



Projektbericht PR2023-02

Charakteristika extrazellulärer Vesikel equiner Melanom-Zelllinien

Projektleitung

Prof. Dr. med. vet. Jessika-M. V. Cavalleri, Abteilung für Interne Medizin Pferde Dr. med. vet. Lina Schachinger, Assistenzprof. Dr. Mag. Silvio Kau-Strebinger, Unit für Morphologie

Equine Melanome sind häufige Hauttumore bei Pferden, die zunächst meist gutartig sind, sich jedoch bei etwa zwei Dritteln der Fälle zu bösartigen Melanomen mit Metastasen entwickeln (Smith et al., 2002, Valentine et al., 1995, Rodriguez et al., 1998). Die Metastasen können dabei auch innere Organe befallen (Hatai et al., 2021, Busato et al., 2017, Patterson-Kane et al., 2001). Extrazelluläre Vesikel (EVs) sind von Zellen freigesetzte Nanopartikel, die Biomoleküle ihrer Ursprungszelle enthalten. Ihr molekulares Muster kann Informationen über Art, Malignität, Ausmaß und Therapiemöglichkeiten ihrer Herkunftszellen, hier von Melanomen, liefern.

Dieses Projekt konzentriert sich auf die Charakterisierung verschiedener equiner Melanomzelllinien sowie insbesondere auf die Untersuchung der von diesen Zellen produzierten EVs.

Für die Isolation zellulärer EVs müssen die Zellen in einem EV-freien Medium heranwachsen, um eine Verdünnung durch Fremd-EVs zu vermeiden. Da ein üblicher Bestandteil von Wachstumsmedium EVs enthält, haben wir zu Beginn des Projekts ein EV-freies (armes) Wachstumsmedium etabliert. Die Ergebnisse dieser Studie haben wir im Sommer auf dem EAVA-Kongress in Toulouse in Form einer Posterpräsentation vorgestellt (<https://doi.org/10.1111/ahe.70056>, siehe Anhänge).

Zur Charakterisierung unserer Zellen haben wir uns immunhistochemische Marker auf Zellen und Tumorgewebeschnitten von Melanomen angeschaut. Siehe dazu Zwischenbericht 2.

In den vergangenen Monaten lag unser Schwerpunkt auf der Charakterisierung der Melanomzellen mittels Proteom-Analyse sowie auf der grundlegenden Untersuchung ihrer EVs. Eine Proteom-Analyse kann Hinweise auf Unterschiede auf zellulärer Ebene, beispielsweise hinsichtlich Vesikelproduktion, -beladung und -sekretion, liefern.

Wir haben Zellen aus drei Pferdemelanomen kultiviert: aus einem mutmaßlichen Primärtumor, einem Lokalrezidiv an derselben Stelle sowie aus einer Lebermetastase eines anderen Patiententiers. Die Zellen wurden in EV-armem Medium wachsen kultiviert, die Überstände gesammelt und bis zur Weiterverarbeitung luftdicht bei -80°C gelagert.

Vorbereitend zur Proteom-Analyse mittels Massenspektrometrie, wurden die Zellen aufgetaut, mit einem RIPA-Puffer lysiert und verdaut. Zur massenspektrometrischen Untersuchung wurde der timsTOF HT (Bruker, Billerica, Massachusetts (MA), USA) verwendet, ein Gerät unserer Core Facility der Veterinärmedizinischen Universität Wien.

Es konnten bei jedem Zelltyp etwa 5000 Proteine gefunden werden, 4776 davon kamen bei allen drei Zelltypen vor. Der Primärtumor und das Lokalrezidiv hatten jeweils unter 200 «exklusive» (nur bei dem einen Zelltyp vorkommende) Proteine, während sie 720 gemeinsame Proteine aufwiesen. Die Lebermetastase wies nur etwa 200 Proteine mit den jeweils anderen Zellen, jedoch 369 «exklusive Proteine auf (Abb.1). Dies lässt vermuten, dass sich die beiden Hauttumore (Primär- und Lokalrezidiv) ähnlich sind, die Lebermetastase jedoch einige Alleinstellungsmerkmale zeigt (mehr exklusive als gemeinsame Proteine). Um dieser Vermutung weiter auf den Grund zu gehen, haben

wir uns die Proteingruppen in funktioneller Hinsicht angeschaut. Für die Analyse nutzten wir string-db.org; die Plattform ordnet Gene Ontology (GO)-Begriffe zu, die Funktion und Wirkort von Genen/Proteinen beschreiben. Wir berücksichtigten dabei die Proteinlisten hinsichtlich ihrer Qualität – ob ein Protein vorkommt.

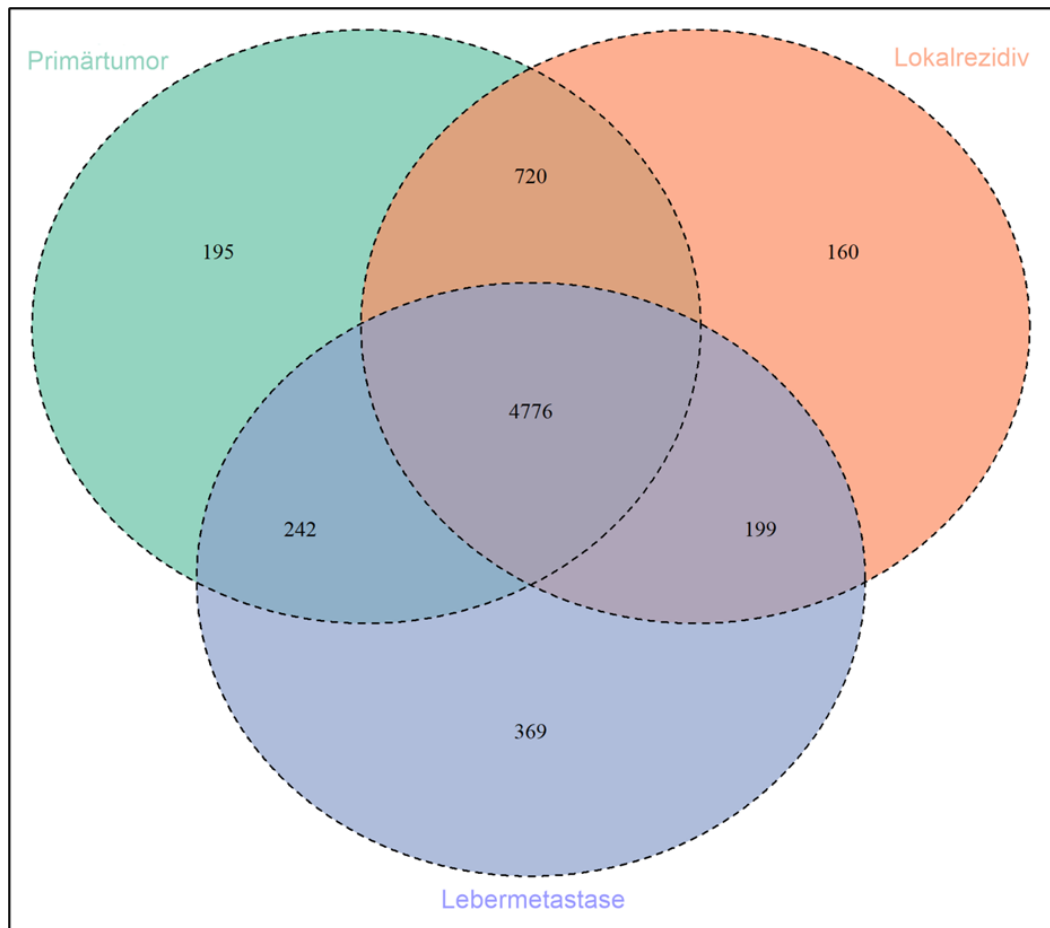


Abb. 1 Venn-Diagramm zur Anzahl der detektierten Proteine bei Zellen des «Primärtumors», des Lokalrezidivs und der Lebermetastase, die Überlappungsbereiche zeigen die Anzahl Proteine, die sich jeweils 2, bzw alle drei (Mitte) Zelltypen teilen.

Sowohl die exklusiven Proteine des Primärtumors als auch des Lokalrezidivs zeigten sehr wenig funktionelle Interaktionen in Relation zur Anzahl der Proteine (einen bzw zwei GOs). Die gemeinsame Gruppe dieser beiden Zelltypen zeigte sehr hohe Protein-Interaktionen, wobei die GO- Begriffe u.a. Tumorzellbewegung, Metabolismus und Gefäßbildung verknüpfen – bestimmend für die Invasion, Metastasierung, Wachstum und Therapieansprechen von Hauttumoren.

Die gemeinsamen Gruppen zwischen der Lebermetastase und dem Primärtumor zeigte eine geringe Anzahl Interaktionen (5 GO Begriffe), zwischen Lebermetastase und Rezidiv gab es einige funktionelle Interaktionen, vor allem um Proteine, die im Zytoplasma wirken und für die intrazelluläre Struktur und Organisation zuständig sind. Die exklusiven Proteine der Metastase weisen vor allem auf fehlregulierte Zellzyklus und Chromosomenkontrollmechanismen hin, die genomische Instabilität, schnelles Wachstum und damit die Entstehung und Unterhaltung von Metastasen begünstigen.

Die EVs unserer Zellen reicherten wir aus den Zellüberständen an. Wir wählten dafür die Ultrazentrifugation mit Saccharose-Kissen, eine etablierte Methode zur Trennung von EV-dichten Partikeln von dichteren Bestandteilen.

Beim Vergleich der angereicherten EVs der 3 vorliegenden Zellen (Abb. 2), ist eine deutlich höhere mittlere Größe von fast 170 nm bei den EVs des Lokalrezidivs zu erkennen, die sich auch in der Rechtsverschiebung der Größenverteilungskurve widerspiegelt. Spannenderweise produzieren die Lebermetastasen-Zellen auch deutlich mehr EVs. Dies könnte auf Zellstress hindeuten – dann werden meist mehr und größere EVs freigesetzt – oder ein zelltypisches EV Muster sein. Wir prüfen, ob sich das im weiteren Verlauf bestätigt.

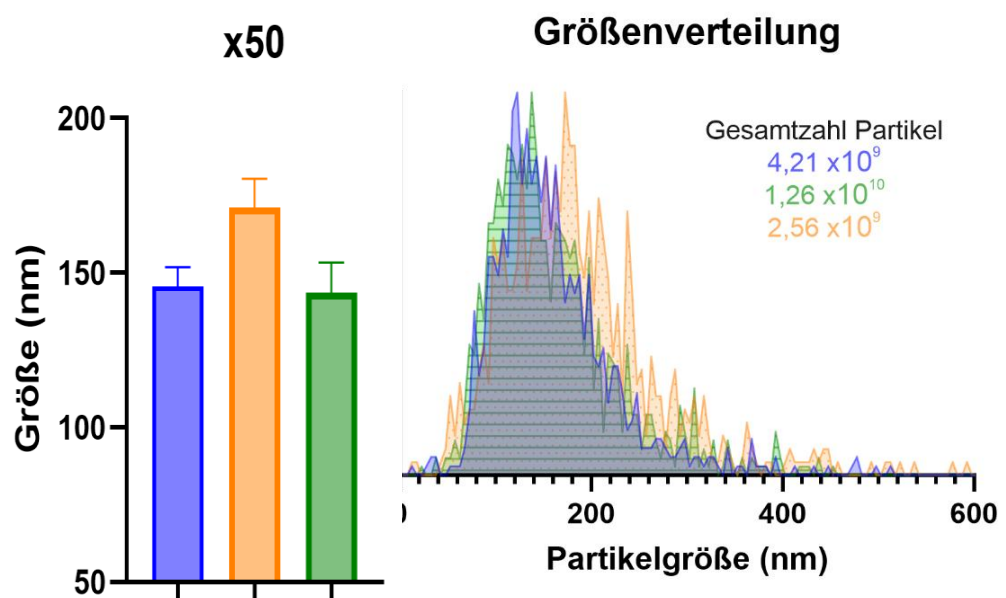


Abb. 2 Durchschnittliche Größe in nm, Größenverteilungskurve und Gesamtzahl der angereicherten EVs von den Zellen des „Primärtumors“ (blau), des Lokalrezidivs (orange) und der Lebermetastase (grün).

Im Folgeprojekt untersuchen wir funktionelle Unterschiede der EVs, etwa wie sie Endothelzellen bei der Bildung einer metastatischen Nische beeinflussen (Gefäßneubildung, erhöhte Durchlässigkeit).

Übergeordnetes Ziel unseres Projekts ist zu prüfen, ob EVs aus peripherem Blut als Biomarker für Melanome beim Pferd dienen können – für Diagnose, Einschätzung des Krankheitsausmaßes und Therapieplanung.