfibroblasten nach unterschiedlichen Stimulationszeiträumen mit tumor-assoziierten und normalen Exosomen

Stimulationszeitraum	Ansätze					
	24 h		48 h		72 h	
Bestandteil	Kontrolle	Behandelt	Kontrolle	Behandelt	Kontrolle	Behandelt
Wellformat	96	96	96	96	24	24
Gesamtvolumen [μ l]	200	200	200	200	600	600
Zellsuspension [μ l]	128	128	128	128	484	484
Exosomen-Konzentration [μ g/ml]	0	5; 12,5; 25	0	5; 12,5; 25	0	5; 12,5; 25
PBS [μ l]	50	0	50	0	50	0
Exosomen-PBS-Lösung [μ l]	0	50	0	50	0	50
ED-FKS [μ l]	20	20	20	20	60	60
Pen/Strep [μ l]	2	2	2	2	6	6

Zudem 24 h Ansatz wurden zum Zeitpunkt der Einsaat gleich zu jedem Well 20 μ l BrdU Labeling Reagenz (10 μ M) [Roche] zugefügt, da einheitlich 24 h vor Stimulationszeitende die BrdU Reagenz zugefügt worden ist. Anschließend wurden alle Platten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 h wurde beim Ansatz 24 h der BrdU Assay wie unter 5.7.1.1 durchgeführt. Gleichzeitig wurde zum Ansatz 48 h das BrdU Reagenz zugefügt, weitere 24 h stehen gelassen und ebenfalls nach 5.7.1.1 ausgewertet. Für den Ansatz 72 h mussten die Volumina der einzelnen Bestandteile des Proliferationsassays angepasst werden (Tab. 20).

Tabelle 20: Angepasste Volumina für Cell Proliferation ELISA BrdU

Reagenz	Volumen [μ l]
BrdU Labeling Reagenz	60
FixDenat	300
Anti-BrdU-POD-Lösung	300
Substrat-Lösung	300

Die Zugabe des BrdU Reagenz erfolgte wie bei den anderen beiden Ansätzen 24 h vor Stimulationsende. Die Messung der Proliferation wurde am nächsten Tag nach 5.7.1.1 mit den angepassten Volumina (Tab. 20) durchgeführt.

Die Berechnung und statistische Auswertung der Proliferation wurde analog zu der im Kapitel 5.7.1.1 durchgeführt und in Boxplots dargestellt.

5.7.2 Einfluss tumor-assoziiertes Exosomen auf die Migration normaler Harnblasenfibroblasten

Das Migrationsverhalten wurde mit zwei verschiedenen Methoden untersucht. Im ersten Versuchsansatz wurde die Migration in einem Boyden Chamber Transwell-System durchgeführt. Im zweiten Ansatz wurde die Migration in Echtzeit mit Hilfe des xCELLigence RTCA DP Instrument [ACEA Biosciences] und den dazugehörigen CIM Platten 16 [OMNI Life Science] gemessen.

5.7.2.1 Stimulation normaler Fibroblasten

Bevor der Einfluss tumor-assoziiertes Exosomen (RT112; 5637; T24; 253J-BV; J82) verglichen zu normalen Exosomen (HCV29) oder PBS untersucht werden konnte, wurden die HBF für 48 h und 72 h mit Exosomen stimuliert (Exosomen-Konzentration: 12,5 µg/ml). Dafür wurden $2,5 \times 10^4$ HBF Zellen pro Well nach folgendem Schema in 6-Wellplatten eingesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert (Tab. 121). Nach 48 h oder 72 h Exosomen-Stimulation wurden die Zellen in die jeweiligen Migrationsassays überführt.

Tabelle 21: Pipettierschema für die Stimulation von normalen Harnblasenfibroblasten zur Migrationsanalyse

Bestandteil	Ansätze	
	Kontrolle	Exosomenstimulation
Stimulationszeitraum [h]	48; 72	48; 72
Gesamtvolumen [ml]	2	2
Zellsuspension [µl]	1630	1630
Exosomen-Konzentration [µg/ml]	0	12,5
PBS [µl]	150	0
Exosomen-PBS-Lösung [µl]	0	150
ED-FKS [µl]	200	200
Pen/Strep [µl]	20	20

5.7.2.2 Boyden Chamber Assays

Das Boyden Chamber System ist eine gängige Methode, um die Migration von Zellen zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde ein 12-Well Format verwendet, bei dem beide Kammern durch eine mikroporöse Membran (Porengröße: 8 µm) getrennt waren. Nachdem die Zellen mit den unterschiedlichen Ansätzen stimuliert wurden, erfolgt der Transfer der Zellen in die Inserts. Die untere Kammer wurde mit 600 µl ED-FKS, versetzt mit 1 % Pen/Strep und Aphidikulin (7 µg/ml) [Calbiochem] gefüllt. In die oberen Kammern wurden 2×10^4 Zellen der unterschiedlichen Stimulationsansätze in technischen Duplikaten unter Verwendung von FKS-freiem Medium eingesät. Der dadurch entstandene FKS-Gradient dient als Chemoattraktionsmittel. Anschließend wurden die Zellen 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach 24 h wurden die Zellen sowohl innerhalb des Inserts als auch die durch die Membran migrierten Zellen 2-mal mit PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 75 %igen Ethanol für 25 min bei 4 °C. Danach wurden die Zellen 3-mal mit PBS gewaschen und die restlichen Zellen aus dem Inneren des Inserts mit einem Wattestäbchen entfernt. Die Färbung der migrierten Zellen wurde mit 0,1 %iger Kristallviolett-Lösung für 5 min durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend sowohl von außen als auch innerhalb des Inserts 5-mal gewaschen, um Farbstoffreste zu entfernen. Die Inserts wurden dann bei RT getrocknet. Zur grafischen Darstellung der migrierten Zellen auf der Unterseite der Inserts wurden mit einem Mikroskop Aufnahmen angefertigt. Nachdem alle Wells aufgenommen worden waren, konnte die photometrische Analyse der Zellen erfolgen. Dazu musste der Farbstoff freigesetzt werden, wozu die Zellen mit 400 µl 10 %igem Eisessig lysiert wurden. Nach erfolgter Lyse wurden jede Probe in Triplikaten photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm im Spektrometer Infinite F200 pro [Tecan] gemessen. Es wurden dazu 100 µl in ein Well einer 96-Wellplatte pipettiert. Als Blank wurde 10 %iger Eisessig verwendet.

5.7.2.3 Echtzeit-Messung unter Verwendung des RTCA Systems

Für die Untersuchung der Migration wurde das RTCA System verwendet, welches durch die Messung der Adhärenz-bedingten Impedanzänderung über die Zeit die Echtzeit-Beobachtung zellulärer Funktionen erlaubt. Die verwendeten Migrationsplatten (CIM-Platten [OMNI Life Science]) bestehen aus 2 Kammern (Abb. 11).

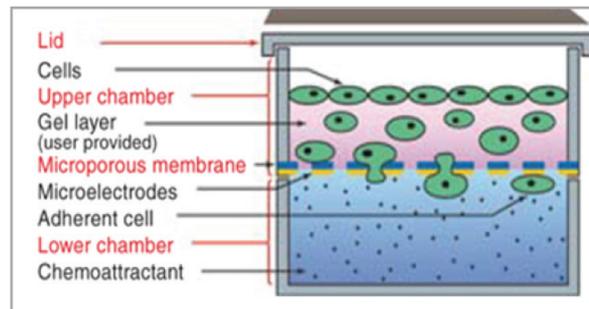


Abbildung 11: Querschnitt einer CIM-Platte 16 für das RTCA System [195]

Die beiden Kammern sind durch eine mikroporöse Membran (Porengröße: 8 μm) getrennt. Diese Membran ist an der Unterseite mit einer Goldelektrode beschichtet. Durch diese Elektrode wird über den gesamten Versuch Strom geleitet und die Impedanz gemessen. Nachdem Zellen durch die Membran migriert sind und auf der Goldelektrode adhären, kommt es auf der Adhäsionsstelle zur Unterbrechung des Stromflusses, was als Impedanzänderung gemessen wird. Die Impedanz steigt mit der Anzahl an Zellen auf der Oberfläche bzw. mit der Fläche, die durch Zellen bedeckt ist. Die Impedanzänderung wird in durch den Benutzer festgelegten Zeitintervallen gemessen. Die *open-source* xCELLigence System Data Analysis Software [ACEA Biosciences] erlaubt die Kalkulation der Impedanzveränderung in einen Zellindex (CI) über die Zeit, welche für die statistische Auswertung mit IBM SPSS Statistics 20 [IBM SPSS GmbH] verwendet wird. Dadurch ist es möglich das Migrationsverhalten der Zellen zu jedem gewählten Messpunkt zu analysieren.

Die untere Kammer wurde mit 160 μl ED-FKS, versetzt mit 1 % Pen/Strep und Aphidikulin (7 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gefüllt. In die oberen Kammern wurden 1×10^4 Zellen der unterschiedlichen Stimulationsansätze in technischen Duplikaten unter Verwendung von FKS-freiem Medium eingesät. Dadurch wurde ein FKS-Gradient zwischen oberer und unterer Kammer erzeugt, was den Zellen als Chemoattraktionsmittel dient. Die Zellen passieren die Mikroporen und adhären an der Elektrode, wodurch die Impedanzänderung eintritt. Die Messung der Impedanz wurde zunächst alle 30 sec für insgesamt 960 Schritte und dann alle 30 min für 999 Schritte gemessen. Als Negativkontrolle (Blank) diente Zell-freies Medium, dessen CI-Wert gemessen wurde. Die Migration wurde nach 24 h Messung ausgewertet. Die Versuche

wurden mit 2 technischen Replikaten und mind. 3 biologischen Replikaten für jeden Stimulationsansatz durchgeführt.

5.7.2.4 Berechnung der Migration

Für die Berechnung der Migration wurde der Mittelwert des Blank von allen Rohwerten (CI, Adsorption) abgezogen. Die prozentuale Migration bezogen auf die Kontrollgruppe (unbehandelt; HCV29) wurde nach folgender Formel berechnet, statistisch mittels Mann-Whitney U Test unter Verwendung der Software IBM SPSS Statistics 20 [IBM SPSS GmbH] ausgewertet und in Boxplots dargestellt.

$$Migration [\%] = \left(\frac{\Delta CI/Adsorption_{Behandelt}}{\Delta CI/Adsorption_{Kontrolle}} \right) * 100\%$$

6 Ergebnisse

6.1 Invasionsassay der Harnblasenkarzinomzelllinien

Basierend auf den Datenblättern und Literaturrecherchen wurden 5 verschiedene UBC-Zelllinien (RT112; 5637; T24; J82; 253J-BV) ausgewählt [187, 188, 196-198]. Das Invasionspotenzial der einzelnen Zellen wurde mit Hilfe eines Invasionsassays überprüft und zeigte deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien (Abb. 12). Das Adsorptionssignal der invadierten Zellen der Zelllinien T24, J82 und 253J-BV war ca. 4-mal größer als das der Zelllinien RT112 und 5637. Für die folgenden Versuche wurden daher die Zelllinien zum einen basierend auf dem Invasionsassay und zum anderen anhand von Literaturangaben in 2 nicht invasive (RT112; 5637) und 3 invasive UBC-Zelllinien (T24; J82; 253J-BV) unterteilt.

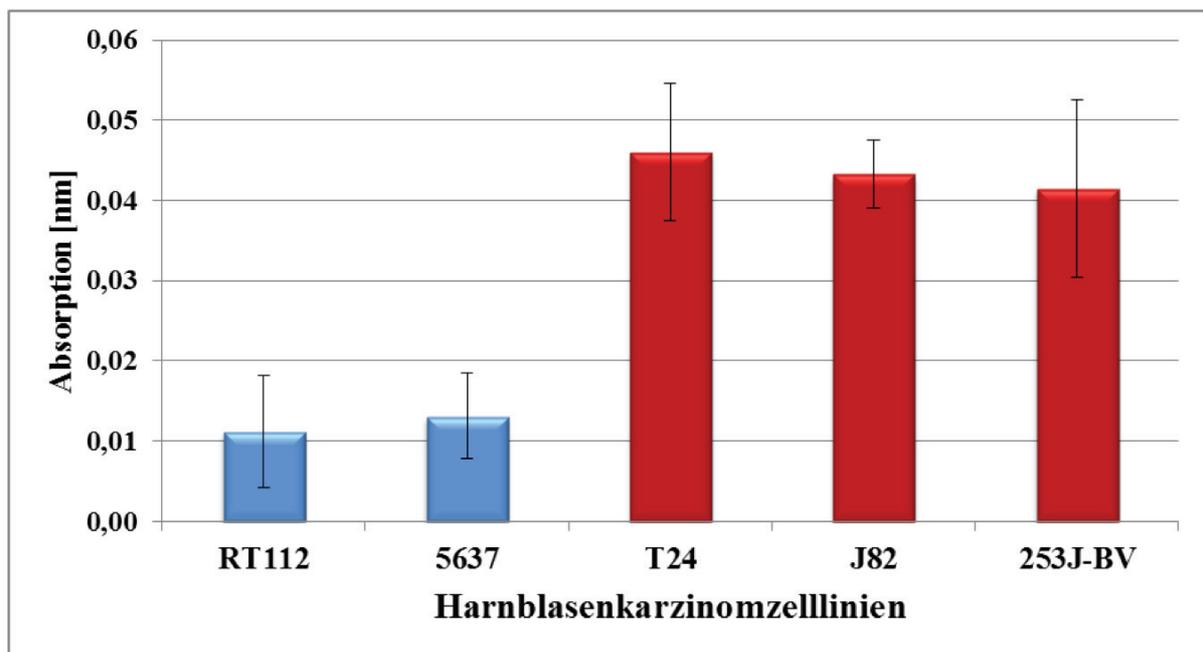


Abbildung 12: Invasionspotential von Harnblasenkarzinomzelllinien

Die Experimente wurden in 3 biologischen Replikaten durchgeführt. Nicht invasive Zellen sind blau und invasive UBC-Zellen rot dargestellt. (Absorptionswerte: Anhang Tab. 25)

6.2 Methodische Optimierung der Isolation von Exosomen aus Zellkulturüberständen

Die Optimierung der verschiedenen Exosomen-Isolationsmethoden wurde in mehreren Schritten durchgeführt. Zunächst erfolgte die Messung der Zellvitalität unter Verwendung des Zellkulturmediums versetzt mit 10 % ED-FKS. Anschließend wurden die isolierten Exosomen mittels Western Blot, Elektronenmikroskopie und NTA in Abhängigkeit von der verwendeten Isolationsmethode charakterisiert.

6.2.1 Vitalität von Harnblasenzellen bei Kultivierung mit Exosomen-freiem Medium

Die Zellen wurden für die Exosomen-Isolation in Kulturmedium versetzt mit 10 % ED-FKS kultiviert. Die Vitalität der Zelllinien unter ED-Medium wurde verglichen zur Kultivierung mit normalem Medium untersucht (Abb. 13).

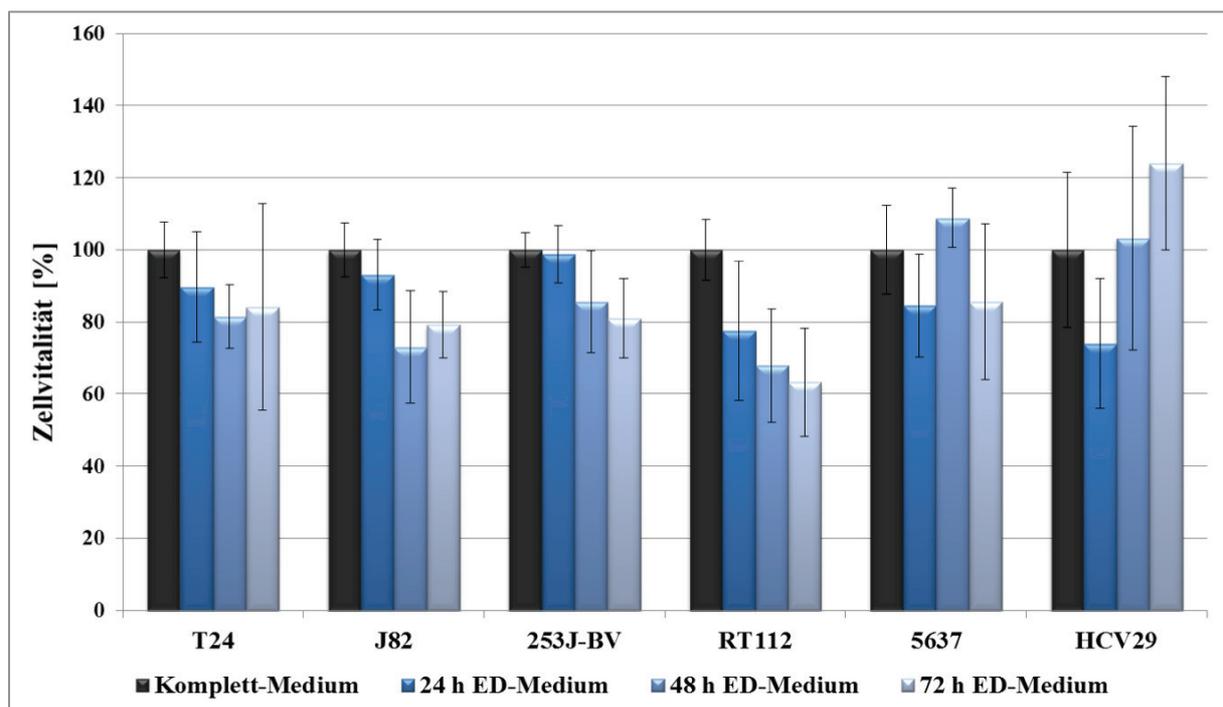


Abbildung 13: Zellvitalität von UBC-Zellen und normalen Harnblasenzellen unter Verwendung von Exosomen-freiem Kulturmedium verglichen zu normalem Kulturmedium

Die Zellen wurden über verschiedene Zeiträume (24 h, 48 h, 72 h) mit Exosomen-freiem Medium (ED-Medium) verglichen zu normalem Kulturmedium (Komplett-Medium) kultiviert. Für jede Zelllinie und jeden Zeitraum wurden mind. 3 biologische Replikate mit 2-3 technischen Replikaten untersucht. Die statistischen Signifikanzen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U Testes ermittelt. (Absorptionswerte: Anhang Tab. 26)

Für die primären HBF wurde kein Vitalitätstest durchgeführt, da diese bereits ohne FKS kultiviert wurden. Unter Verwendung von ED-Medium kommt es zu einer verringerten

Vitalität von UBC-Zellen über die Zeit verglichen zu Komplett-Medium ($P > 0,05$). Diese wurde je nach Zelllinie um 1-37 % verringert (Anhang Tab. 27). Nach 72 h wurde für die Zelllinie RT112 mit 63 ± 15 % die geringste und für die Zelllinie 5637 mit 86 ± 22 % die höchste prozentuale Vitalität gemessen. Normale Harnblasenzellen (HCV29) wiesen nach 24 h eine verminderte Vitalität (74 ± 18 %) auf, welche nach 48 h auf 103 ± 31 % und nach 72 h auf 124 ± 24 % anstieg ($P > 0,05$). Der Einfluss auf die Vitalität war bei keiner der verwendeten Zelllinie signifikant ($P > 0,05$). Es konnte kein signifikanter Einfluss über die 3 Inkubationszeiträume beobachtet werden ($P > 0,05$). ED-Medium induzierte keine signifikanten Veränderungen der Zellvitalität und wurde nachfolgend für alle Versuche verwendet, um den potentiellen Einfluss exosomaler Vesikel aus dem FKS für die Folgeversuche zu minimieren.

6.2.2 Charakterisierung von durch Harnblasenkarzinomzelllinien sezernierten Exosomen

Die mittels Ultrazentrifugation (UC-Exosomen) oder dem Life Technologies Kit (Kit-Exosomen) isolierten Exosomen wurden mit Hilfe des Western Blots auf das Vorhandensein typischer exosomaler Marker überprüft. Anschließend wurde die Partikelanzahl und -größe unter Verwendung der NTA-Methode analysiert. Weiterhin wurde exemplarisch für eine Zelllinie (T24) die Morphologie der Exosomen mittels Elektronenmikroskopie untersucht.

6.2.2.1 Nachweis spezifischer Proteine in UBC-Zelllinien und ihren sezernierten Exosomen

Im ersten Teil wurden die Western Blot Analysen für UBC-Zellen und ihre UC-Exosomen durchgeführt (Abb. 14). Die UC-Exosomen aller UBC-Zellen wiesen ein hohes Level der exosomalen Marker CD81 und Syntenin auf. Für das Tetraspanin CD81 konnten im Immunoblot 2 Banden bei ca. 25 kDa und 40-50 kDa detektiert werden, wovon die 25 kDa Bande mit der im Datenblatt angegebenen Bande übereinstimmte. Alix zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Exosomen und Zellen, weshalb dieser Marker für Western Blot Analysen der Kit-Exosomen ausgeschlossen wurde. Calretikulin konnte nur in der zellulären Fraktion detektiert werden, wodurch die Reinheit in Bezug auf zelluläre Kontaminationen der UC-Exosomen bestätigt werden konnte. GAPDH, als Ladungskontrolle, weist keine stabile Expression in der zellulären und exosomalen Fraktionen einer Zelllinie auf. Dieser Marker wurde ebenfalls für weitere Western Blot Analysen an Kit-Exosomen

ausgeschlossen. Stattdessen wurde als Positivkontrolle für die Beladung eine Coomassieblau-Färbung des SDS-Gels durchgeführt.

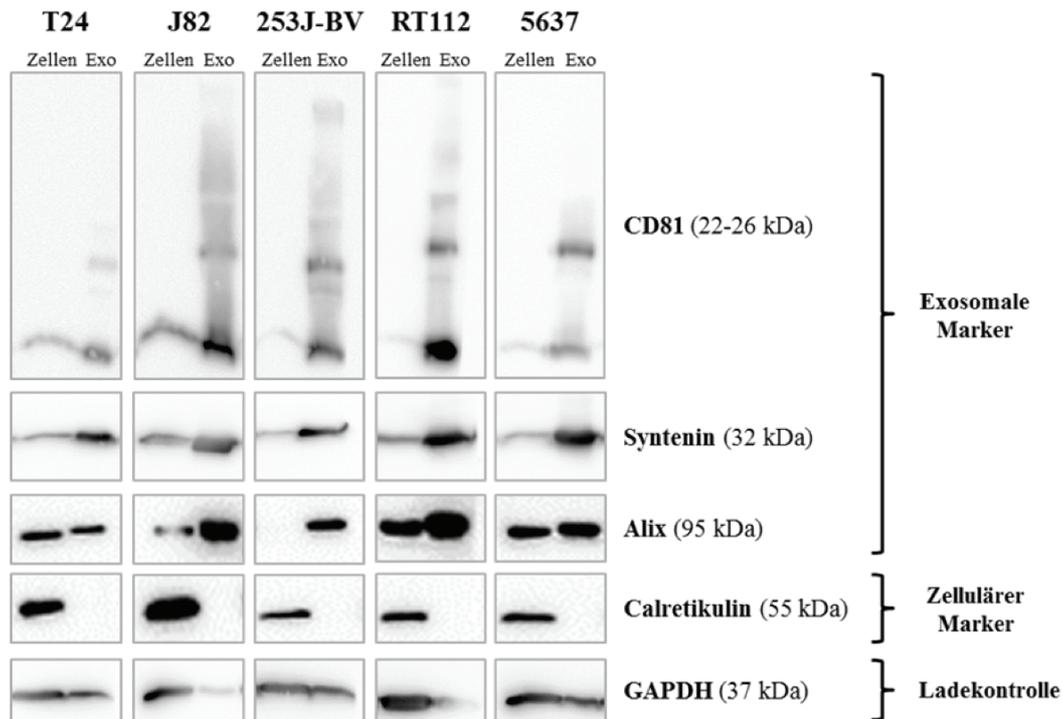


Abbildung 14: Western Blot Analyse von UBC-Zellen und ihren Exosomen nach Ultrazentrifugation

Immunoblot von UBC-Zellen und ihren Exosomen (Exo) für die exosomalen Marker CD81 (22-25 kDa), Syntenin (32 kDa), Alix (95 kDa), den zellulären Kontaminationsmarker Calretikulin (55 kDa) und die Ladekontrolle GAPDH (37 kDa). (Proteinmenge: 20 µg)

Kit-Exosomen wiesen ein hohes Level der exosomalen Marker CD81 und Syntenin verglichen zu den Zellen auf (Abb. 15). Es konnte für CD81 keine Doppelbande detektiert werden, sondern lediglich eine Bande bei ca. 25 kDa. Die Exosomen besaßen keine zellulären Kontaminationen mit dem Protein Calretikulin.

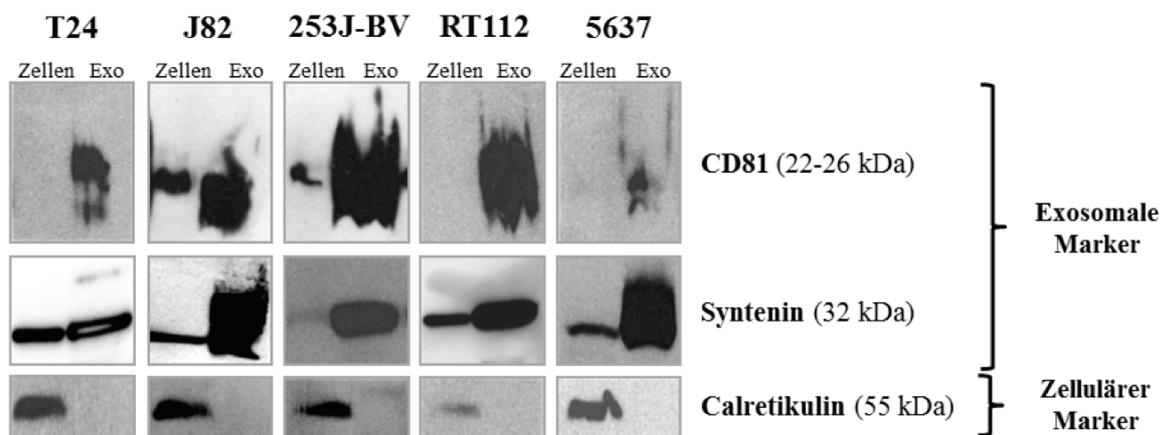


Abbildung 15: Western Blot Analyse von UBC-Zellen und ihren Exosomen nach Kit-Isolation

Immunoblot von UBC-Zellen und ihren Exosomen (Exo) für die exosomalen Marker CD81 (22-25 kDa), Syntenin (32 kDa) und den zellulären Kontaminationsmarker Calretikulin (55 kDa). (Proteinmenge: 20 µg)

6.2.2.2 Bestimmung von Größe und Anzahl der tumor-assoziierten Exosomen

Die Morphologie der Exosomen wurde exemplarisch für die Zelllinie T24 mit Hilfe der Elektronenmikroskopie analysiert (Abb. 16). Unabhängig von der Isolationsmethode wiesen die Exosomen eine vesikuläre Struktur auf. UC-Exosomen haben eine mediane Größe von 40 ± 13 nm und Kit-Exosomen von 57 ± 16 nm. Es konnte kein signifikanter Größenunterschied zwischen den Isolationsmethoden detektiert werden ($P > 0,05$).

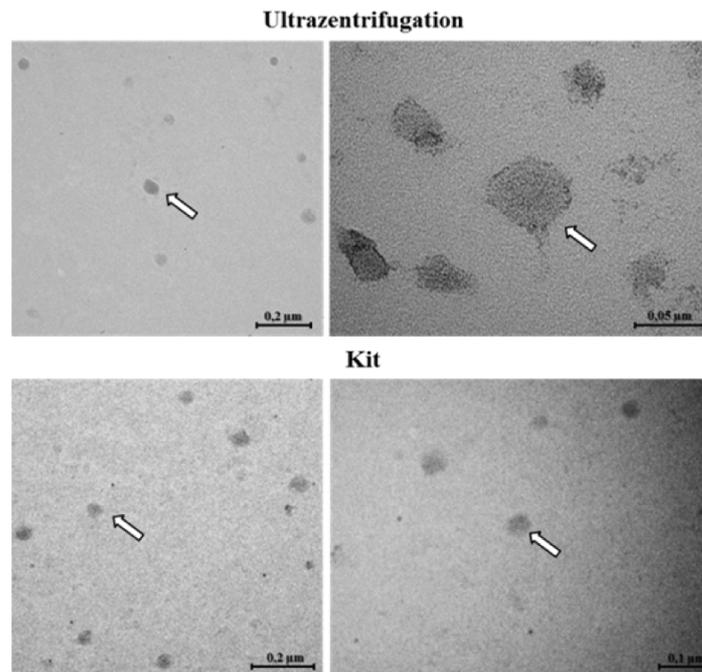


Abbildung 16: Elektronenmikroskopie von T24-Exosomen isoliert mittels Ultrazentrifugation und Kit
Tumor-assoziierte Exosomen von T24-Zellen isoliert mittels Ultrazentrifugation und dem Life Technologies Kit. (Maßstab: 200 nm; 100 nm; 50 nm)

Die Bestimmung der Partikelgröße und -anzahl erfolgte mittels NTA (Abb. 17 A). Für UC-Exosomen wurden deutlich größere Partikelgrößen (110-144 nm) verglichen zu Kit-Exosomen (61-81 nm) gemessen. Der Unterschied war für alle verwendeten Ausgangszelllinien signifikant ($P < 0,05$), liegt jedoch für beide Isolationsmethoden in dem Größenbereich von 61-144 nm. Mit Hilfe der Kit-Isolation konnten signifikant höhere Partikelanzahlen verglichen zur UC isoliert werden (Abb. 17 B). Die Schwankungen innerhalb jeder Probengruppe waren unabhängig von der Isolationsmethode sehr groß. Beide Methoden konnten im Rahmen dieser Dissertation etabliert werden. Die Kit-basierte Methode wurde für die deskriptiven Analysen wie miRNA-Expressionsanalysen in vitro und Patienten-abgeleiteten Proben (Urinexosomen) verwendet.

UC-Exosomen wurden für alle funktionellen Analysen wie Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Exosomen, exosomaler miRNA-Transfer, Proliferations- und Migrationsanalysen nach Stimulation mit tumor-assoziierten Exosomen, genutzt.

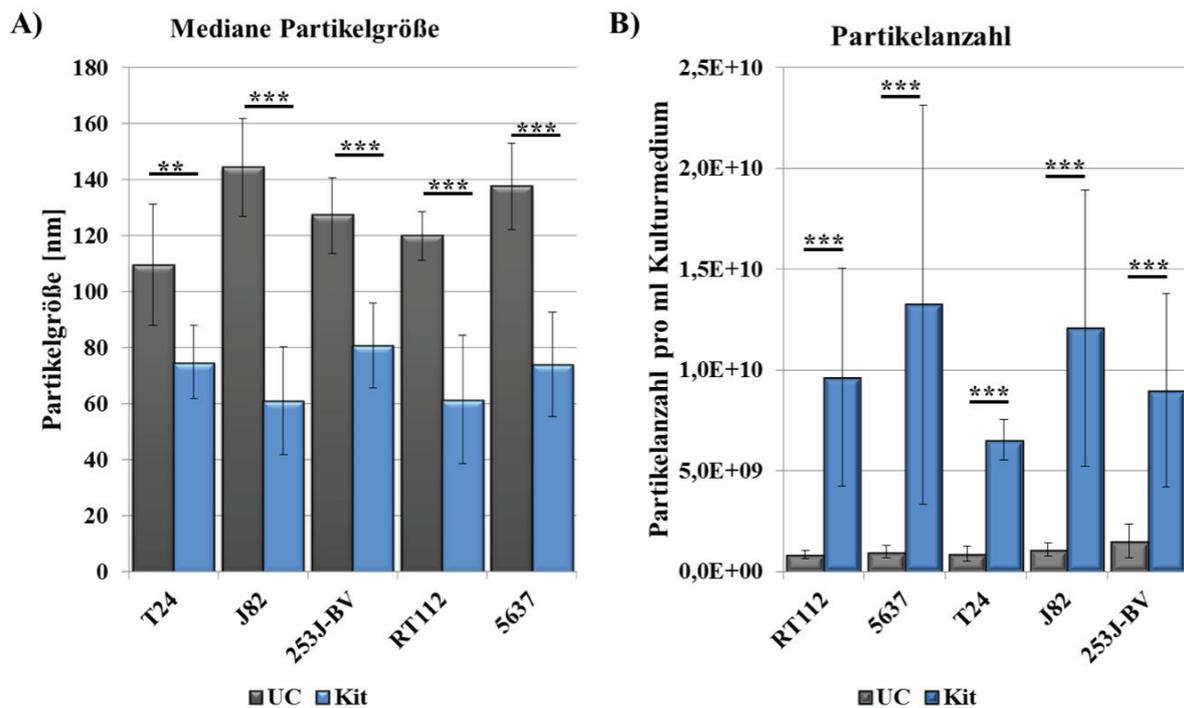


Abbildung 17: Mediane Partikelgröße und Partikelanzahl pro ml Kulturmedium in Abhängigkeit von der Isolationsmethode

A) Der Vergleich der medianen Partikelgröße von Exosomen sezerniert durch UBC-Zellen und B) der Vergleich der Partikelanzahl pro ml Kulturmedium von Exosomen sezerniert durch UBC-Zellen, die mit Ultrazentrifugation (UC, grau) oder Kit (hellblau) isoliert wurden. Beide Parameter wurden an 3 unabhängigen biologischen Replikaten pro Zelllinie mit jeweils 3 technischen Replikaten unter Verwendung der Nanopartikel-Tracking-Analyse ermittelt. Die statistischen Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney U Tests berechnet. (Signifikanzen: * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; Rohdaten: Anhang Tab. 28-30)

6.3 MiRNA-Expressionsanalysen von Harnblasenkarzinomzelllinien und ihren Exosomen

6.3.1 Identifizierung und Validierung invasions-assoziiertes miRNAs in Harnblasenkarzinomzelllinien und ihren Exosomen

Eines der Hauptziele dieser Arbeit lag in der Identifizierung von invasions-assoziierten miRNAs in UBC-Zellen und ihren Exosomen. Dafür wurde das genomweite miRNA-Expressionsprofil von 6 invasiven (T24: $n = 2$; J82: $n = 2$; 253J-BV: $n = 2$) und 4 nicht invasiven UBC-Zellen (RT112: $n = 2$; 5637: $n = 2$) sowie den sezernierten Exosomen (RT112: $n = 2$; 5637: $n = 2$; T24: $n = 2$; J82: $n = 2$; 253J-BV: $n = 2$) mit Hilfe der miRNA Microarray Technologie analysiert.

6.3.1.1 Harnblasenkarzinomzelllinien

Es konnten 37 signifikant deregulierte miRNAs identifiziert werden ($P < 0,05$; Fold Change (FC) $> 1,5$; $\sigma = 0,2$), die invasive und nicht invasive UBC-Zellen unterscheiden (Abb. 18; Anhang Tab. 31). 29 miRNAs zeigten eine verminderte Expression und 8 miRNAs eine erhöhte Expression in invasiven UBC-Zellen. Die Proben wurden basierend auf ihrer miRNA-Expression *unsupervised* hierarchisch in einer Heatmap dargestellt.

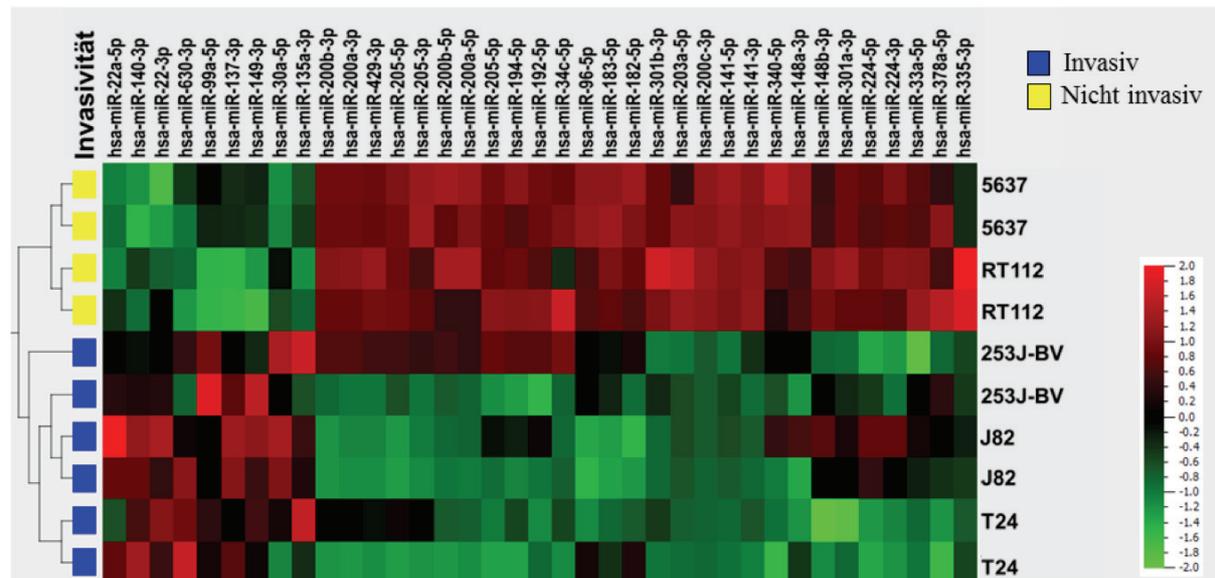


Abbildung 18: Heatmap nach Microarray-Analyse in invasiven UBC-Zellen verglichen zu nicht invasiven UBC-Zellen

Die Heatmap zeigt das miRNA-Expressionslevel in invasiven (blau; $n = 6$) verglichen zu nicht invasiven UBC-Zellen (gelb; $n = 4$). Die Proben wurden anhand ihrer miRNA-Expression *unsupervised* hierarchisch gruppiert. P-Werte wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests berechnet. Für jede Zelllinie wurden 2 biologische Replikate verwendet. ($P < 0,05$; Fold Change $> 1,5$; $\sigma = 0,2$)

Für die Validierung spezifischer invasions-assoziiierter miRNAs wurden aus den Microarray-Daten 5 miRNAs ausgewählt (Tab. 22). 3 der miRNAs waren erhöht und 2 vermindert exprimiert in invasiven Zellen.

Tabelle 22: 5 Differenziell exprimierte miRNAs in invasiven verglichen zu nicht invasiven UBC-Zellen

Invasions-assoziierte miRNAs die anhand der Microarray-Ergebnisse ausgewählt wurden. P-Wert $< 0,05$; Fold Change $> 1,5$; $\sigma = 0,2$. (Komplette Tabelle: Anhang Tab. 31)

MiRNA	P-Wert	Fold Change	Expression
miR-99-5p	0,01	8,56	erhöht
miR-137-3p	0,01	41,34	erhöht
miR-141-3p	$< 0,001$	0,001	erniedrigt
miR-200a-3p	0,01	0,013	erniedrigt
miR-205-5p	0,01	0,002	erniedrigt

Die mittels Microarray ermittelten signifikanten Unterschiede konnten mit der qPCR bestätigt werden (Abb. 19). Die miRNAs miR-141-3p (FC = 0,009), -200a-3p (FC = 0,035) und -205-5p (FC = 0,004) zeigten eine signifikant verminderte Expression in invasiven verglichen zu nicht invasiven UBC-Zellen ($P < 0,001$). Die erhöhte Expression der miRNAs miR-99a-5p (FC = 30,31) und -137-3p (FC = 10,46) konnte mit einer Signifikanz von $P < 0,05$ verifiziert werden.

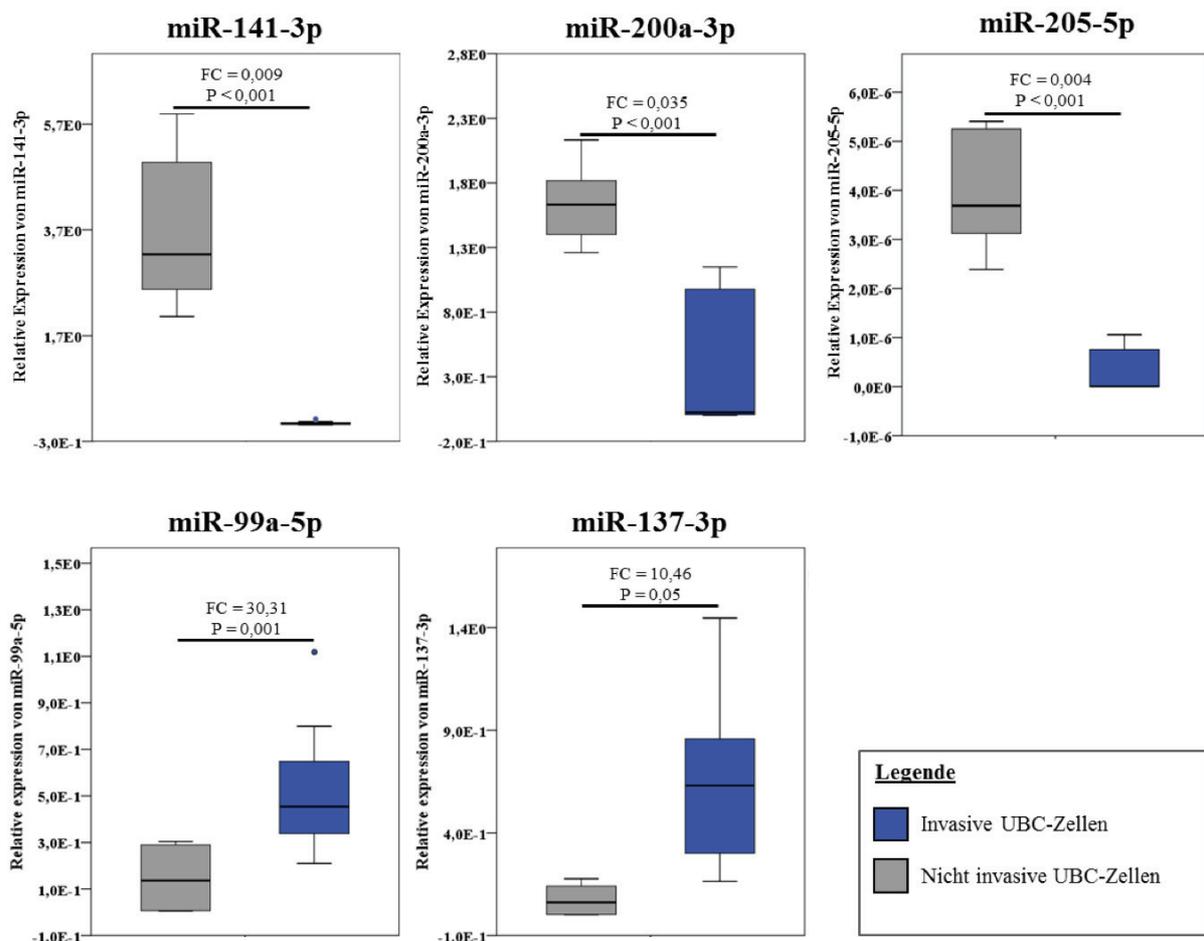


Abbildung 19: Relative Expression von 5 deregulierten miRNAs in invasiven verglichen zu nicht invasiven UBC-Zellen

Relative Expression von 5 deregulierten miRNAs in invasiven (blau; n = 9) verglichen zu nicht invasiven UBC-Zellen (grau; n = 6). Pro Zelllinie wurden 3 biologische Replikate mittels qPCR analysiert. Das Expressionslevel wurde mit dem Referenzgen RNU48 normalisiert. P-Werte wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests berechnet. (FC = Fold Change; P = P-Wert; UBC = Harnblasenkarzinom; Ct-Werte: Anhang Tab. 32)

6.3.1.2 Tumor-assoziierte Exosomen

In Abhängigkeit von der Invasivität der Ausgangszellen konnten 15 signifikant deregulierte miRNAs in Exosomen identifiziert werden ($P < 0,05$; $FC > 1,5$; $\sigma = 0,2$; Abb. 20; Anhang Tab. 33). Von diesen waren 7 erhöht und 8 erniedrigt exprimiert in Exosomen sezerniert von invasiven verglichen zu Exosomen aus nicht invasiven UBC-Zellen.

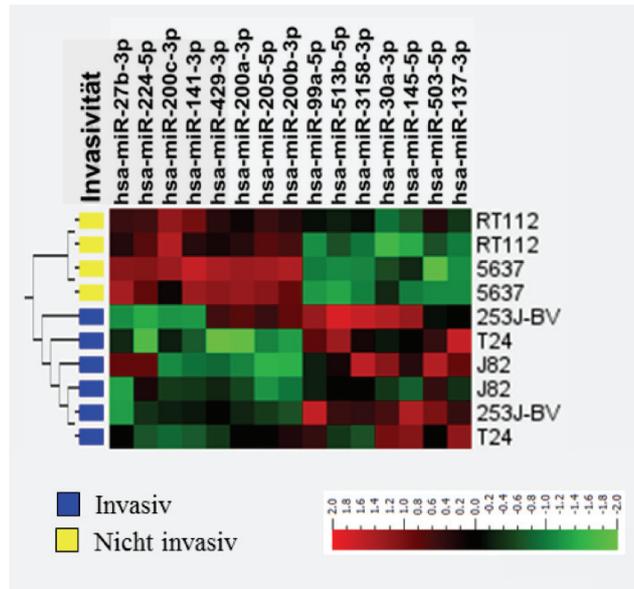


Abbildung 20: Heatmap nach Microarray-Analyse in Exosomen sezerniert von invasiven UBC-Zellen verglichen zu Exosomen sezerniert von nicht invasiven Zellen

Die Heatmap zeigt das miRNA-Expressionslevel in Exosomen sezerniert von invasiven UBC-Zellen (blau; $n = 6$) verglichen zu Exosomen sezerniert von nicht invasiven UBC-Zellen (gelb; $n = 4$). Die Proben wurden anhand ihrer miRNA-Expression *unsupervised* hierarchisch gruppiert. P-Werte wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests berechnet. Für jede Zelllinie wurden 2 biologische Replikate der sezernierten Exosomen verwendet. ($P < 0,05$; Fold Change $> 1,5$; $\sigma = 0,2$)

Anhand der FC-Werte des Microarrays wurden 8 differentiell exprimierte miRNAs für die Validierung mittels qPCR ausgewählt ($P < 0,05$; Tab. 23). Jeweils 4 miRNAs waren erhöht oder vermindert exprimiert in Exosomen sezerniert von invasiven UBC-Zellen.

Tabelle 23: 8 differentiell exprimierte miRNAs in Exosomen sezerniert von invasiven UBC-Zellen verglichen zu Exosomen aus nicht invasiven UBC-Zellen

Invasions-assoziierte miRNAs in Exosomen die anhand der Microarray-Ergebnisse ausgewählt wurden. P-Wert $< 0,05$; Fold Change $> 1,5$; $\sigma = 0,2$. (Komplette Tabelle: Anhang Tab. 33)

MiRNA	P-Wert	Fold Change	Expression
miR-145-5p	0,04	3,38	erhöht
miR-30a-3p	0,02	4,27	erhöht
miR-99-5p	0,04	3,83	erhöht
miR-137-3p	0,01	9,25	erhöht
miR-27b-3p	0,04	0,27	erniedrigt
miR-141-3p	0,01	0,001	erniedrigt
miR-200a-3p	0,04	0,019	erniedrigt
miR-205-5p	0,04	0,069	erniedrigt

Zum jetzigen Zeitpunkt existiert keine geeignete Normalisierungsmethode für die miRNA-Expression in Exosomen, weshalb in dieser Arbeit keine Normalisierung erfolgte. Durch die qPCR-Daten konnten 5 miRNAs validiert werden (Abb. 21).

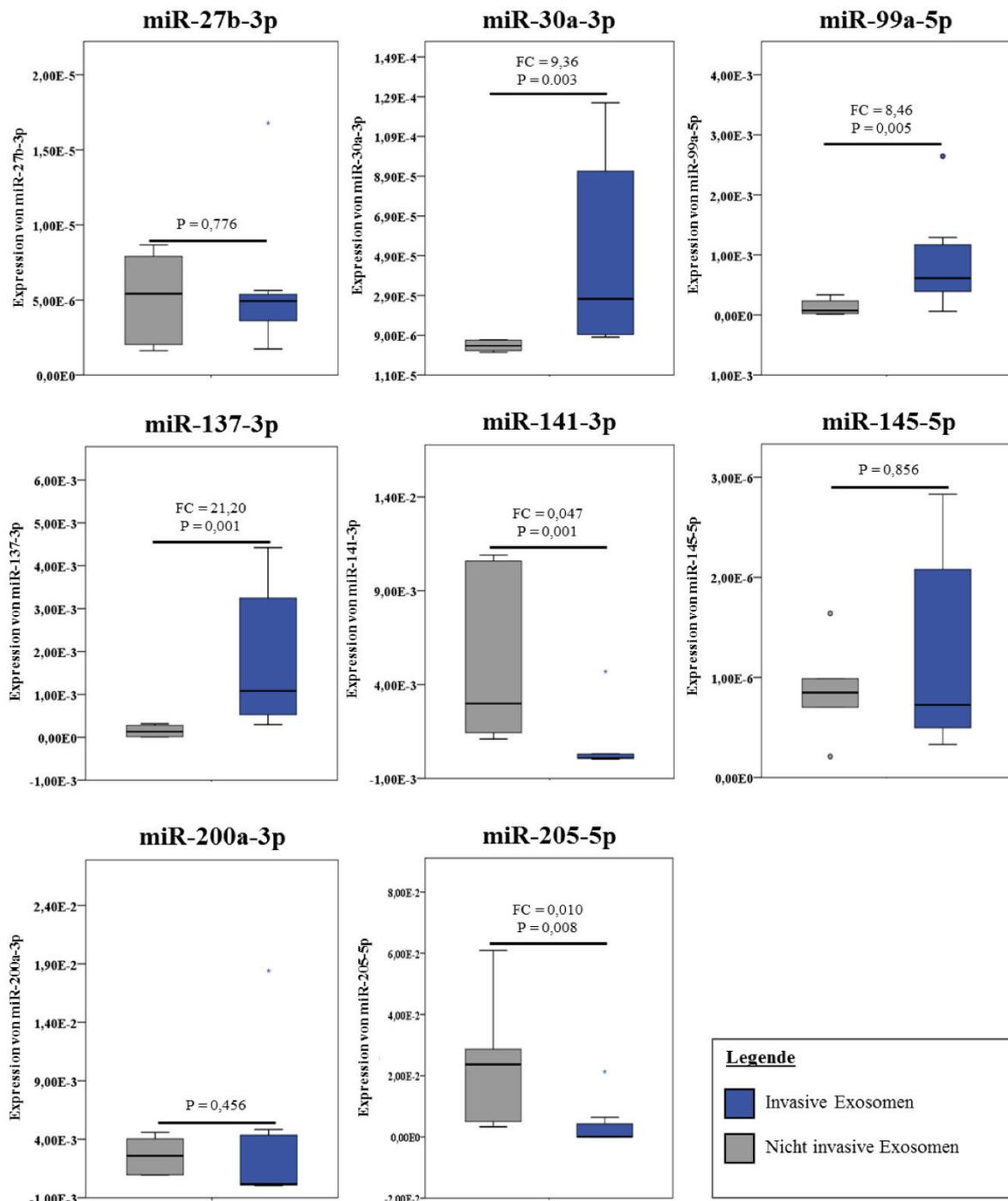


Abbildung 21: Expression von 8 deregulierten miRNAs in Exosomen sezerniert von invasiven UBC-Zellen verglichen zu Exosomen aus nicht invasiven UBC-Zellen

Expression von 8 deregulierten miRNAs in Exosomen sezerniert von invasiven UBC-Zellen (blau; n = 9) verglichen Exosomen aus nicht invasiven Zellen (grau; n = 6). Pro Zelllinie wurden 3 biologische Replikate mittels qPCR analysiert. P-Werte wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests ermittelt. (FC = Fold Change; P = P-Wert; UBC = Urinary bladder cancer; Ct-Werte: Anhang Tab. 34)

Die miRNAs miR-141-3p (FC = 0,047) und -205-5p (FC = 0,01) waren signifikant vermindert exprimiert in Exosomen von invasiven UBC-Zellen ($P < 0,05$). Für die miRNAs miR-30a-3p (FC = 9,36), -99a-5p (FC = 8,46) und -137-3p (FC = 21,20) konnte eine signifikant erhöhte Expression in Exosomen sezerniert von invasiven UBC-Zellen bestätigt werden ($P < 0,05$). Für die miRNAs miR-27b-3p ($P = 0,776$), -145-5p ($P = 0,864$) und -200a-3p ($P = 0,456$) konnte kein signifikanter Unterschied detektiert werden.

6.3.2 Vergleich der invasions-assoziierten miRNA-Expressionsmuster von Harnblasenkarzinomzelllinien und ihren Exosomen

Anhand der Microarray-Analysen der UBC-Zellen und ihrer Exosomen wurden invasions-assoziierte miRNA-Expressionsmuster auf zellulärer und exosomaler Ebene verglichen (Abb. 22). Die Rohdaten wurden auf die eingesetzte RNA-Menge normalisiert. 81 % der in invasiven UBC-Zellen gefundenen miRNAs konnten auch in ihren sezernierten Exosomen detektiert werden. 62 % der miRNAs aus nicht invasiven UBC-Zellen wurden in ihren sezernierten Exosomen detektiert.

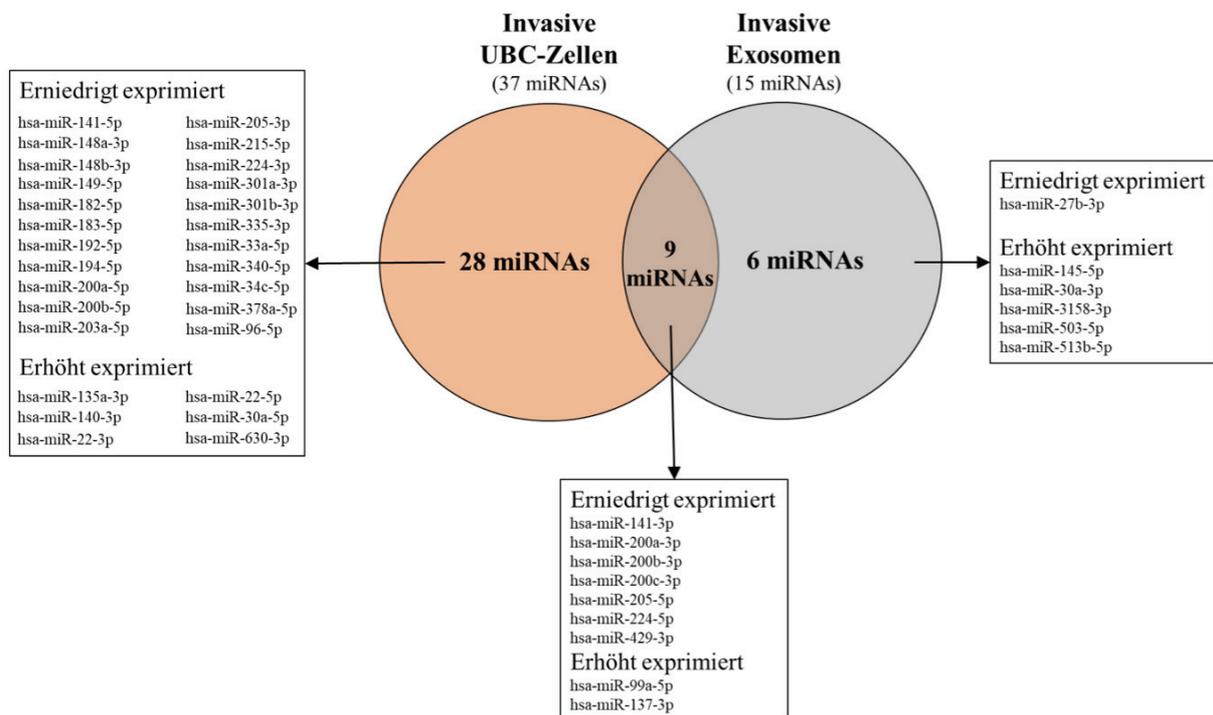


Abbildung 22: VENN-Diagramm von differenziell exprimierten miRNAs in invasiven UBC-Zellen und ihren Exosomen

Basierend auf den invasions-assoziierten miRNA-Signaturen von invasiven UBC-Zellen (37 miRNAs) und ihren sezernierten Exosomen (15 miRNAs) wurde ein VENN-Diagramm erstellt. Dabei konnten 9 miRNAs identifiziert werden, die sowohl in invasiven UBC-Zellen als auch ihren sezernierten Exosomen differenziell exprimiert werden. (FC-Werte: Anhang Tab. 31, 33, 35)

Es konnten 9 miRNAs identifiziert werden, welche sowohl zwischen invasiven UBC-Zellen als auch den entsprechenden Exosomen differentiell exprimiert werden. Von diesen waren 2 erhöht und 7 erniedrigt exprimiert (Abb. 22; Tab. 24).

Tabelle 24: Invasions-assoziierte miRNAs in invasiven UBC-Zellen und ihren sezernierten Exosomen

P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney U Test bestimmt. P-Wert < 0,05; Fold Change > 1,5; $\sigma = 0,2$; invasive UBC-Zellen n = 6; nicht invasive UBC-Zellen n = 4; Biologische Replikate pro Zelllinie n = 2. (Komplette Tabelle: Anhang Tab. 31, 33)

MiRNA	UBC-Zellen			Exosomen		
	P-Wert	Fold Change	Expression	P-Wert	Fold Change	Expression
hsa-miR-141-3p	< 0,001	0,001	erniedrigt	0,01	0,001	erniedrigt
hsa-miR-200a-3p	0,01	0,01	erniedrigt	0,04	0,02	erniedrigt
hsa-miR-200b-3p	0,01	0,01	erniedrigt	< 0,001	0,03	erniedrigt
hsa-miR-200c-3p	< 0,001	0,001	erniedrigt	< 0,001	0,06	erniedrigt
hsa-miR-205-5p	0,01	0,002	erniedrigt	0,04	0,07	erniedrigt
hsa-miR-224-5p	0,03	0,02	erniedrigt	0,04	0,07	erniedrigt
hsa-miR-429-3p	0,02	0,01	erniedrigt	0,04	0,08	erniedrigt
hsa-miR-99a-5p	0,01	8,56	erhöht	0,04	3,83	erhöht
hsa-miR-137-3p	0,01	41,34	erhöht	0,01	9,25	erhöht

Weiterhin konnte eine miRNA-Signatur von 28 miRNAs identifiziert werden, die charakteristisch nur in UBC-Zellen in Abhängigkeit von der Invasivität signifikant differentiell exprimiert werden, nicht aber in den durch sie sezernierten Exosomen ($P < 0,05$; Abb. 22; Anhang Tab. 35). Von diesen 28 miRNAs waren 6 erhöht und 22 erniedrigt exprimiert. 6 miRNAs zeigten eine signifikant differentielle Expression in Exosomen aus invasiven verglichen zu Exosomen aus nicht invasiven UBC-Zellen, nicht aber zwischen ihren Ausgangszellen (Abb. 22; Anhang Tab. 35). 5 dieser miRNAs waren erniedrigt und eine erhöht exprimiert.

6.4 Vergleich invasions-assoziiertes miRNAs zwischen Harnblasenkarzinomzelllinien und Tumorgewebeproben

Um die Ergebnisse der Zelllinien an Tumorproben zu überprüfen, wurden Microarray-basierte miRNA-Expressionsanalysen an FFPE-Geweben von MIBC- und NMIBC-Patienten durchgeführt. Weiterhin erfolgte die Überprüfung der differentiellen Expression ausgewählter exosomaler miRNAs in Urinexosomen von Patienten mit MIBC und NMIBC.

6.4.1 MiRNA-Expressionsanalysen in Gewebeproben von MIBC- und NMIBC-Patienten

63 miRNAs waren signifikant differentiell in MIBC verglichen zu NMIBC exprimiert ($P < 0,05$; Fold Change (FC) $> 1,5$; $\sigma = 0,25$; Abb. 23; Anhang Tab. 36). Neben 35 signifikant erhöht exprimierten miRNAs konnten 28 vermindert exprimierte miRNAs detektiert werden. Auf Basis der miRNA-Expression erfolgte die *unsupervised* hierarchische *Clustering*. Dabei konnte bis auf jeweils 2 Proben pro Gruppe eine richtige Einordnung erreicht werden.

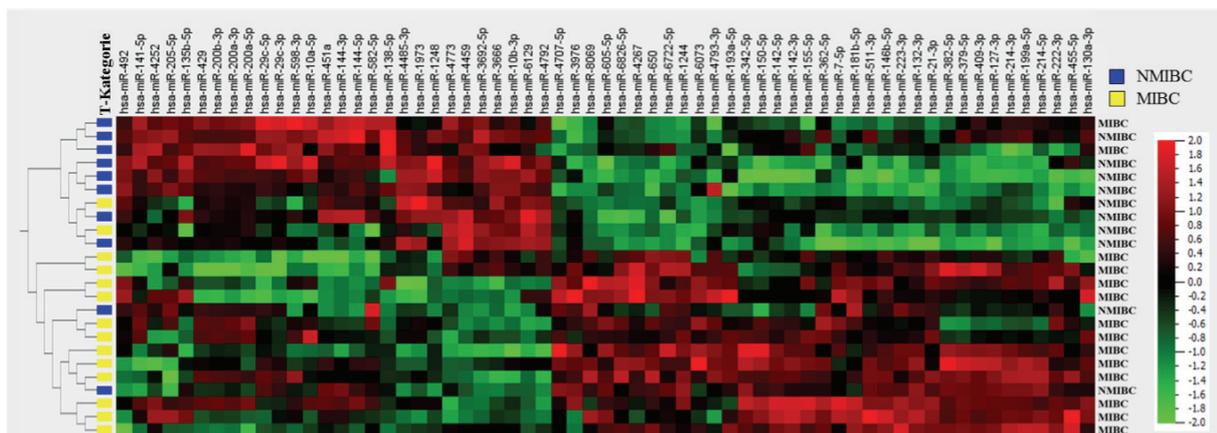


Abbildung 23: Heatmap nach Microarray-Analyse in MIBC verglichen zu NMIBC

Die Heatmap zeigt das miRNA-Expressionslevel in MIBC (blau; $n = 14$) verglichen zu NMIBC (gelb; $n = 10$). Die Proben wurden anhand ihrer miRNA-Expression *unsupervised* hierarchisch gruppiert. P-Werte wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests ermittelt. ($P < 0,05$; Fold Change $> 1,5$; $\sigma = 0,25$; NMIBC = nicht muskelinvasive Harnblasenkarzinome; MIBC = muskelinvasive Harnblasenkarzinome)

6.4.2 Vergleich invasions-assoziiertes miRNAs zwischen Zelllinien und Gewebeproben

Basierend auf den Microarray-Daten konnten invasions-assoziierte miRNA-Signaturen sowohl *in vitro* (37 miRNAs) als auch in Patienten-abgeleiteten Gewebeproben (63 miRNAs) identifiziert werden. Es wurden 6 miRNAs detektiert, die signifikant differentiell in invasiven UBC-Zellen und MIBC exprimiert werden ($P < 0,05$): miR-141-5p (FC = 0,43), -200a-3p (FC = 0,23), -200a-5p (FC = 0,44), -200b-3p (FC = 0,27), -205-5p (FC = 0,523) und -429-3p (FC = 0,22) (Abb. 24).

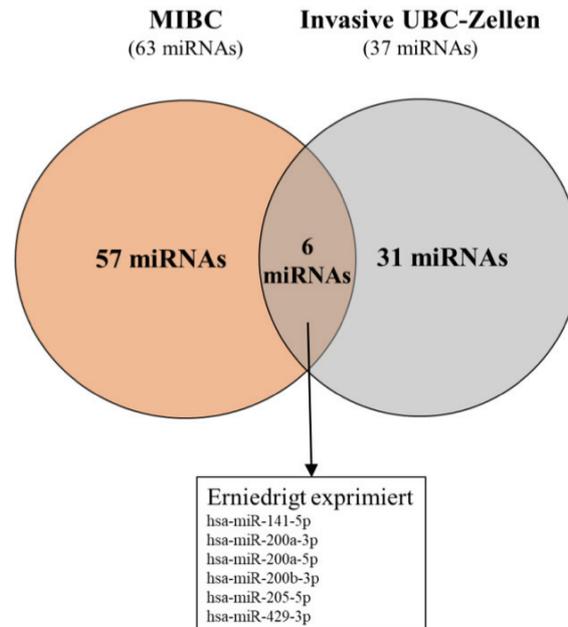


Abbildung 24: VENN-Diagramm von differenziell exprimierten miRNAs in invasiven UBC-Zellen und MIBC

Basierend auf den invasions-assoziierten miRNA-Signaturen von invasiven UBC-Zellen (37 miRNAs) und MIBC (63 miRNAs) wurde ein VENN-Diagramm erstellt. Dabei konnten 6 miRNAs identifiziert werden, die sowohl in invasiven UBC-Zellen als auch MIBC differenziell exprimiert werden. (MIBC = Muskelinvasive Harnblasenkarzinome; FC-Werte: Anhang Tab. 31, 36)

31 miRNAs zeigten eine signifikant differentielle Expression in invasiven UBC-Zellen, nicht aber in MIBC-Gewebeproben. 57 miRNAs waren nur zwischen MIBC- und NMIBC-Tumoren differenziell exprimiert, nicht aber zwischen invasiven und nicht invasiven UBC-Zellen.

6.4.3 Validierung ausgewählter exosomaler miRNAs in Urinexosomen von Harnblasenkarzinompatienten

Um die Eignung von Exosomen als diagnostische Marker zu prüfen, erfolgte die Quantifizierung ausgewählter miRNAs aus Urinexosomen von 21 Patienten (NMIBC n = 7; MIBC n = 14). Die mediane Partikelgröße von Urinexosomen lag bei 138 ± 41 nm mit einer medianen Partikelanzahl von $3,88 \times 10^{10} \pm 6,73 \times 10^{10}$ pro ml Urin (Anhang Tab. 37). Es konnten 120-600 ng Gesamt-RNA mit einem 260/280-Verhältnis von 1,3-1,9 und 260/230-Verhältnis von 0,4-1,7 isoliert werden. Der Nachweis der miRNA miR-137-3p war in keiner Urinprobe möglich. Lediglich die miRNA miR-200a-3p zeigte eine tendenziell verminderte Expression (FC = 0,259; P = 0,084) in Urinexosomen von MIBC- verglichen zu NMIBC-Patienten (Abb. 25). Für die anderen 6 miRNAs (miR-27b-3p; -30a-3p; -99a-5p; -141-3p; 145-5p; -205-5p) wurden keine Unterschiede in der Expression zwischen MIBC- und NMIBC-Patienten detektiert (P > 0,1).

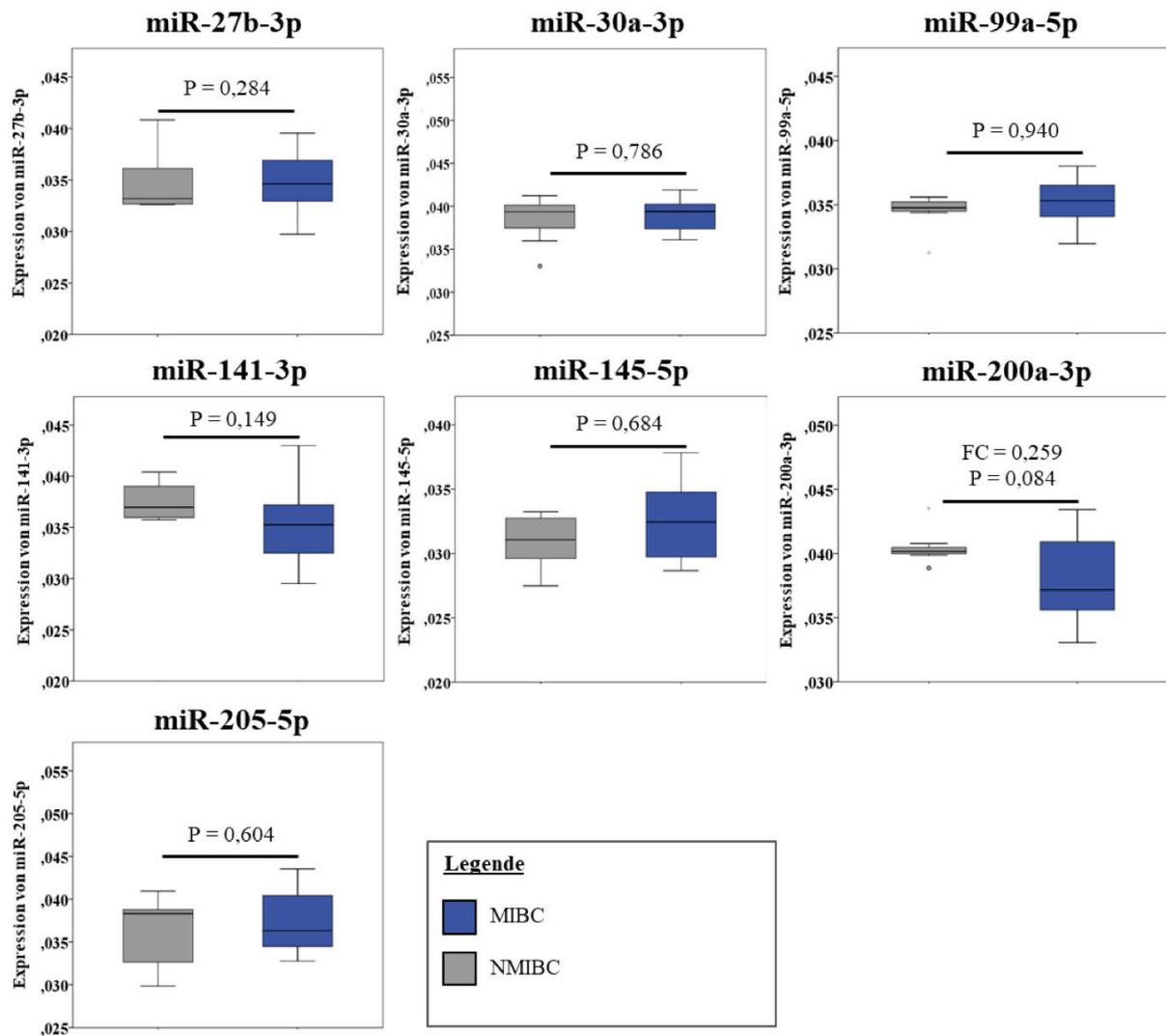


Abbildung 25: Expression von 7 deregulierten miRNAs in Urinexosomen von Patienten mit MIBC und NMIBC

Expression von 7 deregulierten miRNAs in MIBC (blau; $\geq T2$; n = 14) verglichen mit NMIBC (grau; Ta; T1; n = 7). Das Expressionslevel wurde mit Hilfe der qPCR gemessen. P-Werte wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests berechnet. (FC = Fold Change; P = P-Wert; NMIBC = nicht muskelinvasive Harnblasenkarzinome; MIBC = muskelinvasive Harnblasenkarzinome; Ct-Werte: Anhang Tab. 38)

6.5 Interzellulärer Transfer tumor-assoziiierter Exosomen auf normale Fibroblasten

Neben der deskriptiven Untersuchung tumor-assoziiierter Exosomen des Harnblasenkarzinoms stand im Fokus dieser Arbeit die Analyse der funktionellen Bedeutung tumor-assoziiierter Exosomen auf tumorfördernde Prozesse in Zellen der TME. Die dafür verwendeten Exosomen wurden alle mittels UC isoliert. Zuvor musste die Aufnahme von durch UBC-Zellen sezernierten, tumor-assoziierten Exosomen und ihrer Bestandteile (exosomalen miRNAs) durch Zellen der TME experimentell überprüft werden.

6.5.1 Nachweis der zeitabhängigen Internalisierung tumor-assoziiierter Exosomen in normale Fibroblasten

Die Visualisierung der Internalisierung tumor-assoziiierter Exosomen in normale Fibroblasten (hTERT-FB) erfolgte exemplarisch für Exosomen einer nicht invasiven (RT112; Abb. 26) und einer invasiven UBC-Zelllinie (T24; Abb. 27). Es konnte eine zeitabhängige Internalisierung von tumor-assoziierten Exosomen in normale Fibroblasten beobachtet werden. Ein Unterschied in der Aufnahme in Abhängigkeit von der Invasivität der verwendeten Ausgangszelllinie war nicht zu verzeichnen. Bereits nach 1 h war eine deutliche Anreicherung von rot-markierten T24- und RT112-Exosomen in Fibroblasten erkennbar. Dieses war in nahezu derselben Intensität auch für die Zeiträume 2 h, 4 h, und 6 h sichtbar. Nach 12 h nahm die Signalintensität des roten Farbstoffes deutlich ab und war nach 48 h nur noch schwach nachweisbar.

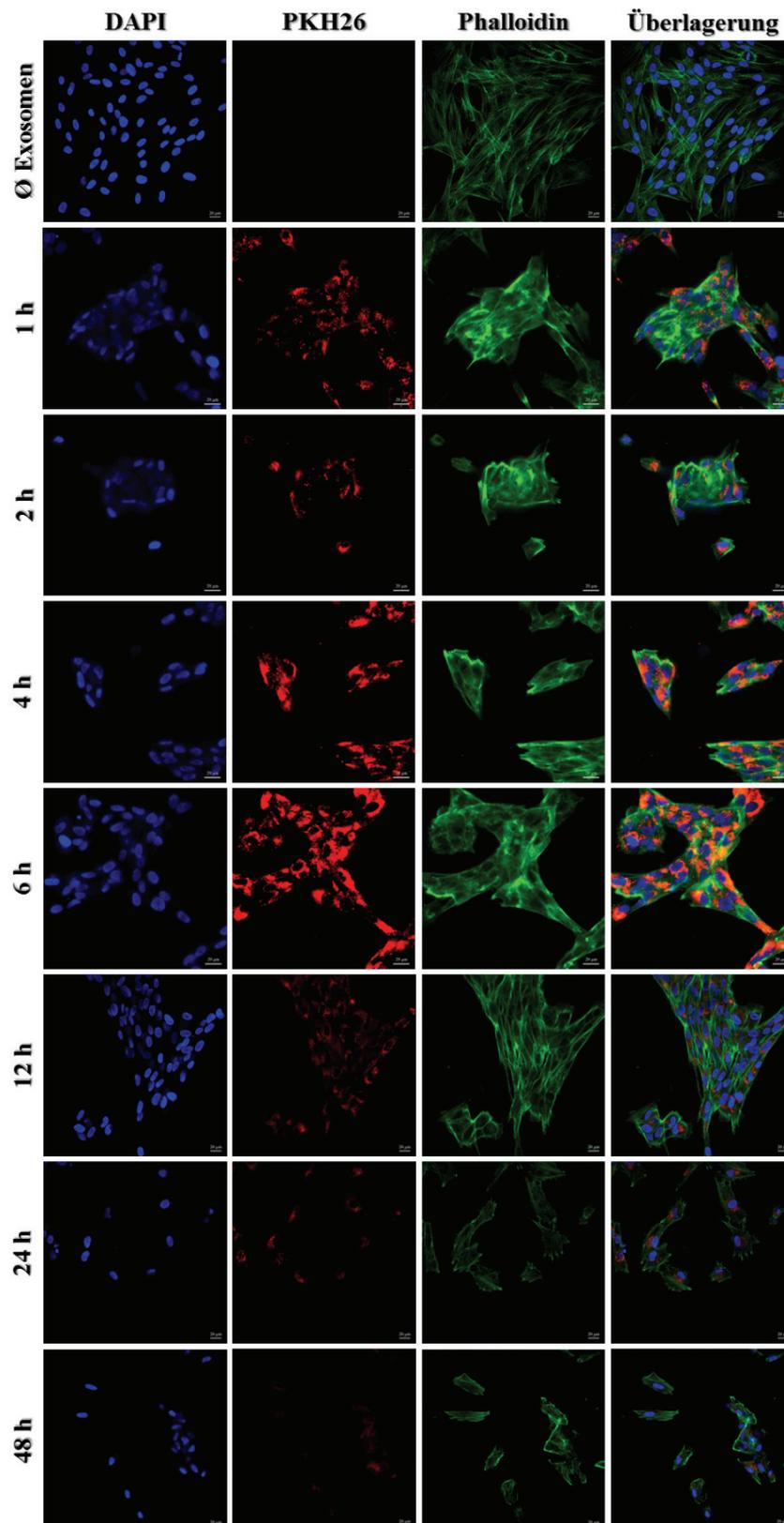


Abbildung 26: Nachweis der Internalisierung von Exosomen aus nicht invasiven UBC-Zellen (RT112) in normale Fibroblasten mittels differenzieller Fluoreszenzmarkierung

hTERT-immortalisierte Fibroblasten (BJ1; grün, Phalloidin) wurden über verschiedene Zeiträume (1-48 h) mit Exosomen von nicht invasiven UBC-Zellen (RT112; rot) kultiviert. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). (Maßstab: 20 µm)

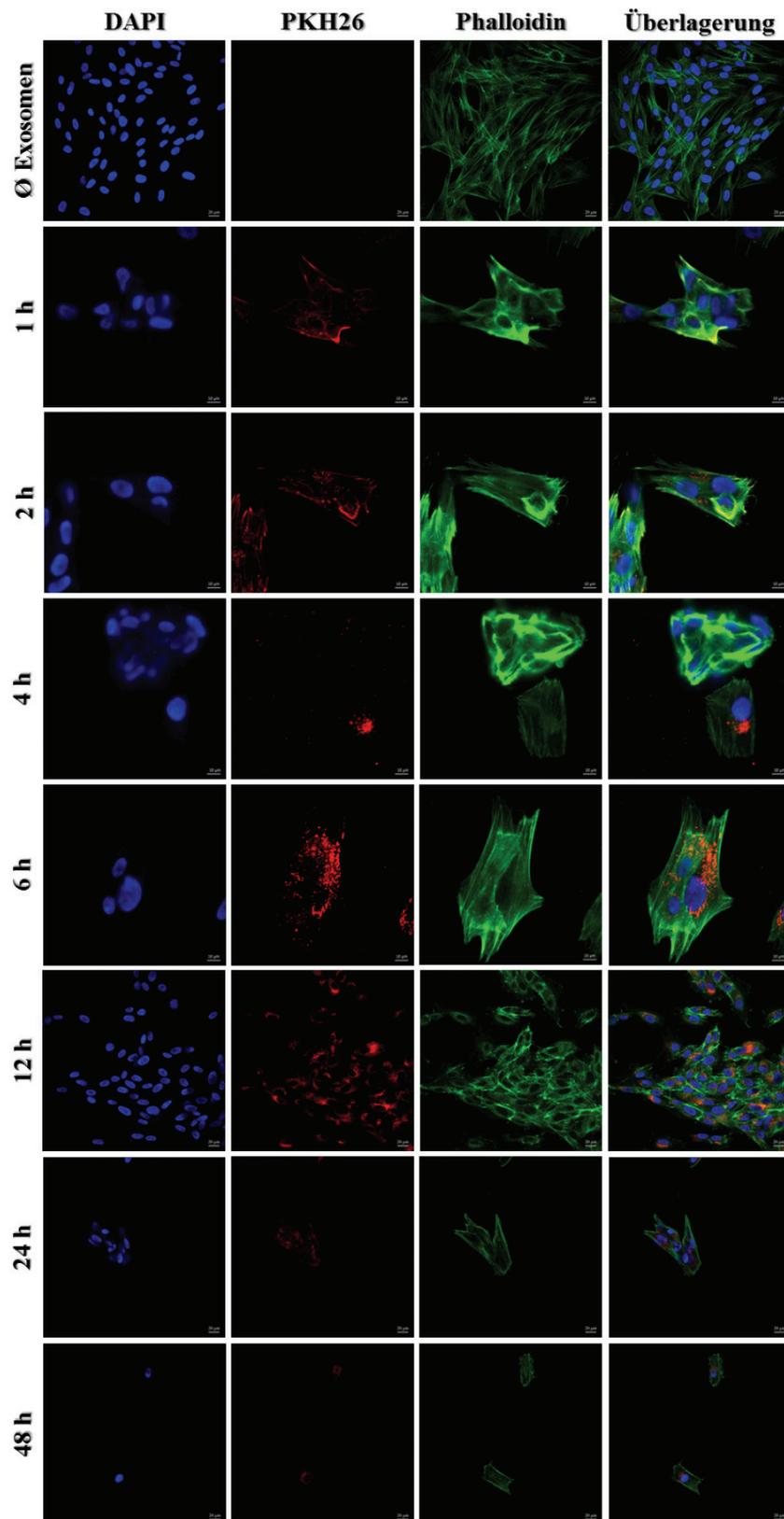


Abbildung 27: Nachweis der Internalisierung von Exosomen aus invasiven UBC-Zellen (T24) in normale Fibroblasten mittels differenzieller Fluoreszenzmarkierung

hTERT-immortalisierte Fibroblasten (BJ1; grün, Phalloidin) wurden über verschiedene Zeiträume (1-48 h) mit Exosomen von invasiven UBC-Zellen (T24; rot) kultiviert. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). (Maßstab: 20 µm)

6.5.2 Exosomaler miRNA-Transfer zwischen Harnblasenkarzinomzelllinien und Fibroblasten

Nachdem die Exosomen-Aufnahme demonstriert wurde, wurde im nächsten Abschnitt der Transfer der exosomalen miRNAs auf normale Vorhautfibroblasten und auf tumor-assoziierte Fibroblasten (TAF) überprüft.

6.5.2.1 Transiente Transfektion von Harnblasenkarzinomzelllinien

Im ersten Schritt wurde die transiente Transfektion der Ausgangszelllinien etabliert, indem zunächst eine Cy3-scrambled miRNA in die Ausgangszellen eingebracht wurde (Abb. 28). Die Cy3-miRNA wurde in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie und eingesetzten Menge unterschiedlich stark aufgenommen. Mikroskopisch wiesen ca. 60-70 % der RT112-Zellen nach 24-stündiger Transfektion mit 25 nM siRNA ein positives Signal auf, wohingegen nur ca. 40-50 % dieses Zelltyps nach Transfektion mit 10 nM ein Fluoreszenzsignal zeigten. Die Transfektionseffizienz der Zelllinie T24 lag bei Verwendung von 25 nM siRNA bei ca. 80 % und für 10 nM bei ca. 50-60 %. Um eine maximale Transfektionseffizienz der Ausgangszellen zu erreichen, wurde die Konzentration des miRNA Mimics cel-miR-39-3p für die folgenden Transfektion auf 50 nM pro Ansatz erhöht.

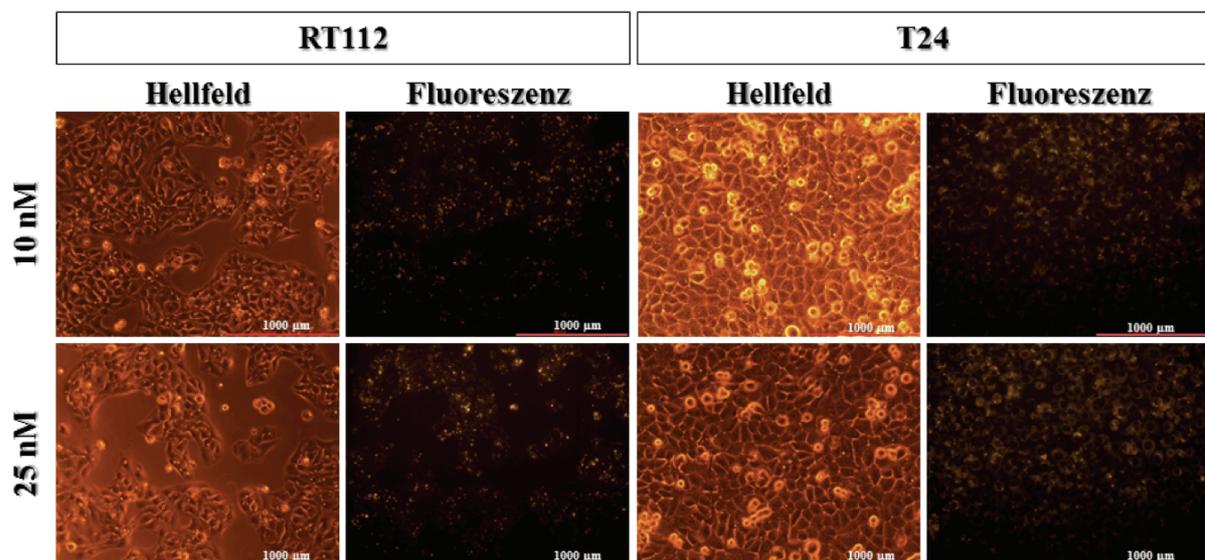


Abbildung 28: Mikroskopische Aufnahmen von transient transfizierten invasiven und nicht invasiven UBC-Zellen

Invasive (T24) und nicht invasive (RT112) UBC-Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen (10 nM; 25 nM) einer Fluoreszenz-gekoppelten *scrambled* miRNA für 24 h transient transfiziert. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden im Hellfeld und Fluoreszenzkanal aufgenommen. (Maßstab: 1000 µm)

Die Reproduzierbarkeit der Transfektion mit cel-miR-39-3p wurde getestet, indem die Anzahl der Experimente auf insgesamt 4 erhöht wurde (Abb. 29). Durch die Transfektion mit 50 nM cel-miR-39-3p konnte eine $7,2 * 10^6$ -fach höhere Expression in RT112-Zellen verglichen zu den untransfizierten Zellen (Mock) gemessen werden ($P = 0,064$). Transfizierte T24-Zellen wiesen eine $1,6 * 10^6$ -fach höhere Expression verglichen zur Kontrolle auf ($P = 0,064$). Die Expressionsänderung in beiden Zelllinien war aufgrund der Schwankungen innerhalb der Ansätze nicht signifikant, sondern zeigte lediglich Tendenzen ($P = 0,064$).

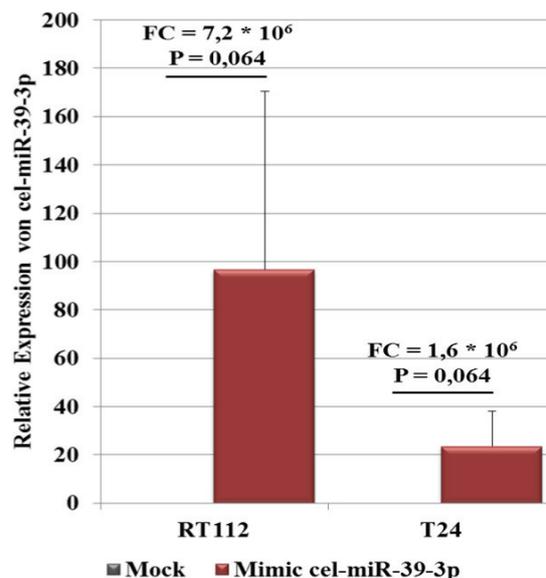


Abbildung 29: Überexpression von cel-miR-39-3p in invasiven und nicht invasiven UBC-Zellen

Invasive (T24) und nicht invasive (RT112) UBC-Zellen wurden mit 50 nM cel-miR-39-3p für 24 h transfiziert. Das Expressionslevel von cel-miR-39-3p wurde auf das Referenzgen RNU48 normalisiert. P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney U Tests berechnet. (FC = Fold Change; P = P-Wert; Mock n = 2 pro Zelllinie; Mimic n = 4 pro Zelllinie; Ct-Werte. Anhang Tab. 39)

6.5.2.2 Transfer der miRNA cel-miR-39 auf normale und tumor-assoziierte Fibroblasten

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die transfizierte miRNA über sezernierte Exosomen auf Zielzellen (hTERT-FB; TAFs) übertragen werden kann. Alle Exosomen wurden zuvor mit RNase behandelt, um den Einfluss freizirkulierender RNA zu minimieren (Anhang Abb. 44, 45).

Für die Etablierung dieses Modells wurde zuerst die Zelllinie hTERT-FB als Zielzelle verwendet. Die Expression der miRNA cel-miR-39-3p konnte in Exosomen nicht nachgewiesen werden. Unabhängig von der eingesetzten Ausgangszelllinie und von deren Invasivität konnte in den Zielzellen eine vermehrte Expression von cel-miR-39-3p verglichen zu Zellen ohne Exosomen-Inkubation detektiert werden (Abb. 30 A).

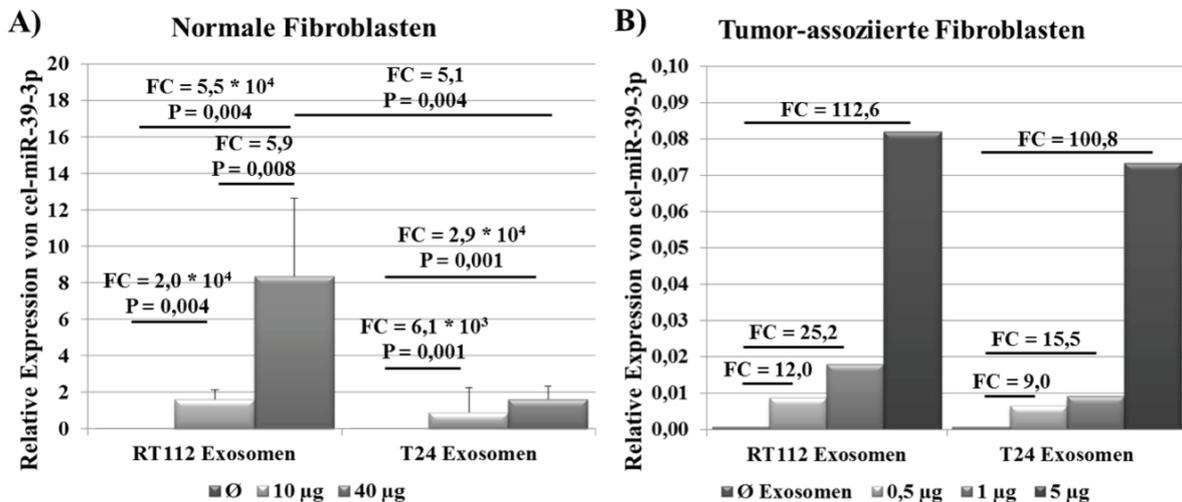


Abbildung 30: Relative Expression von cel-miR-39-3p in normalen und tumor-assoziierten Fibroblasten nach Exosomen-vermitteltem miRNA-Transfer

A) Relative Expression von cel-miR-39-3p in normalen hTERT-immortalisierten Vorhautfibroblasten nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Mengen (Ø Exosomen; 10 µg; 40 µg) von T24- und RT112-Exosomen. Das Expressionslevel von cel-miR-39-3p wurde auf RNU48 normalisiert. P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney U Test berechnet. (Biologische Replikate: Ø Exosomen: n = 6; RT112 Exosomen: 10 µg n = 5 und 40 µg n = 5; T24 Exosomen: 10 µg n = 7 und 40 µg n = 7; FC = Fold Change; P = P-Wert, Ct-Werte: Anhang 43); **B)** Relative Expression von cel-miR-39-3p in tumor-assoziierten Harnblasenfibroblasten nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Mengen (Ø Exosomen; 0,5 µg; 1 µg; 5 µg) von T24- und RT112-Exosomen. Das Expressionslevel von cel-miR-39-3p wurde auf RNU48 normalisiert. (Biologische Replikate für alle Ansätze n = 1; FC = Fold Change; P = P-Wert; Ct-Werte: Anhang Tab. 42)

Das Expressionslevel von cel-miR-39-3p war dabei für RT112-Exosomen signifikant abhängig von der eingesetzten Exosomen-Menge (P = 0,008). Durch die Verwendung von 10 µg RT112-Exosomen konnte signifikant eine $2,0 \cdot 10^4$ -fach höhere Expression in hTERT-FB erreicht werden (P = 0,004). Erhöht man die Exosomen-Menge von RT112 auf 40 µg, kam es zur einem $5,5 \cdot 10^4$ -fachen Anstieg von cel-miR-39-3p (P = 0,004). Die Expression ist um das 5,9 -fach angestiegen (P = 0,008).

T24-Exosomen induzierten eine geringere Expressionserhöhung von cel-miR-39-3p in hTERT-FB. 10 µg T24-Exosomen verursachten einen Anstieg der Expression um das $6,1 \cdot 10^3$ -fache (P = 0,001) und 40 µg um das $2,9 \cdot 10^4$ -fache (P = 0,001). Für diese Exosomen konnte keine Korrelation zwischen der eingesetzten Menge und der cel-miR-39-3p Expression festgestellt werden. Die Exosomen-Menge von 40 µg induzierte in Abhängigkeit von der Invasivität der Ausgangszellen eine signifikante Erhöhung der cel-miR-39-3p Expression. 40 µg RT112-Exosomen erhöhte diese um das 5,1-fache verglichen zu 40 µg T-24-Exosomen (P = 0,004).

Nach der erfolgreichen Versuchsetablierung wurde der exosomale miRNA-Transfer für einen weiteren Zelltyp, TAFs generiert aus einem primären Harnblasenkarzinom, analysiert (Abb. 30 B). Für diesen Versuchsteil wurden 2 unabhängige Experimente durchgeführt. In die

Auswertung konnte nur ein Experiment eingeschlossen werden, da im 2. Versuch keine erfolgreiche Transfektion von cel-miR-39-3p der Ausgangszellen (T24; RT112) erfolgt war. Basierend auf den Daten der Etablierung an hTERT-FB wurden die eingesetzte Exosomen-Mengen auf 0,5 µg, 1 µg und 5 µg minimiert. Die miRNA cel-miR-39-3p konnte ebenfalls erfolgreich von den transfizierten Ausgangszellen über deren Exosomen auf TAFs übertragen werden. Das Expressionslevel von cel-miR-39-3p stieg für beide Ausgangszelllinien in Korrelation mit der eingesetzten Exosomen-Menge an. Bereits bei geringen Mengen (0,5 µg) tumor-assoziiertes Exosomen von RT112 kam es zu einer 12-fach höheren Expression, bei T24-Exosomen zu einer 9-fachen Erhöhung. Setzt man die 10-fache Exosomen-Menge (5 µg) ein, steigt die Expression um das ca. 10-fache an, dies ist jedoch unabhängig von der eingesetzten Ausgangszelllinie. 5 µg RT112-Exosomen induzierten eine 112,6-fache Expression verglichen zur Kontrolle. Dieser Effekt trat auch für die 2-fache Exosomen-Menge (1 µg) auf. Demnach besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten Exosomen-Menge und dem FC.

6.6 Funktionelle Analysen normaler Fibroblasten nach Stimulation mit tumor-assoziierten Exosomen

Ein weiterer wichtiger Teil dieser Arbeit bestand darin, die funktionelle Bedeutung tumor-assoziiertes Exosomen des Harnblasenkarzinoms zu untersuchen. Im ersten Schritt erfolgte die Etablierung der experimentellen Ansätze für die Proliferation unter Verwendung von hTERT-FB. Nachfolgend wurde dann der Einfluss tumor-assoziiertes Exosomen auf das Proliferations- und Migrationsverhalten von normalen primären HBF untersucht.

6.6.1 Etablierung der Proliferationsversuche unter Verwendung der Fibroblastenzelllinie hTERT

Zunächst wurde die Proliferation von hTERT-FB nach Stimulation mit den Exosomen der UBC-Zelllinien (RT112; T24; 5637; 253J-BV) überprüft (Abb. 31). Durch die Inkubation von hTERT-FB mit tumor-assoziierten Exosomen konnte in allen Ansätzen eine signifikante Erhöhung der Proliferationsrate verglichen zur Kontrolle induziert werden ($P < 0,001$). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Steigerung der Proliferation in Abhängigkeit von der eingesetzten Ausgangszelllinie, der Invasivität der Ausgangszelllinie oder der Exosomen-Konzentration detektiert werden ($P > 0,05$).

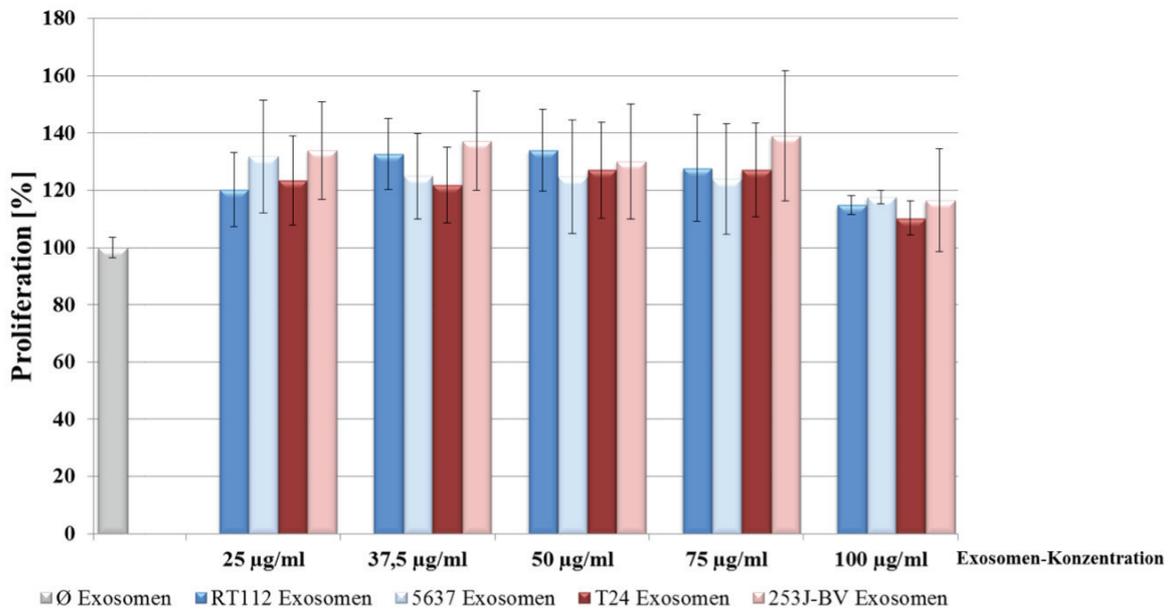


Abbildung 31: Proliferation von normalen Vorhautfibroblasten nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen tumor-assoziiertes Exosomen sezerniert von vier UBC-Zelllinien

Die Proliferation von hTERT-immortalisierten Vorhautfibroblasten wurde nach 48 h Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen (25 µg/ml: n=11-14; 37,5 µg/ml: n=11-14; 50 µg/ml: n=12-20; 75 µg/ml: n=12-20; 100 µg/ml: n=2-5) von Exosomen sezerniert von den Zelllinien T24 (rot) 253J-BV (rosa), RT112 (blau), 5637 (hellblau) verglichen zu unbehandelten Zellen (Ø Exosomen; grau; n=21) analysiert. Die Normalisierung erfolgte auf die unbehandelte Kontrolle. P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney U Tests berechnet. (P = P-Wert; Absorptionswerte: Anhang Tab. 44)

Je nach Ansatz wurde eine Erhöhung der Proliferation von 10-39 % erreicht, wobei die niedrigste Erhöhung unter Verwendung der Zelllinie T24 mit der Konzentration von 100 µg/ml und die höchste beim Einsatz von 75 µg/ml 253J-BV-Exosomen induziert wurde.

Anschließend wurde analysiert, ob zelleigene Exosomen in Abhängigkeit von der Exosomen-Konzentration einen Einfluss auf die Proliferation besitzen. Hierfür wurden zelleigene Exosomen (hTERT-FB-Exosomen) und tumor-assoziierte Exosomen einer invasiven (T24) und nicht invasiven (RT112) UBC-Zelllinie in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet (Abb. 32). Die Exosomen-Konzentration (2,5-75 µg/ml) wurden noch weiter minimiert, da bei Verwendung höher Konzentrationen keine konzentrationsabhängigen Unterschiede detektiert werden konnten.

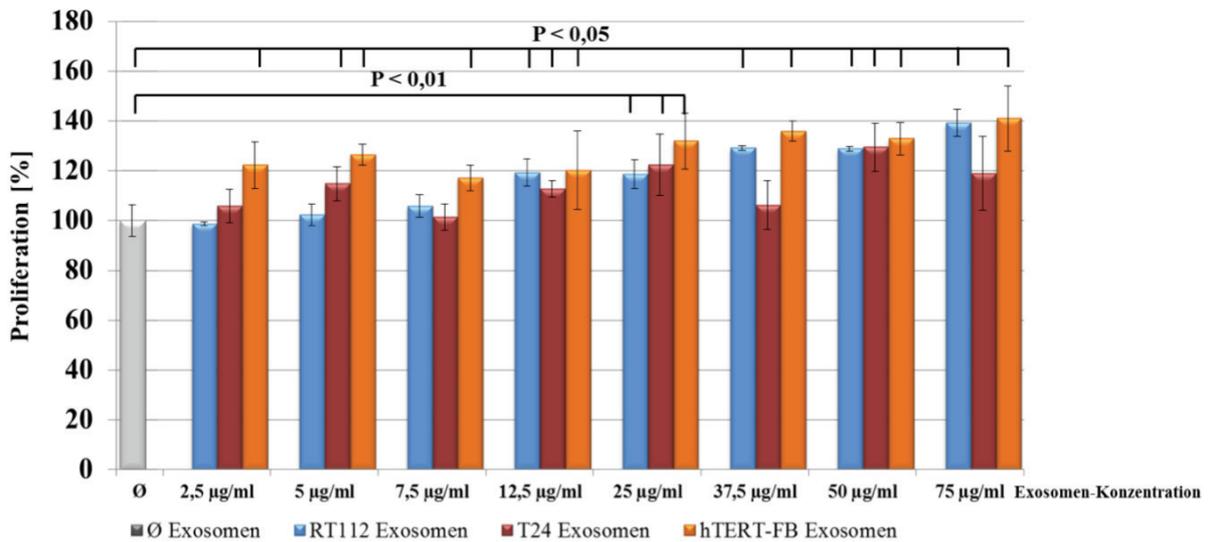


Abbildung 32: Proliferation von normalen Vorhautfibroblasten nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen zelleigener und tumor-assoziiertes Exosomen

Die Proliferation von hTERT-immortalisierten Vorhautfibroblasten wurde nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen (2,5 µg/ml; 5 µg/ml; 7,5 µg/ml; 12,5 µg/ml; 25 µg/ml; 37,5 µg/ml; 50 µg/ml; 75 µg/ml; n = 2-6) an T24- (rot) und RT112-Exosomen (blau) sowie zelleigenen Exosomen (hTERT-FB; orange) verglichen zu unbehandelten Zellen (Ø Exosomen; grau; n = 6) analysiert. Die Normalisierung erfolgte auf die unbehandelte Kontrolle. P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney U Tests berechnet. (P = P-Wert; Absorptionswerte: Anhang Tab. 45)

Exosomen von hTERT-FB verursachten unabhängig von der applizierten Exosomen-Konzentration eine signifikante Erhöhung der Proliferation verglichen zur unbehandelten Kontrolle ($P < 0,05$). Bereits kleine Konzentrationen (2,5 µg/ml) der zelleigenen Exosomen induzierten eine Proliferationserhöhung von 22 %. Die Änderung über alle Konzentrationen lag zwischen 22-41 %, wobei tendenziell eine Korrelation zwischen der Exosomen-Konzentration und der gemessenen Proliferationsrate besteht. Die Stimulation mit T24- und RT112-Exosomen führte zu einer Proliferationssteigerung von 10-30 % verglichen zu unbehandelten Zellen. Für die Exosomen-Konzentration 12,5 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml konnten für alle verwendeten Exosomen eine signifikante Erhöhung der Proliferation gezeigt werden ($P < 0,05$).

6.6.2 Einfluss tumor-assoziiertes Exosomen auf die Proliferation normaler Harnblasenfibroblasten

Nach erfolgreicher Etablierung wurde im folgenden Abschnitt der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen (5 µg/ml; 12,5 µg/ml; 25 µg/ml) von tumor-assoziierten Exosomen des Harnblasenkarzinoms über verschiedene Stimulationszeiträume auf normale HBFs untersucht. Die Zellen hatten nach 24 h Stimulation bereits eine Konfluenz von ca. 80 % und nach 48 h von nahezu 100 % erreicht. Das Experiment wurde daher abgebrochen und die Zellzahl von

2,5 x 10³ auf 0,5 x 10³ pro Well minimiert. Nach Stimulation mit den tumor-assoziierten Exosomen wiesen die Zellen nach 72 h Stimulation auch mit der geringeren Zellzahl eine nahezu 100 %ige Konfluenz auf. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde der Versuch für 72 h in einem anderen Wellformat durchgeführt. Der Wechsel erfolgte von 96-Well auf 24-Well. Bevor der Einfluss tumor-assoziiertes Exosomen untersucht wurde, wurde zunächst überprüft, ob die Stimulation mit Exosomen einer normalen Harnblasenzelllinie (HCV29) bereits einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten verglichen zu unbehandelten Zellen hat (Abb. 33).

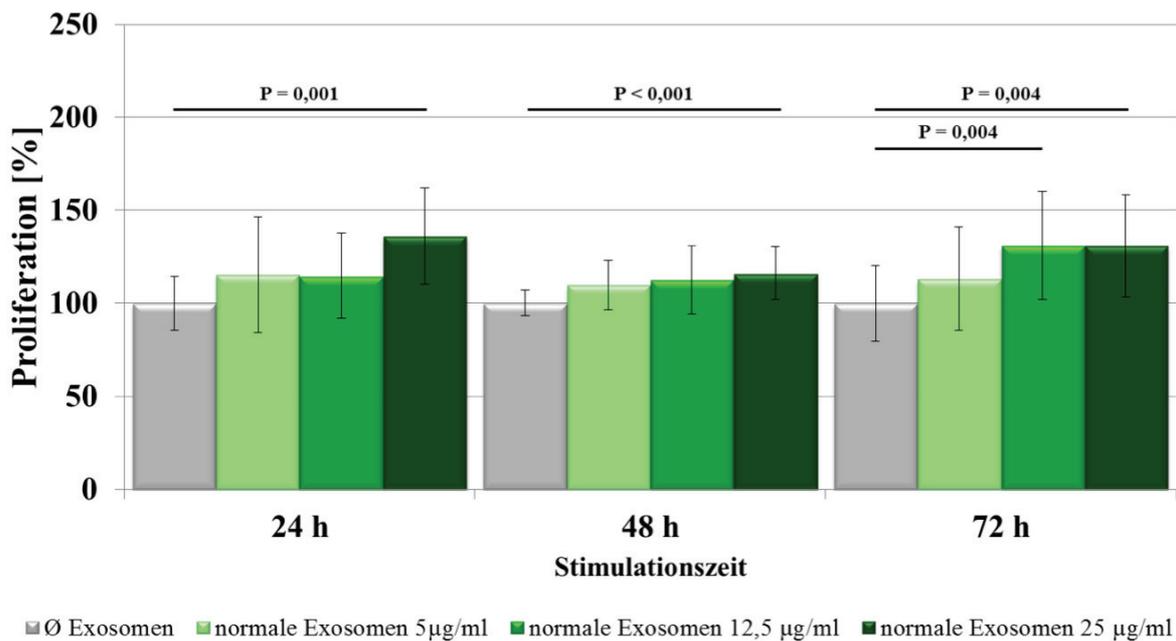


Abbildung 33: Proliferation von normalen primären Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen normaler Harnblasenexosomen

Die Proliferation von normalen primären Harnblasenfibroblasten wurde nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen (5 µg/ml; 12,5 µg/ml; 25 µg/ml; n = 9-18) von normalen Harnblasenexosomen (HCV29) analysiert. Die Zellen wurden über 24 h, 48 h und 72 h stimuliert. Die Normalisierung der Ergebnisse erfolgte auf die unbehandelte Kontrolle (Ø Exosomen; grau; n = 12-18). Die statistischen Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney U Tests berechnet. (P = P-Wert; Absorptionswerte: Anhang Tab. 46-48)

Eine Exosomen-Konzentration von 5 µg/ml der normalen Exosomen induzierte über die Zeit keine signifikante Erhöhung der Proliferation ($P > 0,05$). Verwendete man die höchste Konzentration von 25 µg/ml, so erhöhte sich die Proliferation über alle Zeiträume signifikant ($P < 0,01$). Das Proliferationslevel lag zwischen 116-136 %, wobei die niedrigste Proliferation nach 48 h Stimulation gemessen wurde. Nach 72 h konnte ein signifikanter Anstieg der Proliferation um 31 % bei der Verwendung von 12,5 µg/ml Exosomen ermittelt werden. Für die beiden anderen Zeiträume wurden keine signifikanten Proliferationserhöhungen gemessen ($P > 0,05$).

Die Analysen wurden für alle Konzentrationen durchgeführt, dennoch sind hier nur exemplarisch die Ergebnisse unter Verwendung der 5 µg/ml Konzentration abgebildet. Die Ergebnisse für die Exosomen-Konzentrationen 12,5 µg/ml und 25 µg/ml sind im Anhang dargestellt (Anhang Abb. 47-49). Generell induzierten tumor-assoziierte Exosomen in Abhängigkeit von der Ausgangszelllinie eine Proliferationserhöhung, die zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen vergleichbar war. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Proliferation in Abhängigkeit von der eingesetzten Exosomen-Konzentration und Inkubationszeit detektiert werden. Nach 24 h konnte unabhängig von der Fragestellung kein signifikanter Unterschied detektiert werden, weshalb dieser Zeitraum nicht weiter betrachtet wurde. Exosomen sezerniert von UBC-Zellen weisen in Abhängigkeit von der Ausgangszelllinie einen unterschiedlichen Einfluss auf das Wachstum der HBF auf (Abb. 34).

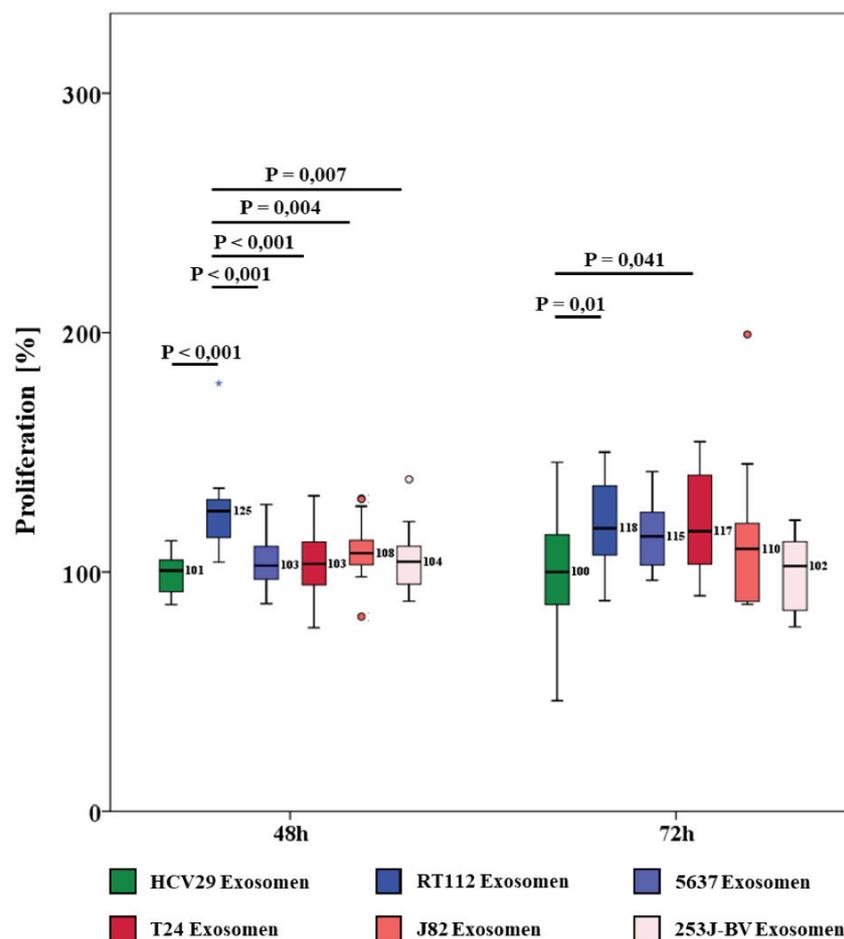


Abbildung 34: Proliferation von normalen primären Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit normalen Harnblasenexosomen und tumor-assoziierten Exosomen sezerniert durch unterschiedliche UBC-Zellen

Die Proliferation von normalen primären Harnblasenfibroblasten wurde nach Stimulation (48 h; 72 h) mit 5 µg/ml normalen Harnblasenexosomen (HCV29; grün; n = 18) und Exosomen sezerniert von unterschiedlichen UBC-Zellen (invasiv: T24; J82; 253J-BV; n = 8-20; nicht invasiv: RT112; 5637; n = 6-15) analysiert. Die Normalisierung der Ergebnisse erfolgte auf Zellen, die mit normalen Exosomen behandelt wurden. Die statistischen Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney U Tests berechnet. (P = P-Wert; Absorptionswerte: Anhang Tab. 47, 48)

Im Weiteren erfolgte die Analyse unter Berücksichtigung der Invasivität der Ausgangszellen. Stimuliert man HBFs mit nicht invasiven Exosomen, konnte sowohl nach 48 h als auch 72 h eine signifikante Proliferationssteigerung um 12-15 % ($P = 0,002$) verglichen zur Kontrolle ausgelöst werden (Abb. 35). Invasive Exosomen induzierten nur nach 48 h eine signifikante Steigerung um 6 % ($P = 0,048$). Die 72-stündige Stimulation erhöhte die Proliferation nicht signifikant um 12 % ($P > 0,05$). Es konnten keine signifikanten Proliferationsunterschiede zwischen HBFs stimuliert mit invasiven und nicht invasiven Exosomen in Abhängigkeit von der Stimulationszeit gefunden werden.

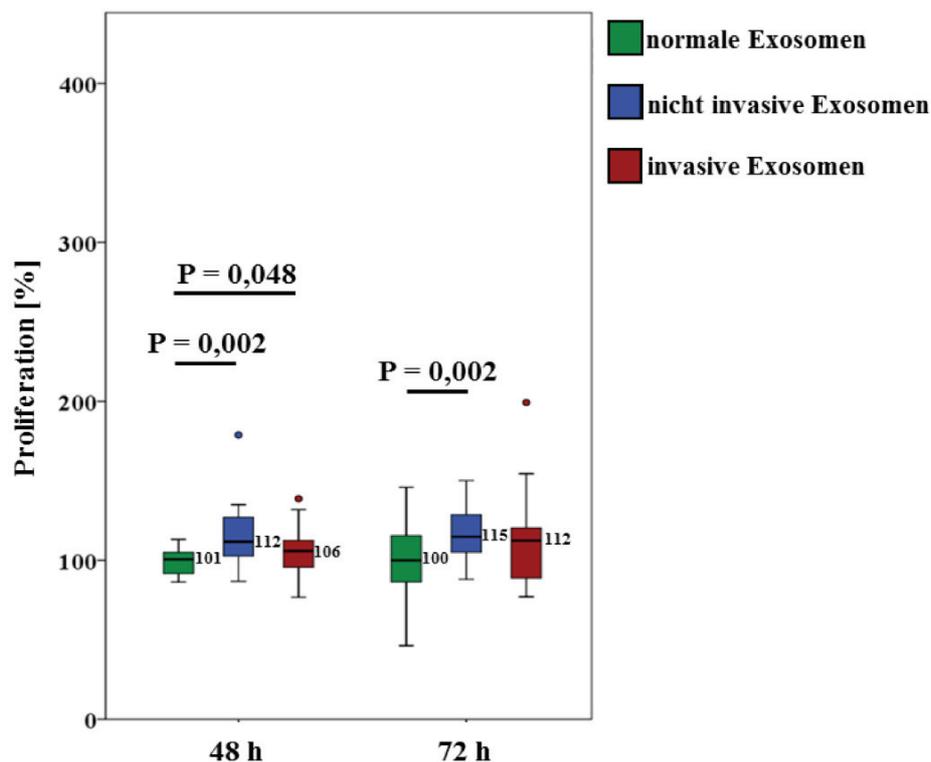


Abbildung 35: Proliferation von normalen primären Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit normalen Harnblasenexosomen und tumor-assoziierten Exosomen sezerniert durch invasive und nicht invasive UBC-Zellen

Die Proliferation von normalen primären Harnblasenfibroblasten wurde nach Stimulation (48 h; 72 h) mit 5 $\mu\text{g/ml}$ normalen Harnblasenexosomen (HCV29; grün; $n = 9-18$) und Exosomen sezerniert von invasiven (T24; J82; 253J-BV; rot; invasive Exosomen: $n = 26-54$) und nicht invasiven (RT112; 5637; blau; nicht invasive Exosomen: $n = 16-30$) UBC-Zellen analysiert. Die Normalisierung der Ergebnisse erfolgte auf Zellen die mit normalen Exosomen behandelt wurden. Die statistischen Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney U Tests berechnet. ($P = P$ -Wert; Absorptionswerte: Anhang Tab. 47, 48)

6.6.3 Einfluss tumor-assoziiertes Exosomen auf die Migration normaler Harnblasenfibroblasten

Der Einfluss tumor-assoziiertes Exosomen auf das Migrationsverhalten normaler primärer HBFs wurden mit zwei verschiedenen Methoden (Boyden Chamber Assay; Echtzeit-Zellanalyse) untersucht. Neben unbehandelten HBFs wurden Zellen, die mit normalen Exosomen stimuliert wurden, als Kontrolle verwendet. Während der Migrationsversuche wurde ein Proliferationsinhibitor (Aphidikulin) verwendet und zuvor auf seine Wirksamkeit überprüft (Anhang Tab. 49, Abb. 49). Die Proliferation von HBF wurde bei der Verwendung von 7 µg/ml um ~30 % minimiert. Bei der gleichen Aphidikulin-Konzentration reduzierte sich die Proliferation von RT112-Zellen um ~70 %. Das Lösungsmittel von Aphidikulin (DMSO) hatte in der eingesetzten Menge von 0,7 % keinen Einfluss auf die Proliferation von HBF- und RT112-Zellen. Für die Migrationsversuche wurde fortan 7 µg/ml Aphidikulin pro Well eingesetzt.

6.6.3.1 Boyden Chamber Assay

Mikroskopisch wiesen Inserts mit Exosomen-stimulierten HBFs eine höhere Zelldichte auf verglichen zu beiden Kontrollansätzen (Abb. 36).

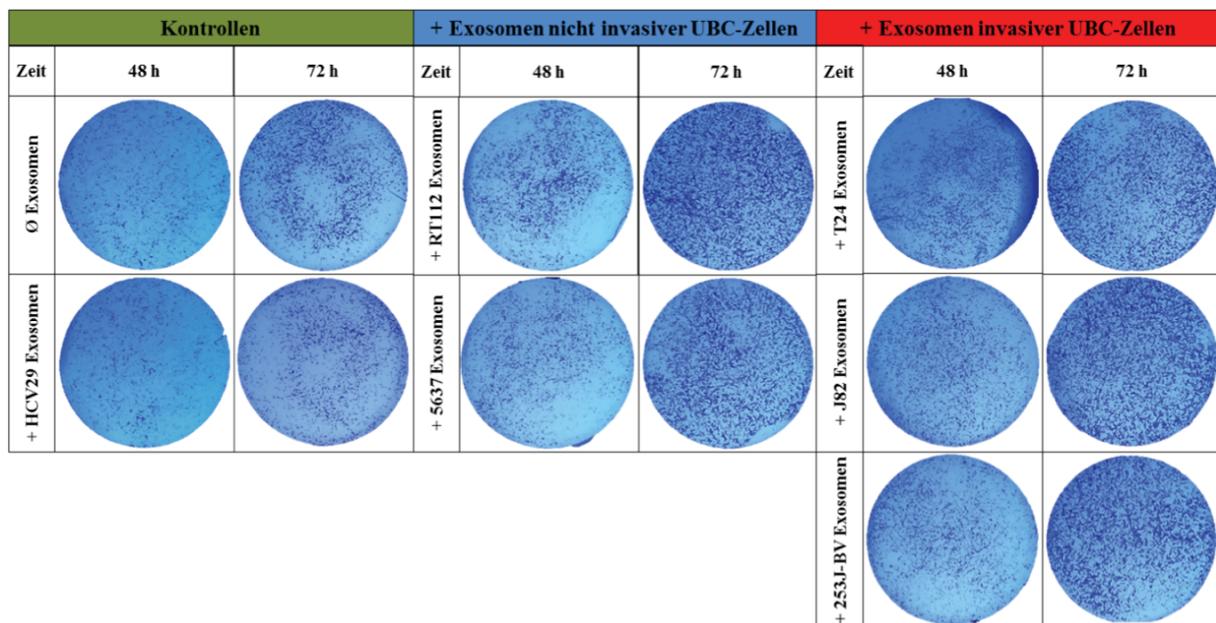


Abbildung 36: Mikroskopische Aufnahmen von migrierten, Kristallviolett-gefärbten normalen Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit normalen Harnblasenexosomen und tumor-assoziierten Exosomen

Die Migration von normalen Harnblasenfibroblasten wurde nach Stimulation (48 h; 72 h) mit 12,5 µg/ml tumor-assoziiertes Exosomen, normalen Harnblasenexosomen verglichen zu unbehandelten Fibroblasten (Ø Exosomen; grau; n = 7-9) analysiert. Der Migrationsassay wurde über einen Zeitraum von 24 h durchgeführt. Anschließend wurden die migrierten Zellen mit 0,1 % Kristallviolett-Lösung angefärbt und mikroskopisch untersucht.

Die Zelldichte stieg auch mit dem Stimulationszeitraum und konnte über alle Ansätze bestätigt werden. Die Migration von HBFs stimuliert mit normalen Exosomen lag bei 94-96 % und wies keine signifikanten Unterschiede zu unbehandelten HBFs auf ($P > 0,05$; Abb. 37).

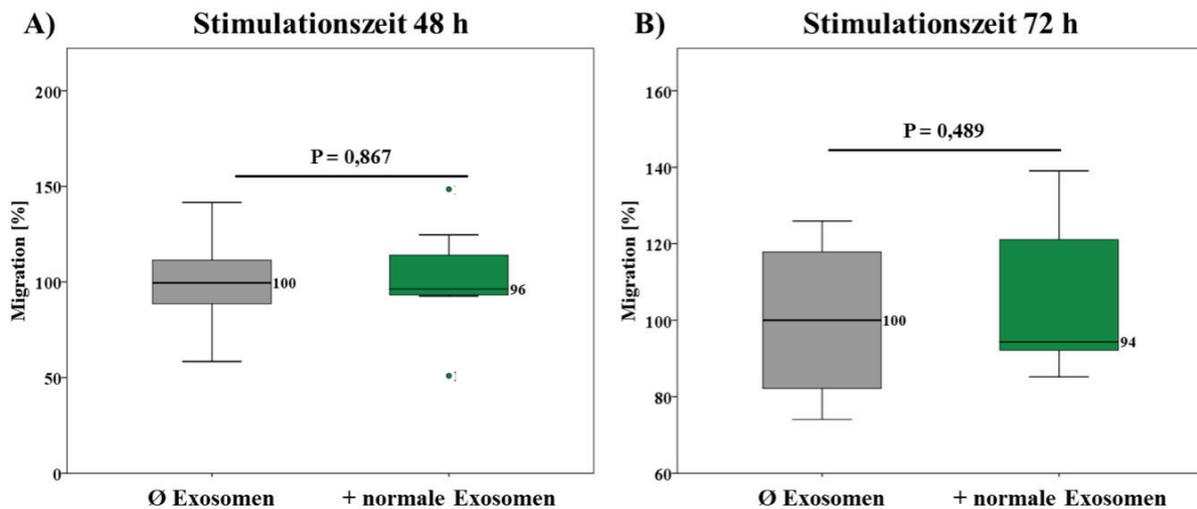


Abbildung 37: Migration von normalen primären Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit normalen Harnblasenexosomen verglichen zu unbehandelten Fibroblasten

Die Migration von normalen Harnblasenfibroblasten wurde nach A) 48 h und B) 72 h Stimulation mit 12,5 µg/ml normalen Harnblasenexosomen (HCV29; grün; n = 8-10) verglichen zu unbehandelten Fibroblasten (Ø Exosomen; grau; n = 7-9) analysiert. Die Migration wurde nach 24 h im Verhältnis zu unbehandelten Fibroblasten berechnet. Der P-Wert wurde mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests bestimmt. (P = P-Wert; Absorptionswerte: Anhang Tab. 50, 51)

Die Migration von HBFs wurde in Abhängigkeit von der Ausgangszelllinie zeitunabhängig beeinflusst (Abb. 38). RT112-Exosomen induzierten unabhängig von der Stimulationszeit eine signifikante Erhöhung der Migration um 27-48 % verglichen zur Kontrolle ($P < 0,01$). Nach 48-stündiger Stimulation, nicht aber nach 72 h, lösten RT112-Exosomen einen signifikanten Anstieg der Migration um 40 % verglichen zu T24-Exosomen aus ($P = 0,03$). RT112-Exosomen induzierten nach 72 h Stimulation eine signifikante Erhöhung der Migration um 28 % in HBFs verglichen zu HBFs inkubiert mit 253J-BV-Exosomen ($P = 0,035$). Für alle anderen Ausgangszellen konnte kein signifikanter Einfluss auf die Migration gemessen werden ($P > 0,05$). Exosomen der Zelllinie 5637 verursachten lediglich nach 72 h eine signifikante Erhöhung der Proliferation um 20 % ($P = 0,013$). Für keine Zelllinie konnte eine Korrelation zwischen der Stimulationszeit und dem Anstieg der Migration bestätigt werden ($P > 0,05$).

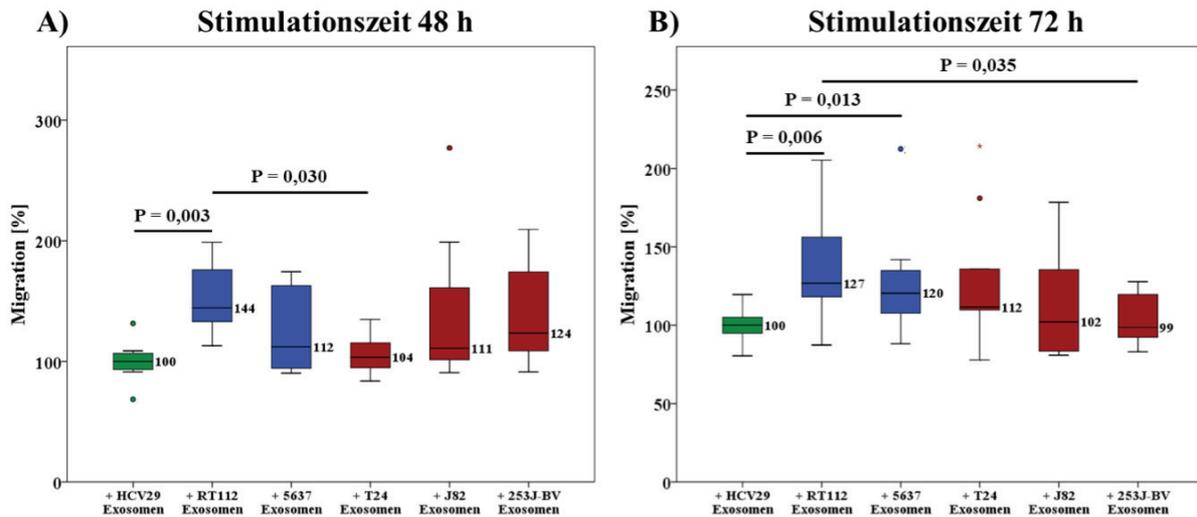


Abbildung 38: Migration von normalen primären Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit Exosomen sezerniert von unterschiedlichen UBC-Zellen und normalen Harnblasenexosomen

Die Migration von normalen Harnblasenfibroblasten wurde nach A) 48 h und B) 72 h Stimulation mit 12,5 µg/ml tumor-assoziierten Exosomen sezerniert von invasiven (rot; T24: n = 6-9; J82: n = 8-10; 253J-BV: n = 6-10) und nicht invasiven (blau; RT112: n = 5-9; 5637: n = 6-9) UBC-Zellen verglichen zu Fibroblasten stimuliert mit normalen Harnblasenexosomen (HCV29; grün; n = 8-10) analysiert. Die Migration wurde nach 24 h im Verhältnis zu den unbehandelten Fibroblasten berechnet. Der P-Wert wurde mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests bestimmt. (P = P-Wert; Absorptionswerte: Anhang Tab. 50, 51)

Unterschiedliche Ausgangszellen induzierten differenzielle Effekte auf die Migration, inwieweit dies abhängig von der Invasivität der Ausgangszellen ist wurde im nächsten Abschnitt untersucht (Abb. 39).

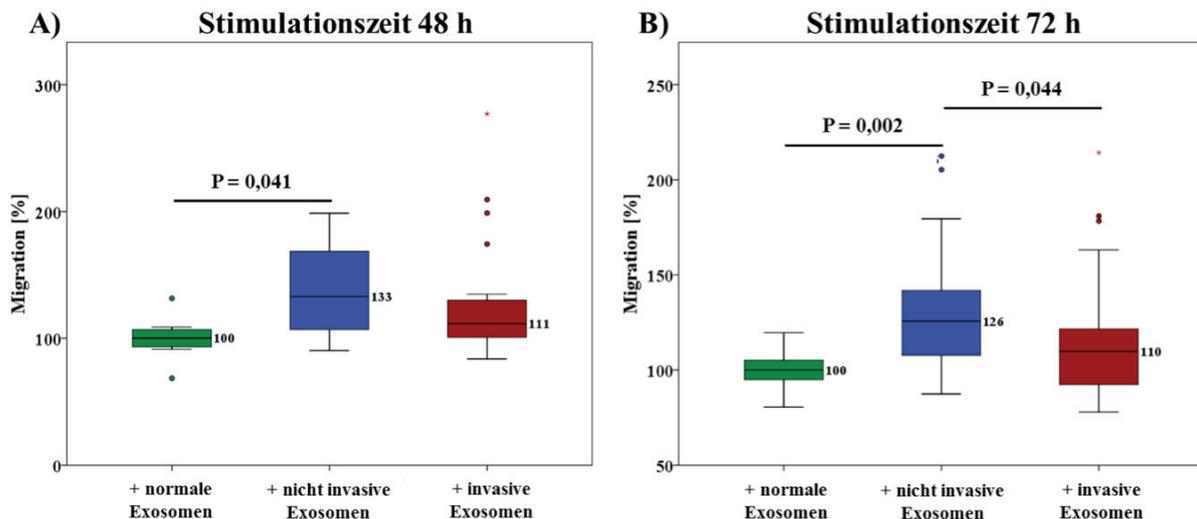


Abbildung 39: Migration von normalen primären Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit Exosomen sezerniert von invasiven oder nicht invasiven UBC- und normalen Harnblasenexosomen

Die Migration von normalen Harnblasenfibroblasten wurde nach A) 48 h und B) 72 h Stimulation mit 12,5 µg/ml tumor-assoziierten Exosomen sezerniert von invasiven (rot; n = 20-29) und nicht invasiven (blau; n = 11-18) UBC-Zellen verglichen zu Fibroblasten behandelt mit normalen Harnblasenexosomen (HCV29; grün; n = 8-10) analysiert. Die Migration wurde nach 24 h im Verhältnis zu den unbehandelten Fibroblasten berechnet. Der P-Wert wurde mit dem Mann-Whitney U Tests bestimmt. (P = P-Wert; Absorptionswerte: Anhang Tab. 50, 51)

Unabhängig von der Stimulationszeit mit nicht invasiven Exosomen war die Migration signifikant um 33 % ($P = 0,048$) und 26 % ($P = 0,002$) erhöht. Invasive Exosomen erhöhten die Migration nicht signifikant um 10-11 % ($P > 0,05$). Nach 72 h Inkubation mit nicht invasiven Exosomen stieg die Migration von HBFs signifikant um 16 % verglichen zu invasiven Exosomen ($P = 0,044$). Dieser Effekt konnte bei 48 h Stimulation nicht nachgewiesen werden.

6.6.3.2 Echtzeit-Zellanalyse

Mit Hilfe der Echtzeit-Messung (RTCA) konnte das Migrationsverhalten von HBFs nach Stimulation mit tumor-assoziierten Exosomen auch nach verschiedenen Zeiträumen gemessen werden (Kurvenverlauf: Anhang Abb. 50). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Migration bei Stimulierung mit normalen Exosomen ($P > 0,05$; Abb. 40 A/B).

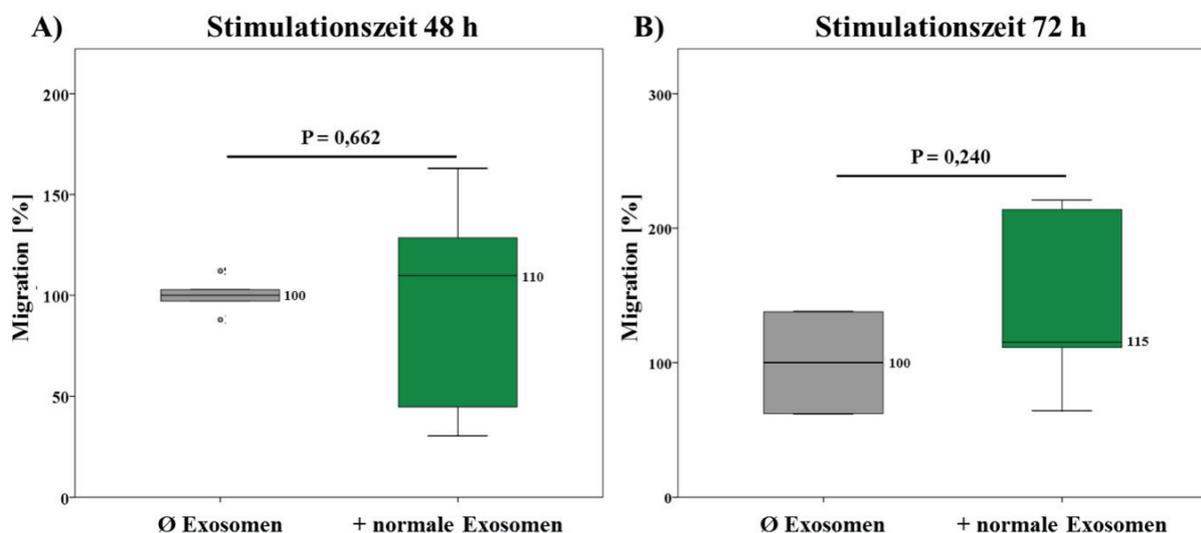


Abbildung 40: Echtzeit-gemessene Migration von normalen primären Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit normalen Harnblasenexosomen

Die Migration von normalen Harnblasenfibroblasten wurde nach A) 48 h und B) 72 h Stimulation mit 12,5 µg/ml normalen Harnblasenexosomen (HCV29; grün; n = 6-8) verglichen zu unbehandelten Fibroblasten (Ø Exosomen; grau; n = 5-6) analysiert. Die Migration wurde unter Verwendung des RTCA-Systems nach 24 h gemessen. Die Migration der Harnblasenfibroblasten wurde im Verhältnis zu den unbehandelten Fibroblasten berechnet. Der P-Wert wurde mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests bestimmt. (P = P-Wert; CI-Werte: Anhang Tab. 52, 53)

In Abhängigkeit von der Zelllinie wurden unterschiedliche Effekte induziert (Abb. 41 A/B). Die Migration war nach 48 h generell erniedrigt in allen verwendeten Exosomen und lag zwischen 53-89 % verglichen zur Kontrolle. RT112-Exosomen senkten die Migration von HBFs signifikant um 47 % ($P = 0,041$). Für diesen Stimulationszeitpunkt wurden keine weiteren Signifikanzen ermittelt. Nach 72 h Inkubation mit RT112- und 5637-Exosomen wurde die Migration von HBFs signifikant um 38 % bzw. 45 % verglichen zur Kontrolle

gesenkt ($P < 0,01$). Der Unterschied war nur für diese beiden Zelllinien signifikant. Während Exosomen der Zelllinien RT112, 5637, J82, 253J-BV eine Senkung der Migration um 24-45 % induzierten, erhöhten T24-Exosomen die Migrationsfähigkeit um 26 % verglichen zur Kontrolle. Der Einfluss war nicht für alle Zelllinien signifikant. T24-Exosomen induzierten verglichen zu RT112- und 5637-Exosomen eine signifikante Erhöhung der Migration um 59-62 % ($P \leq 0,01$). Die Ergebnisse des Boyden Chambers konnten mit Hilfe der Echtzeit-Messung nicht reproduziert werden.

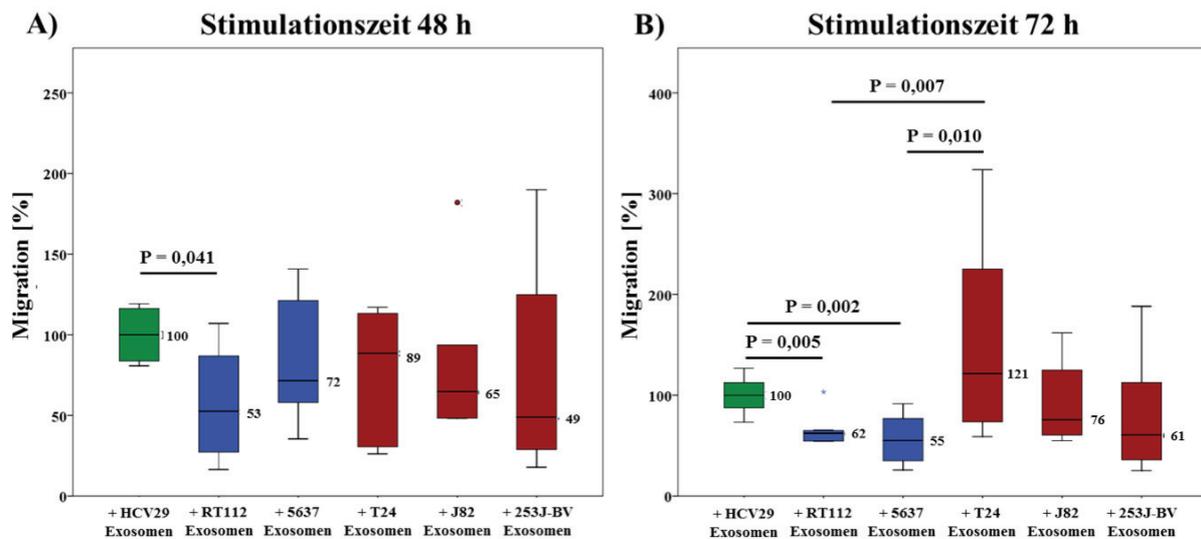


Abbildung 41: Echtzeit-gemessene Migration von normalen primären Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit Exosomen sezerniert von unterschiedlichen UBC-Zellen und normalen Harnblasenexosomen

Die Migration von normalen Harnblasenfibroblasten wurde nach A) 48 h und B) 72 h Stimulation mit 12,5 µg/ml tumor-assoziierten Exosomen sezerniert von invasiven (rot; T24: n = 6; J82: n = 6; 253J-BV: n = 6) und nicht invasiven (blau; RT112: n = 6; 5637: n = 6) UBC-Zellen verglichen zu Fibroblasten behandelt mit normalen Harnblasenexosomen (HCV29; grün; n = 6) analysiert. Die Migration wurde unter Verwendung des RTCA-Systems nach 24 h gemessen. Die Migration der Harnblasenfibroblasten wurde im Verhältnis zu den unbehandelten Fibroblasten berechnet. Der P-Wert wurde mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests bestimmt. (P = P-Wert; CI-Werte: Anhang Tab. 52, 53)

Im Folgenden wurde der Einfluss auf die Migration in Abhängigkeit von der Invasivität der Ausgangszelllinien untersucht. Nach 48 h Stimulation zeigte sich weder für invasive noch für nicht invasive Exosomen ein signifikanter Einfluss auf die Migration ($P > 0,05$; Abb. 42 A). Im Median wurde die Migration in beiden Gruppen um ca. 36 % gesenkt. Die Migration von Zellen, die über einen Zeitraum von 72 h mit den nicht invasiven Exosomen behandelt wurden, sank signifikant auf 62 % ($P < 0,001$; Abb. 42 B). Invasive Exosomen reduzierten die Migration von HBFs nicht signifikant auf 84 % ($P > 0,05$). Dabei bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der Migration von HBFs stimuliert mit invasiven und nicht invasiven Exosomen ($P = 0,027$).

Nicht invasive Exosomen induzierten signifikant eine weitere Senkung der Migration um 22 % auf 62 % verglichen zu invasiven Exosomen. Dagegen wurde mittels Boyden Chamber eine signifikante Erhöhung der Migration gezeigt.

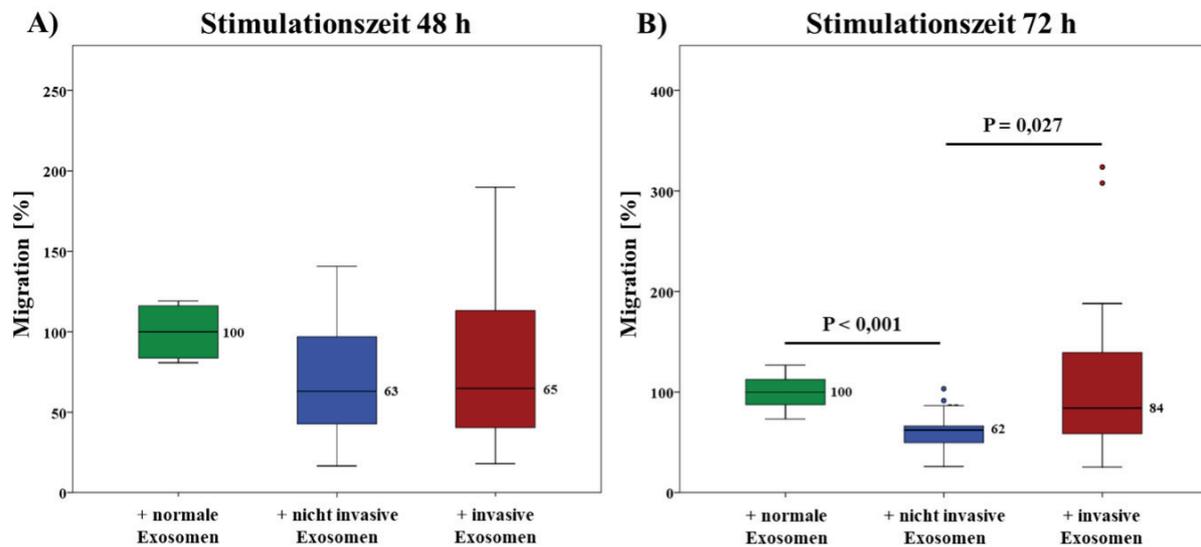


Abbildung 42: Echtzeit-gemessene Migration von normalen primären Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit Exosomen sezerniert von invasiven und nicht invasiven UBC-Zellen verglichen zu normalen Harnblasenexosomen

Die Migration von normalen Harnblasenfibroblasten wurde nach A) 48 h und B) 72 h Stimulation mit 12,5 µg/ml tumor-assoziierten Exosomen sezerniert von invasiven (rot; n = 12-18) und nicht invasiven (blau; n = 12) UBC-Zellen verglichen zu Fibroblasten stimuliert mit normalen Harnblasenexosomen (HCV29; grün; n = 6-8) analysiert. Die Migration wurde unter Verwendung des RTCA-Systems nach 24 h gemessen. Die prozentuale Migration der Harnblasenfibroblasten wurde im Verhältnis zu den unbehandelten Fibroblasten berechnet. Der P-Wert wurde mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests bestimmt. (P = P-Wert; CI-Werte: Anhang Tab. 52, 53)

7 Diskussion

Eine essentielle Voraussetzung für Tumorentstehung und -progression ist die Interaktion zwischen Tumorzellen und ihrer spezifischen Tumormikroumgebung (TME). Durch die aktive Sezernierung von Exosomen und den darin enthaltenen miRNAs können Tumorzellen nicht nur lokal die TME beeinflussen, sondern auch systemisch zur Generierung einer prä-metastatischen Nische beitragen. Für MIBC wurden bereits invasions-assoziierte miRNAs identifiziert. Inwieweit sich die intrazellulären miRNA-Signaturen auch extrazellulär in ihren sezernierten Exosomen widerspiegeln, ist nicht bekannt. Neue Erkenntnisse darüber könnten für die Identifizierung von nicht invasiven Biomarkern für das MIBC von entscheidender Bedeutung sein. Darüber hinaus würden diese Erkenntnisse zum weiteren Verständnis der Entstehung eines invasiven Phänotyps beitragen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst überprüft werden, ob sich die intrazellulären invasions-assoziierten miRNA-Muster in den sezernierten Exosomen widerspiegeln und inwieweit diese als nicht invasive, diagnostische Biomarker in Körperflüssigkeiten verwendet werden können.

7.1 Methodische Optimierung der Isolation von Exosomen aus Zellkulturüberständen

Bevor die miRNA-Expression von UBC-Zellen und ihren Exosomen untersucht werden konnte, erfolgte die Optimierung der Exosomen-Isolation aus Zellkulturüberständen. In Anbetracht der Fülle an Methoden, die sich von differentieller Ultrazentrifugation (UC) über Dichtegradientenzentrifugation bis zur Kit-basierten Präzipitation erstrecken, ist es schwierig, die optimale Isolationsmethode für die konkreten Untersuchungen auszuwählen [199, 200]. Die UC mit vorangeschalteter differentieller Zentrifugation sowie die Dichtegradientenzentrifugation stellen nach wie vor den Goldstandard dar [201]. Neben der UC wurde basierend auf Literaturdaten zu Beginn dieser Promotionsarbeit die Kit-basierte Präzipitation ausgewählt, da sie eine schnellere und dennoch reine Isolation von Exosomen ermöglichen sollte. Beide Methoden, UC und Kit-basierte Präzipitation, konnten erfolgreich für die Exosomen-Isolation aus dem Zellkulturüberstand von Harnblasenkarzinomzellen optimiert und eingesetzt werden.

Dafür wurde zunächst überprüft, ob sich die Zellvitalität von UBC-Zellen, die normalerweise in Zellkulturmedium versetzt mit 10 % FKS kultiviert werden, unter Kultivierung mit ED-FKS verglichen zu normalem FKS verändert. FKS enthält neben Wachstumsfaktoren, Hormonen und Nährstoffen auch EVs, die das Zellverhalten und nachfolgende Analysen

beeinflussen können [202, 203]. Um diese Effekte der FKS-EVs bei funktionellen Analysen ausschließen zu können, wurde das FKS über mind. 18 h bei 200.000 g zentrifugiert und anschließend steril filtriert [202]. Die Kultivierung ohne FKS kam nicht in Frage, da sich das Wachstumsverhalten, die Sezernierung und Verpackung von Exosomen unter Entzug von FKS verglichen zu normalen Kultivierungsbedingungen deutlich ändern können [204, 205]. Durch die hohe Zentrifugalkraft können auch andere wichtige Faktoren sedimentiert werden, wodurch die Zellvitalität negativ beeinflusst werden kann. Der negative Einfluss konnte bereits für andere Zelllinien bestätigt werden [203, 206]. In unserer Untersuchung konnte durch die Verwendung von ED-FKS verglichen zu FKS jedoch kein signifikanter Einfluss auf die Zellvitalität von UBC- und normalen Harnblasenzellen über die verschiedenen Inkubationszeiträume gemessen werden. Um sicherzustellen, dass die nachfolgenden Analysen nicht durch EVs aus FKS beeinflusst werden, wurden die Zellen für die Exosomen-Isolation in Kulturmedium mit 10 % ED-FKS inkubiert.

Unabhängig von der Isolationsmethode wurde standardmäßig der Zellkulturüberstand über 2 Schritte differentiell zentrifugiert, wodurch Zellreste, größere EVs und apoptotische Körper entfernt wurden.

Die Überprüfung der Exosomen mit Western Blot ergab, dass mit UC und Kit generell Exosomen isoliert werden können, die verglichen zu Zellen vermehrt die exosomalen Marker CD81 und Syntenin aufwiesen. Dabei war keinerlei zelluläre Kontamination mit dem Protein des endoplasmatischen Retikulums Calretikulin detektierbar. Die Reinheit der isolierten Exosomen konnte somit bestätigt werden. Das Tetraspanin CD81 zeigte für UC-Exosomen 2 Banden (ca. 25 kDa; 40-50 kDa), jedoch für Kit-Exosomen nur eine sehr große Bande (ca. 25 kDa). Die Chemolumineszenz-Intensität dieser Bande war wesentlich größer verglichen zu UC-Exosomen, weshalb durch die mögliche Überbelichtung der Membran basierend auf der hohen Intensität der Bande (25 kDa), die andere Bande bei 40-50 kDa für Kit-Exosomen nicht detektiert werden konnte. Tetraspanine dimerisieren häufig von einem Monomer in einen Homodimer [207, 208]. Das Molekulargewicht der zweiten Bande liegt bei ca. 40-50 kDa und entspricht in etwa dem doppelten Molekulargewicht des Monomers. Demnach könnte es während der Proteinisolation zur Dimerisierung des Tetraspanins CD81 gekommen sein.

Alix, ein Zytoplasmprotein, spielt eine wesentliche regulatorische Rolle in der Biogenese von Exosomen und wird häufig als exosomaler Marker verwendet [96]. Dieser Marker ist nach unseren Ergebnissen nicht geeignet, um klar UC-Exosomen von der zellulären Fraktion

zu differenzieren. Die Menge von Alix war nicht stabil innerhalb einer exosomalen Fraktion und lag nicht in jeder Zelllinie erhöht in Exosomen verglichen zu den Ausgangszellen vor. Deshalb wurde Alix nicht mehr als Exosomen-Marker für UBC-Zellen verwendet und wurde entsprechend für Untersuchungen an Kit-Exosomen ausgeschlossen.

Das Protein GAPDH wird häufig als Beladungskontrolle für SDS-Gele angewendet [96]. Exosomen und Ausgangszellen eines Zelltyps wiesen unterschiedliche Mengen an GAPDH auf, obwohl gleiche Protein-Mengen (20 µg) eingesetzt worden sind [209]. GAPDH war nicht stabil innerhalb der Fraktionen, weshalb es nicht weiter zur Kontrolle der Gel-Beladung verwendet wurde. Die Beladung des SDS-Gels wurde für UC- und Kit-Exosomen mit Hilfe der Coomassieblau-Färbung kontrolliert. Da sich die Proteinspektren von Zellen und Exosomen unterscheiden, konnte sie zwar als Positivkontrolle angewendet werden, aber nicht für die Quantifizierung. In dieser Arbeit war eine Quantifizierung nicht notwendig, da lediglich eine Aussage über das vermehrte Vorhandensein der Marker getroffen werden sollte. Möchte man eine Quantifizierung der Proteine durchführen, muss eine andere Beladungskontrolle verwendet werden.

Die hier ausgewählten Proteine stellen nur einen Teil der typischen exosomalen bzw. zellulären Marker dar [96, 97, 210]. In weiteren Analysen sollte die Auswahl an zellulären und exosomalen Marker ausgeweitet werden, um ein größeres Spektrum abzubilden. Interessant sind dabei exosomale Oberflächenmarker wie Transmembranproteine, Tetraspanine, Integrine und Proteine der Biogenese. Zum jetzigen Zeitpunkt sind keine eindeutigen Proteinmarker identifiziert, die eine klare Trennung der unterschiedlichen EV-Gruppen ermöglichen, da zum Teil Überlappungen mit dem Proteinspektrum von MVs existieren [211-214]. Aufgrund der methodischen Durchführung ist davon auszugehen, dass die isolierten EVs größtenteils exosomalen Ursprungs sind.

Morphologisch wiesen T24-Exosomen unabhängig von der Isolationsmethode eine vesikuläre Struktur auf, deren mediane Größe in dem für Exosomen typischen Größenbereich (30-150 nm) lag. Basierend auf dem verwendeten Methodenprotokoll der Elektronenmikroskopie konnte nur die Größe und Morphologie bestimmt werden, nicht aber der Nachweis typischer exosomaler Marker, wodurch Kontaminationen mit kleineren MVs nicht ausgeschlossen werden konnten. Durch die immunhistochemische Färbung mit exosomalen Marker könnte eine genauere Differenzierung der Vesikel erreicht werden [121, 215]. Obwohl es durch den Präparationsprozess zu einer Veränderung der Morphologie und minimierten Größe kommt,

stellt die Elektronenmikroskopie mit ihrer hohen Auflösung (~ 1 nm) eine sehr gute Methode dar, Exosomen zu visualisieren [216, 217].

Daneben wird häufig die Nanopartikel-Tracking Analyse (NTA) zur Bestimmung der Größe und Anzahl angewendet [192, 218-220]. Die Größe der Exosomen ist abhängig von der Isolationsmethode. UC-Exosomen sind signifikant größer über alle Zelllinien verglichen zu Kit-Exosomen. Die mediane Größe liegt dennoch im exosomalen Größenbereich [185, 221, 222]. Die Größenunterschiede zwischen UC- und Kit-Exosomen lassen sich durch die schlechte Resuspendierung der UC-Exosomen erklären, wodurch häufiger Aggregate aus mehreren Exosomen vorliegen können. Kit-Exosomen konnten einfach und schnell vereinzelt werden, wohingegen bei UC-Exosomen häufig auch nach mehrmaliger Durchmischung größere Schwebstoffe im Reaktionsgefäß sichtbar waren. Während der Messung von Kit-Exosomen wurden keine größeren Partikel im Sichtfeld gesehen, wohingegen bei UC-Exosomen dies häufiger der Fall war.

Ebenso unterscheidet sich die mittels Elektronenmikroskopie gemessene Größe von T24-Exosomen (UC) verglichen zu der mittels NTA. Die UC-Exosomen lagen bei der Elektronenmikroskopie vereinzelt vor, wohingegen während der NTA immer wieder größere Partikel erkennbar waren. Aufgrund der hohen Zentrifugalkraft während der UC werden die Vesikel stark aneinander gepresst, wodurch es zur vermehrten Aggregatbildung und dadurch zu einer größeren Größe kommen kann [222]. Alle Exosomen wurden daher vor der NTA 24 h bei 4 °C in PBS gelagert, um eine bessere Resuspendierung zu erreichen. Weiterhin kann es basierend auf der Detektionsgrenze des NTAs (~30 nm) zu einer Verschiebung der Größe kommen, da kleinere Vesikel mit dieser Methode nicht detektiert werden können [216, 219].

Untersucht man Kit-Exosomen der T24-Zellen, unterschieden sich die Größen zwischen NTA und Elektronenmikroskopie nicht signifikant, weisen bei NTA jedoch etwas höhere Größen auf. Wie bereits bei den UC-Exosomen erläutert, könnte es zur Verschiebung des Größenbereiches aufgrund der Detektionsgrenze des NTA-Systems gekommen sein [216, 219]. Zudem kann durch die Präparation für die Elektronenmikroskopie eine Minimierung der Größe verursacht werden [216, 217].

Während der NTA kommt es sowohl bei der Partikelgröße als auch Anzahl zu sehr hohen Standardabweichungen. Dies stellt neben der geringeren Auflösung (30-1.000 nm) einen weiteren großen Nachteil der NTA verglichen zur Elektronenmikroskopie dar. Die NTA-Messung wird stark von den Umgebungsbedingungen wie Erschütterungen, Fließgeschwindigkeit, Temperatur, Verdünnung der Partikel und dem Benutzer beeinflusst,

weshalb die Reproduzierbarkeit verglichen zur Elektronenmikroskopie sehr schlecht ist [219]. Dennoch ist es eine einfache und schnelle Methode, um die Größenverteilung isolierter Vesikel zu bestimmen. Möchte man Ergebnisse von unterschiedlichen Ansätzen miteinander vergleichen, ist dabei zu beachten, dass Standards eingehalten werden. So kann beispielsweise die Verwendung von *Beads* mit einer Größe von 100 nm zur Minimierung des Benutzer-Einflusses beitragen und die Detektionseinstellungen standardisieren [218]. Neben der einfachen NTA-Messung können durch spezifische Fluoreszenz-gekoppelte AK Subpopulationen innerhalb der isolierten Exosomen identifiziert und analysiert werden [192]. Die Partikelanzahl pro ml Kulturmedium war signifikant höher in der Gruppe der Kit-Exosomen verglichen zu UC-Exosomen. Durch die Kit-Isolation kann es zur vermehrten Sedimentierung von anderen Bestandteilen (z. B. Proteinen) kommen, die durch den zusätzlichen Waschschrift während der UC zum Teil entfernt werden können [223]. Die verringerte Partikelzahl kann auch durch Verluste oder Aggregatbildung während der UC-Isolation erklärt werden. Ein direkter Vergleich der Partikelanzahlen in Abhängigkeit von der eingesetzten Zelllinie konnte nicht gezogen werden, da zwar gleiche Kultivierungsbedingungen eingehalten wurden, jedoch jede Zelllinie unterschiedliche Verdopplungszeiten aufweist. Die Berechnung der Partikelzahl pro Zelle ist daher nicht möglich.

Obwohl alle 3 Methoden auch einzeln dazu geeignet sind, exosomale Vesikel bzw. EVs im Allgemeinen nachzuweisen, sollte für die Charakterisierung immer eine Kombination aus verschiedenen Techniken verwendet werden.

Zusammenfassend kann eingeschätzt werden, dass die Exosomen-Isolation mittels UC und Kit etabliert werden konnte. Jedoch muss man davon ausgehen, dass zum Teil Kontaminationen mit MVs vorhanden sein können [220]. Obwohl immer mehr Techniken und Ergebnisse zu EVs veröffentlicht werden, sind noch einige grundlegende Fragen nicht geklärt. Es werden verschiedenste Isolationsmethoden eingesetzt, für die bislang keine einheitlichen, standardisierten Protokolle etabliert wurden [214]. Mit keiner der Methoden ist es möglich, eine klare Trennung der EV-Subtypen zu erreichen [125, 224]. Dennoch wird mit der jeweiligen Methode eine hohe Anreicherung einer bestimmten EV-Fraktion erreicht. Mittlerweile werden häufig Methodenkombinationen wie der UC mit nachfolgender Dichtegradientenzentrifugation angewendet. Problematisch bei dieser Variante ist, dass Exosomen nicht generell die gleiche Dichte aufweisen und ebenso MVs mit der gleichen Dichte sedimentiert werden [220]. Durch die aufeinanderfolgende Anwendung mehrerer

Methoden kann es zudem zu einem vermehrten Verlust an EVs kommen. Auch Methoden, die über AK-gekoppelte *Beads* und *Flow Cytometry* eine Aufreinigung ermöglichen, führen lediglich zu einer Aufreinigung bestimmter Subpopulationen [225-227]. Kombinationen aus mehreren AK-gekoppelten *Beads* führen zu einer noch besseren Selektionierung der Exosomen [228]. Es ist wichtig, dass die ausgewählte Isolationsmethode standardisiert über alle Versuchsansätze durchgeführt wird, da bereits kleinere Änderungen wie die Verwendung eines anderen Zentrifugenrotors, verkürzte bzw. verlängerte Zentrifugationszeit und Lagerung einen Einfluss auf die Qualität und Quantität der Exosomen haben [222, 229, 230]. Vor Analysenbeginn muss geklärt werden, ob die ausgewählte Isolationsmethode für die jeweilige Fragestellung geeignet ist, um die bestmöglichen Voraussetzungen für reproduzierbare Ergebnisse zu schaffen. Auf der Jahrestagung 2017 der *International Society of Extracellular Vesicles* (ISEV) wurde ein neue Website (EV-TRACK) vorgestellt, die die Vereinheitlichung und Etablierung von Methoden und Standards verbessern soll [231].

Die Kit-Isolation hat verglichen zur UC den Vorteil, dass relativ schnell, einfach und effektiv Exosomen isoliert werden können, welche im Folgenden sehr gut für deskriptive Analysen in Zellkulturüberständen, Plasma und Urin geeignet sind. Die Isolation erfolgt bei einer geringen Zentrifugationsgeschwindigkeit von 10.000 g, die in jedem Labor durchgeführt werden kann. Sie stellt jedoch mit Kosten von ca. 4 € pro ml Kulturmedium eine sehr teure Methode dar. Vergleicht man die Expressionsergebnisse (z. B. miRNAs; mRNA) zwischen UC und Kits sind diese nahezu identisch [232-235]. Obwohl bereits belegt wurde, dass es durch Präzipitation mittels Kit zur Co-Sedimentierung von nicht exosomalen Proteinen kommt, wurde die Kit-Isolation für Untersuchungen der exosomalen miRNA-Expression in Zellkulturüberständen und Urinen angewendet [223].

Dagegen ist die UC eine relativ kostengünstige, wenn auch sehr zeitintensive Methode, durch die hohe Mengen an Exosomen sedimentiert werden können. Das Vorhandensein einer Ultrazentrifuge stellt nicht die Standardausstattung eines Labors dar, weshalb viele Arbeitsgruppen die teurere Kit-Isolation anwenden. Da bislang nicht bekannt ist, inwieweit Reste des Isolationsreagenz zurückbleiben und welchen Einfluss dies auf nachfolgende funktionelle Versuche hat, wurde in dieser Arbeit die UC für funktionelle Analysen verwendet. Des Weiteren ist es bei der UC möglich, die präzipitierten Exosomen nach der ersten Sedimentierung mittels PBS zu waschen, wodurch eine höhere Reinheit der Proben erreicht werden kann.

7.2 miRNA-Expressionsanalysen im Harnblasenkarzinom

7.2.1 miRNA-Expressionsanalysen in Harnblasenkarzinomzellen und ihren sezernierten Exosomen

Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob Exosomen ein invasionsabhängiges miRNA-Expressionsprofil aufweisen und ob dies die Expression ihrer Ausgangszellen widerspiegelt. Für die in-vitro Analysen wurden basierend auf Datenblättern und Literaturrecherchen 2 nicht invasive (RT112; 5637) und 3 invasive UBC-Zelllinien (T24; J82; 253J-BV) verwendet [187, 188, 196-198]. Durch den Invasionsassay konnte die unterschiedliche Invasionsfähigkeit der Zelllinien bestätigt werden.

Invasive UBC-Zellen sind verglichen zu nicht invasiven Zellen durch 37 signifikant differentiell exprimierte miRNAs charakterisiert. Ausgehend von dieser invasionsassoziierten miRNA-Signatur wurden 5 miRNAs (miR-99a-5p; -137-3p; -141-3p; -200a-3p; -205-5p) ausgewählt, welche mittels qPCR als signifikant differentiell in invasiven verglichen zu nicht invasiven UBC-Zellen verifiziert werden konnten. So konnte bestätigt werden, dass UBC-Zellen abhängig von der Invasivität unterschiedliche miRNA-Signaturen aufweisen. Die hier gewonnenen Daten stimmen teilweise mit bereits beschriebenen miRNA-Alterationen im MIBC überein [59, 60, 62, 63, 65].

Darüber hinaus belegte das globale Screening der miRNA-Expression der Exosomen, dass sich Exosomen sezerniert von invasiven UBC-Zellen durch 15 miRNAs von Exosomen aus nicht invasiven Zellen unterscheiden lassen. Erstmals konnte auch für das Harnblasenkarzinom bestätigt werden, dass sich invasive UBC-Zellen nicht nur intrazellulär anhand ihres miRNA-Musters diskriminieren lassen, sondern auch extrazellulär durch ihre sezernierten Exosomen. Invasive UBC-Zellen weisen auch ein differentes intrazelluläres sowie exosomales Proteinspektrum auf [209]. Dabei konnte eine Korrelation von differentiellen EMT-assoziierten Proteinen in den Exosomen mit dem Metastasierungspotenzial der Zelllinien festgestellt werden. Auch long non-coding RNAs (lncRNA) konnten bereits in Exosomen von UBC-Zellen und Urinexosomen von MIBC nachgewiesen werden [63]. Die lncRNA HOTAIR ist maßgeblich an der Regulation der Migration und Invasion beteiligt.

8 von 15 miRNAs wurden mittels qPCR analysiert, wovon 5 (miR-30a-3p; -99a-5p; -137-3p; -141-3p; -205-5p) verifiziert werden konnten. Die fehlende Verifizierung der anderen 3 miRNAs kann zum einen darin begründet sein, dass bislang keine geeigneten

Normalisierungsmöglichkeiten der exosomalen miRNA-Expression existieren, wodurch eine Quantifizierung nur anhand gleicher RNA-Konzentrationen möglich war. Die für Zelllinien und Primärtumore seit Jahren etablierten Referenzgene (z. B. RNU48; RNU6B) eignen sich nicht für die Normalisierung der exosomalen miRNA-Expression, da das Expressionslevel innerhalb einer Untersuchungsgruppe stark variiert (Daten nicht gezeigt). Hier wurde die exosomale miRNA-Expression durch den Einsatz gleicher RNA-Menge normalisiert, was sicher nicht optimal ist.

Die fehlende Normalisierung wird immer wieder sehr kontrovers diskutiert. Häufig werden sogenannte „Spike-In“ Referenzen eingesetzt [236]. Dabei werden nicht humane miRNAs (z. B. cel-miR-39) vor der RNA-Isolation zugegeben und als Normalisierung verwendet [236]. Diese Methode spiegelt nicht die tatsächliche Situation der Probe wieder, da sie künstlich von außen zugegeben wird und durch z. B. Pipettierfehler selbst Schwankungen unterliegen kann. Weiterhin wird neben Kombinationen aus verschiedenen nicht differentiell exprimierten humanen miRNAs auch die Normalisierung basierend auf der Partikelzahl, RNA-Menge oder Exosomen-Menge durchgeführt [180, 237, 238].

Die Jahrestagung 2017 der ISEV empfiehlt die Kombination aus der Partikelanzahl normiert auf die Proteinmenge sowohl für die Normalisierung von Expressionsanalysen als auch für funktionelle Untersuchungen. Für weitere miRNA-Expressionsanalysen an Exosomen des Harnblasenkarzinoms ist es wichtig, neue Referenzgene zu identifizieren, die z. B. anhand der Microarray-Daten der Zellen und Exosomen ermittelt werden könnten.

Kontaminationen durch freizirkulierende RNAs könnten zu einer Expressionsverschiebung führen, wodurch die Unterschiede nicht detektiert werden. Dieser Einfluss konnte hier während der Expressionsanalysen ausgeschlossen werden, da alle Exosomen zuvor mittels RNase behandelt wurden. Die miRNA-Expression innerhalb der Exosomen wurde dadurch nicht beeinflusst, da der Inhalt durch die Plasmamembran der Exosomen vor Degradation durch RNase geschützt ist und die RNase anschließend durch einen RNase-Inhibitor inaktiviert wurde [239]. Ebenfalls konnte der Einfluss zellulärer Kontaminationen und die damit verbundene Verschiebung der miRNA-Expression ausgeschlossen werden, da die isolierten Exosomen basierend auf den Western Blot Ergebnissen frei von zellulärem Calretikulin waren.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich invasive UBC-Zellen auf intrazellulärer und exosomaler Ebene anhand ihres miRNA-Musters von nicht invasiven unterscheiden lassen, sollte überprüft werden, ob das intrazelluläre Expressionslevel auch in den Exosomen

vorliegt. Nicht alle miRNAs, die in den UBC-Zellen detektiert worden sind, konnten auch in ihren sezernierten Exosomen gefunden werden. Ob dies durch die Nachweisgrenze der Microarrays bedingt ist, müsste durch andere Methoden wie z. B. die Nanostring-Analyse analysiert werden, die die Untersuchung einzelner miRNAs anhand der Verwendung von Code-markierten Fluoreszenz-Primer ermöglichen [240, 241].

Basierend auf der hierarchischen Gruppierung der miRNA-Expression konnten 9 miRNAs (miR-99a-5p; -137-3p; -141-3p; -200a-3p; -200b-3p; -200c-3p; -205-5p; -224a-5p; -429-3p;) identifiziert werden, die sowohl invasive UBC-Zellen als auch ihre sezernierten Exosomen signifikant von nicht invasiven Zellen bzw. Exosomen unterscheiden. Die molekulare Zusammensetzung der UBC-Zellen spiegelt sich somit zum Teil in den sezernierten Exosomen wieder. Dies wurde bereits für andere Tumorentitäten gezeigt, aber noch nicht für das Harnblasenkarzinom [118, 180, 242]. Anhand der hier gezeigten Daten kann geschlussfolgert werden, dass diese miRNAs charakteristisch für den invasiven Phänotyp des Harnblasenkarzinoms sind. Dadurch könnten sie sich als potentielle Biomarker für die Diskriminierung von NMIBC und MIBC in Geweben und Exosomen eignen. Einige der identifizierten miRNAs wurden bereits als differentiell exprimiert zwischen MIBC und NMIBC-Primärtumoren beschrieben [59, 60, 62, 63, 65].

Die am besten charakterisierten miRNAs im Harnblasenkarzinom sowohl diagnostisch als auch funktionell sind miRNAs der miR-200 Familie [55, 56]. Diese sind maßgeblich an der Regulation der EMT beteiligt und weisen eine Korrelation zwischen Expression und der T-Kategorie auf. Im Kapitel 7.2.2 wird die Funktion und deren Bedeutung für das Harnblasenkarzinom näher erläutert [55-58, 243].

Nicht nur als Biomarker sind miRNAs interessant, sondern auch als mögliche Regulatoren in der Tumorgenese des Harnblasenkarzinoms. Die erhöhte Expression von miR-99a-5p in invasiven UBC-Zellen lässt vermuten, dass sie neben ihrer tumorsuppressiven Eigenschaft in *low grade* Harnblasenkarzinomen einen onkogenen Effekt in invasiven UBC-Zellen hat [59, 62, 244]. Dieser Effekt scheint Stadien-abhängig zu sein. MiRNAs können basierend auf der partiellen Komplementarität zwischen ihrer Seed-Sequenz und der 3'UTR-Region der Ziel-mRNA nicht nur eine mRNA regulieren, sondern gewebespezifisch verschiedene mRNAs, wodurch sie unterschiedliche Effekte induzieren können.

Auch für miR-137-3p existieren unterschiedliche Daten hinsichtlich ihrer Expression und der daraus resultierenden Funktion in der Tumorprogression. Während miR-137-3p in anderen Tumorentitäten häufig eine Runterregulation aufweist, wurde hier sowohl intra- als auch

extrazellulär eine erhöhte Expression in invasiven verglichen zu nicht invasiven UBC-Zellen gemessen [245-249]. Es scheint so, dass diese miRNA ebenfalls gewebespezifisch eine onkogene Wirkung besitzt. Invasion, Migration und Proliferation von UBC-Zellen wird durch die erhöhte Expression von miR-137-3p verstärkt [250]. Maßgeblich dafür verantwortlich ist das direkte mRNA-Target PAQR3 (*progesterin and adipoQ receptor family member III*), dessen tumorsuppressive Wirkung bereits für das Osteosarkom beschrieben wurde [250, 251]. Dies verdeutlicht, dass die miR-137-3p potentiell ein kritischer Regulator des Invasions- und Metastasierungspotenzials des invasiven Harnblasenkarzinoms sein kann. Inwieweit diese Daten für die hier verwendeten Zelllinien und Patienten-abgeleiteten Proben zu treffen, muss in weiteren Studien anhand von größeren Fallzahlen, funktionellen Analysen einzelner miRNAs in vitro und in vivo überprüft werden. Genauso muss die Rolle der exosomalen miRNAs im Harnblasenkarzinom genauer untersucht werden, wodurch deren Einfluss auf tumorfördernde Prozesse im Harnblasenkarzinom besser verstanden werden kann.

Neben der übereinstimmenden invasions-assoziierten miRNA-Signatur war es möglich, sowohl zellspezifische (28 miRNAs) als auch exosomenspezifische (6 miRNAs) miRNA-Muster in Abhängigkeit von der Invasivität zu detektieren. Dies könnte darauf hindeuten, dass einige miRNAs selektiv in Exosomen verpackt werden.

Es ist inzwischen bekannt, dass miRNAs durch bestimmte Proteine wie hnRNP (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*) oder bindungsspezifischen Sequenzen am 3'-Ende der miRNA selektiv ausgeschleust werden [252-254]. Ostefeld et al. konnte bereits belegen, dass die miRNA miR-23b selektiv von Harnblasenkarzinomzellen verpackt wird und dabei das Protein RAB27A/B eine essentielle Bedeutung spielt [221].

Zellen können durch die spezifische Sezernierung von exosomalen miRNAs ihr eigenes Expressionslevel regulieren, wodurch sie schnell und effektiv auf sich ändernde Umgebungsbedingungen wie Hypoxie und externe Stimulanzen reagieren können [153, 167, 221, 255, 256]. Durch die vermehrte Sekretion von tumorsuppressiven miRNAs generieren Tumorzellen einen tumorfördernden Phänotyp, indem sie sich selbst vor der tumorsuppressiven Wirkung schützen [257].

Neben der autokrinen Wirkung können exosomale miRNAs auch Zellen in der direkten Umgebung, aber auch in entfernten Organen beeinflussen [150, 221]. Durch die Aufnahme tumor-assoziiertes Exosomen wird das intrazelluläre miRNA-Niveau der Zielzellen verändert [131, 136]. Dies kann zur Generierung einer tumor- und invasionsfördernden TME führen [166, 175, 258-260]. Welchen potentiellen Einfluss exosomale miRNAs sezerniert von

Harnblasentumoren in Abhängigkeit von der Invasivität auf die TME haben, ist bislang nicht bekannt. Es existiert nur eine Studie, die den Einfluss exosomaler miRNAs untersucht hat [221]. Die miRNA miR-23b wird vermehrt exosomal von metastasierenden Harnblasenkarzinomzellen verglichen zu nicht metastasierenden sezerniert. In vivo konnte dadurch eine erhöhte Anzahl an Lungenmetastasen sowie ein Anstieg der Angiogenese beobachtet werden. Inhibiert man die Proteine RAB27A/B, kommt es zur Minimierung der durch Exosomen verursachten Effekte.

Weiterhin konnten 28 miRNAs identifiziert werden, die eine signifikante Deregulation ausschließlich in invasiven verglichen zu nicht invasiven UBC-Zellen aufweisen. Diese Fragestellung stand jedoch nicht Fokus dieser Arbeit, weshalb keine weiteren miRNAs für die Validierung in UBC-Zellen ausgewählt wurden. Einige der identifizierten miRNAs wurden bereits in anderen Studien als differentiell exprimiert in MIBC beschrieben [56, 59, 60, 64, 244, 261].

Die miRNA-Expression von Zellen und Exosomen kann nicht direkt verglichen werden, da zum einen die Quantifizierung basierend auf fehlender Normalisierung zwischen beiden Gruppen nicht erfolgen kann und zum anderen besitzen Zellen verglichen zu Exosomen unterschiedliche Mengenanteile der jeweiligen RNA-Klassen [262-264]. Der Anteil von miRNAs normalisiert auf den Gesamt-RNA-Gehalt in Exosomen schwankt stark in Abhängigkeit von der Ausgangszelllinie [262]. Die isolierten RNA-Mengen sind sehr klein, weshalb es durch den Einsatz bestimmter RNA-Konzentrationen möglich ist, dass die Detektionsgrenze des verwendeten Analysensystems erreicht ist und die miRNA nicht gemessen werden kann. Es müssen geeignete Normalisierungs- und Analysemethoden entwickelt werden, die 1. einen direkten Vergleich der exosomalen und zellulären miRNA-Expression erlauben und 2. die Expressionsbestimmung einzelner Exosomen ermöglicht.

7.2.2 Vergleich der miRNA-Expression mit Patienten-abgeleiteten Proben

Die klinische Relevanz der in vitro gewonnenen Daten wurde durch den Vergleich mit der miRNA-Expression von Patienten-abgeleiteten Proben untersucht. Dazu wurde eine Microarray-Analyse von 10 NMIBC und 14 MIBC Primärtumoren durchgeführt. Harnblasenkarzinome weisen je nach T-Kategorie eine starke Heterogenität in Hinblick auf die zelluläre Zusammensetzung auf, weshalb alle verwendeten Primärtumore erneut von einem Pathologen begutachtet worden sind. Die Tumorareale wurden auf dem Gewebeschnitt markiert und dahingehend selektioniert, dass der Tumoranteil mind. 80-90 % betrug und frei

von Nekrosen war. Ein höherer Anteil anderer Gewebetypen könnte in der Verschiebung der miRNA-Expression resultieren, da diese zellspezifisch exprimiert werden [34, 41, 265].

MIBC können anhand von 63 differentiell exprimierten miRNAs von NMIBC unterschieden werden. Jeweils 2 Proben des MIBC und NMIBC wurden zu der anderen Gruppe geclustert. Grund dafür könnte die intertumorale Heterogenität sein [266, 267]. Technisch induzierte Artefakte, welche durch ein optimiertes Protokoll minimiert worden sind, konnten ausgeschlossen werden.

Die in vitro generierte invasions-assoziierte miRNA-Signatur des Zellkultursystems spiegelt sich zum Teil in MIBC-Primärtumoren wider. Dabei konnten 6 miRNAs (miR-141-5p; -200a-3p; -200a-5p; -200b-3p; -205-5p; -429-3p) identifiziert werden, die signifikant differentiell in UBC-Zelllinien und in Gewebeproben exprimiert werden. Der Großteil der übereinstimmenden miRNAs gehört der miR-200 Familie an. Diese Daten sind ein Indiz dafür, dass diese miRNA-Familie eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des invasiven Phänotyps des Harnblasenkarzinoms spielt. Die hier dargestellten Ergebnisse stimmen mit Studien von Dyrskjöt et al. und Pignot et al. überein, die bereits gezeigt haben, dass es zur verminderten Expression einiger Mitglieder dieser Familie in *high grade* und MIBC kommt [261, 268].

Die miR-200 Familie ist eine der am häufigsten und am besten untersuchten miRNAs im Harnblasenkarzinom, aber auch anderer Tumorentitäten [55-58, 269, 270]. Die Runterregulation dieser miRNAs steht im direkten Zusammenhang mit der EMT, welche ein kritischer Schritt in der Metastasierungskaskade des Harnblasenkarzinoms ist. Durch die verminderte Expression kommt es zur vermehrten Expression des Transkriptionsfaktors ZEB1 und ZEB2. Dieser fungiert als transkriptionaler Hemmer von epithialen Proteinen wie E-Cadherin, wodurch es zur vermehrten Anreicherung mesenchymaler Proteine kommt. Durch die Verlagerung von epithialen zu mesenchymalen Proteinen kommt es zum Verlust der Zelladhäsion und erhöhter Invasivität, wodurch die Progression und Metastasierung des MIBC begünstigt werden kann.

Neben der invasions-assoziierten miRNA-Signatur, die invasive Harnblasenkarzinome im Allgemeinen kennzeichnen, konnten auch miRNA-Muster ermittelt werden, die jeweils ausschließlich charakteristisch für invasive UBC-Zellen (22 miRNAs) oder MIBC-Tumore (57 miRNAs) sind. Inwieweit diese Unterschiede jedoch relevant sind, muss in weiteren Validierungsstudien an einer größeren Patientenzahl sowie weiteren Zelllinien überprüft werden. Die detektierten Expressionsunterschiede könnten ihre Ursache auch in der geringen

Anzahl an verwendeten Zelllinien (n = 5) haben. Zwar wird durch die Verwendung von 2 nicht invasiven und 3 invasiven UBC-Zelllinien eine relativ große Spanne der molekularen Charakteristika des Harnblasenkarzinoms abgebildet, jedoch bei weitem nicht alle. Die verwendeten Zelllinien weisen jede für sich bestimmte molekulare Signaturen und Eigenschaften auf, die zum Teil mit denen der Primärtumoren und anderen Zelllinien übereinstimmen [189, 271-273]. Es handelt sich um Zelllinien, die zwar primär aus einem Harnblasenkarzinom entstammen, jedoch können über die Zeit einige der phänotypischen Merkmale verloren gegangen sein [274]. Grundsätzlich lässt sich jedoch schlussfolgern, dass die Zellkulturmodelle für die Analyse invasions-assoziiierter Moleküle und Prozesse geeignet sind.

7.2.3 Exosomale miRNAs als potentielle Biomarker

Im weiteren sollte geklärt werden, ob sich die exosomalen miRNA-Signaturen auch als potentielle diagnostische Biomarker in *liquid biopsies* eignen. Hierzu wurden Urinexosomen von NMIBC- und MIBC-Patienten mittels Kit isoliert.

Die miRNA-Quantifizierung von 8 in vitro identifizierten exosomalen miRNAs wurde mittels qPCR und vorangeschalteter PreAmp durchgeführt. Die Ergebnisse der in vitro Daten konnten nur teilweise bestätigt werden. MiRNA miR-200a-3p wies eine tendenzielle Runterregulation in Urinexosomen von MIBC verglichen zu NMIBC auf, für alle weiteren miRNAs ergaben sich keine Unterschiede.

Die Ursachen für die fehlende Reproduzierbarkeit können sehr vielseitig sein. Der wichtigste Einflussfaktor ist die große Heterogenität der Exosomen im Urin, da diese keine reine Tumorexosomenfraktion darstellt [115, 275-277]. Im Urin kommen Exosomen von verschiedenen Zelltypen (z. B. Epithelzellen, Fibroblasten) vor [115, 175-177]. Obwohl bekannt ist, dass der größte Anteil an Urinexosomen ihren Ursprung bei Tumorzellen hat, kann durch das Vorhandensein anderer Exosomen eine Verschiebung der miRNA-Expression resultieren, wodurch tumor-assoziierte Veränderungen überlagert werden können [262].

In Zukunft sollten für die Identifizierung und Charakterisierung von tumorspezifischen Exosomen aus Körperflüssigkeiten alternative Ansätze verwendet werden. Die Identifizierung von neuen Biomarkern sollte von der jeweiligen Körperflüssigkeit und dem darin verwendeten Material (z. B. freizirkulierende RNA; DNA; Exosomen; MVs) ausgehen und nicht von in vitro Daten oder Ergebnissen, die aus Tumorgewebe gewonnen wurden. Dies war jedoch nicht Ziel dieser Arbeit. Weiterhin könnte die Entwicklung neuer Methoden, die

z. B. über tumorzellspezifische Oberflächenmarker, eine Selektionierung von tumor-assoziierten Exosomen erlauben, eine sehr gute Alternative darstellen.

Ein möglicher Einfluss von freizirkulierenden RNAs kann nicht ausgeschlossen werden, da keine RNase-Behandlung erfolgt ist. Daneben können auch zelluläre Resten eine Verschiebung der RNA-Expression induziert haben. Zwar wurde mit Hilfe der NTA die mediane Größe und Partikelanzahl bestimmt, jedoch erfolgte keine Überprüfung typischer exosomaler und zellulärer Marker. Erste Western Blot Analysen außerhalb dieser Arbeit zeigen, dass es in einigen Urinproben zu geringen zellulären Kontaminationen (Calretikulin; Daten nicht gezeigt) kommt, obwohl der Urinüberstand auch differentiell zentrifugiert wurde. Die geringe Gesamt-RNA-Konzentration könnte ebenfalls einen Einfluss auf die miRNA-Quantifizierung haben. Für Urinexosomen wurden 10 ng Gesamt-RNA für die Umschreibung in cDNA eingesetzt, wohingegen bei UBC-Exosomen 100 ng verwendet wurden. Aufgrund der niedrigen RNA-Menge wurde eine Target-basierte Präamplifikation der cDNA durchgeführt. Zwar belegen Studien, dass bei dieser Methode keine Unterschiede in der miRNA-Expression verglichen zur normalen qPCR auftreten, jedoch ist das für UBC-Exosomen noch nicht getestet worden [193, 194].

Für die Präamplifikation ist eine wichtige Voraussetzung, dass die Effizienz der einzelnen Primer annähernd gleich ist. Die gemessenen Primereffizienzen waren unterschiedlich und lagen zwischen 55 % bis 67 %. Demnach wurden pro Zyklus nicht 2 identische Kopien amplifiziert, weshalb es zu einer Verschiebung der miRNA-Expression kommen kann [193]. Bereits kleinste Abweichungen der RNA-Konzentration können zur veränderten Expression führen, die sich durch die Präamplifikation noch verstärken. Obwohl die miRNA präamplifiziert wurden, kann es sein, dass das Expressionsniveau der zu untersuchenden miRNA außerhalb der Detektionsgrenze des Systems lag. Um sicherzustellen, dass weder die Präamplifikation noch die geringe RNA-Konzentration das Ergebnis beeinflussen, sollte dies durch mehrfache Wiederholung mit unterschiedlichen RNA-Konzentrationen getestet werden. Ein wichtiger Punkt hierbei ist auch die fehlende Normalisierung der relativen Expression in Exosomen, wodurch mögliche Qualitätsmängel der RNA nicht identifiziert werden können (Kapitel 7.2.1).

Beachtet man die diskutierten Punkte, könnten exosomale miRNA geeignete diagnostische und vielleicht in Zukunft sogar prädiktive Biomarker für das Harnblasenkarzinom darstellen. Bislang sind keine Studien veröffentlicht, die die exosomale miRNA-Expression zwischen NMIBC und MIBC in *Liquid Biopsies* untersucht haben. Generelle miRNA-

Expressionsanalysen an Harnblasenkarzinomen unter Verwendung von *liquid biopsies* verdeutlichen aber deren potentiellen Nutzen zur Diskriminierung von gesunden Probanden und Harnblasenkarzinompatienten [182, 235, 278-283]. Harnblasenkarzinompatienten weisen über alle T-Kategorien unter Verwendung von Urinen eine signifikant verminderte Expression der miR-200 Familie verglichen zu gesunden Probanden auf [278]. Dabei bestand eine Korrelation der Expression der miR-200 Familie und EMT-Markern im Urin. Erste Veröffentlichungen zeigen, dass miRNAs aus *liquid biopsies* nicht nur für die Diskriminierung zwischen gesund und krank geeignet sind, sondern auch eine differentielle Expression in Abhängigkeit von der T-Kategorie und dem Grading besitzen [283, 284].

Liquid biopsies stellen neben der herkömmlichen Gewebebiopsie eine bessere Alternative dar, um prognostische und diagnostische Biomarker für Tumore zu identifizieren. Tumore weisen nicht nur eine intertumorale, sondern auch eine intratumorale Heterogenität auf [266, 267, 285]. Durch Expressionsanalysen an einzelnen Gewebeschnitten kann diese nicht optimal dargestellt werden. Durch das weite Spektrum an Untersuchungsmaterial (z. B. zellfreie DNA; RNA; exosomale RNAs; Proteine) innerhalb der Körperflüssigkeiten kann die Heterogenität von Tumoren verglichen zur einzelnen Gewebebiopsie besser abgebildet werden [286, 287]. Gewebematerial, was während einer Biopsie entnommen wurde, ist zum Teil nicht ausreichend, um genauere Aussage über die Erkrankung zu treffen, weshalb häufig eine erneute Biopsie indiziert wird. Dies ist aufwendig, kostenintensiv und schmerzhaft für den Patienten. *Liquid biopsies* würden daher eine kostengünstigere, Patienten-freundlichere und sichere Alternative darstellen. Sie können minimal invasiv durch eine Blutprobe oder nicht invasiv über eine Urinprobe gewonnen werden. Bislang finden molekulare Veränderungen detektiert in *Liquid biopsies* weder für das Harnblasenkarzinom noch für andere Tumorentitäten eine klinische Anwendung, dies rückt jedoch immer mehr in den Fokus der Biomarkerforschung.

7.3 Interzellulärer Transport von tumor-assoziierten Exosomen auf Fibroblasten

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, die funktionelle Bedeutung tumor-assoziiierter Exosomen in der Interaktion mit Zellen der TME zu analysieren, um die komplexen tumorbiologischen Prozesse des Harnblasenkarzinoms besser zu verstehen. Harnblasenkarzinome, vor allem MIBC, zeichnen sich durch einen vermehrten Anteil an Stromazellen (normalen Fibroblasten; TAFs) aus, weshalb in dieser Arbeit der Fokus auf der funktionellen Interaktion von Harnblasenkarzinomzellen mit normalen primären Harnblasenfibroblasten (HBF) lag.

Die Kultivierung von normalen primären HBFs ist verglichen zu etablierten Zelllinien sehr schwierig, da Kulturmedien mit speziellen Zusätzen (HSA (*human serum albumin*); Linolsäure; Lecithin; EGF; FGF; Insulin; L-Glutamin; Ascorbinsäure) verwendet werden müssen. Daher wurde für alle Optimierungs- und Etablierungsversuche die immortalisierte Zelllinie hTERT-FB, die aus der Vorhaut stammt, eingesetzt.

Tumor-assoziierte Exosomen werden abhängig von der Zeit, aber unabhängig von der Invasivität der Ausgangszellen von normalen Vorhautfibroblasten (hTERT-FB) aufgenommen. Basierend auf den Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass bereits nach 1-6 h ein Großteil der Exosomen in die Zielzelle aufgenommen, aber noch nicht verarbeitet worden ist. Über den Zeitraum von 12-48 h konnte eine kontinuierliche Abnahme des exosomalen Signals beobachtet werden. Exosomen sezerniert von UBC-Zellen werden demnach schnell und effektiv von Zielzellen aufgenommen, was bereits für andere Tumorzellen demonstriert wurde [137, 288]. Alle Fluoreszenzbilder wurden mit den gleichen Einstellungen (Laserintensität; Belichtungsstärke; Belichtungszeit) aufgenommen und konnten daher miteinander verglichen werden.

Das rote Signal lagert sich vorwiegend im Bereich des Zellkerns an, wo das endoplasmatische Retikulum lokalisiert ist. Diese Vermutung kann durch die hier verwendete Phalloidin-Färbung nicht detailliert untersucht werden, da sie lediglich die F-Aktivfilamente des Zytoskeletts anfärbt [289]. Für die bessere Lokalisierung der aufgenommenen Exosomen sollten andere AKs verwendet werden, die eine Färbung von zellulären Strukturen wie dem endoplasmatischen Retikulum oder Golgi-Apparat ermöglichen [290-292].

Mit diesem Versuchsaufbau kann nicht klar gezeigt werden, dass wirklich 1. nur reine Exosomen internalisiert worden sind und 2. alle Exosomen aufgenommen worden sind und sich nicht zum Teil nur an die zelluläre Plasmamembran anlagern. Durch die Verwendung des

Membranfarbstoffes PKH26 wurde nur die Plasmamembran der Vesikel angefärbt. Wie bereits in vorangegangenen Abschnitten diskutiert, ist es zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich, 100 %ig reine Exosomen zu isolieren, weshalb die verwendeten Exosomen eventuell Kontaminationen durch MVs aufweisen. Der Farbstoff PKH26 ist nicht geeignet zwischen Exosomen und MVs zu unterscheiden. Daher sollten AK-gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe für die Markierung der Exosomen verwendet werden, die zumindest teilweise eine bessere Selektionierung der exosomalen Vesikel von MVs erlauben [293, 294]. Exosomen können durch z. B. eine stabile Überexpression von CD63-GFP in den Ausgangszellen bereits vor der Isolation markiert werden [295]. Durch Anwendung anderer Techniken wie 3D Lebendzell-Mikroskopie könnte die dreidimensionale Struktur der Zellen abgebildet und damit eine genauere Lokalisierung der Exosomen gezeigt werden [296, 297].

Durch die Aufnahme von Exosomen werden Moleküle von der Ausgangszelle in die Zielzelle transportiert. Um dies experimentell nachzustellen, wurde in dieser Arbeit ein bislang für das Harnblasenkarzinom einzigartiger Versuchsaufbau etabliert. Dieser ermöglicht es, eine nicht humane miRNA (cel-miR-39-3p) über tumor-assoziierte Exosomen in Zielzellen zu transportieren und dort zu detektieren. Mit diesem Protokoll gelang es, die miRNA cel-miR-39-3p sowohl unter Verwendung von einer invasiven als auch nicht invasiven UBC-Zelllinie in normale und tumor-assoziierte Fibroblasten zu transportieren. Die exosomale miRNA wurde schnell innerhalb von 24 h internalisiert. Die Erhöhung der miRNA-Expression in den Zielzellen beruhte allein auf dem Transfer bzw. der Aufnahme von Exosomen, da der Einfluss von freizirkulierender RNA und des Transfektionsreagenz ausgeschlossen werden konnte.

Die Effekte waren abhängig von der Ausgangszelllinie und Exosomen-Menge. Durch die Inkubation mit der höchsten Menge an Exosomen (40 µg) konnten abhängig von der Invasivität der Ausgangszelllinie signifikant unterschiedliche Expressionslevel in normalen Vorhautfibroblasten detektiert werden. Dies ließe vermuten, dass eine Abhängigkeit von der Invasivität der parentalen Zellen besteht. Betrachtet man jedoch das intrazelluläre Expressionslevel der Ausgangszellen, wiesen RT112-Zellen eine 4,5-fach höhere Expression verglichen zu T24-Zellen auf. Infolge der unterschiedlichen Transfektionseffizienz der Ausgangszellen kann es zu einer minimierten exosomalen Expression kommen, wodurch weniger miRNAs in Exosomen verpackt und demnach vermindert in Zielzellen transportiert werden. Deshalb kann nicht auf eine Abhängigkeit von der Invasivität der parentalen UBC-Zellen geschlossen werden.

Das Expressionslevel von cel-miR-39-3p konnte basierend auf der geringen RNA-Menge (20-40 ng) nicht in Exosomen gemessen werden. Für die RNA-Isolation wurde nicht die gesamte Exosomen-Lösung verwendet, sondern nur 20-30 µl. Das Expressionslevel von cel-miR-39-3p lag außerhalb der Detektionsgrenze.

Die Unterschiede der intrazellulären Expression von miRNA cel-miR-39-3p zwischen RT112 und T24 beruhen nicht auf Einflüssen des Transfektionsversuches. Das verwendete Protokoll ist seit vielen Jahren im Labor etabliert und wurde für diesen Versuch an die gegebenen Bedingungen angepasst und getestet. Die Reproduzierbarkeit wurde mikroskopisch und auf miRNA-Ebene in mind. 3 biologischen Replikaten bestätigt. Diese beiden Methoden sind dafür auch sehr gut geeignet und stellen den Standard dar [298]. Gründe für die Unterschiede können sein, dass 1. nicht jede Zelle transfiziert wurde, 2. dass unterschiedliche Mengen an Mimic aufgenommen worden sind oder 3. die aufgenommene miRNA bereits wieder abgebaut worden ist [298]. Um für den Folgeversuch gleiche intrazelluläre Level zu bekommen, muss die eingesetzte miRNA Mimic-Menge von 50 nM für die Zelllinie T24 weiter erhöht werden.

Für die Zelllinie RT112 konnte eine konzentrationsabhängige Steigerung der miRNA in hTERT-FB belegt werden. Verwendet man TAFs als Zielzellen, konnte für beide Ausgangszelllinien eine Korrelation zwischen der Expression und der Exosomen-Menge beobachtet werden. Die Ergebnisse der TAFs beruhen jedoch auf einem biologischen Ansatz, da der zweite Ansatz aufgrund einer fehlenden Überexpression der cel-miR-39-3p ausgeschlossen wurde. Um statistisch valide Aussagen treffen zu können, müssen diese Versuche wiederholt werden.

Dieses Versuchsmodell wurde im Rahmen dieser Arbeit an 2 UBC-Zelllinien (RT112; T24), sowie 2 Zielzelltypen (hTERT-FB; TAFs) durchgeführt. Dabei ist zu beachten, dass für TAFs noch keine Validierung des ersten Ergebnisses erfolgt ist und noch nachgeholt werden muss. Inwieweit dieser Versuchsaufbau auf andere Ausgangszellen wie weitere UBC-Zelllinien, anderer Tumorzelllinien oder primäre Zellkulturen übertragen werden kann, muss geprüft werden. Genauso ist nicht geklärt, ob auch andere Zielzellen (z. B. Endothelzellen, Epithelzellen, Immunzellen, Tumorzellen) geeignet sind. Durch den Transfer exosomaler miRNAs können tumor-assoziierte Prozesse in Zielzellen induziert werden, wodurch die Tumorprogression und -metastasierung gefördert werden kann [120, 136, 175, 186]. Verhindert man den Transfer durch Inhibierung der Sezernierung oder verändert die Beladung der Exosomen, kann dies zur Hemmung tumorfördernder Prozesse führen [221, 258].

Basierend auf diesem Versuchsaufbau können weitere Versuche durchgeführt werden, die zu einem besseren Verständnis der Tumor-TME-Interaktion führen, wodurch therapeutische Strategien entwickelt werden könnten, die die komplexen Interaktionsprozesse berücksichtigen.

7.4 Funktionelle Bedeutung tumor-assoziiertes Exosomen in der Interaktion zwischen Harnblasenkarzinomzellen und normalen Harnblasenfibroblasten

Nachdem exemplarisch für eine invasive und eine nicht invasive UBC-Zelllinie die Aufnahme von Exosomen und miRNAs demonstriert wurde, sollte im Folgenden der Einfluss auf typische tumorfördernde Prozesse wie Proliferation und Migration in Fibroblasten untersucht werden.

7.4.1 Etablierung der Proliferationsversuche nach Stimulation von normalen Fibroblasten mit tumor-assoziierten Exosomen

Die Etablierung des Versuchsaufbaus zur Messung der Proliferation nach Stimulation mit tumor-assoziierten Exosomen erfolgte unter Verwendung der Zelllinie hTERT-FB.

Tumor-assoziierte Exosomen verschiedener UBC-Zellen induzierten unabhängig von der eingesetzten Exosomen-Konzentration eine signifikante Proliferationssteigerung um durchschnittlich 26 % verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Der verwendete Konzentrationsbereich von 25-100 µg/ml war nicht zu niedrig, wodurch definitiv ein Effekt auf die Proliferation erreicht wurde, schloss jedoch auch sehr hohe Konzentrationen (75 µg/ml; 100 µg/ml) mit ein, die mit hoher Wahrscheinlichkeit außerhalb des physiologischen Bereiches liegen.

Es existieren kontroverse Meinungen über die richtige Kontrolle für funktionelle Analysen. Häufig werden Zellen, die in Exosomen-konditioniertem Medium kultiviert wurden, mit Zellen verglichen, die keinerlei Stimulanz bekommen haben. Inwieweit dies jedoch die richtige Kontrolle darstellt, ist fraglich. Um zu überprüfen, ob zelleigene Exosomen ebenfalls einen Effekt auf die Proliferation haben, wurde die Proliferation von hTERT-FB nach Stimulation mit zelleigenen Exosomen (hTERT-FB) und mit Exosomen sezerniert von einer invasiven (T24) und einer nicht invasiven (RT112) UBC-Zelllinie verglichen zu unbehandelten Zellen untersucht. Zuvor konnten keine konzentrationsabhängigen Einflüsse

auf die Proliferation detektiert werden, weshalb im Folgenden die Konzentrationen der Exosomen auf einen Bereich von 2,5-75 µg/ml minimiert worden sind.

Zelleigene Exosomen stimulieren unabhängig von der Konzentration die Proliferation der hTERT-FB verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Dies zeigt, dass unbehandelte Zellen keine geeignete Kontrolle für die Bestimmung des funktionellen Einflusses tumor-assoziiertes Exosomen sind und andere Kontrollen verwendet werden müssen. Dabei können zelleigene Exosomen verwendet werden oder aber Exosomen sezerniert von normalen Zelllinien, um den tumorspezifischen Einfluss zu untersuchen. Für die folgenden Versuche an normalen Harnblasenfibroblasten wurden Exosomen der Zelllinie HCV29, die aus normalem Harnblasenepithel generiert wurde, als zweite Kontrolle verwendet. Eine weitere Kontrolle würden zelleigene Exosomen darstellen. Diese konnten aber nicht in ausreichender Menge aus normalen primären HBFs isoliert werden.

Für alle Exosomen wurde ein tendenzieller Anstieg der Proliferation in Korrelation zur Exosomen-Konzentration gezeigt. Die Ergebnisse der Etablierung verdeutlichen, dass es notwendig ist, genau abzuwägen, welche Konzentration an Exosomen appliziert wird, da ungeeignete Mengen zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen können. In der Literatur werden unterschiedliche Exosomen-Konzentrationen verwendet [299-301]. Für jede Fragestellung muss daher individuell überprüft werden, welcher Konzentrationsbereich geeignet ist. Die Quantifizierung der eingesetzten Exosomen ist neben der geeigneten Kontrolle ebenfalls sehr kontrovers. In dieser Arbeit wurde dies über die Proteinkonzentration der Exosomen durchgeführt. Dies ist eine weitverbreitete Methode, die aber die Gefahr birgt, dass trotz gleicher Proteinmengen eine unterschiedliche Anzahl an Exosomen vorhanden ist. Exosomen weisen zwar unabhängig von der Ausgangszelle auch evolutionär-konservierte Proteine auf. Daneben beinhalten sie auch spezifische Proteine, die ausgehend von den parentalen Zellen abgegeben werden. Demnach können die Proteinmengen abhängig von der Ausgangszelle oder auch Exosomengröße innerhalb der isolierten Exosomen schwanken.

Häufig wird auch die Partikelanzahl bestimmt durch NTA oder die Kombination aus Proteinmenge und Partikelzahl für die Quantifizierung verwendet. Basierend auf den Ergebnissen der Charakterisierung von Exosomen haben wir uns bewusst gegen die Quantifizierung der Exosomen-Konzentration mittels NTA-bestimmter Partikelanzahl entschieden. Die hohen Standardabweichungen während der Messung führen zu größeren Fehlern in den folgenden Stimulationsversuchen als die Normalisierung basierend auf der Proteinmenge.

7.4.2 Einfluss tumor-assoziiertes Exosomen auf das Proliferationsverhalten normaler Harnblasenfibroblasten

Nach erfolgreicher Etablierung wurde der Einfluss tumor-assoziiertes Exosomen des Harnblasenkarzinoms auf die Proliferation von normalen HBFs zeit- und konzentrationsabhängig analysiert. Die Konzentrationen 5 µg/ml, 12,5 µg/ml und 25 µg/ml wurden daher ausgewählt, da sie sowohl kleine als auch große Konzentrationen abdecken.

Trotz ähnlicher Verdopplungszeit zeigten die normalen HBF wesentlich stärkere Effekte auf die Stimulation mit Exosomen im Vergleich zu hTERT-FB. Folglich musste die Anfangszellzahl stark minimiert werden. Die verminderte Zellzahl reichte dennoch nicht aus, um eine Stimulation über 72 h im 96-Well zu untersuchen, weshalb dieser Zeitpunkt in einer 24-Well Platte durchgeführt wurde.

Normale HBFs wurden aus Harnblasengewebe isoliert, wohingegen hTERT-FBs aus der Vorhaut generiert wurden [191]. Allein der Unterschied im Ursprung könnte dazu führen, dass HBFs tumor-assoziiertes Exosomen aus Harnblasentumoren basierend auf der Ähnlichkeit zum Ausgangsgewebe besser internalisieren und umsetzen als Vorhautfibroblasten. Ein weiterer wichtiger Punkt ist der Unterschied zwischen primären und immortalisierten Fibroblasten. Die verwendeten HBFs sind primäre Zellen, die maximal über 15 Passagen kultiviert werden können und danach in Seneszenz übergehen. Hingegen sind hTERT-FB immortalisierte Zellen, die durch eine stabile Vektor-Transfektion das Enzym hTERT vermehrt exprimieren [302]. Dies kann ebenso wie auch die zelltypbedingten genetischen Unterschiede zu einem unterschiedlichen Ansprechen auf die Stimulation führen.

Normale Harnblasenexosomen stimulieren die Proliferation von HBFs unabhängig von der Zeit und Exosomen-Konzentration. Dies verdeutlicht genauso wie die Ergebnisse von zelleigenen Exosomen, wie wichtig es ist, eine geeignete Kontrolle zu verwenden, da sonst wichtige Einflüsse fehlinterpretiert werden. Für alle Proliferations- und Migrationsversuche wurde daher sowohl die unbehandelten als auch die HBFs stimuliert mit normalen Harnblasenexosomen als Kontrollen verwendet.

Die Proliferation von normalen, primären HBFs wurde unabhängig von der Invasivität der Ausgangszellen, dafür zellspezifisch stimuliert. Es besteht demnach kein Zusammenhang zwischen dem Invasionspotenzial der Ausgangszelle und dem Einfluss auf die Proliferation der Fibroblasten. Viel mehr deuten die Daten daraufhin, dass UBC-Zellen in Abhängigkeit von dem Ausgangszelltyp die Proliferation individuell unterschiedlich stimulieren. Es ist deshalb in diesem Fall nicht sinnvoll, die Zellen anhand ihrer Eigenschaften (Invasivität;

Phänotyp-Charakteristika), wie in der Literatur üblich, zu unterteilen [196]. Gruppieren man die Zelllinien nur nach einem Merkmal, resultiert dies in Fehlinterpretationen.

Die Heterogenität, die zwischen den Zelllinien beobachtet wurde, kann auch auf Patienten übertragen werden. Harnblasentumore, vor allem ihre Subtypen sind zwar genetisch durch spezifische molekulare Marker gekennzeichnet (z. B. FGFR3, Ras, Verlust von Chromosomen), weisen aber in Abhängigkeit vom Patienten unterschiedliche Eigenschaften auf [8, 303-305]. Das Therapieansprechen, die Prognose und die Metastasierung der Harnblasentumore sind sehr heterogen.

Dies spiegelt sich auch in unseren Daten wieder. Die Zelllinie RT112, obwohl sie aus einem gut differenzierten NMIBC-Tumor stammt, induzierte sowohl nach 48 h als auch 72 h Stimulation eine signifikante Erhöhung der Proliferation (18-25 %) von HBFs verglichen zu HBFs stimuliert mit normalen Exosomen. Für andere Zelllinien war dieser Effekt nicht so deutlich erkennbar. Der Einfluss von RT112-Exosomen war auch nach 48 h verglichen zu den anderen tumor-assoziierten Exosomen signifikant. Die Exosomen der Zelllinie 253J-BV hatte zu keinem Zeitpunkt und keiner Konzentration einen Einfluss auf die Proliferation von HBF. Die Exosomen dieser UBC-Zelllinie scheinen demnach keine Rolle für die Proliferation von HBFs zu spielen. Welche molekularen Charakteristika der Ausgangszellen und welche exosomalen Bestandteile für die Unterschiede im Einfluss auf das Proliferationsverhalten verantwortlich sind, konnte im Rahmen der Arbeit nicht geklärt werden.

Für andere Tumorentitäten ist bekannt, dass vorwiegend Moleküle wie miRNAs, Proteine und mRNAs über Exosomen an Fibroblasten übertragen werden, wodurch es zur Differenzierung von normalen Fibroblasten in TAFs oder zur vermehrten Aktivierung von TAFs einhergehend mit einer erhöhten Proliferation kommt [172, 306, 307]. Die Aktivierung von HBFs wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, könnte aber ein Grund für die vermehrte Proliferation von stimulierten HBFs verglichen zur Kontrolle sein. Unterschiedliche Tumore sezernieren exosomal hohe Level an MMPs, TGF- β , VCAM-1, Fibronectin oder Akt, wodurch die Differenzierung in TAFs über den TGF- β -, Akt-, Erk1/2- oder MAPK-c Signalweg induziert werden kann [172, 306, 307]. Durch Sekretion von MMPs (MMP-1; -14; -19) oder Aktivatoren der MMP-Sekretion (Hsp90; -70) kommt es neben der Aktivierung zur Remodellierung der EZM, indem EZM-Bestandteile z. B. Kollagen und Fibronectin degradiert werden [173]. Im Melanom besteht dabei eine Korrelation zur Invasivität des Tumors, welche für das Harnblasenkarzinom nicht nachgewiesen werden konnte [173, 308]. Durch die Zerstörung der EZM können die Migration und Invasion von Tumorzellen aber

auch anderen Zellen (Endothelzellen; Fibroblasten; TAFs) und somit die Metastasierung begünstigt werden.

Die verwendeten UBC-Zelllinien besitzen phänotypische Unterschiede wie die Wuchsform und Invasivität, aber auch molekulare Unterschiede, die maßgeblich für die verschiedenen Effekte verantwortlich sein können [189, 190, 271, 273, 274, 309]. In weiteren Untersuchungen muss geklärt werden, ob die für andere Tumorentitäten bekannten Mechanismen auch beim Harnblasenkarzinom eine Rolle spielen oder andere für die Effekte verantwortlich sind.

Die einzelnen UBC-Zelllinien und ihre Exosomen müssen daher in Abhängigkeit von der Zelllinie genauer charakterisiert werden, um zelltypspezifische Alterationen zu ermitteln und deren Effekte auf die HBFs näher zu analysieren. Neben den Bestandteilen der Exosomen können spezifische Proteine auf der Oberfläche der Exosomen zu einer unterschiedlichen Internalisierung in den Zielzellen führen [142, 310, 311]. Warum die Zelllinie RT112 eine vermehrte Proliferation der Fibroblasten induziert, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

7.4.3 Einfluss tumor-assoziiertes Exosomen auf das Migrationsverhalten normaler Harnblasenfibroblasten

Proliferationsbedingte Verfälschungen der Migrationsergebnisse wurden durch die Verwendung des Proliferationsinhibitors Aphidikulin, ein Hemmstoff der DNA-Replikation, verhindert [312]. Die Konzentration von 7 µg/ml war ausreichend, um die Proliferation von HBFs und RT112-Zellen zu minimieren. Geringere Konzentrationen und die Verwendung des Lösungsmittels DMSO führten zu keiner signifikanten Senkung der Proliferation. Folglich wurde für alle Versuche diese Konzentration verwendet.

Das Migrationsverhalten normaler HBFs nach Stimulation mit Exosomen wurde zunächst mittels des Boyden Chamber Assays untersucht, wodurch eine quantitative und qualitative Bestimmung möglich war [313]. Morphologisch wiesen die Zellen keine Veränderungen nach Stimulation mit Exosomen auf.

Normale Harnblasenexosomen stimulieren zwar die Proliferation von HBFs, zeigen aber keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten verglichen zu unbehandelten Zellen. UBC-Zellen stimulieren die Migration von normalen HBFs. Die Effekte sind zeitunabhängig, aber abhängig von der verwendeten Zelllinie.

Exosomen der Zelllinie RT112 induzierten unabhängig von der Zeit eine signifikante Erhöhung der Migration verglichen zur Kontrolle. RT112-Exosomen müssen entweder

bestimmte biologische Moleküle innerhalb der Exosomen oder Signalmoleküle auf der Zelloberfläche besitzen, die verglichen zu allen anderen UBC-Exosomen maßgeblich Proliferation und Migration beeinflussen. Dies kann auch durch die Bindung an spezifische Rezeptoren der Oberfläche der Zielzelle induziert werden, wodurch intrazelluläre Prozesse ausgelöst werden [140, 146, 162, 314]. Für andere Zelllinien konnte der Effekt auf die Migration nicht bestätigt werden.

Bei einer Gruppierung der UBC-Zelllinien nach ihrer Invasivität konnten zum Teil signifikante Einflüsse auf die Migration von HBFs in Abhängigkeit von der Invasivität detektiert werden. Wie bereits bei den Proliferationsversuchen erläutert, ist es basierend auf der Heterogenität der Ausgangszelllinien nicht ratsam, diese Eingruppierung zu treffen, sondern man sollte eher die zellspezifischen Unterschiede genauer betrachten. Dafür sollten die molekularen Alterationen sowohl intrazellulär als auch exosomal in Abhängigkeit von der jeweiligen Ausgangszelllinie analysiert werden, die für die Induktion der Migration verantwortlich sein können.

Weiterhin muss geklärt werden, ob Fibroblasten aufgrund der exosomalen Stimulation hin zu den Tumorzellen oder weg von den Tumorzellen migrieren. Fibroblasten besitzen in Abhängigkeit des jeweiligen Lokalisationsortes und Stimuli unterschiedliche Aufgaben [71, 73, 78, 84, 85, 133, 315, 316]. Verursachen die Tumorzellen eine Fortbewegung der Fibroblasten, spricht dies dafür, dass innerhalb der Fibroblasten Prozesse induziert werden, durch die eine Extravasation aus dem zellulären Verband ermöglicht wird. Dadurch kann die Ausbreitung außerhalb des Primärtumors begünstigt werden, wodurch es zur Förderung der Metastasierung kommen kann.

Migrieren Fibroblasten zum Tumor hin, könnte dies darauf hindeuten, dass der Tumor die Fibroblasten für andere Prozesse wie der Remodellierung der EZM durch Sezernierung von MMPs, der Aktivierung von normalen zu TAFs oder aber zum Schutz vor Chemotherapeutika in seiner direkten Umgebung benötigt [82, 171, 317-319].

Die Richtung der Migration kann z. B. durch Ko-Kulturversuche von Fibroblasten und UBC-Zellen untersucht werden. Neuere Systeme basierend auf Mikrofluid-Chips ermöglichen auch die Echtzeitanalyse der Migration von separierten Zellen, wodurch dies getestet werden kann [320, 321]. Neben dem Einfluss auf Proliferation und Migration könnten tumor-assoziierte Exosomen des Harnblasenkarzinoms auch andere Eigenschaften wie Invasion, Sekretom, Aktivierung von normalen HBFs beeinflussen, die hier nicht näher untersucht wurden.

Die Studie von Enkelmann et al. konnte entgegen den hier ermittelten Daten bereits belegen, dass invasive UBC-Zellen die Migration von normalen Fibroblasten steigern. Diese Daten wurden basierend auf Ko-Kulturversuchen von einer invasiven Zelllinie ermittelt und beruhen nicht auf der Stimulation mit reinen Exosomen [322]. Durch die Kultivierung von Fibroblasten und invasiven UBC-Zellen in Ko-Kultur kam es zu einer Veränderung des miRNA- und Proteinprofils, was eventuell im Zusammenhang mit der Erhöhung der Migration steht [322]. Welche Moleküle Tumorzellen genau dafür sezernieren, ist nicht geklärt. Nicht nur die Migration von HBFs kann durch tumor-assoziierte Exosomen des invasiven Harnblasenkarzinoms beeinflusst werden, sondern auch die Migration von Endothelzellen und normalen Urothelzellen [185, 186]. Endothelzellen weisen eine erhöhte Migration verglichen zu unbehandelten Zellen auf, nachdem sie mit Exosomen sezerniert von invasiven UBC-Zelllinien oder Urinexosomen von *high grade* Patienten stimuliert worden sind. Das Protein EDIL3 (*EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3*) und die dadurch herbeigeführte Aktivierung des EGF-Rezeptors sollen dafür verantwortlich sein. Ob dieser Effekt bei Verwendung von Exosomen normaler Blasen Zellen als Kontrolle bestehen bleibt, muss geprüft werden, um den tumorabhängigen Einfluss zu bestätigen.

Nicht nur exosomale Proteine können die TME des Harnblasenkarzinoms beeinflussen, auch miRNAs. Durch die exosomale Sezernierung der tumorsuppressiven miR-23b von metastasierenden UBC-Zellen, wurde im Mausmodell eine verstärkte Angiogenese sowie vermehrte Kolonisation von Metastasen in das Lungengewebe beobachtet. Inhibiert man das miRNA-Targets Rab27A/B, einen wichtigen Regulator der exosomalen Sekretion, wird dieser Prozess entscheidend beeinflusst [57].

Invasive Harnblasenkarzinomzellen beeinflussen zusätzlich normale Urothelzellen, wodurch verschiedene EMT-assoziierte Moleküle (α -SMA, E-Cadherin, β -Catenin) dereguliert werden und es zu einer Erhöhung der Migration und Invasion der Epithelzellen kommt [186]. Dadurch kann es zur malignen Transformation von normalen Epithelzellen kommen, wodurch die Tumorprogression und -metastasierung begünstigt werden kann. Diese kann auch durch die autokrine Wirkung von Exosomen sezerniert von invasiven UBC-Zellen gefördert werden, indem sie die Migration und Invasion steigern [185].

Die in diesem Zusammenhang erläuterten Studien sind die einzigen veröffentlichten, die den Einfluss von tumor-assoziierten Exosomen des Harnblasenkarzinoms auf Zellen der TME untersuchen. Weitere Analysen sind notwendig, um die genauen Mechanismen der Interaktion

von Harnblasenkarzinomen und normalen HBFs und die darin involvierten Moleküle zu verstehen.

Dabei ist zu beachten, dass Tumore nicht nur aus 2 verschiedenen Zelltypen (Fibroblasten; Tumorzellen) bestehen, sondern ein komplexes Gebilde aus unterschiedlichen, miteinander interagierenden Zellen ist. Jeder dieser Zelltypen ist maßgeblich an der Generierung eines tumorfördernden Mikromilieus beteiligt und leistet unterschiedliche Beiträge, wodurch die Tumorgenese, -progression und Metastasierung maßgeblich beeinflusst wird. Daher muss in weiteren Analysen nicht nur die Interaktion zwischen HBFs und Harnblasenkarzinomen betrachtet werden, sondern auch andere Zelltypen (z. B. Endothelzellen; Immunzellen; normale Urothelzellen). Ein möglicher Ansatz sind Ko-Kulturversuche, die eine gemeinsame Kultivierung unterschiedlicher Zellen ermöglichen.

Der Boyden Chamber Assay ist ein Endpunktassay und ermöglicht deshalb nur die Analyse nach bestimmten Zeitpunkten. Dabei kann keine Untersuchung der Zellmigration in Echtzeit erfolgen, was dazu führen kann, dass Effekte, die nach anderen Zeitpunkten erreicht werden, nicht detektiert werden können. Um die Migration in Echtzeit zu beobachten und auch die Daten des Boyden Chamber Assays zu verifizieren, wurde die Migration unter Verwendung des xCELLigence RTCA-Systems durchgeführt [323]. Dieses System erlaubt die Echtzeitmessung der Migration durch Messung der Adhärenz-bedingten Impedanzänderung über die Zeit.

Anhand der Ergebnisse des Boyden Chamber Assay wurde geschlussfolgert, dass UBC-Exosomen in Abhängigkeit vom Zelltyp eine Steigerung der Migration induzieren. Dies konnte unter Verwendung des RTCA-Systems nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse des RTCAs suggerieren, dass die Stimulation mit unterschiedlichen UBC-Exosomen einen zeitunabhängigen zelltypspezifischen Einfluss auf die Migration von HBFs hat, diese aber vorwiegend zur Minimierung der Migration verglichen zur Kontrolle führt. Diese Ergebnisse sind komplett gegensätzlich zu den zuvor gezeigten.

Basierend auf den Daten ist davon auszugehen, dass das RTCA-System keine geeignete Methode darstellt, um die Migration von Exosomen-stimulierten HBFs zu untersuchen. Die mikroskopische Kontrolle kann bei diesem System nicht durchgeführt werden, weshalb davon auszugehen ist, dass im RTCA Einflussfaktoren vorliegen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft werden konnten.

Im Boyden Chamber Assay ist es jeder Zeit möglich, das Zellwachstum innerhalb des Inserts zu bewerten, wodurch überprüft werden kann, ob die Zellen in Apoptose übergehen, sich ablösen oder Kontaminationen auftreten. Im RTCA ist diese mikroskopische Kontrolle nicht möglich. Zellen können nach der Exosomen-Stimulation ihr Verhalten hinsichtlich Adhärenz und Morphologie ändern [324, 325]. Das RTCA-System beruht sowohl für die Proliferation als auch die Migrationsmessung auf der indirekten Bestimmung dieser Funktionen über die Messung der Impedanz. Die Impedanz ist der Widerstand, der sich proportional zur bewachsenen Fläche des Wells (Goldelektrode) ändert und dann in einen CI umgerechnet wird. Der CI-Wert ist deshalb nicht proportional zur Zellzahl. Verändert sich nun die Adhärenz der Zellen nach Stimulation, kann dies dazu führen, dass HBFs entweder mehr oder weniger an der Elektrode haften. Folglich können andere Werte verglichen zur Kontrolle detektiert werden, die nicht zwingend mit der eigentlichen Zellzahl auf der Elektrode übereinstimmen. Dies tritt beim Boyden Chamber nicht auf, da Zellen, egal wie fest sie auf der Oberfläche adhären, gefärbt und quantitativ mittels Photometer bestimmt werden. Weiterhin könnte durch die mikroskopische Kontrolle des Kulturmediums im unteren Well, schnell überprüft werden, ob sich migrierte Zellen von dem Boden des Inserts abgelöst haben. Es konnten in keinem einzigen Ansatz abgelöste Zellen im unteren Well gefunden werden. Zur Überprüfung, ob die Unterschiede zwischen Ergebnissen des RTCAs und dem Boyden Chamber auf der Adhärenz-bedingten Fehlmessung im RTCA beruhen, muss zunächst die Wachstumskurve der Zellen vor und nach Behandlung untersucht werden, um das Zellverhalten in dem Messsystem zu untersuchen und die geeignete Zellzahl für den Assay zu definieren. Bislang wurden standardmäßig 1×10^4 HBF pro Well im RTCA eingesät. Diese Zellzahl ist für Proliferationsversuche viel zu hoch, jedoch für Migrationsversuche in dem System normalerweise ideal. Inwieweit dies auch für unbehandelte und stimulierte HBFs zu trifft, wurde nicht untersucht.

Im zweiten Schritt sollte die Untersuchung des Proliferationsverhaltens nach exosomaler Stimulation ebenfalls in diesem System durchgeführt werden. Dadurch können nicht nur die Unterschiede im Proliferationsverhalten, sondern auch bei der Adhärenz bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde dies nicht durchgeführt. Es wurde ein Proliferationsassay (BrdU-Assay) verwendet, der es ermöglicht, durch Einbau des Bromdesoxyuridin in die DNA nur proliferierende Zellen zu detektieren [326]. Bei der RTCA-Methode wird die Proliferation wie auch bei der Migration nur durch Berechnung des CI-Wertes anhand der bewachsenen Oberfläche bestimmt. Sind aber Zellen vorhanden, die sich bereits in Seneszenz befinden und

nicht weiter proliferieren, würde deren Einfluss auf den CI-Wert weiterhin mit untersucht werden. Es würde nicht wie bei dem BrdU-Assay die tatsächliche Proliferationsrate analysiert werden.

Die intra-experimentellen Schwankungen waren, obwohl gleiche Zellzahlen (Vorverdünnung) und Ausgangsbedingungen (Trypsinierungszeit; Zentrifugationszeit) verwendet worden sind, relativ hoch verglichen zum Boyden Chamber. Diese Problematik ist bereits bekannt und deutet daraufhin, dass nicht immer die Ergebnisse von Endpunktassays mit Echtzeitsystemen vergleichbar sind [323]. Um wirklich sicherzustellen, dass die hier ermittelten Daten des RTCA nicht adäquat sind, müssen alle genannten Vorversuche sowie Optimierungsvorschläge überprüft werden. Für den Boyden Chamber Assay wurden wesentliche Einflussfaktoren ausgeschlossen, weshalb die mit diesem Assay ermittelten Werte den tatsächlichen Einflüssen entsprechen sollten.

Unabhängig von der verwendeten Analyse (Proliferation, Migration) ist zu vermerken, dass die Ergebnisse zwischen den biologischen Ansätzen zum Teil sehr stark schwanken. Dies könnte für ein methodisches Problem sprechen, was durch weitere Optimierungsschritte verbessert werden kann. Der Versuchsaufbau sowohl für die Migration als auch Proliferation ist sehr komplex und kann daher sehr leicht beeinflusst werden.

Bereits vor der Aufreinigung der Exosomen kann es zu Konfluenz-assoziierten Einflüssen auf die Qualität der Exosomen kommen. Die Ausgangszellen dürfen nie eine 100 %ige Konfluenz aufweisen. Dadurch kann Stress induziert werden, wodurch andere Inhaltsstoffe an Exosomen abgegeben werden, die andere Effekte induzieren können [167, 327, 328]. Entfernt man das Zellkulturmedium nicht restlos, können Reste zur Verschiebung der Proteinkonzentration führen, wodurch falsche Exosomen-Konzentrationen eingesetzt werden und es zu unterschiedlichen Effekten kommen kann.

Ein wesentlicher Punkt ist die Behandlung bzw. der Umgang mit den Zielzellen. Im Versuchsablauf existiert zwischen Proliferations- und Migrationsassay ein wesentlicher Unterschied. Die Zellen werden für die Proliferation eingesät und nach Einsaat gleich stimuliert. Die Messung erfolgt dann ohne nochmaliges Überführen in einen anderen Assay 24-72 h nach Stimulationsbeginn. Hingegen werden Zellen für die Migrationsbestimmung erst im 6-Well stimuliert, nach 48-72 h abgelöst und in den Migrationsassay überführt.

7.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erfolgreich die Isolation von tumor-assoziierten Exosomen des Harnblasenkarzinoms mit Hilfe der UC und der Kit-basierten Präzipitation durchgeführt werden. Die isolierten Exosomen waren frei von zellulären Kontaminationen und weisen typische exosomale Marker auf. UBC-Exosomen besitzen eine typische runde, vesikuläre Struktur mit einer Größe zwischen 30 bis 150 nm.

Erstmals konnte gezeigt werden, dass sich UBC-Zelllinien sowohl intra- als auch extrazellulär anhand ihres miRNA-Expressionsmusters in Abhängigkeit von der Invasivität der Ausgangszelllinien unterscheiden lassen. Diese invasions-assoziierten miRNA-Signaturen entsprechen zum Teil denen der Patienten-abgeleiteten Tumorproben. Deshalb können die Zellkultursysteme als Modell für funktionelle Analysen genutzt werden. Ausgewählte miRNAs könnten sich auch als potentielle diagnostische Biomarker sowohl für Gewebeproben als auch für *liquid biopsies* eignen.

Basierend auf diesen Erkenntnissen sollen weitere Studien an größeren Patientenkohorten durchgeführt werden, die zum einen zur Identifizierung von neuen diagnostischen sowie prognostischen Biomarkern des Harnblasenkarzinoms und zum anderen zur Analyse der funktionelle Bedeutung beitragen können. Dabei sollen vor allem gepaarte Tumorgewebeproben und Körperflüssigkeiten verwendet werden, da dadurch eine Korrelation zwischen intrazellulärer und extrazellulärer Expression gezogen werden kann.

Tumor-assoziierte Exosomen des Harnblasenkarzinoms haben eine wichtige funktionelle Bedeutung in der Tumorgenese und -progression des Harnblasenkarzinoms, indem sie wichtige Regulatoren in der Tumor-TME-Interaktion sind. Zunächst konnte gezeigt werden, dass tumor-assoziierte Exosomen und ihre miRNA von normalen und tumor-assoziierten Fibroblasten internalisiert werden. Dabei hatten sie unabhängig von der Invasivität, aber abhängig von dem Ausgangszelltyp einen Einfluss auf die Proliferation und Migration von normalen, primären HBFs. Harnblasenkarzinome fördern somit die Induktion von tumor-assoziierten Prozessen in normalen HBFs, wodurch die Tumorprogression und -metastasierung begünstigt werden kann. Inwieweit dabei die differentiell exprimierten miRNAs eine Rolle spielen oder welche genauen Mechanismen dafür verantwortlich sind, muss in weiterführenden Studien näher untersucht werden.

Darüber hinaus sollte analysiert werden, welchen Einfluss tumor-assoziierte Exosomen auf andere Prozesse, wie die Aktivierung von Fibroblasten, die Invasivität oder ihr Sekretom besitzen und welche Signalwege dabei eine kritische Rolle spielen. In diesem Zusammenhang

sollten auch andere Zielzellen (z. B. Endothelzellen; Immunzellen; Urothelzellen) in die Analysen einbezogen werden, da der Tumor ein komplexes Gebilde aus unterschiedlichen Zellen darstellt.

Das vertiefte Wissen über die molekularen Signalwege des MIBC sowohl intrazellulär als auch exosomal führt zu einem besseren Verständnis der Entwicklung, Progression und Metastasierung des Harnblasenkarzinoms. Dies wird zu einer individuellen Prognosebewertung und Therapiestrategie sowie zur Entwicklung neuer zielgerichteter Medikamente beitragen.

8 Literaturverzeichnis

1. International, W.C.R.F., Bladder cancer statistics. World Cancer Research Fund International 2015: p. <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/bladder-cancer-statistics>.
2. Robert-Koch-Institut, G.d.e.K.i.D.e.V., Krebs in Deutschland 2011/2012. 2015. http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2015/krebs_in_deutschland_2015.html?nn=2640382.
3. Freedman, N.D., Silverman, D.T., Hollenbeck, A.R., Schatzkin, A. and Abnet, C.C., Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA*, 2011. 306(7): p. 737-45.
4. Burger, M., Catto, J.W., Dalbagni, G., Grossman, H.B., Herr, H., Karakiewicz, P., Kassouf, W., Kiemeny, L.A., La Vecchia, C., Shariat, S. and Lotan, Y., Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol*, 2013. 63(2): p. 234-41.
5. Karl, A., Zaak, D., Tilki, D., Hungerhuber, E., Staehler, M., Denzinger, S., Stanislaus, P., Tritschler, S., Strittmatter, F., Stief, C. and Burger, M., [Diagnosis of urothelial carcinoma]. *Urologe A*, 2008. 47(3): p. 357-67.
6. Humphrey, P.A., Moch, H., Cubilla, A.L., Ulbright, T.M. and Reuter, V.E., The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol*, 2016. 70(1): p. 106-19.
7. Colombel, M., Soloway, M., Akaza, H., Bohle, A., Palou, J., Buckley, R., Lamm, D., Brausi, M., Witjes, J.A. and Persad, R., Epidemiology, Staging, Grading, and Risk Stratification of Bladder Cancer. *European Urology Supplements*, 2008. 7(10): p. 618-626.
8. Knowles, M.A. and Hurst, C.D., Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer*, 2015. 15(1): p. 25-41.
9. Babjuk, M., Bohle, A., Burger, M., Capoun, O., Cohen, D., Comperat, E.M., Hernandez, V., Kaasinen, E., Palou, J., Roupret, M., van Rhijn, B.W., Shariat, S.F., Soukup, V., et al., EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur Urol*, 2017. 71(3): p. 447-461.
10. ACS, A.C.S., <https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>. 2017.
11. Sharma, S., Ksheersagar, P. and Sharma, P., Diagnosis and treatment of bladder cancer. *Am Fam Physician*, 2009. 80(7): p. 717-23.
12. Cheung, G., Sahai, A., Billia, M., Dasgupta, P. and Khan, M.S., Recent advances in the diagnosis and treatment of bladder cancer. *BMC Med*, 2013. 11: p. 13.

13. Alfred Witjes, J., Lebet, T., Comperat, E.M., Cowan, N.C., De Santis, M., Bruins, H.M., Hernandez, V., Espinos, E.L., Dunn, J., Rouanne, M., Neuzillet, Y., Veskimae, E., van der Heijden, A.G., et al., Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. *Eur Urol*, 2017. 71(3): p. 462-475.
14. Leissner, J., Ghoneim, M.A., Abol-Enein, H., Thuroff, J.W., Franzaring, L., Fisch, M., Schulze, H., Managadze, G., Allhoff, E.P., el-Baz, M.A., Kastendieck, H., Buhtz, P., Kropf, S., et al., Extended radical lymphadenectomy in patients with urothelial bladder cancer: results of a prospective multicenter study. *J Urol*, 2004. 171(1): p. 139-44.
15. Stein, J.P., Lieskovsky, G., Cote, R., Groshen, S., Feng, A.C., Boyd, S., Skinner, E., Bochner, B., Thangathurai, D., Mikhail, M., Raghavan, D. and Skinner, D.G., Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J Clin Oncol*, 2001. 19(3): p. 666-75.
16. Knowles, M.A., Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese? *Carcinogenesis*, 2006. 27(3): p. 361-73.
17. Jakse, G., Stöckle, M., Lehmann, J., Otto, T., Krege, S. and Rübber, H., Metastasiertes Harnblasenkarzinom. *Dtsch Arztebl International*, 2007. 1024-104 15.
18. von der Maase, H., Hansen, S.W., Roberts, J.T., Dogliotti, L., Oliver, T., Moore, M.J., Bodrogi, I., Albers, P., Knuth, A., Lippert, C.M., Kerbrat, P., Sanchez Rovira, P., Wersall, P., et al., Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *J Clin Oncol*, 2000. 18(17): p. 3068-77.
19. van Rhijn, B.W., Lurkin, I., Radvanyi, F., Kirkels, W.J., van der Kwast, T.H. and Zwarthoff, E.C., The fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutation is a strong indicator of superficial bladder cancer with low recurrence rate. *Cancer Res*, 2001. 61(4): p. 1265-8.
20. Billerey, C., Chopin, D., Aubriot-Lorton, M.H., Ricol, D., Gil Diez de Medina, S., Van Rhijn, B., Bralet, M.P., Lefrere-Belda, M.A., Lahaye, J.B., Abbou, C.C., Bonaventure, J., Zafrani, E.S., van der Kwast, T., et al., Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol*, 2001. 158(6): p. 1955-9.
21. Kompier, L.C., Lurkin, I., van der Aa, M.N., van Rhijn, B.W., van der Kwast, T.H. and Zwarthoff, E.C., FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy. *PLoS One*, 2010. 5(11): p. e13821.
22. Goebell, P.J. and Knowles, M.A., Bladder cancer or bladder cancers? Genetically distinct malignant conditions of the urothelium. *Urol Oncol*, 2010. 28(4): p. 409-28.
23. Jebar, A.H., Hurst, C.D., Tomlinson, D.C., Johnston, C., Taylor, C.F. and Knowles, M.A., FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene*, 2005. 24(33): p. 5218-25.

24. Mitra, A.P. and Cote, R.J., Molecular pathogenesis and diagnostics of bladder cancer. *Annu Rev Pathol*, 2009. 4: p. 251-85.
25. Cordon-Cardo, C., Wartinger, D., Petrylak, D., Dalbagni, G., Fair, W.R., Fuks, Z. and Reuter, V.E., Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1992. 84(16): p. 1251-6.
26. Amaral, J.D., Xavier, J.M., Steer, C.J. and Rodrigues, C.M., The role of p53 in apoptosis. *Discov Med*, 2010. 9(45): p. 145-52.
27. Pietsch, E.C., Sykes, S.M., McMahon, S.B. and Murphy, M.E., The p53 family and programmed cell death. *Oncogene*, 2008. 27(50): p. 6507-21.
28. Sarkar, S., Julicher, K.P., Burger, M.S., Della Valle, V., Larsen, C.J., Yeager, T.R., Grossman, T.B., Nickells, R.W., Protzel, C., Jarrard, D.F. and Reznikoff, C.A., Different combinations of genetic/epigenetic alterations inactivate the p53 and pRb pathways in invasive human bladder cancers. *Cancer Res*, 2000. 60(14): p. 3862-71.
29. Damrauer, J.S., Hoadley, K.A., Chism, D.D., Fan, C., Tiganelli, C.J., Wobker, S.E., Yeh, J.J., Milowsky, M.I., Iyer, G., Parker, J.S. and Kim, W.Y., Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. 111(8): p. 3110-5.
30. Choi, W., Porten, S., Kim, S., Willis, D., Plimack, E.R., Hoffman-Censits, J., Roth, B., Cheng, T., Tran, M., Lee, I.L., Melquist, J., Bondaruk, J., Majewski, T., et al., Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell*, 2014. 25(2): p. 152-65.
31. Biton, A., Bernard-Pierrot, I., Lou, Y., Krucker, C., Chapeaublanc, E., Rubio-Perez, C., Lopez-Bigas, N., Kamoun, A., Neuzillet, Y., Gestraud, P., Grieco, L., Rebouissou, S., de Reynies, A., et al., Independent component analysis uncovers the landscape of the bladder tumor transcriptome and reveals insights into luminal and basal subtypes. *Cell Rep*, 2014. 9(4): p. 1235-45.
32. Neuhausen, A., Florl, A.R., Grimm, M.O. and Schulz, W.A., DNA methylation alterations in urothelial carcinoma. *Cancer Biol Ther*, 2006. 5(8): p. 993-1001.
33. Vallot, C., Stransky, N., Bernard-Pierrot, I., Herault, A., Zucman-Rossi, J., Chapeaublanc, E., Vordos, D., Laplanche, A., Benhamou, S., Leuret, T., Southgate, J., Allory, Y. and Radvanyi, F., A novel epigenetic phenotype associated with the most aggressive pathway of bladder tumor progression. *J Natl Cancer Inst*, 2011. 103(1): p. 47-60.
34. Garzon, R., Calin, G.A. and Croce, C.M., MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med*, 2009. 60: p. 167-79.
35. Jones, P.A. and Baylin, S.B., The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, 2002. 3(6): p. 415-28.

36. Feinberg, A.P., Ohlsson, R. and Henikoff, S., The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet*, 2006. 7(1): p. 21-33.
37. Baylin, S.B. and Ohm, J.E., Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(2): p. 107-16.
38. Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V., The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993. 75(5): p. 843-54.
39. miRBase, miRBase. <http://www.mirbase.org/ftp.shtml>, 2016.
40. Kusenda, B., Mraz, M., Mayer, J. and Pospisilova, S., MicroRNA biogenesis, functionality and cancer relevance. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2006. 150(2): p. 205-15.
41. Bartel, D.P., MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004. 116(2): p. 281-97.
42. Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H. and Kim, V.N., MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, 2004. 23(20): p. 4051-60.
43. Cai, X., Hagedorn, C.H. and Cullen, B.R., Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 2004. 10(12): p. 1957-66.
44. Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H. and Kim, V.N., The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*, 2004. 18(24): p. 3016-27.
45. Gregory, R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N. and Shiekhattar, R., The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 2004. 432(7014): p. 235-40.
46. Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E. and Kutay, U., Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 2004. 303(5654): p. 95-8.
47. Bohnsack, M.T., Czaplinski, K. and Gorlich, D., Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna-a Publication of the Rna Society*, 2004. 10(2): p. 185-191.
48. Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G. and Tuschl, T., Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, 2004. 15(2): p. 185-97.
49. Lin, S. and Gregory, R.I., MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2015. 15(6): p. 321-33.

50. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I. and Diederichs, S., Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*, 2009. 11(3): p. 228-34.
51. Iorio, M.V. and Croce, C.M., microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis*, 2012. 33(6): p. 1126-33.
52. Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J.R., Jacks, T., Horvitz, H.R., et al., MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 2005. 435(7043): p. 834-8.
53. Esquela-Kerscher, A. and Slack, F.J., Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(4): p. 259-69.
54. Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M. and Croce, C.M., Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(9): p. 2999-3004.
55. Wiklund, E.D., Bramsen, J.B., Hulf, T., Dyrskjot, L., Ramanathan, R., Hansen, T.B., Villadsen, S.B., Gao, S., Ostensfeld, M.S., Borre, M., Peter, M.E., Orntoft, T.F., Kjems, J., et al., Coordinated epigenetic repression of the miR-200 family and miR-205 in invasive bladder cancer. *Int J Cancer*, 2011. 128(6): p. 1327-34.
56. Adam, L., Zhong, M., Choi, W., Qi, W., Nicoloso, M., Arora, A., Calin, G., Wang, H., Siefker-Radtke, A., McConkey, D., Bar-Eli, M. and Dinney, C., miR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and reverses resistance to epidermal growth factor receptor therapy. *Clin Cancer Res*, 2009. 15(16): p. 5060-72.
57. Gregory, P.A., Bert, A.G., Paterson, E.L., Barry, S.C., Tsykin, A., Farshid, G., Vadas, M.A., Khew-Goodall, Y. and Goodall, G.J., The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol*, 2008. 10(5): p. 593-601.
58. Korpala, M., Lee, E.S., Hu, G. and Kang, Y., The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem*, 2008. 283(22): p. 14910-4.
59. Dip, N., Reis, S.T., Timoszczuk, L.S., Viana, N.I., Piantino, C.B., Morais, D.R., Moura, C.M., Abe, D.K., Silva, I.A., Srougi, M., Dall'Oglio, M.F. and Leite, K.R., Stage, grade and behavior of bladder urothelial carcinoma defined by the microRNA expression profile. *J Urol*, 2012. 188(5): p. 1951-6.
60. Ratert, N., Meyer, H.A., Jung, M., Lioudmer, P., Mollenkopf, H.J., Wagner, I., Miller, K., Kilic, E., Erbersdobler, A., Weikert, S. and Jung, K., miRNA profiling identifies candidate mirnas for bladder cancer diagnosis and clinical outcome. *J Mol Diagn*, 2013. 15(5): p. 695-705.

61. Nordentoft, I., Birkenkamp-Demtroder, K., Agerbaek, M., Theodorescu, D., Ostendorf, M.S., Hartmann, A., Borre, M., Orntoft, T.F. and Dyrskjot, L., miRNAs associated with chemo-sensitivity in cell lines and in advanced bladder cancer. *BMC Med Genomics*, 2012. 5: p. 40.
62. Xu, Z., Yu, Y.Q., Ge, Y.Z., Zhu, J.G., Zhu, M., Zhao, Y.C., Xu, L.W., Yang, X.B., Geng, L.G., Dou, Q.L. and Jia, R.P., MicroRNA expression profiles in muscle-invasive bladder cancer: identification of a four-microRNA signature associated with patient survival. *Tumour Biol*, 2015. 36(10): p. 8159-66.
63. Zhou, H., Tang, K., Xiao, H., Zeng, J., Guan, W., Guo, X., Xu, H. and Ye, Z., A panel of eight-miRNA signature as a potential biomarker for predicting survival in bladder cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015. 34(1): p. 53.
64. Ochoa, A.E., Choi, W., Su, X., Siefker-Radtke, A., Czerniak, B., Dinney, C. and McConkey, D.J., Specific micro-RNA expression patterns distinguish the basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Oncotarget*, 2016. 7(49): p. 80164-80174.
65. Catto, J.W., Miah, S., Owen, H.C., Bryant, H., Myers, K., Dudzic, E., Larre, S., Milo, M., Rehman, I., Rosario, D.J., Di Martino, E., Knowles, M.A., Meuth, M., et al., Distinct microRNA alterations characterize high- and low-grade bladder cancer. *Cancer Res*, 2009. 69(21): p. 8472-81.
66. Bakkar, A.A., Wallerand, H., Radvanyi, F., Lahaye, J.B., Pissard, S., Lecerf, L., Kouyoumdjian, J.C., Abbou, C.C., Pairen, J.C., Jaurand, M.C., Thiery, J.P., Chopin, D.K. and de Medina, S.G., FGFR3 and TP53 gene mutations define two distinct pathways in urothelial cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res*, 2003. 63(23): p. 8108-12.
67. Cunha, G.R., Hayward, S.W. and Wang, Y.Z., Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation*, 2002. 70(9-10): p. 473-85.
68. Beacham, D.A. and Cukierman, E., Stromagenesis: the changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression. *Semin Cancer Biol*, 2005. 15(5): p. 329-41.
69. Shimoda, M., Mellody, K.T. and Orimo, A., Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Semin Cell Dev Biol*, 2010. 21(1): p. 19-25.
70. Stetler-Stevenson, W.G. and Yu, A.E., Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *Semin Cancer Biol*, 2001. 11(2): p. 143-52.
71. Kalluri, R. and Zeisberg, M., Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(5): p. 392-401.
72. Franco, O.E., Shaw, A.K., Strand, D.W. and Hayward, S.W., Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 2010. 21(1): p. 33-9.

73. Micke, P. and Ostman, A., Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer*, 2004. 45 Suppl 2: p. S163-75.
74. Olumi, A.F., Grossfeld, G.D., Hayward, S.W., Carroll, P.R., Tlsty, T.D. and Cunha, G.R., Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res*, 1999. 59(19): p. 5002-11.
75. Dvorak, H.F., Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*, 1986. 315(26): p. 1650-9.
76. Albini, A. and Sporn, M.B., The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer*, 2007. 7(2): p. 139-47.
77. Radisky, E.S. and Radisky, D.C., Stromal induction of breast cancer: inflammation and invasion. *Rev Endocr Metab Disord*, 2007. 8(3): p. 279-87.
78. Vong, S. and Kalluri, R., The role of stromal myofibroblast and extracellular matrix in tumor angiogenesis. *Genes Cancer*, 2011. 2(12): p. 1139-45.
79. Brocke, C. and Kunz, H., Synthesis of tumor-associated glycopeptide antigens. *Bioorg Med Chem*, 2002. 10(10): p. 3085-112.
80. Kunz-Schughart, L.A. and Knuechel, R., Tumor-associated fibroblasts (part I): Active stromal participants in tumor development and progression? *Histol Histopathol*, 2002. 17(2): p. 599-621.
81. Kunz-Schughart, L.A. and Knuechel, R., Tumor-associated fibroblasts (part II): Functional impact on tumor tissue. *Histol Histopathol*, 2002. 17(2): p. 623-37.
82. Zeisberg, E.M., Potenta, S., Xie, L., Zeisberg, M. and Kalluri, R., Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res*, 2007. 67(21): p. 10123-8.
83. Radisky, D.C., Kenny, P.A. and Bissell, M.J., Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT? *J Cell Biochem*, 2007. 101(4): p. 830-9.
84. Gonda, T.A., Varro, A., Wang, T.C. and Tycko, B., Molecular biology of cancer-associated fibroblasts: can these cells be targeted in anti-cancer therapy? *Semin Cell Dev Biol*, 2010. 21(1): p. 2-10.
85. Kharraishvili, G., Simkova, D., Bouchalova, K., Gachechiladze, M., Narsia, N. and Bouchal, J., The role of cancer-associated fibroblasts, solid stress and other microenvironmental factors in tumor progression and therapy resistance. *Cancer Cell Int*, 2014. 14: p. 41.
86. Keller, S., Sanderson, M.P., Stoeck, A. and Altevogt, P., Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett*, 2006. 107(2): p. 102-8.
87. Chargaff, E. and West, R., The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem*, 1946. 166(1): p. 189-97.

88. Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972. 26(4): p. 239-57.
89. Junker, K., Heinzelmann, J., Beckham, C., Ochiya, T. and Jenster, G., Extracellular Vesicles and Their Role in Urologic Malignancies. *Eur Urol*, 2016. 70(2): p. 323-31.
90. 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: p. 255-89.
91. Thery, C., Zitvogel, L. and Amigorena, S., Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*, 2002. 2(8): p. 569-79.
92. Gruenberg, J. and Stenmark, H., The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. 5(4): p. 317-23.
93. Mellman, I., Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1996. 12: p. 575-625.
94. Fevrier, B. and Raposo, G., Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol*, 2004. 16(4): p. 415-21.
95. Sotelo, J.R. and Porter, K.R., An electron microscope study of the rat ovum. *J Biophys Biochem Cytol*, 1959. 5(2): p. 327-42.
96. Baietti, M.F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P. and David, G., Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol*, 2012. 14(7): p. 677-85.
97. Andreu, Z. and Yanez-Mo, M., Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol*, 2014. 5: p. 442.
98. Bache, K.G., Raiborg, C., Mehlum, A. and Stenmark, H., STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes. *J Biol Chem*, 2003. 278(14): p. 12513-21.
99. Lu, Q., Hope, L.W., Brasch, M., Reinhard, C. and Cohen, S.N., TSG101 interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(13): p. 7626-31.
100. Bache, K.G., Brech, A., Mehlum, A. and Stenmark, H., Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J Cell Biol*, 2003. 162(3): p. 435-42.
101. Bishop, N. and Woodman, P., TSG101/mammalian VPS23 and mammalian VPS28 interact directly and are recruited to VPS4-induced endosomes. *J Biol Chem*, 2001. 276(15): p. 11735-42.

102. Babst, M., Katzmann, D.J., Snyder, W.B., Wendland, B. and Emr, S.D., Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell*, 2002. 3(2): p. 283-9.
103. Teo, H., Perisic, O., Gonzalez, B. and Williams, R.L., ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes. *Dev Cell*, 2004. 7(4): p. 559-69.
104. Swaminathan, S., Amerik, A.Y. and Hochstrasser, M., The Doa4 deubiquitinating enzyme is required for ubiquitin homeostasis in yeast. *Mol Biol Cell*, 1999. 10(8): p. 2583-94.
105. Babst, M., Katzmann, D.J., Estepa-Sabal, E.J., Meerloo, T. and Emr, S.D., Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell*, 2002. 3(2): p. 271-82.
106. Fujita, H., Umezuki, Y., Imamura, K., Ishikawa, D., Uchimura, S., Nara, A., Yoshimori, T., Hayashizaki, Y., Kawai, J., Ishidoh, K., Tanaka, Y. and Himeno, M., Mammalian class E Vps proteins, SBP1 and mVps2/CHMP2A, interact with and regulate the function of an AAA-ATPase SKD1/Vps4B. *J Cell Sci*, 2004. 117(Pt 14): p. 2997-3009.
107. Babst, M., Wendland, B., Estepa, E.J. and Emr, S.D., The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J*, 1998. 17(11): p. 2982-93.
108. Kajimoto, T., Okada, T., Miya, S., Zhang, L. and Nakamura, S., Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. *Nat Commun*, 2013. 4: p. 2712.
109. Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brugger, B. and Simons, M., Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 2008. 319(5867): p. 1244-7.
110. Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y. and Ochiya, T., Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem*, 2010. 285(23): p. 17442-52.
111. Futter, C.E., Pearse, A., Hewlett, L.J. and Hopkins, C.R., Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *J Cell Biol*, 1996. 132(6): p. 1011-23.
112. Mullock, B.M., Bright, N.A., Fearon, C.W., Gray, S.R. and Luzio, J.P., Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. *J Cell Biol*, 1998. 140(3): p. 591-601.
113. Kleijmeer, M., Ramm, G., Schuurhuis, D., Griffith, J., Rescigno, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Rudensky, A.Y., Ossendorp, F., Melief, C.J., Stoorvogel, W. and Geuze, H.J., Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. *J Cell Biol*, 2001. 155(1): p. 53-63.

114. Ostrowski, M., Carmo, N.B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C.F., Schauer, K., Hume, A.N., Freitas, R.P., Goud, B., Benaroch, P., Hacoen, N., et al., Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol*, 2010. 12(1): p. 19-30; sup pp 1-13.
115. Peinado, H., Aleckovic, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., Garcia-Santos, G., Ghajar, C., Nitadori-Hoshino, A., Hoffman, C., Badal, K., et al., Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med*, 2012. 18(6): p. 883-91.
116. Savina, A., Fader, C.M., Damiani, M.T. and Colombo, M.I., Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic*, 2005. 6(2): p. 131-43.
117. Fader, C.M., Sanchez, D.G., Mestre, M.B. and Colombo, M.I., TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1793(12): p. 1901-16.
118. Liang, B., Peng, P., Chen, S., Li, L., Zhang, M., Cao, D., Yang, J., Li, H., Gui, T., Li, X. and Shen, K., Characterization and proteomic analysis of ovarian cancer-derived exosomes. *J Proteomics*, 2013. 80: p. 171-82.
119. Rosell, R., Wei, J. and Taron, M., Circulating MicroRNA Signatures of Tumor-Derived Exosomes for Early Diagnosis of Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer*, 2009. 10(1): p. 8-9.
120. Bovy, N., Blomme, B., Freres, P., Dederen, S., Nivelles, O., Lion, M., Carnet, O., Martial, J.A., Noel, A., Thiry, M., Jerusalem, G., Josse, C., Bours, V., et al., Endothelial exosomes contribute to the antitumor response during breast cancer neoadjuvant chemotherapy via microRNA transfer. *Oncotarget*, 2015. 6(12): p. 10253-66.
121. Pisitkun, T., Shen, R.F. and Knepper, M.A., Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(36): p. 13368-73.
122. Admyre, C., Johansson, S.M., Qazi, K.R., Filen, J.J., Laheesmaa, R., Norman, M., Neve, E.P., Scheynius, A. and Gabrielsson, S., Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol*, 2007. 179(3): p. 1969-78.
123. Escola, J.M., Kleijmeer, M.J., Stoorvogel, W., Griffith, J.M., Yoshie, O. and Geuze, H.J., Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem*, 1998. 273(32): p. 20121-7.
124. Thery, C., Regnault, A., Garin, J., Wolfers, J., Zitvogel, L., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G. and Amigorena, S., Molecular characterization of dendritic cell-derived

- exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol*, 1999. 147(3): p. 599-610.
125. Bobrie, A., Colombo, M., Krumeich, S., Raposo, G. and Thery, C., Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *J Extracell Vesicles*, 2012. 1.
 126. Thery, C., Boussac, M., Veron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J. and Amigorena, S., Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol*, 2001. 166(12): p. 7309-18.
 127. Blanchard, N., Lankar, D., Faure, F., Regnault, A., Dumont, C., Raposo, G. and Hivroz, C., TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J Immunol*, 2002. 168(7): p. 3235-41.
 128. Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Thery, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., Angevin, E., Amigorena, S. and Zitvogel, L., Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med*, 2001. 7(3): p. 297-303.
 129. Esser, J., Gehrman, U., D'Alexandri, F.L., Hidalgo-Estevez, A.M., Wheelock, C.E., Scheynius, A., Gabrielsson, S. and Radmark, O., Exosomes from human macrophages and dendritic cells contain enzymes for leukotriene biosynthesis and promote granulocyte migration. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. 126(5): p. 1032-40, 1040 e1-4.
 130. Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J. and Lotvall, J.O., Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 2007. 9(6): p. 654-9.
 131. Skog, J., Wurdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W.T., Jr., Carter, B.S., Krichevsky, A.M. and Breakefield, X.O., Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*, 2008. 10(12): p. 1470-6.
 132. Koga, Y., Yasunaga, M., Moriya, Y., Akasu, T., Fujita, S., Yamamoto, S. and Matsumura, Y., Exosome can prevent RNase from degrading microRNA in feces. *J Gastrointest Oncol*, 2011. 2(4): p. 215-22.
 133. Jossen, S., Gururajan, M., Sung, S.Y., Hu, P., Shao, C., Zhau, H.E., Liu, C., Lichterman, J., Duan, P., Li, Q., Rogatko, A., Posadas, E.M., Haga, C.L., et al., Stromal fibroblast-derived miR-409 promotes epithelial-to-mesenchymal transition and prostate tumorigenesis. *Oncogene*, 2015. 34(21): p. 2690-9.
 134. Kobayashi, M., Salomon, C., Tapia, J., Illanes, S.E., Mitchell, M.D. and Rice, G.E., Ovarian cancer cell invasiveness is associated with discordant exosomal sequestration of Let-7 miRNA and miR-200. *J Transl Med*, 2014. 12: p. 4.

135. Mulcahy, L.A., Pink, R.C. and Carter, D.R., Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles*, 2014. 3.
136. Tian, T., Zhu, Y.L., Zhou, Y.Y., Liang, G.F., Wang, Y.Y., Hu, F.H. and Xiao, Z.D., Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *J Biol Chem*, 2014. 289(32): p. 22258-67.
137. Escrevente, C., Keller, S., Altevogt, P. and Costa, J., Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer*, 2011. 11: p. 108.
138. Wang, L.H., Rothberg, K.G. and Anderson, R.G., Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol*, 1993. 123(5): p. 1107-17.
139. Doherty, G.J. and McMahon, H.T., Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*, 2009. 78: p. 857-902.
140. Seo, W., Eun, H.S., Kim, S.Y., Yi, H.S., Lee, Y.S., Park, S.H., Jang, M.J., Jo, E., Kim, S.C., Han, Y.M., Park, K.G. and Jeong, W.I., Exosome-mediated activation of toll-like receptor 3 in stellate cells stimulates interleukin-17 production by gammadelta T cells in liver fibrosis. *Hepatology*, 2016. 64(2): p. 616-31.
141. Fitzner, D., Schnaars, M., van Rossum, D., Krishnamoorthy, G., Dibaj, P., Bakhti, M., Regen, T., Hanisch, U.K. and Simons, M., Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J Cell Sci*, 2011. 124(Pt 3): p. 447-58.
142. Nabi, I.R. and Le, P.U., Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol*, 2003. 161(4): p. 673-7.
143. Corrado, C., Raimondo, S., Chiesi, A., Ciccia, F., De Leo, G. and Alessandro, R., Exosomes as intercellular signaling organelles involved in health and disease: basic science and clinical applications. *Int J Mol Sci*, 2013. 14(3): p. 5338-66.
144. Zhang, X., Yuan, X., Shi, H., Wu, L., Qian, H. and Xu, W., Exosomes in cancer: small particle, big player. *J Hematol Oncol*, 2015. 8: p. 83.
145. Xu, J.F., Wang, Y.P., Zhang, S.J., Chen, Y., Gu, H.F., Dou, X.F., Xia, B., Bi, Q. and Fan, S.W., Exosomes containing differential expression of microRNA and mRNA in osteosarcoma that can predict response to chemotherapy. *Oncotarget*, 2017.
146. Cho, J.A., Park, H., Lim, E.H. and Lee, K.W., Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells. *Int J Oncol*, 2012. 40(1): p. 130-8.
147. Chen, W.X., Liu, X.M., Lv, M.M., Chen, L., Zhao, J.H., Zhong, S.L., Ji, M.H., Hu, Q., Luo, Z., Wu, J.Z. and Tang, J.H., Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit chemoresistance by a horizontal transfer of microRNAs. *PLoS One*, 2014. 9(4): p. e95240.

148. Ge, R., Tan, E., Sharghi-Namini, S. and Asada, H.H., Exosomes in Cancer Microenvironment and Beyond: have we Overlooked these Extracellular Messengers? *Cancer Microenviron*, 2012. 5(3): p. 323-32.
149. Donnarumma, E., Fiore, D., Nappa, M., Roscigno, G., Adamo, A., Iaboni, M., Russo, V., Affinito, A., Puoti, I., Quintavalle, C., Rienzo, A., Piscuoglio, S., Thomas, R., et al., Cancer-associated fibroblasts release exosomal microRNAs that dictate an aggressive phenotype in breast cancer. *Oncotarget*, 2017. 8(12): p. 19592-19608.
150. Penfornis, P., Vallabhaneni, K.C., Whitt, J. and Pochampally, R., Extracellular vesicles as carriers of microRNA, proteins and lipids in tumor microenvironment. *Int J Cancer*, 2016. 138(1): p. 14-21.
151. Fidler, I.J., The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation*, 2002. 70(9-10): p. 498-505.
152. Langley, R.R. and Fidler, I.J., Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis. *Endocr Rev*, 2007. 28(3): p. 297-321.
153. Khan, S., Aspe, J.R., Asumen, M.G., Almaguel, F., Odumosu, O., Acevedo-Martinez, S., De Leon, M., Langridge, W.H. and Wall, N.R., Extracellular, cell-permeable survivin inhibits apoptosis while promoting proliferative and metastatic potential. *Br J Cancer*, 2009. 100(7): p. 1073-86.
154. Shedden, K., Xie, X.T., Chandaroy, P., Chang, Y.T. and Rosania, G.R., Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Res*, 2003. 63(15): p. 4331-7.
155. Lv, M.M., Zhu, X.Y., Chen, W.X., Zhong, S.L., Hu, Q., Ma, T.F., Zhang, J., Chen, L., Tang, J.H. and Zhao, J.H., Exosomes mediate drug resistance transfer in MCF-7 breast cancer cells and a probable mechanism is delivery of P-glycoprotein. *Tumour Biol*, 2014. 35(11): p. 10773-9.
156. Abd Elmageed, Z.Y., Yang, Y., Thomas, R., Ranjan, M., Mondal, D., Moroz, K., Fang, Z., Rezk, B.M., Moparty, K., Sikka, S.C., Sartor, O. and Abdel-Mageed, A.B., Neoplastic reprogramming of patient-derived adipose stem cells by prostate cancer cell-associated exosomes. *Stem Cells*, 2014. 32(4): p. 983-97.
157. Melo, S.A., Sugimoto, H., O'Connell, J.T., Kato, N., Villanueva, A., Vidal, A., Qiu, L., Vitkin, E., Perelman, L.T., Melo, C.A., Lucci, A., Ivan, C., Calin, G.A., et al., Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell*, 2014. 26(5): p. 707-21.
158. Koch, R., Demant, M., Aung, T., Diering, N., Cicholas, A., Chapuy, B., Wenzel, D., Lahmann, M., Guntsch, A., Kiecke, C., Becker, S., Hupfeld, T., Venkataramani, V., et al., Populational equilibrium through exosome-mediated Wnt signaling in tumor progression of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 2014. 123(14): p. 2189-98.
159. Dutta, S., Warshall, C., Bandyopadhyay, C., Dutta, D. and Chandran, B., Interactions between exosomes from breast cancer cells and primary mammary epithelial cells

- leads to generation of reactive oxygen species which induce DNA damage response, stabilization of p53 and autophagy in epithelial cells. *PLoS One*, 2014. 9(5): p. e97580.
160. Uccelli, A., Moretta, L. and Pistoia, V., Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(9): p. 726-36.
 161. Ullah, I., Subbarao, R.B. and Rho, G.J., Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep*, 2015. 35(2): p. e00191.
 162. Cho, J.A., Park, H., Lim, E.H., Kim, K.H., Choi, J.S., Lee, J.H., Shin, J.W. and Lee, K.W., Exosomes from ovarian cancer cells induce adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to acquire the physical and functional characteristics of tumor-supporting myofibroblasts. *Gynecol Oncol*, 2011. 123(2): p. 379-86.
 163. Chowdhury, R., Webber, J.P., Gurney, M., Mason, M.D., Tabi, Z. and Clayton, A., Cancer exosomes trigger mesenchymal stem cell differentiation into pro-angiogenic and pro-invasive myofibroblasts. *Oncotarget*, 2015. 6(2): p. 715-31.
 164. Paggetti, J., Haderk, F., Seiffert, M., Janji, B., Distler, U., Ammerlaan, W., Kim, Y.J., Adam, J., Lichter, P., Solary, E., Berchem, G. and Moussay, E., Exosomes released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer-associated fibroblasts. *Blood*, 2015. 126(9): p. 1106-17.
 165. Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A. and Rak, J., Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol*, 2008. 10(5): p. 619-24.
 166. Zhuang, G., Wu, X., Jiang, Z., Kasman, I., Yao, J., Guan, Y., Oeh, J., Modrusan, Z., Bais, C., Sampath, D. and Ferrara, N., Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway. *EMBO J*, 2012. 31(17): p. 3513-23.
 167. King, H.W., Michael, M.Z. and Gleadle, J.M., Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer*, 2012. 12(1): p. 421.
 168. Lindau, D., Gielen, P., Kroesen, M., Wesseling, P. and Adema, G.J., The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology*, 2013. 138(2): p. 105-15.
 169. Fabbri, M., Paone, A., Calore, F., Galli, R., Gaudio, E., Santhanam, R., Lovat, F., Fadda, P., Mao, C., Nuovo, G.J., Zanesi, N., Crawford, M., Ozer, G.H., et al., MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(31): p. E2110-6.
 170. Abusamra, A.J., Zhong, Z., Zheng, X., Li, M., Ichim, T.E., Chin, J.L. and Min, W.P., Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis. *Blood Cells Mol Dis*, 2005. 35(2): p. 169-73.

171. Roma-Rodrigues, C., Fernandes, A.R. and Baptista, P.V., Exosome in tumour microenvironment: overview of the crosstalk between normal and cancer cells. *Biomed Res Int*, 2014. 2014: p. 179486.
172. Webber, J., Steadman, R., Mason, M.D., Tabi, Z. and Clayton, A., Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Res*, 2010. 70(23): p. 9621-30.
173. Muller, M., Beck, I.M., Gadesmann, J., Karschuk, N., Paschen, A., Proksch, E., Djonov, V., Reiss, K. and Sedlacek, R., MMP19 is upregulated during melanoma progression and increases invasion of melanoma cells. *Modern Pathology*, 2010. 23(4): p. 511-521.
174. Luga, V., Zhang, L., Vilorio-Petit, A.M., Ogunjimi, A.A., Inanlou, M.R., Chiu, E., Buchanan, M., Hosein, A.N., Basik, M. and Wrana, J.L., Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell*, 2012. 151(7): p. 1542-56.
175. Rana, S., Malinowska, K. and Zoller, M., Exosomal tumor microRNA modulates premetastatic organ cells. *Neoplasia*, 2013. 15(3): p. 281-95.
176. Valencia, K., Luis-Ravelo, D., Bovy, N., Anton, I., Martinez-Canarias, S., Zandueta, C., Ormazabal, C., Struman, I., Tabruyn, S., Rebmann, V., De Las Rivas, J., Guruceaga, E., Bandres, E., et al., miRNA cargo within exosome-like vesicle transfer influences metastatic bone colonization. *Mol Oncol*, 2014. 8(3): p. 689-703.
177. Hood, J.L., San, R.S. and Wickline, S.A., Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res*, 2011. 71(11): p. 3792-801.
178. Costa-Silva, B., Aiello, N.M., Ocean, A.J., Singh, S., Zhang, H., Thakur, B.K., Becker, A., Hoshino, A., Mark, M.T., Molina, H., Xiang, J., Zhang, T., Theilen, T.M., et al., Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol*, 2015. 17(6): p. 816-26.
179. Paget, S., The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*, 1989. 8(2): p. 98-101.
180. Huang, X., Yuan, T., Liang, M., Du, M., Xia, S., Dittmar, R., Wang, D., See, W., Costello, B.A., Quevedo, F., Tan, W., Nandy, D., Bevan, G.H., et al., Exosomal miR-1290 and miR-375 as prognostic markers in castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol*, 2015. 67(1): p. 33-41.
181. Kroh, E.M., Parkin, R.K., Mitchell, P.S. and Tewari, M., Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*, 2010. 50(4): p. 298-301.
182. Matsuzaki, K., Fujita, K., Jingushi, K., Kawashima, A., Ujike, T., Nagahara, A., Ueda, Y., Tanigawa, G., Yoshioka, I., Ueda, K., Hanayama, R., Uemura, M., Miyagawa, Y.,

- et al., MiR-21-5p in urinary extracellular vesicles is a novel biomarker of urothelial carcinoma. *Oncotarget*, 2017. 8(15): p. 24668-24678.
183. Tian, Y., Li, S., Song, J., Ji, T., Zhu, M., Anderson, G.J., Wei, J. and Nie, G., A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials*, 2014. 35(7): p. 2383-90.
 184. Pitt, J.M., Charrier, M., Viaud, S., Andre, F., Besse, B., Chaput, N. and Zitvogel, L., Dendritic cell-derived exosomes as immunotherapies in the fight against cancer. *J Immunol*, 2014. 193(3): p. 1006-11.
 185. Beckham, C.J., Olsen, J., Yin, P.N., Wu, C.H., Ting, H.J., Hagen, F.K., Scosyrev, E., Messing, E.M. and Lee, Y.F., Bladder cancer exosomes contain EDIL-3/Dell1 and facilitate cancer progression. *J Urol*, 2014. 192(2): p. 583-92.
 186. Franzen, C.A., Blackwell, R.H., Todorovic, V., Greco, K.A., Foreman, K.E., Flanigan, R.C., Kuo, P.C. and Gupta, G.N., Urothelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition after exposure to muscle invasive bladder cancer exosomes. *Oncogenesis*, 2015. 4: p. e163.
 187. Dinney, C.P., Fishbeck, R., Singh, R.K., Eve, B., Pathak, S., Brown, N., Xie, B., Fan, D., Bucana, C.D., Fidler, I.J. and et al., Isolation and characterization of metastatic variants from human transitional cell carcinoma passaged by orthotopic implantation in athymic nude mice. *J Urol*, 1995. 154(4): p. 1532-8.
 188. Bubenik, J., Baresova, M., Viklicky, V., Jakoubkova, J., Sainerova, H. and Donner, J., Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen. *Int J Cancer*, 1973. 11(3): p. 765-73.
 189. Earl, J., Rico, D., Carrillo-de-Santa-Pau, E., Rodriguez-Santiago, B., Mendez-Pertuz, M., Auer, H., Gomez, G., Grossman, H.B., Pisano, D.G., Schulz, W.A., Perez-Jurado, L.A., Carrato, A., Theodorescu, D., et al., The UBC-40 Urothelial Bladder Cancer cell line index: a genomic resource for functional studies. *BMC Genomics*, 2015. 16(1): p. 403.
 190. Masters, J.R., Hepburn, P.J., Walker, L., Highman, W.J., Trejdosiewicz, L.K., Povey, S., Parkar, M., Hill, B.T., Riddle, P.R. and Franks, L.M., Tissue culture model of transitional cell carcinoma: characterization of twenty-two human urothelial cell lines. *Cancer Res*, 1986. 46(7): p. 3630-6.
 191. de Magalhaes, J.P., Chainiaux, F., Remacle, J. and Toussaint, O., Stress-induced premature senescence in BJ and hTERT-BJ1 human foreskin fibroblasts. *FEBS Lett*, 2002. 523(1-3): p. 157-62.
 192. Dragovic, R.A., Gardiner, C., Brooks, A.S., Tannetta, D.S., Ferguson, D.J.P., Hole, P., Carr, B., Redman, C.W.G., Harris, A.L., Dobson, P.J., Harrison, P. and Sargent, I.L., Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 2011. 7(6): p. 780-788.

193. Lao, K., Xu, N.L., Yeung, V., Chen, C., Livak, K.J. and Straus, N.A., Multiplexing RT-PCR for the detection of multiple miRNA species in small samples. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 343(1): p. 85-9.
194. Le Carre, J., Lamon, S. and Leger, B., Validation of a multiplex reverse transcription and pre-amplification method using TaqMan((R)) MicroRNA assays. *Front Genet*, 2014. 5: p. 413.
195. Biosciences, A., XCELLigence RTCA DP. <https://www.aceabio.com/products/rtca-dp/>, 2017.
196. Baumgart, E., Cohen, M.S., Silva Neto, B., Jacobs, M.A., Wotkowicz, C., Rieger-Christ, K.M., Biolo, A., Zeheb, R., Loda, M., Libertino, J.A. and Summerhayes, I.C., Identification and prognostic significance of an epithelial-mesenchymal transition expression profile in human bladder tumors. *Clin Cancer Res*, 2007. 13(6): p. 1685-94.
197. O'Toole, C., Price, Z.H., Ohnuki, Y. and Unsgaard, B., Ultrastructure, karyology and immunology of a cell line originated from a human transitional-cell carcinoma. *Br J Cancer*, 1978. 38(1): p. 64-76.
198. O'Toole, C.M., Povey, S., Hepburn, P. and Franks, L.M., Identity of some human bladder cancer cell lines. *Nature*, 1983. 301(5899): p. 429-430.
199. Van Deun, J., Mestdagh, P., Sormunen, R., Cocquyt, V., Vermaelen, K., Vandesompele, J., Bracke, M., De Wever, O. and Hendrix, A., The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. *J Extracell Vesicles*, 2014. 3(1): p. 24858.
200. They, C., Amigorena, S., Raposo, G. and Clayton, A., Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*, 2006. Chapter 3: p. Unit 3 22.
201. Tauro, B.J., Greening, D.W., Mathias, R.A., Ji, H., Mathivanan, S., Scott, A.M. and Simpson, R.J., Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *Methods*, 2012. 56(2): p. 293-304.
202. Shelke, G.V., Lasser, C., Gho, Y.S. and Lotvall, J., Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. *J Extracell Vesicles*, 2014. 3.
203. Eitan, E., Zhang, S., Witwer, K.W. and Mattson, M.P., Extracellular vesicle-depleted fetal bovine and human sera have reduced capacity to support cell growth. *J Extracell Vesicles*, 2015. 4: p. 26373.
204. Gstraunthaler, G., Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *ALTEX*, 2003. 20(4): p. 275-81.
205. van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Fex Svenningsen, A., Honegger, P., Knudsen, L.E., Lindl, T., Noraberg, J., Price, A., Scarino, M.L. and Gstraunthaler, G.,

- Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol In Vitro*, 2010. 24(4): p. 1053-63.
206. Aswad, H., Jalabert, A. and Rome, S., Depleting extracellular vesicles from fetal bovine serum alters proliferation and differentiation of skeletal muscle cells in vitro. *BMC Biotechnol*, 2016. 16: p. 32.
 207. Kovalenko, O.V., Yang, X., Kolesnikova, T.V. and Hemler, M.E., Evidence for specific tetraspanin homodimers: inhibition of palmitoylation makes cysteine residues available for cross-linking. *Biochem J*, 2004. 377(Pt 2): p. 407-17.
 208. Kitadokoro, K., Bordo, D., Galli, G., Petracca, R., Falugi, F., Abrignani, S., Grandi, G. and Bolognesi, M., CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *EMBO J*, 2001. 20(1-2): p. 12-8.
 209. Jeppesen, D.K., Nawrocki, A., Jensen, S.G., Thorsen, K., Whitehead, B., Howard, K.A., Dyrskjot, L., Orntoft, T.F., Larsen, M.R. and Ostensfeld, M.S., Quantitative proteomics of fractionated membrane and lumen exosome proteins from isogenic metastatic and nonmetastatic bladder cancer cells reveal differential expression of EMT factors. *Proteomics*, 2014. 14(6): p. 699-712.
 210. Bang, C. and Thum, T., Exosomes: new players in cell-cell communication. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012. 44(11): p. 2060-4.
 211. van Dommelen, S.M., Vader, P., Lakhal, S., Kooijmans, S.A., van Solinge, W.W., Wood, M.J. and Schiffelers, R.M., Microvesicles and exosomes: opportunities for cell-derived membrane vesicles in drug delivery. *J Control Release*, 2012. 161(2): p. 635-44.
 212. Muralidharan-Chari, V., Clancy, J., Plou, C., Romao, M., Chavrier, P., Raposo, G. and D'Souza-Schorey, C., ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol*, 2009. 19(22): p. 1875-85.
 213. Dragovic, R.A., Collett, G.P., Hole, P., Ferguson, D.J., Redman, C.W., Sargent, I.L. and Tannetta, D.S., Isolation of syncytiotrophoblast microvesicles and exosomes and their characterisation by multicolour flow cytometry and fluorescence Nanoparticle Tracking Analysis. *Methods*, 2015. 87: p. 64-74.
 214. Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J.P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M. and Thery, C., Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. 113(8): p. E968-77.
 215. Romancino, D.P., Paterniti, G., Campos, Y., De Luca, A., Di Felice, V., d'Azzo, A. and Bongiovanni, A., Identification and characterization of the nano-sized vesicles released by muscle cells. *FEBS Lett*, 2013. 587(9): p. 1379-84.
 216. Momen-Heravi, F., Balaj, L., Alian, S., Tigges, J., Toxavidis, V., Ericsson, M., Distel, R.J., Ivanov, A.R., Skog, J. and Kuo, W.P., Alternative methods for characterization of extracellular vesicles. *Front Physiol*, 2012. 3: p. 354.

217. Wu, Y., Deng, W. and Klinke, D.J., 2nd, Exosomes: improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers. *Analyst*, 2015. 140(19): p. 6631-42.
218. Śliwa, T., Jarzębski, M. and Szutkowski, K., Nanoparticle Tracking Analysis of Latex Standardized Beads, in *Current Topics in Biophysics*. 2015. p. 49.
219. Filipe, V., Hawe, A. and Jiskoot, W., Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharm Res*, 2010. 27(5): p. 796-810.
220. Ettelaie, C., Collier, M.E., Maraveyas, A. and Ettelaie, R., Characterization of physical properties of tissue factor-containing microvesicles and a comparison of ultracentrifuge-based recovery procedures. *J Extracell Vesicles*, 2014. 3: p. 10.3402/jev.v3.23592.
221. Ostefeld, M.S., Jeppesen, D.K., Laurberg, J.R., Boysen, A.T., Bramsen, J.B., Primdal-Bengtson, B., Hendrix, A., Lamy, P., Dagnaes-Hansen, F., Rasmussen, M.H., Bui, K.H., Fristrup, N., Christensen, E.I., et al., Cellular disposal of miR23b by RAB27-dependent exosome release is linked to acquisition of metastatic properties. *Cancer Res*, 2014. 74(20): p. 5758-71.
222. Jeppesen, D.K., Hvam, M.L., Primdahl-Bengtson, B., Boysen, A.T., Whitehead, B., Dyrskjot, L., Orntoft, T.F., Howard, K.A. and Ostefeld, M.S., Comparative analysis of discrete exosome fractions obtained by differential centrifugation. *J Extracell Vesicles*, 2014. 3: p. 25011.
223. Lobb, R.J., Becker, M., Wen, S.W., Wong, C.S., Wiegman, A.P., Leimgruber, A. and Moller, A., Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J Extracell Vesicles*, 2015. 4: p. 27031.
224. Willms, E., Johansson, H.J., Mager, I., Lee, Y., Blomberg, K.E., Sadik, M., Alaarg, A., Smith, C.I., Lehtio, J., El Andaloussi, S., Wood, M.J. and Vader, P., Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Sci Rep*, 2016. 6: p. 22519.
225. Lasser, C., Eldh, M. and Lotvall, J., Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J Vis Exp*, 2012(59): p. e3037.
226. Nakai, W., Yoshida, T., Diez, D., Miyatake, Y., Nishibu, T., Imawaka, N., Naruse, K., Sadamura, Y. and Hanayama, R., A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles. *Sci Rep*, 2016. 6: p. 33935.
227. Maas, S.L., de Vrij, J., van der Vlist, E.J., Geragousian, B., van Bloois, L., Mastrobattista, E., Schiffelers, R.M., Wauben, M.H., Broekman, M.L. and Nolte-'t Hoen, E.N., Possibilities and limitations of current technologies for quantification of biological extracellular vesicles and synthetic mimics. *J Control Release*, 2015. 200: p. 87-96.
228. Koliha, N., Wiencek, Y., Heider, U., Jungst, C., Kladt, N., Krauthauser, S., Johnston, I.C., Bosio, A., Schauss, A. and Wild, S., A novel multiplex bead-based platform

- highlights the diversity of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*, 2016. 5: p. 29975.
229. Lee, M., Ban, J.J., Im, W. and Kim, M., Influence of storage condition on exosome recovery. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2016. 21(2): p. 299-304.
230. Lorincz, A.M., Timar, C.I., Marosvari, K.A., Veres, D.S., Otrókocsi, L., Kittel, A. and Ligeti, E., Effect of storage on physical and functional properties of extracellular vesicles derived from neutrophilic granulocytes. *J Extracell Vesicles*, 2014. 3: p. 25465.
231. Consortium, E.-T., Van Deun, J., Mestdagh, P., Agostinis, P., Akay, O., Anand, S., Anckaert, J., Martinez, Z.A., Baetens, T., Beghein, E., Bertier, L., Berx, G., Boere, J., et al., EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nat Methods*, 2017. 14(3): p. 228-232.
232. Alvarez, M.L., Khosroheidari, M., Kanchi Ravi, R. and DiStefano, J.K., Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney Int*, 2012. 82(9): p. 1024-32.
233. Royo, F., Diwan, I., Tackett, M.R., Zuniga, P., Sanchez-Mosquera, P., Loizaga-Iriarte, A., Ugalde-Olano, A., Lacasa, I., Perez, A., Unda, M., Carracedo, A. and Falcon-Perez, J.M., Comparative miRNA Analysis of Urine Extracellular Vesicles Isolated through Five Different Methods. *Cancers*, 2016. 8(12): p. 112.
234. Mateescu, B., Kowal, E.J., van Balkom, B.W., Bartel, S., Bhattacharyya, S.N., Buzas, E.I., Buck, A.H., de Candia, P., Chow, F.W., Das, S., Driedonks, T.A., Fernandez-Messina, L., Haderk, F., et al., Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA - an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles*, 2017. 6(1): p. 1286095.
235. Wang, D. and Sun, W., Urinary extracellular microvesicles: isolation methods and prospects for urinary proteome. *Proteomics*, 2014. 14(16): p. 1922-32.
236. Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A. and Burwinkel, B., Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*, 2011. 39(16): p. 7223-33.
237. Zhou, H., Yuen, P.S., Pisitkun, T., Gonzales, P.A., Yasuda, H., Dear, J.W., Gross, P., Knepper, M.A. and Star, R.A., Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Kidney Int*, 2006. 69(8): p. 1471-6.
238. Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I. and Illei, G.G., The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One*, 2012. 7(3): p. e30679.
239. Jung, M., Schaefer, A., Steiner, I., Kempkensteffen, C., Stephan, C., Erbersdobler, A. and Jung, K., Robust microRNA stability in degraded RNA preparations from human tissue and cell samples. *Clin Chem*, 2010. 56(6): p. 998-1006.

240. Talhouk, A., Kommos, S., Mackenzie, R., Cheung, M., Leung, S., Chiu, D.S., Kalloger, S.E., Huntsman, D.G., Chen, S., Intermaggio, M., Gronwald, J., Chan, F.C., Ramus, S.J., et al., Single-Patient Molecular Testing with NanoString nCounter Data Using a Reference-Based Strategy for Batch Effect Correction. *PLoS One*, 2016. 11(4): p. e0153844.
241. Beard, R.E., Abate-Daga, D., Rosati, S.F., Zheng, Z., Wunderlich, J.R., Rosenberg, S.A. and Morgan, R.A., Gene expression profiling using nanostring digital RNA counting to identify potential target antigens for melanoma immunotherapy. *Clin Cancer Res*, 2013. 19(18): p. 4941-50.
242. Silva, J., Garcia, V., Rodriguez, M., Compte, M., Cisneros, E., Veguillas, P., Garcia, J.M., Dominguez, G., Campos-Martin, Y., Cuevas, J., Pena, C., Herrera, M., Diaz, R., et al., Analysis of exosome release and its prognostic value in human colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 2012. 51(4): p. 409-18.
243. Kohler, C.U., Bryk, O., Meier, S., Lang, K., Rozynek, P., Bruning, T. and Kafferlein, H.U., Analyses in human urothelial cells identify methylation of miR-152, miR-200b and miR-10a genes as candidate bladder cancer biomarkers. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. 438(1): p. 48-53.
244. Feng, Y., Kang, Y., He, Y., Liu, J., Liang, B., Yang, P. and Yu, Z., microRNA-99a acts as a tumor suppressor and is down-regulated in bladder cancer. *BMC Urol*, 2014. 14: p. 50.
245. Han, Y., Bi, Y., Bi, H., Diao, C., Zhang, G., Cheng, K. and Yang, Z., miR-137 suppresses the invasion and procedure of EMT of human breast cancer cell line MCF-7 through targeting CtBP1. *Hum Cell*, 2016. 29(1): p. 30-6.
246. Sakaguchi, M., Hisamori, S., Oshima, N., Sato, F., Shimono, Y. and Sakai, Y., miR-137 Regulates the Tumorigenicity of Colon Cancer Stem Cells through the Inhibition of DCLK1. *Mol Cancer Res*, 2016. 14(4): p. 354-62.
247. Yang, Y.R., Li, Y.X., Gao, X.Y., Zhao, S.S., Zang, S.Z. and Zhang, Z.Q., MicroRNA-137 inhibits cell migration and invasion by targeting bone morphogenetic protein-7 (BMP7) in non-small cell lung cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015. 8(9): p. 10847-53.
248. Luo, Y., Li, X., Dong, J. and Sun, W., microRNA-137 is downregulated in thyroid cancer and inhibits proliferation and invasion by targeting EGFR. *Tumour Biol*, 2016. 37(6): p. 7749-55.
249. Wu, L., Chen, J., Ding, C., Wei, S., Zhu, Y., Yang, W., Zhang, X., Wei, X. and Han, D., MicroRNA-137 Contributes to Dampened Tumorigenesis in Human Gastric Cancer by Targeting AKT2. *PLoS One*, 2015. 10(6): p. e0130124.
250. Xiu, Y., Liu, Z., Xia, S., Jin, C., Yin, H., Zhao, W. and Wu, Q., MicroRNA-137 upregulation increases bladder cancer cell proliferation and invasion by targeting PAQR3. *PLoS One*, 2014. 9(10): p. e109734.

251. Ma, Z., Wang, Y., Piao, T., Li, Z., Zhang, H., Liu, Z. and Liu, J., The tumor suppressor role of PAQR3 in osteosarcoma. *Tumour Biol*, 2015. 36(5): p. 3319-24.
252. Squadrito, M.L., Baer, C., Burdet, F., Maderna, C., Gilfillan, G.D., Lyle, R., Ibberson, M. and De Palma, M., Endogenous RNAs modulate microRNA sorting to exosomes and transfer to acceptor cells. *Cell Rep*, 2014. 8(5): p. 1432-46.
253. Villarroya-Beltri, C., Gutierrez-Vazquez, C., Sanchez-Cabo, F., Perez-Hernandez, D., Vazquez, J., Martin-Cofreces, N., Martinez-Herrera, D.J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M. and Sanchez-Madrid, F., Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun*, 2013. 4: p. 2980.
254. Bolukbasi, M.F., Mizrak, A., Ozdener, G.B., Madlener, S., Strobel, T., Erkan, E.P., Fan, J.B., Breakefield, X.O. and Saydam, O., miR-1289 and "Zipcode"-like Sequence Enrich mRNAs in Microvesicles. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2012. 1: p. e10.
255. Li, W., Li, Y., Guan, S., Fan, J., Cheng, C.F., Bright, A.M., Chinn, C., Chen, M. and Woodley, D.T., Extracellular heat shock protein-90alpha: linking hypoxia to skin cell motility and wound healing. *EMBO J*, 2007. 26(5): p. 1221-33.
256. Ho, A.S., Huang, X., Cao, H.B., Christman-Skieller, C., Bennewith, K., Le, Q.T. and Koong, A.C., Circulating miR-210 as a Novel Hypoxia Marker in Pancreatic Cancer. *Translational Oncology*, 2010. 3(2): p. 109-113.
257. Ohshima, K., Inoue, K., Fujiwara, A., Hatakeyama, K., Kanto, K., Watanabe, Y., Muramatsu, K., Fukuda, Y., Ogura, S., Yamaguchi, K. and Mochizuki, T., Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line. *PLoS One*, 2010. 5(10): p. e13247.
258. Fong, M.Y., Zhou, W., Liu, L., Alontaga, A.Y., Chandra, M., Ashby, J., Chow, A., O'Connor, S.T., Li, S., Chin, A.R., Somlo, G., Palomares, M., Li, Z., et al., Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nat Cell Biol*, 2015. 17(2): p. 183-94.
259. Ridder, K., Sevko, A., Heide, J., Dams, M., Rupp, A.K., Macas, J., Starmann, J., Tjwa, M., Plate, K.H., Sultmann, H., Altevogt, P., Umansky, V. and Momma, S., Extracellular vesicle-mediated transfer of functional RNA in the tumor microenvironment. *Oncoimmunology*, 2015. 4(6): p. e1008371.
260. Ding, G., Zhou, L., Qian, Y., Fu, M., Chen, J., Chen, J., Xiang, J., Wu, Z., Jiang, G. and Cao, L., Pancreatic cancer-derived exosomes transfer miRNAs to dendritic cells and inhibit RFXAP expression via miR-212-3p. *Oncotarget*, 2015. 6(30): p. 29877-88.
261. Pignot, G., Cizeron-Clairac, G., Vacher, S., Susini, A., Tozlu, S., Vieillefond, A., Zerbib, M., Lidereau, R., Debre, B., Amsellem-Ouazana, D. and Bieche, I., microRNA expression profile in a large series of bladder tumors: identification of a 3-miRNA signature associated with aggressiveness of muscle-invasive bladder cancer. *Int J Cancer*, 2013. 132(11): p. 2479-91.

262. Ferguson, S.W. and Nguyen, J., Exosomes as therapeutics: The implications of molecular composition and exosomal heterogeneity. *J Control Release*, 2016. 228: p. 179-190.
263. Jenjaroenpun, P., Kremenska, Y., Nair, V.M., Kremensky, M., Joseph, B. and Kurochkin, I.V., Characterization of RNA in exosomes secreted by human breast cancer cell lines using next-generation sequencing. *PeerJ*, 2013. 1: p. e201.
264. Li, M., Zeringer, E., Barta, T., Schageman, J., Cheng, A. and Vlasov, A.V., Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2014. 369(1652).
265. Gregory, R.I. and Shiekhattar, R., MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Res*, 2005. 65(9): p. 3509-12.
266. Gerlinger, M., Rowan, A.J., Horswell, S., Math, M., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P., Varela, I., Phillimore, B., et al., Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*, 2012. 366(10): p. 883-892.
267. Diaz-Cano, S.J., Blanes, A., Rubio, J., Matilla, A. and Wolfe, H.J., Molecular Evolution and Intratumor Heterogeneity by Topographic Compartments in Muscle-Invasive Transitional Cell Carcinoma of the Urinary Bladder. *Lab Invest*, 0000. 80(3): p. 279-289.
268. Dyrskjot, L., Ostenfeld, M.S., Bramsen, J.B., Silahdaroglu, A.N., Lamy, P., Ramanathan, R., Fristrup, N., Jensen, J.L., Andersen, C.L., Zieger, K., Kauppinen, S., Ulhoi, B.P., Kjems, J., et al., Genomic profiling of microRNAs in bladder cancer: miR-129 is associated with poor outcome and promotes cell death in vitro. *Cancer Res*, 2009. 69(11): p. 4851-60.
269. Lee, H., Jun, S.Y., Lee, Y.S., Lee, H.J., Lee, W.S. and Park, C.S., Expression of miRNAs and ZEB1 and ZEB2 correlates with histopathological grade in papillary urothelial tumors of the urinary bladder. *Virchows Arch*, 2014. 464(2): p. 213-20.
270. Korpala, M. and Kang, Y., The emerging role of miR-200 family of microRNAs in epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. *RNA Biol*, 2008. 5(3): p. 115-9.
271. Hatina, J., Huckenbeck, W., Rieder, H., Seifert, H.H. and Schulz, W.A., [Bladder carcinoma cell lines as models of the pathobiology of bladder cancer. Review of the literature and establishment of a new progression series]. *Urologe A*, 2008. 47(6): p. 724-34.
272. Strefford, J.C., Lillington, D.M., Steggall, M., Lane, T.M., Nouri, A.M., Young, B.D. and Oliver, R.T., Novel chromosome findings in bladder cancer cell lines detected with multiplex fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*, 2002. 135(2): p. 139-46.

273. Xu, X., Wang, X., Fu, B., Meng, L. and Lang, B., Differentially expressed genes and microRNAs in bladder carcinoma cell line 5637 and T24 detected by RNA sequencing. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015. 8(10): p. 12678-87.
274. Pinto-Leite, R., Carreira, I., Melo, J., Ferreira, S.I., Ribeiro, I., Ferreira, J., Filipe, M., Bernardo, C., Arantes-Rodrigues, R., Oliveira, P. and Santos, L., Genomic characterization of three urinary bladder cancer cell lines: understanding genomic types of urinary bladder cancer. *Tumour Biol*, 2014. 35(5): p. 4599-617.
275. Kosaka, N., Iguchi, H. and Ochiya, T., Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*, 2010. 101(10): p. 2087-92.
276. Armstrong, D.A., Green, B.B., Seigne, J.D., Schned, A.R. and Marsit, C.J., MicroRNA molecular profiling from matched tumor and bio-fluids in bladder cancer. *Mol Cancer*, 2015. 14(1): p. 194.
277. Di Meo, A., Bartlett, J., Cheng, Y., Pasic, M.D. and Yousef, G.M., Liquid biopsy: a step forward towards precision medicine in urologic malignancies. *Mol Cancer*, 2017. 16(1): p. 80.
278. Wang, G., Chan, E.S., Kwan, B.C., Li, P.K., Yip, S.K., Szeto, C.C. and Ng, C.F., Expression of microRNAs in the urine of patients with bladder cancer. *Clin Genitourin Cancer*, 2012. 10(2): p. 106-13.
279. Miah, S., Dudzic, E., Drayton, R.M., Zlotta, A.R., Morgan, S.L., Rosario, D.J., Hamdy, F.C. and Catto, J.W., An evaluation of urinary microRNA reveals a high sensitivity for bladder cancer. *Br J Cancer*, 2012. 107(1): p. 123-8.
280. Adam, L., Wszolek, M.F., Liu, C.G., Jing, W., Diao, L., Zien, A., Zhang, J.D., Jackson, D. and Dinney, C.P., Plasma microRNA profiles for bladder cancer detection. *Urol Oncol*, 2013. 31(8): p. 1701-8.
281. Jiang, X., Du, L., Wang, L., Li, J., Liu, Y., Zheng, G., Qu, A., Zhang, X., Pan, H., Yang, Y. and Wang, C., Serum microRNA expression signatures identified from genome-wide microRNA profiling serve as novel noninvasive biomarkers for diagnosis and recurrence of bladder cancer. *Int J Cancer*, 2015. 136(4): p. 854-62.
282. Mengual, L., Lozano, J.J., Ingelmo-Torres, M., Gazquez, C., Ribal, M.J. and Alcaraz, A., Using microRNA profiling in urine samples to develop a non-invasive test for bladder cancer. *Int J Cancer*, 2013. 133(11): p. 2631-41.
283. Long, J.D., Sullivan, T.B., Humphrey, J., Logvinenko, T., Summerhayes, K.A., Kozinn, S., Harty, N., Summerhayes, I.C., Libertino, J.A., Holway, A.H. and Rieger-Christ, K.M., A non-invasive miRNA based assay to detect bladder cancer in cell-free urine. *Am J Transl Res*, 2015. 7(11): p. 2500-9.
284. Yamada, Y., Enokida, H., Kojima, S., Kawakami, K., Chiyomaru, T., Tatarano, S., Yoshino, H., Kawahara, K., Nishiyama, K., Seki, N. and Nakagawa, M., MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma:

- correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology. *Cancer Sci*, 2011. 102(3): p. 522-9.
285. Morrison, C.D., Liu, P., Woloszynska-Read, A., Zhang, J., Luo, W., Qin, M., Bshara, W., Conroy, J.M., Sabatini, L., Vedell, P., Xiong, D., Liu, S., Wang, J., et al., Whole-genome sequencing identifies genomic heterogeneity at a nucleotide and chromosomal level in bladder cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. 111(6): p. E672-81.
286. Cheng, L., Sharples, R.A., Scicluna, B.J. and Hill, A.F., Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *J Extracell Vesicles*, 2014. 3.
287. Scheffer, A.R., Holdenrieder, S., Kristiansen, G., von Ruecker, A., Muller, S.C. and Ellinger, J., Circulating microRNAs in serum: novel biomarkers for patients with bladder cancer? *World J Urol*, 2014. 32(2): p. 353-8.
288. Franzen, C.A., Simms, P.E., Van Huis, A.F., Foreman, K.E., Kuo, P.C. and Gupta, G.N., Characterization of uptake and internalization of exosomes by bladder cancer cells. *Biomed Res Int*, 2014. 2014: p. 619829.
289. Chazotte, B., Labeling cytoskeletal F-actin with rhodamine phalloidin or fluorescein phalloidin for imaging. *Cold Spring Harb Protoc*, 2010. 2010(5): p. pdb prot4947.
290. Terasaki, M., Loew, L., Lippincott-Schwartz, J. and Zaal, K., Fluorescent staining of subcellular organelles: ER, Golgi complex, and mitochondria. *Curr Protoc Cell Biol*, 2001. Chapter 4: p. Unit 4 4.
291. Teiten, M.H., Bezdetnaya, L., Morliere, P., Santus, R. and Guillemin, F., Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan[reg] localisation in cultured tumour cells. *Br J Cancer*, 2003. 88(1): p. 146-152.
292. Terasaki, M., Song, J., Wong, J.R., Weiss, M.J. and Chen, L.B., Localization of endoplasmic reticulum in living and glutaraldehyde-fixed cells with fluorescent dyes. *Cell*, 1984. 38(1): p. 101-8.
293. Sánchez-Vela, P., Garcia, N.A., Campos-Segura, M. and Forteza-Vila, J., Liquid biopsy and tumor derived exosomes in clinical practice. *Revista Española de Patología*, 2016. 49(2): p. 106-111.
294. Alonso, R., Mazzeo, C., Rodriguez, M.C., Marsh, M., Fraile-Ramos, A., Calvo, V., Avila-Flores, A., Merida, I. and Izquierdo, M., Diacylglycerol kinase alpha regulates the formation and polarisation of mature multivesicular bodies involved in the secretion of Fas ligand-containing exosomes in T lymphocytes. *Cell Death Differ*, 2011. 18(7): p. 1161-73.
295. Mittelbrunn, M., Gutierrez-Vazquez, C., Villarroya-Beltri, C., Gonzalez, S., Sanchez-Cabo, F., Gonzalez, M.A., Bernad, A. and Sanchez-Madrid, F., Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun*, 2011. 2: p. 282.

296. Tian, T., Wang, Y., Wang, H., Zhu, Z. and Xiao, Z., Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. *J Cell Biochem*, 2010. 111(2): p. 488-96.
297. Ram, S., Kim, D., Ober, R.J. and Ward, E.S., 3D single molecule tracking with multifocal plane microscopy reveals rapid intercellular transferrin transport at epithelial cell barriers. *Biophys J*, 2012. 103(7): p. 1594-603.
298. Thomson, D.W., Bracken, C.P., Szubert, J.M. and Goodall, G.J., On measuring miRNAs after transient transfection of mimics or antisense inhibitors. *PLoS One*, 2013. 8(1): p. e55214.
299. Lucchetti, D., Calapa, F., Palmieri, V., Fanali, C., Carbone, F., Papa, A., De Maria, R., De Spirito, M. and Sgambato, A., Differentiation Affects the Release of Exosomes from Colon Cancer Cells and Their Ability to Modulate the Behavior of Recipient Cells. *Am J Pathol*, 2017. 187(7): p. 1633-1647.
300. Keller, S., Konig, A.K., Marme, F., Runz, S., Wolterink, S., Koensgen, D., Mustea, A., Sehouli, J. and Altevogt, P., Systemic presence and tumor-growth promoting effect of ovarian carcinoma released exosomes. *Cancer Lett*, 2009. 278(1): p. 73-81.
301. Higginbotham, J.N., Demory Beckler, M., Gephart, J.D., Franklin, J.L., Bogatcheva, G., Kremers, G.J., Piston, D.W., Ayers, G.D., McConnell, R.E., Tyska, M.J. and Coffey, R.J., Amphiregulin exosomes increase cancer cell invasion. *Curr Biol*, 2011. 21(9): p. 779-86.
302. Lee, K.M., Choi, K.H. and Ouellette, M.M., Use of exogenous hTERT to immortalize primary human cells. *Cytotechnology*, 2004. 45(1-2): p. 33-8.
303. Smith, S.C., Baras, A.S., Dancik, G., Ru, Y., Ding, K.F., Moskaluk, C.A., Fradet, Y., Lehmann, J., Stockle, M., Hartmann, A., Lee, J.K. and Theodorescu, D., A 20-gene model for molecular nodal staging of bladder cancer: development and prospective assessment. *Lancet Oncol*, 2011. 12(2): p. 137-43.
304. Al Hussain, T.O. and Akhtar, M., Molecular basis of urinary bladder cancer. *Adv Anat Pathol*, 2013. 20(1): p. 53-60.
305. Luis, N.M., Lopez-Knowles, E. and Real, F.X., Molecular biology of bladder cancer. *Clin Transl Oncol*, 2007. 9(1): p. 5-12.
306. Zhao, X.P., Wang, M., Song, Y., Song, K., Yan, T.L., Wang, L., Liu, K. and Shang, Z.J., Membrane microvesicles as mediators for melanoma-fibroblasts communication: roles of the VCAM-1/VLA-4 axis and the ERK1/2 signal pathway. *Cancer Lett*, 2015. 360(2): p. 125-33.
307. Wysoczynski, M. and Ratajczak, M.Z., Lung cancer secreted microvesicles: underappreciated modulators of microenvironment in expanding tumors. *Int J Cancer*, 2009. 125(7): p. 1595-603.

308. Ayala, G., Morello, M., Frolov, A., You, S., Li, R., Rosati, F., Bartolucci, G., Danza, G., Adam, R.M., Thompson, T.C., Lisanti, M.P., Freeman, M.R. and Vizio, D.D., Loss of caveolin-1 in prostate cancer stroma correlates with reduced relapse-free survival and is functionally relevant to tumour progression. *J Pathol*, 2013. 231(1): p. 77-87.
309. Pan, C., Kumar, C., Bohl, S., Klingmueller, U. and Mann, M., Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions. *Mol Cell Proteomics*, 2009. 8(3): p. 443-50.
310. Hazan-Halevy, I., Rosenblum, D., Weinstein, S., Bairey, O., Raanani, P. and Peer, D., Cell-specific uptake of mantle cell lymphoma-derived exosomes by malignant and non-malignant B-lymphocytes. *Cancer Lett*, 2015. 364(1): p. 59-69.
311. French, K.C., Antonyak, M.A. and Cerione, R.A., Extracellular vesicle docking at the cellular port: Extracellular vesicle binding and uptake. *Semin Cell Dev Biol*, 2017. 67: p. 48-55.
312. Spadari, S., Sala, F. and Pedralinoy, G., Aphidicolin - a Specific Inhibitor of Nuclear-DNA Replication in Eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*, 1982. 7(1): p. 29-32.
313. Chen, H.C., Boyden chamber assay. *Methods Mol Biol*, 2005. 294: p. 15-22.
314. Liu, Y., Li, D., Liu, Z., Zhou, Y., Chu, D., Li, X., Jiang, X., Hou, D., Chen, X., Chen, Y., Yang, Z., Jin, L., Jiang, W., et al., Targeted exosome-mediated delivery of opioid receptor Mu siRNA for the treatment of morphine relapse. *Sci Rep*, 2015. 5: p. 17543.
315. Bhowmick, N.A., Neilson, E.G. and Moses, H.L., Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, 2004. 432(7015): p. 332-7.
316. Hu, Y., Yan, C., Mu, L., Huang, K., Li, X., Tao, D., Wu, Y. and Qin, J., Fibroblast-Derived Exosomes Contribute to Chemoresistance through Priming Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer. *PLoS One*, 2015. 10(5): p. e0125625.
317. Dowling, C.M., Herranz Ors, C. and Kiely, P.A., Using real-time impedance-based assays to monitor the effects of fibroblast-derived media on the adhesion, proliferation, migration and invasion of colon cancer cells. *Biosci Rep*, 2014. 34(4): p. e00126.
318. Webber, J.P., Spary, L.K., Sanders, A.J., Chowdhury, R., Jiang, W.G., Steadman, R., Wymant, J., Jones, A.T., Kynaston, H., Mason, M.D., Tabi, Z. and Clayton, A., Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes. *Oncogene*, 2015. 34(3): p. 290-302.
319. Tsuyada, A., Chow, A., Wu, J., Somlo, G., Chu, P., Loera, S., Luu, T., Li, A.X., Wu, X., Ye, W., Chen, S., Zhou, W., Yu, Y., et al., CCL2 mediates cross-talk between cancer cells and stromal fibroblasts that regulates breast cancer stem cells. *Cancer Res*, 2012. 72(11): p. 2768-79.

320. Chen, Y.C., Allen, S.G., Ingram, P.N., Buckanovich, R., Merajver, S.D. and Yoon, E., Single-cell Migration Chip for Chemotaxis-based Microfluidic Selection of Heterogeneous Cell Populations. *Sci Rep*, 2015. 5: p. 9980.
321. Kukhtevich, I.V., Belousov, K.I., Bukatin, A.S., Chubinskiy-Nadezhdin, V.I., Vasileva, V.Y., Negulyaev, Y.A. and Evstrapov, A.A., Microfluidic chips for the study of cell migration under the effect of chemicals. *Technical Physics Letters*, 2016. 42(5): p. 478-481.
322. Enkelmann, A., Heinzelmann, J., von Eggeling, F., Walter, M., Berndt, A., Wunderlich, H. and Junker, K., Specific protein and miRNA patterns characterise tumour-associated fibroblasts in bladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011. 137(5): p. 751-9.
323. Limame, R., Wouters, A., Pauwels, B., Fransen, E., Peeters, M., Lardon, F., De Wever, O. and Pauwels, P., Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays. *PLoS One*, 2012. 7(10): p. e46536.
324. Nicolson, G.L., Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells. I. Cytoplasmic influence over surface components. *Biochim Biophys Acta*, 1976. 457(1): p. 57-108.
325. Starkey, J.R., Liggitt, H.D., Jones, W. and Hosick, H.L., Influence of migratory blood cells on the attachment of tumor cells to vascular endothelium. *Int J Cancer*, 1984. 34(4): p. 535-43.
326. Madhavan, H.N., Simple Laboratory methods to measure cell proliferation using DNA synthesis property. *Journal of Stem Cells & Regenerative Medicine*, 2007. 3(1): p. 12-14.
327. Park, J.E., Tan, H.S., Datta, A., Lai, R.C., Zhang, H., Meng, W., Lim, S.K. and Sze, S.K., Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes. *Mol Cell Proteomics*, 2010. 9(6): p. 1085-99.
328. Fasanaro, P., D'Alessandra, Y., Di Stefano, V., Melchionna, R., Romani, S., Pompilio, G., Capogrossi, M.C. and Martelli, F., MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J Biol Chem*, 2008. 283(23): p. 15878-83.

9 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1:	Stadieneinteilung des Harnblasentumors.....	8
Abbildung 2:	Tumorgenese und genetische Alterationen des Harnblasenkarzinoms	10
Abbildung 3:	Biogenese und Funktion der miRNA	12
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der zellulären Zusammensetzung der Tumormikroumgebung des Harnblasenkarzinoms.....	15
Abbildung 5:	Die Biogenese von extrazellulären Vesikeln und molekulare Zusammensetzung von Exosomen	17
Abbildung 6:	Schematische Darstellung der Sekretion von Exosomen und ihrer möglichen Aufnahmemechanismen in die Empfängerzellen	21
Abbildung 7:	Schematische Zusammenfassung des beispielhaften Einflusses tumor-assoziiertes Exosomen auf die Tumormikroumgebung.....	22
Abbildung 8:	Prinzip der Nanopartikel-Tracking Analyse [192]	42
Abbildung 9:	Versuchsablauf für den exosomalen miRNA-Transfer von Tumorzellen auf normale und tumor-assoziierte Fibroblasten	51
Abbildung 10:	Versuchsschema der funktionellen Analysen.....	54
Abbildung 11:	Querschnitt einer CIM-Platte 16 für das RTCA System [195]	59
Abbildung 12:	Invasionspotential von Harnblasenkarzinomzelllinien.....	61
Abbildung 13:	Zellvitalität von UBC-Zellen und normalen Harnblasenzellen unter Verwendung von Exosomen-freiem Kulturmedium verglichen zu normalem Kulturmedium.....	62
Abbildung 14:	Western Blot Analyse von UBC-Zellen und ihren Exosomen nach Ultrazentrifugation.....	64
Abbildung 15:	Western Blot Analyse von UBC-Zellen und ihren Exosomen nach Kit-Isolation	64
Abbildung 16:	Elektronenmikroskopie von T24-Exosomen isoliert mittels Ultrazentrifugation und Kit	65
Abbildung 17:	Mediane Partikelgröße und Partikelanzahl pro ml Kulturmedium in Abhängigkeit von der Isolationsmethode	66
Abbildung 18:	Heatmap nach Microarray-Analyse in invasiven UBC-Zellen verglichen zu nicht invasiven UBC-Zellen	67
Abbildung 19:	Relative Expression von 5 deregulierten miRNAs in invasiven verglichen zu nicht invasiven UBC-Zellen	68
Abbildung 20:	Heatmap nach Microarray-Analyse in Exosomen sezerniert von invasiven UBC-Zellen verglichen zu Exosomen sezerniert von nicht invasiven Zellen	69
Abbildung 21:	Expression von 8 deregulierten miRNAs in Exosomen sezerniert von invasiven UBC-Zellen verglichen zu Exosomen aus nicht invasiven UBC-Zellen	70
Abbildung 22:	VENN-Diagramm von differentiell exprimierten miRNAs in invasiven UBC-Zellen und ihren Exosomen.....	71
Abbildung 23:	Heatmap nach Microarray-Analyse in MIBC verglichen zu NMIBC.....	73

Abbildung 24: VENN-Diagramm von differentiell exprimierten miRNAs in invasiven UBC-Zellen und MIBC.....	74
Abbildung 25: Expression von 7 deregulierten miRNAs in Urinexosomen von Patienten mit MIBC und NMIBC.....	75
Abbildung 26: Nachweis der Internalisierung von Exosomen aus nicht invasiven UBC-Zellen (RT112) in normale Fibroblasten mittels differenzieller Fluoreszenzmarkierung.....	77
Abbildung 27: Nachweis der Internalisierung von Exosomen aus invasiven UBC-Zellen (T24) in normale Fibroblasten mittels differenzieller Fluoreszenzmarkierung.....	78
Abbildung 28: Mikroskopische Aufnahmen von transient transfizierten invasiven und nicht invasiven UBC-Zellen.....	79
Abbildung 29: Überexpression von cel-miR-39-3p in invasiven und nicht invasiven UBC-Zellen.....	80
Abbildung 30: Relative Expression von cel-miR-39-3p in normalen und tumor-assoziierten Fibroblasten nach Exosomen-vermitteltem miRNA-Transfer.....	81
Abbildung 31: Proliferation von normalen Vorhautfibroblasten nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen tumor-assoziiertes Exosomen sezerniert von vier UBC-Zelllinien.....	83
Abbildung 32: Proliferation von normalen Vorhautfibroblasten nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen zelleigener und tumor-assoziiertes Exosomen.....	84
Abbildung 33: Proliferation von normalen primären Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen normaler Harnblasenexosomen.....	85
Abbildung 34: Proliferation von normalen primären Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit normalen Harnblasenexosomen und tumor-assoziiertes Exosomen sezerniert durch unterschiedliche UBC-Zellen.....	86
Abbildung 35: Proliferation von normalen primären Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit normalen Harnblasenexosomen und tumor-assoziiertes Exosomen sezerniert durch invasive und nicht invasive UBC-Zellen.....	87
Abbildung 36: Mikroskopische Aufnahmen von migrierten, Kristallviolett-gefärbten normalen Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit normalen Harnblasenexosomen und tumor-assoziiertes Exosomen.....	88
Abbildung 37: Migration von normalen primären Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit normalen Harnblasenexosomen verglichen zu unbehandelten Fibroblasten.....	89
Abbildung 38: Migration von normalen primären Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit Exosomen sezerniert von unterschiedlichen UBC-Zellen und normalen Harnblasenexosomen.....	90
Abbildung 39: Migration von normalen primären Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit Exosomen sezerniert von invasiven oder nicht invasiven UBC- und normalen Harnblasenexosomen.....	90

Abbildung 40: Echtzeit-gemessene Migration von normalen primären Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit normalen Harnblasenexosomen	91
Abbildung 41: Echtzeit-gemessene Migration von normalen primären Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit Exosomen sezerniert von unterschiedlichen UBC-Zellen und normalen Harnblasenexosomen	92
Abbildung 42: Echtzeit-gemessene Migration von normalen primären Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit Exosomen sezerniert von invasiven und nicht invasiven UBC-Zellen verglichen zu normalen Harnblasenexosomen	93
Abbildung 43: Relative Expression von cel-miR-39-3p in normalen Fibroblasten nach Stimulation mit Exosomen sezerniert von nicht invasiven UBC-Zellen nach Behandlung mit dem Transfektionsreagenz	171
Abbildung 44: RNase-Behandlung von tumor-assoziierten Exosomen der UBC-Zelllinie T24	172
Abbildung 45: Expression der miRNA cel-miR-39-3p in Zielzellen nach Stimulation mit tumor-assoziierten Exosomen (+/ø RNase-Behandlung)	173
Abbildung 46: Proliferation von normalen primären Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit normalen Harnblasenexosomen und tumor-assoziierten Exosomen sezerniert durch unterschiedliche UBC-Zellen.....	178
Abbildung 47: Proliferation von normalen primären Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit normalen Harnblasenexosomen und tumor-assoziierten Exosomen sezerniert durch unterschiedliche UBC-Zellen.....	179
Abbildung 48: Proliferation von normalen primären Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit normaler Harnblasenexosomen und tumor-assoziierten Exosomen sezerniert durch invasive und nicht invasive UBC-Zellen	180
Abbildung 49: Bestimmung der geeigneten Apidiukulinkonzentration	187
Abbildung 50: Kurvenverlauf der in Echtzeit-gemessenen Migration von normalen Harnblasenfibroblasten nach 48-stündiger Stimulation mit normalen und tumor-assoziierten Exosomen.....	191

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Klinisch-pathologische Parameter der Patientenkohorte.....	28
Tabelle 2:	Charakteristika der verwendeten Harnblasenzelllinien und Fibroblasten	29
Tabelle 3:	Verbrauchsmaterialien.....	30
Tabelle 4:	Kits.....	30
Tabelle 5:	Chemikalien.....	31
Tabelle 6:	Antikörper, Enzyme, Medium und Primer	32
Tabelle 7:	Allgemeine Puffer und Lösungen.....	33
Tabelle 8:	Geräte.....	34
Tabelle 9:	Datenbank und Computersoftware	34
Tabelle 10:	Primär- und Sekundär-Antikörper-Lösungen für Western Blot	41
Tabelle 11:	Probenverteilung für die Microarray-Analyse.....	44
Tabelle 12:	Scanvorschriften für Agilent Microarray.....	45
Tabelle 13:	Pipettierschema und PCR-Programm für die Reverse Transkription.....	46
Tabelle 14:	Programm für die Präamplifikation.....	47
Tabelle 15:	Programm für die qPCR	47
Tabelle 16:	Einstellungen der einzelnen Aufnahmekanäle.....	50
Tabelle 17:	Pipettierschema für die transiente Transfektion von cel-miR-39-3p.....	52
Tabelle 18:	Pipettierschema zur Etablierung der Proliferationsmessung nach Exosomen-Stimulation.....	55
Tabelle 19:	Pipettierschema für Proliferationsanalysen normaler Harnblasenfibroblasten nach unterschiedlichen Stimulationszeiträumen mit tumor-assoziierten und normalen Exosomen	56
Tabelle 20:	Angepasste Volumina für Cell Proliferation ELISA BrdU	56
Tabelle 21:	Pipettierschema für die Stimulation von normalen Harnblasenfibroblasten zur Migrationsanalyse.....	57
Tabelle 22:	5 Differentiell exprimierte miRNAs in invasiven verglichen zu nicht invasiven UBC-Zellen.....	67
Tabelle 23:	8 differentiell exprimierte miRNAs in Exosomen sezerniert von invasiven UBC-Zellen verglichen zu Exosomen aus nicht invasiven UBC-Zellen.....	69
Tabelle 24:	Invasions-assoziierte miRNAs in invasiven UBC-Zellen und ihren sezernierten Exosomen.....	72
Tabelle 25:	Absorptionswerte des Invasionsassays	161
Tabelle 26:	Absorptionswerte des WST-1 Assays für die Bestimmung der Zellvitalität von UBC-Zellen und normalen Harnblasenzellen.....	162
Tabelle 27:	Zellvitalität von UBC-Zellen und normalen Harnblasenzellen unter Verwendung von Exosomen-freiem Zellkulturmedium verglichen zu normalem Zellkulturmedium.....	163
Tabelle 28:	Mediane Partikelgröße und Partikelanzahl pro ml Kulturmedium von Exosomen isoliert durch Verwendung der Ultrazentrifugation und dem Kit von Life Technologies	163
Tabelle 29:	Ergebnisse der NTA-Messung der Exosomen nach Ultrazentrifugation	164

Tabelle 30:	Ergebnisse der NTA-Messung der Exosomen nach Kit.....	165
Tabelle 31:	37 deregulierte miRNAs in invasiven UBC-Zellen verglichen zu nicht invasiven UBC-Zellen -Microarray Daten	166
Tabelle 32:	Ct-Werte der Validierung spezifischer miRNAs in invasiven und nicht invasiven UBC-Zellen	167
Tabelle 33:	15 deregulierte miRNAs in Exosomen sezerniert von invasiven verglichen zu Exosomen sezerniert von nicht invasiven UBC-Zellen - Microarray Daten	167
Tabelle 34:	Ct-Werte der Validierung spezifischer miRNAs in Exosomen sezerniert von invasiven und nicht invasiven UBC-Zelllinien	167
Tabelle 35:	Deregulierte miRNAs in invasiven UBC-Zellen oder ihren sezernierten Exosomen -Microarray Daten.....	168
Tabelle 36:	Deregulierte miRNAs in muskelinvasiven verglichen zu nicht muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen - Microarray Daten	169
Tabelle 37:	Ergebnisse der NTA-Messung unter Verwendung von Urinexosomen	170
Tabelle 38:	Ct-Werte der Validierung spezifischer exosomaler miRNAs in Urinexosomen von MIBC- und NMIBC-Patienten	170
Tabelle 39:	Ct-Werte der qPCR nach transienter Transfektion von RT112- und T24-Zellen mit der miRNA cel-miR-39-3p - Transfektionseffizienz	171
Tabelle 40:	Ct-Werte der von hTERT-FB nach Stimulation mit Exosomen sezerniert von der Zelllinie RT112 (Mock-Ansatz) - Überprüfung des Einflusses des Transfektionsreagenz.....	171
Tabelle 41:	Ct-Werte der von tumor-assoziierten Exosomen sezerniert von der UBC-Zelllinie T24 - RNase-Behandlung	172
Tabelle 42:	Ct-Werte der von tumor-assoziierten Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit Exosomen sezerniert von den cel-miR-39-3p transfizierten UBC-Zelllinien RT112 und T24 - Überprüfung des Einflusses der RNase-Behandlung von Exosomen	173
Tabelle 43:	Ct-Werte von hTERT-immortalisierten Vorhautfibroblasten nach Stimulation mit Exosomen sezerniert von den cel-miR-39-3p transfizierten Zelllinien RT112 und T24 - Exosomaler Transfer der miRNA cel-miR-39-3p	174
Tabelle 44:	Absorptionswerte für die Bestimmung der Proliferation von hTERT-immortalisierten Vorhautfibroblasten nach 48-stündiger Stimulation mit tumor-assoziierten Exosomen verschiedener UBC-Zelllinien	175
Tabelle 45:	Absorptionswerte für die Bestimmung der Proliferation von hTERT-immortalisierten Vorhautfibroblasten nach 48-stündiger Stimulation mit tumor-assoziierten Exosomen einer invasiven und einer nicht invasiven UBC-Zelllinien und zelleigenen Exosomen.....	177
Tabelle 46:	Absorptionswerte der Proliferationsmessung von normalen Harnblasenfibroblasten nach Stimulation (24 h) mit tumor-assoziierten Exosomen und normalen Harnblasenexosomen.....	181
Tabelle 47:	Absorptionswerte der Proliferationsmessung von normalen Harnblasenfibroblasten nach 48-stündiger Stimulation mit tumor-assoziierten Exosomen und normalen Harnblasenexosomen.....	182

Tabelle 48:	Absorptionswerte der Proliferationsmessung von normalen Harnblasenfibroblasten nach 72-stündiger Stimulation mit tumor-assoziierten Exosomen verschiedener UBC-Zelllinien und normalen Harnblasenexosomen 185
Tabelle 49:	Absorptionswerte der Proliferationsmessung von normalen Harnblasenfibroblasten und RT112-Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit unterschiedlichen Aphidikulin-Konzentrationen und DMSO 187
Tabelle 50:	Absorptionswerte des Boyden Chamber Assays für die Bestimmung der Migration von normalen Harnblasenfibroblasten nach 48-stündiger Stimulation mit unterschiedlichen Exosomen sezerniert von UBC-Zelllinien und normalen Harnblasenzellen 188
Tabelle 51:	Absorptionswerte des Boyden Chamber Assays für die Bestimmung der Migration von normalen Harnblasenfibroblasten nach 72-stündiger Stimulation mit unterschiedlichen Exosomen sezerniert von UBC-Zelllinien und normalen Harnblasenzellen 189
Tabelle 52:	CI-Werte von normalen Harnblasenfibroblasten nach 48-stündiger Stimulation mit unterschiedlichen Exosomen sezerniert von UBC-Zelllinien und normalen Harnblasenzellen 191
Tabelle 53:	CI-Werte von normalen Harnblasenfibroblasten nach 72-stündiger Stimulation mit unterschiedlichen Exosomen sezerniert von UBC-Zelllinien und normalen Harnblasenzellen 191

11 Abkürzungsverzeichnis

3' UTR	3' untranslated region
AAA+ATPase	ATPases Associated with diverse cellular Activities
Abb.	Abbildung
Ago	Argonaute
AK	Antikörper
ALIX	ALG-2-interacting protein X
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Aqua d.	destilliertes Wasser
BCA	Bicinchoninsäure
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BSA	Bovine Serum Albumin
C. elegans	Caenorhabditis elegans
CIP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
CIS	Carcinoma in situ
DGCR8	DiGeorge syndrome chromosomal region 8
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothiol
DUB	de-ubiquitylating enzyme
ED	Exosomen-frei
EDIL3	EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3
ED-Medium	Exosomen-freies Zellkulturmedium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMT	epitheliale mesenchymale Transition
ESCRT	endosomal sorting complex required for transport
EV	Extrazelluläre Vesikel
EZM	extrazelluläre matrix
FFPE	Formalin-fixierte in Paraffin eingebettet
FGF-2	fibroblast growth factor 2
FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybrisierung
FKS	Fetales Kälberserum
GTP	Guanosintriphosphat
HBF	Harnblasenfibroblasten
hnRNP	heterogenous nuclear ribonucleoprotein
HRP	Horseradish peroxidase
HRS	HGF-regulated tyrosine kinase substrate
HSA	human serum albumin

Hsp	heat shock proteins
hTERT-FB	h-TERT immortalisierte Vorhautfibroblasten
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
IL	Interleukine
ILV	intraluminale Vesikel
ISEV	International Society of Extracellular Vesicles
Kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
LAMP1/2	lysosomal-associated membrane protein 1/2
lncRNA	long non-coding RNA
Mac-1	Macrophage-1 antigen
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MEM	Modified Eagle's medium
MHC-II	major histocompatibility complex
MIBC	Muskelinvasives Harnblasenkarzinom
miRNA	mikroRNA
MSC	Mesenchymale Stammzellen
Mut	Mutation
MVB	multi vesicular bodies
NaCl	Natriumchlorid
NETG	Gelantine-Lösung
NMIBC	Nicht muskelinvasives Harnblasenkarzinom
nSMase2	neutral sphingomyelinase 2
Nt	Nukleotid
NTA	Nanopartikel-Tracking Analyse
PAQR3	progesterin and adipoQ receptor family member III
PBS	Phosphat gebufferte Salzlösung
PDGF	platelet derived growth factor
PD-L1	Programmed death-ligand 1
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
P-Körperchen	processing bodies
Pol	Polymerase
PPARγ	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
Pre-miRNA	precursor miRNA
Pri-miRNA	primäre miRNA
PTEN	Phosphate and tensin homolog
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qPCR	quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion
Ras	Rat sarcoma
Rb	Retinoblastoma
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
S1P	sphingosine-1-phosphate
SDF1	stromal-derived factor 1
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SNAI2	Snail family Transcriptional Repressor 2
SNARE	soluble NSF-attachment protein receptor
Sphk2	sphingosine kinase 2
STAM	signal transducing adaptor molecule
Tab.	Tabelle
TBS-T	tris buffered saline Tween 20
TCC	Transitional cell carcinoma
TEM	Tranmissionselektronenmikroskop
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TGF-β	transforming growth factor beta
TLR3	Toll-like receptors 3
TRBP	TAR RNA binding protein
TSG101	tumor susceptibility gene 101 protein
TWIST1/2	Twist-related protein 1/2
Ü. N.	über Nacht
UBC	Harnblasenkarzinomzellen
UC	Ultrazentrifugation
VEGF	vascular endothelial growth factor
VIM	Vimentin
WST-1	water soluble tetrazolium
ZEB	Zinc finger E-box-binding homeobox 1
αSMA	alpha smooth muscle actine

12 Anhang

Tabelle 25: Absorptionswerte des Invasionsassays

1. Versuch				
Zelllinie		Adsorption		
Blank		0,037	0,038	0,040
RT112	1	0,047	0,043	0,043
	2	0,042	0,057	0,042
5637	1	0,047	0,045	0,045
	2	0,051	0,050	0,050
2. Versuch				
Blank		0,036	0,036	0,036
T24	1	0,078	0,079	0,078
	2	0,064	0,067	0,068
J82	1	0,078	0,078	0,078
	2	0,072	0,073	0,073
RT112	1	0,043	0,043	0,043
	2	0,044	0,043	0,045
5637	1	0,047	0,043	0,043
	2	0,043	0,043	0,043
253J-BV	1	0,079	0,078	0,078
	2	0,067	0,068	0,071
3. Versuch				
Blank		0,036	0,036	0,036
T24	1	0,088	0,089	0,090
	2	0,095	0,096	0,095
	3	0,082	0,083	0,082
J82	1	0,093	0,095	0,092
	2	0,070	0,070	0,072
	3	0,073	0,073	0,073
4. Versuch				
Blank		0,036	0,035	0,036
T24	1	0,088	0,089	0,090
	2	0,079	0,079	0,080
J82	1	0,095	0,096	0,095
	2	0,070	0,072	0,072
RT112	1	0,044	0,044	0,045
	2	0,044	0,047	0,044
5637	1	0,044	0,056	0,044
	2	0,044	0,045	0,057
253J-BV	1	0,084	0,086	0,087
	2	0,093	0,095	0,092

Tabelle 26: Absorptionswerte des WST-1 Assays für die Bestimmung der Zellvitalität von UBC-Zellen und normalen Harnblasenzellen

5637										
Versuch		Zeiträume								
		24 h			48 h			72 h		
1	Komplett-Medium	0,237	0,198	0,282	0,429	0,394	0,397	0,826	0,599	0,718
	ED-Medium	0,233	0,215	0,235	0,483	0,421	0,442	0,697	0,589	0,628
2	Komplett-Medium	0,144	0,168	0,150	0,397	0,383	0,377	0,907	0,805	0,668
	ED-Medium	0,128	-	0,155	0,361	0,417	0,450	0,899	0,838	0,705
3	Komplett-Medium	0,237	0,198	0,282	0,429	0,394	0,397	0,033	0,025	0,041
	ED-Medium	0,233	0,215	0,235	0,483	0,421	0,442	0,002	0,002	0,006
4	Komplett-Medium	0,192	0,206	0,149	-	-	-	0,884	1,138	1,075
	ED-Medium	0,129	0,132	0,141	-	-	-	0,562	0,565	-
5	Komplett-Medium	0,212	0,260	0,228	-	-	-	-	-	-
	ED-Medium	0,145	0,206	0,134	-	-	-	-	-	-
HCV29										
Versuch		Zeiträume								
		24 h			48 h			72 h		
1	Komplett-Medium	0,278	0,130	0,134	0,368	0,317	0,346	0,268	0,349	0,284
	ED-Medium	0,093	0,184	0,132	0,267	0,211	0,243	0,334	0,386	0,389
2	Komplett-Medium	0,207	0,174	0,215	0,206	0,219	0,166	0,226	0,214	0,227
	ED-Medium	0,205	0,176	0,163	0,230	0,217	0,273	0,327	0,264	0,327
3	Komplett-Medium	0,270	0,287	0,346	0,200	0,271	0,367	0,341	0,450	0,542
	ED-Medium	0,208	0,222	0,223	0,210	0,262	0,335	0,314	0,646	0,523
4	Komplett-Medium	0,306	0,298	0,356	0,182	0,206	0,400	-	-	-
	ED-Medium	0,151	0,178	0,214	0,213	0,412	0,360	-	-	-
T24										
Versuch		Zeiträume								
		24 h			48 h			72 h		
1	Komplett-Medium	1,256	1,590	1,534	3,111	3,085	3,013	3,611	-	3,628
	ED-Medium	1,141	1,287	1,259	2,628	2,640	2,615	3,374	3,001	3,167
2	Komplett-Medium	0,691	0,631	0,647	1,632	1,763	1,821	2,306	2,334	2,299
	ED-Medium	0,745	0,666	0,658	1,290	1,617	1,525	2,458	2,320	2,656
3	Komplett-Medium	1,256	1,590	1,534	3,111	3,085	3,013	1,476	1,047	0,975
	ED-Medium	1,141	1,287	1,259	2,628	2,640	2,615	0,692	0,563	0,374
4	Komplett-Medium	0,368	0,317	0,346	0,872	0,675	0,576	0,453	0,737	0,522
	ED-Medium	0,267	0,211	0,243	0,586	0,457	0,623	-	0,660	-
5	Komplett-Medium	2,485	2,708	2,392	0,475	0,322	0,580	-	-	-
	ED-Medium	2,522	2,583	2,895	0,281	0,367	0,360	-	-	-
J82										
Versuch		Zeiträume								
		24 h			48 h			72 h		
1	Komplett-Medium	0,189	0,226	0,198	1,685	1,709	1,952	2,560	2,523	2,723
	ED-Medium	0,138	0,188	0,131	1,489	1,571	1,705	2,088	2,399	2,204
2	Komplett-Medium	0,947	0,922	1,014	1,058	0,933	0,955	2,026	1,437	1,687
	ED-Medium	0,945	0,960	0,973	0,749	0,844	0,907	1,326	1,623	1,129
3	Komplett-Medium	0,711	0,637	0,556	1,685	1,709	1,952	1,277	1,229	1,316
	ED-Medium	0,656	0,533	0,551	1,489	1,571	1,705	0,986	1,031	1,012
4	Komplett-Medium	0,947	0,922	1,014	0,819	0,786	0,888	-	-	-
	ED-Medium	0,945	0,960	0,973	0,519	0,526	0,498	-	-	-
5	Komplett-Medium	0,420	0,419	0,424	1,966	1,288	1,351	-	-	-
	ED-Medium	0,380	0,337	0,289	0,853	0,879	0,847	-	-	-
6	Komplett-Medium	0,781	0,750	0,595	-	-	-	-	-	-
	ED-Medium	0,695	0,676	0,642	-	-	-	-	-	-

253J-BV										
Versuch		Zeiträume								
		24 h			48 h			72 h		
1	Komplett-Medium	3,150	3,415	3,606	3,391	0,792	0,871	0,385	0,301	0,338
	ED-Medium	3,557	3,451	3,549	3,519	0,495	0,549	0,350	0,356	0,412
2	Komplett-Medium	0,280	0,278		0,279	1,162	1,107	1,489	1,537	1,587
	ED-Medium	0,281	0,271	0,296	0,283	1,208	0,890	0,928	1,200	1,233
3	Komplett-Medium	0,401	0,422	0,438	0,421	0,792	0,871	0,597	0,516	0,535
	ED-Medium	0,449	0,397	0,367	0,404	0,495	0,549	0,480	0,483	0,371
4	Komplett-Medium	0,280	0,278	0,263	0,273	3,222	3,118	3,016	3,138	3,061
	ED-Medium	0,281	0,271	0,296	0,283	3,033	2,483	2,864	2,804	2,563
5	Komplett-Medium	0,199	0,168	0,184	0,184	-	-	-	-	-
	ED-Medium	0,178	0,160	0,153	0,164	-	-	-	-	-
6	Komplett-Medium	3,124	3,385	3,577	3,362	-	-	-	-	-
	ED-Medium	3,543	3,427	3,559	3,510	-	-	-	-	-

RT112										
Versuch		Zeiträume								
		24 h			48 h			72 h		
1	Komplett-Medium	0,139	0,145	0,134	1,685	1,709	1,952	2,560	2,523	2,723
	ED-Medium	0,080	0,108	0,116	1,489	1,571	1,705	2,088	2,399	2,204
2	Komplett-Medium	0,947	0,922	1,014	0,453	0,470	0,481	0,967	0,630	0,549
	ED-Medium	0,945	0,960	0,973	0,369	0,302	0,289	-	-	0,615
3	Komplett-Medium	0,145	0,156	0,128	0,600	0,475	0,426	1,088	0,944	0,911
	ED-Medium	0,143	-	0,138	0,411	0,281	0,317	0,568	0,556	0,628
4	Komplett-Medium	0,164	0,164	0,191	0,871	0,852	0,650	1,456	1,575	1,514
	ED-Medium	-	0,145	0,103	0,423	0,403	0,784	0,781	0,717	0,614
5	Komplett-Medium	0,379	0,297	0,276	-	-	-	1,266	1,112	1,006
	ED-Medium	0,193	0,180	0,178	-	-	-	0,859	0,874	0,849
6	Komplett-Medium	0,295	0,289	0,276	-	-	-	-	-	-
	ED-Medium	0,199	0,158	0,203	-	-	-	-	-	-

Tabelle 27: Zellvitalität von UBC-Zellen und normalen Harnblasenzellen unter Verwendung von Exosomen-freiem Zellkulturmedium verglichen zu normalem Zellkulturmedium

	T24	J82	253J-BV	RT112	5637	HCV29
Komplett-Medium	100 ± 8 %	100 ± 8 %	100 ± 5 %	100 ± 8 %	100 ± 12 %	100 ± 22 %
24 h ED-Medium	90 ± 15 %	93 ± 10 %	99 ± 8 %	78 ± 19 %	85 ± 14 %	74 ± 18 %
48 h ED-Medium	82 ± 9 %	73 ± 16 %	86 ± 14 %	68 ± 16 %	109 ± 8 %	103 ± 31 %
72 h ED-Medium	84 ± 29 %	79 ± 9 %	81 ± 11 %	63 ± 15 %	86 ± 22 %	124 ± 24 %

Tabelle 28: Mediane Partikelgröße und Partikelanzahl pro ml Kulturmedium von Exosomen isoliert durch Verwendung der Ultrazentrifugation und dem Kit von Life Technologies

Zelllinie	Mediane Partikelgröße [nm]		Partikelanzahl pro ml Medium	
	Isolationsmethode		Isolationsmethode	
	Ultrazentrifuge	Kit	Ultrazentrifuge	Kit
T24	110 ± 22 nm	75 ± 13 nm	8,84E+08 (± 3,77E+08)	6,54E+09 (± 5,40E+09)
J82	144 ± 17 nm	61 ± 19 nm	1,09E+09 (± 3,35E+08)	1,21E+10 (± 9,88E+09)
253J-BV	127 ± 14 nm	81 ± 15 nm	1,51E+09 (± 8,35E+08)	8,98E+09 (± 1,01E+09)
RT112	120 ± 9 nm	61 ± 23 nm	8,50E+08 (± 1,88E+08)	9,63E+09 (± 6,84E+09)
5637	138 ± 15 nm	74 ± 19 nm	9,78E+08 (± 3,04E+08)	1,32E+10 (± 4,78E+09)

Tabelle 29: Ergebnisse der NTA-Messung der Exosomen nach Ultrazentrifugation

Zelllinie	Ansätze	Partikel/ml Medium	Partikel/Zelle	Partikelgröße (Mittelwert) [nm]	Partikelgröße (Median) [nm]
T24	1	8,68E+08	4,13E+02	149	122
	2	9,19E+08	4,37E+02	154	117
	3	9,08E+08	4,33E+02	158	123
	4	1,13E+09	9,41E+02	149	141
	5	1,48E+09	1,24E+03	149	78
	6	1,29E+09	1,07E+03	141	76
	7	4,49E+08	2,50E+02	129	106
	8	4,57E+08	2,54E+02	141	121
	9	4,59E+08	2,55E+02	145	102
J82	1	1,33E+09	1,78E+03	175	149
	2	6,61E+08	8,81E+02	175	172
	3	1,20E+09	1,60E+03	179	149
	4	1,75E+09	6,73E+03	170	150
	5	1,29E+09	4,96E+03	168	164
	6	9,26E+08	3,56E+03	167	133
	7	9,43E+08	2,62E+03	166	136
	8	1,00E+09	2,79E+03	159	116
	9	7,52E+08	2,09E+03	151	130
253J-BV	1	1,43E+09	9,50E+02	180	143
	2	1,28E+09	8,50E+02	167	120
	3	1,31E+09	8,76E+02	165	128
	4	3,72E+09	3,38E+03	184	156
	5	1,29E+09	1,18E+03	157	116
	6	1,20E+09	1,10E+03	158	118
	7	1,10E+09	1,10E+03	161	119
	8	1,25E+09	1,25E+03	157	120
	9	1,05E+09	1,05E+03	186	125
RT112	1	1,04E+09	3,72E+02	158	126
	2	8,82E+08	3,15E+02	167	129
	3	8,03E+08	2,87E+02	162	120
	4	1,00E+09	1,00E+03	170	130
	5	1,03E+09	1,03E+03	158	117
	6	1,02E+09	1,02E+03	144	117
	7	5,66E+08	3,78E+02	182	124
	8	6,13E+08	4,08E+02	158	113
	9	6,98E+08	4,66E+02	139	103
5637	1	1,50E+09	1,00E+03	217	141
	2	1,42E+09	9,48E+02	227	147
	3	1,08E+09	7,17E+02	211	136
	4	8,38E+08	6,98E+02	164	135
	5	8,75E+08	7,29E+02	197	162
	6	8,97E+08	7,48E+02	183	151
	7	7,17E+08	5,52E+02	163	110
	8	5,98E+08	4,60E+02	181	133
	9	8,81E+08	6,78E+02	151	123

Tabelle 30: Ergebnisse der NTA-Messung der Exosomen nach Kit

Zelllinie	Ansätze	Partikel/ml Medium	Partikel/Zelle	Partikelgröße (Mittelwert) [nm]	Partikelgröße (Median) [nm]
T24	1	7,37E+09	4,03E+03	168	91
	2	6,28E+09	3,43E+03	164	56
	3	5,05E+09	2,76E+03	144	86
	4	8,18E+09	4,47E+03	172	77
	5	6,17E+09	6,31E+03	150	64
	6	7,26E+09	7,43E+03	159	94
	7	6,07E+09	6,21E+03	150	65
	8	7,06E+09	7,21E+03	158	70
	9	5,38E+09	5,51E+03	158	70
J82	1	4,78E+09	8,09E+03	118	45
	2	6,80E+09	1,15E+04	93	50
	3	6,12E+09	1,04E+04	85	40
	4	5,76E+09	9,76E+03	130	41
	5	1,31E+10	2,50E+04	121	80
	6	1,75E+10	3,34E+04	120	77
	7	1,15E+10	2,19E+04	81	50
	8	1,98E+10	3,78E+04	126	88
	9	2,34E+10	4,46E+04	108	78
253J-BV	1	1,05E+10	7,96E+03	105	81
	2	1,32E+10	1,00E+04	118	70
	3	1,85E+10	1,40E+04	149	83
	4	1,11E+10	8,43E+03	98	72
	5	7,57E+09	1,38E+04	132	72
	6	3,92E+09	7,13E+03	121	106
	7	4,71E+09	8,57E+03	137	69
	8	6,05E+09	1,10E+04	140	106
	9	5,28E+09	9,59E+03	131	68
RT112	1	9,31E+09	5,84E+03	108	81
	2	1,56E+10	9,79E+03	133	86
	3	6,57E+09	4,12E+03	111	36
	4	5,84E+09	3,66E+03	122	33
	5	2,76E+09	2,00E+03	133	36
	6	8,67E+09	6,27E+03	105	65
	7	7,86E+09	5,69E+03	93	52
	8	2,07E+10	1,50E+04	123	92
	9	9,40E+09	6,80E+03	108	71
5637	1	1,49E+10	1,36E+04	100	74
	2	8,85E+09	8,05E+03	124	47
	3	2,74E+10	2,50E+04	136	91
	4	2,93E+10	2,66E+04	150	86
	5	4,17E+09	3,79E+03	115	64
	6	5,76E+09	5,24E+03	137	80
	7	9,18E+09	8,34E+03	117	41
	8	6,32E+09	5,74E+03	109	86

Tabelle 31: 37 deregulierte miRNAs in invasiven UBC-Zellen verglichen zu nicht invasiven UBC-Zellen - Microarray Daten

P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney U Test bestimmt. P-Wert < 0,05; Fold Change > 1,5; $\sigma = 0,2$; invasive UBC-Zellen n = 6; nicht invasive UBC-Zellen n = 4; Biologische Replikate pro Zelllinie n = 2.

MiRNA	P-Wert	Fold Change	Expression
hsa-miR-141-5p	< 0,001	0,001	erniedrigt
hsa-miR-141-5p	0,01	0,11	erniedrigt
hsa-miR-148a-3p	0,02	0,05	erniedrigt
hsa-miR-148b-3p	0,04	0,29	erniedrigt
hsa-miR-149-5p	0,01	0,17	erniedrigt
hsa-miR-182-5p	0,01	0,17	erniedrigt
hsa-miR-183-5p	0,01	0,11	erniedrigt
hsa-miR-192-5p	0,02	0,21	erniedrigt
hsa-miR-194-5p	0,02	0,18	erniedrigt
hsa-miR-200a-3p	0,01	0,01	erniedrigt
hsa-miR-200a-5p	0,01	0,15	erniedrigt
hsa-miR-200b-3p	0,01	0,008	erniedrigt
hsa-miR-200b-5p	0,01	0,24	erniedrigt
hsa-miR-200c-3p	< 0,001	0,001	erniedrigt
hsa-miR-203a-5p	0,01	0,08	erniedrigt
hsa-miR-205-3p	0,01	0,03	erniedrigt
hsa-miR-205-5p	0,01	0,002	erniedrigt
hsa-miR-215-5p	0,04	0,20	erniedrigt
hsa-miR-224-3p	0,04	0,09	erniedrigt
hsa-miR-224-5p	0,03	0,02	erniedrigt
hsa-miR-301a-3p	0,01	0,22	erniedrigt
hsa-miR-301b-3p	0,01	0,15	erniedrigt
hsa-miR-335-3p	0,04	0,1	erniedrigt
hsa-miR-33a-5p	0,01	0,26	erniedrigt
hsa-miR-340-5p	0,02	0,15	erniedrigt
hsa-miR-34c-5p	0,04	0,24	erniedrigt
hsa-miR-378a-5p	0,01	0,29	erniedrigt
hsa-miR-429-3p	0,02	0,01	erniedrigt
hsa-miR-96-5p	0,01	0,17	erniedrigt
hsa-miR-135a-3p	0,02	4,40	vermehrt
hsa-miR-137-3p	0,01	41,34	vermehrt
hsa-miR-140-3p	0,01	5,25	vermehrt
hsa-miR-22-3p	0,01	3,90	vermehrt
hsa-miR-22-5p	0,02	3,49	vermehrt
hsa-miR-30a-5p	0,04	3,42	vermehrt
hsa-miR-630-3p	0,02	5,61	vermehrt
hsa-miR-99a-5p	0,01	8,56	vermehrt

Tabelle 32: Ct-Werte der Validierung spezifischer miRNAs in invasiven und nicht invasiven UBC-Zellen

	RNU48	miR-99a-5p	miR-137-3p	miR-205-5p	miR-200a-3p	miR-141-3p	miR-30a-3p	miR-27b-3p	miR-145-5p
RT112									
1	21,95	31,96	37,53	21,21	24,03	23,59	30,27	25,95	33,71
2	22,05	31,45	37,45	20,63	23,35	23,20	30,49	25,16	33,28
3	22,03	31,90	37,68	20,03	22,96	21,68	30,49	23,93	33,48
5637									
1	22,35	24,71	29,22	20,62	24,24	23,31	30,62	25,58	40,35
2	22,53	24,98	28,58	19,54	24,35	22,98	30,90	26,01	41,32
3	22,15	24,79	28,64	19,52	23,45	21,43	31,21	25,07	41,75
T24									
1	22,53	22,98	25,88	33,15	33,44	35,92	32,10	25,54	40,35
2	22,4	23,26	25,66	33,47	33,45	36,39	31,81	24,80	40,28
3	22,65	22,43	27,55	33,83	31,59	35,27	31,16	23,90	41,18
J82									
1	22,17	24,56	24,67	37,70	36,18	33,43	28,12	24,90	45,00
2	21,95	25,04	24,51	38,78	37,06	33,58	28,09	24,25	44,86
3	21,85	23,42	23,25	38,68	35,20	32,34	27,55	23,67	41,96
253J-BV									
1	22,06	24,21	28,21	22,94	24,71	31,89	27,85	26,02	38,37
2	22,3	24,30	27,93	22,84	24,91	31,52	27,21	25,43	39,82
3	22,43	23,47	25,02	23,52	24,77	30,59	27,70	25,31	38,40

Tabelle 33: 15 deregulierte miRNAs in Exosomen sezerniert von invasiven verglichen zu Exosomen sezerniert von nicht invasiven UBC-Zellen - Microarray Daten

P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney U Test bestimmt. P-Wert < 0,05; Fold Change > 1,5; $\sigma = 0,2$; invasive Exosomen n = 6; nicht invasive Exosomen n = 4; Biologische Replikate pro Zelllinie n = 2

MiRNA	P-Wert	Fold Change	Expression
hsa-miR-141-3p	0,01	0,001	erniedrigt
hsa-miR-200a-3p	0,04	0,02	erniedrigt
hsa-miR-200b-3p	< 0,001	0,03	erniedrigt
hsa-miR-200c-3p	< 0,001	0,06	erniedrigt
hsa-miR-205-5p	0,04	0,07	erniedrigt
hsa-miR-224-5p	0,04	0,07	erniedrigt
hsa-miR-27b-3p	0,04	0,27	erniedrigt
hsa-miR-429-3p	0,04	0,08	erniedrigt
hsa-miR-137-3p	0,01	9,25	erhöht
hsa-miR-145-5p	0,04	3,38	erhöht
hsa-miR-30a-3p	0,02	4,27	erhöht
hsa-miR-3158-3p	0,02	3,39	erhöht
hsa-miR-503-5p	0,04	2,87	erhöht
hsa-miR-513b-5p	0,02	2,87	erhöht
hsa-miR-99a-5p	0,04	3,83	erhöht

Tabelle 34: Ct-Werte der Validierung spezifischer miRNAs in Exosomen sezerniert von invasiven und nicht invasiven UBC-Zelllinien

	miR-99a-5p	miR-137-3p	miR-205-5p	miR-200a-3p	miR-141-3p	miR-30a-3p	miR-27b-3p	miR-145-5p
RT112								
1	35,87	39,53	25,84	30,64	31,18	32,51	35,52	36,62
2	34,57	39,68	24,98	30,64	30,53	33,21	35,85	36,56
3	34,18	39,23	22,00	29,36	30,58	30,07	34,72	35,83
5637								
1	31,59	33,11	21,41	27,45	25,97	31,08	33,67	38,79
2	29,46	32,84	21,62	27,17	26,03	29,36	33,56	37,05
3	30,17	32,57	19,87	27,78	27,97	28,79	33,43	36,95
T24								
1	25,39	27,50	33,66	34,36	37,39	28,91	34,26	35,42
2	28,93	28,30	31,97	35,93	36,88	29,48	34,05	37,64
3	29,17	27,15	33,45	34,78	37,39	28,32	34,18	38,14
J82								
1	29,55	30,16	39,08	37,34	37,32	27,57	34,32	35,04
2	32,84	32,69	37,66	24,09	38,69	29,85	36,97	36,56
3	28,28	26,82	41,53	38,26	37,11	25,12	32,47	35,56
253J-BV								
1	26,81	31,68	25,30	28,03	34,13	34,13	35,74	36,76
2	27,79	31,46	22,01	27,28	27,88	27,14	34,21	37,30
3	27,00	29,89	24,49	27,05	34,08	24,94	35,19	37,46

Tabelle 35: Deregulierte miRNAs in invasiven UBC-Zellen oder ihren sezernierten Exosomen -Microarray Daten

<i>MiRNAs einzig dereguliert in invasiven UBC-Zellen</i>			
MiRNA	P-Wert	Fold Change	Expression
hsa-miR-205-3p	0,01	0,03	erniedrigt
hsa-miR-148a-3p	0,02	0,05	erniedrigt
hsa-miR-203a-5p	0,01	0,08	erniedrigt
hsa-miR-224-3p	0,04	0,09	erniedrigt
hsa-miR-335-3p	0,04	0,10	erniedrigt
hsa-miR-183-5p	0,01	0,11	erniedrigt
hsa-miR-141-5p	0,01	0,11	erniedrigt
hsa-miR-200a-5p	0,01	0,15	erniedrigt
hsa-miR-301b-3p	0,01	0,15	erniedrigt
hsa-miR-340-5p	0,02	0,15	erniedrigt
hsa-miR-149-5p	0,01	0,17	erniedrigt
hsa-miR-182-5p	0,01	0,17	erniedrigt
hsa-miR-96-5p	0,01	0,17	erniedrigt
hsa-miR-194-5p	0,02	0,18	erniedrigt
hsa-miR-215-5p	0,04	0,20	erniedrigt
hsa-miR-192-5p	0,02	0,21	erniedrigt
hsa-miR-301a-3p	0,01	0,22	erniedrigt
hsa-miR-34c-5p	0,04	0,24	erniedrigt
hsa-miR-200b-5p	0,01	0,24	erniedrigt
hsa-miR-33a-5p	0,01	0,26	erniedrigt
hsa-miR-148b-3p	0,04	0,29	erniedrigt
hsa-miR-378a-5p	0,01	0,29	erniedrigt
hsa-miR-22-5p	0,02	3,49	erhöht
hsa-miR-30a-5p	0,04	3,42	erhöht
hsa-miR-22-3p	0,01	3,90	erhöht
hsa-miR-135a-3p	0,02	4,40	erhöht
hsa-miR-140-3p	0,01	5,25	erhöht
hsa-miR-630-3p	0,02	5,61	erhöht
<i>MiRNAs einzig dereguliert in Exosomen sekretiert von invasiven UBC-Zellen</i>			
MiRNA	P-Wert	Fold Change	Expression
hsa-miR-27b-3p	0,04	0,27	erniedrigt
hsa-miR-503-5p	0,04	2,87	erhöht
hsa-miR-513b-5p	0,02	2,87	erhöht
hsa-miR-145-5p	0,04	3,38	erhöht
hsa-miR-3158-3p	0,02	3,39	erhöht
hsa-miR-30a-3p	0,02	4,27	erhöht

Tabelle 36: Deregierte miRNAs in muskelinvasiven verglichen zu nicht muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen - Microarray Daten

P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney U Test bestimmt. P-Wert < 0,05; Fold Change > 1,5; $\sigma = 0,25$; muskelinvasive Tumore: n = 14; nicht muskelinvasive Tumor: n = 10.

miRNA	P-Wert	Fold Change	Expression
hsa-miR-10a-5p	0,02	0,38	erniedrigt
hsa-miR-10b-3p	0,01	0,53	erniedrigt
hsa-miR-1248	0,05	0,49	erniedrigt
hsa-miR-135b-5p	0,004	0,17	erniedrigt
hsa-miR-138-5p	0,01	0,28	erniedrigt
hsa-miR-141-5p	0,02	0,43	erniedrigt
hsa-miR-144-3p	0,01	0,33	erniedrigt
hsa-miR-144-5p	0,01	0,32	erniedrigt
hsa-miR-1973	0,02	0,53	erniedrigt
hsa-miR-200a-3p	0,03	0,23	erniedrigt
hsa-miR-200a-5p	0,02	0,44	erniedrigt
hsa-miR-200b-3p	0,03	0,27	erniedrigt
hsa-miR-205-5p	0,04	0,53	erniedrigt
hsa-miR-29c-3p	< 0,001	0,41	erniedrigt
hsa-miR-29c-5p	< 0,001	0,37	erniedrigt
hsa-miR-3666	0,04	0,51	erniedrigt
hsa-miR-3692-5p	0,02	0,49	erniedrigt
hsa-miR-4252	0,02	0,50	erniedrigt
hsa-miR-429	0,02	0,22	erniedrigt
hsa-miR-4459	0,03	0,55	erniedrigt
hsa-miR-4485-3p	0,01	0,47	erniedrigt
hsa-miR-451a	0,02	0,41	erniedrigt
hsa-miR-4773	0,01	0,51	erniedrigt
hsa-miR-4792	0,04	0,52	erniedrigt
hsa-miR-492	0,03	0,57	erniedrigt
hsa-miR-582-5p	0,01	0,37	erniedrigt
hsa-miR-598-3p	0,03	0,38	erniedrigt
hsa-miR-6129	0,05	0,48	erniedrigt
hsa-miR-1244	0,01	3,08	erhöht
hsa-miR-127-3p	0,01	3,13	erhöht
hsa-miR-130a-3p	0,02	1,84	erhöht
hsa-miR-132-3p	0,02	2,38	erhöht
hsa-miR-142-3p	0,01	2,29	erhöht
hsa-miR-142-5p	0,01	2,55	erhöht
hsa-miR-146b-5p	0,01	3,90	erhöht
hsa-miR-150-5p	0,01	3,40	erhöht
hsa-miR-155-5p	< 0,001	2,57	erhöht
hsa-miR-181b-5p	0,01	2,06	erhöht
hsa-miR-193a-5p	0,01	2,37	erhöht
hsa-miR-199a-5p	0,04	2,35	erhöht
hsa-miR-21-3p	0,01	3,43	erhöht
hsa-miR-214-3p	0,03	2,73	erhöht
hsa-miR-214-5p	0,04	2,88	erhöht
hsa-miR-222-3p	0,01	2,78	erhöht
hsa-miR-223-3p	0,04	2,93	erhöht
hsa-miR-342-5p	0,003	2,5	erhöht
hsa-miR-362-5p	0,04	1,74	erhöht
hsa-miR-379-5p	0,04	2,50	erhöht
hsa-miR-382-5p	0,03	2,91	erhöht
hsa-miR-3976	0,02	1,86	erhöht
hsa-miR-409-3p	0,02	2,53	erhöht
hsa-miR-4267	0,01	2,36	erhöht
hsa-miR-455-5p	0,02	2,41	erhöht
hsa-miR-4707-5p	0,01	2,29	erhöht
hsa-miR-4793-3p	0,03	1,82	erhöht
hsa-miR-511-3p	0,01	2,86	erhöht
hsa-miR-605-5p	0,01	1,99	erhöht
hsa-miR-6073	< 0,05	1,79	erhöht
hsa-miR-650	< 0,001	2,92	erhöht
hsa-miR-6722-5p	0,01	2,19	erhöht
hsa-miR-6826-5p	< 0,001	2,44	erhöht
hsa-miR-7-5p	0,01	4,61	erhöht
hsa-miR-8069	0,01	1,96	erhöht

Tabelle 37: Ergebnisse der NTA-Messung unter Verwendung von Urinexosomen

Proben-ID	Partikel/ml Urin	Standardabweichung	Partikelgröße (Mittelwert) [nm]	Partikelgröße (Median) [nm]
BTB 409	1,22E+10	3,64E+09	130	99
BTB 415	2,08E+11	3,20E+09	160	124
BTB 429	2,24E+10	7,72E+08	186	125
BTB 430	5,60E+08	4,08E+07	230	175
BTB 431	1,27E+11	1,20E+10	168	73
BTB 443	4,32E+10	2,48E+09	210	160
BTB 789	2,47E+09	5,04E+08	148	104
BTB 802	5,73E+09	4,77E+07	232	170
BTB 800	4,27E+09	5,87E+07	255	197
BTB 786	1,74E+09	1,03E+08	172	153

Tabelle 38: Ct-Werte der Validierung spezifischer exosomaler miRNAs in Urinexosomen von MIBC- und NMIBC-Patienten

Proben-ID	T-Kategorie	miR-200a-3p	miR-141-3p	miR-99a-5p	miR-205-5p	miR-30a-3p	miR-27b-3p	miR-145-5p
BTB 269	NMIBC	25,73	27,92	28,91	31,38	27,80	24,49	36,38
BTB 431	NMIBC	24,90	27,70	28,53	25,85	24,26	27,69	30,53
BTB 612	NMIBC	22,98	24,74	29,08	25,73	25,41	30,61	32,08
BTB 196	NMIBC	25,08	27,05	31,99	33,50	30,27	-	33,77
BTB 440	NMIBC	24,95	26,48	28,10	26,10	25,14	30,65	-
BTB 475	NMIBC	24,52	24,82	28,77	24,42	25,65	30,01	32,30
BTB 277	MIBC	30,25	28,86	28,51	27,98	24,27	28,88	26,44
BTB 460	MIBC	30,14	31,29	27,95	29,02	24,95	30,14	33,40
BTB 173	MIBC	23,03	27,05	27,26	24,74	25,15	26,56	31,22
BTB 577	MIBC	27,79	26,35	26,68	23,99	23,86	27,09	28,05
BTB 246	NMIBC	24,90	27,99	28,26	29,91	24,70	30,24	30,08
BTB 428	MIBC	25,16	26,88	28,14	25,47	24,95	28,43	30,42
BTB 863	MIBC	27,15	30,22	27,82	30,51	25,62	33,55	32,18
BTB 31	MIBC	29,01	30,78	30,97	29,89	27,65	-	-
BTB 258	MIBC	27,54	33,87	30,36	29,09	27,71	33,63	-
BTB 134	MIBC	28,09	33,16	31,28	28,21	27,41	31,35	34,88
BTB 273	MIBC	23,58	23,26	29,35	25,56	26,48	27,49	33,86
BTB 523	MIBC	26,55	27,89	29,34	28,01	26,58	30,36	34,10
BTB 208	MIBC	24,44	27,78	27,38	22,97	24,84	25,28	28,44
BTB 455	MIBC	26,68	29,42	28,55	27,12	26,76	29,64	29,08
BTB 656	MIBC	24,04	24,78	26,31	24,33	24,45	26,95	29,37

Tabelle 39: Ct-Werte der qPCR nach transients Transfektion von RT112- und T24-Zellen mit der miRNA cel-miR-39-3p - Transfektionseffizienz

Mock			
Zelllinie		Ct-Wert RNU48	Ct-Wert cel-miR-39-3p
RT112	1	21,28	40,25
	2	20,54	40,35
T24	1	20,18	39,86
	2	21,17	38,48
Mimic			
RT112	1	20,45	12,80
	2	21,26	14,98
	3	20,35	14,04
	4	22,65	17,83
T24	1	20,14	16,31
	2	20,69	15,46
	3	20,77	17,60
	4	22,92	17,82

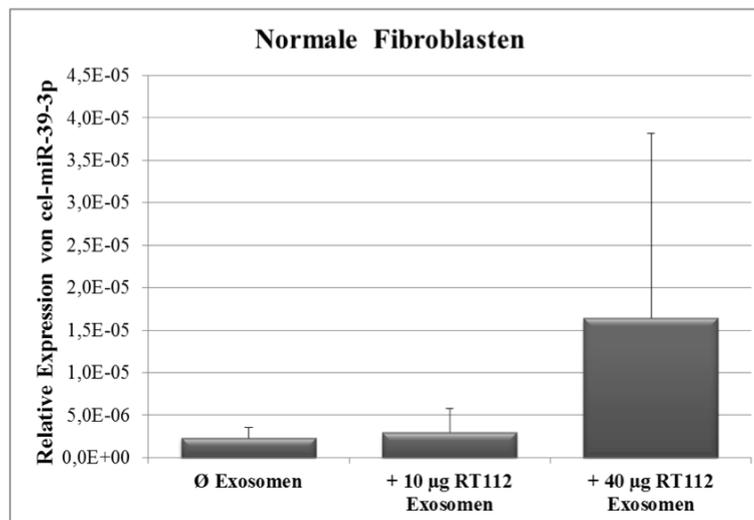


Abbildung 43: Relative Expression von cel-miR-39-3p in normalen Fibroblasten nach Stimulation mit Exosomen sezerniert von nicht invasiven UBC-Zellen nach Behandlung mit dem Transfektionsreagenz
Immortalisierte hTERT-Fibroblasten wurden 24 h mit verschiedenen Mengen (10 µg; 40 µg) tumor-assoziiierter Exosomen der UBC-Zelllinie RT112 (Mock), die zuvor mit der Transfektionsreagenz Lipofectamin transfiziert wurde, stimuliert. Dadurch sollte der Einfluss der Transfektionsreagenz auf die Zielzellen überprüft werden. Die Expression wurde normalisiert auf das Referenzgen RNU48. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests bestimmt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede detektiert werden. (Biologische Replikate: n = 2-3; Ct-Werte: Anhang Tab. 40)

Tabelle 40: Ct-Werte der von hTERT-FB nach Stimulation mit Exosomen sezerniert von der UBC-Zelllinie RT112 (Mock-Ansatz) - Überprüfung des Einflusses des Transfektionsreagenz

1. Versuch			
Ansatz	Exosomen-Menge	Ct-Wert RNU48	Ct-Wert cel-miR-39-3p
Kontrolle	0 µg	21,45	39,86
		20,23	38,48
		20,43	40,35
+ RT112-Exosomen Mock	10 µg	21,63	39,25
		21,65	41,59
	40 µg	21,73	41,50
		21,85	36,79

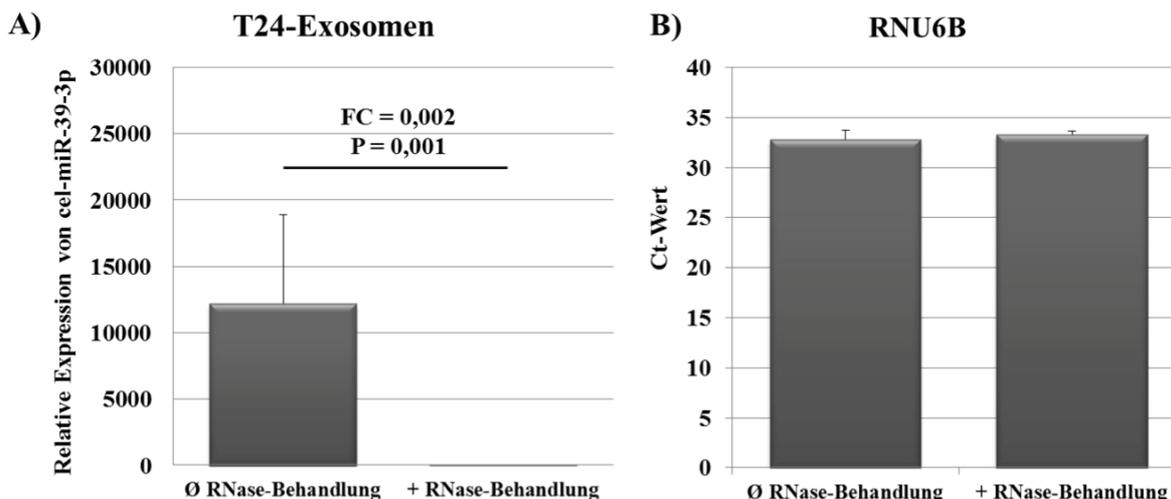


Abbildung 44: RNase-Behandlung von tumor-assoziierten Exosomen der UBC-Zelllinie T24

T24-Exosomen wurden mit cel-miR-39-3p Spike-In's und anschließend mit RNase behandelt. Danach wurde die Gesamt-RNA isoliert und die Expression von cel-miR-39-3p und RNU6B mittels qPCR gemessen. A) Relative Expression von cel-miR-39-3p und B) Ct-Werte der RNU6B jeweils mit und ohne RNase-Behandlung. (Biologische Replikate: n = 6-9; Ct-Werte: Anhang Tab. 41)

Tabelle 41: Ct-Werte der von tumor-assoziierten Exosomen sezerniert von der UBC-Zelllinie T24 - RNase-Behandlung

Ø RNase-Behandlung		
Ansatz	Ct-Wert RNU6B	Ct-Wert cel-miR-39-3p
1	33,98	20,35
2	33,60	19,99
3	34,28	20,06
4	32,21	18,35
5	32,48	18,10
6	32,46	18,40
7	32,02	20,06
8	31,95	19,82
9	32,49	19,98
RNase-Behandlung		
1	33,09	28,19
2	33,10	27,83
3	32,97	27,88
4	33,72	29,55
5	33,56	29,58
6	33,53	29,98

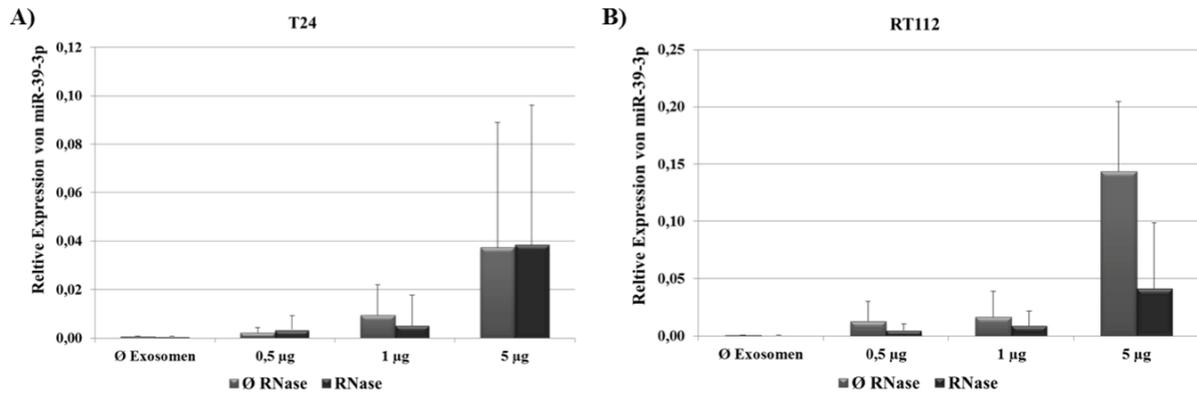


Abbildung 45: Expression der miRNA cel-miR-39-3p in Zielzellen nach Stimulation mit tumor-assoziierten Exosomen (+/Ø RNase-Behandlung)

Tumor-assoziierte Fibroblasten wurden mit unterschiedlichen Mengen (0,5 µg; 1 µg; 5 µg) tumor-assoziiierter Exosomen einer A) invasiven (T24) und B) einer nicht invasiven UBC-Zelllinien stimuliert. In den Ausgangszelllinien wurde zuvor mit Hilfe einer transienten Transfektion eine Überexpression der miRNA cel-miR-39-3p induziert. Das Expressionslevel wurde auf das Referenzgen RNU48 normalisiert. Die Daten beruhen auf 2 unabhängigen Experimenten. (Biologische Replikate: n = 2; Ct-Werte: Tab. 42)

Tabelle 42: Ct-Werte der von tumor-assoziierten Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit Exosomen sezerniert von den cel-miR-39-3p transfizierten UBC-Zelllinien RT112 und T24 - Überprüfung des Einflusses der RNase-Behandlung von Exosomen

1. Versuch			
Ansatz	Exosomen-Menge	Ct RNU48	Ct cel-miR-39-3p
Transfizierte T24 Zellen		22,92	17,82
Transfizierte RT112 Zellen		22,65	17,83
Kontrolle	0 µg	23,13	33,56
+ RT112-Exosomen ohne RNase-Behandlung	0,5µg	25,66	30,98
	1 µg	22,63	27,58
	5 µg	22,95	25,37
+ RT112-Exosomen mit RNase-Behandlung	0,5µg	22,7	29,54
	1 µg	22,94	28,74
	5 µg	22,81	26,42
+ T-24-Exosomen ohne RNase-Behandlung	0,5µg	22,34	30,39
	1 µg	22,81	28,58
	5 µg	22,96	26,72
+ T-24-Exosomen mit RNase-Behandlung	0,5µg	22,78	30,04
	1 µg	22,67	29,45
	5 µg	22,5	26,27
2. Versuch			
Transfizierte T24 Zellen		21,64	34,95
Transfizierte RT112 Zellen		22,00	35,03
Kontrolle	0 µg	22,56	32,87
+ RT112-Exosomen ohne RNase-Behandlung	0,5µg	22,78	33,91
	1 µg	22,66	33,32
	5 µg	30,53	33,85
+ RT112-Exosomen mit RNase-Behandlung	0,5µg	22,79	33,18
	1 µg	22,58	33,73
	5 µg	22,68	33,98
+ T-24-Exosomen ohne RNase-Behandlung	0,5µg	22,66	33,33
	1 µg	22,56	33,13
	5 µg	22,91	33,13
+ T-24-Exosomen mit RNase-Behandlung	0,5µg	22,67	33,32
	1 µg	23,57	32,9
	5 µg	24,73	32,85

Tabelle 43: Ct-Werte von hTERT-immortalisierten Vorhautfibroblasten nach Stimulation mit Exosomen sezerniert von den cel-miR-39-3p transfizierten Zelllinien RT112 und T24 - Exosomal Transfer der miRNA cel-miR-39-3p

1. Versuch			
Ansatz	Exosomen-Menge	Ct-Wert RNU48	Ct-Wert cel-miR-39-3p
Kontrolle	0 µg	21,35	34,25
		21,55	39,79
		21,89	37,56
+ RT112-Exosomen (cel-miR-39-3p)	10 µg	21,40	20,43
		20,31	19,30
		20,49	19,51
	40 µg	21,56	18,28
		20,56	16,99
		20,87	17,22
+ T24-Exosomen (cel-miR-39-3p)	10 µg	21,61	19,63
		21,62	24,64
		22,03	24,35
	40 µg	21,82	21,71
		22,12	23,04
		20,49	19,65
2. Versuch			
Kontrolle	0 µg	21,45	34,02
		20,23	31,60
		20,43	32,17
+ RT112-Exosomen (cel-miR-39-3p)	10 µg	20,49	20,67
		20,66	20,48
	40 µg	20,85	18,90
		20,57	18,70
+ T24-Exosomen (cel-miR-39-3p)	10 µg	20,38	21,89
		20,20	21,49
		20,45	21,41
		20,39	21,31
	40 µg	20,49	19,65
		20,40	19,01
		20,42	19,52
		20,05	19,29

Tabelle 44: Absorptionswerte für die Bestimmung der Proliferation von hTERT-immortalisierten Vorhautfibroblasten nach 48-stündiger Stimulation mit tumor-assoziierten Exosomen verschiedener UBC-Zelllinien

1. Versuch				
	Exosomen-Konzentration	Absorption		
Blank		0,037	0,040	0,038
Ø Exosomen		0,336	0,316	0,326
+ RT112-Exosomen	25 µg/ml	0,455	0,508	-
	37,5 µg/ml	0,495	0,437	-
	50 µg/ml	0,501	0,537	0,478
+ 5637-Exosomen	25 µg/ml	0,410	0,461	-
	37,5 µg/ml	0,481	0,468	0,458
+ T24-Exosomen	25 µg/ml	0,414	0,427	-
	37,5 µg/ml	0,457	0,439	-
	50 µg/ml	0,439	0,449	-
	75 µg/ml	0,491	0,482	-
+ 253J-BV-Exosomen	25 µg/ml	0,450	0,447	-
	37,5 µg/ml	0,470	0,460	-
	50 µg/ml	0,457	0,410	-
	75 µg/ml	0,523	0,504	-
2. Versuch				
Blank		0,037	0,040	0,038
Ø Exosomen		0,481	0,475	0,450
+ RT112-Exosomen	25 µg/ml	0,586	0,547	-
	37,5 µg/ml	0,571	0,604	-
	50 µg/ml	0,604	0,609	-
	75 µg/ml	0,477	0,602	-
+ 5637-Exosomen	25 µg/ml	0,555	0,572	-
	37,5 µg/ml	0,520	0,602	-
	50 µg/ml	0,523	0,533	-
	75 µg/ml	0,489	0,544	-
+ T24-Exosomen	25 µg/ml	0,482	0,481	-
	37,5 µg/ml	0,569	0,537	0,535
	50 µg/ml	0,584	0,546	0,529
	37,5 µg/ml	0,584	0,547	0,597
+ 253J-BV-Exosomen	25 µg/ml	0,559	0,519	0,536
	37,5 µg/ml	0,592	0,557	0,522
	50 µg/ml	0,530	0,543	0,550
	75 µg/ml	0,580	0,605	0,570
3. Versuch				
Blank		0,062	0,060	0,061
Ø Exosomen		0,459	0,454	0,462
+ RT112-Exosomen	25 µg/ml	0,542	0,554	0,645
	37,5 µg/ml	0,555	0,535	0,608
	50 µg/ml	0,635	0,658	0,613
	75 µg/ml	0,690	0,652	0,619
+ 5637-Exosomen	25 µg/ml	0,533	0,593	0,606
	37,5 µg/ml	0,593	0,630	0,587
	50 µg/ml	0,718	0,625	0,672
	75 µg/ml	0,676	0,624	0,693
+ T24-Exosomen	25 µg/ml	0,615	0,594	0,623
	37,5 µg/ml	0,577	0,558	0,610
	50 µg/ml	0,686	0,675	0,687
	75 µg/ml	0,633	0,625	0,682
+ 253J-BV-Exosomen	25 µg/ml	0,659	0,615	0,647
	37,5 µg/ml	0,706	0,684	0,655
	50 µg/ml	0,713	0,722	0,674
	75 µg/ml	0,695	0,697	0,685

4. Versuch				
Blank		0,055	0,058	0,060
Ø Exosomen		0,383	0,385	0,350
+ RT112-Exosomen	25 µg/ml	0,441	0,431	-
	37,5 µg/ml	0,467	0,463	-
	50 µg/ml	0,464	-	-
	75 µg/ml	0,484	0,509	-
+ 5637-Exosomen	25 µg/ml	0,395	0,455	0,417
	37,5 µg/ml	0,387	0,373	0,441
	50 µg/ml	0,473	0,474	0,415
	75 µg/ml	0,430	0,488	-
+ T24-Exosomen	25 µg/ml	0,467	0,456	0,473
	37,5 µg/ml	0,380	0,428	0,370
	50 µg/ml	0,464	0,436	0,497
	75 µg/ml	0,425	0,390	0,483
+ 253J-BV-Exosomen	25 µg/ml	0,555	0,552	0,502
	37,5 µg/ml	0,476	0,502	0,558
	50 µg/ml	0,514	0,470	0,544
	75 µg/ml	0,548	0,631	0,540
5. Versuch				
Blank		0,037	0,040	0,038
Ø Exosomen		0,481	0,475	0,450
+ RT112-Exosomen	25 µg/ml	0,586	0,547	-
	37,5 µg/ml	0,571	0,604	-
	50 µg/ml	0,604	0,609	-
	75 µg/ml	0,477	0,602	-
+ 5637-Exosomen	25 µg/ml	0,555	0,572	-
	37,5 µg/ml	0,520	0,602	-
	50 µg/ml	0,523	0,533	-
	75 µg/ml	0,489	0,544	-
+ T24-Exosomen	50 µg/ml	0,482	0,481	-
	37,5 µg/ml	0,569	0,537	0,535
	50 µg/ml	0,584	0,546	0,529
	75 µg/ml	0,584	0,547	0,597
+ 253J-BV-Exosomen	25 µg/ml	0,559	0,519	0,536
	37,5 µg/ml	0,592	0,557	0,522
	50 µg/ml	0,530	0,543	0,550
	75 µg/ml	0,580	0,605	0,570
6. Versuch				
Blank		0,040	0,038	0,036
Ø Exosomen		0,861	0,813	0,789
+ RT112-Exosomen	50 µg/ml	0,923	0,879	-
	75 µg/ml	0,976	0,923	0,886
	100 µg/ml	0,919	0,955	-
+ 5637-Exosomen	50 µg/ml	0,899	0,849	0,836
	75 µg/ml	0,935	0,895	0,888
	100 µg/ml	0,945	0,971	-
+ T24-Exosomen	50 µg/ml	0,843	0,900	0,826
	75 µg/ml	0,905	0,880	0,884
	100 µg/ml	0,869	0,881	0,955
+ 253J-BV-Exosomen	50 µg/ml	0,826	0,837	-
	75 µg/ml	0,882	0,853	0,851
	100 µg/ml	0,816	0,855	0,879
7. Versuch				
Blank		0,040	0,038	0,040
Ø Exosomen		0,542	0,503	0,519
+ T24-Exosomen	50 µg/ml	0,587	0,643	0,623
	75 µg/ml	0,582	0,622	0,599
+ 253J-BV-Exosomen	50 µg/ml	0,612	0,632	-
	75 µg/ml	0,646	0,674	-
	100 µg/ml	0,691	0,655	-

Tabelle 45: Absorptionswerte für die Bestimmung der Proliferation von hTERT-immortalisierten Vorhautfibroblasten nach 48-stündiger Stimulation mit tumor-assoziierten Exosomen einer invasiven und einer nicht invasiven UBC-Zelllinien und zelleigenen Exosomen

1. Versuch				
Ansatz	Exosomen-Konzentration	Absorption		
Blank		0,037	0,040	0,038
Ø Exosomen		0,458	0,497	0,529
+ T24-Exosomen	2,5 µg/ml	0,531	0,547	0,487
	5 µg/ml	0,579	0,581	0,526
	7,5 µg/ml	0,474	0,512	0,516
	12,5 µg/ml	0,539	0,551	0,568
	25 µg/ml	0,535	0,518	0,644
+ RT112-Exosomen	2,5 µg/ml	0,486	0,492	-
	5 µg/ml	0,519	0,491	-
	7,5 µg/ml	0,543	0,502	0,519
	12,5 µg/ml	0,553	0,597	0,597
	25 µg/ml	0,566	0,611	0,563
+ hTERT-FB-Exosomen	2,5 µg/ml	0,605	0,545	0,662
	5 µg/ml	0,615	0,635	0,596
	7,5 µg/ml	0,582	0,591	0,546
	12,5 µg/ml	0,669	0,544	0,547
	25 µg/ml	0,605	0,606	0,639
2. Versuch				
Blank		0,055	0,058	0,060
Ø Exosomen		0,383	0,385	0,350
+ T24-Exosomen	25 µg/ml	0,467	0,456	0,473
	37,5 µg/ml	0,380	0,428	0,370
	50 µg/ml	0,464	0,436	0,497
	75 µg/ml	0,425	0,390	0,483
+ RT112-Exosomen	25 µg/ml	0,441	0,431	-
	37,5 µg/ml	0,467	0,463	-
	50 µg/ml	0,464	-	-
	75 µg/ml	0,484	0,509	-
+ hTERT-FB-Exosomen	25 µg/ml	0,517	0,516	0,437
	37,5 µg/ml	0,501	0,478	0,479
	50 µg/ml	0,453	0,490	0,486
	75 µg/ml	0,456	0,513	0,536

12,5 µg/ml Exosomen

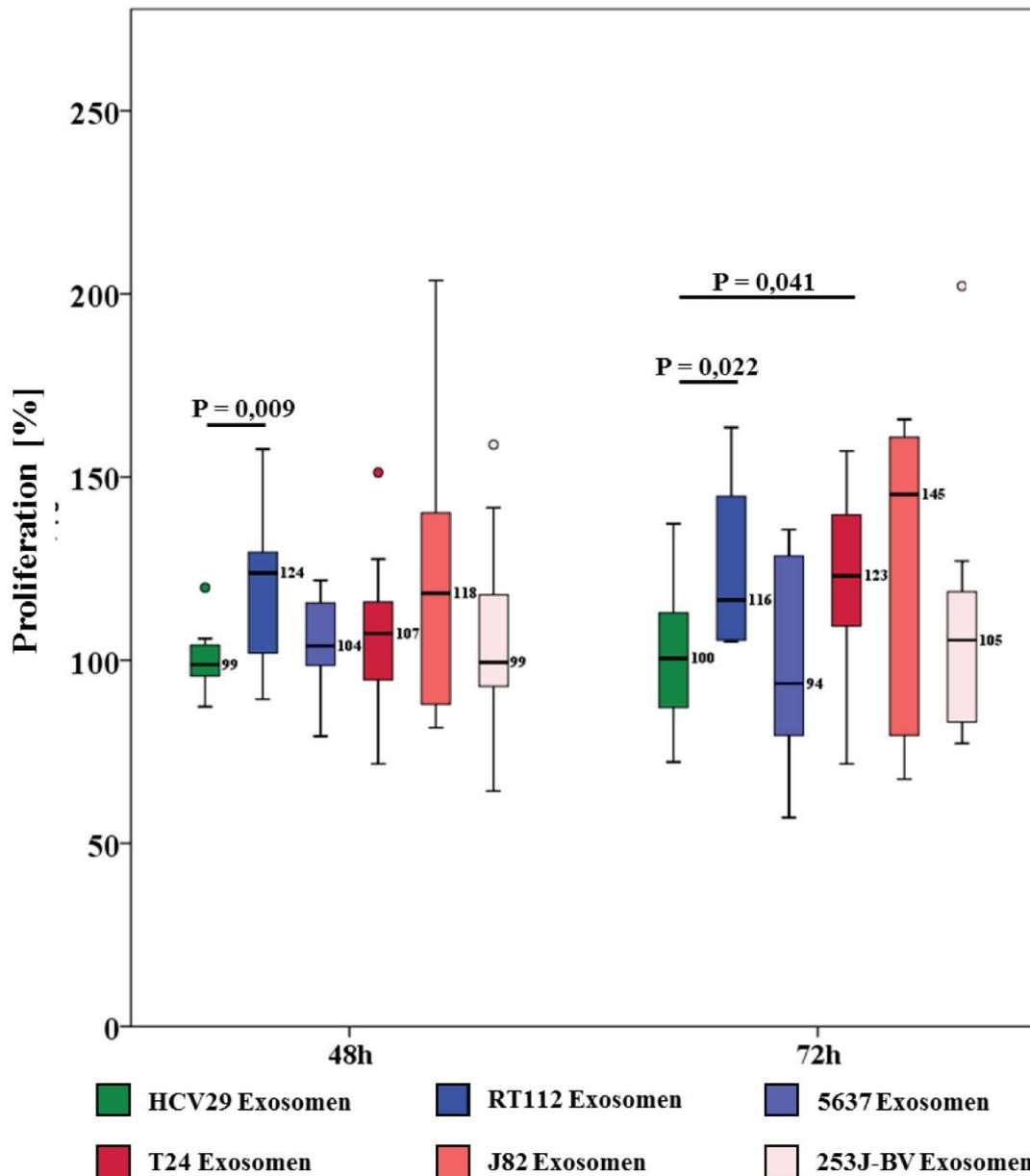


Abbildung 46: Proliferation von normalen primären Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit normalen Harnblasenexosomen und tumor-assoziierten Exosomen sezerniert durch unterschiedliche UBC-Zellen

Die Proliferation von normalen primären Harnblasenfibroblasten wurde nach Stimulation (48 h; 72 h) mit 12,5 µg/ml normalen Harnblasenexosomen (HCV29; grün; n = 18) und Exosomen sezerniert von unterschiedliche UBC-Zellen (invasiv:T24; J82; 253J-BV; n = 8-20; nicht invasiv: RT112; 5637; n = 6-15) analysiert. Die Normalisierung der Ergebnisse erfolgte auf Zellen die mit normalen Exosomen behandelt wurden. Die statistischen Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney U Tests berechnet. (P = P-Wert; Absorptionwerte: Anhang Tab. 47, 48)

25 µg/ml Exosomen

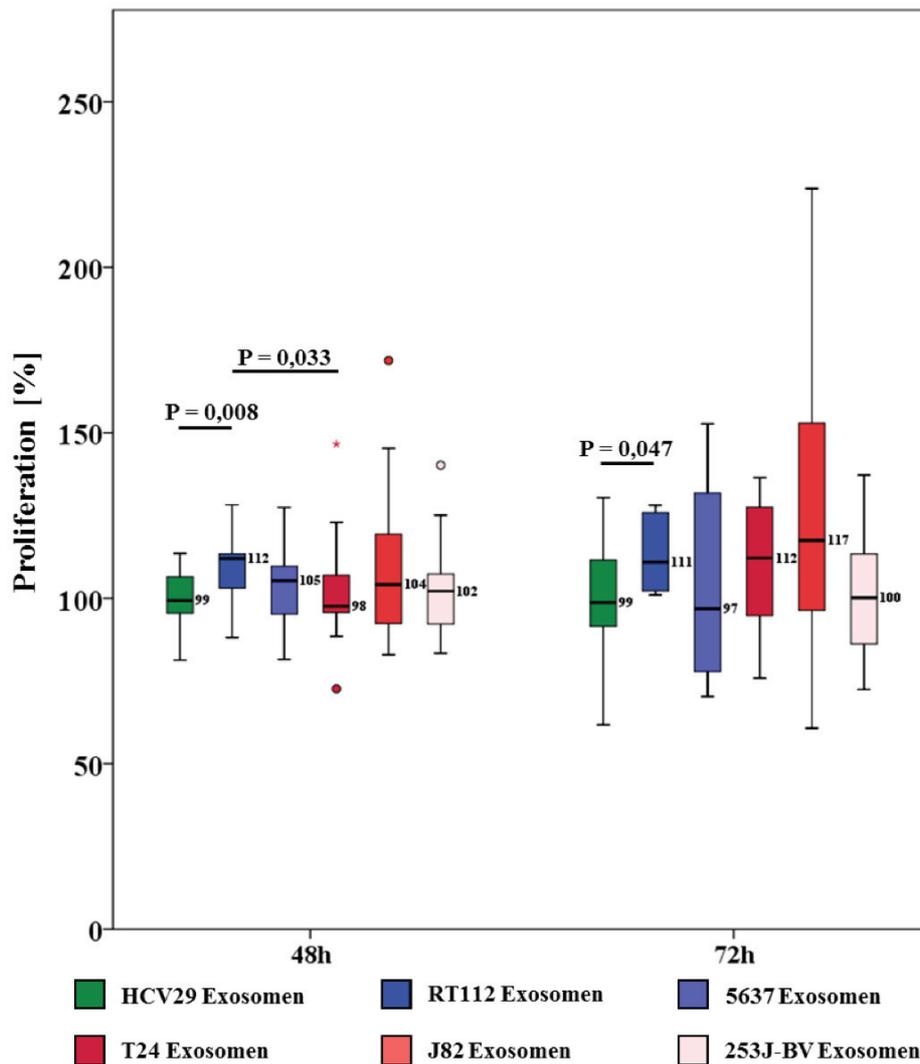


Abbildung 47: Proliferation von normalen primären Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit normalen Harnblasenexosomen und tumor-assoziierten Exosomen sezerniert durch unterschiedliche UBC-Zellen

Die Proliferation von normalen primären Harnblasenfibroblasten wurde nach Stimulation (48 h; 72 h) mit 25 µg/ml normalen Harnblasenexosomen (HCV29; grün; n = 18) und Exosomen sezerniert von unterschiedliche UBC-Zellen (invasiv:T24; J82; 253J-BV; n = 8-20; nicht invasiv: RT112; 5637; n = 6-15) analysiert. Die Normalisierung der Ergebnisse erfolgte auf Zellen die mit normalen Exosomen behandelt wurden. Die statistischen Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney U Tests berechnet. (P = P-Wert; Absorptionswerte: Anhang Tab. 47, 48)

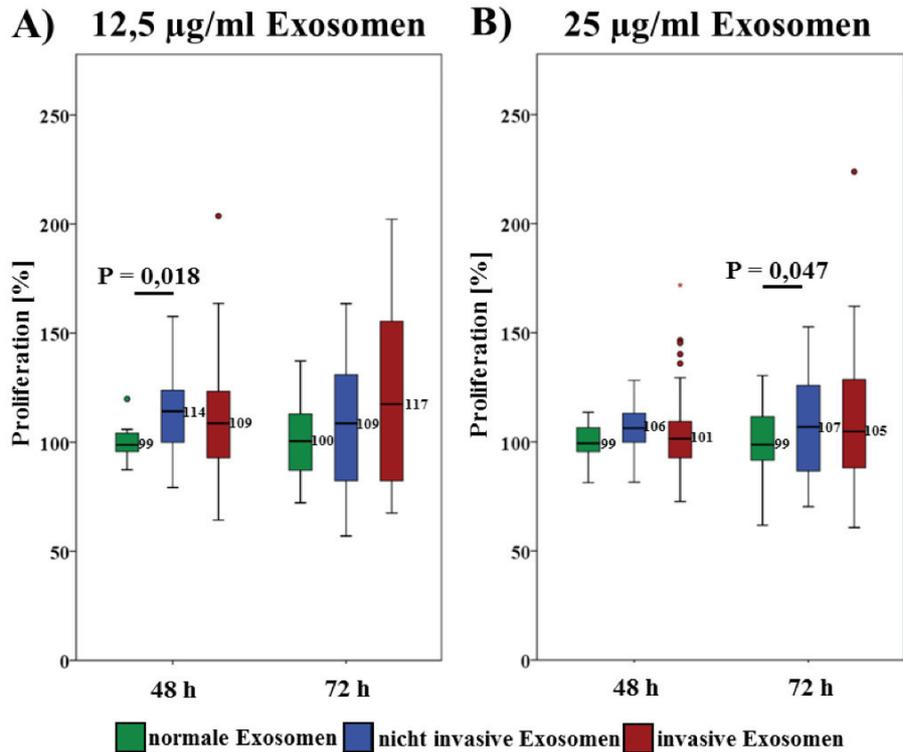


Abbildung 48: Proliferation von normalen primären Harnblasenfibroblasten nach Stimulation mit normaler Harnblasenexosomen und tumor-assoziierten Exosomen sezerniert durch invasive und nicht invasive UBC-Zellen

Die Proliferation von normalen primären Harnblasenfibroblasten wurde nach Stimulation (48 h; 72 h) mit A) 12,5 µg/ml und B) 25 µg/ml normalen Harnblasenexosomen (HCV29; grün; n = 9-18) und Exosomen sezerniert von invasiven (T24; J82; 253J-BV; rot; invasive Exosomen: n = 26-54) und nicht invasiven (RT112; 5637; blau; nicht invasive Exosomen: n = 16-30) UBC-Zellen analysiert. Die Normalisierung der Ergebnisse erfolgte auf Zellen die mit normalen Exosomen behandelt wurden. Die statistischen Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney U Tests berechnet. (P = P-Wert; Absorptionswerte: Anhang Tab. 47, 48)

Tabelle 46: Absorptionswerte der Proliferationsmessung von normalen Harnblasenfibroblasten nach Stimulation (24 h) mit tumor-assoziierten Exosomen und normalen Harnblasenexosomen

1. Versuch				
Ansatz	Exosomenmenge	Absorption		
Blank		0,038	0,037	0,038
Ø Exosomen		0,283	0,284	0,287
+ HCV29-Exosomen	5 µg/ml	0,305	0,296	0,331
	12,5 µg/ml	0,328	0,348	0,339
	25 µg/ml	0,326	0,338	0,335
+ RT112-Exosomen	5 µg/ml	0,346	0,324	0,295
	12,5 µg/ml	0,329	0,323	0,333
	25 µg/ml	0,405	0,364	0,362
+ 5637-Exosomen	5 µg/ml	0,282	0,287	0,319
	12,5 µg/ml	0,313	0,294	0,320
	25 µg/ml	0,341	0,332	0,293
+ T24-Exosomen	5 µg/ml	0,249	0,288	0,290
	12,5 µg/ml	0,295	0,325	0,291
	25 µg/ml	0,358	0,312	0,314
+ J82-Exosomen	5 µg/ml	0,335	0,303	0,295
	12,5 µg/ml	0,348	0,329	0,351
	25 µg/ml	0,321	0,352	0,347
+ 253J-BV-Exosomen	5 µg/ml	0,276	0,344	0,316
	12,5 µg/ml	0,304	0,286	0,322
	25 µg/ml	0,324	0,357	0,319
2. Versuch				
Blank		0,040	0,038	0,037
Ø Exosomen		0,089	0,069	0,078
+ HCV29-Exosomen	5 µg/ml	0,070	0,073	0,072
	12,5 µg/ml	0,077	0,069	0,080
	25 µg/ml	0,097	0,089	0,079
+ RT112-Exosomen	5 µg/ml	0,109	0,072	0,075
	12,5 µg/ml	0,105	0,094	0,086
	25 µg/ml	0,099	0,097	0,096
+ 5637-Exosomen	5 µg/ml	0,070	0,072	0,069
	12,5 µg/ml	0,080	0,065	0,087
	25 µg/ml	0,086	0,079	0,089
+ T24-Exosomen	5 µg/ml	0,082	0,086	0,081
	12,5 µg/ml	0,083	0,097	0,083
	25 µg/ml	0,077	0,086	0,086
+ J82-Exosomen	5 µg/ml	0,069	0,070	0,080
	12,5 µg/ml	0,079	0,084	0,075
	25 µg/ml	0,126	0,098	0,085
+ 253J-BV-Exosomen	5 µg/ml	0,146	0,087	0,072
	12,5 µg/ml	0,086	0,083	0,092
	25 µg/ml	0,068	0,079	0,080
3. Versuch				
Blank		0,037	0,039	0,041
Ø Exosomen		0,068	0,058	0,066
+ HCV29-Exosomen	5 µg/ml	0,081	0,077	0,075
	12,5 µg/ml	0,065	0,076	0,075
	25 µg/ml	0,086	0,077	0,079
+ RT112-Exosomen	5 µg/ml	0,078	0,075	0,073
	12,5 µg/ml	0,078	0,086	0,083
	25 µg/ml	0,081	0,080	0,087
+ 5637-Exosomen	5 µg/ml	0,054	0,056	0,078
	12,5 µg/ml	0,065	0,068	0,083
	25 µg/ml	0,071	0,071	0,079

+ T24-Exosomen	5 µg/ml	0,064	0,067	0,071
	12,5 µg/ml	0,068	0,074	0,068
	25 µg/ml	0,081	0,081	0,074
+ J82-Exosomen	5 µg/ml	0,071	0,069	0,063
	12,5 µg/ml	0,078	0,082	0,085
	25 µg/ml	0,085	0,083	0,082
+ 253J-BV-Exosomen	5 µg/ml	0,074	0,069	0,065
	12,5 µg/ml	0,060	0,077	0,069
	25 µg/ml	0,074	0,075	0,084

Tabelle 47: Absorptionswerte der Proliferationsmessung von normalen Harnblasenfibroblasten nach 48-stündiger Stimulation mit tumor-assoziierten Exosomen und normalen Harnblasenexosomen

1. Versuch				
Ansatz	Exosomen-Konzentration	Absorption		
Blank		0,042	0,046	0,043
Ø Exosomen		0,335	0,349	0,330
+ HCV29-Exosomen	2,5 µg/ml	0,297	0,319	0,367
	5 µg/ml	0,320	0,382	0,351
	12,5 µg/ml	0,339	0,327	0,312
	25 µg/ml	0,382	0,303	0,340
	50 µg/ml	0,451	0,372	0,340
+ RT112-Exosomen	2,5 µg/ml	0,360	0,497	0,390
	5 µg/ml	0,444	0,594	0,404
	12,5 µg/ml	0,489	0,438	0,376
	25 µg/ml	0,346	0,388	0,426
	50 µg/ml	0,536	0,420	0,396
+ 5637-Exosomen	2,5 µg/ml	0,312	0,347	0,301
	5 µg/ml	0,345	0,386	0,363
	12,5 µg/ml	0,337	0,342	0,388
	25 µg/ml	0,389	0,325	0,375
	50 µg/ml	0,453	0,350	0,340
+ T24-Exosomen	2,5 µg/ml	0,439	0,333	0,458
	5 µg/ml	0,338	0,392	0,449
	12,5 µg/ml	0,385	0,364	0,367
	25 µg/ml	0,408	0,355	0,335
	50 µg/ml	0,368	0,408	-
+ J82-Exosomen	2,5 µg/ml	0,334	0,375	0,363
	5 µg/ml	0,392	0,446	0,352
	12,5 µg/ml	0,292	0,619	0,506
	25 µg/ml	0,412	0,556	0,429
	50 µg/ml	0,451	0,417	0,389
+ 253J-BV-Exosomen	2,5 µg/ml	0,388	0,315	0,306
	5 µg/ml	0,470	0,336	0,321
	12,5 µg/ml	0,356	0,444	0,387
	25 µg/ml	0,346	0,301	0,461
	50 µg/ml	0,418	0,461	0,393
2. Versuch				
Blank		0,042	0,046	0,043
Ø Exosomen		0,335	0,349	0,330
+ HCV29-Exosomen	5 µg/ml	0,334	0,368	0,379
	12,5 µg/ml	0,367	0,375	-
	25 µg/ml	0,393	0,376	-
	50 µg/ml	0,342	0,453	0,435
+ RT112-Exosomen	5 µg/ml	0,440	0,456	0,445
	12,5 µg/ml	0,476	0,455	0,449
	25 µg/ml	0,444	0,426	0,426
	50 µg/ml	0,408	0,405	0,505

+ 5637-Exosomen	5 µg/ml	0,321	0,407	0,360
	12,5 µg/ml	0,360	0,429	0,428
	25 µg/ml	0,449	0,423	0,478
	50 µg/ml	0,358	0,436	0,407
+ T24-Exosomen	5 µg/ml	0,404	0,392	0,366
	12,5 µg/ml	0,539	0,386	0,461
	25 µg/ml	0,501	0,376	0,370
	50 µg/ml	0,456	0,442	0,432
+ J82-Exosomen	5 µg/ml	0,373	0,370	0,398
	12,5 µg/ml	0,331	0,425	-
	25 µg/ml	0,393	0,337	-
	50 µg/ml	0,354	0,401	0,355
+ 253J-BV-Exosomen	5 µg/ml	0,344	0,344	0,408
	12,5 µg/ml	0,363	0,400	-
	25 µg/ml	0,367	0,339	0,461
	50 µg/ml	0,372	0,461	0,441
3. Versuch				
Blank		0,044	0,043	0,046
Ø Exosomen		0,322	0,330	0,333
+ HCV29-Exosomen	5 µg/ml	0,404	0,408	0,360
	12,5 µg/ml	0,320	0,304	0,400
	25 µg/ml	0,415	0,324	0,425
	50 µg/ml	0,367	0,329	0,379
+ RT112-Exosomen	5 µg/ml	0,431	0,405	0,425
	12,5 µg/ml	0,421	0,353	0,383
	25 µg/ml	0,429	0,406	0,434
	50 µg/ml	0,424	0,433	0,441
+ 5637-Exosomen	5 µg/ml	0,345	0,386	0,363
	12,5 µg/ml	0,337	0,342	0,388
	25 µg/ml	0,389	0,325	0,375
	50 µg/ml	0,453	0,350	0,340
+ T24-Exosomen	5 µg/ml	0,372	0,352	0,446
	12,5 µg/ml	0,366	0,393	0,375
	25 µg/ml	0,337	0,427	0,361
	50 µg/ml	0,368	0,371	-
+ J82-Exosomen	5 µg/ml	0,415	0,384	0,486
	12,5 µg/ml	0,461	0,443	0,468
	25 µg/ml	0,435	0,455	0,407
	50 µg/ml	0,359	0,399	0,432
+ 253J-BV-Exosomen	5 µg/ml	0,372	0,434	0,412
	12,5 µg/ml	0,387	0,516	0,452
	25 µg/ml	0,424	0,413	-
	50 µg/ml	0,459	0,461	-
4. Versuch				
Blank		0,042	0,046	0,043
Ø Exosomen		0,335	0,349	0,330
+ HCV29-Exosomen	5 µg/ml	0,189	0,191	0,197
	12,5 µg/ml	0,202	0,191	-
	25 µg/ml	0,208	0,194	0,189
+ RT112-Exosomen	5 µg/ml	0,238	0,245	0,219
	12,5 µg/ml	0,249	0,196	0,234
	25 µg/ml	0,247	0,197	0,226
+ 5637-Exosomen	5 µg/ml	0,200	0,157	0,192
	12,5 µg/ml	0,233	0,211	0,180
	25 µg/ml	0,168	0,269	0,208
+ T24-Exosomen	5 µg/ml	0,195	0,200	0,201
	12,5 µg/ml	0,198	0,206	0,186

	25 µg/ml	0,190	0,199	0,197
+ J82-Exosomen	5 µg/ml	0,164	0,202	0,206
	12,5 µg/ml	0,246	0,225	0,204
	25 µg/ml	0,217	0,185	0,203
+ 253J-BV-Exosomen	5 µg/ml	0,196	0,188	0,224
	12,5 µg/ml	0,194	0,188	0,224
	25 µg/ml	0,203	0,211	0,236
5. Versuch				
Blank		0,0371	0,0380	0,0392
Ø Exosomen		0,1773	0,1747	0,1461
+ HCV29-Exosomen	5 µg/ml	0,1773	0,1630	0,1448
	12,5 µg/ml	0,1725	0,1705	0,1836
	25 µg/ml	0,1751	0,1830	0,1712
+ 5637-Exosomen	5 µg/ml	0,1965	0,1820	0,1650
	12,5 µg/ml	0,1968	0,1773	-
	25 µg/ml	0,1685	0,1590	0,1582
+ T24-Exosomen	5 µg/ml	0,1528	0,1763	-
	12,5 µg/ml	0,1700	0,1723	-
	25 µg/ml	0,1730	0,1661	0,2028
+ J82-Exosomen	5 µg/ml	0,1698	0,1632	0,1993
	12,5 µg/ml	0,1814	0,2360	0,2243
	25 µg/ml	0,1867	0,2261	0,2391
+ 253J-BV-Exosomen	5 µg/ml	0,1727	0,1466	-
	12,5 µg/ml	0,1405	0,1657	0,1747
	25 µg/ml	0,1493	0,1794	0,1858
6. Versuch				
Blank		0,052	0,051	0,058
Ø Exosomen		0,353	0,418	0,393
+ HCV29-Exosomen	5 µg/ml	0,377	0,390	0,453
	12,5 µg/ml	0,513	0,565	-
	25 µg/ml	0,500	0,452	0,079
+ RT112-Exosomen	5 µg/ml	0,506	0,474	0,448
	12,5 µg/ml	0,518	0,507	0,487
	25 µg/ml	0,532	0,488	0,503
+ 5637-Exosomen	5 µg/ml	0,429	0,442	0,392
	12,5 µg/ml	0,462	0,438	0,558
	25 µg/ml	0,501	0,473	0,539
+ T24-Exosomen	5 µg/ml	0,477	0,388	0,379
	12,5 µg/ml	0,445	0,453	0,401
	25 µg/ml	0,465	0,482	0,463
+ J82-Exosomen	5 µg/ml	0,464	0,438	0,442
	12,5 µg/ml	0,449	0,451	0,479
	25 µg/ml	0,483	0,462	0,427
+ 253J-BV-Exosomen	5 µg/ml	0,431	0,436	-
	12,5 µg/ml	0,366	0,401	0,486
	25 µg/ml	0,443	0,486	0,496

Tabelle 48: Absorptionswerte der Proliferationsmessung von normalen Harnblasenfibroblasten nach 72-stündiger Stimulation mit tumor-assoziierten Exosomen verschiedener UBC-Zelllinien und normalen Harnblasenexosomen

1. Versuch			
Ansatz	Exosomen-Konzentration	Absorption	
Blank		0,031	0,033
Ø Exosomen		0,050	0,062
+ HCV29-Exosomen	5 µg/ml	0,057	0,060
		0,063	0,066
	12,5 µg/ml	0,055	0,057
		0,071	0,072
	25 µg/ml	0,061	0,060
		0,063	0,069
+ RT112-Exosomen	5 µg/ml	0,064	0,058
	12,5 µg/ml	0,065	0,070
	25 µg/ml	0,068	0,071
+ 5637-Exosomen	5 µg/ml	0,060	0,066
	12,5 µg/ml	0,050	0,058
	25 µg/ml	0,054	0,056
+ T24-Exosomen	5 µg/ml	0,059	0,059
	12,5 µg/ml	0,068	0,082
	25 µg/ml	0,065	0,075
+ J82-Exosomen	5 µg/ml	0,058	0,063
	12,5 µg/ml	0,082	0,083
	25 µg/ml	0,062	0,083
+ 253J-BV-Exosomen	5 µg/ml	0,056	0,058
	12,5 µg/ml	0,056	0,066
	25 µg/ml	0,062	0,064
2. Versuch			
Blank		0,033	0,034
Ø Exosomen		0,058	0,068
+ HCV29-Exosomen	5 µg/ml	0,057	0,060
		0,063	0,066
	12,5 µg/ml	0,055	0,057
		0,071	0,072
	25 µg/ml	0,061	0,060
		0,063	0,069
+ RT112-Exosomen	5 µg/ml	0,064	0,058
	12,5 µg/ml	0,065	0,070
	25 µg/ml	0,068	0,071
+ 5637-Exosomen	5 µg/ml	0,060	0,066
	12,5 µg/ml	0,050	0,058
	25 µg/ml	0,054	0,056
+ T24-Exosomen	5 µg/ml	0,059	0,059
	12,5 µg/ml	0,068	0,082
	25 µg/ml	0,065	0,075
+ J82-Exosomen	5 µg/ml	0,058	0,063
	12,5 µg/ml	0,082	0,083
	25 µg/ml	0,062	0,083
+ 253J-BV-Exosomen	5 µg/ml	0,056	0,058
	12,5 µg/ml	0,056	0,066
	25 µg/ml	0,062	0,064

3. Versuch			
Blank		0,035	0,043
Ø Exosomen		0,090	0,119
+ HCV29-Exosomen	5 µg/ml	0,098	0,097
	12,5 µg/ml	0,099	0,117
	25 µg/ml	0,109	0,143
+ RT112-Exosomen	5 µg/ml	0,127	0,119
	12,5 µg/ml	0,111	0,151
	25 µg/ml	0,127	0,151
+ 5637-Exosomen	5 µg/ml	0,097	0,103
	12,5 µg/ml	0,094	0,097
	25 µg/ml	0,115	0,132
+ T24-Exosomen	5 µg/ml	0,126	0,109
	12,5 µg/ml	0,110	0,121
	25 µg/ml	0,129	0,115
+ J82-Exosomen	5 µg/ml	0,090	0,108
	12,5 µg/ml	0,086	0,094
	25 µg/ml	0,092	0,126
+ 253J-BV-Exosomen	5 µg/ml	0,098	0,100
	12,5 µg/ml	0,094	0,126
	25 µg/ml	0,116	0,159
4. Versuch			
Blank		0,035	0,043
Ø Exosomen		0,055	0,064
+ HCV29-Exosomen	5 µg/ml	0,049	0,071
		0,060	0,065
	12,5 µg/ml	0,064	0,082
		0,064	0,071
	25 µg/ml	0,058	0,069
		0,072	0,079
+ 5637-Exosomen	5 µg/ml	0,068	0,064
	12,5 µg/ml	0,064	0,075
	25 µg/ml	-	-
+ T24-Exosomen	5 µg/ml	0,065	0,073
	12,5 µg/ml	0,061	0,078
	25 µg/ml	0,062	0,078
+ J82-Exosomen	5 µg/ml	0,059	0,058
	12,5 µg/ml	0,065	0,062
	25 µg/ml	0,064	0,072
5. Versuch			
Blank		0,026	0,027
Ø Exosomen		0,067	0,072
+ HCV29-Exosomen	5 µg/ml	0,073	0,069
		0,064	0,084
	12,5 µg/ml	0,075	0,075
		0,082	0,089
	25 µg/ml	0,066	0,073
		0,073	0,083
+ 5637-Exosomen	5 µg/ml	0,092	0,083
	12,5 µg/ml	0,098	0,099
	25 µg/ml	0,095	0,099
+ J82-Exosomen	5 µg/ml	0,118	0,093
	12,5 µg/ml	0,115	0,113
	25 µg/ml	0,094	0,132
+ 253J-BV-Exosomen	5 µg/ml	0,062	0,079
	12,5 µg/ml	0,135	0,082
	25 µg/ml	0,066	0,084

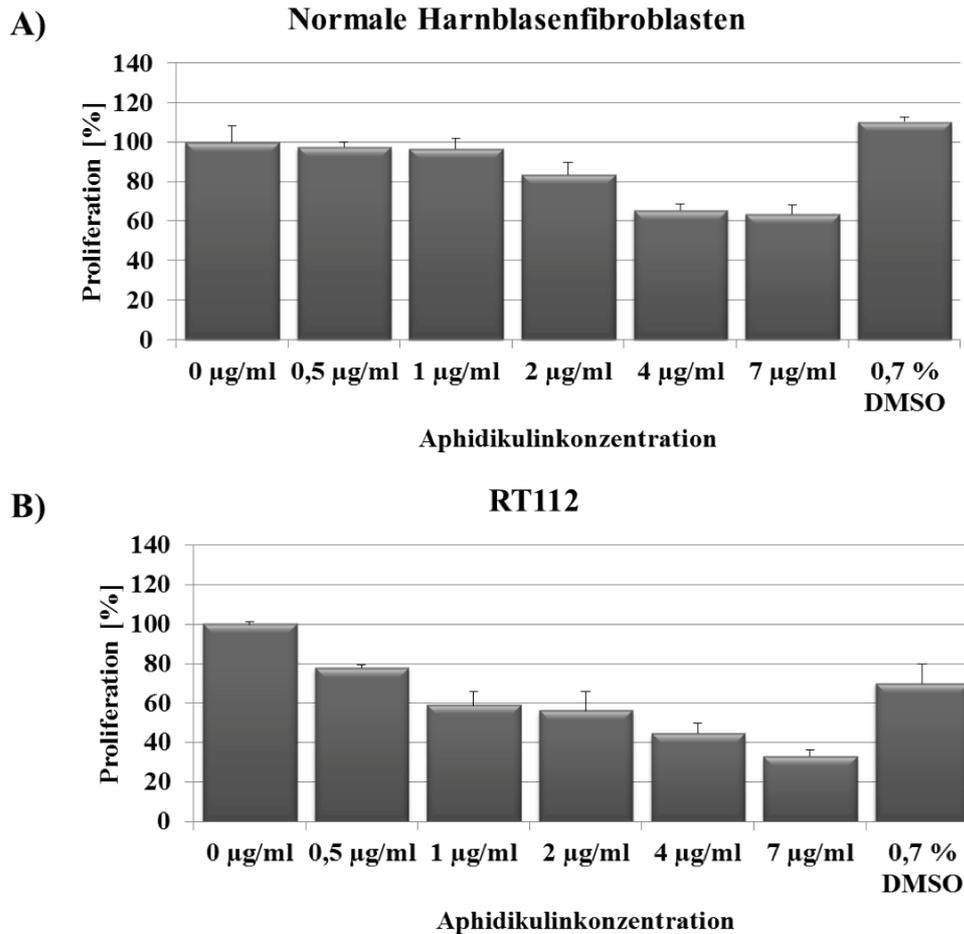


Abbildung 49: Bestimmung der geeigneten Apidiukulinkonzentration

Normale Harnblasenfibroblasten und RT112-Zellen wurden über 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen Apidikulin behandelt. Des Weiteren wurde das Lösungsmittel DMSO mit der höchsten Konzentration von 0,7 % verwendet. (Biologische Replikate: n = 3)

Tabelle 49: Absorptionswerte der Proliferationsmessung von normalen Harnblasenfibroblasten und RT112-Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit unterschiedlichen Aphidikulin-Konzentrationen und DMSO

Ansatz	Konzentration	Absorption		
Blank		0,056	0,054	0,060
		0,052	0,051	0,058
Harnblasenfibroblasten	0 µg/ml Aphi	0,538	0,675	0,524
	0,5 µg/ml Aphi	-	0,581	0,554
	1 µg/ml Aphi	0,566	0,611	0,511
	2 µg/ml Aphi	0,513	0,423	0,541
	4 µg/ml Aphi	0,427	0,362	0,401
	7 µg/ml Aphi	0,422	0,352	-
	0,7% DMSO	0,648	0,608	0,646
RT112	0 µg/ml Aphi	-	0,819	0,834
	0,5 µg/ml Aphi	-	0,666	0,645
	1 µg/ml Aphi	0,586	0,494	0,447
	2 µg/ml Aphi	0,468	0,402	0,594
	4 µg/ml Aphi	0,442	0,340	0,414
	7 µg/ml Aphi	0,284	0,334	-
	0,7% DMSO	0,707	0,538	0,539

Tabelle 50: Absorptionswerte des Boyden Chamber Assays für die Bestimmung der Migration von normalen Harnblasenfibroblasten nach 48-stündiger Stimulation mit unterschiedlichen Exosomen sezerniert von UBC-Zelllinien und normalen Harnblasenzellen

1. Versuch				
Blank		0,036	0,036	0,036
Ø Exosomen	1	0,113	0,115	0,116
	2	0,120	0,125	0,121
+ HCV29-Exosomen	1	0,113	0,113	0,114
	2	0,122	0,121	0,122
+ RT112-Exosomen	1	0,144	0,143	0,146
	2	0,152	0,154	0,155
+ 5637-Exosomen	1	0,112	0,113	0,113
	2	0,118	0,118	0,117
+ T24-Exosomen	1	0,122	0,120	0,123
	2	0,118	0,119	0,120
+ J82-Exosomen	1	0,127	0,129	0,131
	2	0,135	0,137	0,137
+ 253J-BV-Exosomen	1	0,138	0,137	0,139
	2	0,130	0,137	0,138
2. Versuch				
Blank		0,036	0,036	0,036
Ø Exosomen	1	0,134	0,134	0,136
	2	0,180	0,179	0,178
+ HCV29-Exosomen	1	0,214	0,215	0,218
	2	0,184	0,189	0,187
+ 5637-Exosomen	1	0,182	0,187	0,186
	2	0,243	0,241	0,237
+ J82-Exosomen	1	0,208	0,212	0,203
	2	0,184	0,186	0,187
	3	0,201	0,199	0,199
	4	0,212	0,215	0,216
+ 253J-BV-Exosomen	1	0,214	0,215	0,218
	2	0,184	0,189	0,187
3. Versuch				
Blank		0,036	0,035	0,035
Ø Exosomen	1	0,084	0,084	0,083
	2	0,153	0,151	0,152
+ HCV29-Exosomen	1	0,076	0,079	0,077
	2	0,116	0,116	0,116
+ RT112-Exosomen	1	0,156	0,158	0,157
	2	0,144	0,142	0,144
+ 5637-Exosomen	1	0,134	0,134	0,138
	2	0,147	0,138	0,142
+ T24-Exosomen	1	0,118	0,118	0,118
	2	0,114	0,091	0,113
+ J82-Exosomen	1	0,155	0,157	0,160
	2	0,204	0,207	0,204
+ 253J-BV-Exosomen	1	0,165	0,163	0,163
	2	0,141	0,143	0,143
4. Versuch				
Blank		0,036	0,035	0,035
Ø Exosomen	1	0,081	0,075	0,074
+ HCV29-Exosomen	1	0,075	0,075	0,075
	2	0,074	0,074	0,074
+ RT112-Exosomen	1	0,079	0,080	0,079
+ T24-Exosomen	1	0,072	0,072	0,072
	2	0,067	0,069	0,067

Tabelle 51: Absorptionswerte des Boyden Chamber Assays für die Bestimmung der Migration von normalen Harnblasenfibroblasten nach 72-stündiger Stimulation mit unterschiedlichen Exosomen sezerniert von UBC-Zelllinien und normalen Harnblasenzellen

1. Versuch				
Blank		0,036	0,035	0,035
PBS	1	0,045	0,045	0,045
	2	0,051	0,052	0,051
+ HCV29-Exosomen	1	0,047	0,047	0,047
	2	0,052	0,053	0,053
+ RT112-Exosomen	1	0,065	0,066	0,065
	2	0,061	0,061	0,062
+ 5637-Exosomen	1	0,056	0,056	0,056
	2	0,066	0,066	0,067
+ T24-Exosomen	1	0,055	0,055	0,055
	2	0,067	0,066	0,067
+ J82-Exosomen	1	0,052	0,052	0,052
	2	0,062	0,061	0,061
+ 253J-BV-Exosomen	1	0,052	0,053	0,053
	2	0,048	0,049	0,048
2. Versuch				
Blank		0,035	0,035	0,035
PBS	1	0,081	0,082	0,082
	2	0,101	0,101	0,104
+ HCV29-Exosomen	1	0,083	0,083	0,084
	2	0,090	0,087	0,089
+ RT112-Exosomen	1	0,099	0,100	0,099
	2	0,114	0,115	0,115
+ 5637-Exosomen	1	0,090	0,091	0,089
	2	0,097	0,096	0,097
+ T24-Exosomen	1	0,124	0,128	0,129
	2	0,092	0,094	0,095
+ J82-Exosomen	1	0,117	0,118	0,119
	2	0,103	0,104	0,105
+ 253J-BV-Exosomen	1	0,096	0,097	0,098
	2	0,094	0,096	0,096
3. Versuch				
Blank		0,036	0,035	0,035
PBS	1	0,126	0,132	0,133
	2	0,154	0,156	0,154
+ HCV29-Exosomen	1	0,161	0,162	0,161
	2	0,128	0,127	0,128
+ RT112-Exosomen	1	0,172	0,171	0,171
	2	0,163	0,165	0,164
+ 5637-Exosomen	1	0,131	0,132	0,131
	2	0,180	0,183	0,184
+ T24-Exosomen	1	0,154	0,157	0,154
	2	0,151	0,161	0,159
+ J82-Exosomen	1	0,147	0,144	0,145
	2	0,123	0,123	0,125
+ 253J-BV-Exosomen	1	0,144	0,147	0,147
	2	0,134	0,137	0,137
4. Versuch				
Blank		0,036	0,035	0,035
PBS	1	0,096	0,097	0,097
	2	0,092	0,093	0,093
+ HCV29-Exosomen	1	0,092	0,091	0,091
	2	0,092	0,093	0,093
+ RT112-Exosomen	1	0,115	0,115	0,116

	2	0,093	0,093	0,095
+ 5637-Exosomen	1	0,108	0,106	0,108
+ T24-Exosomen	1	0,101	0,098	0,097
+ J82-Exosomen	1	0,094	0,093	0,094
	2	0,091	0,091	0,090
+ 253J-BV-Exosomen	1	0,088	0,088	0,088
	2	0,089	0,090	0,091
5. Versuch				
Blank		0,036	0,036	0,036
PBS	1	0,119	0,123	0,123
	2	0,086	0,086	0,087
+ HCV29-Exosomen	1	0,116	0,119	0,120
	2	0,119	0,121	0,126
+ RT112-Exosomen	1	0,108	0,109	0,112
+ 5637-Exosomen	1	0,126	0,128	0,127
	2	0,121	0,123	0,122
+ T24-Exosomen	1	0,101	0,101	0,102
	2	0,103	0,103	0,104
+ J82-Exosomen	1	0,106	0,106	0,106
	2	0,104	0,105	0,106
+ 253J-BV-Exosomen	1	0,104	0,107	0,107
	2	0,145	0,142	0,144

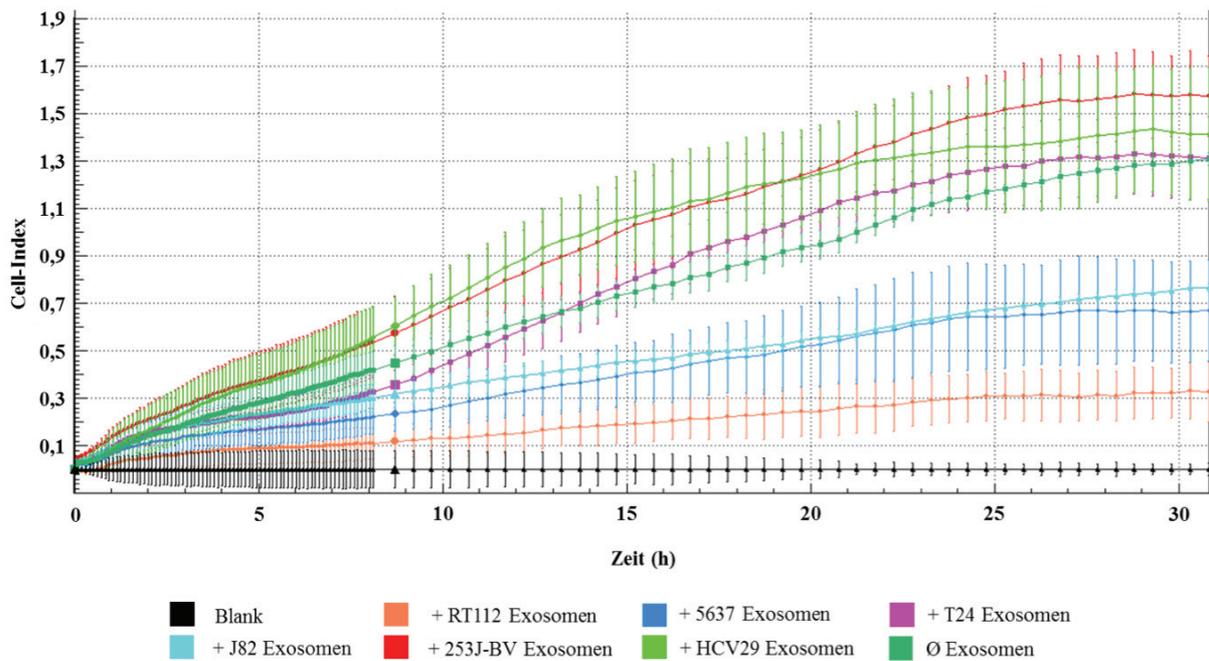


Abbildung 50: Kurvenverlauf der in Echtzeit-gemessenen Migration von normalen Harnblasenfibroblasten nach 48-stündiger Stimulation mit normalen und tumor-assoziierten Exosomen

Tabelle 52: CI-Werte von normalen Harnblasenfibroblasten nach 48-stündiger Stimulation mit unterschiedlichen Exosomen sezerniert von UBC-Zelllinien und normalen Harnblasenzellen

Ansatz	1.Versuch		2. Versuch		3.Versuch	
Blank	0,236	0,273	0,071	0,141	0,029	-
Ø Exosomen	1,469	1,403	1,766	1,409	0,567	-
+ HCV29-Exosomen	1,461	1,773	0,556	0,770	0,923	0,666
+ RT112-Exosomen	0,479	0,626	0,590	0,702	0,440	0,400
+ 5637-Exosomen	0,737	1,045	0,890	0,781	0,540	0,598
+ T24-Exosomen	1,657	1,849	0,519	0,737	0,210	0,245
+ J82-Exosomen	0,913	0,913	0,628	1,120	0,470	0,561
+ 253J-BV-Exosomen	0,499	0,648	1,163	0,801	0,458	0,323

Tabelle 53: CI-Werte von normalen Harnblasenfibroblasten nach 72-stündiger Stimulation mit unterschiedlichen Exosomen sezerniert von UBC-Zelllinien und normalen Harnblasenzellen

Ansatz	1.Versuch		2.Versuch		3.Versuch		4.Versuch	
Blank	0,302	0,201	0,166	0,057	0,048	0,063	-	0,084
Ø Exosomen	0,539	0,887	-	-	0,689	0,280	0,134	0,201
+ HCV29-Exosomen	0,548	0,765	0,857	1,292	0,552	0,580	0,578	0,554
+ RT112-Exosomen	0,516	0,670	0,636	0,639	0,283	0,340	0,279	0,306
+ 5637-Exosomen	0,365	0,422	0,739	0,761	0,513	0,483	0,162	0,020
+ T24-Exosomen	1,498	1,562	0,761	0,680	0,828	0,780	0,417	0,629
+ J82-Exosomen	0,833	0,907	0,674	0,716	0,286	0,337	0,482	0,612
+ 253J-BV-Exosomen	0,609	0,542	0,593	0,418	1,114	0,795	0,016	0,126

Publikationsliste

Publikationen

S. Baumgart, S. Holters, C. H. Ohlmann, R. Bohle, M. Stoeckle, M. S. Ostefeld, L. Dyrskjot, K. Junker, and J. Heinzelmann, „Exosomes of invasive urothelial carcinoma cells are characterized by a specific miRNA expression signature”, *Oncotarget* (2017).

J. Heinzelmann, B. Stubendorff, V. Jung, S. Baumgart, S. Holters, G. Unteregger, J. Grimm, J. Linxweiler, M. Janssen, C. H. Ohlmann, M. Saar, S. Siemer, M. Stoeckle, and K. Junker, „Epigenetic regulation of urological tumors. Importance for prognosis and metastasis]“, *Urologe A*, 54 (2015), 832-8.

J. Heinzelmann, A. Unrein, U. Wickmann, S. Baumgart, M. Stapf, A. Szendroi, M. O. Grimm, M. R. Gajda, H. Wunderlich, and K. Junker, 'MicroRNAs with prognostic potential for metastasis in clear cell renal cell carcinoma: A comparison of primary tumors and distant metastases', *Ann Surg Oncol*, 21 (2014), 1046-54

Publizierte Abstracts

S. Baumgart, J. Heinzelmann, E. Krause, M. Stöckle, M. Stampe Ostefeld, and K. Junker, „Tumor-associated exosomes of urothelial bladder cancer cells affect tumor-promoting processes in normal bladder fibroblasts and support tumorigenesis”, *European Urology Supplements*, 16 (2017), e897.

S. Baumgart, J. Heinzelmann, E. Krause, M. S. Ostefeld, A. Hartmann, M. Stoeckle, and K. Junker, „Exosomal miRNAs: Key regulators of cell-cell communication between bladder cancer cells and tumor microenvironment”, *Journal of Urology*, 195 (2016), E607-E07.

J. Heinzelmann, S. Baumgart, S. Hoelters, M. Janssen, M. Stöckle, and K. Junker, „Blood Based exosomal miRNAs as biomarkers for diagnosis and prognosis of clear cell renal cell cancer”, *European Urology Supplements*, 15 (2016), e230.

J. Heinzelmann, S. Baumgart, S. Hoelters, M. Janssen, M. Stöckle, and K. Junker, „Blood-Based exosomal miRNAs as biomarkers for diagnosis and prognosis of clear cell renal cell cancer”, *Cancer Research*, 76 (2016), 3162-62.

S. Baumgart, J. Heinzelmann, M. Stoeckle, M. Stampe Ostefeld, and K. Junker, „Characterization of miRNA expression pattern from in-vitro obtained exosomes of different urinary bladder cancer cell lines”, *Cancer Research*, 75 (2015), 5182-82.

J. Heinzelmann, S. Hoelters, R. Schneeweiss, F. Stolzenbach, S. Baumgart, M. Gajda, C. Mawrin, M. Stöckle, and K. Junker, „MicroRNAs as regulators of cellular processes in distant metastases of renal cancer”, *European Urology Supplements*, 14 (2015), e860.

J. Heinzelmann, F. Stolzenbach, R. Schneeweiss, U. Wickmann, S. Baumgart, Mieczyslaw Gajda, Michael Stöckle, and Kerstin Junker, „Specific miRNA signatures characterize different metastatic sites in clear cell renal cell carcinoma”, *Cancer Research*, 74 (2014), 1493-93.

J. Heinzelmann, S. Baumgart, U. Wickmann, A. Szendroi, A. Unrein, M. R. Gajda, M. O. Grimm, M. Stöckle, and K. Junker, “Analysis of site specific miRNA expression in distant metastases of clear cell renal cell carcinoma”, *European Urology Supplements*, 12 (2013), e774.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Frau Prof. Dr. Kerstin Junker, die mir die Möglichkeit der Bearbeitung dieses interessanten Dissertationsthemas gegeben hat. Ich danke ihr für die umfassende und ausgezeichnete Betreuung, sowie für die großzügige Unterstützung während all der Jahre und die vielen guten Anregungen und hilfreichen Ratschläge.

Bei Prof. Dr. Richard Zimmermann bedanke ich mich für die Erstbegutachtung dieser Arbeit sowie die Bereitstellung der Gerätschaften seines Institutes. In diesem Rahmen möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Martin Jung für die freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit während meiner Versuchszeit in der Medizinischen Biochemie und Molekularbiologie bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt auf Asc. Prof. Dr. Marie Stampe Ostenfeld aus dem Institut für molekular Medizin des Universitätsklinikums Aarhus in Dänemark. Sie war mir sowohl fachlich als auch persönlich während meines Forschungsaufenthaltes in Dänemark und danach eine sehr große Hilfe.

Außerdem gilt mein herzlichster Dank den Mitarbeitern der Forschungslabore in Jena, Aarhus und Homburg, mit denen die Zusammenarbeit immer großen Spaß gemacht hat und die mir stets fachlich und moralisch beigestanden haben. Ich danke euch allen und insbesondere Dr. Joana Heinzelmann und Dr. Sebastian Hölters, für die vielen fachlichen Diskussionen. Nicht zu vergessen, Herrn Thomas Gebhardt, der mit seinen herausragenden PC- und Grafikenkenntnissen die Erstellung einiger Abbildung des Einleitungsteils möglich gemacht hat. Weiterhin möchte ich Herrn Alexander Vogt und Frau Tanja Etteldorf danken, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Dem medizinischen Personal und Ärzten der Klinik für Urologie und Kinderurologie danke ich für die gut funktionierende Zusammenarbeit bei der Probengewinnung.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, die stets an mich geglaubt und mich unterstützt haben. Insbesondere möchte ich meinem Mann Raik, meiner Mutter Petra sowie meinen beiden Großeltern Monika und Peter bedanken, die immer für mich da waren.

Ich möchte diese Arbeit meinem verstorbenen Vater Knut Baumgart widmen, der leider viel zu früh von uns gegangen ist und den Weg seiner Tochter nicht miterleben konnte.