

# Charakteristika extrazellulärer Vesikel equiner Melanom-Zelllinien

**Projektleitung:**  
Univ.-Prof. Dr. med.  
vet. Dipl. ECEIM  
Jessika-M. V. Cavalleri  
Dr. med. vet.  
Lina Sellke  
Dr. med. vet. Mag.  
Silvio Kau, MSc.

## Frühzeitige und wenig invasive Methode zur Erkennung von Tumoren beim Pferd

Melanome gehören zu den häufigsten Krankheiten (Hautneoplasien), die zu einem (bösartigen) Tumor beim Pferd führen können. Dabei beschränken sie sich nicht nur auf die Hautoberfläche, sondern können auch an inneren Strukturen wie dem Nasenrachen (Hatai et al., 2021) oder an den Wirbelknochen (Busato et al, 2017, Patterson-Kane et al., 2001) auftreten. Auch wenn die Tumoren in den Anfangsstadien meist ein gutartiges Wachstum zeigen, neigen etwa 66 % dazu, maligne (bösartig) zu entarten und Metastasen zu bilden (Smith et al., 2002, Valentine et al., 1995, Rodriguez et al., 1998).

Hautbiopsien sind bisher Mittel der Wahl in der Diagnostik equiner Melanome (Johnson 1998, Knottenbelt et al., 2015), gehen aber mit einer Manipulation des Tumorgewebes einher. Auch wenn das Risiko einer Metastasierung durch den Eingriff bei diesen Tumoren gering ist (Sullins 2020), stimmen nicht alle Tierhalter zu, sodass die Diagnose oft ein Verdacht bleibt. Je grösser die einzelnen Melanome sind und je mehr Melanome vorhanden sind, desto schwieriger ist allerdings die Therapie.

## Ziel der Studie

Ziel dieses Projekts ist die Charakterisierung verschiedener equiner Melanomzelllinien, insbesondere in Hinblick auf ihre Malignität, sowie die Anreicherung und molekulare Charakterisierung der aus diesen Zellen stammenden EVs. Bei der Kultivierung von Zellen deren EVs geerntet und untersucht werden sollen, besteht die Problematik, dass fetales Kälberserum als üblicher Bestandteil des Wachstumsmediums selbst EVs enthält.

## Klinische Relevanz

Extrazelluläre Vesikel (EVs) sind Nanopartikel, die von allen Körperzellen abgegeben werden und eine Mischung von Biomolekülen ihrer Herkunftszelle enthalten. Daher sind EVs als Biomarker verwendbar, sie wurden bereits erfolgreich für die Krebsdiagnostik beim Menschen eingesetzt (Allenson et al., 2017, Menck et al., 2017, Möhrmann et al., 2018). Das molekulare Muster von EVs kann beispielsweise eine Aussage über die Art, Malignität und das Ausmass des Befalls einer Neoplasie oder auch über mögliche Therapieansätze machen. Zellen entlassen EVs mit einer Intention: Sie enthalten geschützte Informationen und sollen zielgerichtet mit anderen Körperzellen interagieren. Bei EVs von Tumorzellen geht der Gedanke in Richtung Vorbereitung einer Metastasierung und Hemmung der körpereigenen Tumorabwehr.

Es besteht also sowohl der Bedarf nach weniger invasiven als auch frühzeitigen Diagnosemethoden für equine Melanome, möglicherweise sogar vor auftreten der ersten makroskopisch abgrenzbaren Tumore, die EVs bieten uns da einen vielversprechenden Ansatz.

## Bisherige Ergebnisse

In einem ersten Schritt haben wir daher untersucht, wie wir kostengünstig ein EV-freies Medium herstellen können, in dem unsere Zelllinien (Melanomzellen und Fibroblasten) ähnlich wie unter Kontrollbedingungen wachsen. Hierzu haben wir die Ultrafiltration mit 100 kDa MWCO AMICON Filtern sowie die tangential flow filtration (TFF) als Methoden zur EV-Depletion gewählt. Da die Poren der Filter und TFF-Units schnell verstopfen, haben wir zusätzlich zu purem fetalem Kälberserum, zwei verschiedene Vorverdünnungen verwendet (1:2 und 1:5; mit gefiltertem PBS verdünnt). Nach dem Filtrationsprozess haben wir die Filtrate und Retentate (bei der Ultrafiltration), sowie die Permeate und Konzentrate (bei der TFF) mittels ZetaView Nano-Partikel-Tracking analysiert und den jeweiligen Proteingehalt getestet. Im Anschluss wurde in einem viability assay die Überlebensrate der Melanomzellen und Fibroblasten mit dem EV-freien Medium der unterschiedlichen Filtrationsansätze über 72 Std. angeschaut. Es wurde dabei deutlich, dass sowohl Fibroblasten als auch Melanomzellen am besten mit dem ultrafiltrierten 1:5 vorverdünnten Kälberserum wachsen (Abbildung 1). Es scheint, dass durch die Vorverdünnung die Filtereinheiten nicht so schnell verstopften und mehr der wichtigen Proteine durchgelassen werden, sodass die Zellen etwas besser wachsen können (Abbildung 2).

Bei der TFF (Abbildung 3) war zu erkennen, dass in allen Konditionen die Filtration so effektiv ist, dass eine Partikelanzahl niedriger als bei filtriertem PBS (womit wir verdünnt haben) zu finden ist. Daher ist die Methode aus Sicht der EV-Depletion sehr effektiv, aber die Zellen können im Permeat, dem wahrscheinlich auch mehr der nützlichen Proteine entzogen wurden, weniger gut wachsen als mit ultrafiltriertem Serum (Abbildung 2). Auch bei der Ultrafiltration konnte die Partikelanzahl im Filtrat drastisch reduziert werden, lag jedoch die Partikelanzahl pro mL etwas über der von filtriertem PBS (Abbildung 2).

## Ausblick

Im Januar und Februar 2024 fand die Kultivierung unserer zu untersuchenden Melanomzelllinien sowie der Fibroblasten als Kontrollzelllinie an. Die Zellen wurden sodann anhand spezifischer Markermoleküle charakterisiert; deren EVs wurden geerntet, angereichert, und basal charakterisiert. Zusätzlich wird als nächstes auch versucht, Melanom-spezifische Markermoleküle auf den EVs zu finden und deren allgemeine molekulare Komposition der EVs mittels Fourier-Transform Infrared Spektroskopie (FTIR) zu untersuchen.

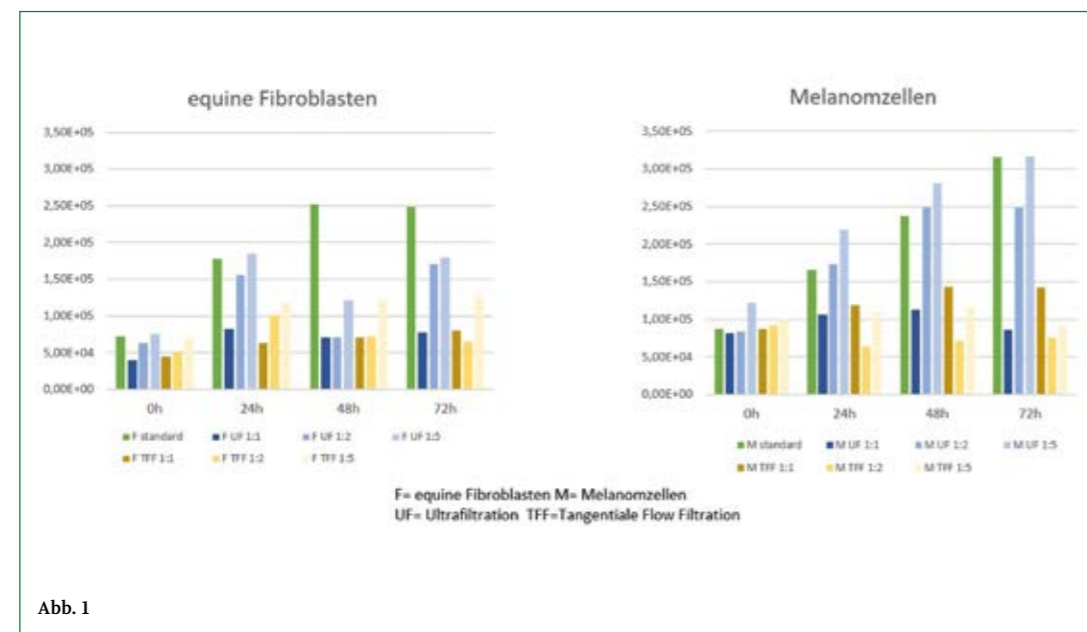


Abbildung 1: Ergebnisse des Viability assays, mit Fibroblasten und Melanomzellen über 72 Std.

Abb. 1

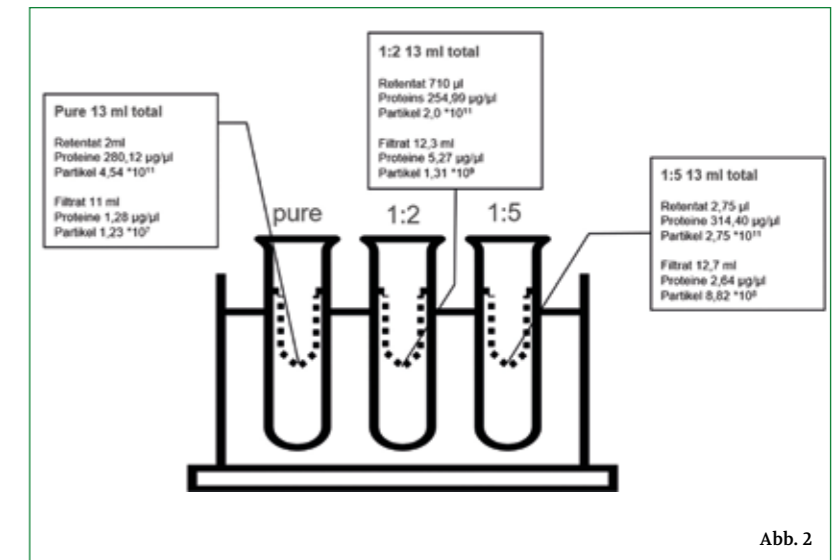


Abb. 2

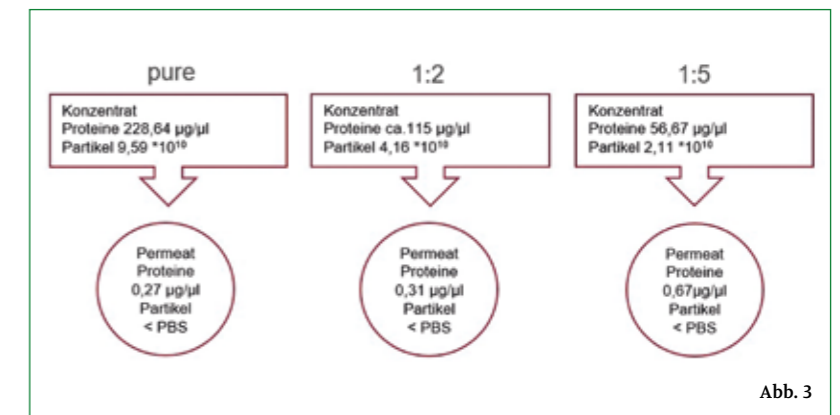


Abb. 3

Abbildung 2: Ergebnisse Ultrafiltration von fetalem Kälberserum.

Abbildung 3: Ergebnisse Tangentiale Flow Filtration von fetalem Kälberserum. Auf Grund eines Verdünnungsfehlers musste der Proteingehalt des 1:2 vorverdünnten Konzentrats nur annäherungsweise geschätzt werden.