

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

Equine Melanome sind häufige Hauttumore bei Pferden, die auch innere Organe befallen können (Hatai et al., 2021, Busato et al, 2017, Patterson-Kane et al., 2001). Anfangs meist gutartig, entwickeln sich etwa zwei Drittel zu bösartigen Melanomen mit Metastasen (Smith et al., 2002, Valentine et al., 1995, Rodriguez et al., 1998). Die gängige Diagnose mittels Hautbiopsie ist invasiv und nicht immer akzeptiert. Daher besteht Bedarf an weniger invasiven Methoden zur Frühdiagnose.

Ziel der Studie

Dieses Projekt konzentriert sich auf die Charakterisierung der Malignität verschiedener equiner Melanomzelllinien sowie die Anreicherung und molekulare Analyse der von diesen Zellen produzierten EVs.

Klinische Relevanz

Extrazelluläre Vesikel (EVs) von Zellen freigesetzte Nanopartikel mit Biomolekülen der Ursprungszelle, bieten hier einen vielversprechenden Ansatz. In der Humanmedizin haben sich EVs als Biomarker für die Krebsdiagnostik bewährt. Ihr

Abbildung 1: Mediane EV-Größenverteilung (X50) von Melanomzellen gewachsen in Nährmedien mit verschiedenem EV-freiem FCS: Nebeneinandergestellt die beiden Filtrierungsmethoden tangentielle Flow-Filtration (TFF) und Ultrafiltration (UF) von FCS im reinen Zustand (pure), 1:2 vorverdünnt (1to2), sowie 1:5 vorverdünnt (1to5) sowie dem Standardnährmedium für Melanomzellen (Standard). Signifikante Unterschiede zwischen den Methoden sind mit einem Sternchen gekennzeichnet ($p < 0,05$).

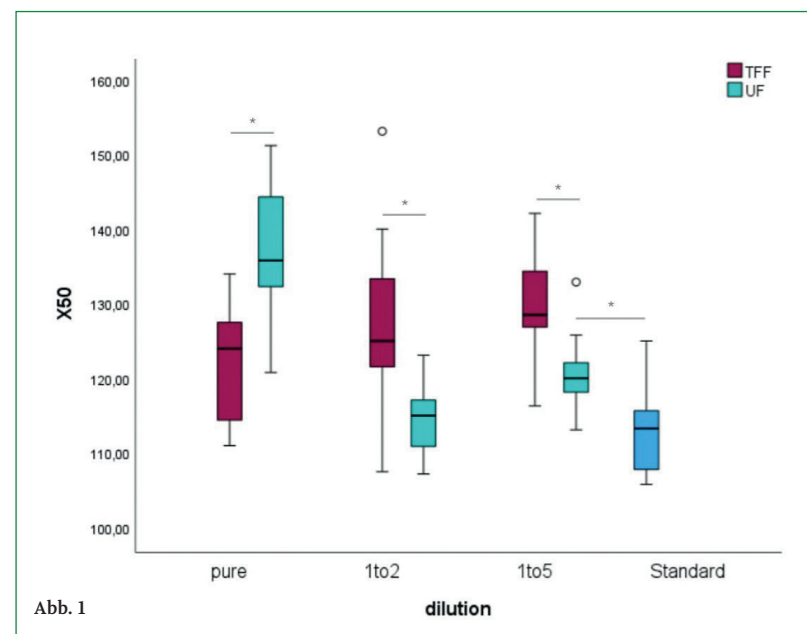


Abb. 1

molekulares Muster könnte Informationen über Art, Malignität (Bösartigkeit), Tumorausmass und Therapie liefern. Zur Bestimmung und Gradierung der Malignität können Melanommarker (bspw. PNL2, RACK 1, Tyrosinase) und Proliferationsmarker (bspw. Ki-67, PCNA) herangezogen werden (Pimenta et al., 2023).

Bisherige Ergebnisse

Im Zwischenbericht Januar 2024 berichteten wir über die Entwicklung eines EV-freien Wachstumsmediums. Da das für die Zellkultur notwendige fetale Kälberserum (FCS) xenogene EVs enthält, testeten wir Ultrafiltration (UF) und Tangential-Flow-Filtration (TFF) zur EV-Entfernung. Sowohl reines als vorverdünntes FCS wurde mit beiden Methoden gefiltert. Sowohl Melanomzellen als auch Fibroblasten zeigten bei UF mit 1:5 vorverdünntem FCS (UF1to5) das beste Zellwachstum.

Wir untersuchten die von den Zellen unter verschiedenen Bedingungen freigesetzten EVs. Zellüberstände wurden nach 24, 48 und 72 Stunden gesammelt, konzentriert und mittels Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA) auf Menge, Größenverteilung und durchschnittliche Grösse der EVs analysiert. Besonders interessant war die EV-Produktion von Zellen mit gutem bzw. schlechtem Wachstum. Nach 48 Stunden zeigte sich beispielsweise, dass Melanomzellen unter guten Bedingungen (UF 1to2 und besonders UF 1to5) eher kleinere EVs (Median 115 bzw. 120 nm), ähnlich den Standardbedingungen mit purem FCS (Median 113,3nm) produzieren. Unter schlechteren Wachstumsbedingungen (TFF allgemein und UF mit purem FCS) produzierten die Zellen grössere EVs (Median 124, 125, 128,5 bzw. 135,8 nm) (Abb. 1). Bei der Größenverteilung der EVs (Abb.2) fällt ebenso auf, dass die Kurven unserer Melanomzellen im Medium mit TFF FCS im Vergleich mit dem Standardmedium nach rechts verlagert sind. Es sind also mehr grössere EVs darin zu finden. Interessant dabei ist, dass sich die höchsten Punkte der Kurven (Peaks) nur gering voneinander unterscheiden (um die 100 nm), was bedeutet, dass die grösste Gruppe der EVs etwa gleich gross ist, sich jedoch eine Population grösserer EVs zusätzlich abzeichnet. Wenn die Zellen unter schlechten Bedingungen wachsen, scheinen sie mehr grössere Partikel freizusetzen. Dies könnte ein Zeichen für den natürlichen Zelltod sein, bei dem grosse Vesikel von der Zelloberfläche abgeschnürt werden, sogenannte apoptotische Ektosomen oder Körperchen.

In einem direkten Vergleich von Melanomzellen und Fibroblasten im Wachstumsmedium UFFCS 1:5 fällt auf, dass die Größenverteilung der extrazellulären Vesikel (EV) der Zellen je nach

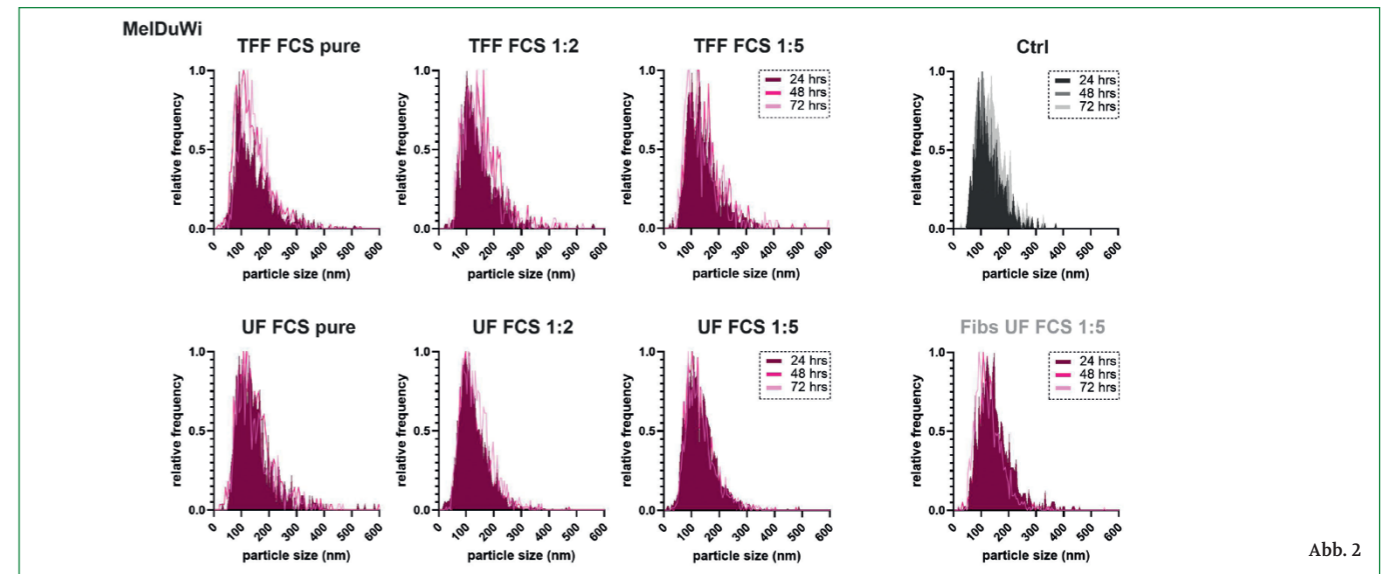


Abb. 2

Zeitpunkt der Ernte variiert (Abb. 2). Während die Kurven bei Fibroblasten nach 24 und 48 Stunden etwas weiter rechts liegen, zeigen beide Zellarten bei 72 Stunden einen Peak bei 100 nm. Wenn auch bei den Krebszellen kein zeitabhängiger Effekt zu erkennen ist, zeigen Fibroblasten eine Art zeitabhängige Adaption auf die neue Medienkomposition. Ob dieser Effekt mit Viabilitätsveränderungen der Zellen zusammenhängt, bleibt abzuklären.

Mit Hilfe der Melanommarker PNL2, RACK 1 und Tyrosinase sowie des Proliferationsmarkers Ki-67 begannen wir mit der Charakterisierung unserer Melanomzellen und -tumore zur Einstufung ihrer Malignität (Abb. 3). Es zeigte sich, dass 2D kultivierte Zellen eine deutlich stärkere Expression von RACK1 zeigen als natives Gewebe (Abb.3). und dass Zellen, die 3D kultiviert wurden, bspw. in Form von Sphäroiden (2), weniger deutlicher markiert werden konnten und eher dem Gewebe (3) ähneln. Da equine Zellen noch nicht in 3D kultiviert und analysiert wurden, stammt diese erste Erkenntnis aus dem Vergleich mit Hundezellen, die bereits 2D und 3D kultiviert, und mit nativem Tumorgewebe verglichen wurden. Eine detailliertere Interpretation der Ergebnisse wird allerdings vorerst durch vermehrt aufgetretene «Sprinkles» (Farbsprenkel) erschwert. Diese Sprinkles könnten sowohl hochreaktive Zellen als auch Artefakte durch hohe Marker-Konzentration oder unspezifische Signale sein. Da der Versuch zur Minimierung dieser Artefakte wiederholt wird, hier die vorläufigen Ergebnisse: Alle Proben waren positiv für den Melanommarker RACK 1 (Bestätigung der Diagnose). Ki-67 war in allen 3 Proben positiv, in Probe 2 und 3 mit Sprinkles. Alle drei Proben zeigten ein positives Staining mit Tyrosinase, während nur in der Gewebeprobe (3) auch PNL-2 nachgewiesen werden konnte.

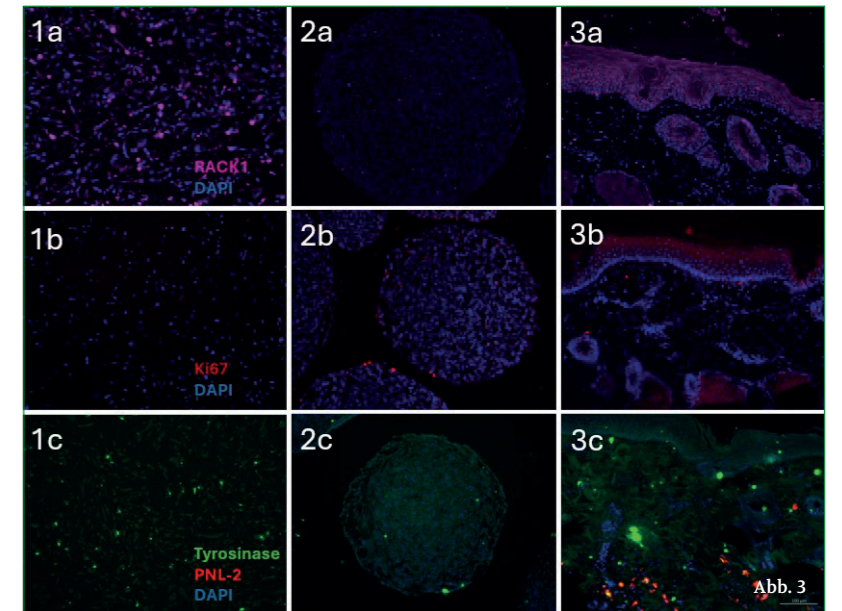


Abb. 3

Ausblick

Abschliessend werden wir unsere Melanomzellen und Kontrollzellen nochmals in Kultur nehmen, die EVs anreichern, und auf die Melanom-spezifische Marker testen sowie deren allgemeine biomolekulare Komposition mittels Fourier-Transform Infrarot Spektroskopie (FTIR) untersuchen.

Abbildung 2: Größenverteilungskurven der EVs von MelDuWi-Zellen von drei Zeitpunkten, gewachsen in den Nährmedien mit verschiedenem EV-freiem FCS. Filtrierungsmethoden tangentielle Flow-Filtration (TFF) und Ultrafiltration (UF) von FCS im reinen Zustand (pure), 1:2 vorverdünnt (1to2), sowie 1:5 vorverdünnt (1to5) sowie dem Standardnährmedium für Melanomzellen (Standard). Im Vergleich damit die Graphen zu den Fibroblasten (Fibs) in dem Medium, welches die besten Wachstumsbedingungen bot.

Abbildung 3: Immunohistochemische Markierung von Melanomzellen aus 2D-Kultur (1), Melanomzell-Sphäroid (Hund) (2) und Melanomgewebe (3) mit den Melanommarkern RACK 1 (a), dem Proliferationsmarker Ki-67 (b) sowie im double staining mit PNL-2 und Tyrosinase (c).