

Aus der Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie
(Prof. Dr. med. L. Trümper)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Diagnostische und funktionelle Relevanz
neutraler Sphingomyelinasen bei der
Sekretion extrazellulärer Vesikel aus
Prostatakarzinomzellen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Jan-Moritz Plum

aus

Gießen

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuerin Prof. Dr. rer. nat J. Groß

Ko-Betreuerin: Prof. Dr. med. C. Binder

Prüfungskommission

Referentin Prof. Dr. rer. nat. J. Groß

Ko-Referentin: Prof. Dr. med. C. Binder

Datum der mündlichen Prüfung: 09.02.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Diagnostische und funktionelle Relevanz neutraler Sphingomyelinasen bei der Sekretion extrazellulärer Vesikel aus Prostatakarzinomzellen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

(Jan-Moritz Plum)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Prostatakarzinome.....	1
1.2 Extrazelluläre Vesikel.....	4
1.3 Extrazelluläre Vesikel und Krebs.....	5
1.4 Neutrale Sphingomyelinasen.....	6
2 Material und Methoden.....	8
2.1 Material.....	8
2.2 Methoden.....	14
2.2.1 Zellkultur.....	14
2.2.1.1 Zellen Einfrieren und Auftauen.....	15
2.2.1.2 6-well-System für NTA, Western Blot und Proteinkonzentrationsmessung.....	15
2.2.1.3 <i>Viability assay</i> - Photometrische Messung.....	16
2.2.2 Vesikelaufreinigung mittels differentieller Zentrifugation.....	16
2.2.3 <i>Nanoparticle tracking analysis</i>	17
2.2.4 Western Blot – Vesikel und Zellextrakt.....	18
2.2.5 Immunohistochemische Färbung von <i>tissue arrays</i>	19
2.2.6 Proteinkonzentrationsmessung mittels Spektralphotometrie.....	21
2.2.7 Massenspektrometrie aufgereinigter Vesikel und deren Analyse.....	21
2.2.8 Bewertungssystem für Tumormarkerpotenzial.....	22
2.2.9 <i>Wound healing assay</i>	23
3 Ergebnisse	25
3.1 nSmase2-Gewebefärbung korreliert positiv mit Metastasierung, nSmase1 mit Tumorerkrankung an sich.....	25
3.2 RNAi vermittelter <i>knockdown</i> und Inhibition der neutralen Sphingomyelinasen beeinträchtigt die Lebensfähigkeit von Zellen der Linien PC3 und Du145 nicht.....	28
3.3 Bestätigung des <i>knockdown</i> im Western Blot.....	30

3.4	<i>Nanoparticle tracking analysis</i>	31
3.5	Western Blot der NTA-Proben.....	46
3.6	Vesikel- <i>Proteomics</i> enthüllt interessante Tumormarkerkandidaten.....	48
3.6.1	<i>Proteomics</i> und Bewertung des Tumormarkerpotenzials.....	48
3.6.2	Validierung potenzieller Kandidaten im Western Blot.....	62
3.7	Zelllinien zeigen im <i>wound healing assay</i> gegensätzliches Migrationsverhalten nach GW4869 Behandlung.....	65
4	Diskussion	73
5	Zusammenfassung	77
6	Literaturverzeichnis	79
6.1	Literaturverzeichnis des Scoringsystems.....	83

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Exemplarische Darstellung der Färbegrade	26
Abbildung 2: Grad der Gewebefärbung in Relation zum Tumorprogress.....	28
Abbildung 3: <i>Viability assay</i> von PC3-, (A) und Du145- (B) Zellen.....	29
Abbildung 4: Beispiel Western Blots von Zellextrakt.....	30
Abbildung 5: Quantifizierung der NTA Ergebnisse für PC3-Zellen	38
Abbildung 6: Quantifizierung der NTA Ergebnisse für Du145-Zellen.....	45
Abbildung 7: Western Blots der p14- und p100-Fraktion von PC3- und Du145-Zellen	48
Abbildung 8: Exemplarisches <i>heatmap-cluster</i> von PC3-Vesikeln	49
Abbildung 9: Graphische Darstellung der statistischen Analyse der Biomarkerkandidaten aus PC3-Zellen	53
Abbildung 10: Graphische Darstellung der statistischen Analyse der Biomarkerkandidaten aus Du145-Zellen	58
Abbildung 11: Schnittmenge der Tumormarkerkandidaten	61
Abbildung 12: Nachweis SRPX2 und AGRIN im Western Blot	64
Abbildung 13: Vergleich der relativen Wunddicke über 24 Stunden mit und ohne Inhibition der neutralen Sphingomyelinasen	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Geräte.....	8
Tabelle 2 – Verbrauchsmaterialien.....	9
Tabelle 3 – Chemikalien.....	10
Tabelle 4 – Medien, Lösungen und Puffer	11
Tabelle 5 – Antikörper.....	12
Tabelle 6 – Zelllinien.....	13
Tabelle 7 – Software.....	13
Tabelle 8 – Auswertung der Beurteilung der IHC Färbung	27
Tabelle 9 – Tumormarkerkandidaten aus PC3-Vesikel <i>Proteomics</i> und deren Beurteilung.....	59
Tabelle 10 – Tumormarkerkandidaten aus Du145-Vesikel <i>Proteomics</i> und deren Beurteilung....	60

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
DAB	Diaminbenzidin
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
EM	Extrazelluläre Matrix
EMMPRIN	<i>Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147)</i>
ESCRT	<i>Escort-complex</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
GNRH	Gonadotropin-releasing-Hormon
ILV	Intraluminaler Vesikel
MTA	Medizinisch technische/r Assistent/in
MVB	<i>Multivesicular bodies</i>
nSmase 1/2	Neutrale Sphingomyelinase 1 bzw. 2
NTA	<i>Nanoparticle tracking analysis</i>
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RPM	<i>Revolutions per minute</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PSM	<i>Petide spectrum matches</i>
RPKM	<i>Reads per kilobase per million</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SMPD 2/3	Gennamen der neutralen Sphingomyelinasen 1 bzw. 2
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
TBS-T	<i>Tris buffered saline with Tween20</i>

1 Einleitung

1.1 Prostatakarzinome

Prostatakarzinome sind maligne Tumoren der Vorsteherdrüse, die, wie der Begriff Karzinom definiert, aus entarteten Zellen epithelialer Herkunft bestehen (RKI 2014). Genauer sind es in 98% der Fälle Adenokarzinome, also bösartige Tumoren, die von Drüsengewebe ausgehen (RKI 2014). Sehr selten geht der Tumor von neuroendokrinen Zellen aus. Mit 23% aller maligner Neuerkrankungen bei Männern ist das Prostatakarzinom die eindeutig häufigste, gefolgt vom Lungenkarzinom mit 13,9%. Diese 23% entsprachen 2014 57 400 Neuerkrankungen in Deutschland (RKI 2014). Das mittlere Erkrankungsalter lag dabei bei 72 Jahren, wobei das Risiko zu erkranken mit dem Alter ansteigt. Je höher also das Alter eines Mannes, desto wahrscheinlicher wird die maligne Entartung des Drüsengewebes der Prostata. Die aktuelle demographische Entwicklung, besonders die Tatsache, dass die Lebenserwartung weiter ansteigt, wird also voraussichtlich zu einer Zunahme der behandlungsbedürftigen Prostatakarzinomfälle führen. Obwohl die Prävalenz höher liegt als bei allen anderen bösartigen Tumorerkrankungen, ist die Mortalität vergleichsweise niedrig. Die altersstandardisierte 5-Jahres-Überlebensrate nach Diagnose liegt bei 91%, das relative 10-Jahres-Überleben bei 90% (RKI 2014). Trotz dieser scheinbar guten Überlebenschancen ist das Prostatakarzinom mit einer standardisierten Sterberate von 19,7% nach wie vor die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache in Deutschland (RKI 2014). Diese Zahlen zeigen, dass ein noch besseres Verständnis von der Entstehung von Tumoren, deren Progress, sowie Ansatzmöglichkeiten für die gezielte Therapie, nötig ist. Die Gefahr geht beim Prostatakarzinom nicht vom Primärtumor aus, der zwar die Lebensqualität deutlich einschränkende Beschwerden wie Harnverhalt, Schmerzen beim Wasserlassen, Erektionsstörungen sowie weitere lokale Störungen verursachen kann, sondern von den Schäden, die seine Metastasen, die bevorzugt Knochen (85% der Fälle, davon 90% osteoblastisch, also Knochen aufbauend), vor allem Wirbelsäule, Oberschenkel und Becken sowie seltener Leber, Lunge und Gehirn befallen, verursachen (Hautmann und Gschwend 2014).

Ein Ansatz der steigenden Inzidenz zu begegnen, ist die Empfehlung, ab dem 45. Lebensjahr eine Screeninguntersuchung mit quantitativer Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA), sowie digital rektaler Untersuchung anzubieten (S3-Leitlinie Prostatakarzinom 2018). Je nach PSA-Wert werden dann die Zeiten bis zur nächsten Kontrolluntersuchung festgelegt. Eine europaweite, multizentrische Studie zeigte auf, dass

in der Screeninggruppe von 10 000 Männern zwölf weniger an einem Prostatakarzinom sterben, als in der Kontrollgruppe (Schröder et al. 2014). In der Screeninggruppe wurden jedoch 340 Karzinome pro 10 000 Männer mehr diagnostiziert als in der Kontrollgruppe (Schröder et al. 2014). Das bedeutet, dass eine Vielzahl an Patienten mit den teilweise gravierenden Nebenwirkungen der Behandlung, sowie der enormen psychischen Belastung einer Krebsdiagnose zu kämpfen hatte, obwohl dies für ihre Überlebenszeit möglicherweise keinen Vorteil brachte. Dies ist vor allem auf das Auftreten sogenannter latenter Prostatakarzinome zurückzuführen, die als Frühform klinisch manifester Prostatakarzinome interpretiert, und bei 40% der über 60-Jährigen gefunden werden können (Hautmann und Gschwend 2014). Warum einige davon klinisch nicht manifest werden, ist bisher nicht geklärt und Bestandteil aktueller Forschung. Daher beruht die aktuelle Empfehlung zum Thema PSA-Screening der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V., der Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und der Deutschen Krebshilfe, die gemeinsam die aktuelle S3-Leitlinien herausgegeben haben, auf der sogenannten „guten klinischen Praxis“ (S3-Leitlinie Prostatakarzinom 2018). Der Patient soll also umfassend über alle Vor- und Nachteile des Screeningverfahrens sowie vor allem über die möglichen Konsequenzen eines positiven Testergebnisses aufgeklärt werden, um dann eigenständig eine Entscheidung darüber fällen zu können, ob er die Untersuchung durchführen lassen möchte. Die Leitlinie weist dabei explizit darauf hin, dass Männer darüber aufgeklärt werden sollten, dass das Risiko an einem Prostatakarzinom zu versterben in Deutschland bei etwa 3% liegt und die Früherkennung dieses Risiko auf 2,4% bis minimal 1,8% senken kann.

Die Behandlung des Prostatakarzinoms richtet sich, ähnlich anderer Tumorerkrankungen, stark danach, in welchem Stadium der Erkrankung die Diagnose erfolgt. Die Stadien werden nach UICC (Union International Contre le Cancer) anhand der TNM-Klassifikation in Stadium 1 bis 4 eingeteilt. Ein kurativer Behandlungsansatz ist dabei nur in den Stadien 1 bis 3 gegeben, die eine lokale Ausbreitung des Tumors ohne Fernmetastasierung beinhalten. Bei Diagnose im Stadium 4 ist eine palliative Versorgung indiziert (S3-Leitlinie Prostatakarzinom 2018). Ein weiteres Maß zur Abschätzung des Risikoprofils, neben der Bestimmung der Tumorausbreitung, ist der Gleason-Score. Dieser ist eine rein histologische Einteilung, die nur in der Klassifizierung von Prostatakarzinomen Anwendung findet. Zur Sicherung der Diagnose soll bei dringendem Verdacht auf ein Prostatakarzinom eine transrektale Stanzbiopsie mit mindestens 10 – 12 Biopsieproben durchgeführt werden (S3-Leitlinie Prostatakarzinom 2018). Die Biopsieproben werden nun graduell nach ihrer Differenzierung

eingeteilt. Gewebeproben, die morphologisch gesundem Prostatagewebe am nächsten sind, erhalten den Gleason-Wert eins, diejenigen, die am wenigsten Ähnlichkeit mit gesundem Prostatagewebe haben, werden mit fünf bewertet, entsprechende Abstufungen mit zwei bis vier. Der Score errechnet sich dann aus dem Wert, der in den Biopsieproben am häufigsten gefunden wurde addiert zu dem höchsten gefundenen Wert. Somit reicht der Gleason-Score von zwei bis zehn, wobei Karzinome mit einem Score \geq sieben als prognostisch ungünstig bezeichnet werden (Hautmann und Gschwend 2014).

Tumore, die bei Diagnose lokal begrenzt sind, können durch verschiedene Methoden therapiert werden. Eine Option ist die chirurgische Therapie im Sinne einer radikalen Prostatektomie sowie Lymphadenektomie des kleinen Beckens. Die Operation kann bei adäquater Durchführung Heilung bringen, jedoch auch die Lebensqualität stark einschränkende Nebenwirkungen wie Harninkontinenz und erektile Dysfunktion verursachen. Dem gegenüber steht die Strahlentherapie, die entweder von außen als perkutane Hochvolt-Radiotherapie oder als so genannte „low dose rate“ Brachytherapie erfolgen kann, bei der radioaktive Körner bestehend aus Jod oder Palladium, sonographiegestützt in die Prostata eingebracht werden (Hautmann und Gschwend 2014). Auch eine Bestrahlung kann wirksam sein, birgt jedoch die Gefahr von Nebenwirkungen wie Prostatitis, Harninkontinenz und Impotenz (Hautmann und Gschwend 2014). Die dritte Therapieoption bei lokal begrenzten Karzinomen, die vor allem für Patienten mit niedrigem Gleason-Score, also niedrigem Risikoprofil geeignet ist, und so auch in der S3-Leitlinie festgehalten wurde, besteht in der so genannten „active surveillance“. Das bedeutet, dass die Patienten weder operiert noch bestrahlt werden, sondern sich unter aktiver Beobachtung der Ärztin/des Arztes, im Sinne regelmäßiger Kontrollen des PSA-Wertes, des Tastbefundes in der digital-rektalen Untersuchung oder weiterer Stanzbiopsien, befinden.

Das ist möglich, weil Prostatakarzinome in der Regel nur langsam wachsen und je nach Alter des Patienten die Behandlungsn Nebenwirkungen schwerwiegender wären als die voraussichtlich durch den Tumor bis zum Lebensende verursachten Beschwerden (S3-Leitlinie Prostatakarzinom 2018). Für Patienten in noch höherem Lebensalter und ebenfalls niedrigem Gleason-Score kommt außerdem das so genannte „watchful waiting“ in Frage, bei dem eine symptomorientierte, palliative Behandlung im Vordergrund steht (S3-Leitlinie Prostatakarzinom 2018). Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren sowie Lymphknoten- oder Fernmetastasierung besteht das Behandlungskonzept in der radikalen Entfernung der Prostata inklusive der Lymphknoten im Abflussgebiet oder in der Bestrahlung betroffener Gebiete. Beide Optionen werden bei diesem Tumorstadium mit einer antiandrogenen

Therapie kombiniert, die heute hauptsächlich mit GNRH-Analoga durchgeführt wird, welche nach kurzem Anstieg der Testosteronkonzentration zu einem Absinken selbiger auf Kastrationsniveau führen (Hautmann und Gschwend 2014). Diese Therapieoption kann funktionieren, da Prostatagewebe erst durch Testosteron am Leben gehalten wird (ohne Testosteron atrophiert die Prostata). Bis zu 80% der Tumorzellklone sind auch nach Entartung noch hormonsensitiv (Hautmann und Gschwend 2014). Rezidive nach Hormonablation bestehen daher häufig aus hormoninsensitiven Klonen, diese Tumoren werden dann als kastrationsresistent bezeichnet. Die Therapie selbiger ist wenig erfolgversprechend und besteht aus Symptombehandlung sowie der Gabe des Spindelgiftes Docetaxel aus der Familie der Taxane (Hautmann und Gschwend 2014). Die Erforschung weiterer diagnostischer und therapeutischer Mittel ist also nötig, um die Erkennung und Behandlung des Prostatakarzinoms in Zukunft noch effizienter zu gestalten.

1.2 Extrazelluläre Vesikel

Extrazelluläre Vesikel sind kugelförmige, von einer Lipiddoppelschicht umgebene Partikel, die von allen bisher untersuchten Zellen des Körpers, auch entarteten, sezerniert und aufgenommen werden können (Tetta et al. 2012). Erstmals wurden extrazelluläre Vesikel in den 1960er Jahren von Godman und Porter beschrieben, denen bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Chondroblasten einer Maus membranumschlossene, extrazelluläre Gebilde in unterschiedlicher Größe auffielen. Die verschiedenen Populationen extrazellulärer Vesikel unterscheiden sich in ihrer zellulären Herkunft, der Größe, sowie ihrer Funktion. Zu nennen sind in diesem Zusammenhang große Onkosomen mit 1-10 μm , die bisher nur in einzelnen Tumorentitäten wie Hirn- und Prostatatumoren beschrieben werden konnten und deren Funktion Gegenstand aktueller Forschung ist (Di Vizio et al. 2009). Weiterhin zu nennen sind Apoptosekörperchen, die mit 1000-5000 nm den größten Vertreter extrazellulärer Vesikel in nicht tumorösen Zellen darstellen, gefolgt von Mikrovesikeln mit 150-1000 nm Durchmesser und Exosomen mit 30-150 nm Durchmesser. Apoptosekörperchen entstehen, wie der Name bereits verrät, bei der Apoptose und enthalten, für die umliegenden Zellen potenziell toxisches, ehemals intrazelluläres Material und stehen aktuell ebenfalls im Fokus der Wissenschaft (Atkin Smith et al. 2017). Die in dieser Arbeit betrachteten extrazellulären Vesikel sind Mikrovesikel und Exosomen. Exosomen werden intrazellulär, in so genannten *multivesicular bodies* (MVB), durch nach innen

gewandtes Ausknospen der Membran, im Sinne intraluminaler Vesikel (ILV), gebildet. Diese MVB entsprechen späten Endosomen (Adell et al. 2014). Für die Bildung und Beladung der ILV ist der *endosomal sorting complex required for transport*, ESCRT-Komplex verantwortlich. Die MVB werden nun entweder zur Fusion mit dem Lysosom, und somit der Verdauung deren Inhalts, oder zur Fusion mit der Plasmamembran und somit zur Sezernierung der ILV in den Extrazellularraum, die dann Exosomen genannt werden, dirigiert (Buschow et al. 2009). Wie genau entschieden wird, ob MVB degradiert oder mit der Plasmamembran fusioniert werden und welche Stoffe daran beteiligt sind, ist Gegenstand aktueller Forschung. Mikrovesikel entstehen durch direktes Ausknospen der Plasmamembran, wobei dies durch diverse Faktoren, wie der Lipidkomposition des entsprechenden Membranabschnitts, der Kalziumkonzentration oder der Aktivität bestimmter Enzyme beeinflusst werden kann (Minciacchi et al. 2015). Sie pelletieren in der Ultrazentrifugation bei 14 000 g, Exosomen bei 100 000 g (Menck et al. 2017). Da jedoch ohne Elektronenmikroskopie keine genaue Aussage darüber getätigt werden kann, ob bei 100 000 g tatsächlich nur Exosomen oder bei 14 000 g ausschließlich aus der Plasmamembran hervorgegangene Mikrovesikel pelletiert wurden, wird in dieser Arbeit die Terminologie der p14- und der p100-Fraktion verwendet. Extrazelluläre Vesikel stellen eine Form der interzellulären Kommunikation dar und können zu langfristigen, unter Umständen pathogenen, Veränderungen zellulären Verhaltens führen (Menck et al. 2017). Sie können zu diesem Zweck diverse Beladungen wie beispielsweise Proteine, diverse RNA Populationen oder DNA transportieren (Colombo et al. 2014).

1.3 Extrazelluläre Vesikel und Krebs

Bösartige Tumoren nutzen Vesikel, um diverse, für ihren Progress und ihre Metastasierung nötige, Prozesse zu unterstützen. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Karzinome ihre Mikroumgebung, mithilfe über extrazelluläre Vesikel sekretierter Metalloproteinasen, degradieren können, um Raum für die eigene Ausdehnung zu schaffen (Yue et al. 2015). Des Weiteren wurde gezeigt, dass extrazelluläre Vesikel an der Ausbildung und Stabilisierung von Zellprotrusionen im Sinne von Invadopodien beteiligt sind, die zur Migration benötigt werden (Hoshino et al. 2013). Einer der schwerwiegendsten Prozesse, an denen extrazelluläre Vesikel beteiligt sind, ist die Metastasierung bösartiger Tumoren. Dabei können Vesikel über Lymph- oder Blutgefäße an vom Primärtumor entfernte Stellen im Körper gelangen. Ihre Beladung kann dann zu erhöhter Gefäßpermeabilität, zur Rekrutierung von

Knochenmarksstammzellen sowie zur Induktion von Umbauprozessen der extrazellulären Matrix führen. Zusammengenommen können diese Prozesse als Formung einer sogenannten prämetastatischen Nische bezeichnet werden (Tkach und Théry 2016). Diese ermöglichen es metastatischen Zellen, leichteren Zugang zum Zielorgan zu erlangen und erhöhen damit die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Metastasierung (Liu und Cao 2016). Des Weiteren nutzen Tumoren extrazelluläre Vesikel, um die Immunreaktion, die sie hervorrufen, zu ihrem Vorteil zu modulieren (Colombo et al. 2014). Ebenso konnte gezeigt werden, dass extrazelluläre Vesikel in der Entwicklung von Therapieresistenzen in der Krebsbehandlung involviert sein können, indem in ihnen bereits in den Intrazellularraum gelangte Medikamente wieder aus der Zelle transportiert werden können (Soekmadji und Nelson 2015). Extrazelluläre Vesikel scheinen also eine signifikante Rolle in der Entstehung, dem Progress und der Metastasierung von Tumoren zu spielen.

1.4 Neutrale Sphingomyelinasen

Zur Familie der humanen Sphingomyelinasen (Smase) gehören fünf Enzyme, die in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten, bei je unterschiedlichen pH-Optima von sauer über neutral bis basisch, die Hydrolyse des Hauptbestandteils humaner Zellmembranen Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphorylcholin katalysieren (Airola und Hannun 2014). In dieser Arbeit wurde die funktionelle Relevanz zweier der Sphingomyelinasen mit neutralem pH-Optimum (nSmase), mit den Gennamen *SMPD2* und *SMPD3* untersucht. nSmase1 (*SMPD2*) ist ein aus 423 Aminosäuren bestehendes Enzym, das neben seinem katalytischen Zentrum an Position 272 eine Metallbindestelle an Position 49 besitzt (uniprot.org). Diese ist notwendig, um den für die Katalyse nötigen Cofaktor Magnesium binden zu können. nSmase1 liegt membrangebunden an der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran vor. Neutrale Sphingomyelinase 2 (*SMPD3*) besteht aus 655 Aminosäuren, hat ein katalytisches Zentrum an Position 639, sowie eine Metallbindestelle für Magnesium an Position 364 (uniprot.org). Des Weiteren verfügt nSmase2 über eine posttranslationale Modifikation im Sinne einer S-Palmitoylierung. Palmitinsäure ist dabei an bis zu fünf Positionen mit Cystein verestert und dient als Membrananker. Somit kann das Protein, je nach Modifikation, sowohl frei im Cytosol, als auch membranassoziiert an Golgi-Apparat und Zellmembran vorliegen (uniprot.org). Beide Enzyme sind für die Bildung von Ceramid notwendig und spielen daher sowohl eine zentrale Rolle im Lipidstoffwechsel der Zellen, als auch in der Ceramid-vermittelten Apoptose (Airola und Hannun 2014). Die beiden neutralen

Sphingomyelinasen können durch GW4869 konzentrationsabhängig für einen begrenzten Zeitraum nicht-kompetitiv inhibiert werden (Luberto et al. 2002). Neben ihrer Beteiligung an Lipidstoffwechsel und Apoptose spielen neutrale Sphingomyelinasen in der Sekretion extrazellulärer Vesikel eine wichtige Rolle. Menck et al. konnten 2017 zeigen, dass eine Inhibition der neutralen Sphingomyelinasen zu einem veränderten Vesikelsekretionsverhalten der Brustkrebszelllinie SKBR3 führt. Sie konnten beweisen, dass die Konzentration sekretierter Mikrovesikel unter Inhibition der neutralen Sphingomyelinasen ansteigt, wohingegen die Konzentration sekretierter Exosomen abnimmt. Weiterhin war eine Veränderung der Proteinkomposition, im Sinne vermehrt durch Mikrovesikel sekretierter Wnt-Proteine, zu beobachten.

Die Untersuchung der funktionellen und diagnostischen Relevanz neutraler Sphingomyelinasen in der Sekretion extrazellulärer Vesikel aus Karzinomen soll daher das Ziel dieser Arbeit sein. Zur Erarbeitung der Ergebnisse wurden die folgenden Leitfragen genutzt:

- I) Besteht ein Zusammenhang zwischen nSmase-Gewebefärbung und Tumorprogress?
- II) Ändert sich die Anzahl sekretierter Vesikel nach *knockdown* oder Inhibition der neutralen Sphingomyelinasen?
- III) Ändert sich die Proteinkomposition der Vesikel nach Inhibition der neutralen Sphingomyelinasen und birgt dies diagnostische Relevanz?
- IV) Gibt es Unterschiede im Migrationsverhalten der Zellen, wenn nSmasen inhibiert werden?

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 1 – Geräte

Gerät	Hersteller
Accu-Jet pro	Brand, Hamburg, Deutschland
Axioplan 2 inkl. AxioCam HRc	Zeiss, Jena, Deutschland
Axiovert 25	Zeiss, Jena, Deutschland
BBD 6220 Inkubator	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Casy Zellzähler	Schärfe Systeme, Reutlingen, Deutschland
Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centro LB 960 Luminometer	Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland
Consort E-143	Consort, Turnhout, Belgien
IncuCyte S3	Essen BioScience, Inc., Ann Arbor, USA
Labofuge 400R	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
LLG uniroller 10	Lab Logistics Group, Meckenheim, Deutschland
MBT 250 Heizblock	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden, Deutschland
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Micro Star Centrifuge	VWR, Darmstadt, Deutschland
Mini Blot Module	Thermo Fisher, Waltham, USA
Mini Gel Tank	Thermo Fisher, Waltham, USA
NanoDrop 2000c	Thermo Fisher, Waltham, USA
NanoSight	Malvern Panalytical GmbH, Kassel, Deutschland
Odyssey CLx Imager	Li-Cor, Lincoln, USA
Optima LE-80K Ultracentrifuge	BeckmannCoulter, Brea, USA
Optima TL Ultracentrifuge	BeckmannCoulter, Brea, USA
pH-Meter	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Pipetus-akku,	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach, Deutschland
RM 5 Taumelrollenmischer	Hecht Assistent, Sondheim/Rhön, Deutschland

Gerät	Hersteller
R937 Microwave	Sharp, Osaka, Japan
Stemi DV4	Zeiss, Jena, Deutschland
ThermoStat plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage CP224S	Sartorius, Göttingen, Deutschland

Tabelle 2 – Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Blotting Papier	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Bolt 4-12% Bis-Tris Plus Gel 1mm x10 well / x12 well / x15 well	Thermo Fisher, Waltham, USA
Deckgläser 24x60mm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Falcon Röhrchen 15ml + 50ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<i>Filtertips</i> 10µl , 20µl +1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mikroplatte 96-well, Rund, Flachboden, weiß	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
<i>Prostate cancer tissue array PR242b</i>	US Biomax, Derwood, USA
<i>Prostate cancer tissue array PR808</i>	US Biomax, Derwood, USA
PVDF Transfermembran	Thermo Fisher, Waltham, USA
Reaktionsgefäße 0,5ml, 1,5ml + 2ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipette 1ml, 5ml, 10 ml + 25ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritze, 1ml	B Braun, Melsungen, Deutschland
Zellkulturflasche, 25cm ² + 75cm ² , mit Filterdeckel	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturschale, d=145mm	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
6-well Zellkulturplatte	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich

Tabelle 3 – Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Albumin für Mikrobiologie (BSA)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Bicine	Biomol, Hamburg, Deutschland
BisTris	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Complete proteinaseinhibitor tablets</i>	Roche, Basel, Schweiz
DAB	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Dilutionbuffer</i>	Screenfect, Eggenstein, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
DMEM Powder	Thermo Fisher, Waltham, USA
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 99,9%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
ExtrAvidin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
GW4869	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hämalaun Lösung sauer nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Igepal	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Thermo Fisher, Waltham, USA
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdeoxycholat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol 99,9%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
MOPS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Histokitt II	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640	Thermo Fisher, Waltham, USA
Screenfect A	Screenfect, Eggenstein, Deutschland
Screenfect siRNA	Screenfect, Eggenstein, Deutschland
Sucofin <i>skimmed milk powder</i>	TSI, Zeven, Deutschland
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Chemikalien	Hersteller
Triton X 100 Solution	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol 99,9%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
0,25% Trypsin-EDTA	Thermo Fisher, Waltham, USA

Tabelle 4– Medien, Lösungen und Puffer

Medien, Lösungen, Puffer	Zutaten
Blockierlösung Western Blot	5% <i>skimmed milk powder</i> in TBS-T
Blockierlösung Immunhistochemie	5% BSA in PBS
DMEM (1L)	1g DMEM Powder, 3,7g NaHCO ₃ , pH adjust to 7,2–7,4 with HCL
Einfrriermedium	90% FCS, 10% DMSO
GW4869 Lösung	1mg in 5ml DMSO
20x MOPS <i>running buffer</i>	1M MOPS, 1M Tris Base, 69,3mM SDS, 20,5mM EDTA pH 8,0
20x <i>NuPage transfer buffer</i>	500mM Bicine, 500mM BisTris, 20,5mM EDTA pH 8,0
10x PBS (500ml)	0,68M NaCl, 0,013M KCl, 0,04M Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, 0,007M KH ₂ PO ₄
PBS-T	1x PBS, 0,1% Tween 20
Peroxidaseblockierlösung IHC	3% H ₂ O ₂ in PBS
RIPA Lysepuffer	50mM TrisHCL pH 7,5, 150mM NaCl, 1% Igepal, 0,5% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS
2x SDS <i>loading dye</i>	100mM TrisHCL pH 6,8, 4% SDS, 0,2% Bromphenolblau, 20% Glycerin, 200mM β-Mercaptoethanol
20x TBS	
TBS-T	1x TBS, 0,02% Tween 20

Medien, Lösungen, Puffer	Zutaten
<i>Washing / binding buffer</i>	150mM KCl, 50mM TrisHCl pH 7,5, 1% Triton X-100
Zellkulturmedium DMEM	DMEM + 10% FCS
Zellkulturmedium RPMI 1640	RPMI 1640 + 10% FCS

Tabelle 5– Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung WB	Verdünnung IHC
<i>Goat polyclonal anti ALIX</i>	Santa Cruz, Dallas, USA	1:1000 in TBST	
<i>Rabbit polyclonal anti Androgenreceptor</i>	Abcam, Cambridge, UK		1:50 in 1xPBS 5% BSA
<i>Mouse monoclonal anti CD81</i>	Biolegend, San Diego, USA	1:1000 in TBST	
<i>Mouse monoclonal anti EMMPRIN = CD 147</i>	Santa Cruz, Dallas, USA	1:1000 in TBST	
<i>Mouse monoclonal anti Flotillin-1</i>	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA	1:1000 in TBST	
<i>Mouse monoclonal anti GAPDH</i>	Merck, Darmstadt, Deutschland	1:3000 in TBST	
<i>Mouse monoclonal anti histone H2B</i>	Abcam, Cambridge, UK		1:50 in 1xPBS 5% BSA
<i>Mouse monoclonal anti HSC 70</i>	Santa Cruz, Dallas, USA	1:1000 in TBST	
<i>Rabbit polyclonal anti SMPD2</i>	Merck, Darmstadt, Deutschland	1:1000 in TBST	1:50 in 1xPBS 5% BSA
<i>Rabbit polyclonal anti SMPD3</i>	Santa Cruz, Dallas, USA	1:1000 in TBST	1:50 in 1xPBS 5% BSA

Antikörper	Hersteller	Verdünnung WB	Verdünnung IHC
<i>Mouse monoclonal anti SMPD3</i>	Santa Cruz, Dallas, USA	1:1000 in TBST	1:50 in 1xPBS 5% BSA
<i>Rabbit monoclonal anti Syntenin</i>	Abcam, Cambridge, UK	1:1000 in TBST	
<i>Mouse monoclonal anti TSG101</i>	Abcam, Cambridge, UK	1:1000 in TBST	
<i>Mouse monoclonal anti acetylated α-Tubulin</i>	Santa Cruz, Dallas, USA	1:1000 in TBST	
<i>Rabbit polyclonal anti Wnt3a</i>	Abcam, Cambridge, UK	1:1000 in TBST	
<i>Rabbit polyclonal anti Wnt5a</i>	Santa Cruz, Dallas, USA	1:1000 in TBST	

Tabelle 6 – Zelllinien

Zelllinie	Ursprung/Hersteller
PC3	Knochenmetastase eines 64-jährigen Kaukasiers mit Prostatakarzinom
Du145	Hirnläsion eines 69-jährigen Kaukasiers mit Prostatakarzinom und lymphatischer Leukämie

Tabelle 7– Software

Software	Hersteller
Excel	Microsoft, Redmond, USA
GraphPad PRISM 6.02	GraphPad Software Inc, San Diego, USA
Image Studio Software	Licor, Lincoln, USA
MicroWin200 Lite	Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath, Deutschland
NanoDrop 2000c	Thermo Fisher, Waltham, USA
NanoSight 2.3	Malvern Panalytical GmbH, Kassel, Deutschland

Software	Hersteller
Powerpoint	Microsoft, Redmond, USA
Word	Microsoft, Redmond, USA
Fiji	GitHub, San Francisco, USA
Venny 2.1	BioInfoGP, Madrid, Spanien

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden die Zelllinien PC3 und Du145 genutzt. Beide stammen aus metastatischen Läsionen von Patienten mit Prostatakarzinomen und werden schon seit den 1970er Jahren kultiviert und für *in vitro* Versuche genutzt (Stone et al. 1978; Kaighn et al. 1979.) Aliquots beider Zelllinien wurden durch das Labor von Oliver Hahn, aus der Abteilung Urologie der Universitätsmedizin Göttingen, bereitgestellt. Die Zelllinien werden durch die dort zuständige MTA seit Jahren gepflegt. Beide Zelllinien wurden bei Eurofins Genomics positiv authentifiziert.

Die Zellen wurden zunächst in T-75 Zellkulturflaschen mit Filterdeckel, später, zur Gewinnung größerer Vesikelproben, in 14,5 cm Petrischalen, im Brutschrank mit 37,5 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. PC3-Zellen wachsen adhärent und bevorzugen DMEM Medium mit 10% fetalem Kälberserum. Ein Penicillin und Streptomycin Kombinationspräparat wurde dem Kulturmedium, zur Prophylaxe bakterieller Kontaminationen, in der Verdünnung 1/100 beigelegt. Für die Du145-Zellen wurden, abgesehen vom eingesetzten RPMI 1640 Medium, die gleichen Bedingungen genutzt. PC3-Zellen wurden im Verhältnis 1:3, Du145-Zellen im Verhältnis 1:6 gesplittet. Dazu wurde zunächst der alte Überstand verworfen und die Zellen mit 10 ml 1xPBS gewaschen. Dann wurden für T-75 Flaschen 2ml und für 14,5 cm Petrischalen 4 ml 0,25% Trypsin-EDTA zum Ablösen der Zellen verwendet. Die Reaktion wurde mit 8 ml bzw. 16ml 1xPBS für 14,5cm Petrischalen gestoppt. Dann wurden 1/3 für PC3- und 1/6 des Volumens für Du145-Zellen in ein neues Kulturgefäß überführt und FBS-haltiges Medium, entsprechend der Gefäßgröße, hinzugegeben. Die Zellen wurden höchstens bis zur 10. Passage für Experimente genutzt.

2.2.1.1 Zellen Einfrieren und Auftauen

Um allzeit niedrige Passagennummern für die Experimente zu gewährleisten, wurde ein Teil der Zellen frühzeitig eingefroren. Dazu wurden die Zellen mit 0,25% Trypsin-EDTA vom Grund des Kulturgefäßes gelöst und dann bei 1200 RPM für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Einfriermedium, bestehend aus steril gefiltertem FBS mit 10% DMSO, resuspendiert. Die Lösung wurde in Cryoröhrchen zunächst bei -80° C eingefroren und zwei Tage später in flüssigen Stickstoff überführt. Um die Zellen bei Bedarf wieder aufzutauen wurde das Cryoröhrchen in einem 37 °C Wasserbad schnell erwärmt und die Lösung in ein 15 ml *falcontube* mit 10 ml Kulturmedium überführt. Dieses wurde dann für fünf Minuten bei 1200 RPM zentrifugiert und das Pellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Diese Lösung wurde dann in ein Kulturgefäß gegeben.

2.2.1.2 6-well-System für NTA, Western Blot und Proteinkonzentrationsmessung

Die Zellen sollten mit unterschiedlichen Stoffen behandelt werden, um anschließend überprüfen zu können, ob sich an der Zusammensetzung der Vesikelpopulationen bezüglich Größenverteilung und Proteinkonzentration etwas ändert. Zu diesem Zweck eignet sich ein *6-well*, bei dem, wie der Name sagt, sechs kleine Gefäße auf einer Kunststoffplatte befestigt sind. Die Abfolge dieser *wells* blieb bei allen sechs Replikaten pro Zelllinie die gleiche:

Well 1: *non-targeting* siRNA, also eine siRNA, die kein Zielgen hat und als Negativkontrolle dient. *Well 2*: siRNA gegen nSmase1 (*SMPD2*). *Well 3*: siRNA gegen nSmase2 (*SMPD3*). *Well 4*: siRNA gegen beide neutralen Sphingomyelinasen (*SMPD2/3*). *Well 5*: DMSO als Negativkontrolle für *well 6*: GW4869, Inhibitor der neutralen Sphingomyelinasen (Luberto et al. 2002). Zur Vorbereitung der Transfizierung der Zellen wurden 60 µl ScreenFect *dilution buffer* in die *wells* eins bis vier gegeben, um den Durchtritt der nachfolgend hinzugefügten siRNA durch die Zellmembranen zu erleichtern. 2 µl der jeweiligen siRNA (*SMPD2*, *SMPD3* und beide gemeinsam), sowie 2 µl ScreenFect siRNA Reagenz wurden nun hinzugefügt. Dieser Ansatz musste dann 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Im Anschluss wurden 400 000 Zellen pro *well* in 1,5 ml Kulturmedium hinzugefügt. Die Wirkdauer der siRNA beträgt laut Hersteller ca. 96 Stunden, die des Inhibitors GW4869 16-18 Stunden. Dementsprechend wurde das Kulturmedium nach 72 Stunden gewechselt und durch 1 ml Exofree Medium ersetzt. Dabei handelt es sich um Kulturmedium, das durch 24-stündige

Ultrazentrifugation bei 100 000 g von Vesikeln jeglicher Art, wie sie zum Beispiel im, dem Medium zugegebenen, fetalen Kälberserum zu finden sind, befreit wurde (Lehrich et al. 2018). Nach 78 Stunden wurde den *wells* fünf DMSO- und sechs in DMSO gelöstes GW4869 zugefügt. Das Verhältnis zwischen Inhibitor und Kulturmedium sollte 1/70 betragen. Das entspricht bei 1 ml Medium einem Volumen von 14,3 µl DMSO bzw. GW4869. Nach 96 Stunden wurde der Überstand abgenommen und Vesikel mittels differentieller Zentrifugation aufgereinigt.

2.2.1.3 Viability assay - Photometrische Messung

Viability assays werden, wie der Name sagt, genutzt um die Viabilität von Zellen unter verschiedenartiger Behandlung zu vergleichen. In dieser Arbeit sollte so beurteilt werden, ob die Behandlung der Zellen mit siRNA oder DMSO oder dem in DMSO gelösten GW4869 Einfluss auf das Überleben der Zellen hatte. Genutzt wurde ein *assay kit*, das es ermöglicht, den ATP-Gehalt der Probe mittels einer Enzymreaktion in Lichtemission auszudrücken. Diese kann dann mit einem Photometer bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden 96-*well* Platten mit 15k Zellen pro *well* in 100 µl Medium besät. Zuvor wurde in je drei technischen Replikaten, der in 2.2.1.3 beschriebene Transfektionsmix mit siRNA gegen SMPD2, SMPD3, beide kombiniert, sowie einer Kontroll-siRNA ohne Zielgen hinzugefügt. Weiterhin wurde Ubiquitin siRNA als Negativkontrolle hinzugefügt, da das die Zellen zum Absterben bringen sollte. Nach 48 Stunden Inkubation wurde den restlichen, bisher nur Zellen und Medium enthaltenden *wells*, ebenfalls in drei technischen Replikaten DMSO oder GW4869 in einer Verdünnung von 1/70 hinzugefügt. 72 Stunden nach Beginn des Experiments wurden jedem *well* 100 µl *CellTiter-Glo One Solution* hinzugegeben. Ein sofortiger Farbumschlag von pink zu gelb machte die Enzymreaktion dabei makroskopisch sichtbar. Die Platte wurde nun im Photometer ausgelesen und die gemessenen Werte auf die Positivkontrolle normalisiert.

2.2.2 Vesikelaufreinigung mittels differentieller Zentrifugation

In dieser Arbeit wurden, für die NTA-Experimente, Vesikel aus einem 1 ml Überstand der o. g. 6-*wells* sowie, für die massenspektrometrische Analyse, Vesikel aus 20 ml Überstand einer 14,5 cm Petrischale, aufgereinigt. Der Ablauf der Aufreinigung ist dabei in beiden

Fällen der gleiche. Zunächst wurde das Medium vorsichtig aus dem jeweiligen Gefäß abpipettiert und bei 750 g bei 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert, um zugrunde gegangene Zellen vom Überstand zu trennen. Daraufhin wurde der Überstand wieder abpipettiert, in ein frisches Gefäß überführt und das Pellet verworfen. Der Überstand wurde nun bei 1500 g bei 4 °C noch einmal für zehn Minuten zentrifugiert, um Zelldebris vom Überstand zu trennen. Wieder wurde der Überstand, der nun, neben kleineren zellulären Bestandteilen, hauptsächlich extrazelluläre Vesikel beinhaltete, in ein neues Gefäß überführt und das Zelldebris pellet verworfen. Nun wurde der Überstand bei 14 000 g für 35 Minuten zentrifugiert, mit der Zielsetzung Mikrovesikel zu pelletieren. Diese werden daher in dieser Arbeit auch als p14 -Fraktion der Vesikel bezeichnet. Das Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und ein weiteres Mal für 35 Minuten bei 4 °C und 14 000 g zentrifugiert, um die Reinheit des p14-Pellets zu erhöhen. Im Anschluss daran wurde das Pellet im Fall der *6-well*-Versuche in 50 µl und für die Massenspektrometrie in 100 µl PBS resuspendiert und im Anschluss zum Teil für Experimente genutzt oder zur Lagerung bei -18 °C eingefroren. Der nun gewonnene Überstand wurde ebenfalls bei 4 °C, allerdings bei 100 000 g für eine Stunde zentrifugiert, um Exosomen, die hier als p100-Fraktion bezeichnet werden, aufzureinigen. Das entstandene Pellet wurde ebenfalls in 1 ml resuspendiert und erneut für eine Stunde bei 4 °C und 100 000 g zentrifugiert. Auch das p100-Pellet wurde für die NTA-Experimente und Western Blots in 50 µl, für die Massenspektrometrie in 52,5 µl, resuspendiert.

2.2.3 Nanoparticle tracking analysis

Nanoparticle tracking analysis (NTA) ist ein Verfahren, das sich die Brown'sche Molekularbewegung zunutze macht, um in Verbindung mit einer speziellen Software Aussagen über Partikelkonzentration und deren Durchmesser in einer Probe zu ermöglichen. Dazu wurden 10 µl der 50 µl Vesikelsuspension (siehe 2.2.2) zu 390 µl PBS gegeben. Diese 400 µl wurden mit einer 1 ml Spritze in die Messkammern des NTA-Gerätes eingebracht. Dabei ist darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen in den Messkammern befinden, diese würden eine Messung verhindern. Eine im Gerät verbaute, hochauflösende Kamera filmt nun einen gewissen Ausschnitt der Kammer mit der Flüssigkeit und den sich darin befindlichen Partikeln. Dabei wird die Bewegung einzelner Partikel aufgezeichnet. Um das Ergebnis im Anschluss tatsächlich bewerten zu können, muss die Kamera innerhalb der Messzeit, in diesem Fall 30 Sekunden, mindestens 200 Partikelbewegungen aufzeichnen. Die Software errechnet im Anschluss, wie viele Partikel welchen Durchmessers in der Probe

vorhanden sind. Das Ergebnis ist eine Auflistung in 20 nm Schritten (von 10-1000 nm) mit der jeweiligen Konzentration der Partikeldurchmesser angegeben als $n \cdot 10^6/\text{ml}$. Zur genauen Konzentrationsbestimmung musste die Verdünnung der ursprünglichen Vesikelprobe dann wieder herausgerechnet werden, wobei die genaue Konzentration für diese Arbeit weniger eine Rolle spielte, als der relative Vergleich von Proben, die aus zuvor unterschiedlich behandelten Zellen stammten. Des Weiteren errechnet die Software die Gesamtkonzentration der Probe unabhängig von der Größe der erfassten Partikel. Diese Gesamtkonzentration konnte als Marker für die Qualität der Probe genutzt werden. Messungen mit einer Gesamtkonzentration von weniger als 7×10^8 Partikel/ml wurden nicht mit einbezogen. Bei diesen war es nur selten möglich mehr als 200 Partikelbewegungen zu detektieren. Um die Darstellung der Ergebnisse übersichtlich gestalten zu können, wurden mehrere Partikeldurchmesser in Größengruppen zusammengefasst. Für die p14-Fraktion wurden immer drei 20er-Schritte in eine Gruppe zusammengefasst, für die p100-Fraktion zwei (Abbildung 4+5). Da es nur geringste Mengen Partikel > 500 nm in der p14-Fraktion, und > 300 nm in der p100-Fraktion gab, enden die graphischen Darstellungen in dieser Größenordnung (Abbildung 4+5).

2.2.4 Western Blot – Vesikel und Zellextrakt

Zur Bestimmung der *knockdown*-Effizienz, zur Validierung der NTA-Ergebnisse und zum Nachweis potenzieller Tumormarkerkandidaten wurden Western Blots von Zellextrakt oder aufgereinigten Vesikeln angefertigt. Beim Western Blot, auch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, kurz SDS-PAGE genannt, durchlaufen Proteine, bei angelegter Spannung, aufgrund ihrer negativen Ladung ein netzartiges Gel, dessen Maschen immer kleiner werden. So können Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Zu diesem Zweck wurden vorgefertigte, in Kunststoff eingefasste, Polyacrylamidgele der Firma ThermoFisher verwendet. Die zu untersuchenden Proben wurden zur Denaturierung der Proteine mit 6x SDS gemischt und für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt. Während der Kochzeit wurden die verwendeten Polyacrylamidgele in die Blotkammer eingespannt, Laufpuffer eingefüllt und die Ladetaschen mit selbigem gespült. Daraufhin wurden die Proben in die Ladetaschen des Gels gegeben und eine Spannung von 80 V angelegt bis die Lauffront die Ladetaschen verlassen hatte. Nun wurde die Spannung auf 120 V erhöht und die Gelelektrophorese durchgeführt, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte. Jetzt wurde das Gel vorsichtig aus der Kunststoffhülle befreit und in ein Blotmodul übertragen.

Hierbei wird das Gel gegen eine Membran gedrückt, die durch Anlage von 20 V für ca. 90 Minuten in der Lage ist, die im Gel gesammelten Proteine aufzunehmen. Diese Membran wurde im Anschluss für 30 Minuten in 5% Milchpulverlösung gebadet, um freie Proteinbindungsstellen zu sättigen. Dieser Schritt sollte eine starke Hintergrundfärbung verhindern. Im Anschluss wurde die Membran kurz in TBS-T gewaschen und dann in einem 50 ml *falcontube* mit 2 ml in TBS-T gelöstem Primärantikörper bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst dreimal für 15 Minuten in TBS-T gewaschen. Daraufhin wurde ein fluoreszierender Sekundärantikörper, der sich gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers richtet, hinzugefügt und alles für eine Stunde bei Raumtemperatur und in Dunkelheit inkubiert. Nach einem letzten dreimaligen waschen konnte die Membran nun gescannt und dadurch digitalisiert und zur weiteren Analyse gespeichert werden.

2.2.5 Immunohistochemische Färbung von *tissue arrays*

Die hier verwendeten *tissue arrays* sind Objektträger, auf die Stanzbiopsieproben von Prostatakarzinompatienten sowie gesunden Probanden aufgebracht und in Paraffin eingebettet wurden (Herkunft siehe 2.1.2). Diese Objektträger können unter anderem immunohistochemisch gefärbt werden.

Bei der immunohistochemischen Gewebefärbung nutzt man spezielle Antikörper, um gesuchte Strukturen sichtbar zu machen. Dabei gibt es verschiedenste Methoden, die sich in der Art und Anzahl der genutzten Antikörper unterscheiden. In dieser Arbeit wurde eine Methode verwandt, die dazu dienen sollte, ein möglichst starkes Signal zu erzeugen. Diese wird im Folgenden beschrieben. Zunächst wurden die *tissue arrays* bei 50 °C erhitzt, bis das Paraffin zu schmelzen begann. Als nächstes wurden die Präparate 20 Minuten in Xylol eingelegt, daraufhin je fünf Minuten in einer 50% Xylol/Isopropanol Mischung, 100% Isopropanol, sowie 100%, 90% und 70% Ethanol, um das Paraffin schonend auszuwaschen. Im nächsten Schritt wurden die Präparate dreimalig mit Wasser gewaschen, ebenfalls für insgesamt fünf Minuten. Daraufhin wurden die Präparate in einem mikrowelleneigneten Schnellkochtopf für zehn Minuten in einem Zitronensäurepuffer mit pH 6,4 gekocht. Dabei war darauf zu achten, dass die Präparate stets mit Flüssigkeit bedeckt waren, um ein Austrocknen und damit deren Zerstörung zu vermeiden. Im Anschluss an den Kochvorgang und nach kurzem Abkühlen wurden die Präparate erneut dreimal für insgesamt fünf Minuten in Wasser gewaschen. Nun wurden sie für 45 Minuten in PBS mit 3% H₂O₂ eingelegt. Dieser

Schritt war nötig, um eine potenzielle endogene Aktivität des Enzyms Peroxidase zu blockieren, da genau dieses Enzym später verwendet wurde, um die gesuchten Strukturen sichtbar zu machen. Daraufhin wurden die Präparate dreimal für insgesamt fünf Minuten in PBS gewaschen. Als nächstes wurden die Präparate für eine Stunde mit einer Blockierlösung, bestehend aus PBS mit 5% bovinem Serumalbumin (BSA) bedeckt, mit dem Zweck unspezifische Proteinbindestellen zu besetzen, um eine Fehlbindung der eingesetzten Antikörper und die damit verbundene stärkere Hintergrundfärbung zu vermeiden. Jetzt wurden die Präparate mit dem Primärantikörper, in einer Verdünnung von 1:50 in BSA Blockierlösung beträufelt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Für die finale Färbung wurden fünf *tissue arrays* verwendet. Eines diente als Negativkontrolle, diesem wurde an dieser Stelle kein Primärantikörper zugefügt. Als Positivkontrolle wurde ein Antikörper gegen den Androgenrezeptor genutzt. Weiterhin wurden Primärantikörper gegen die nSmase1 und 2 genutzt, wobei für nSmase2 Antikörper von verschiedenen Herstellern genutzt wurden.

Der nächste Tag begann mit dreimaligem Waschen der Präparate in PBS-T für fünf Minuten. Daraufhin wurde ein zweiter, biotinylierter, Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 in PBS auf die Objektträger geträufelt und alles für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Biotin ist ein Molekül, das mit Avidin eine starke Bindung eingehen kann. Das hier genutzte Avidin war an einen weiteren Antikörper gekoppelt, der wiederum das Enzym Peroxidase gebunden hatte. Diese Lösung, in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS, wurde, nach einem weiteren fünfminütigen Waschschrift in PBS-T, auf die Präparate gegeben und für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun sollte also der Primärantikörper sein Zielprotein, an dessen Fc-Teil der biotinylierte Sekundärantikörper und an diesen wiederum über Avidin der Peroxidase tragende Tertiärantikörper, gebunden haben. Um dieses Konstrukt nun sichtbar zu machen, wurden die Präparate unter einem Lichtmikroskop mit 2% 3,3'-Diaminbenzidin (DAB) + 0,12% H₂O₂ in PBS benetzt. Dabei diente der Peroxidase DAB als Substrat, das nach der Enzymreaktion, durch Oxidation durch H₂O₂, eine kräftige, braune Farbe entwickelte. Die Arbeiten mit der DAB Lösung mussten unter einem Abzug und mit großer Sorgfalt und Einmalmaterialien durchgeführt werden, da das Substrat hochgiftig ist. Die Substratlösung wurde von den Objektträgern abgeklopft, sobald unter dem Mikroskop eine deutliche Farbreaktion sichtbar wurde. Das dauerte in diesem Fall ca. 3,5 Minuten, wobei es je nach Primärantikörper leichte Schwankungen im Bereich von 30 Sekunden gab. Als nächstes wurden die Präparate zehn Mal kurz in eine mit Hämatoxylin gefüllte Färbekammer getaucht, um eine Gegenfärbung, vor allem der Zellkerne, zu erreichen. Sofort nach dieser Gegenfärbung wurden die Präparate für fünf Minuten unter

laufendem Wasser gewaschen. Im Anschluss durchliefen die Präparate die gleiche Alkoholreihe wie zu Beginn des Färbeprozesses, nun allerdings in umgekehrter Reihenfolge. Als Letztes wurde ein Tropfen Eindeckmedium auf die Präparate gegeben, diese mit einem Deckgläschen bedeckt und alles über Nacht und unter dem Abzug bei Raumtemperatur getrocknet. Die Färbintensitäten der Präparate wurden im Anschluss von drei Personen unabhängig voneinander beurteilt und in die Kategorien „schwache“, „mittelstarke“ oder „starke“ Färbung eingeteilt. Die Auswertung dieser Beurteilungen findet sich im Ergebnisteil unter 3.1.

2.2.6 Proteinkonzentrationsmessung mittels Spektralphotometrie

Zur Proteinkonzentrationsmessung wurde das *Pierce BCA Protein Assay Kit* nach Herstellerangaben verwendet. Dazu wurden die zu untersuchenden Proben, sowie eine leere Kontrolle, in eine durchsichtige Küvette gegeben und mit den Reagenzien des *kits*, im entsprechenden Mischverhältnis, versetzt und für 30 Minuten bei 60 °C erhitzt. Ein Farbumschlag von grün zu lila während des Erhitzens gab hierbei einen ersten Hinweis darauf, ob das Protokoll ordnungsgemäß angewendet wurde, bzw. ob sich Proteine in der Probe befanden. Nach Abkühlen konnten die Proben dann mit dem Spektralphotometer NanoDrop2000 untersucht werden, um ihren Proteingehalt als Konzentration zu ermitteln.

2.2.7 Massenspektrometrie aufgereinigter Vesikel und deren Analyse

Für die massenspektrometrische Analyse wurde der Zellüberstand aus je zwei 14,5 cm Kulturschalen zusammengenommen und anschließend Vesikel daraus aufgereinigt. Dabei wurden je zwei mal zwei Kulturschalen PC3- und Du145-Zellen mit reinem DMSO als Kontrolle und je zwei mal zwei mit GW4869 behandelt. 14,5 cm Kulturschalen wurden mit 20 ml Medium befüllt, die Aufreinigung der Vesikel erfolgte also aus 40 ml Überstand mittels differentieller Zentrifugation (siehe 2.2.2). Die fertig aufgereinigten Vesikel wurden in 52,5 µl PBS resuspendiert. Davon wurden 2,5 µl zur Messung der Proteinkonzentration mittels Spektralphotometrie (siehe 2.2.6) genutzt. Die Proteinmasse der Probe sollte als Voraussetzung für die erfolgreiche massenspektrometrische Analyse nicht unter 40 µg liegen. Zur Vorbereitung der massenspektrometrischen Analyse wurden 50 µl Vesikelsuspension 10 µl 6xSDS zugegeben und alles für fünf Minuten bei 95 °C inkubiert, um die zu

untersuchenden Proteine zu solubilisieren. Die eigentliche massenspektrometrische Analyse wurde von der „UMG Core Facility Proteomics“ unter Leitung von Dr. Christof Lenz durchgeführt. Bei der Massenspektrometrie werden die Moleküle zu untersuchender Stoffe ionisiert und anhand ihres Masse/Ladungsverhältnisses aufgetrennt. Dabei entsteht ein für jede atomare Zusammensetzung spezifisches Profil. Durch Abgleich mit einer Datenbank kann so jeder Stoff mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit identifiziert werden. Diese Methodik lässt sich auf die Analyse ganzer Proteine übertragen. Selbige müssen dafür zunächst denaturiert sowie mit Trypsin verdaut werden und ergeben in der Analyse ebenfalls ein proteinspezifisches Muster, das mit bestehenden Datenbanken abgeglichen werden kann. So können die in einer Probe enthaltenen Proteine ermittelt und deren jeweilige Konzentration bestimmt werden.

2.2.8 Bewertungssystem für Tumormarkerpotenzial

Jene Proteinkandidaten aus der massenspektrometrischen Analyse, die auf den Vesikeln der mit GW4869-behandelten Zellen signifikant erhöht zu finden waren, wurden einem Bewertungssystem unterzogen. Dieses System sollte anzeigen, wie gut die gefundenen Proteine als Biomarker aus Serum dienen könnten. Als Vorlage diente ein erstmalig von Thomas Worst und Kollegen angewendetes System (Worst et al. 2017), das für diese Arbeit angepasst wurde.

Das Grundprinzip, die Suche nach bestimmten Eigenschaften der Proteine in sechs verschiedenen Internetdatenbanken, blieb dabei bestehen. Eine der im Worst-System genutzten Datenbanken, www.cbioportal.org, wurde für diese Arbeit durch www.proteinatlas.org ersetzt. Beide liefern RNA-Sequenzierungsdaten, jedoch ist es bei Proteinatlas möglich, sowohl die Expression eines Proteins in gesundem, als auch in erkranktem Gewebe zu erfragen, im Gegensatz zum reinen Krebs-Genom-Atlas, *cbioportal*. Die restlichen Datenbanken wurden beibehalten. Zur Beurteilung der RNA-Expression verschiedener Proteinkandidaten in gesundem und krebsbefallenen Prostatagewebe, wurden die durchschnittlichen *reads per kilobase per million* (RPKM) zu Rate gezogen. Wurde ein Protein im Prostatakarzinom stärker exprimiert als in gesundem Gewebe, so erhielt es einen Punkt. War die Expression besonders hoch, konnte ein zweiter Punkt erzielt werden. Die nächste genutzte Datenbank war www.pubmed.gov. Hier richtete sich die Punktevergabe nach der Anzahl krebsbezogener Publikationen, die sich mit dem entsprechenden Protein befassten. Ein Punktwert zwischen null und drei wurde vergeben. Je nach Anzahl der Artikel, die

zusätzlich von einem Zusammenhang des Kandidaten mit Metastasierung oder verkürztem Überleben berichteten, wurden noch einmal null bis drei Punkte vergeben. Eine Liste der Publikationen befindet sich in einem gesonderten Literaturverzeichnis am Ende der Arbeit (6.2). Ein ähnliches Verfahren wurde für die Datenbank *www.microvesicles.org* angewendet, welche eine Vielzahl von Studien zum Thema extrazelluläre Vesikel enthält. Hier wurde der Anteil der Prostatakrebs-bezogenen Studien im Vergleich zur Gesamtzahl der Krebs-bezogenen Studien bewertet. Nach diesem Schema wurden null bis drei Punkte vergeben, null für wenige, drei für besonders viele Prostatakrebs-bezogene Studien.

www.peptideatlas.org ist eine Datenbank des *Institute for Systems Biology*, Seattle. Diese ermöglicht es, massenspektrometrische Proteinanalysen verschiedenster Organismen einzusehen, so auch eine Analyse humanen Plasmas. Sollten Kandidaten in Plasma gehäuft zu finden sein, so sind sie als Biomarker ungeeignet. Die Häufigkeit in humanem Plasma wurde mit dem normalisierten PSM (*peptide-spectrum matches*)/100k – Wert ermittelt. Ein Punktwert von null bis zwei konnte hierbei erzielt werden, null für gehäuftes Vorkommen in Plasma, eins für geringes und zwei für kein Vorhandensein. Zuletzt wurde das frei zugängliche *online tool* „*Protter*“ der Arbeitsgruppe um Bernd Wollscheid, ETH Zürich, genutzt. Dieses Programm ermöglicht es, zelluläre Lokalisationen des gesuchten Proteins darstellen zu lassen. Hierbei wurden die Kandidaten mit null oder einem Punkt bewertet, je nachdem, ob sie sekretiert werden (ein Punkt), eine oder mehrere Transmembrandomänen aufweisen (ein Punkt), oder ob sie rein intrazellulär zu finden sind (null Punkte). Daraus resultiert eine maximale Gesamtpunktzahl von 14. Je höher die Punktzahl, desto größer das Potenzial der Proteine als Biomarker aus Blut geeignet zu sein.

2.2.9 Wound healing assay

Der hier durchgeführte *wound healing assay* diente dazu, die Frage zu beantworten, ob sich das Migrationsverhalten der beiden genutzten Zelllinien durch die Blockade der neutralen Sphingomyelinasen ändert. Ermöglicht wird dies durch das Geräte IncucyteS3 von EssenBio. Mithilfe dieses Geräts können lebende Zellen in hoher Auflösung über längere Zeiträume fotografiert werden. Zunächst wurde eine *96-well* Platte mit Zellen in unterschiedlicher Konzentration besät, je Zelllinie vier Mal zwei *wells* mit 5k, 10k, 20k, 40k, 50k und 60k Zellen. Diese wurde für 24 Stunden bei 37,5 °C und 5% CO₂ inkubiert, um den Zellen eine Adhäsion am Boden der Platte zu ermöglichen. Am nächsten Tag wurden die Zellen zunächst mit einem serumfreien Medium dreimal gewaschen. Anschließend wurde

den Zellen mittels des *Incucyte wound makers* eine, in jedem *well* gleichförmige, Wunde zugefügt. Nach weiterem dreimaligem Waschen mit serumfreiem Medium wurde den Zellen Medium zugegeben, das unbehandelt, mit DMSO oder mit GW4869 in einer Verdünnung von 1/70 versetzt war. Je Saatkonzentration waren nun zwei *wells* mit reinem Medium und drei mit DMSO bzw. GW4869 behandelt. Jetzt wurde die *96-well* Platte in das Gerät eingebracht und die Einstellung so vorgenommen, dass über 24 Stunden stündlich ein Bild gemacht wurde.

3 Ergebnisse

3.1 nSmase2-Gewebefärbung korreliert positiv mit Metastasierung, nSmase1 mit Tumorerkrankung an sich

Im Rahmen des *Cancer Genome Atlas Program* (TCGA) wurde das Genom zahlreicher Tumorentitäten sequenziert. Die Ergebnisse dieser Arbeiten können im Onlineportal www.cbioportal.org eingesehen werden. Bei der genetischen Untersuchung von 492 Prostatakarzinomen zeigte sich in 83 Fällen (17%) eine Deletion mindestens eines der Gene, die für die beiden neutralen Sphingomyelinasen kodieren (Cerami et al. 2012). Dies warf nun die Frage auf, ob die fehlende Expression bzw. eingeschränkte Funktionalität der neutralen Sphingomyelinasen in Zusammenhang mit Tumorprogression oder Metastasierung steht. Um dieser Frage nachzugehen, wurden *tissue arrays* immunohistochemisch gefärbt. Diese *tissue arrays* sind Objektträger, auf die 80 in Paraffin eingebettete Stanzbiopsieproben aufgebracht sind. Diese 80 Proben stammen von 35 Prostatakarzinompatienten mit unterschiedlichen Tumorstadien und Gleason-Scores sowie fünf gesunden Spendern, zwei Schnitte pro Patient. Die Färbeintensität wurde für jedes der *tissue arrays* von drei unabhängigen Personen beurteilt. Beispiele für die Intensität der Gewebefärbung sind in Abbildung 1 dargestellt. Diese zeigt zunächst nSmase1 und 2 Färbung in gesundem Gewebe, sowie Androgenrezeptor als Positiv-, und kein zugefügter Primärantikörper als Negativkontrollen in Tumorgewebe. Im Anschluss sind exemplarisch die Färbegrade „schwach“, „mittelstark“ und „stark“ in Tumorgewebe abgebildet. Weiteres zu *tissue arrays*, Immunohistochemie und der Auswertungsmethodik siehe 2.2.5.

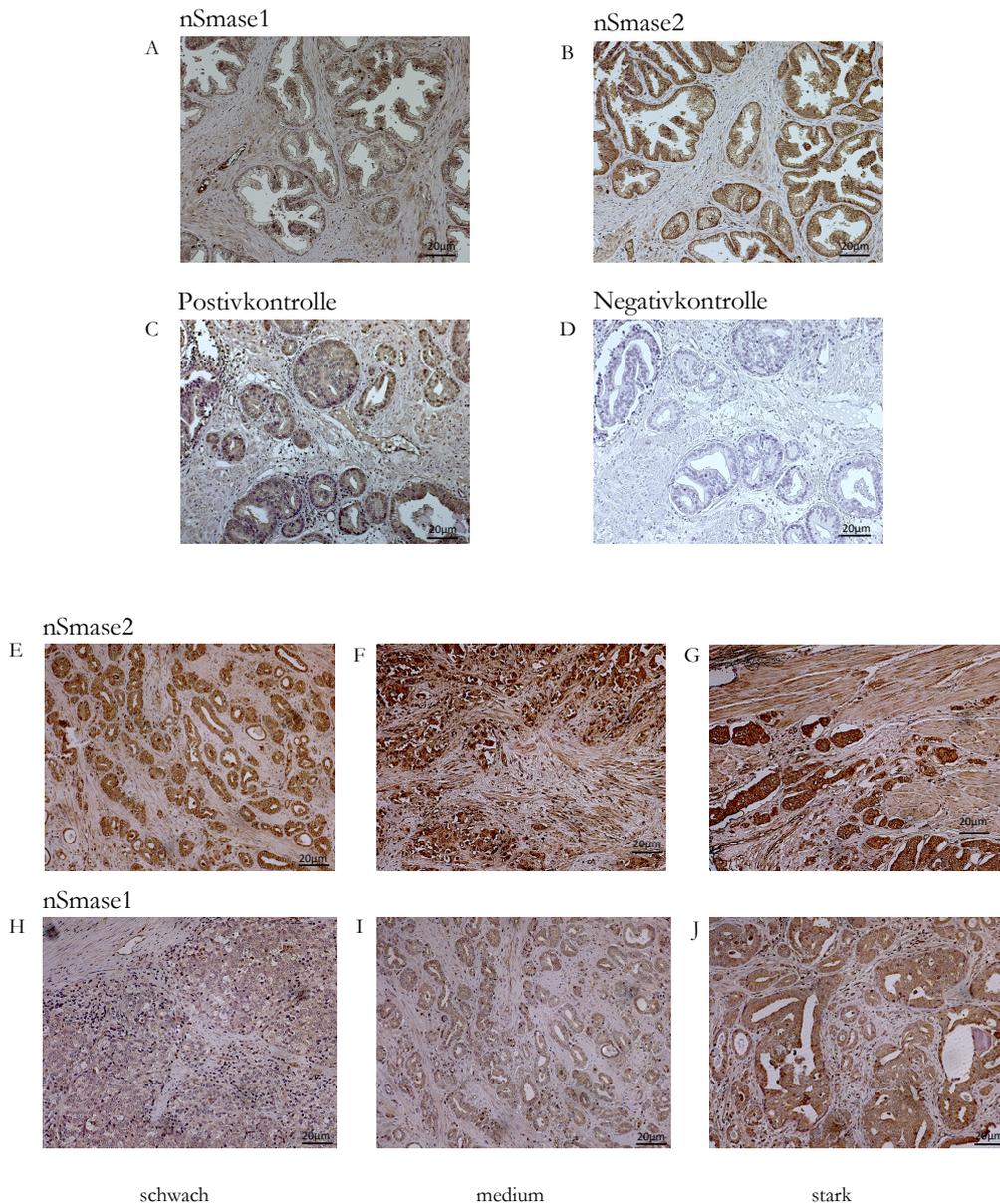


Abbildung 1: Exemplarische Darstellung der Färbegrade. Gesundes Prostatagewebe mit nSmase1 (A) und nSmase2 (B) Färbung. C-J Tumorgewebe, mit Antikörper gegen (C) Androgenrezeptor (Positivkontrolle), (D) kein Primärantikörper (Negativkontrolle). E-J von links nach rechts zunehmende Färbegrade von nSmase2 (E-G) und nSmase1 (H-J).

Nach Auswertung der Beurteilung der Färbegrade zeigte sich ein Zusammenhang zwischen nSmase2 Gewebefärbung und Metastasierung, der in Tabelle 8 dargestellt ist.

Tabelle 8 – Auswertung der Beurteilung der IHC Färbung

Färbung	nSmase2 (x)	Metastasierte (M)	M/x	nSmase1 (x) (x)	Metastasierte (M)	M/ x
Stark	36	25	0,69	25	10	0,4
Mittelstark	107	41	0,38	99	44	0,44
Schwach	67	19	0,28	86	35	0,4
Gesamt	210	45	0,42	210	45	0,42

n = 35, Gesamtzahl der Beurteilungen = 210 (zwei Proben von 35 Patienten, dreimal unabhängig beurteilt)

Dieser spiegelte sich in der Tatsache wider, dass Biopsieproben, die in die Gruppe „starke Färbung“ eingeordnet wurden, den höchsten Anteil an metastasierten Tumoren (69%) beinhalten. Im Gegensatz dazu gehörten diejenigen Schnitte, die als „schwach gefärbt“ eingeordnet wurden, zur Patientengruppe mit dem geringsten Anteil an Metastasierung (28%). Für nSmase1 ließ sich kein solcher Zusammenhang zeigen. Die Intensität der nSmase1 Färbung war jedoch, wie in Abbildung 2 dargestellt, im Gewebe erkrankter Patienten signifikant höher, als in dem gesunder Probanden. Für nSmase2 galt dies nicht. Ein Unterschied der Färbintensität zwischen hohen und niedrigen Gleason-Scores, also hohem und niedrigem Grad der Dedifferenzierung der Zellen, war weder für nSmase1 noch für nSmase2, festzustellen.

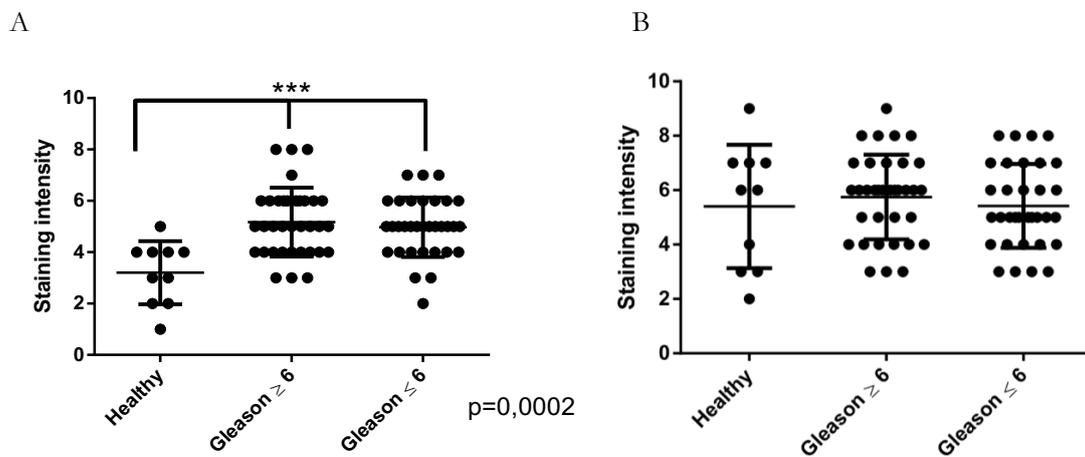


Abbildung 2: Grad der Gewebefärbung in Relation zum Tumorprogress. A nSmase1 Färbung, B nSmase2. X-Achsen: Grad der Tumordifferenzierung- Healthy: Kein Tumor. Gleason-Score ≤ 6 : besser differenzierter Tumor. Gleason-Score ≥ 6 : schlechter differenzierter Tumor. Y-Achsen: Intensität der Gewebefärbung. Statistische Analyse mit 2-way ANOVA.

3.2 RNAi vermittelter *knockdown* und Inhibition der neutralen Sphingomyelinasen beeinträchtigt die Lebensfähigkeit von Zellen der Linien PC3 und Du145 nicht

Die Ergebnisse der immunohistochemischen Färbungen sowie die Daten von *cbioportal* haben gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der Expression der neutralen Sphingomyelinasen und Tumorprogress sowie Metastasierung bestehen könnte. Um die Bedeutung der nSmasen in diesem Zusammenhang weiter zu untersuchen, sollten die Zelllinien PC3 und Du145 zum einen durch siRNA an der Expression der Enzyme gehindert werden oder zum anderen deren Aktivität durch den Inhibitor GW4869 blockiert werden. Dieser *knockdown* der Gene *SMPD2* und *SMPD3* oder die Blockierung ihres Produkts sollten dabei den Zustand simulieren, der einer vollständigen Deletion dieser Enzyme entspricht, wie sie in bis zu 17% der Prostatakarzinome vorliegt. Daraufhin sollten extrazelluläre Vesikel aus dem Kulturüberstand der Zellen aufgereinigt und untersucht werden. Um einzelne Vesikelproben quantitativ miteinander vergleichen zu können, musste sichergestellt werden,

dass diese Behandlung keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen hat. Zu diesem Zweck wurden *viability assays* (2.2.1.4) durchgeführt (Abbildung 3).

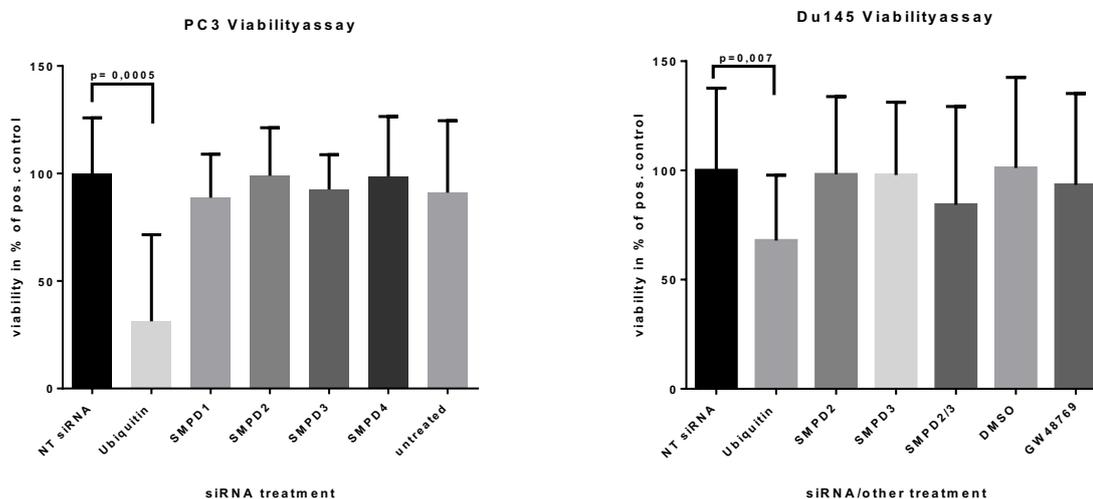


Abbildung 3: Viability assay von PC3-, (A) und Du145- (B) Zellen. Auf der X-Achse finden sich die verschiedenen Behandlungen, auf der Y-Achse das Überleben der Zellen im Vergleich zur Positivkontrolle, gemessen am ATP-Gehalt der Probe. NT = siRNA ohne Zielgen (Positivkontrolle); Ubiquitin = siRNA gegen Ubiquitin (Negativkontrolle); SMPD 1-4 = siRNA gegen Sphingomyelinase 1-4; DMSO = Positivkontrolle für GW4869 (in DMSO gelöst). Statistische Analyse mit 2-way Anova, $n = 3$.

Diese zeigten auf, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Lebensfähigkeit der Zellen gab, wenn diese mit siRNA gegen *SMPD2-3* oder beide in Kombination behandelt wurden. Gemessen wurde die Viabilität durch photometrische Bestimmung des ATP-Gehalts einer bestimmten, in allen Replikaten konstanten, Zellzahl. Ebenfalls ohne Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der Zellen blieb die Zugabe des Inhibitors GW4869, in wirksamer Konzentration, zum Kulturmedium. Für die Behandlung mit verschiedenen siRNA diente eine siRNA ohne Zielgen als Positivkontrolle, für die Behandlung mit GW4869 diente DMSO als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurde siRNA gegen Ubiquitin eingesetzt, dessen *knockdown* zu einer signifikanten Abnahme der Lebensfähigkeit der Zellen beider Zelllinien führte. Um den *viability assays* Aussagekraft zu verleihen, musste weiterhin gezeigt werden, dass der *knockdown* mittels siRNA tatsächlich funktioniert und somit die Expression der entsprechenden Genprodukte unterblieb.

3.3 Bestätigung des *knockdown* im Western Blot

Zur Überprüfung der Effizienz des *knockdown* wurden Western Blots mit Zellextrakt der zuvor behandelten Zellen durchgeführt (Abbildung 4). Ein vollständiges Verschwinden der Banden war dabei nicht festzustellen, jedoch die Abnahme der Bandenintensität bei gleichmäßiger Proteinverteilung in der Ladekontrolle.

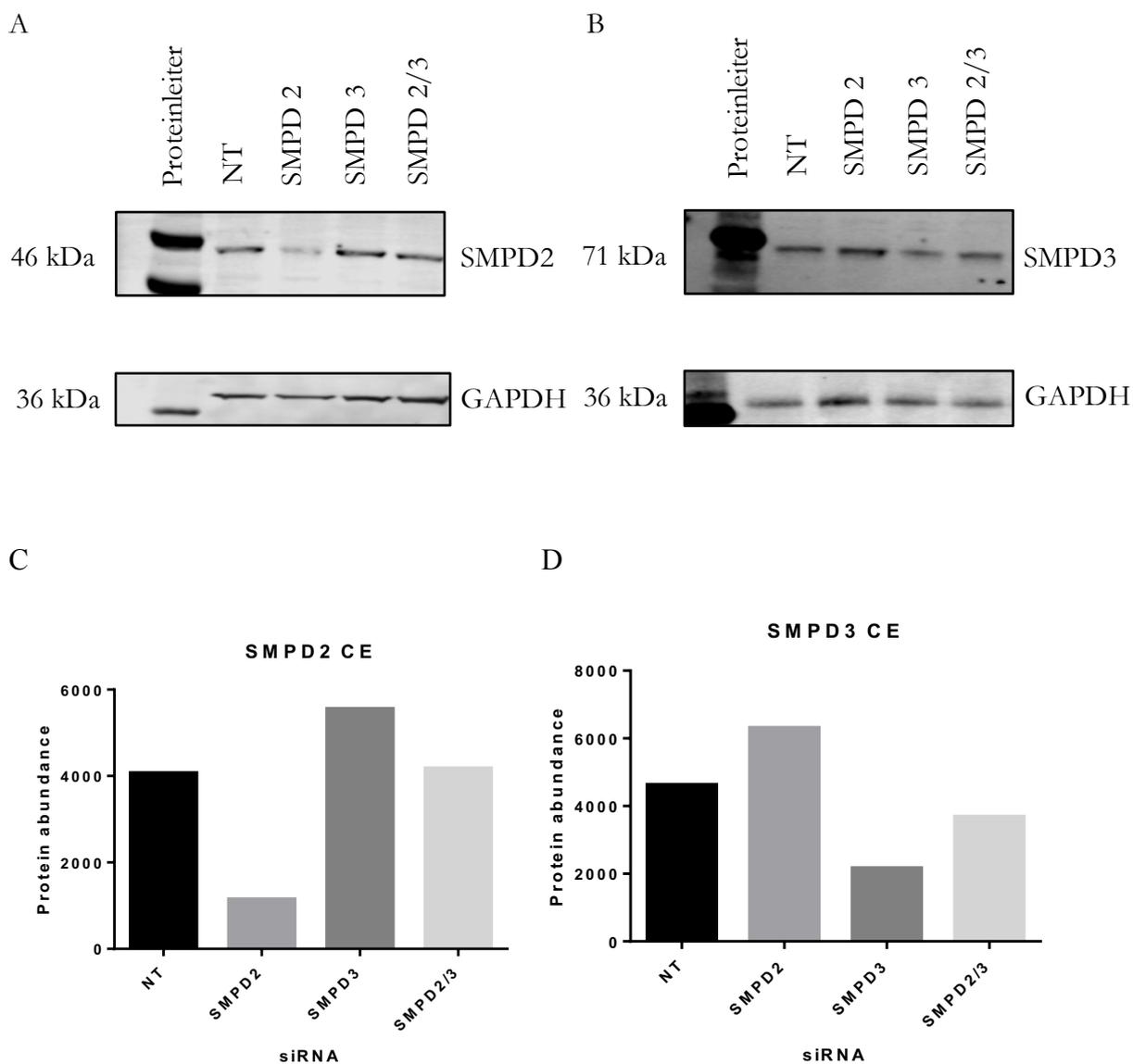
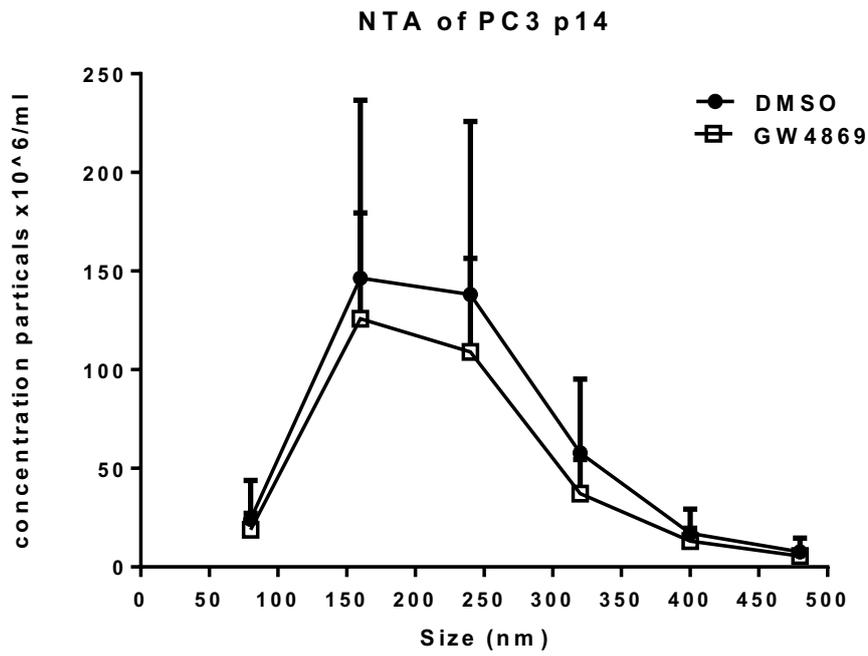


Abbildung 4: Beispiel Western Blots von Zellextrakt. (A) Du145-Zellextrakt mit Antikörper gegen *SMPD2* (oben), erwartete Bande bei 46 kDa und GAPDH (36 kDa) als Ladekontrolle (unten) gefärbt. (B) PC3-Zellextrakt (CE) mit Antikörper gegen *SMPD3* (oben), erwartete Bande bei 71 kDa und GAPDH (36 kDa) als Ladekontrolle (unten). (C+D) Quantifizierung der Färbintensität. Oberhalb stehen die siRNA, mit denen die Zellen jeweils zuvor behandelt wurden, NT steht dabei für „non targeting siRNA“ also eine siRNA ohne Zielgen, die als Kontrolle dient.

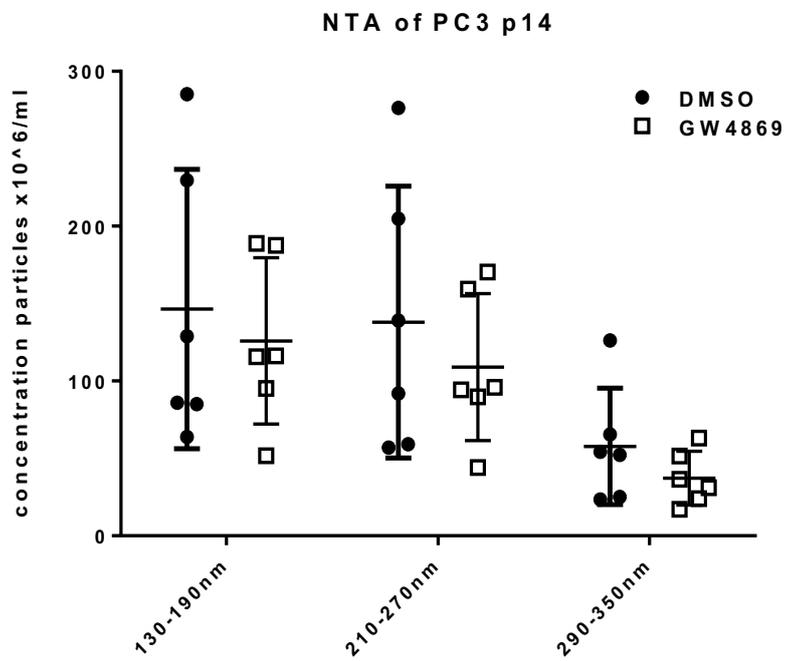
3.4 *Nanoparticle tracking analysis*

Nanoparticle tracking analysis (NTA) ist ein Verfahren, bei dem die Größe und Konzentration in einer Flüssigkeit enthaltener Partikel, zum Beispiel extrazelluläre Vesikel, bestimmt werden kann. Dazu wird die Brown'sche Molekularbewegung der Partikel mit einer hochauflösenden Kamera über einen bestimmten Zeitraum festgehalten. Eine Software kann im Anschluss aus diesen Daten die Größenverteilung und Konzentration der Partikel berechnen (2.2.3). Mit diesem Verfahren sollte ermittelt werden, ob sich die Konzentration der p14- oder p100-Fraktion ändert, sobald die neutralen Sphingomyelinasen nicht mehr exprimiert oder inhibiert werden. Wie zuvor wurden die Zellen zu diesem Zweck mit siRNA oder GW4869 behandelt und die Vesikel im Anschluss wie in 2.2.2 beschrieben aufgereinigt. In den folgenden Abbildungen (5+6) sind zunächst die Ergebnisse für PC3-Zellen (Abb. 5), im Anschluss die für Du145-Zellen (Abb. 6), dargestellt. Die Graphen A-F zeigen jeweils die Ergebnisse der p14-Fraktion, G-L die der p100-Fraktion. Zunächst ist die Konzentration gegen die Partikelgröße als Kurve aufgetragen (Abb. 5/6 A, D, G, J), wobei A und G die Ergebnisse nach GW4869- und D und J nach siRNA-Behandlung zeigen. Dabei fällt auf, dass nicht alle Größengruppen Unterschiede aufweisen. Zum Beispiel jeweils die erste und letzten beiden Größengruppen in der p14-, oder die letzten beiden in der p100-Fraktion. Aus diesem Grund sind die relevanten Größengruppe in separaten Graphiken als absolute Konzentration (Abb. 5/6 B, E, H, K), sowie als Vielfaches der Kontrollgruppe (Abb. 5/6 C, F, I, L), dargestellt.

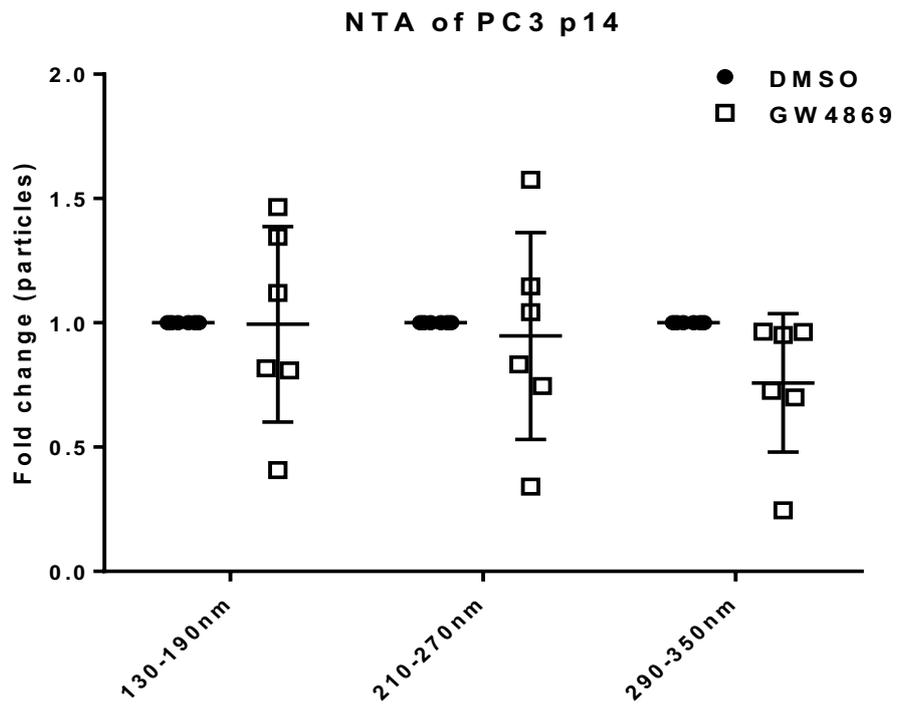
A



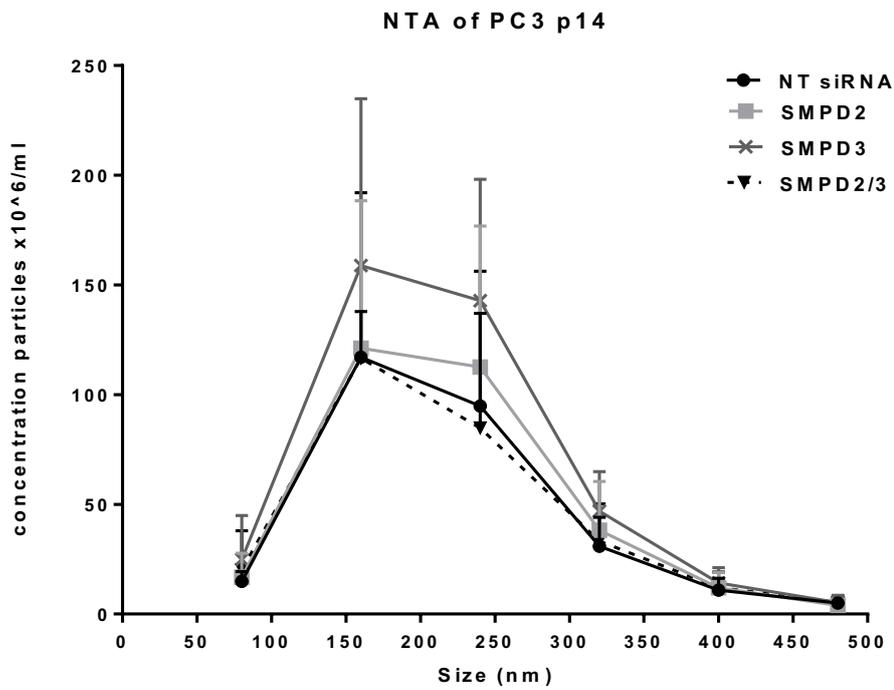
B



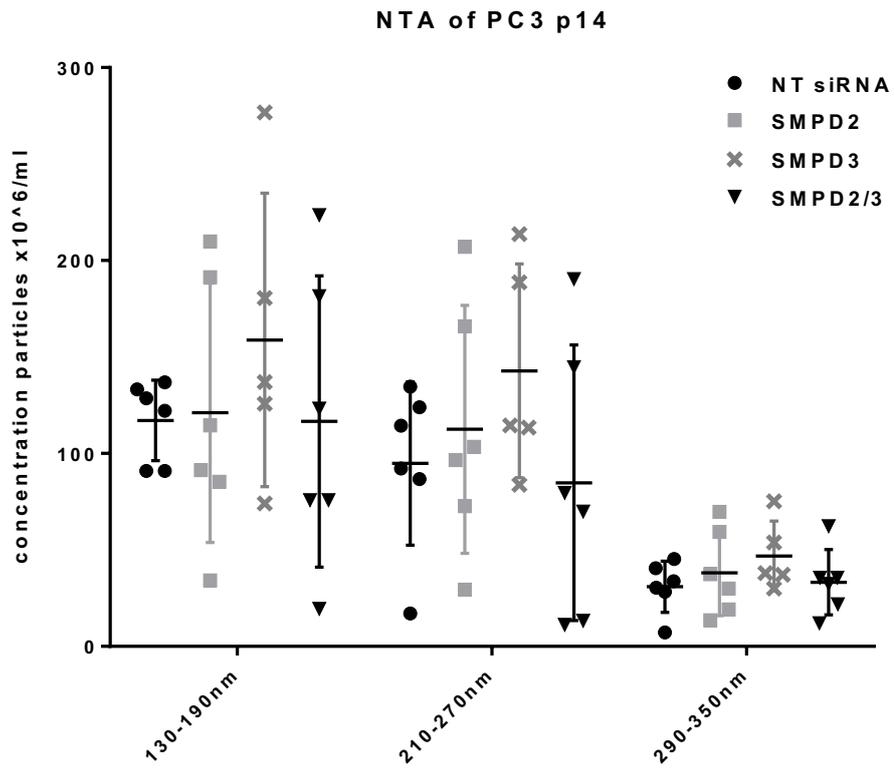
C



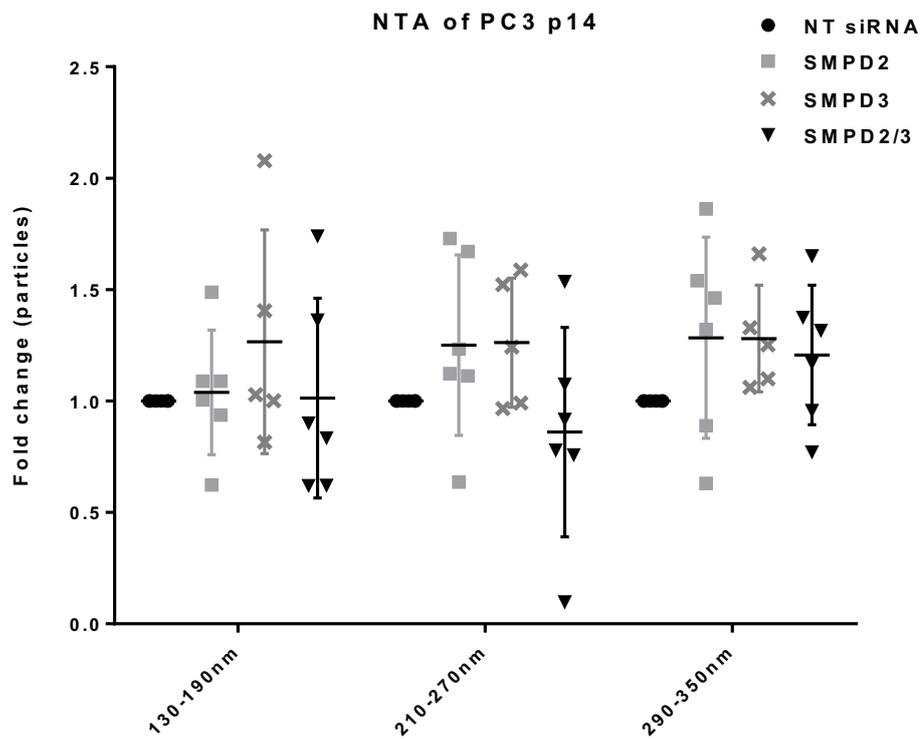
D



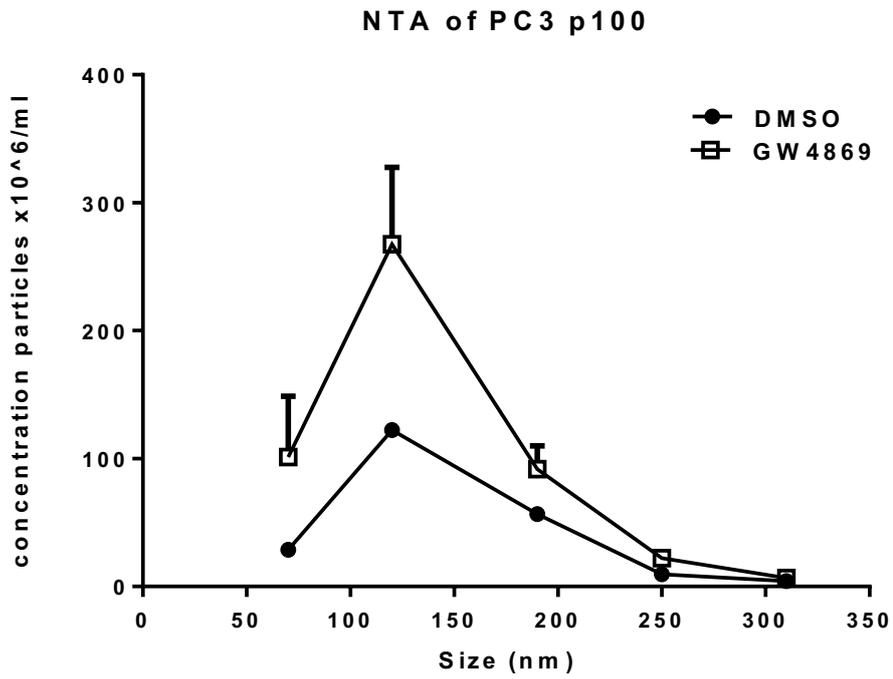
E



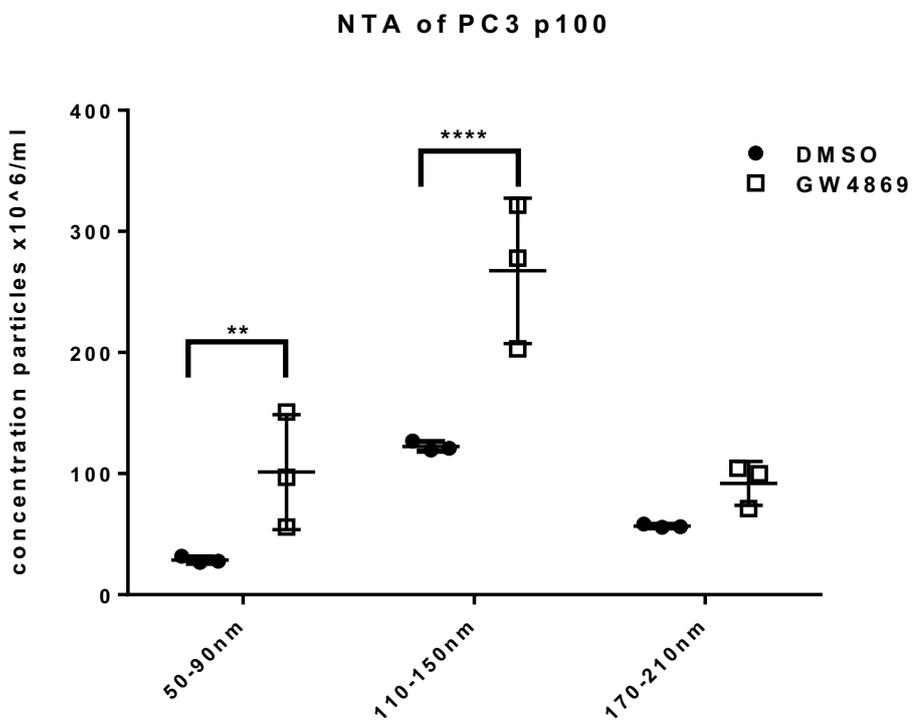
F



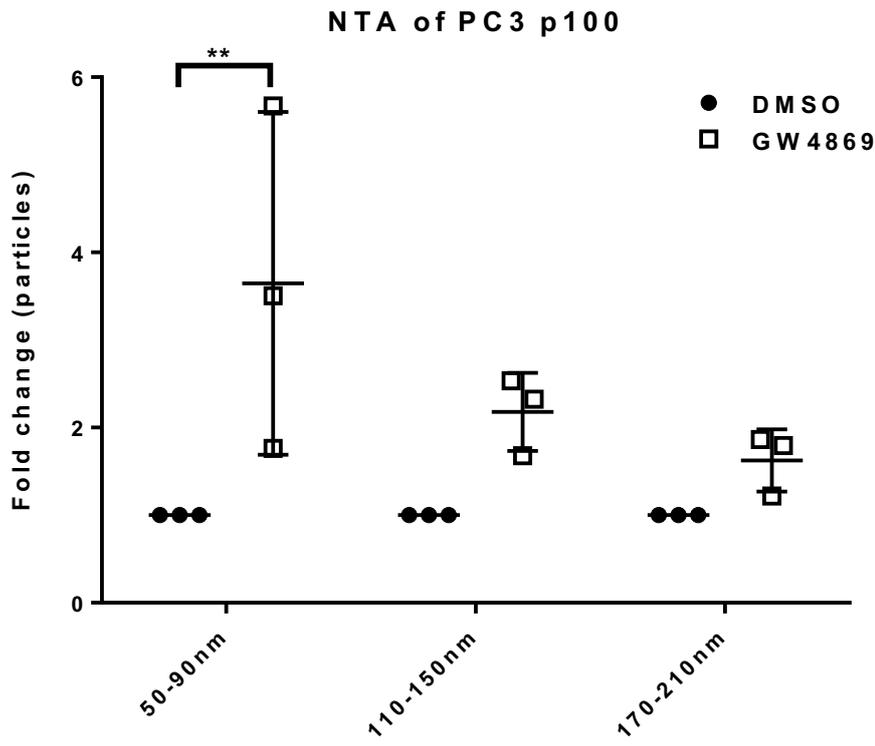
G



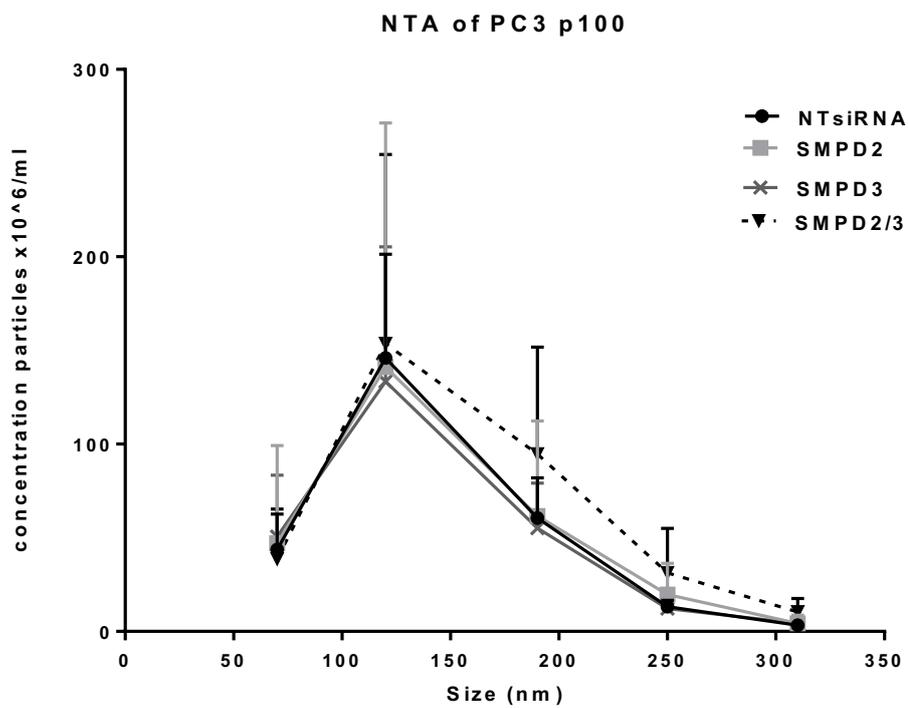
H



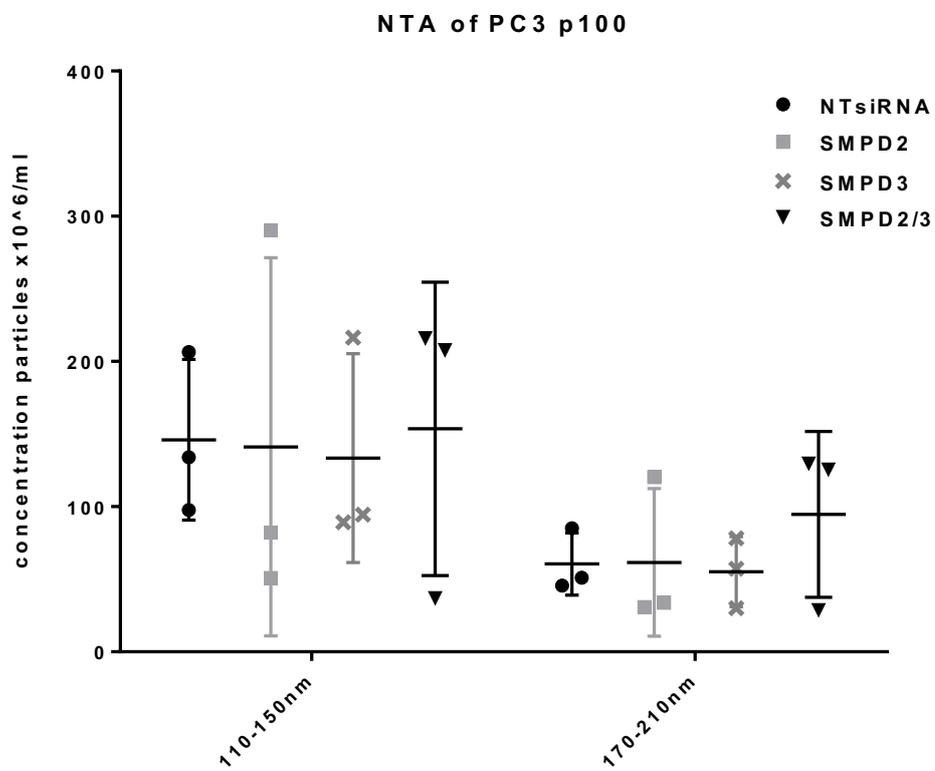
I



J



K



L

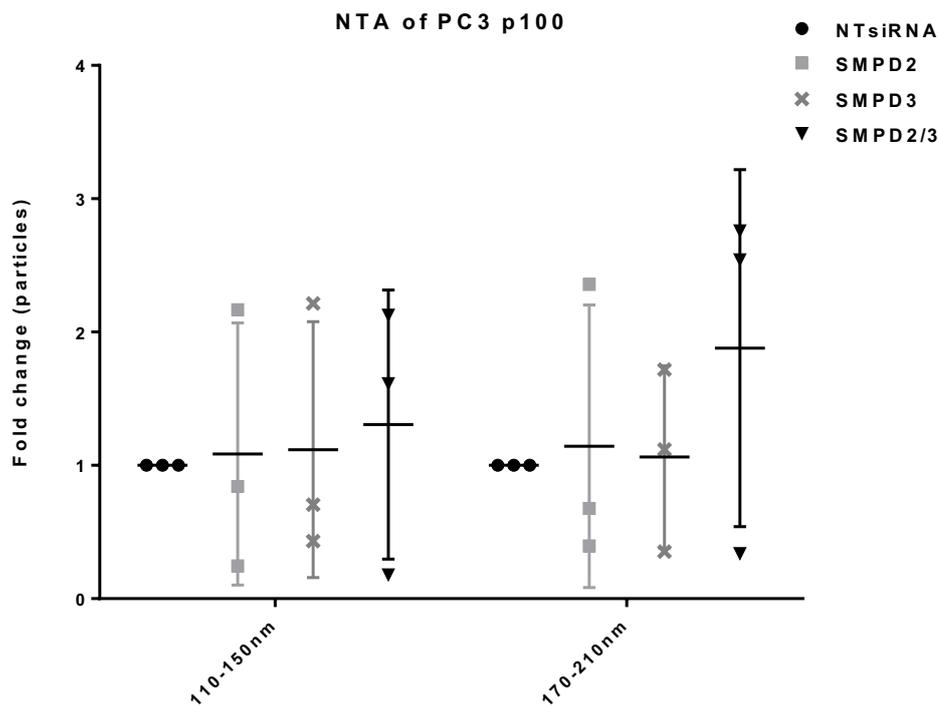
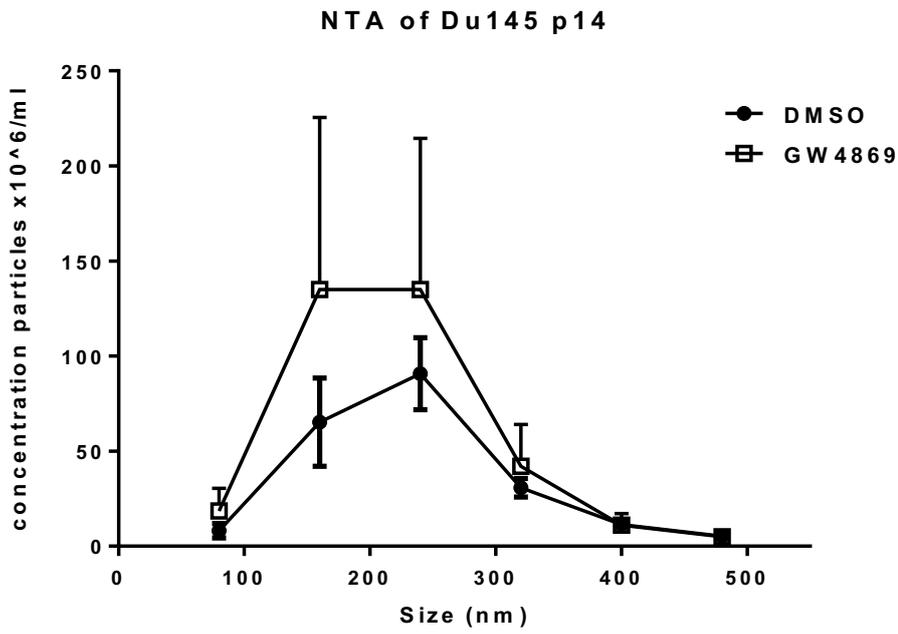
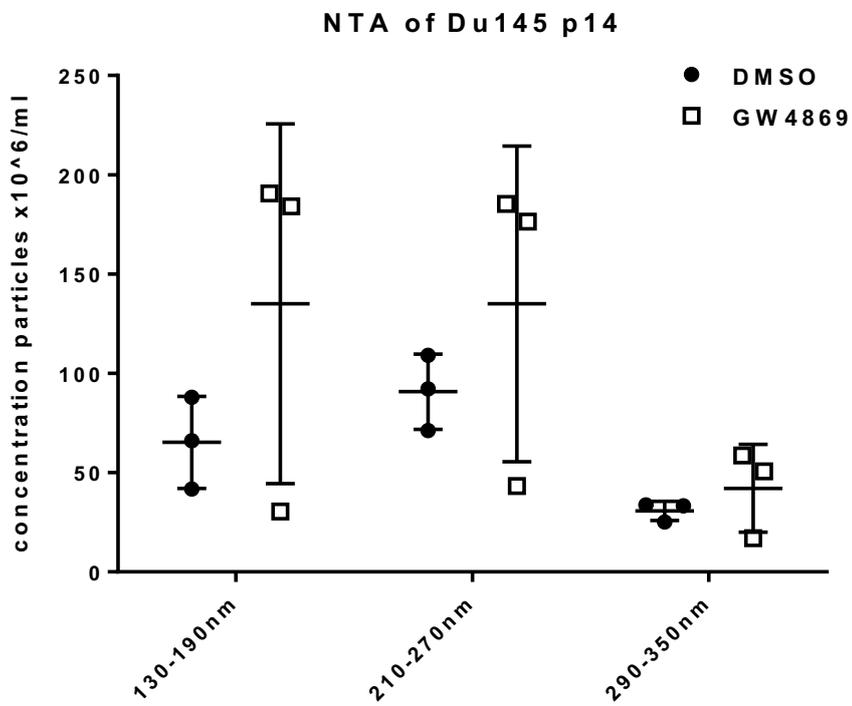


Abbildung 5: Quantifizierung der NTA Ergebnisse für PC3-Zellen. In den Abbildungen A-F sind die Ergebnisse der p14-Fraktion dargestellt, in G-L die der p100-Fraktion. Abbildung A zeigt den Vergleich der Größenverteilung sekretierter Partikel, nach DMSO oder GW4869 Behandlung der Zellen. Die Konzentrationsunterschiede der dabei relevanten Größengruppen sind in B gezeigt, deren Vielfaches der Kontrollgruppe in C. Die Abbildungen D-F folgen demselben Prinzip, mit dem Unterschied, dass die Zellen hier zuvor mit verschiedenen siRNA behandelt wurden. Gleiches gilt für die nächsten Abbildungen der p100-Fraktion: Behandlung der Zellen mit DMSO oder GW4869 (G-I), bzw. siRNA (J-L). Achsenbeschriftungen: X-Achsen: Partikeldurchmesser in nm (A, D, G, J); Relevante Größengruppen (B, C, E, F, H, I, K, L). Y-Achsen A, B, D, E, G, H, J, K: Konzentration der Partikel $\times 10^6/\text{ml}$. Y-Achsen C, F, I, L: Vielfaches der Kontrollgruppe. A-F $n = 6$, G-L $n = 3$ statistische Analyse mit 2-way ANOVA und multiplem Testen.

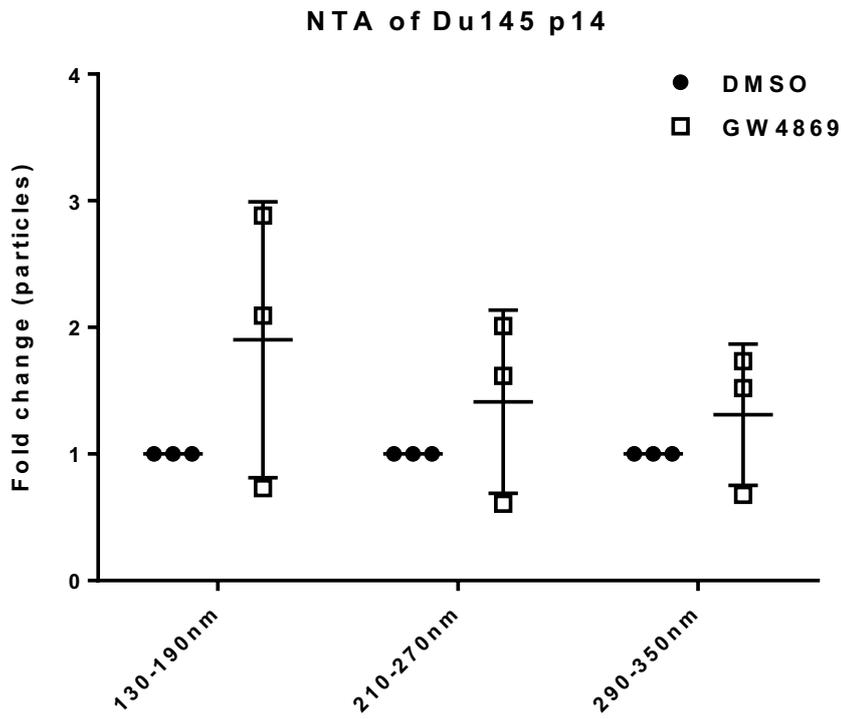
A



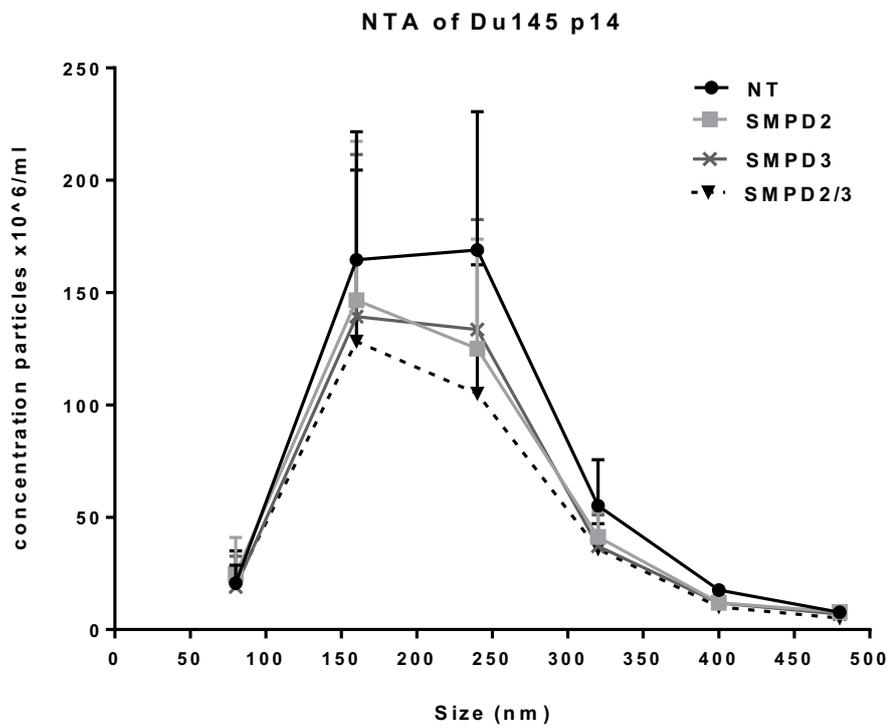
B



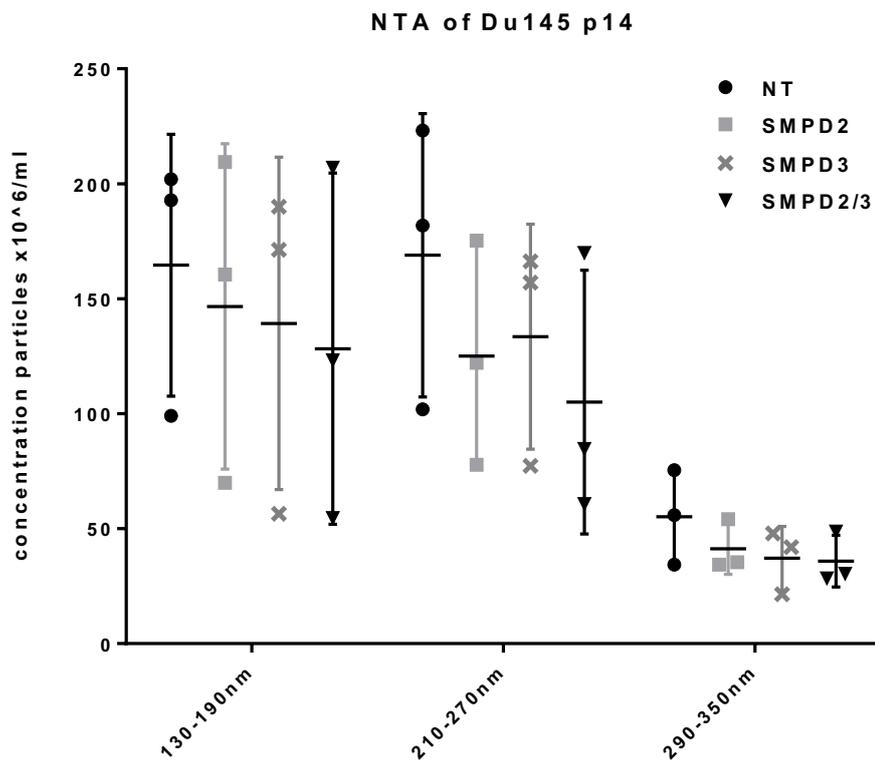
C



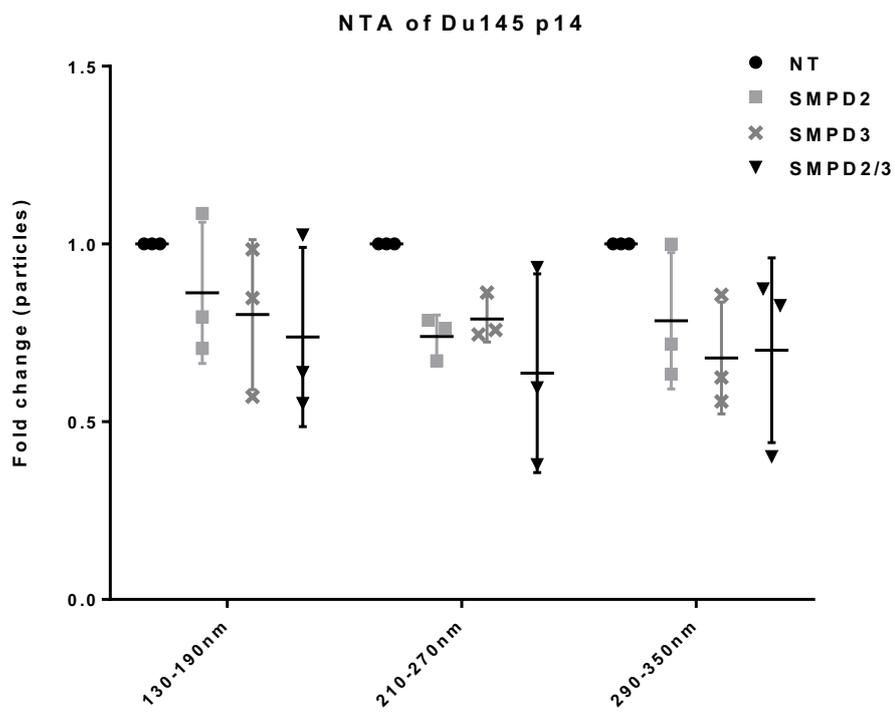
D



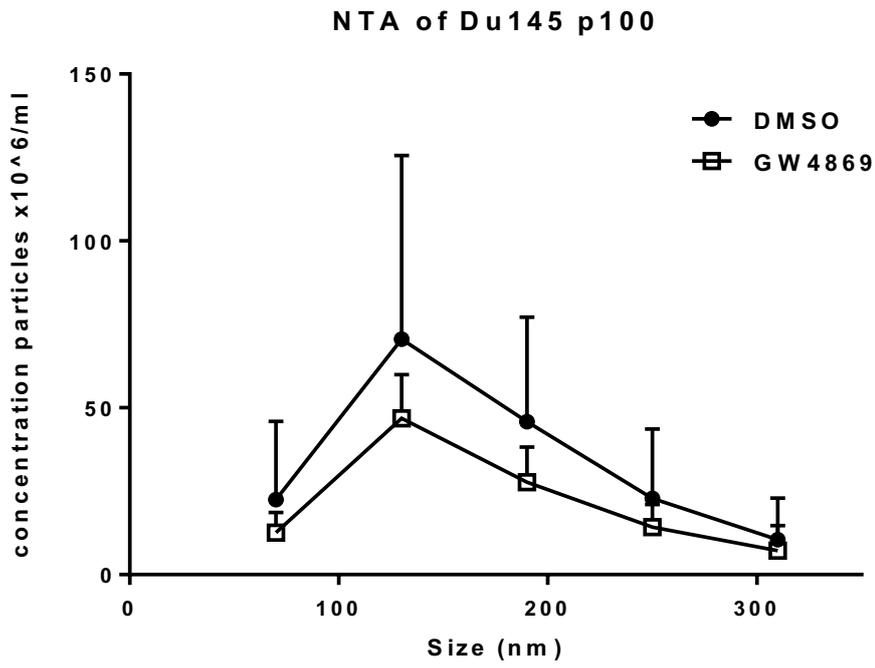
E



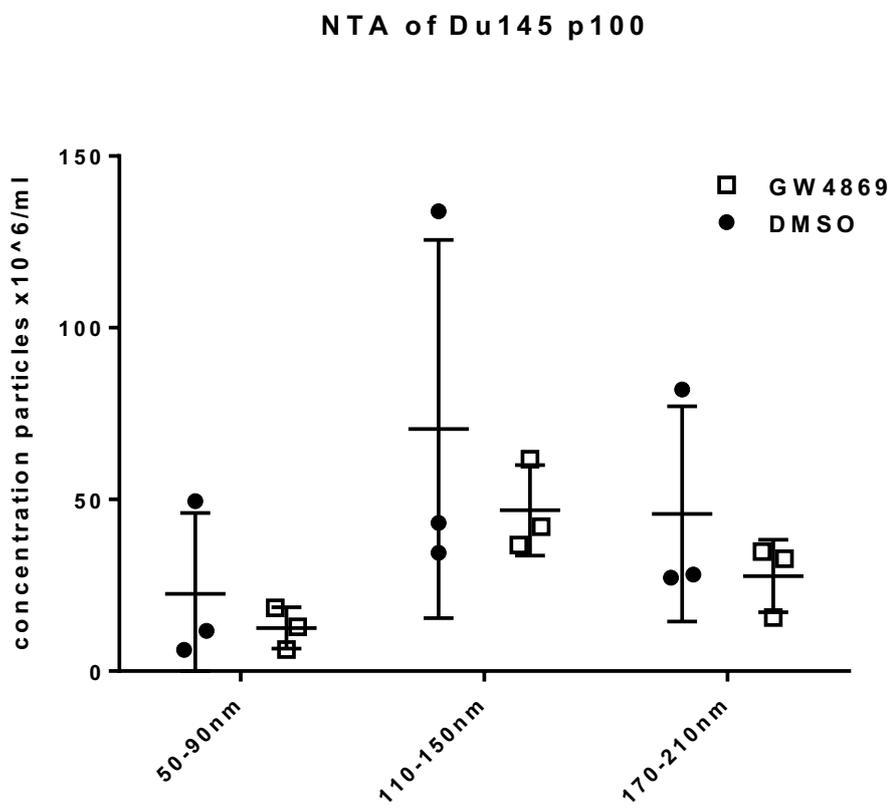
F



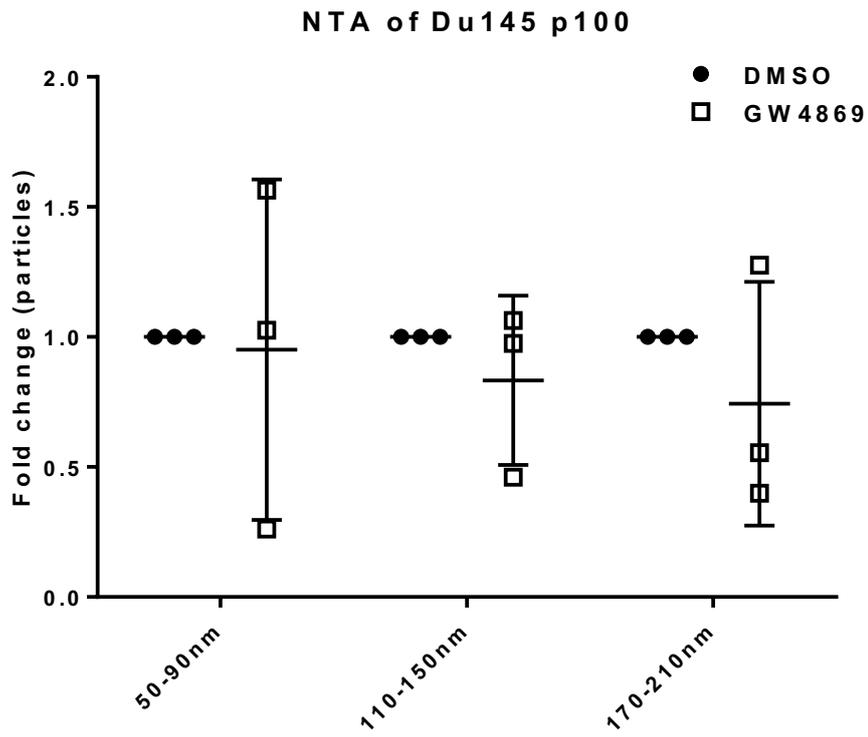
G



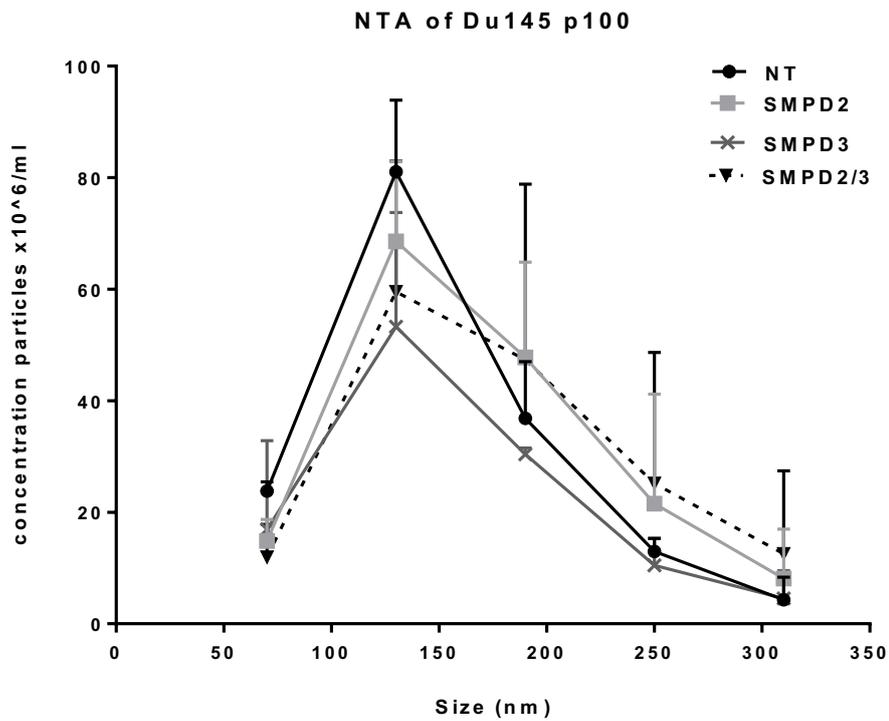
H



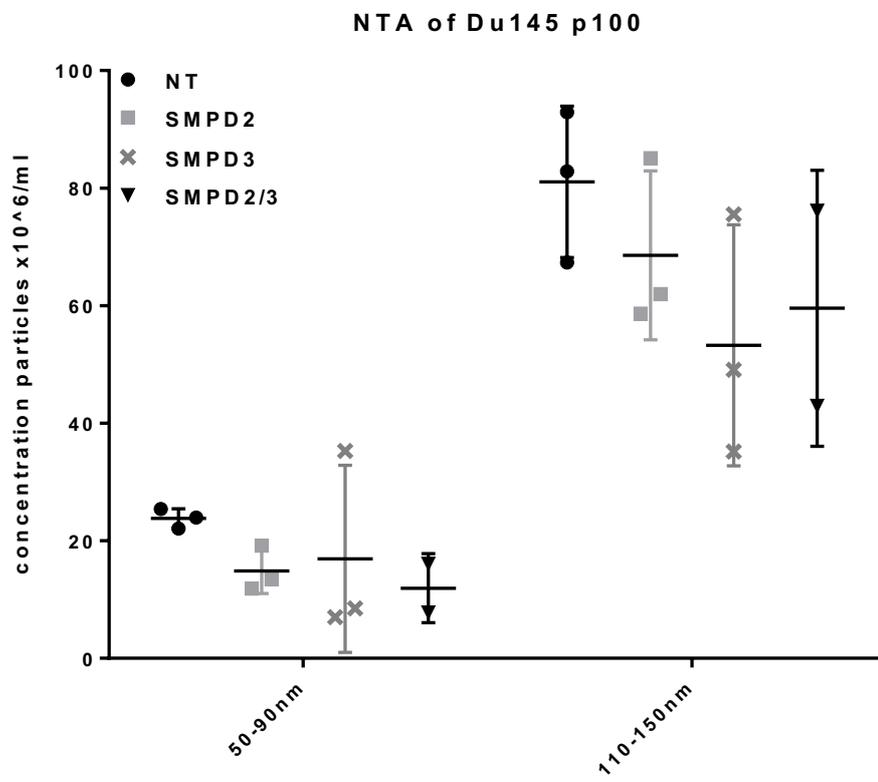
I



J



K



L

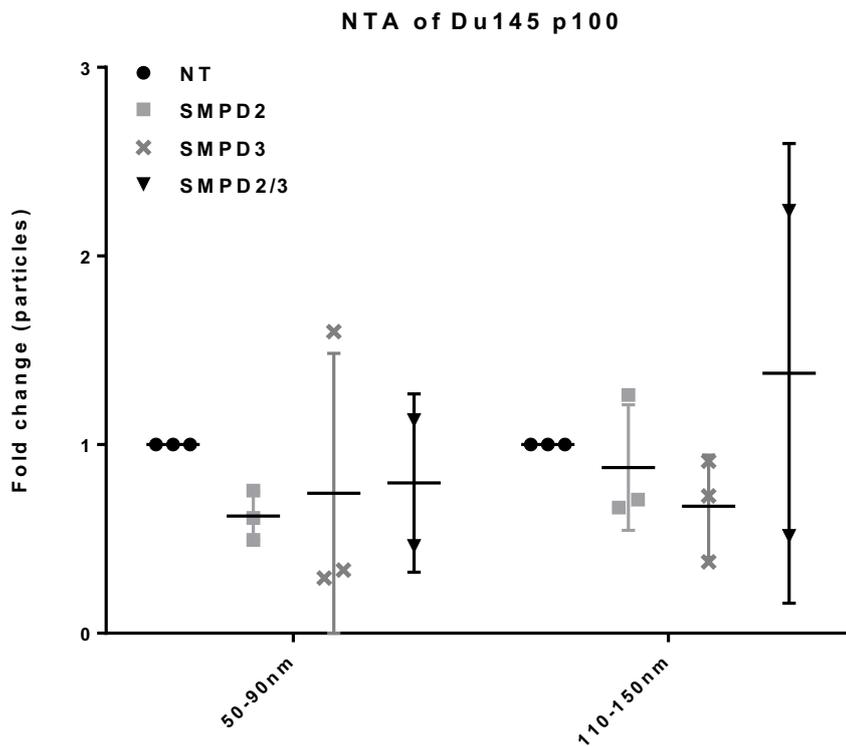


Abbildung 6: Quantifizierung der NTA Ergebnisse für Du145-Zellen. In den Abbildungen A-F sind die Ergebnisse der p14-Fraktion dargestellt, in G-L die der p100-Fraktion. Abbildung A zeigt den Vergleich der Größenverteilung sekretierter Partikel, nach DMSO oder GW4869 Behandlung der Zellen. Die Konzentrationsunterschiede der dabei relevanten Größengruppen sind in B gezeigt, deren Vielfaches der Kontrollgruppe in C. Die Abbildungen D-F folgen demselben Prinzip, mit dem Unterschied, dass die Zellen hier zuvor mit verschiedenen siRNA behandelt wurden. Gleiches gilt für die nächsten Abbildungen der p100-Fraktion: Behandlung der Zellen mit DMSO oder GW4869 (G-I), bzw. siRNA (J-L). Achsenbeschriftungen: X-Achsen: Partikeldurchmesser in nm (A, D, G, J); Relevante Größengruppen (B, C, E, F, H, I, K, L). Y-Achsen A, B, D, E, G, H, J, K: Konzentration der Partikel $\times 10^6/\text{ml}$. Y-Achsen C, F, I, L: Vielfaches der Kontrollgruppe. $n = 3$ statistische Analyse mit 2-way ANOVA und multiplem Testen.

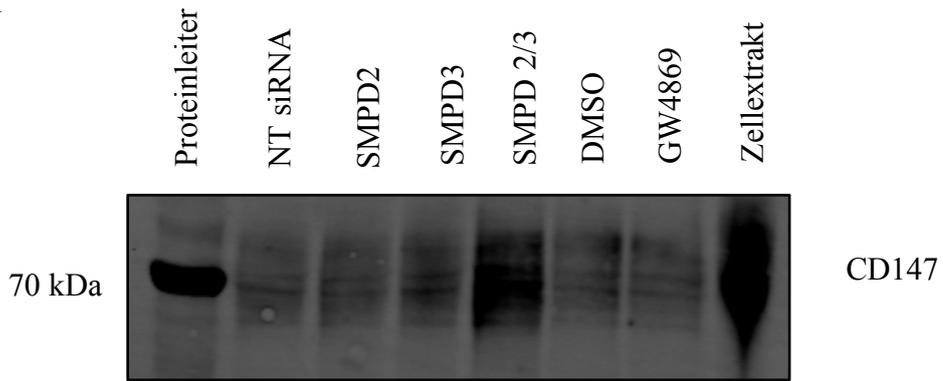
Für PC3-Zellen zeigte sich in der p14-Fraktion eine Tendenz zur Abnahme der Konzentration 130 nm bis 350 nm großer Partikel, wenn die Zellen zuvor, wie in 2.2.1 beschrieben, mit dem Inhibitor der nSmases GW4869 behandelt wurden, jedoch war der Unterschied statistisch nicht signifikant (Abb. 5 A-C). Für die Behandlung der Zellen mit siRNA zeigte sich kein solcher Effekt (Abb. 5 D-F). In der p100-Fraktion zeigte sich eine signifikante Zunahme der Zahl sekretierter Partikel mit 50-150 nm Durchmesser, die auch als Exosomen bezeichnet werden können, wenn die Zellen zuvor mit GW4869 behandelt wurden (Abb. 5 G-I). Für die Behandlung der PC3-Zellen mit siRNA gegen die nSmases zeigte sich in der p100-Fraktion kein solcher Effekt (Abb. 5 J-L). Von Du145-Zellen sekretierte Vesikel lieferten andere Ergebnisse. Hier war in der p14-Fraktion, unter Inhibition der nSmases durch GW4869, tendenziell eine Zunahme der Zahl sekretierter Vesikel zu beobachten (Abb. 6 A-C). Bei der p14-Fraktion der mit siRNA behandelten Zellen zeigte sich kein solcher Effekt (Abb. 6 D-F). In der p100-Fraktion war tendenziell eine Abnahme sekretierter Vesikel zu beobachten, wenn die Zellen zuvor mit GW4869 oder siRNA behandelt wurden (Abb. 6 G-L). Diese Ergebnisse waren statistisch nicht signifikant. Die Gesamtschau der NTA Messungen zeigte, dass die Aktivität der nSmases keinen großen Einfluss auf die Zahl und Größe sekretierter Vesikel in Prostatakarzinomzellen zu haben scheint. Dies führte zu der Annahme, dass sich aber das Vorhandensein vesikelspezifischer Proteine in den Proben ändern könnte.

3.5 Western Blot der NTA-Proben

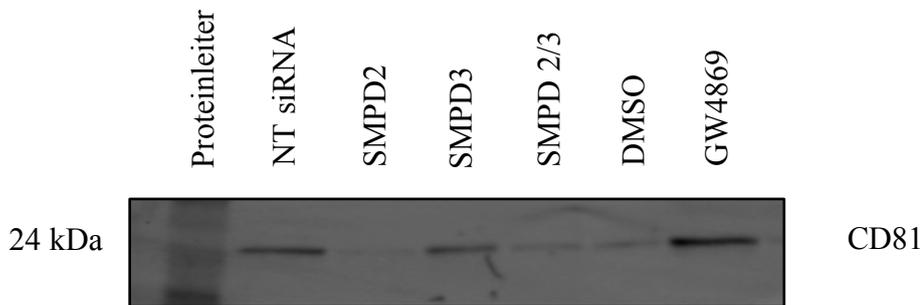
Um dieser Annahme nachzugehen, wurden neben den NTA-Messungen Western Blots mit den aufgereinigten Vesikeln, zuvor mit siRNA oder GW4869 behandelten Zellen, durchgeführt. Dabei zeigte sich für Vesikel aus zuvor mit siRNA gegen beide nSmases behandelten PC3-Zellen eine Zunahme des für die p14-Fraktion typischen Proteins *extracellular matrix metalloproteinase inducer* (EMMPRIN; CD147) (Abb. 7A). In der p100-Fraktion war eine Zunahme des für diese Fraktion charakteristischen CD81 in der Vesikelprobe zuvor mit GW4869 behandelten Zellen festzustellen (Abb. 7B). Diese Zunahme deckt sich mit den Ergebnissen der NTA-Messungen der p100-Fraktion.

Auch die Zunahme der Proteinmenge in der p14-Fraktion mit GW4869 behandelten Du145-Zellen (Abb. 7C) spiegelt die in den NTA Messungen gefundene Tendenz wieder.

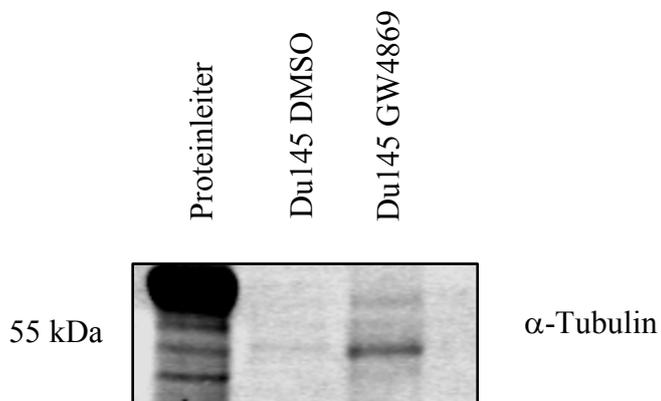
A



B



C



D

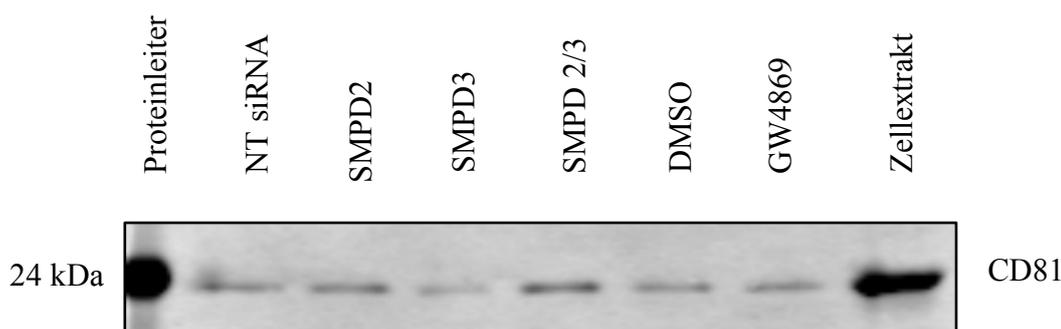


Abbildung 7: Western Blots der p14- und p100-Fraktion von PC3- und Du145-Zellen. (A) p14- und (B) p100-Fraktion aus PC3-Zellen, deutlich Zunahme in der p100-Fraktion nach GW4869 Behandlung. (C) p14- und (D) p100-Fraktion aus Du145-Zellen, deutliche Zunahme der p14-Fraktion nach GW4869 Behandlung.

Die Ergebnisse der Western Blots und der NTA Messungen mit Vesikeln zuvor behandelter Zellen zeigen, dass die nSmasen nicht nur Einfluss auf Anzahl und Größe sekretierter Vesikel zu haben scheinen, sondern, dass sich dadurch auch die Menge sekretierter Proteine ändert. Dies führt zu der Frage, ob die Menge sekretierter Proteine direkt von der Zahl sekretierter Vesikel abhängt, oder ob sich durch die Inhibition der nSmasen ebenfalls die Proteinmenge pro Vesikel selbst ändert. Weiterhin wird die Frage aufgeworfen, ob sich neben der Proteinmenge pro Vesikel auch die Komposition der Proteine auf der Vesikeloberfläche ändern könnte und ob diese Veränderungen funktionelle oder diagnostische Relevanz haben könnten.

3.6 Vesikel-*Proteomics* enthüllt interessante Tumormarkerkandidaten

3.6.1 *Proteomics* und Bewertung des Tumormarkerpotenzials

Um der zuletzt genannten Frage auf den Grund zu gehen, wurden Zellen der Linien PC3 und Du145 zunächst mit DMSO als Kontrolle oder GW4869 als Inhibitor der nSmasen behandelt. Die von diesen Zellen sekretierten Vesikel wurden im Anschluss einer massenspektrometrischen Analyse zugeführt. Dieses Experiment wurde durch die Arbeitsgruppe der „UMG Core Facility Proteomics“ um Herrn Dr. Christof Lenz durchgeführt. Die Daten wurden mit dem *online tool* „Multi experiment viewer“ in eine übersichtliche Form - eine *cluster-heatmap* gebracht (Abb. 8). In dieser *heatmap* wurden Proteine nach ihrer Häufigkeit

in der massenspektrometrischen Analyse sowie der Zugehörigkeit zu technischen Replikaten des Experiments geordnet. Daraufhin wurde nach Proteinen gesucht, die vermehrt auf Vesikeln aus GW4869-behandelter Zellen zu finden waren (gelb in der *heatmap*) und möglichst in geringem Maße auf Vesikeln aus DMSO-behandelter Zellen (dunkel, bzw. blau in der *heatmap*).

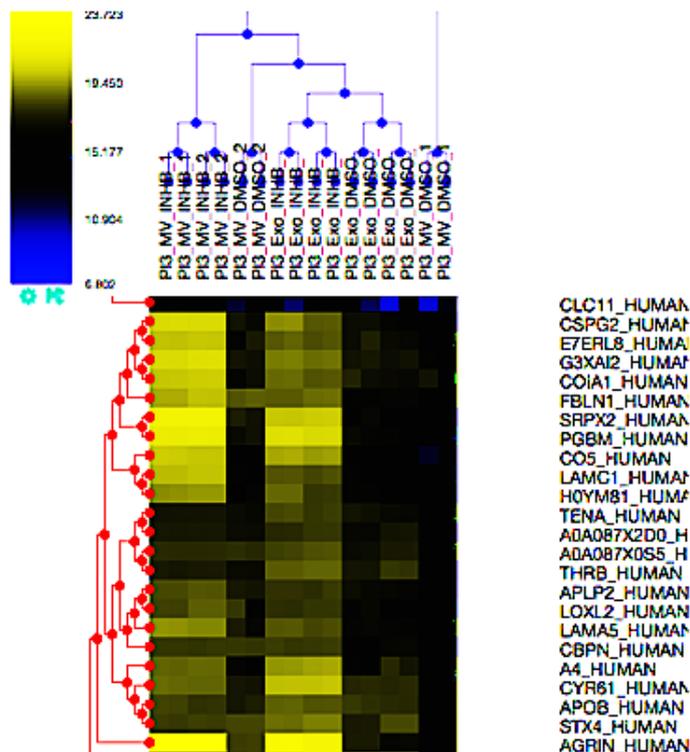
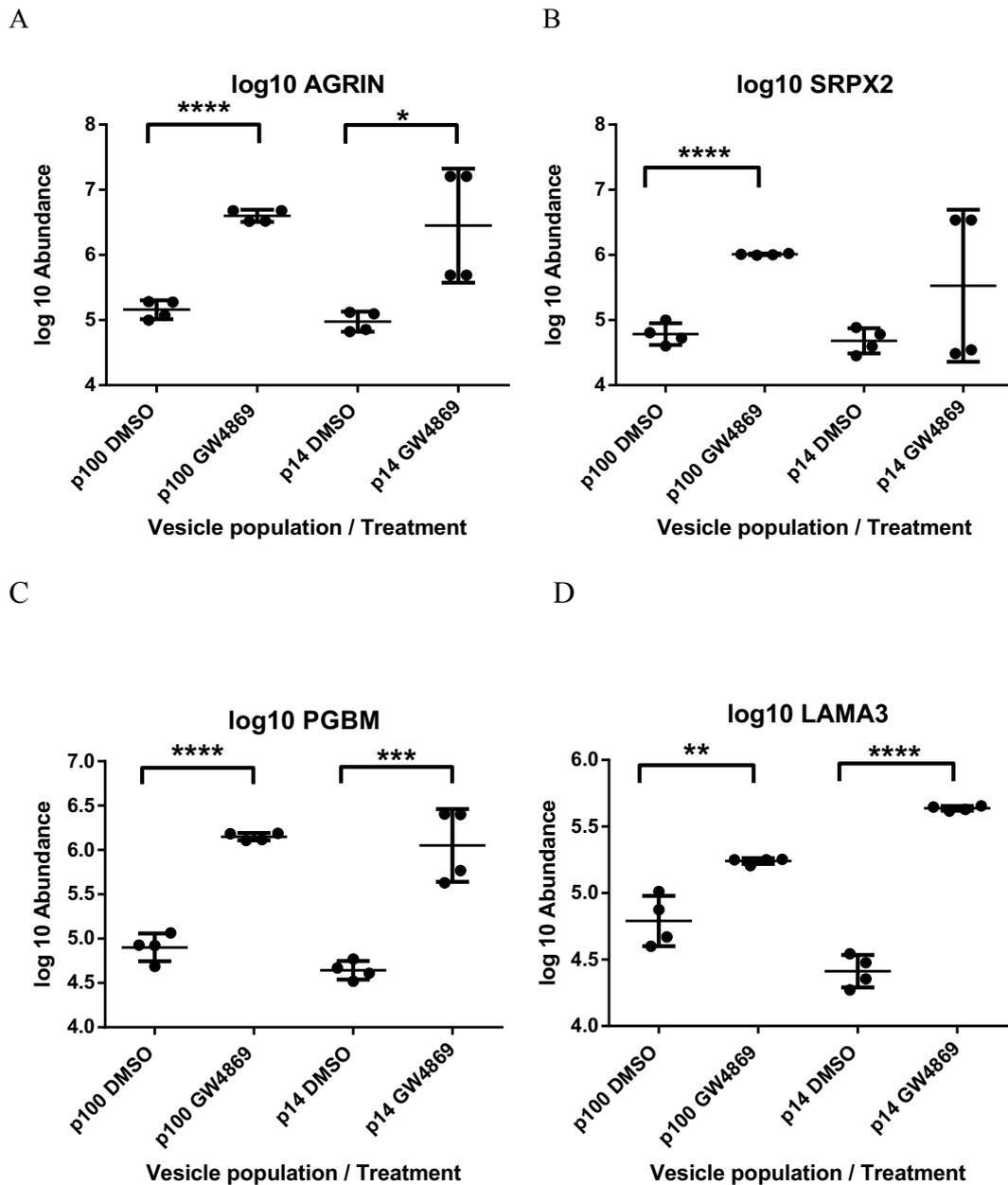


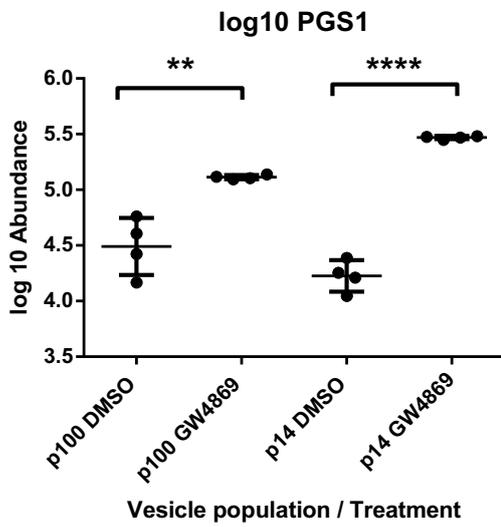
Abbildung 8: Exemplarisches *heatmap-cluster* von PC3-Vesikeln. Links oben, Farbabstufung: gelb: hohes Aufkommen, dunkler werdend: abnehmendes, blau: niedriges Aufkommen. Oben vertikal: Nach „*Principal Component*“-Analyse zusammengefasste Replikate. Dabei steht MV für Mikrovesikel, also die p14-Fraktion, EXO für Exosomen, also die p100-Fraktion, INHIB für GW4869 Behandlung und DMSO für die Kontrolle. Rechts: Liste der Proteinnamen.

Diese Verteilung bedeutete, dass die entsprechenden Proteine in Vesikelproben der mit GW4869-behandelten Zellen häufiger gefunden wurden als auf Vesikelproben aus DMSO-behandelten Zellen. Sollten diese Proteine auch *in vivo* häufiger auf Vesikeln zu finden sein, die von Zellen mit weniger (funktioneller) nSmasen sekretiert wurden, könnte sich für diese Proteinkandidaten das Potenzial ergeben, als Biomarker aus Blut dienen zu können. Für PC3-Zellen konnten so 22 Kandidaten aus zunächst 1495 detektierten Proteinen ermittelt werden. Für Du145-Zellen waren es 56. Diese 22 bzw. 56 Proteinkandidaten wurden im

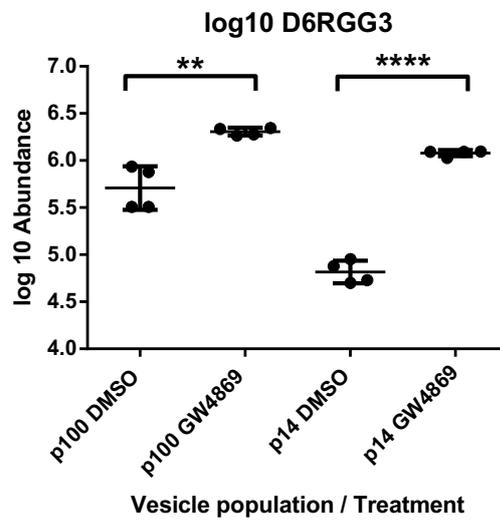
Anschluss statistisch analysiert. Zu diesem Zweck wurden die Quantifizierungsdaten der massenspektrometrischen Analyse zunächst logarithmiert und im Anschluss mittels „students t-test“ mit „multiple testing correction“ analysiert. Dabei zeigten 15 der 22 Proteine auf Vesikeln von PC3-Zellen statistische Signifikanz im Sinne eines vermehrten Auftretens auf Vesikeln der mit GW4869-behandelten Zellen. Von diesen 15 wiederum 12 sowohl in der p14- als auch der p100-Fraktion, drei in jeweils einer der beiden Fraktionen (Abb. 9).



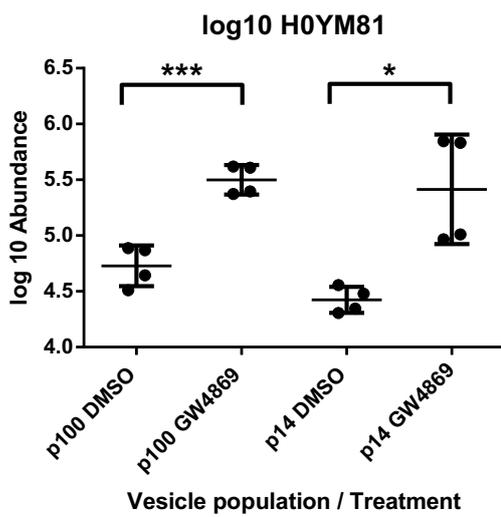
E



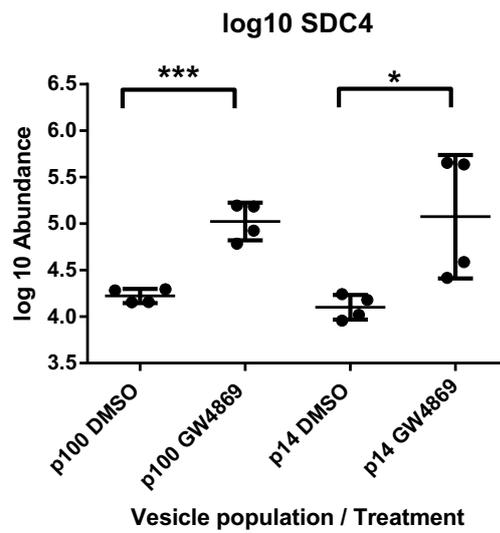
F



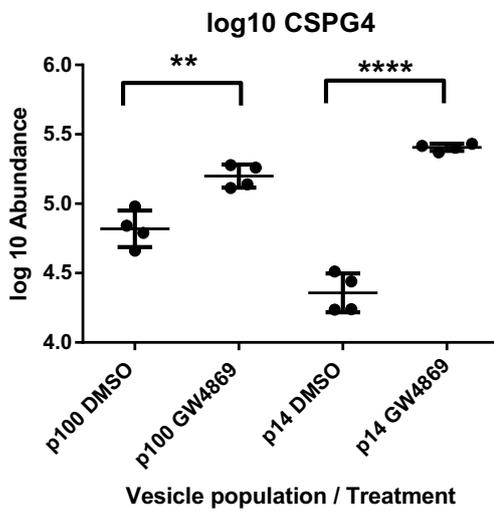
G



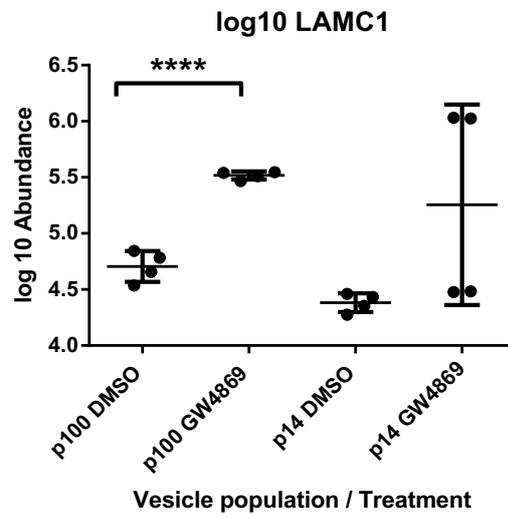
H



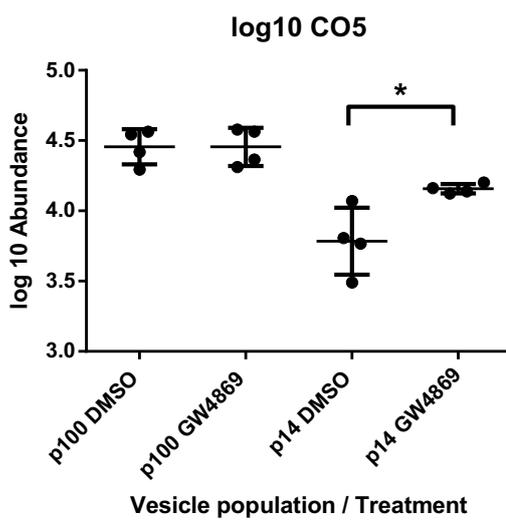
I



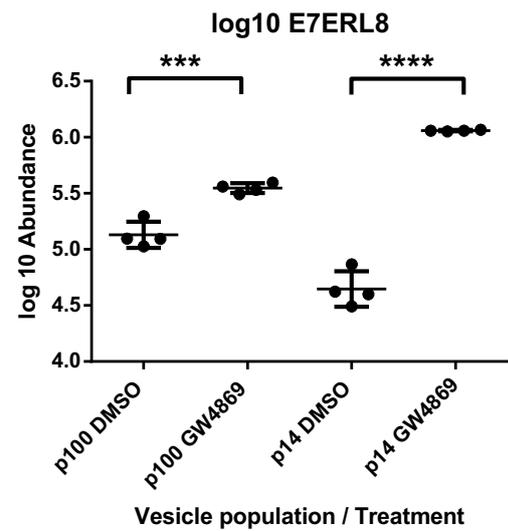
J



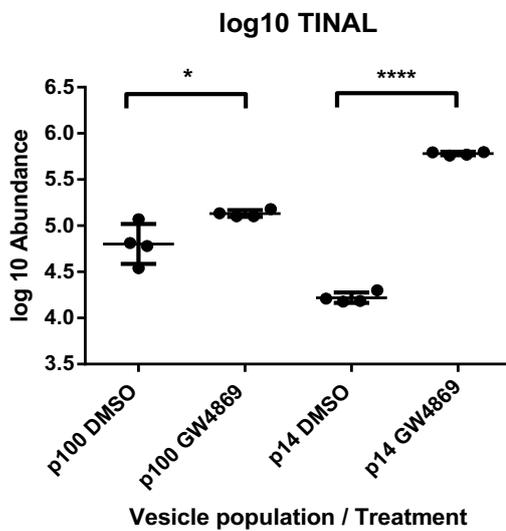
K



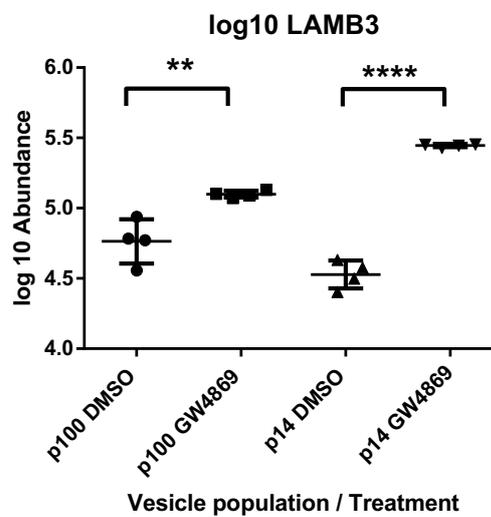
L



M



N



O

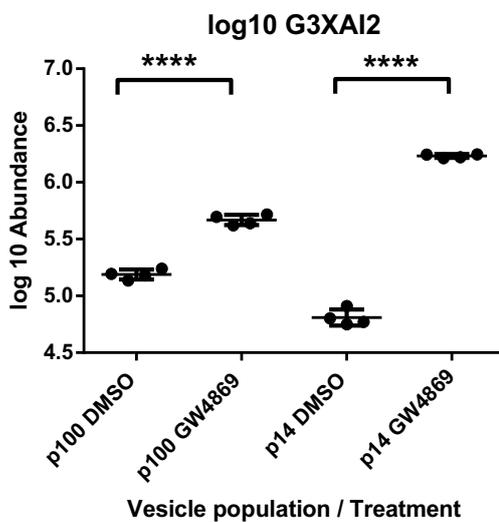
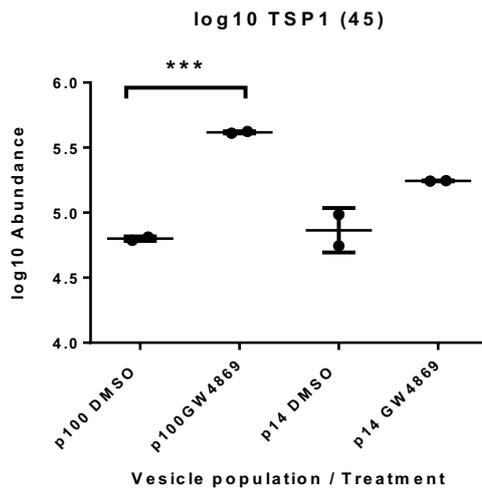


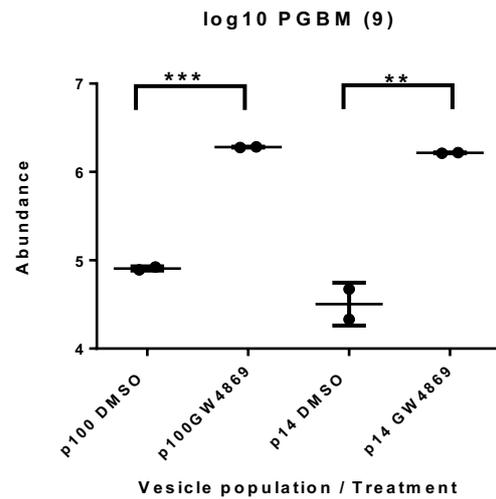
Abbildung 9: Graphische Darstellung der statistischen Analyse der Biomarkerkandidaten aus PC3-Zellen. X-Achsen: Behandlung der Zellen vor Vesikelaufreinigung - DMSO oder GW4869, sowie Fraktion – p100 und p14. Y-Achsen: Log₁₀ der Quantifizierungswerte aus der massenspektrometrischen Analyse. Statistische Analyse mittel *student's t-test* und *multiple testing correction*. * $\hat{=}$ $p \leq 0,05$; ** $\hat{=}$ $p \leq 0,005$; *** $\hat{=}$ $p \leq 0,0005$; **** $\hat{=}$ $p < 0,0001$, 2 technische, 2 biologische Replikate.

Eine signifikante Zunahme der Proteinhäufigkeit auf Vesikeln von GW4869 -behandelten Du145-Zellen war für 18 der 56 Kandidaten festzustellen, 17 davon in beiden Vesikelpopulationen (Abb. 10).

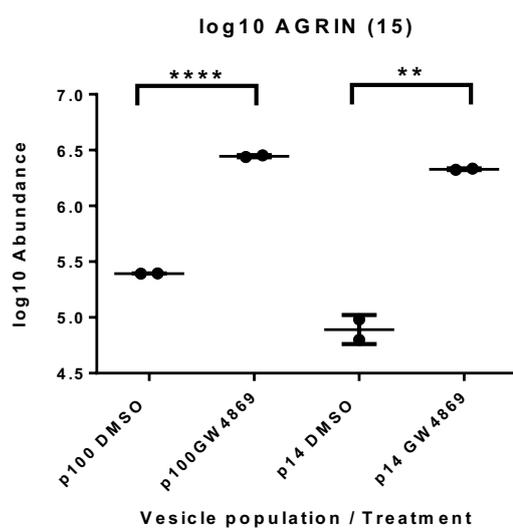
A



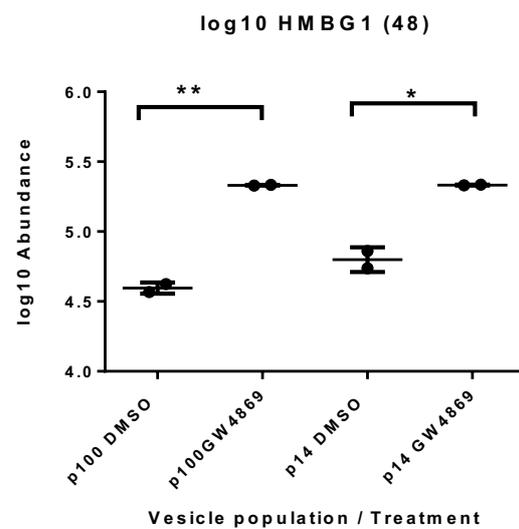
B



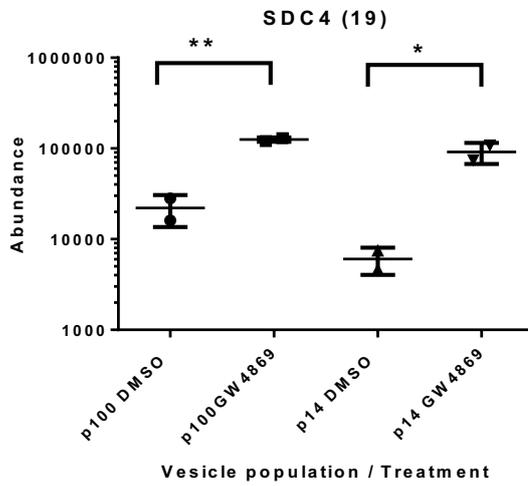
C



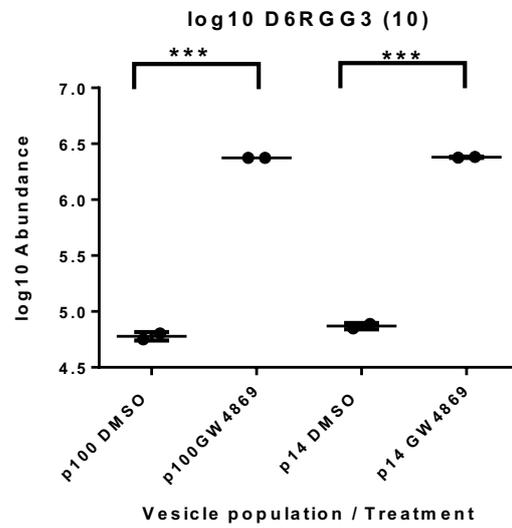
D



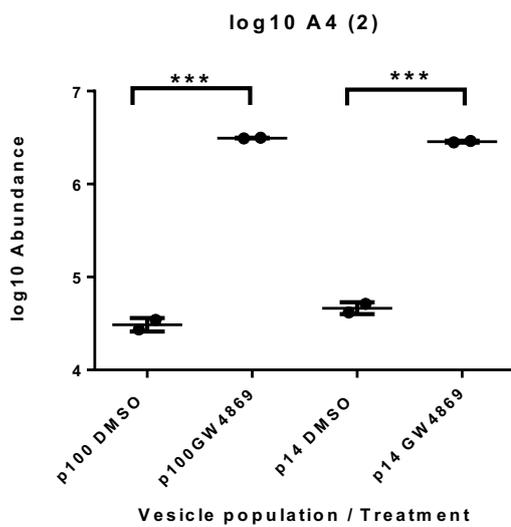
E



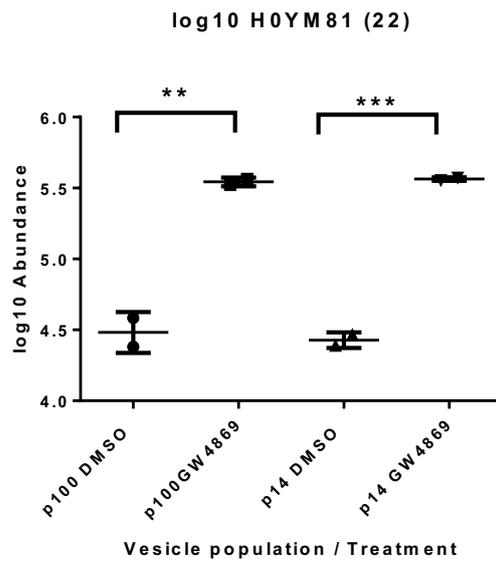
F



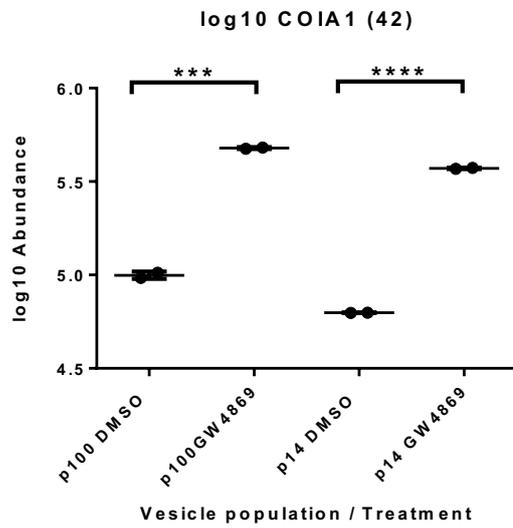
G



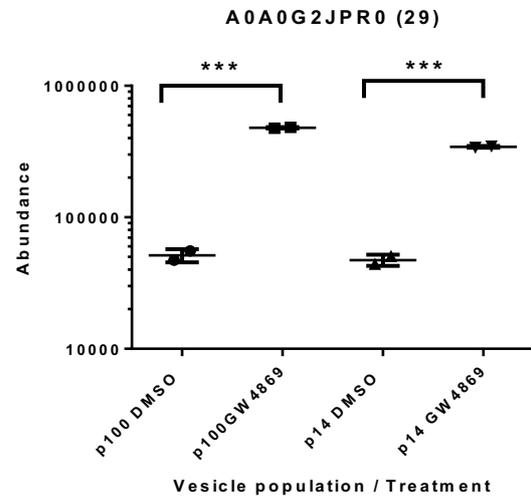
H



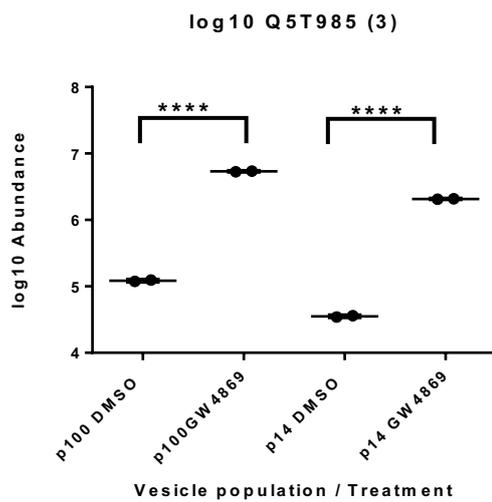
I



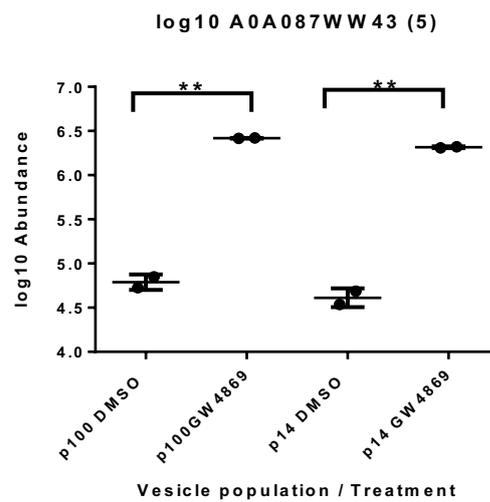
J



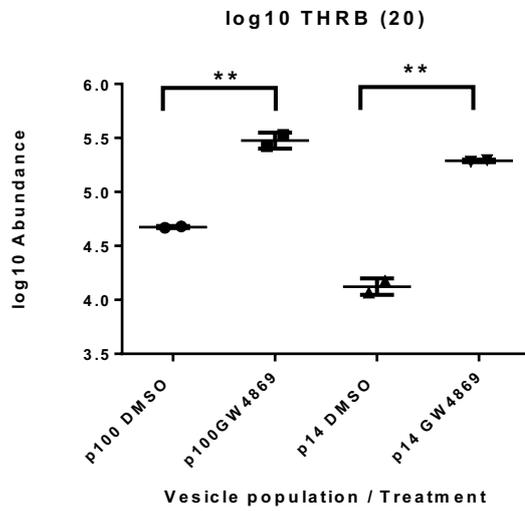
K



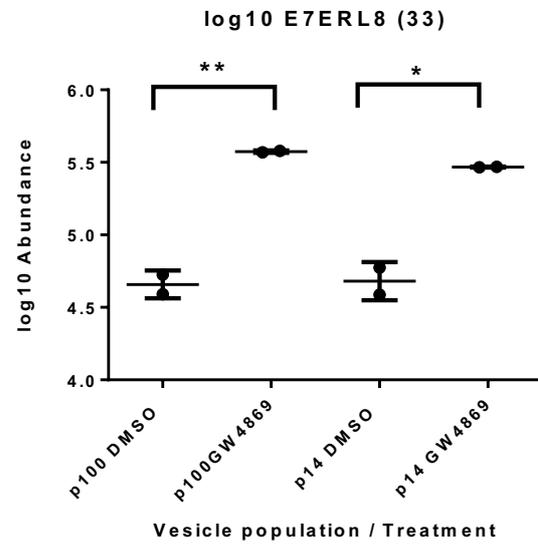
L



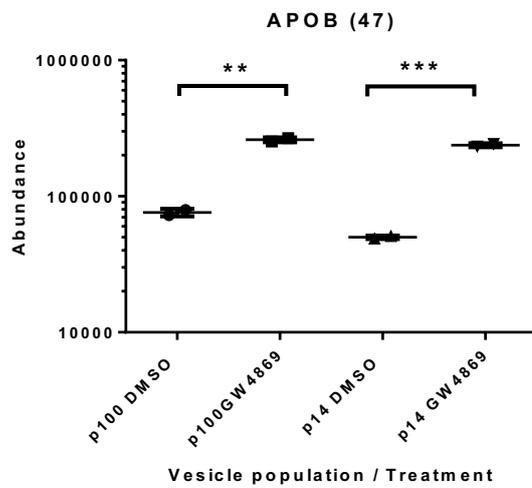
M



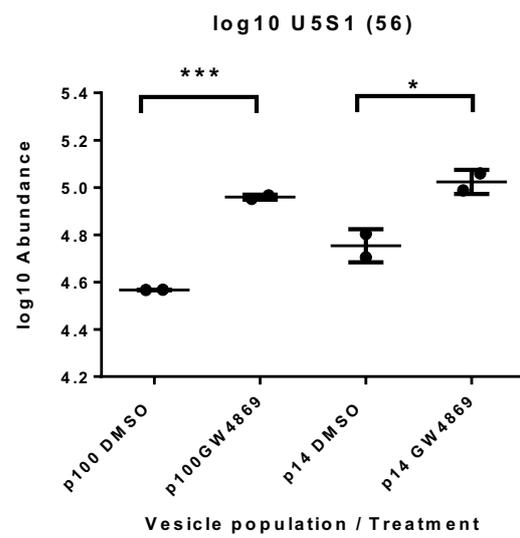
N



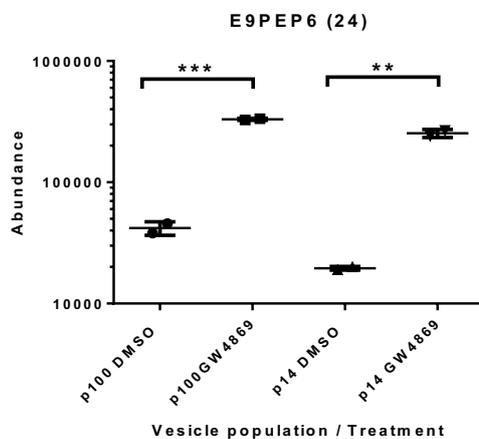
O



P



Q



R

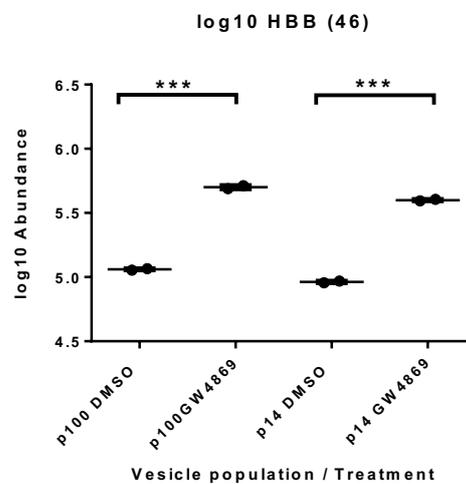


Abbildung 10: Graphische Darstellung der statistischen Analyse der Biomarkerkandidaten aus Du145-Zellen: X-Achsen: Behandlung der Zellen vor Vesikelaufräumung – DMSO oder GW4869, sowie Fraktion – p100 und p14. Y-Achsen: Log10 der Quantifizierungswerte aus der massenspektrometrischen Analyse. Statistische Analyse mittels *student's t-test* und *multiple testing correction*. * $\triangleq p \leq 0,05$; ** $\triangleq p \leq 0,005$; *** $\triangleq p \leq 0,0005$; **** $\triangleq p < 0,0005$

Diese Kandidaten wurden nun einem Bewertungssystem unterzogen, das ermitteln sollte, ob die Proteine das Potenzial haben, als Biomarker aus humanem Serum dienen zu können. Zu diesem Zweck wurde das in 2.2.8 beschriebene Bewertungssystem, eine modifizierte Version des 2017 von Worst et al. implementierten Bewertungssystems, genutzt. Jeder der potenziellen Kandidaten wurde durch Abfrage in sechs verschiedenen Internetdatenbanken auf seine Tauglichkeit als Biomarker aus Blut überprüft, die als Punktwert zwischen 0 und maximal 14 zum Ausdruck kommen sollte. In Tabelle 9 sind die Kandidaten und ihre Punktwerte aus PC3-Zellen dargestellt, Tabelle 10 zeigt die Kandidaten aus Du145-Zellen.

Tabelle 9 – Tumormarkerkandidaten aus PC3-Vesikel *Proteomics* und deren Beurteilung

Proteinname	UniProt ID	Funktion/Involviert in Prozess	Punktzahl (max. 14)
Sushi repeat-containing protein	SRPX2	Gehirnentwicklung, Zellmigration	10
Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	PGBM	Bestandteil extrazellulärer Matrix (EM); Instandhaltung von Endothelien	10
AGRIN	AGRIN	Neuromuskuläre Entwicklung	9
Laminin subunit gamma-1	LAMC1	Zelladhäsion, Zelldifferenzierung, Metastasierung	9
Syndecan-4	SDC4	Transmembran FGF-Corezeptor, Zelladhäsion	8
Chondroitinsulfate proteoglycan	CSPG4	Proliferation, Migration, Kollagen-interaktion	7
Biglycan	PGS1	Neuromuskuläre Entwicklung, Gefäßneubildung	7
Laminin subunit beta 3	LAMB3	EM Bestandteil	6
Laminin subunit beta 1	G3XAI2	EM Bestandteil	5
Collagen alpha-1(XII)	D6RGG3	Kollagen 1 Modifikation	4
Complement C5	CO5	Humorales Immunsystem	3
Aggrecan core protein	H0YM81	EM Bestandteil, Knorpelbestandteil	3
Laminin subunit alpha 3	LAMA3	EM Bestandteil	2
Tubulointerstitial nephritis antigen-like	TINAL	Peptidase, bindet Laminin	2
Neurexin-1-beta	E7ERL8	Zelladhäsion in Synapsen	1

Tabelle 10 – Tumormarkerkandidaten aus Du145-Vesikel *Proteomics* und deren Beurteilung

Proteinname	UniProt ID	Funktion/Involviert in Prozess	Punktzahl (max. 14)
Neuropilin	E9PEP6	Angiogenese, Migration, Axonführung	11
Thrombospondin-1	TSP1	Zell-Zell-, Zell-Matrix-Interaktionen, Stressreaktionen	11
Heparansulfat proteoglycan core protein	PGBM	Bestandteil extrazellulärer Matrix (EM); Instandhaltung von Endothelien	10
Aggrin	AGRIN	Neuromuskuläre Entwicklung	9
High motility group protein B1	HMGB1	DNA Chaperone	9
Syndecan 4	SDC4	Regulation verschiedener Prozesse, u.A. Vesikelsekretion	8
Collagen alpha-1 (XII)	D6RGG3	Kollagen 1 Modifikationen	7
Amyloid beta A4 protein	A4	Neuralmembranrezeptor	3
Aggrecan core protein	H0YM81	EM Bestandteil, Knorpelbestandteil	3
Collagen alpha-1 (XVIII) chain	COIA1	EM Bestandteil, VEGF-Inhibitor	3
Complement C4	A0A0G2JPRO	Immunreaktion, Komplementaktivierung	2
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	Q5T985	Hyaluronmetabolismus	1
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	A0A087WW43	Hyaluronmetabolismus	1
Prothrombin	THRB	Gerinnung, Akute-Phase-Protein	1
Neurexin-1-beta	E7ERL8	Zelladhäsion in Synapsen	1
Apolipoprotein B100	APOB	Fettstoffwechsel/Fetttransport	1

Proteinname	UniProt ID	Funktion/Involviert in Prozess	Punktzahl (max. 14)
116 kDa u5 small nuclear ribonucleoprotein component	U5S1	prä-mRNA <i>splicing</i>	1
Hemoglobin subunit beta	HBB	Sauerstofftransport	0

Nach Durchlaufen des Bewertungssystems blieben für Vesikel aus PC3- und aus Du145-Zellen je sieben solcher potenzieller Biomarkerkandidaten übrig. Sechs der Proteine waren sowohl auf den Vesikeln von PC3-, als auch denen von Du145-Zellen vermehrt zu finden, wenn die Zellen zuvor mit GW4869 behandelt wurden. Dabei handelte es sich um Agrin, Basalmembran spezifisches heparansulfat-proteoglycan-kernprotein, Syndecan4, Kollagen alpha1 (XII), Aggrecan core protein, sowie Neurexin 1 beta.

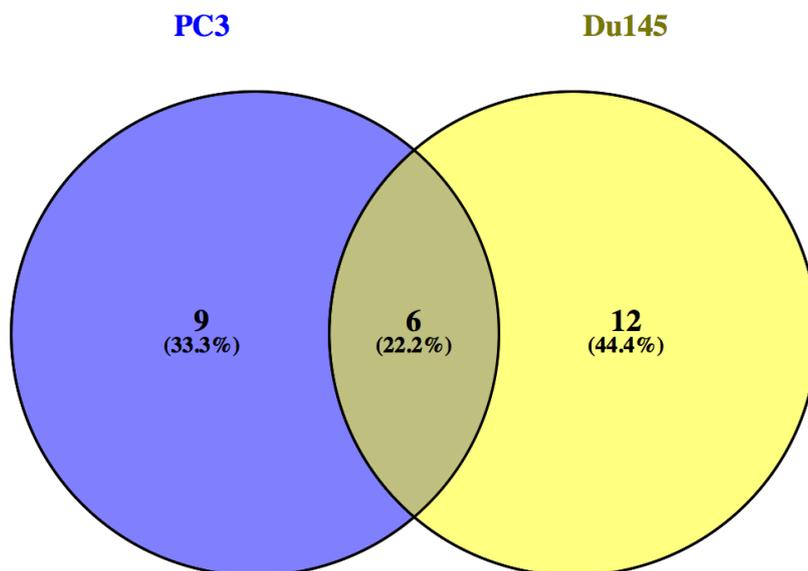
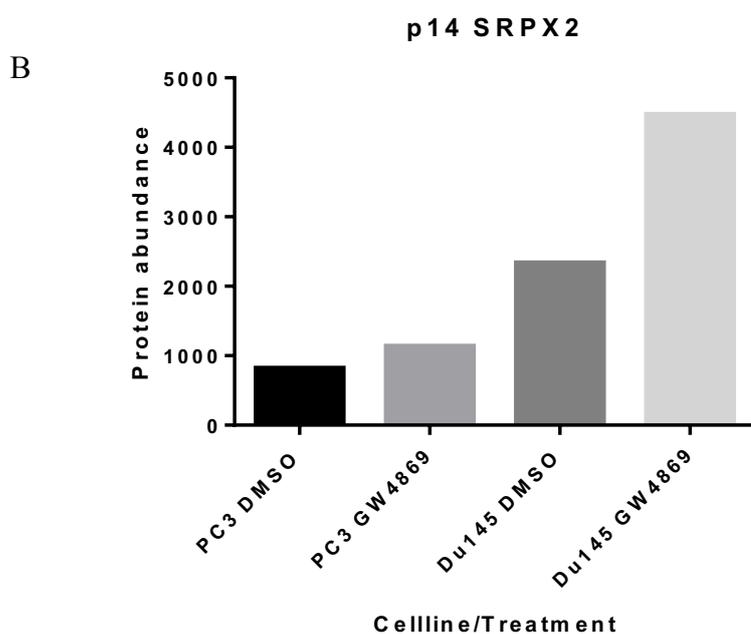


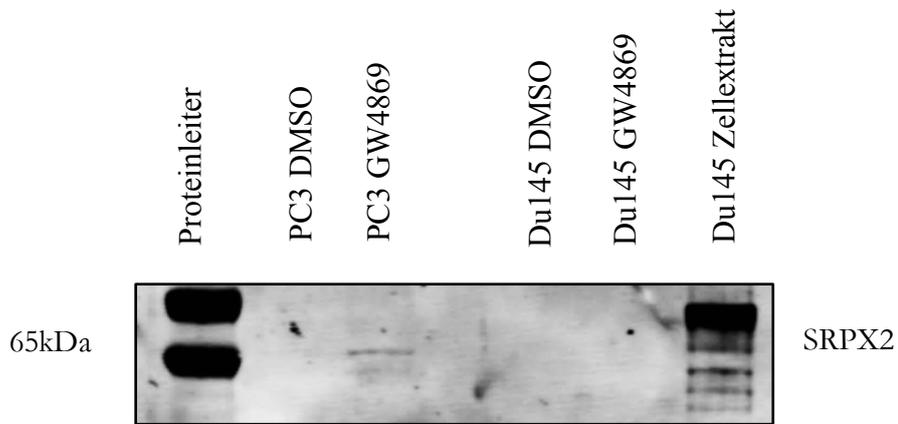
Abbildung 11: Schnittmenge der Tumormarkerkandidaten. Links PC3-, rechts Du145-Proteinkandidaten, Mitte Schnittmenge – AGRIN; PGBM; SDC4; D6RGG3; H0YM81; E7ERL8.

3.6.2 Validierung potenzieller Kandidaten im Western Blot

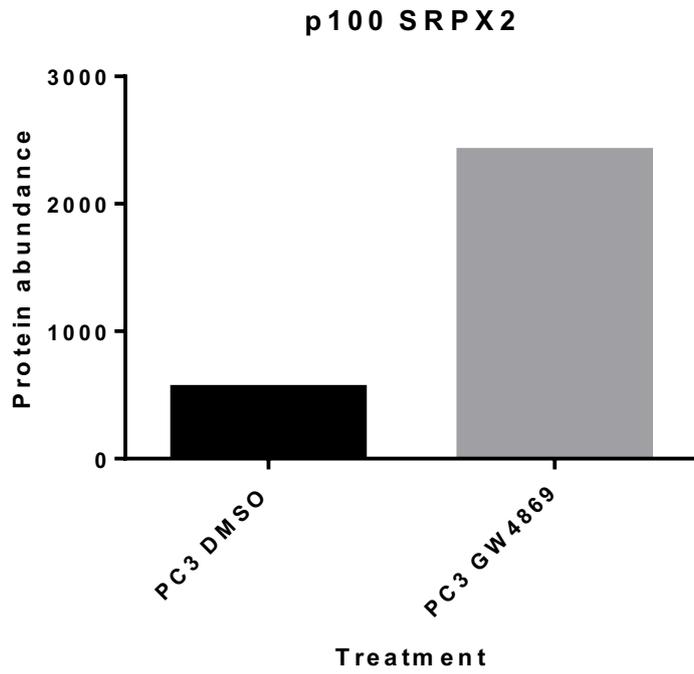
Diejenigen über Massenspektrometrie gefundenen Proteine, die sich durch das Bewertungssystem als potenzielle Tumormarkerkandidaten herausgestellt hatten, sollten nun mittels Western Blot validiert werden. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die Proteoglykane Agrin (*AGRIN*), *Sushi repeat containing protein 2* (*SRPX2*), sowie Syndecan 4 (*SDC4*) gelegt. *SRPX2* vor allem, weil es in der Literatur in verschiedenen Tumorentitäten im Zusammenhang mit verringertem Überleben oder Metastasierung beschrieben wurde (Zhang et al. 2018; He et al. 2019). Syndecan 4 war auf Vesikeln beider Zelllinien zu finden, ist an der Ausbildung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten beteiligt (Woods und Couchman, 1994) und kann als Rezeptor für den *fibroblast growth factor 2* dienen (Chua-Ceres C. et al.). Agrin war auf Vesikeln beider Zelllinien nachweisbar und ist darüber hinaus in Zusammenhang mit dem Progress hepatozellulärer Karzinome beschrieben (Chakraborty et al. 2015).



C



D



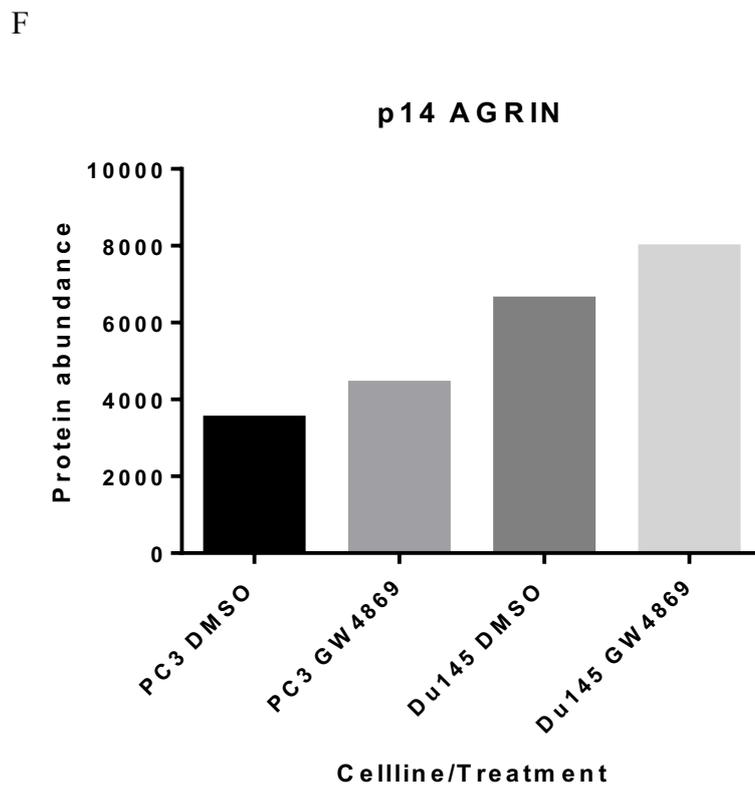
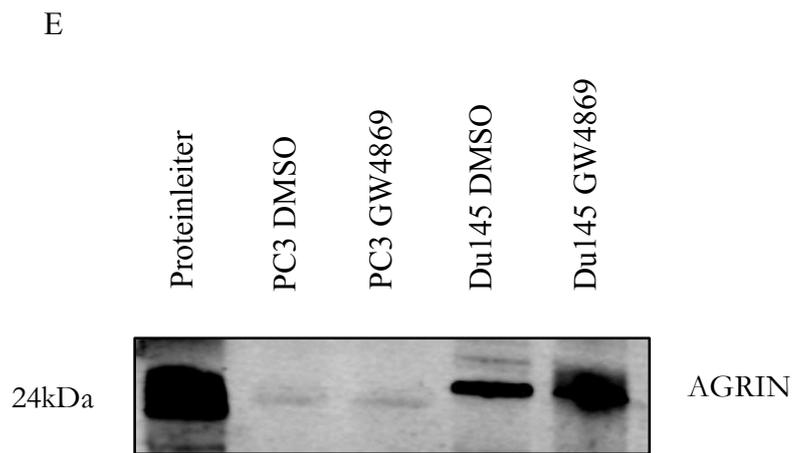


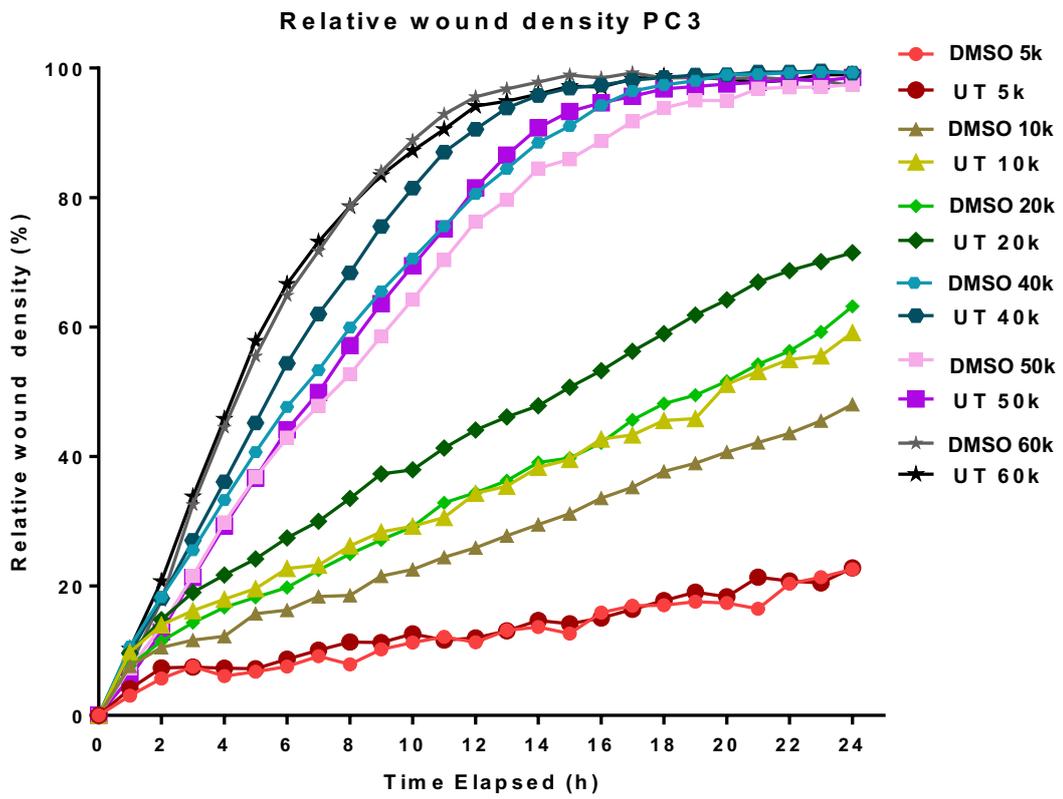
Abbildung 12: Nachweis SRPX2 und AGRIN im Western Blot. Anreicherung von SRPX2 in der p14- sowie p100-Fraktion aus GW4869-behandelten PC3-Zellen (A, B, C, D). Vesikel der p14-Fraktion aus Du145-Zellen, die zuvor mit GW4869 behandelt wurden, zeigten eine Anreicherung von SRPX2 (A, B) und AGRIN (E, F).

Im Western Blot ließen sich *SRPX2* sowohl in der p14-, als auch in der p100-Fraktion nachweisen. Das Protein *AGRIN* ließ sich auf Vesikeln der p14-Fraktion nachweisen. Hier spiegelten sich die Ergebnisse der Massenspektrometrie wider, die diese Proteine als auf Vesikeln GW4869 behandelter Zellen angereichert identifiziert hatte. Syndecan 4 ließ sich zum Zeitpunkt der Datenerhebung mittels Western Blot nicht auf Vesikeln von PC3- oder Du145-Zellen nachweisen.

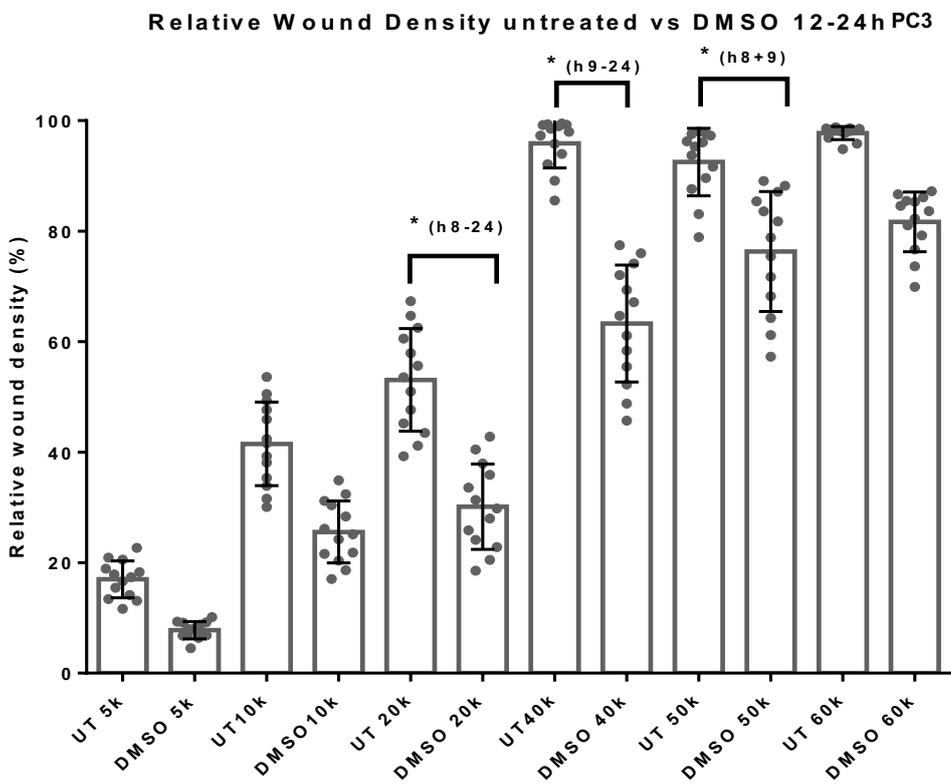
3.7 Zelllinien zeigen im *wound healing assay* gegensätzliches Migrationsverhalten nach GW4869 Behandlung

Um zu untersuchen, ob die Inhibition der nSmasen und die damit verbundene veränderte Proteinbeladung sekretierter Vesikel funktionelle Relevanz für Prostatakarzinomzellen birgt, wurde ein *wound healing assay* durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden PC3-Zellen und Du145-Zellen in unterschiedlicher Konzentration auf einer 96-well Platte ausgesät. Nach 24 Stunden wurde den nun konfluent gewachsenen Zellen mittels eines speziellen Geräts (*Incucyte Woundmaker* ©) eine Wunde zugefügt. Drei technische Replikate wurden jeweils mit DMSO oder GW4869 behandelt. Zudem wurden für jede Zelllinie zwei technische Replikate, die unbehandelt blieben, hinzugefügt. Anschließend wurde das Migrationsverhalten der Zellen mit stündlich erzeugten Bildern festgehalten. Selbiges kann, wie im Folgenden geschehen, durch die relative Wunddicke, aufgetragen gegen die Zeit, ausgedrückt werden (Abb. 13). Weiteres zur Methodik siehe 2.2.9.

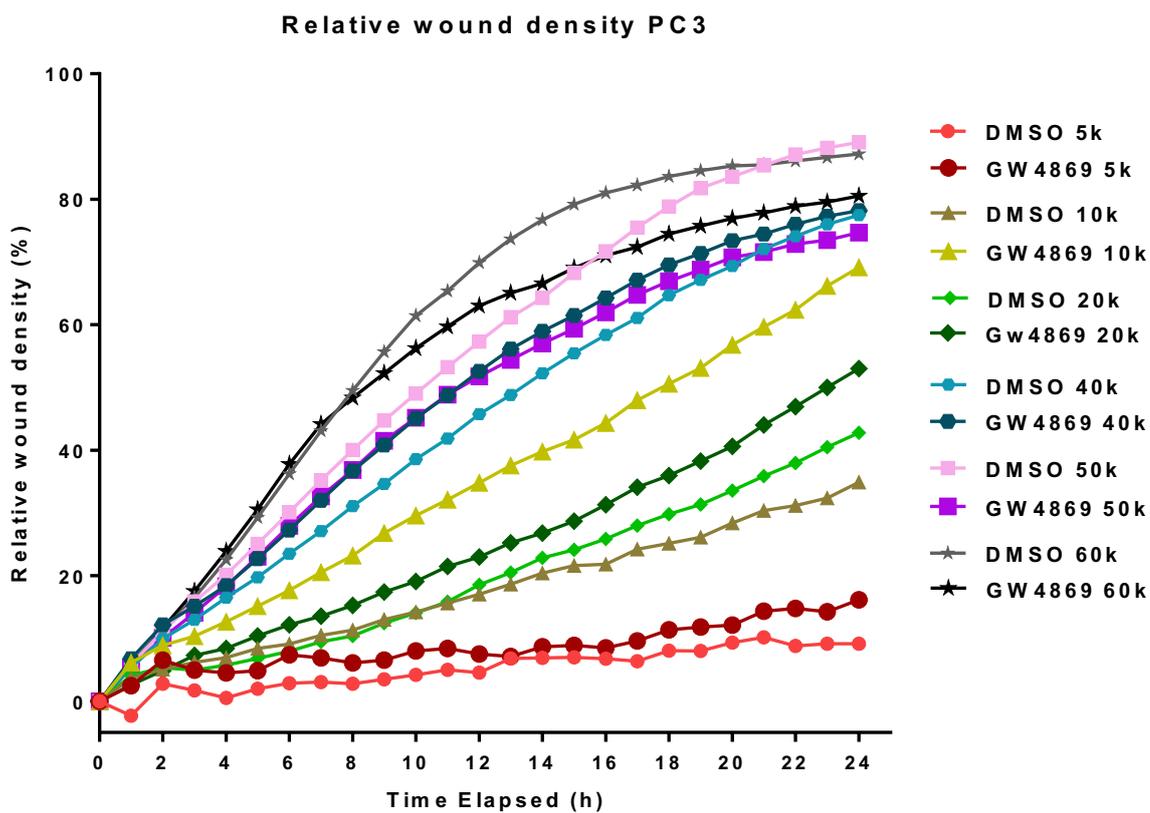
A



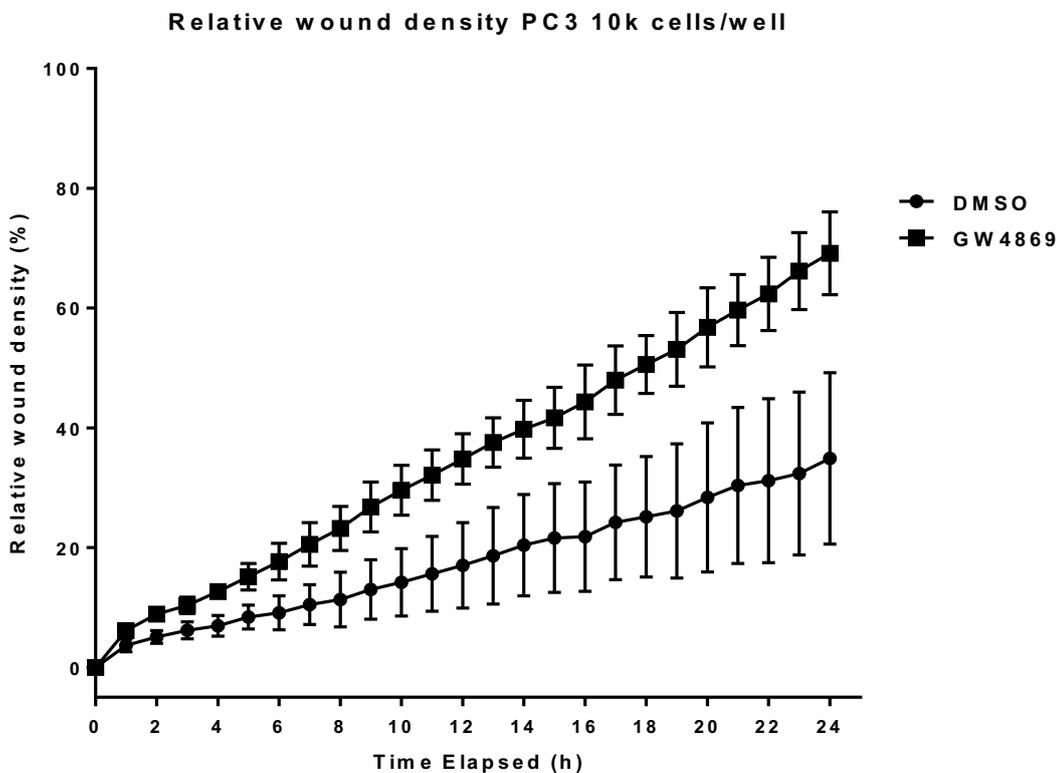
B



C

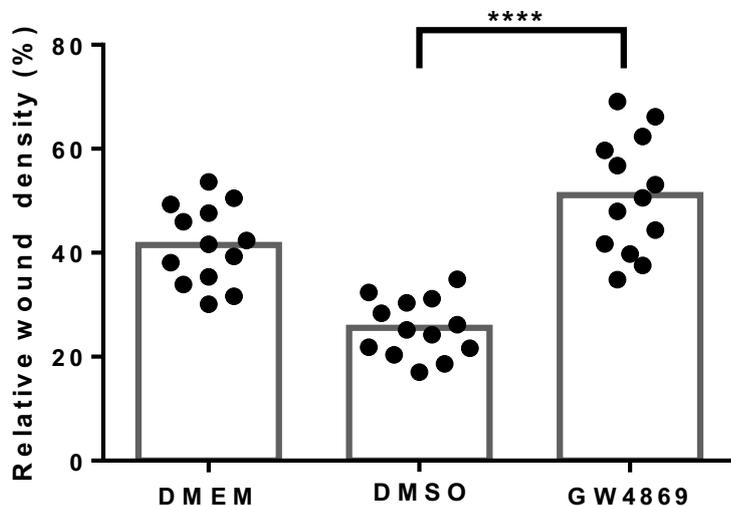


D

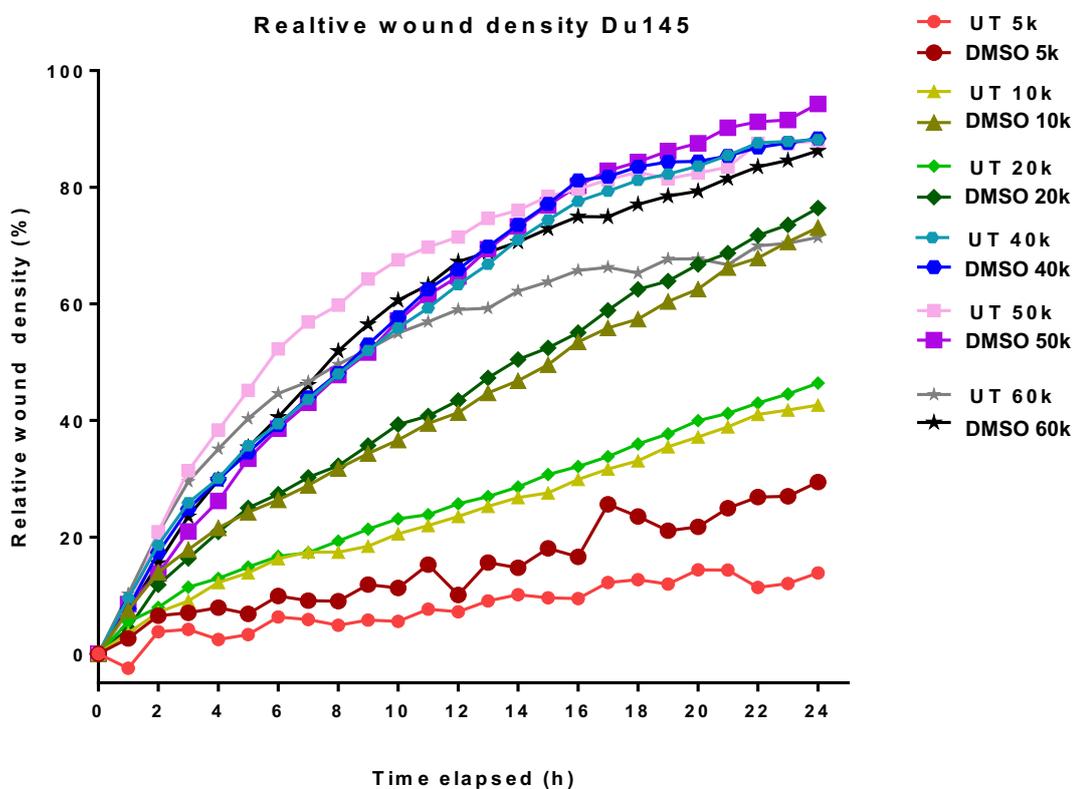


E

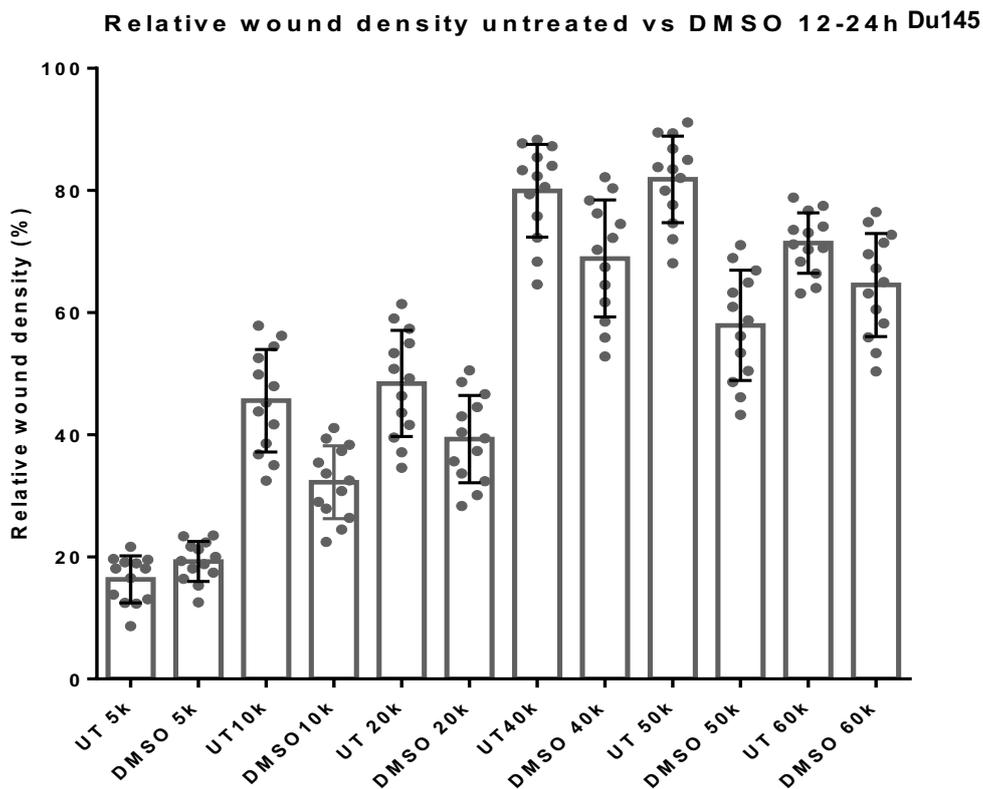
Relative wound density PC3 12-24h 10k cells/well



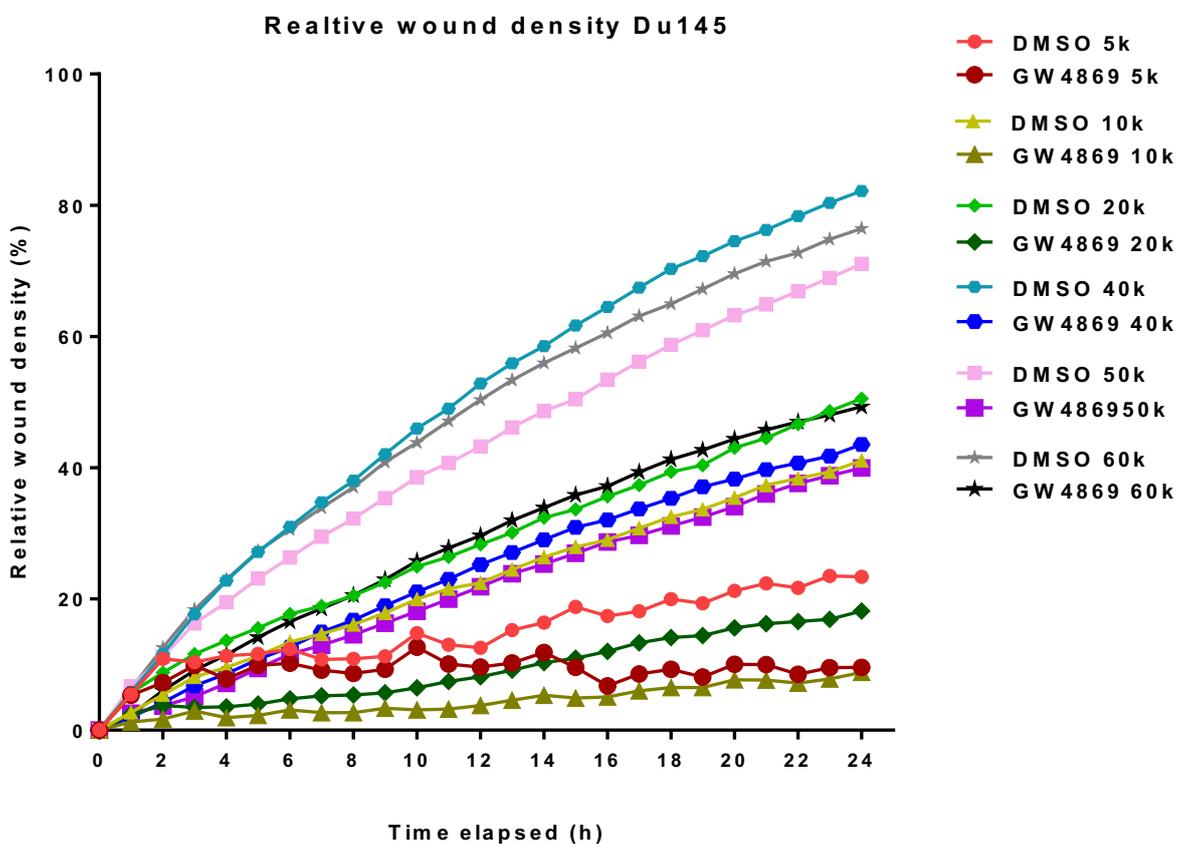
F



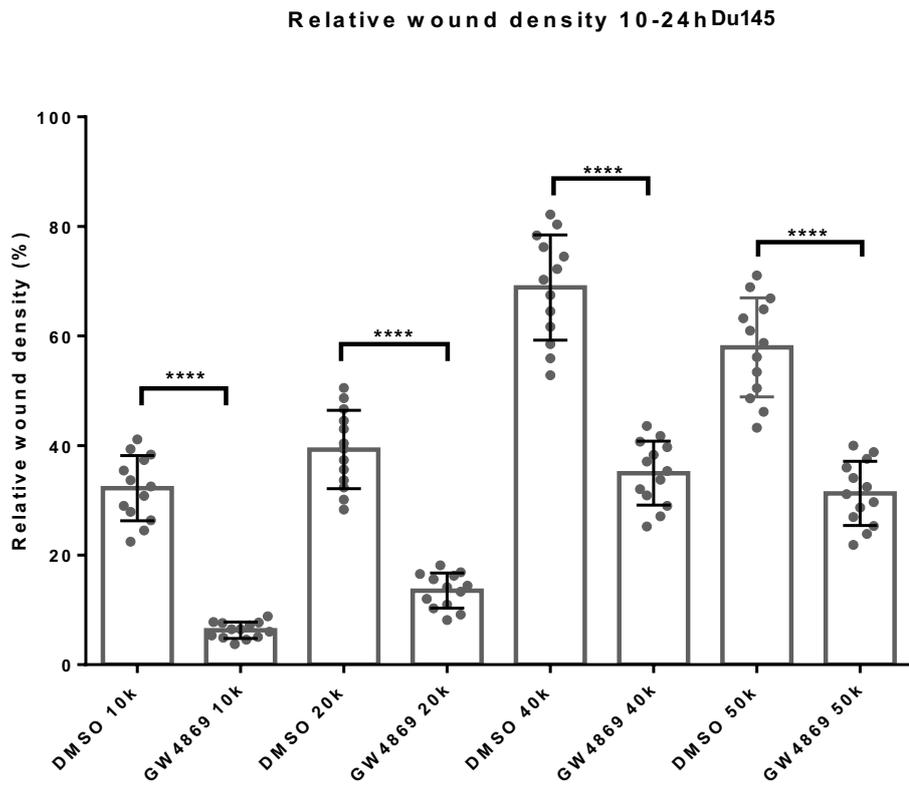
G



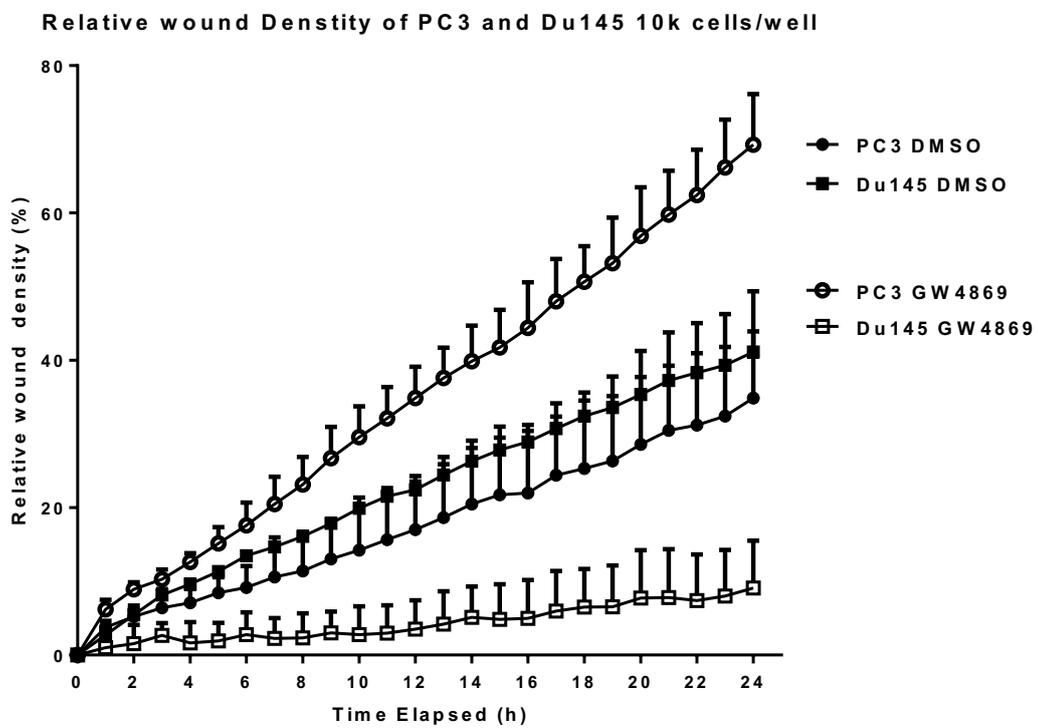
H



I



J



K

Relative wound Density PC3 vs Du145 10k cells/well 12-24h

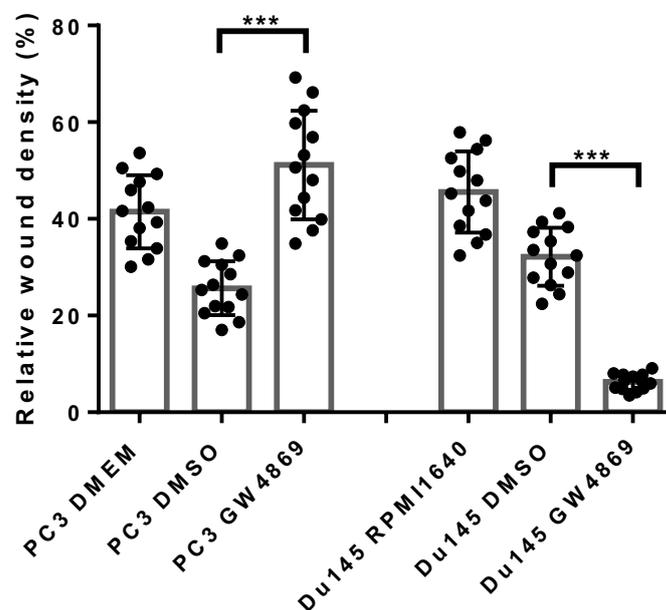


Abbildung 13: Vergleich der relativen Wunddichte über 24 Stunden mit und ohne Inhibition der neutralen Sphingomyelinasen. Vergleich der relativen Wunddichte nach DMSO oder keiner Behandlung der Zellen, PC3-Zellen (A+B), Du145-Zellen (F+G). Überblick über den zeitlichen Verlauf der relativen Wunddichte in allen Saatkonzentrationen für PC3-Zellen (C), sowie für Du145-Zellen (H). Zunahme der relativen Wunddichte von PC3-Zellen bei 10k Zellen/*well* (D+E), Abnahme der relativen Wunddichte von Du145-Zellen (I). Vergleich der relativen Wunddichte beider Zelllinien (J+K). Statistische Analyse mit *2-way Anova*, drei technische Replikate bei $n=1$.

Zunächst wurde bei der Auswertung beurteilt, ob es zwischen den unbehandelten und den mit DMSO-behandelten Zellen Unterschiede im Migrationsverhalten gab (Abb. 13A PC3-Zellen, F Du145-Zellen). Dabei zeigten beide Zelllinien ähnliche Ergebnisse im Sinne einer Abnahme der Wunddichte nach Behandlung mit DMSO (Abb. 13B PC3-Zellen, G Du145-Zellen). Signifikant wurde diese Abnahme jedoch nur für PC3-Zellen in den Aussaatkonzentrationen 20k, 40k und 50k Zellen/*well* und nicht über die gesamte Dauer des Experiments, sondern zu gewissen Zeitpunkten (Abb. 13B). Auch beim Vergleich zwischen GW4869 und DMSO-behandelten PC3- oder Du145-Zellen zeigten sich die größten Effekte 10–24h nach Wundherzeugung (Abb. 13 E, I, K). PC3-Zellen zeigten bei einer Konzentration von 10k Zellen/*well* und im Zeitraum von 12–24 Stunden nach Wundherzeugung einen signifikanten

Unterschied in der relativen Wunddicke (Abb. 13E). GW4869 behandelte Zellen schafften es dabei die Wunde deutlich schneller zu verschließen, als mit DMSO behandelte oder unbehandelte Zellen. Bei Du145-Zellen hingegen dauerte der Wundverschluss, gemessen an der relativen Wunddicke, nach GW4869-Behandlung, in den Konzentrationen 10k, 20k, 40k und 50k Zellen/*well* und im Zeitraum von 12-24 Stunden, signifikant länger als in der Kontrollgruppe (Abb. 13I). Der Vergleich der beiden Zelllinien erfolgte bei einer Konzentration von 10k Zellen/*well*. Hierbei wurde der Unterschied im Migrationsverhalten der Zellen, gemessen an der relativen Wunddicke, nach Behandlung mit GW4869 besonders deutlich (Abb. 13 J+K). Die mit DMSO-behandelten und unbehandelten Zellen zeigten dabei bei einer Konzentration von 10k Zellen/*well* keine signifikanten Unterschiede im Migrationsverhalten (Abb. 13K).

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die funktionelle und diagnostische Relevanz neutraler Sphingomyelinasen bei der Sekretion extrazellulärer Vesikel aus Prostatakarzinomzellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden vier Fragestellungen als Leitlinien genutzt:

- I) Besteht ein Zusammenhang zwischen nSmase Gewebefärbung und Tumorprogress?
- II) Ändert sich die Anzahl sekretierter Vesikel, nach *knockdown* oder Inhibition der neutralen Sphingomyelinasen?
- III) Ändert sich die Proteinkomposition der Vesikel nach Inhibition der neutralen Sphingomyelinasen und birgt dies diagnostische Relevanz?
- IV) Gibt es Unterschiede im Migrationsverhalten der Zellen, wenn nSmasen inhibiert werden?

Die erste Frage wurde durch immunohistochemische Färbung von *tissue arrays* und deren Bewertung angegangen. Dabei zeigte sich, dass nSmase1 in Tumorgewebe stärker exprimiert wird als in gesundem Gewebe. Des Weiteren enthielt die Patientengruppe mit der stärksten nSmase2 Gewebefärbung den größten Anteil an metastasierten Karzinomen, die mit der schwächsten Färbung den kleinsten. Dies lässt die Vermutung zu, dass ein Zusammenhang zwischen Tumorprogress bzw. Metastasierung und der Expression der neutralen Sphingomyelinasen besteht. Dabei ist möglicherweise nicht der Tumorprogress die Folge erhöhter nSmase Expression, sondern die erhöhte Expression Folge des Tumorprogresses. Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte nSmase-Aktivität in höheren Ceramidkonzentrationen und damit in vermehrter Apoptose resultiert und diese erhöhte Aktivität durch diverse Einflüsse, wie zum Beispiel Inflammation oder räumlichen Stress, ausgelöst werden kann (Yabu et al. 2014). Folglich könnte die nSmase-Aktivität in Tumorzellen unter immunologischem oder auch räumlichem Stress erhöht sein, der bei stark proliferierenden (metastasierenden) Tumoren herrscht. Darüber hinaus gibt es therapeutische Ansätze, die die Ceramidlevel über Induktion der neutralen Sphingomyelinasen erhöhen, um Tumorzellen zur Apoptose zu bewegen (Cheng, Bhujwala, Glunde 2016). Die *tissue array* Gewebeproben wurden laut Hersteller jedoch vor

Therapiebeginn entnommen, sodass eine therapiebedingte Induktion der neutralen Sphingomyelinasen ausgeschlossen werden kann. Ein Mechanismus, mit dem Tumoren dieser Apoptose auslösenden, erhöhten Ceramidkonzentration entkommen können, ist eine Mutation in Form einer Deletion der Geneexpression der neutralen Sphingomyelinasen. Eine solche Deletion liegt laut einer Studie des *Cancer Genome Atlas Program*, deren Ergebnisse auf der Website www.cbioportal.org analysiert, visualisiert und als Grundlage für diese Arbeit genutzt wurden, in bis zu 17% der 492 sequenzierten Fälle vor (Gao et al. 2013 & Cerami et al. 2012).

Menck et al. haben 2017 gezeigt, dass sich die Konzentration sekretierter Vesikel aus der Brustkrebszelllinie SKBR3 ändert, wenn die neutralen Sphingomyelinasen inhibiert werden. Dabei wurde eine Zunahme der p14-Fraktion und eine Abnahme der p100-Fraktion beobachtet. Somit stellte sich also die zweite der Leitfragen: ob sich die Anzahl sekretierter Vesikel unter Inhibition der nSmasen auch in Prostatakarzinomen ändert. Dies wurde für die Prostatakarzinomzelllinien PC3 und Du145 untersucht. Dabei zeigte sich, gegensätzlich zum Sekretionsverhalten der SKBR3-Zellen, für PC3-Zellen eine signifikante Zunahme der p100-Fraktion, sowie eine tendenzielle, jedoch statistisch nicht signifikante, Abnahme der p14-Fraktion. Keine Zunahme aber eine unveränderte p100-Fraktion nach Inhibition der nSmase in PC3-Zellen wurde zuvor schon von Phuyal et al. (2014) beschrieben. Diese Arbeitsgruppe hatte jedoch zur Quantifizierung der sekretierten Partikel Western Blots als einzige Methode genutzt. Dabei ist es schwer zu beurteilen, ob sich tatsächlich die Anzahl sekretierter Partikel oder nur deren Proteinbeladung ändert. Um diesen Faktor auszuschließen, wurden die Vesikel in dieser Arbeit nicht nur mittels Western Blot, sondern auch via *nanoparticle tracking analysis* untersucht. Du145-Zellen zeigten mit einer tendenziellen Zunahme der p14-Fraktion und Abnahme der p100-Fraktion ein ähnliches Sekretionsverhalten wie SKBR3-Zellen, jedoch waren diese Ergebnisse statistisch nicht signifikant. Eine Erklärungsmöglichkeit der, mit Ausnahme der PC3-p100-Fraktion, mangelnden statistischen Aussagekraft der Ergebnisse besteht darin, dass die Inhibition der neutralen Sphingomyelinasen in den beiden genutzten Zelllinien zwar tatsächlich Einfluss auf das Sekretionsverhalten der Zellen nimmt, die Auswirkungen jedoch zu gering sind, als dass signifikante Unterschiede in der Zahl sekretierter Vesikel sichtbar würden. Ein weiterer zu beachtender Faktor sind mögliche Fehlerquellen in der experimentellen Durchführung. Dabei kann es vor allem beim Absaugen des Überstandes zwischen den einzelnen Zentrifugationsschritten zum Verlust von Teilen des Pellets und somit zur Reduktion der später gemessenen Partikelzahl kommen. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass das zu resuspendierende Pellet in der Regel nicht sichtbar ist

und somit ein teilweiser oder gar vollständiger Verlust zunächst nicht bemerkt wird. Des Weiteren ist nicht sicher auszuschließen, dass bei der Ultrazentrifugation auch andere Partikel, wie zum Beispiel Lipoproteine, mit pelletiert werden. Aktuell werden diverse andere Aufreinigungsmethoden diskutiert, die alle ihre jeweiligen Vor- und Nachteile mit sich bringen (Small et al. 2019). Allerdings scheint sich mittlerweile die sogenannte *size exclusion chromatography* als Methode der Wahl herauszustellen, weil sie leicht anzuwenden ist, günstig ist und eine hohe Reinheit der Vesikel erreicht werden kann, was vor allem bei der Aufreinigung aus Blutplasma eine größere Rolle spielt (Monguió-Tortajada et al. 2019). Vesikel der durch *knockdown* der nSmasen behandelten Zellen zeigten in den NTA Messungen teils größere Unterschiede, sogar innerhalb eines biologischen Replikats. Bei diesen Experimenten kam als potenzielle Fehlerquelle, neben der Aufreinigung der Vesikel, die fragliche Effizienz des *knockdown* hinzu. Der entsprechende Nachweis via Western Blot gelang dabei nur in ca. 50% der Fälle, was eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse weiter erschwert und ein weiteres Verfahren zur Inhibition der nSmasen via GW4869 nötig machte. Wie weiter oben erwähnt, wurden die aufgereinigten Vesikel nicht nur mittels NTA, sondern auch im Western Blot untersucht. Dabei ließen sich die NTA Messdaten teilweise im Western Blot bestätigen. So vor allem in der PC3 p100- sowie der Du145 p14-Fraktion. Die Visualisierung der Vesikelmenge sowie der Vergleich unterschiedlicher Behandlungen mittels Western Blot bergen dabei einige Schwierigkeiten. Zum einen gibt es, im Gegensatz zur vergleichenden Detektion von Proteinen aus Zellextrakt, keine Möglichkeit einer Ladekontrolle. Zum anderen ist, wie oben bereits erwähnt, nicht sicher auszuschließen, dass sich nicht die Menge der Vesikel, sondern lediglich die Konzentration ihrer Proteinbeladung unter Behandlung mit beispielsweise GW4869 ändert oder dass Proteine unabhängig von Vesikeln pelletiert werden. Festzuhalten ist jedoch, dass die neutralen Sphingomyelinasen eine Rolle in der Sekretion extrazellulärer Vesikel aus Prostatakarzinomzellen spielen. Ob diese Rolle eine diagnostische Relevanz beinhaltet, sollte mit der nächsten Leitfrage beantwortet werden. Zu diesem Zweck wurden Vesikelpopulationen von Du145- und PC3-Zellen, die entweder mit DMSO oder GW4869 behandelt wurden, massenspektrometrisch untersucht. Diejenigen Proteine, die dabei ein signifikant erhöhtes Vorkommen auf Vesikeln aus GW4869-behandelten Zellen zeigten, wurden einem Bewertungssystem unterzogen, das deren Eignung als Biomarker aus Blut abschätzen sollte. Dabei stellten sich vor allem das *sushi repeat containing protein (SRPX2)* sowie Agrin (*AGRIN*) als interessante Kandidaten für weitere Untersuchungen heraus. *SRPX2* gehört als Chondroitinsulfat, genauso wie Agrin als Heparansulfat zur Familie der Proteoglykane. Beiden Proteinen wird neben einer Rolle zu

bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung des Gehirns (Kröger und Schröder, 2002; Schirwani et al. 2019), auch eine Rolle in Tumorprogress und Metastasierung, sowie möglichen therapeutischen Ansätzen zugesprochen. Dies gilt bei *SRPX2* sowohl für Prostata- als auch für andere Karzinome, wie zum Beispiel das Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre (Zhang et al. 2018; He et al. 2019). Für Agrin wurde bisher kein Zusammenhang mit Prostatakarzinomen, jedoch mit dem Progress des hepatozellulären Karzinoms beschrieben (Chakraborty et al. 2015). Weitere Untersuchungen zur praktischen Anwendung der Proteine als Biomarker könnten daher vielversprechende Ergebnisse liefern. Als letzter Schritt sollte nun beurteilt werden, ob die Inhibition der neutralen Sphingomyelinasen funktionelle Konsequenzen hat. Zu diesem Zweck wurde ein Wundheilungsassay durchgeführt. Dieses Experiment lieferte sehr interessante Hinweise auf das Migrationsverhalten der untersuchten Zelllinien. Dabei zeigten Du145- und PC3-Zellen gegensätzliches Verhalten, wenn die neutralen Sphingomyelinasen inhibiert wurden. PC3-Zellen waren unter Inhibition der nSmases in der Lage, die erzeugte Wunde in kürzerer Zeit zu verschließen als die Kontrollgruppe, wohingegen Du145-Zellen unter Inhibition der nSmases länger brauchten die Wunde zu verschließen, als die Kontrollgruppe. Da bei der massenspektrometrischen Untersuchung der Vesikel aus mit GW4869-behandelten PC3-Zellen *SRPX2* vermehrt gefunden wurde, lässt sich das beschleunigte Migrationsverhalten möglicherweise mit der gesteigerten Freisetzung an *SRPX2*-beladenen Vesikeln erklären. Zhang et al. beschrieben 2018 einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der *SRPX2*-Expression und Lymphknoten- und Fernmetastasierung sowie verkürztem Gesamtüberleben von Prostatakarzinompatienten, was ebenfalls für ein gesteigertes Migrationsverhalten und erhöhte Invasivität der Tumorzellen spricht. Gao et al. konnten 2015 bereits zeigen, dass *SRPX2* in Pankreaskarzinomen Migrations- und Invasionsverhalten der Tumorzellen verstärkt. Fest steht, dass *SRPX2* aktuell Grundlage einer Vielzahl von Studien ist und eine weitergehende Untersuchung der funktionellen Zusammenhänge um dieses Protein erfolgen sollte.

Mit dieser Arbeit wurden die Zusammenhänge zwischen der Aktivität der neutralen Sphingomyelinasen und der Sekretion extrazellulärer Vesikel aus Prostatakarzinomzellen, sowie des Migrationsverhaltens der Zelllinien PC3 und Du145 näher beleuchtet. Des Weiteren wurden *sushi repeat containing protein* und Agrin als potenzielle vesikelgebundene Biomarker identifiziert. Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden die Grundlage für weitere Fragestellungen und Experimente im Hinblick auf die Regulation der EV-Beladung und Sekretion durch nSmases im Tumorkontext.

5 Zusammenfassung

Prostatakarzinome stellen die häufigste maligne Tumorerkrankung bei Männern dar. Trotz guter Früherkennungs- und Behandlungsmöglichkeiten ist das Prostatakarzinom die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache. Der Wert des prostataspezifischen Antigens kann als Früherkennungs- und Verlaufsmarker genutzt werden, jedoch birgt das Screening nicht nur Vorteile, da dabei auch potenziell latent verlaufende Karzinome entdeckt werden, bei deren Behandlung die Patienten mit teils gravieren Nebenwirkungen zu kämpfen haben. Weitere Forschung zur Erkennung und Behandlung ist also nötig.

Ziel dieser Arbeit war es, die funktionelle und diagnostische Relevanz neutraler Sphingomyelinasen bei der Sekretion extrazellulärer Vesikel aus Prostatakarzinomzellen zu untersuchen.

Zunächst wurden immunohistochemische Färbungen von *tissue arrays* angefertigt. Dabei zeigte sich eine Korrelation zwischen Metastasierung und erhöhter nSmase2-Expression. Da erhöhte nSmase2-Aktivität mit erhöhter Ceramidproduktion und damit erhöhtem Apoptosedruck einhergehen, könnte eine, durch Mutation bedingte, Funktionseinschränkung des *SMPD2*-Gen-Produkts, wie sie in dieser Arbeit durch die GW4869 Behandlung simuliert wurde, einen Überlebensmechanismus für Tumoren darstellen.

Weiterhin zeigte sich, dass sich das Vesikelsekretionsverhalten der Prostatakrebszelllinien PC3 und Du145 unter Inhibition der neutralen Sphingomyelinasen änderte. Eine große Änderung der Konzentration sekretierter Vesikel war unter den experimentellen Voraussetzungen bei beiden Zelllinien und in beiden Vesikelpopulationen nicht zu erkennen. Für die p100-Fraktion von PC3-Zellen ließ sich jedoch eine statistisch signifikante Zunahme der Vesikelmenge um das 3–4fache der Kontrollgruppe feststellen. Weiterhin waren PC3-Zellen, die zuvor mit dem Inhibitor GW4869 behandelt wurden, im *wound healing assay* in der Lage, die Wunde sehr viel schneller zu verschließen, als diejenige Zellen in der Kontrollgruppe. Bei Du145-Zellen zeigte sich ein genau umgekehrtes Verhalten. Eine funktionelle Relevanz der neutralen Sphingomyelinasen ist also nicht nur in der Sekretion der Vesikel gegeben, sondern auch im Migrationsverhalten der untersuchten Zellen.

Einen Zusammenhang zwischen funktioneller und diagnostischer Relevanz brachten die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse von Vesikeln aus zuvor mit GW4869 oder DMSO-behandelten Zellen. Dabei zeigte sich das Protein *SRPX2* als ein vielversprechender Kandidat für weitergehende Untersuchungen. Das Protein wird in aktueller Forschung mit Tumorprogress und Metastasierung in Verbindung gebracht und seine Sekretion auf extrazellulären Vesikeln könnte Teil des oben genannten Mechanismus sein, wachsendem Apoptosedruck im Primärtumor zu entgehen. Eine Aufreinigung extrazellulärer Vesikel aus Blut ist möglich und unter bestimmten molekulargenetischen Konstellationen des Tumorgewebes wäre ein möglicher Nachweis von *SRPX2* auf extrazellulären Vesikeln denkbar. Weitergehende Untersuchungen der diagnostischen und funktionellen Relevanz von *SRPX2* werden interessante Ergebnisse liefern. Fest steht, dass das spannende, junge Feld der extrazellulären Vesikel, vor allem im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen, deren Erkennung und Therapie, weiter ergründet werden muss.

6 Literaturverzeichnis

- Adell MAY, Vogel GF, Pakdel M, Müller M, Lindner H, Hess MW, Teis D (2014): Coordinated binding of Vps4 to ESCRT-III drives membrane neck constriction during MVB vesicle formation. *J Cell Biol* 205, 33–49
- Airola MV, Hannun YA (2013): Sphingolipid metabolism and neutral sphingomyelinases. *Handb Exp Pharmacol* 57–76
- Atkin-Smith GK, Paone S, Zanker DJ, Duan M, Phan TK, Chen W, Hulett MD, Poon IKH (2017): Isolation of cell type-specific apoptotic bodies by fluorescence-activated cell sorting. *Sci Rep* 7 article number: 39846
- Buschow SI, Nolte 't Hoen ENM, Niel GV, Pols MS, ten Broeke T, Lauwen M, Ossendorp F, Melief CJM, Raposo G, Wubbolts R et al. (2009): MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic* 10, 1528–1542
- Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E et al. (2012): The cBio Cancer Genomics Portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2, 401–404
- Chakraborty S, Lakshmanan M, Swa HLF, Chen J, Zhang X, Ong YS, Loo LS, Akincilar SC, Gunaratne J, Tergaonkar V, et al. (2015): An oncogenic role of Agrin in regulating focal adhesion integrity in hepatocellular carcinoma. *Nat Commun* 6 article number 6184
- Cheng M, Bhujwala ZM, Glunde K (2016): Targeting Phospholipid Metabolism in Cancer. *Front Oncol* 6, 266
- Chua CC., Rahimi N, Forsten-Williams K, Nugent MA. (2004): Heparan sulfate proteoglycans function as receptors for fibroblast growth factor-2 activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *circulation research* 94, 316–323
- Colombo M, Raposo G, Théry C (2014): Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30, 255–289
- Di Vizio D, Kim J, Hager MH, Morello M, Yang W, Lafargue CJ, True LD, Rubin MA, Adam RM, Beroukhi R et al. (2009): Oncosome formation in prostate cancer: association with a region of frequent chromosomal deletion in metastatic disease. *Cancer Res* 69, 5601–5609
- Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E et al. (2013): Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 6, 269
- Godman GC, Porter KR (1960): Chondrogenesis, studied with the electron microscope. *J Biophys Biochem Cytol* 8, 719–760

- He F, Wang H, Li Y, Liu W, Gao X, Chen D, Wang Q, Shi G (2019): SRPX2 knockdown inhibits cell proliferation and metastasis and promotes chemosensitivity in esophageal squamous cell carcinoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 109, 671–678
- Hoshino D, Kirkbride KC, Costello K, Clark ES, Sinha S, Grega-Larson N, Tyska MJ, Weaver AM (2013): Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior. *Cell Rep* 5, 1159–1168
- Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW (1979): Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17, 16–23
- Kröger S, Schröder JE (2002): Agrin in the Developing CNS: New roles for a synapse organizer. *Physiology* 17, 207–212
- Lehrich BM, Liang Y, Khosravi P, Federoff HJ, Fiandaca MS (2018): Fetal bovine serum-derived extracellular vesicles persist within vesicle-depleted culture media. *Int J Mol Sci* 19 : 3538
- Liu Y, Cao X (2016): Characteristics and significance of the pre-metastatic niche. *Cancer Cell* 30, 668–681
- Luberto C, Hassler DF, Signorelli P, Okamoto Y, Sawai H, Boros E, Hazen-Martin DJ, Obeid LM, Hannun YA, Smith GK (2002): Inhibition of tumor necrosis factor-induced cell death in MCF7 by a novel inhibitor of neutral sphingomyelinase. *J Biol Chem* 277, 41128–41139
- Menck K, Sönmezer C, Worst TS, Schulz M, Dihazi GH, Streit F, Erdmann G, Kling S, Boutros M, Binder C, Gross JC (2017): Neutral sphingomyelinases control extracellular vesicles budding from the plasma membrane. *J Extr, Streitacell Vesicles* 6, 1378056
- Minciacchi VR, Freeman MR, Di Vizio D (2015): Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin Cell Dev Biol* 40, 41–51
- Monguió-Tortajada M, Gálvez-Montón C, Bayes-Genis A, Roura S, Borràs FE (2019): Extracellular vesicle isolation methods: rising impact of size-exclusion chromatography. *Cell Mol Life Sci* 76, 2369–2382
- Schirwani S, McConnell V, Willoughby J, Balasubramanian M (2019): Exploring the association between SRPX2 variants and neurodevelopment: How causal is it? *Gene* 685, 50–54
- Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TLJ, Zappa M, Nelen V, Kwiatkowski M, Lujan M, Mänttinen L, Lilja H, et al. (2014): Screening and prostate cancer mortality: results of the european randomised study of screening for prostate cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up. *Lancet* 384, 2027–2035
- Small J, Roy S, Alexander R, Balaj L (2018): Overview of protocols for studying extracellular RNA and extracellular vesicles. *Methods Mol Biol* 1740, 17–21
- Soekmadji C, Nelson CC (2015): The Emerging Role of Extracellular Vesicle-Mediated Drug Resistance in Cancers: Implications in Advanced Prostate Cancer. *Biomed Res Int* 2015, 454837

- Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF (1978): Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer* **21**, 274–281
- Tetta C, Ghigo E, Silengo L, Deregibus MC, Camussi G (2013): Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication. *Endocrine* **44**, 11–19
- Tkach M, Théry C (2016): Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* **164**, 1226–1232
- Woods A, Couchman JR (1994): Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. *Mol Biol Cell* **5**, 183–192
- Worst TS, von Hardenberg J, Gross JC, Erben P, Schnölzer M, Hausser I, Bugert P, Michel MS, Boutros M (2017): Database-augmented Mass Spectrometry Analysis of Exosomes Identifies Claudin 3 as a Putative Prostate Cancer Biomarker. *Mol Cell Proteomics* **16**, 998–1008
- Yabu T, Shiba H, Shibasaki Y, Nakanishi T, Imamura S, Touhata K, Yamashita M (2015): Stress-induced ceramide generation and apoptosis via the phosphorylation and activation of nSMase1 by JNK signaling. *Cell Death Differ* **22**, 258–273
- Yue S, Mu W, Erb U, Zöller M (2015): The tetraspanins CD151 and Tspan8 are essential exosome components for the crosstalk between cancer initiating cells and their surrounding. *Oncotarget* **6**, 2366–2384
- Zhang M, Li X, Fan Z, Zhao J, Liu S, Zhang M, Li H, Goscinski MA, Fan H, Suo Z (2018): High SRPX2 protein expression predicts unfavorable clinical outcome in patients with prostate cancer. *Onco Targets Ther* **11**, 3149–3157

Internetquellen

Bewertungssystem für Tumormarkerkandidaten

<http://microvesicles.org/query>

Zugriff am 08.03.2018

Bewertungssystem für Tumormarkerkandidaten

<http://www.peptideatlas.org>

Zugriff am 11.03.2018

Bewertungssystem für Tumormarkerkandidaten

<https://www.proteinatlas.org>

Zugriff am 16.02.2018

S3-Leitlinie Prostatakarzinom

https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Prostata_5_0/LL_Prostata_Langversion_5.0.pdf

Zugriff am 12.10.2018

Bewertungssystem für Tumormarkerkandidaten

<https://www.pubmed.gov>

Zugriff am 05.02.2018

SMPD2

<https://www.uniprot.org/uniprot/O60906>

Zugriff am 08.09.2017

SMPD3

<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9NY59>

Zugriff am 08.09.2017

Bewertungssystem für Tumormarkerkandidaten

<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>

Zugriff am 10.03.2018

6.1 Literaturverzeichnis des Scoringsystems

A0A0G2JPR0 (Du145):

Davis MT, Auger P, Spahr C, Patterson SD (2007): Cancer biomarker discovery via low molecular weight serum proteome profiling - Where is the tumor? *Proteomics Clin Appl* **1**, 1545–1558

Grayhack JT, Lee C, Kolbusz W, Oliver L (1980): Detection of Carcinoma of the Prostate Utilizing Biochemical Observations. *Cancer* **45 Suppl 7**, 1896–1901

Grayhack JT, Wendel EF, Oliver L, Lee C (1979): Analysis of specific proteins in prostatic fluid for detecting prostatic malignancy. *J Urol* **121**, 295–299

AGRIN (PC3+Du145):

Bao X, Fukuda M: Chapter Twenty-Two - A Tumor Suppressor Function of Laminin-Binding α -Dystroglycan. In: Fukuda M (Hrsg.): *Methods in Enzymology (Functional Glycomics)*. Band 479; Academic Press **2010**, 387–396

Myers JS, von Lersner AK, Sang Q-XA (2016): Proteomic Upregulation of Fatty Acid Synthase and Fatty Acid Binding Protein 5 and Identification of Cancer- and Race-Specific Pathway Associations in Human Prostate Cancer Tissues. *J Cancer* **7**, 1452–1464

CSPG4 (PC3):

Salanti A, Clausen TM, Agerbæk MØ, Al Nakouzi N, Dahlbäck M, Oo HZ, Lee S, Gustavsson T, Rich JR, Hedberg BJ, et al. (2015): Targeting Human Cancer by a Glycosaminoglycan Binding Malaria Protein. *Cancer Cell* **28**, 500–514

E9PEP6 (Du145):

Latil A, Bièche I, Pesche S, Valéri A, Fournier G, Cussenot O, Lidereau R (2000): VEGF overexpression in clinically localized prostate tumors and neuropilin-1 overexpression in metastatic forms. *Int J Cancer* **89**, 167–171

Miao HQ, Lee P, Lin H, Soker S, Klagsbrun M (2000): Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression. *FASEB J* **14**, 2532–2539

Pallaoro A, Braun GB, Moskovits M (2011): Quantitative ratiometric discrimination between noncancerous and cancerous prostate cells based on neuropilin-1 overexpression. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 16559–16564

Tse BWC, Volpert M, Rather E, Stylianou N, Nouri M, McGowan K, Lehman ML, McPherson SJ, Roshan-Moniri M, Butler MS, et al. (2017): Neuropilin-1 is upregulated in the adaptive response of prostate tumors to androgen-targeted therapies and is prognostic of metastatic progression and patient mortality. *Oncogene* **36**, 3417–3427

Vanveldhuizen PJ, Zulfiqar M, Banerjee S, Cherian R, Saxena NK, Rabe A, Thrasher JB, Banerjee SK (2003): Differential expression of neuropilin-1 in malignant and benign prostatic stromal tissue. *Oncol Rep* 10, 1067–1071

Zhang S, Zhau HE, Osunkoya AO, Iqbal S, Yang X, Fan S, Chen Z, Wang R, Marshall FF, Chung LWK, Wu D (2010): Vascular endothelial growth factor regulates myeloid cell leukemia-1 expression through neuropilin-1-dependent activation of c-MET signaling in human prostate cancer cells. *Mol Cancer* 9, 9

H0YM81 (PC3+Du145):

Suhovskih AV, Mostovich LA, Kunin IS, Boboev MM, Nepomnyashchikh GI, Aidagulova SV, Grigorieva EV (2013): Proteoglycan expression in normal human prostate tissue and prostate cancer. *ISRN Oncol* 2013, 680136

HMBG1 (Du145):

Barreiro-Alonso A, Lamas-Maceiras M, Rodríguez-Belmonte E, Vizoso-Vázquez Á, Quindós M, Cerdán ME (2016): High Mobility Group B Proteins, Their Partners, and Other Redox Sensors in Ovarian and Prostate Cancer. *Oxid Med Cell Longev* 2016, 5845061

Chang H-Y, Chen S-Y, Wu C-H, Lu C-C, Yen G-C (2019): Glycyrrhizin Attenuates the Process of Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Modulating HMGB1 Initiated Novel Signaling Pathway in Prostate Cancer Cells. *J Agric Food Chem* 67, 3323–3332

Gnanasekar M, Thirugnanam S, Ramaswamy K (2009): Short hairpin RNA (shRNA) constructs targeting high mobility group box-1 (HMGB1) expression leads to inhibition of prostate cancer cell survival and apoptosis. *Int J Oncol* 34, 425–431

Todorova J, Pasheva E (2012): High mobility group B1 protein interacts with its receptor RAGE in tumor cells but not in normal tissues. *Oncol Lett* 3, 214–218

Wu T, Zhang W, Yang G, Li H, Chen Q, Song R, Zhao L (2016): HMGB1 overexpression as a prognostic factor for survival in cancer: a meta-analysis and systematic review. *Oncotarget* 7, 50417–50427

Zhang J, Shao S, Han D, Xu Y, Jiao D, Wu J, Yang F, Ge Y, Shi S, Li Y, et al. (2018): High mobility group box 1 promotes the epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer PC3 cells via the RAGE/NF- κ B signaling pathway. *Int J Oncol* 53, 659–671

PGBM (PC3+Du145):

Datta MW, Hernandez AM, Schlicht MJ, Kahler AJ, DeGueme AM, Dhir R, Shah RB, Farach-Carson C, Barrett A, Datta S (2006): Perlecan, a candidate gene for the CAPB locus, regulates prostate cancer cell growth via the Sonic Hedgehog pathway. *Mol Cancer* 5, 9

- Grindel B, Li Q, Arnold R, Petros J, Zayzafoon M, Muldoon M, Stave J, Chung LWK, Farach-Carson MC (2016): Perlecan/HSPG2 and matrilysin/MMP-7 as indices of tissue invasion: tissue localization and circulating perlecan fragments in a cohort of 288 radical prostatectomy patients. *Oncotarget* 7, 10433–10447
- Grindel BJ, Martinez JR, Pennington CL, Muldoon M, Stave J, Chung LW, Farach-Carson MC (2014): Matrilysin/matrix metalloproteinase-7(MMP7) cleavage of perlecan/HSPG2 creates a molecular switch to alter prostate cancer cell behavior. *Matrix Biol* 36, 64–76
- Grindel BJ, Martinez JR, Tellman TV, Harrington DA, Zafar H, Nakhleh L, Chung LW, Farach-Carson MC (2018): Matrilysin/MMP-7 Cleavage of Perlecan/HSPG2 Complexed with Semaphorin 3A Supports FAK-Mediated Stromal Invasion by Prostate Cancer Cells. *Sci Rep* 8(1) 7262
- Lin H-Y, Cheng CH, Chen DT, Chen YA, Park JY (2016): Coexpression and expression quantitative trait loci analyses of the angiogenesis gene-gene interaction network in prostate cancer. *Transl Cancer Res* 5, 951–963
- Warren CR, Grindel BJ, Francis L, Carson DD, Farach-Carson MC (2014): Transcriptional Activation by NF κ B Increases Perlecan/HSPG2 Expression in the Desmoplastic Prostate Tumor Microenvironment. *J Cell Biochem* 115, 1322–1333
- LAMB3 (PC3):
- Calaluce R, Bearss DJ, Barrera J, Zhao Y, Han H, Beck SK, McDaniel K, Nagle RB (2004): Laminin-5 beta3A expression in LNCaP human prostate carcinoma cells increases cell migration and tumorigenicity. *Neoplasia* 6, 468–479
- Reis ST, Timoszczuk LS, Pontes-Junior J, Viana N, Silva IA, Dip N, Srougi M, Leite KRM (2013): The role of micro RNAs let7c, 100 and 218 expression and their target RAS, C-MYC, BUB1, RB, SMARCA5, LAMB3 and Ki-67 in prostate cancer. *Clinics (Sao Paulo)* 68, 652–657
- Sathyanarayana UG, Padar A, Suzuki M, Maruyama R, Shigematsu H, Hsieh J-T, Frenkel EP, Gazdar AF (2003): Aberrant promoter methylation of laminin-5-encoding genes in prostate cancers and its relationship to clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 9, 6395–6400
- LAMC1 (PC3):
- Nishikawa R, Goto Y, Kojima S, Enokida H, Chiyomaru T, Kinoshita T, Sakamoto S, Fuse M, Nakagawa M, Naya Y, et al. (2014): Tumor-suppressive microRNA-29s inhibit cancer cell migration and invasion via targeting LAMC1 in prostate cancer. *Int J Oncol* 45, 401–410
- Pasqualini L, Bu H, Puhr M, Narisu N, Rainer J, Schlick B, Schäfer G, Angelova M, Trajanoski Z, Börno ST, et al. (2015): miR-22 and miR-29a Are Members of the Androgen Receptor Cistrome Modulating LAMC1 and Mcl-1 in Prostate Cancer. *Mol Endocrinol* 29, 1037–1054

PGS1 (PC3):

Jacobsen F, Kraft J, Schroeder C, Hube-Magg C, Kluth M, Lang DS, Simon R, Sauter G, Izbicki JR, Clauditz TS, et al. (2017): Up-regulation of Biglycan is Associated with Poor Prognosis and PTEN Deletion in Patients with Prostate Cancer. *Neoplasia* 19, 707–715

SDC4 (PC3+Du145):

Franzen CA, Chen C-C, Todorović V, Juric V, Monzon RI, Lau LF (2009): The Matrix Protein CCN1 is Critical for Prostate Carcinoma Cell Proliferation and TRAIL-Induced Apoptosis. *Mol Cancer Res* 7, 1045–1055

Roblek M, Strutzmann E, Zankl C, Adage T, Heikenwalder M, Atlic A, Weis R, Kungl A, Borsig L (2016): Targeting of CCL2-CCR2-Glycosaminoglycan Axis Using a CCL2 Decoy Protein Attenuates Metastasis through Inhibition of Tumor Cell Seeding. *Neoplasia* 18, 49–59

SRPX2 (PC3):

Hong X, Hong X, Zhao H, He C (2019): Knockdown of SRPX2 inhibits the proliferation, migration, and invasion of prostate cancer cells through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 33, e22237

Zhang M, Li X, Fan Z, Zhao J, Liu S, Zhang M, Li H, Goscinski MA, Fan H, Suo Z (2018): High SRPX2 protein expression predicts unfavorable clinical outcome in patients with prostate cancer. *Onco Targets Ther* 11, 3149–3157

TSP1 (Du145):

Gustavsson H, Tesan T, Jennbacken K, Kuno K, Damber J-E, Welén K (2010): ADAMTS1 alters blood vessel morphology and TSP1 levels in LNCaP and LNCaP-19 prostate tumors. *BMC Cancer* 10, 288

Kwak C, Jin RJ, Lee C, Park MS, Lee SE (2002): Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor expression and their relationship with p53 status in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *BJU Int* 89, 303–309

Lu J, Ye D, Li W, Du L, Jin W, Lu X, Zhang J, Chen G (2013): [Supplemental role of thrombospondin-1 in the diagnosis of prostate cancer]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 93, 252–255

Nelius T, Filleur S, Yemelyanov A, Budunova I, Shroff E, Mirochnik Y, Aurora A, Veliceasa D, Xiao W, Wang Z, Volpert OV (2007): Androgen receptor targets NFkappaB and TSP1 to suppress prostate tumor growth in vivo. *Int J Cancer* 121, 999–1008

Sfar S, Saad H, Mosbah F, Gabbouj S, Chouchane L (2007): TSP1 and MMP9 genetic variants in sporadic prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 172, 38–44

Zhang Y, Zheng D, Zhou T, Song H, Hulsurkar M, Su N, Liu Y, Wang Z, Shao L, Ittmann M, et al. (2018): Androgen deprivation promotes neuroendocrine differentiation and angiogenesis through CREB-EZH2-TSP1 pathway in prostate cancers. *Nat Commun* 9, 4080