

Zentrum für Onkologie

Martinistraße 52
20246 Hamburg

Prof. Dr. Meike J. Saul
Professorin für
Translationale Onkologie
Gebäude N27, 4. Etage, Raum 04.074
Telefon: +49 (0) 40 7410-51969
Fax: +49 (0) 40 7410-55563
m.saul@uke.de
www.uke.de

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf | Martinistraße 52 | 20246 Hamburg
II. Medizinische Klinik und Poliklinik – Prof. Dr. Meike J. Saul

Hamburger Krebsgesellschaft e.V.
Geschäftsstelle und Krebsberatungsdienst
Butenfeld 18
22529 Hamburg

Abschlussbericht: Entwicklung eines Multiplex-Mikroskopieverfahrens zur Detektion extrazellulärer Vesikel-basierter Biomarkersignaturen in der Krebsdiagnostik

Hamburg, 30.4.2025
Seite 1/1

Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit übersende ich Ihnen den Abschlussbericht zu unserem von Ihnen geförderten Projekt „Entwicklung eines Multiplex-Mikroskopieverfahrens zur Detektion extrazellulärer Vesikel-basierter Biomarkersignaturen in der Krebsdiagnostik“.

Wir möchten uns herzlich bei der Hamburger Krebsgesellschaft e.V. für die Unterstützung bedanken, die es uns ermöglicht hat, dieses Projekt durchzuführen. Ihre Förderung war entscheidend für unseren Fortschritt.

Den vollständigen Projektabschlussbericht finden Sie in der Anlage. Für Rückfragen stehe ich Ihnen gerne zur Verfügung und freue mich auf Ihre Rückmeldung.

Mit freundlichen Grüßen,



Meike Saul

Professorin für Translationale Onkologie

Einleitung

Die derzeitigen Methoden zur Krebsdiagnose, wie z.B. Biopsien, sind oft invasiv und nicht immer möglich¹. Die Flüssigbiopsie bietet eine weniger invasive Alternative, allerdings bestehen derzeit noch technische Herausforderungen bei der spezifischen Detektion von Biomarkern².

Extrazelluläre Vesikel (EVs) sind stabile Membranstrukturen, die von allen eukaryotischen Zellen produziert werden und in allen Körperflüssigkeiten nachweisbar sind^{3,4}. Ihre Bedeutung in der Krebsdiagnostik nimmt zu, da sie spezifische molekulare Signaturen ihrer Ursprungszellen in Form von Proteinen und microRNAs (miRNAs) tragen^{5,6}. Diese Signaturen bieten einzigartige Möglichkeiten, die Pathogenese und Aktivität von Tumoren vorherzusagen⁷⁻⁹. Dabei ist die superhochauflösende Mikroskopie die Methode der Wahl für die genaue Charakterisierung von EV-Populationen, da sie eine detaillierte Visualisierung und Analyse einzelner extrazellulärer Vesikel ermöglicht, die mit konventionellen Methoden nicht erreicht werden kann^{10,11}. Diese Technologie erlaubt die genaue Charakterisierung von EV Biomarkern in ihrem physiologischen Kontext auf Einzelpartikelebene. Dadurch wird eine genauere Differenzierung von EV-Subpopulationen und eine deutlich erhöhte Spezifität und Sensitivität in der Biomarkerdiagnostik erreicht.

Ziele

Im Rahmen der Projektförderung wurden neue superhochauflösende Mikroskopiemethoden entwickelt und etabliert, die es ermöglichen, in nachfolgenden präklinischen Studien die zelltypspezifische Heterogenität von EV-Populationen auszunutzen, um spezifische Biomarkersignaturen zu identifizieren.

Das Projekt umfasst drei wesentliche Arbeitspakete (AP): - AP1: Gerichtete und ungerichtete Anreicherung von EV-Populationen über Oberflächenproteine. - AP2: Entwicklung einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)-Methode zur Detektion spezifischer miRNAs in EVs. - AP3: Test der Übertragbarkeit auf verschiedene Bioflüssigkeiten und Anpassung für Biomarkerstudien.

Ergebnisse

Im Arbeitspaket 1 konnten wir nach Etablierung der ungerichteten Immobilisierungsmethode am Beispiel des Prostatakarzinoms die multiplexe Detektion von Biomarkern durch EVs erfolgreich demonstrieren. Hierfür wurden, in Kooperation mit Prof. Gunhild Amsberg, EVs von vier verschiedenen Prostatakarzinom-Zelllinien verwendet. Zwei dieser Zelllinien gelten als therapieresistent. Als proof of concept wurden 2 gängige Prostatakarzinom Biomarker, Tumor-assoziiertes Calcium Signal Transducer 2 (Trop2) und Androgenrezeptor (AR), auf den isolierten EVs detektiert. In einem ersten Validierungsschritt wurden die EVs der jeweiligen Krebszellen ungerichtet auf Glas immobilisiert und anschließend der krebsspezifische Marker Trop2 in Kombination mit den beiden EV-spezifischen Markern CD63 und CD81 detektiert (Abbildung 1A). Dabei konnte die multiplexe Biomarkersignatur der jeweiligen Krebs-EVs dargestellt und die Anwesenheit von Trop2 auf den EVs erstmals bestätigt werden, in ca. 20-30% aller EVs konnte Trop2 nachgewiesen werden. Bei der qualitativen Analyse der Ko-Lokalisation des Trop2-Biomarkers mit den EV-Biomarkern CD63 und CD81 konnten keine Unterschiede zwischen therapieresistenten und nicht therapieresistenten Krebs-EVs festgestellt werden. Bei genauerer quantitativer Betrachtung der Signalintensitäten der verschiedenen Biomarkerkombinationen konnte jedoch eine Biomarkerkombination identifiziert werden, die eine Differenzierung der therapieresistenten EVs ermöglicht (Abbildung 1B). So ist die Trop2-Signalintensität von EVs, die ausschließlich Trop2- und CD81-positiv sind, für EVs von therapieresistenten Zellen ca. 2-3fach höher. Diese Beobachtung unterstreicht die Leistungsfähigkeit der Multiplex-Biomarkeranalyse, die durch die parallele Betrachtung mehrerer Biomarker eine präzisere Aussage ermöglicht.

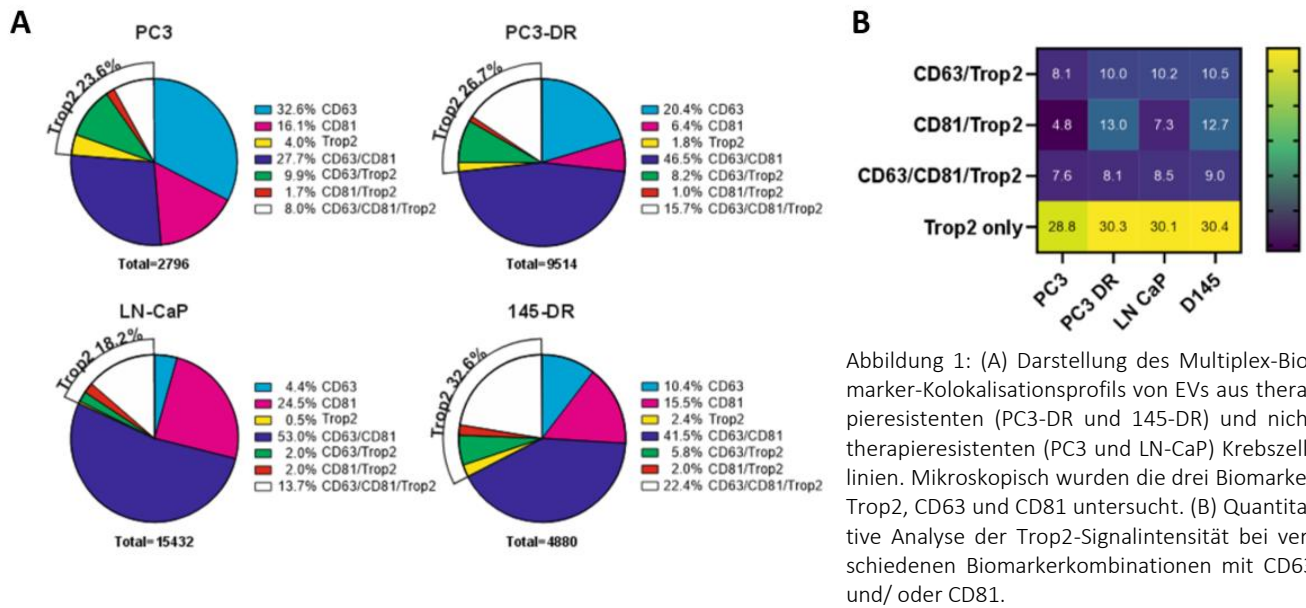


Abbildung 1: (A) Darstellung des Multiplex-Biomarker-Kolokalisationsprofils von EVs aus therapieresistenten (PC3-DR und 145-DR) und nicht therapieresistenten (PC3 und LN-CaP) Krebszelllinien. Mikroskopisch wurden die drei Biomarker Trop2, CD63 und CD81 untersucht. (B) Quantitative Analyse der Trop2-Signalintensität bei verschiedenen Biomarkerkombinationen mit CD63 und/oder CD81.

Ein weiterer Aspekt zur Verfeinerung der Multiplex-Biomarkeranalyse bestand darin, das Innere der EVs für die Analyse zugänglich zu machen, um die Anzahl potentiell messbarer Biomarker zu erhöhen. Zu diesem Zweck wurde ein Permeabilisierungsverfahren entwickelt, das die Membran der EVs perforiert, ohne die Gesamtstruktur der EVs zu beschädigen (Abbildung 2). Dazu wurden die EVs mit einem Tetraspanin-Cocktail und einem lipophilen Farbstoff dargestellt und anschließend ARs mit und ohne Permeabilisierung der EV-Membran angefärbt. Damit konnten erstmals AR in EVs nachgewiesen werden und es wurde deutlich, dass eine Permeabilisierung notwendig ist. Durch sie war es möglich, den AR im Inneren der EVs anzufärben, was zu einer mehr als fünffachen Zunahme der AR-positiven EVs führte, was darauf hindeutet, dass die Permeabilisierung erfolgreich etabliert werden konnte.

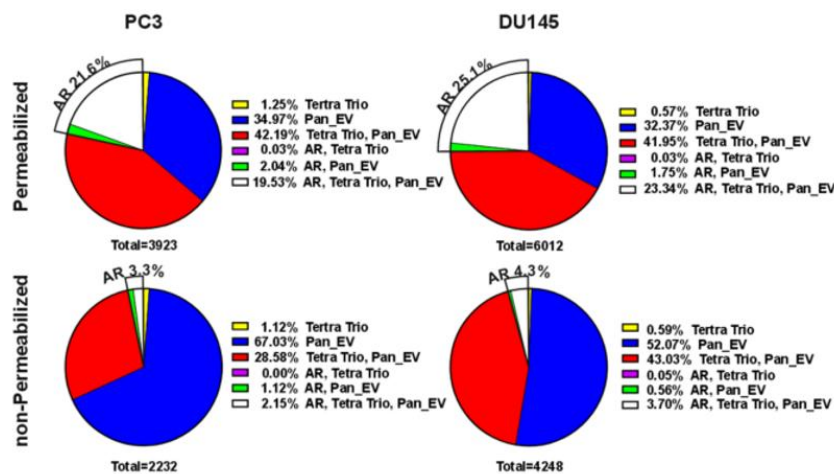


Abbildung 2: Darstellung des Multiplex-Biomarker-Kolokalisationsprofils von Prostatakrebs-Zelllinien EVs. Mikroskopisch wurde der Biomarker AR untersucht. Zur Darstellung der EVs wurde ein lipophiler Pan-EV-Farbstoff und ein Anti-Tetraspanin-Antikörpercocktail (bestehend aus CD9, CD63 und CD81) verwendet. Die Färbung und mikroskopische Analyse erfolgte zu Kontrollzwecken mit und ohne Permeabilisierung.

Der zweite Aspekt, unter dem die EV-Multiplex-Biomarkeranalyse verfeinert werden soll, ist die Immobilisierungsstrategie. Obwohl die bereits etablierte ungerichtete Immobilisierungsstrategie den großen Vorteil hat, keinen Bias auf die EV-Population auszuüben, ist es für zukünftige Anwendungen von besonderem Interesse, die EVs bereits aufgrund ihrer Oberfläche vorzusortieren bzw. anzureichern. Dafür wurde eine modulare antikörperbasierte Immobilisierungsstrategie entwickelt, die eine individuelle epitopabhängige Immobilisierung von EVs ermöglicht (Abbildung 3A). Damit können in zukünftigen Anwendungen beispielsweise besonders seltene Biomarker vor der Analyse gezielt angereichert werden. Dazu wurde zunächst die optimale Konzentration des Beschichtungsmaterials für die Immobilisierung bestimmt, um eine dichte, homogene Beschichtung ohne unerwünschte Aggregationen zu erhalten (Abbildung 3B).

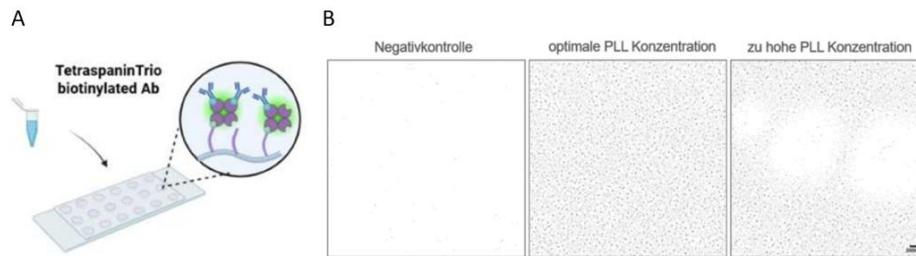


Abbildung 3: (A) Schematische Darstellung der modularen Antikörperbasierten Immobilisierungsstrategie (B) Übersichtsbilder zur Konzentrationsfindung der Beschichtungsschemikalie.

In einem zweiten Schritt wurden zu Validierungszwecken spezifische Antikörper gegen die EV-Biomarker CD9, CD63 und CD81 auf die Beschichtung aufgebracht, um eine gezielte EV-Immobilisierung auf Basis vorhandener Biomarker zu etablieren. Um eine erfolgreiche spezifische EV-Immobilisierung mikroskopisch nachweisen zu können, wurden anschließend EVs der Lungenkrebszelllinie A549 auf die Oberfläche aufgebracht. Anschließend wurden nicht gebundene EVs abgewaschen und die immobilisierten EVs mit Hilfe eines Antikörpercocktails bestehend aus CD9, CD63 und CD81 abgebildet (Abbildung 4). Es ist zu erkennen, dass sich die abgebildeten EVs (cyan) ausschließlich in der unmittelbaren nanometergroßen Umgebung des Immobilisierungsmaterials (magenta) befinden, was auf eine spezifische Immobilisierung hindeutet. Diese Methode wird zukünftig auf weitere Biomarker übertragen und uns erlauben, EVs mit seltenen Biomarkersignaturen gezielt anzureichern.

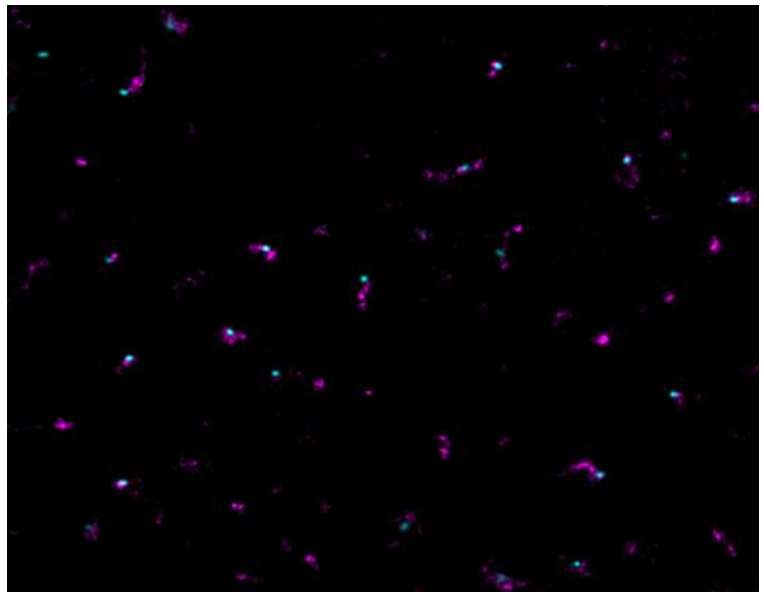


Abbildung 4: Mikroskopische Aufnahme mit sehr hoher Auflösung (hoher Zoomfaktor). Dargestellt sind das antikörperbasierte Beschichtungsmaterial (magenta) und EVs (cyan), die durch den Nachweis von CD9, CD63 und CD81 markiert sind.

Im Rahmen des Arbeitspakets 2 wurden zwei verschiedene *in-situ* Hybridisierungsstrategien zum Nachweis von miR in EVs entwickelt und getestet. Dazu wurden zwei verschiedene Sondentypen verwendet: 5-Carboxytetramethylrhodamin-markierte Peptid-Nukleinsäuren (PNA) und Fluorescein-markierte Locked-Nukleinsäuren (LNA). Beide Sondentypen wurden als Spezialanfertigungen hergestellt. Es zeigte sich, dass die LNA-Sonden im Vergleich zu den PNA-Sonden ein geringeres Hintergrundrauschen aufwiesen. Daher wurde die Methode auf Basis der LNA-Sonden weiterentwickelt. Dazu wurde die onkologisch relevante miR-574-5p in EVs der Lungenkrebszelllinie A549 detektiert. Basierend auf der ungerichteten EV-Immobilisierungsmethode aus Arbeitspaket 1 konnten durchschnittlich 73 positive EVs pro Aufnahme identifiziert werden, während die entsprechende Negativkontrolle durchschnittlich 14 Signale zeigte (Abbildung 5). Um die Spezifität der *in situ*-Hybridisierung weiter zu erhöhen, wird derzeit eine spezielle nicht-bindende Sonde synthetisiert. Sie wird es in Zukunft ermöglichen, die experimentellen Parameter in ihrer Stringenz so zu erhöhen, dass möglichst wenige falsch-positive Signale entstehen, während die miR-spezifischen Signale unverändert bleiben.

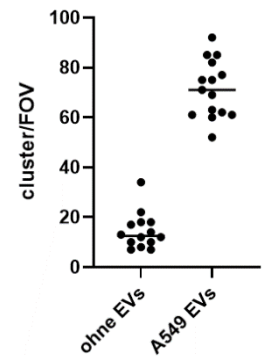


Abbildung 5: Darstellung der Signalintensität nach miR-574-5p Detektion durch LNA Sonden in A549 EVs

In Arbeitspaket 3 wird die entwickelte Methode auf verschiedene Bioflüssigkeiten wie Plasma und Atemkondensat angewendet, um Matrixeffekte zu identifizieren und das Protokoll für Biomarkerstudien anzupassen. Ziel ist es, die Anreicherung von klinisch relevanten Biomarkern zu gewährleisten und deren Nachweisbarkeit in verschiedenen Körperflüssigkeiten zu optimieren.

Im Rahmen des Arbeitspakets 3 konnte bestätigt werden, dass nach der Aufreinigung der EVs keine nennenswerten Matrixeffekte auftreten und eine effiziente Immobilisierung gewährleistet ist. So konnten wir beispielsweise mit Hilfe der ungerichteten Immobilisierungsstrategie EV aus EBC und Plasma immobilisieren und charakterisieren. Eine weitere antikörperbasierte Methode (siehe Arbeitspaket 1), die ohne aufwendige Aufreinigungsschritte auskommt, wird derzeit etabliert und für verschiedene Bioflüssigkeiten validiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Projektförderung mehrere innovative Multiplex-Mikroskopieverfahren zur Analyse von EV-basierten Biomarkern erfolgreich etabliert werden konnten. Diese neuartigen Methoden werden von uns bereits in zukünftigen Projekten eingeplant. Und finden beispielsweise bereits Anwendung in einem aktuellen Projekt zur Erforschung potentieller EV-Biomarker in Ausatemkondensat von Lungenkrebspatienten.

Literaturverzeichnis

- (1) Ziv, E.; Durack, J. C.; Solomon, S. B. The Importance of Biopsy in the Era of Molecular Medicine. *The Cancer Journal* **2016**, 22 (6), 418–422. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000228>.
- (2) Baev, V.; Koppers-Lalic, D.; Costa-Silva, B. Liquid Biopsy: Current Status and Future Perspectives. *Cancers* **2023**, 15 (12), 3205. <https://doi.org/10.3390/cancers15123205>.
- (3) Asleh, K.; Dery, V.; Taylor, C.; Davey, M.; Djeungoue-Petga, M.-A.; Ouellette, R. J. Extracellular Vesicle-Based Liquid Biopsy Biomarkers and Their Application in Precision Immuno-Oncology. *Biomark Res* **2023**, 11 (1), 99. <https://doi.org/10.1186/s40364-023-00540-2>.
- (4) Yu, D.; Li, Y.; Wang, M.; Gu, J.; Xu, W.; Cai, H.; Fang, X.; Zhang, X. Exosomes as a New Frontier of Cancer Liquid Biopsy. *Mol Cancer* **2022**, 21 (1), 56. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01509-9>.
- (5) Tkach, M.; Théry, C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* **2016**, 164 (6), 1226–1232. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.043>.
- (6) Breitwieser, K.; Koch, L. F.; Tertel, T.; Proestler, E.; Burgers, L. D.; Lipps, C.; Adjaye, J.; Fürst, R.; Giebel, B.; Saul, M. J. Detailed Characterization of Small Extracellular Vesicles from Different Cell Types Based on Tetraspanin Composition by ExoView R100 Platform. *IJMS* **2022**, 23 (15), 8544. <https://doi.org/10.3390/ijms23158544>.
- (7) Lane, R.; Simon, T.; Vintu, M.; Solkin, B.; Koch, B.; Stewart, N.; Benstead-Hume, G.; Pearl, F. M. G.; Critchley, G.; Stebbing, J.; Giamas, G. Cell-Derived Extracellular Vesicles Can Be Used as a Biomarker Reservoir for Glioblastoma Tumor Subtyping. *Commun Biol* **2019**, 2 (1), 315. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0560-x>.
- (8) Lee, Y.; Ni, J.; Beretov, J.; Wasinger, V. C.; Graham, P.; Li, Y. Recent Advances of Small Extracellular Vesicle Biomarkers in Breast Cancer Diagnosis and Prognosis. *Mol Cancer* **2023**, 22 (1), 33. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01741-x>.
- (9) K, S.; T, D.; M, P. Small Extracellular Vesicles as a Multicomponent Biomarker Platform in Urinary Tract Carcinomas. *Front. Mol. Biosci.* **2022**, 9, 916666. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.916666>.
- (10) Panagopoulou, M. S.; Wark, A. W.; Birch, D. J. S.; Gregory, C. D. Phenotypic Analysis of Extracellular Vesicles: A Review on the Applications of Fluorescence. *J of Extracellular Vesicle* **2020**, 9 (1), 1710020. <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1710020>.
- (11) Colombo, F.; Norton, E. G.; Cocucci, E. Microscopy Approaches to Study Extracellular Vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2021**, 1865 (4), 129752. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129752>.