

Verbesserte Diagnostik bei genitalen Läsionen

Projektleitung:
med. vet.
Nadine Werlen

Lebenszyklus und Pathomechanismen des Equinen Papillomavirus Typ 2

Wir möchten den Lebenszyklus und die Pathomechanismen von Equinem Papillomavirus Typ 2 (EcPV-2) im Zusammenhang mit gutartigen und bösartigen Krankheitsstadien erforschen. Im Rahmen des unterstützten Projekts werden wir RNA-Sequenzierungen von mikrodisezierten FFPE-Proben genitaler Läsionen durchführen, um Unterschiede in den viralen und zellulären Genexpressionsprofilen zwischen verschiedenen Hautschichten sowie deren Veränderungen im Verlauf der Krankheit zu erforschen.

Es besteht starke Evidenz, dass EcPV-2 mit Läsionen im Genitalbereich assoziiert sind. In Frühstadien kommt es zu gutartigen Läsionen wie Papillomen oder Plaques, welche in späteren Stadien zu bösartigen Carcinoma in Situ oder Plattenepithelkarzinomen fortschreiten können.

Wir haben die Hypothese aufgestellt, dass der differenzierungsabhängige Lebenszyklus des Virus mit der Pathogenese und dem Schweregrad der Erkrankung bei EcPV-2 assoziierten Läsionen korreliert.

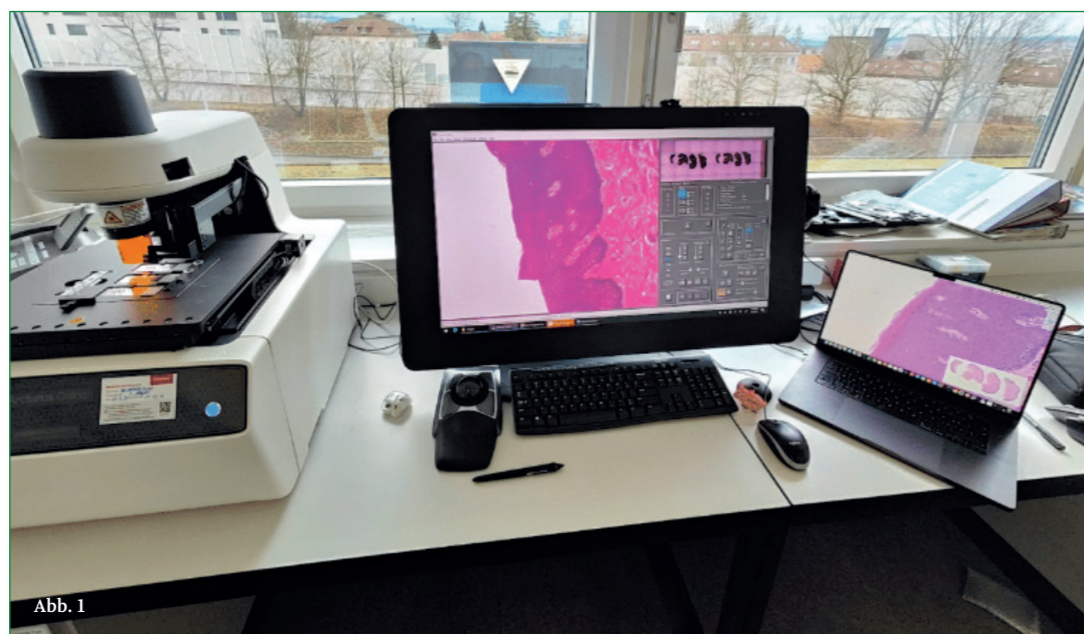


Abbildung 1:
Das Arcturus Collect Laser Capture Microdissection (LCM) System (ThermoFisher Scientific) besteht aus drei Hauptkomponenten: dem Laser-Mikrodissektionsgerät (links), einem zentralen Display (mittig) und einem Arbeitslaptop (rechts). Das Display agiert als interaktive Benutzeroberfläche, welche das Live-Mikroskopbild in Echtzeit darstellt und eine exakte Bereichsauswahl ermöglicht. Der hochauflösende histologische Scan auf dem Arbeitslaptop dient der Verifikation der ausgewählten Gewebelokalisation, wodurch eine exakte und kontrollierte Selektion der auszuschneidenden Gewebeareale gewährleistet wird.

Abb. 1

Ziel der Studie

Das Ziel der Studie ist die Untersuchung der Unterschiede in der Virus- und Wirtsgenexpression zwischen verschiedenen Zellschichten und zwischen verschiedenen Stadien der Erkrankung. Dies soll zu einer verbesserten diagnostischen Einstufung sowie dem Erschaffen von neuen Ansätzen für therapeutische Interventionen führen.

Klinische Relevanz

Eine klinisch manifeste Infektion wird oft erst spät erkannt, wenn sie bereits fortgeschritten ist und eine deutliche Symptomatik vorliegt. Hier sind häufig nur mehr radikale chirurgische Eingriffe möglich, welche mit erheblichen körperlichen und psychologischen Auswirkungen auf das betroffene Pferd einher gehen. Auch die aktuell verfügbaren topischen Behandlungsoptionen mit Chemotherapeutika führen zu erheblichen Nebenwirkungen.

Bisherige Ergebnisse

Teil 1:

Durchführung LCM

Es wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Veterinärpathologie (Vetsuisse Fakultät, UZH) geeignete archivierte FFPE-Gewebeschnitte ausgewählt. Aus folgenden Gruppen wurden jeweils drei männliche Pferde ausgewählt: 1) gesunde Haut, 2) Hyperplasie –repräsentativ für gutartige Läsionen und 3) PEK – repräsentativ für maligne Läsionen.

Im Zeitraum vom 09/24-01/25 wurden von diesen Fällen mittels der «Laser Capture Microdissection» (LCM) Technik jeweils folgende Hautschichten einzeln daraus ausgeschnitten:

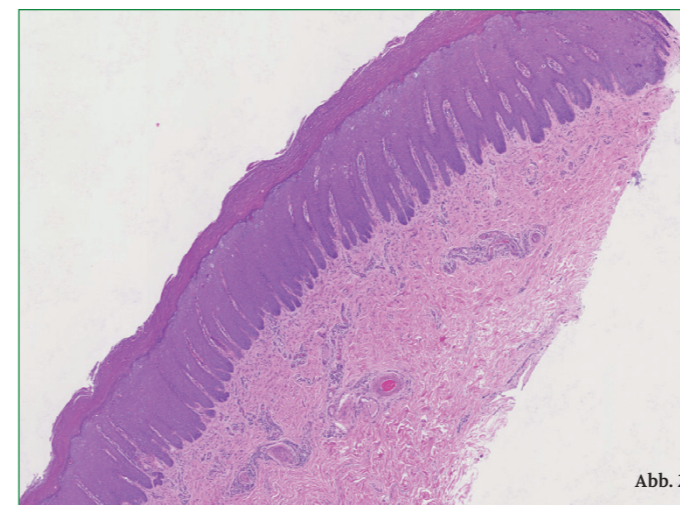


Abb. 2

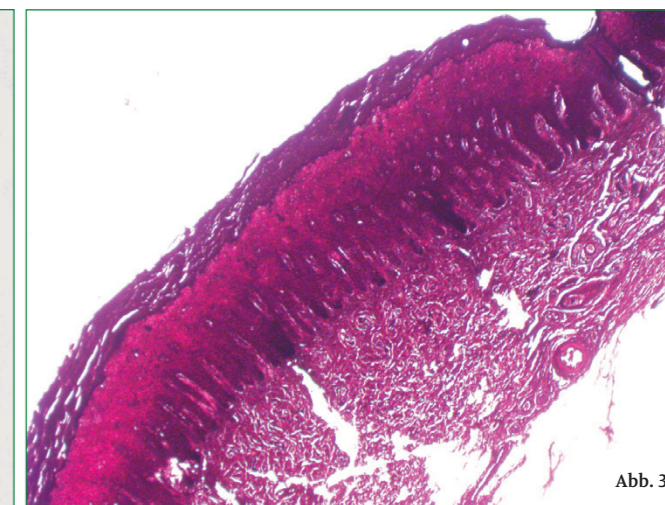


Abb. 3

1) Stroma/Dermis, 2) Stratum basale und suprabasale 3) Stratum spinosum 4) Stratum granulosum und corneum.

Aktuell muss nur noch Gewebe von einem Pferd aus einer Fallgruppe (Hyperplasie) ausgeschnitten werden.

Teil 2:

Extraktion RNA und Qualitätskontrolle

Die RNA wurde in regelmässigen Abschnitten von den bis dahin vollendeten Schnitten mit dem Covaris truXTRAC FFPE RNA Kit und dem fokussierten Ultraschallgerät Covaris E220 extrahiert. Die RNA wurde intern mit der Agilent TapeStation 4150 System auf Menge und Qualität geprüft (>10ng RNA, DVM200 >30%).

Während die RNA-Menge sämtlicher Fälle gesunder Haut ausreichend war, mussten wir sowohl bei den Hyperplasien als auch bei den PEK aufgrund zu wenig RNA-Gehalt bei einigen Fällen noch weiteres Gewebe anfordern und verarbeiten um mehr RNA zu gewinnen.

Ausblick

Zu Jahresbeginn wurde die RNA für die Sequenzierung ans Functional Genomics Center Zürich übergeben. Die Datenanalyse wird im Anschluss in Zusammenarbeit mit deren Bioinformatikern durchgeführt. Wir planen, die Publikation im Laufe des Frühjahrssemesters 2025 zu verfassen.

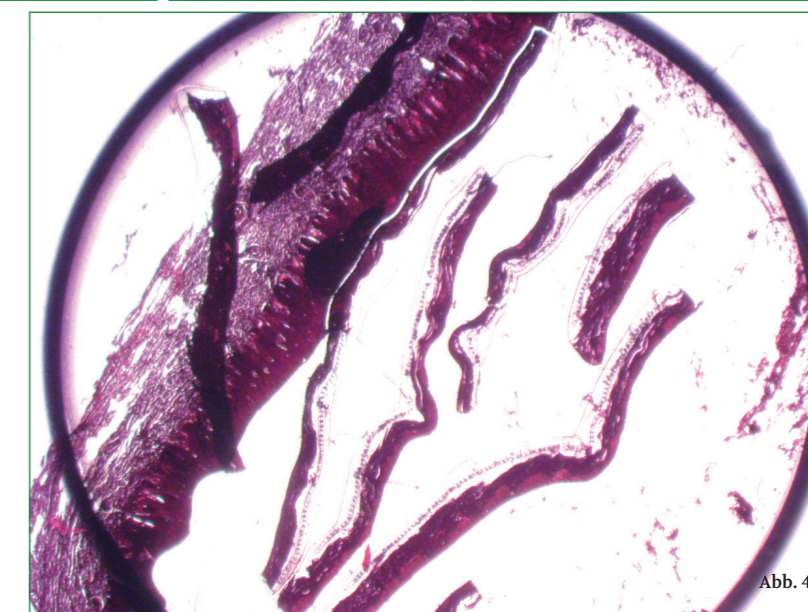


Abb. 4

Abbildung 2:
Histologischer Schnitt durch das hyperplastische Penisepithel eines Pferdes mit klinisch manifester Infektion mit EcPV-2. Das Gewebe weist charakteristische Merkmale einer gutartigen Erkrankung im Frühstadium auf.

Abbildung 3:
Dieselbe Läsion wie in Abbildung 2, dargestellt durch das integrierte Mikroskop des Arcturus Collect Laser Capture Microdissection (LCM) Systems, welches das Live-Mikroskopbild in Echtzeit auf dem Bildschirm des Geräts anzeigt.

Abbildung 4:
Laser-Capture-Mikrodissektion der oberflächlichen Epidermisschichten (Stratum granulosum/Corneum). Sichtbar sind die Gewebeschnitte und ihre erfolgreiche Haftung am CapSure™ Macro LCM Caps-Auffangsystem.