Department für Kleintiere und Pferde
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Klinisches Zentrum für Kleintiere
Interne Medizin Kleintiere
Leitung: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Iwan A. Burgener
PhD, Dipl.ECVIM-CA, Dipl.ACVIM PhD

Expressionshemmung von CD146 und die Auswirkung auf Bestrahlungssensitivität und Zytokinsekretion beim oralen malignen Melanom des Hundes

Bachelorarbeit



Vorgelegt von
Hagar EL-Mashtawy

Wien, Juli 2024

Betreuerin: Mag^{a} rer.nat. Dr^{in} rer.nat. Barbara Pratscher

Gutachterin: Dipl.-Ing^{in} Dr^{in} nat.techn. Priv.-Doz^{in} Sabine Brandt

Danksagung

Ich möchte allen Personen meinen herzlichen Dank aussprechen, die mich während des Schreibens meiner Bachelorarbeit unterstützt haben. Es war mir eine Freude, Anregungen und konstruktive Kritik entgegenzunehmen und in meine Arbeit einfließen zu lassen. Für die hilfreichen Beiträge bin ich sehr dankbar.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Iwan A. Burgener und dem gesamten Team der Abteilung für Innere Medizin von Kleintieren für die freundliche Aufnahme und die Möglichkeit, meine Bachelorarbeit in ihrer Abteilung zu verfassen.

Am meisten möchte ich mich bei Frau Dr. Barbara Pratscher bedanken, die mich bei meiner Bachelorarbeit betreut hat. Ihre wertvolle Kritik und Unterstützung waren von unschätzbarem Wert. Sie ist mir nicht nur im Labor, sondern auch beim Schreiben der Arbeit stets zur Seite gestanden und hat mich Schritt für Schritt unterstützt. Ihre Geduld und Hilfsbereitschaft haben mir sehr geholfen, diese Arbeit erfolgreich zu vollenden.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie. Ihre kontinuierliche Unterstützung während meines gesamten Studiums war für mich von größter Bedeutung.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1. Canine Melanome 1

1.1.1. Klassifikation: 3

1.2. Zytokine im Zusammenhang mit Tumoren 4

1.3. Small interfering RNA (siRNA) 6

1.4. CD146 als Marker 7

1.4.1. CD146 in der physiologischen Angiogenese 8

1.4.2. CD146 im Zusammenhang mit Zytokinen 9

1.5. Ziel der Bachelorarbeit 10

2. Materialien und Methoden 12

2.1. Tumorpatienten und Zellkultur 12

2.2. Zweidimensionale Zellkultur 13

2.3. Reverse si-RNA-Transfektion 14

2.4. Bestrahlung und Zellproliferationstest 14

2.5. Western Blot 15

2.6. Multiplex Sekretom-Analyse 16

3. Ergebnisse 19

3.1. Proliferationsverhalten der Melanomzellen nach Einzel- und Kombinationstherapie mit Bestrahlung und Unterdrückung der CD146 Expression 19

3.1.1. Auswertung 19

3.1.2. Statistische Auswertung 23

3.2. Western Blot 24

3.3. Multiplex Sekretom-Analyse 25

3.3.1. Auswertung 25

3.3.2. Statistische Auswertung 29

4. Diskussion 30

5. Zusammenfassung 34

6. Summary 35

7. Literatur 36

8. Anhänge 39

8.1. Liste der Abkürzungen 39

8.2. Liste der Abbildungen 39

8.3. Liste der Tabellen 39

1. Einleitung

1.1. Canine Melanome

Das Melanom ist einer der häufigsten oralen Tumorerkrankungen des Hundes und repräsentiert eine bösartige Neubildung von Melanozyten. Diese entsteht vor allem bei stark pigmentierter Haut- bzw. Schleimhaut. Ein Melanom kann an behaarter Haut, in der Mundhöhle, an den Fußballen, im Auge, im Magen-Darm-Trakt oder am Nagelbett entstehen. Dieser Tumor weist ein hoch malignes Verhalten auf und kann sehr oft Bestrahlung oder Chemotherapie überstehen, im Gegensatz zu Melanomen der behaarten Haut, die nur selten metastasieren und eine relativ gute Prognose aufweisen (Schmid et al., 2019) (1).
Aufgrund der Aggressivität und hohen Metastasierungs- und Mortalitätsrate, die diese Art von Tumoren an Schleimhäuten bei Hunden aufweist, gilt es nach Ursachen und vor allem weiteren Therapiemöglichkeiten sowie Präventionsmaßnahmen zu forschen (Fonseca-Alves et al., 2021) (2).

Hunde werden aufgrund der gemeinsamen Umgebung mit ihrem:r Besitzer:in als geeignete Tumormodelle angesehen, da sie potenziell denselben Karzinogenen und Umweltbedingungen ausgesetzt sind, die die Tumorentstehung begünstigen können.
Immunologisch intakte Hunde sind auch deshalb ein gutes Tumormodell, da sich die Krebserkrankung spontan entwickelt. Dies spiegelt somit den natürlichen Prozess der Tumorentstehung gut wider.

Humane (hMM)- und canine maligne Melanom (cMM) weisen mehrere molekulare Ähnlichkeiten in verschiedenen Signalwegen auf, wie zum Beispiel die Hochregulierung der Cyclooxygenase-2 (COX2) Expression (Martínez et al., 2011) (3), oder die Aktivierung des AKT-mTOR-Signalwegs (Atherton et al., 2016) (4).
Außerdem wurde häufig eine Deregulierung der CD146-Expression während des Tumorwachstums beobachtet, was eine wichtige Rolle bei der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) spielt.

Dieser biologische Prozess ist gekennzeichnet durch die Auflösung interzellulärer Kontakte, den Verlust der Zelladhäsion und die Übernahme mesenchymaler Eigenschaften. Diese Veränderungen ermöglichen es Tumorzellen in benachbartes Gewebe einzudringen und Metastasen zu bilden. Daher kann die Deregulierung von CD146 als ein Schlüsselmechanismus im EMT-Prozess angesehen werden, der die Tumorzellen befähigt ihre Adhäsionseigenschaften zu verändern und invasive und metastatische Fähigkeiten zu erwerben (Ouhtit et al., 2009) (5). Da sowohl cMM als auch hMM dazu neigen sich biologisch aggressiv zu verhalten, können canine orale maligne melanome (cOMM) ein Modell für das menschliche maligne Melanom (hMM) darstellen (Atherton et al., 2016) (4).

HMM gilt als der tödlichste aller Hauttumore aufgrund seiner hohen Fähigkeit bereits in frühen Krankheitsstadien Metastasen zu bilden. Während die meisten Hauttumoren bei rechtzeitiger Erkennung durch Exzision einfach geheilt werden können, weisen nicht selten klein erscheinende Melanome aufgrund ihrer hohen Metastasenbildung eine schlechte Prognose auf (L. R. Braathen et al., 2000) (6).

In den Stadien I und II stellt der chirurgische Eingriff, bei dem die Resektionsränder abhängig von der Tiefe der Tumorinvasion festgelegt werden, die primäre Behandlung für lokalisierte Melanome dar. In diesen Stadien bietet er eine hohe Heilungsrate, während er bei fortgeschrittenen, metastasierten Tumoren keine kurative Wirkung entfaltet (Natarelli et al., 2024) (7).
Außerdem besteht nach vollständiger Tumorresektion die Möglichkeit einer adjuvanten Immuntherapie. Studien zeigten einen kleinen, aber signifikanten Vorteil dieser Therapie sowohl für das Gesamtüberleben als auch für das progressionsfreie Überleben der Patienten (Krieter et al., 2019) (8).

Im Stadium III (lokoregionäre Metastasierung) können Satelliten- und In-Transit-Metastasen operativ entfernt werden. Ist eine vollständige Resektion nicht machbar, kommen intraläsionale Verfahren, wie onkolytische Therapien, zum Einsatz, die Tumorzellen direkt zerstören und gleichzeitig eine tumorspezifische Immunantwort anregen. Weitere Therapieoptionen umfassen die Elektrochemotherapie mit Bleomycin oder Cisplatin.

Zusätzlich werden für Stadium III auch adjuvante Behandlungen zugelassen, die zuvor nur im Stadium IV angewendet wurden (Krieter et al., 2019) (8).

Im Stadium IV, wenn das Melanom bereits systemisch metastasiert hat, stehen verschiedene Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung. Dazu zählen in erster Linie medikamentöse Immuntherapien, die das Immunsystem aktivieren, sowie zielgerichteten Therapien (z.B. MAPK-Inhibitoren), die auf molekulare Schwachstellen des Tumors abzielen.
Ergänzend können auch chirurgische Eingriffe zur Entfernung von Metastasen und strahlentherapeutische Verfahren in Betracht gezogen werden.
Die aktuellen Therapien zielen darauf ab, das Immunsystem zu stärken oder den Tumor auf molekulare Ebene zu bekämpfen. Dabei spricht das Melanom im Stadium III teilweise noch auf Chemotherapie an, insbesondere in Kombination mit anderen therapeutischen Ansätzen (Krieter et al., 2019) (8).
Die Gesamtüberlebensrate von Patienten mit Melanom im fortgeschrittenen Stadien bleibt dennoch niedrig (Stevenson et al., 2023) (9).
Da bisher somit noch keine vollständig erfolgreiche und effiziente Therapie für hMM existiert, ist es notwendig detaillierter in diesem Bereich zu forschen, wobei das cOMM als natürliches, nicht artifizielles Modell dienen kann.

1.1.1. Klassifikation:

Viele solide Tumoren werden nach dem TNM-Klassifikationssystem unterteilt:
Dabei steht T für „Tumor“ und beschreibt den Durchmesser des Primärtumors sowie das Ausmaß der Ausbreitung in benachbartes Gewebe (Ulzeration). „N“ steht für „Nodes“ also Lymphknoten, die als biologische Filter fungieren, die Flüssigkeit oder Zellen aus Körpergewebe in Lymphkapillaren sammeln und über die Lymphknoten abtransportiert (Sapin, 2007) (10). Somit beschreibt „N“ die Beteiligung regionaler Lymphknoten an der Tumorausbreitung. „M“ steht für „Metastasierung“ und beschreibt, ob eine Ausbreitung über regionale Lymphknoten hinaus in andere Organe erfolgt ist (Rosen and Sapra, 2023) (11).
Basierend auf diesem System kann cOMM nach den WHO-Richtlinien in 4 Stadien eingeteilt werden (Bergman, 2007) (12).

Tabelle 1|TNM-basierte WHO Stadieneinteilung für maligne orale Melanome bei Hunden

T= Primärtumor	N = regionale knoten	M= Fernmetastasen
T1 < 2 cm	**N0** kein Hinweis auf Beteiligung regionaler Lymphknoten	**M0** Keine Hinweise auf Fernmetastasen
T2 2-4 cm	**N1** histologischer bzw. zytologischer Hinweis auf Beteiligung regionaler Lymphknoten	**M1** Hinweis auf Fernmetastasen
T3 > 4 cm	**N2** feste Lymphknotenbeteiligung	

Tabelle 2|Einstufungssystem der WHO für maligne orale Melanome bei Hunden

Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV
T1 N0 M0	T2 N0 M0	T2 N1 M0 oder T3 N0 M0	T beliebig, N beliebig und M1

1.2. Zytokine im Zusammenhang mit Tumoren

Tumoren können der Immunüberwachung durch bestimmte Immun-Escape-Strategien entkommen, zu diesen Strategien gehören die Expression von koinhibitorischen oder kostimulatorischen Molekülen des Interferon (IFN)-Signaltransduktionswegs, sowie die Freisetzung von entzündungsmodulierenden Zytokinen.

Das „Ziel“ einer Tumorzelle ist es, der Immunerkennung durch zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) und natürliche Killerzellen (NK) zu entgehen (Abdurakhmonov, 2016) (13).

Auch das Tumormikromilieu beeinflusst die Sekretion verschiedener Zytokine, die je nach Krebsart und -stadium unterschiedliche Rollen spielen können. Während einige Zytokine das Tumorwachstum hemmen, tragen andere zur chronischen Entzündung bei, die das Tumorwachstum sowohl autokrin als auch parakrin unterstützt und mit ungünstigen Krebsereignissen assoziiert ist. Daher könnten diese Zytokine potenziell als Biomarker zur Krebsdiagnose dienen (Kartikasari et al., 2021) (14).

Zudem sind Zytokine von großer Bedeutung für das Gleichgewicht zwischen Gesundheit und Krankheit und können jede Zelle des Körpers beeinflussen. Sie spielen somit bei zahlreichen pathologischen Zuständen eine wesentliche Rolle. Sie übernehmen außerdem eine Vielzahl zentraler Funktionen bei der Immunabwehr gegen Infektionen und Neoplasien und sind wichtige Mediatoren bei Entzündungserkrankungen (Richter et al., 2018) (15).

Es ist bekannt, dass die Wirkung jedes einzelnen Zytokins eine komplexe Wirkung hervorruft und sich diese Wirkungen auch gegenseitig beeinflussen. Daher ist es sinnvoll, bei der Messung ihrer Konzentration mehrere Zytokine gleichzeitig zu untersuchen, anstatt nur selektiv die Konzentration eines einzelnen Zytokins zu messen. Wichtig dabei ist eine Studie auf eine bestimmte Gruppe zu konzentrieren, da dies dabei hilft, die Variabilität der Daten zu verringern. Es sollte jedoch bedacht werden, dass dadurch die Relevanz der Ergebnisse für andere Gruppen eingeschränkt wird, da nur eine bestimmte Gruppe berücksichtigt wurde (Richter et al., 2018) (15).

Die Rolle der Zytokine während der Tumorentwicklung ist komplex. Einige Zytokine, wie IL-1, IL-6, IL-11 und TGF-β, fördern das Tumorwachstum, während andere, wie IL-12, IL-18 und Interferone, die Ausbreitung und/oder Invasion von zum Beispiel Brustkrebs hemmen. Zudem scheinen hohe zirkulierende Konzentrationen bestimmter Zytokine unterschiedliche Auswirkungen zu haben, einige wie IL-6, IL-18 und IL-10 haben ungünstige Effekte. Es wurde außerdem beobachtet, dass bei der Bildung von Metastasen häufiger IL-10 produziert wurde. Obwohl IL-10 in der Regel eine Anti-Tumor-Wirkung hat, könnte es auch das Tumorwachstum fördern. Es wurde gezeigt, dass es das Tumorzellwachstum direkt stimulieren kann.
Diese gegensätzlichen Effekte könnten durch Wechselwirkungen mit anderen Zytokinen oder Faktoren in der Tumormikroumgebung erklärt werden. Die genauen Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig verstanden (Estrela-Lima et al., 2016) (16).

In einer Studie wurden Zytokine bei Hunden mit verschiedenen neoplastischen Erkrankungen wie Lymphom, Mammakarzinom, histiozytischem Sarkom und Lebertumoren gemessen.

Im Vergleich zu gesunden Kontrollhunden waren etwa die Konzentrationen des CC-Chemokinligands 2 (CCL2:MCP1) bei Hunden mit disseminiertem histiozytischem Sarkom signifikant erhöht.
Ähnliche Erhöhungen wurden auch bei Hunden mit Lymphomen festgestellt. Zusätzlich korrelierten die CCL-2-Konzentrationen mit dem Krankheitsstadium und den krankheitsfreien Intervallen. Dies deutet darauf hin, dass die CCL-2-Messung einen gewissen prognostischen Wert bei Hunden mit Lymphomen haben könnte (Richter et al., 2018) (15).

Es wurde zudem nachgewiesen, dass Hunde mit nicht metastasierten gutartigen Mischtumoren sowie malignen Brusttumoren deutlich seltener hohe IL-10-Konzentrationen im Plasma aufwiesen als Hunde mit Lymphknotenmetastasen. Die Bedeutung von IL-10 als prognostischer Indikator bei caninen Krebserkrankungen wird durch mehrere Studien, einschließlich Untersuchungen an Hunden mit multizentrischem Lymphom, bestätigt. Diese Studien zeigen, dass eine Fehlregulation des entzündungshemmenden Zytokins IL-10 bei Krebs eine wichtige Rolle spielen könnte (Richter et al., 2018) (15).

Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8, IL-17, TNF, und IFN γ fördern zudem das Tumorwachstum durch Induktion der Zellproliferation. IL-6 ist außerdem entscheidend für die Tumorentwicklung, da es mit dem JAK-Rezeptor interagiert und die Aktivierung von STAT-3 bewirkt. STAT-3 aktiviert daraufhin Onkogene wie MCL-1 und reguliert Gene wie Cyclin-D1, die für die Zellproliferation verantwortlich sind (Kartikasari et al., 2021) (14).

1.3. Small interfering RNA (siRNA)

Small interfering RNA (siRNA) hat als potenzielles therapeutisches Mittel Aufmerksamkeit erregt. Einerseits dient es als experimentelles Werkzeug zur Analyse der Genfunktion, andererseits kann siRNA als Möglichkeit in der Gentherapie zur Bekämpfung von verschiedenen Krankheiten dienen. Dies gilt auch für unheilbare Krankheiten wie Krebs, da es gezielt Gene bei verschiedenen genetisch bedingten Krankheiten hemmen kann, indem es die Expression eines Zielgens spezifisch unterdrückt (Dana et al., 2017) (17).

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein biologischer Mechanismus, bei dem doppelsträngige RNA (dsRNA) durch den Abbau komplementärer mRNA die Stilllegung von Genen bewirkt.
Diese Methode ist ein bedeutender Fortschritt in der Behandlung von Krankheiten und verändert grundlegend die Erforschung der Genfunktion (Takeshita and Ochiya, 2006) (18).
Es wurden potenzielle Zielgene für den RNAi-vermittelten Knockdown identifiziert. Diese Genkandidaten stammen aus verschiedenen Gruppen, einschließlich bedeutender Onkogene, anti-apoptotischer Gene und Gene, die das Tumorwachstum fördern, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, die die Angiogenese beeinflussen. Die gezielte Reduktion der Expression dieser Gene mittels RNA-Interferenz zielt darauf ab, deren spezifische Funktionen in Krebsprozessen zu entschlüsseln und potenziell neue therapeutische Ansätze zu entwickeln (Dana et al., 2017) (17).

Ein Beispiel dafür ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der unter hypoxischen Bedingungen induziert wird. Dieser Hypoxie-induzierbarer Faktor-1α (HIF-1α) spielt eine zentrale Rolle bei der Tumorentwicklung sowie Tumorbehandlung.
Es wurde festgestellt, dass eine signifikante Abschwächung des Expressionsniveaus von HIF-1α mit Hilfe von siRNA-Technologie erzielt werden kann. Als Resultat kam es zu einer verstärkten Hypoxie-vermittelten Apoptose von Tumorzellen *in vitro* sowie zur Verlangsamung des weiteren Tumorwachstums. Dies illustriert, wie mit siRNA eine erfolgreiche Wirkung bei der Tumorbehandlung erreicht werden kann (Zhang et al., 2004) (19).

1.4. CD146 als Marker

CD146 dient einerseits als Adhäsionsmolekül und andererseits als zellulärer Oberflächenrezeptor für verschiedene Liganden, einschließlich Wachstumsfaktoren. CD146 spielt über Wechselwirkungen mit seinen Liganden eine wichtige Rolle in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen der Zellen. Bei vielen bösartigen Erkrankungen wird CD146 jedoch übermäßig produziert und spielt besonders bei der Metastasierung über Blut- und Lymphgefäße eine bedeutende Rolle, da es diesen Prozess fördert (Mannion et al., 2023) (20).

Studien ergaben, dass eine Überexpression von CD146 in Krebszellen mit epithelialen Eigenschaften zu Änderungen in der Transkription führt, die für phänotypische Umwandlung in mesenchymale Tumorzellen ausschlaggebend sind (Kocemba-Pilarczyk et al., 2021) (21).

Der Übergang von epithelialen zu mesenchymalen Krebszellen erlaubt es letzteren, sich von den benachbarten epithelialen Zellen zu lösen, in das umgebende Gewebe und schließlich in Blutgefäße einzudringen, was metastatische Prozesse zur Folge hat.
Darüber hinaus können durch EMT stammzellenähnliche Eigenschaften wie Resistenzen erworben werden, wodurch die Überlebensfähigkeit der Tumorzelle erhöht wird und die Widerstandsfähigkeit gegenüber Behandlungen steigt. Somit ist eine erhöhte CD146-Expression mit einer schlechteren Prognose verbunden (Mannion et al., 2023) (20).

Funktionell betrachtet verstärkt die erhöhte CD146-Expression als Zelladhäsionsmolekül (CAM) die Interaktionen zwischen CD146 und seinen Liganden in der extrazellulären Matrix (ECM), wie beispielsweise Laminin 411, Laminin 421, Galectin-1 und Galectin-3. Dies verschiebt das Gleichgewicht zwischen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion.
Gleichzeitig führt die erhöhte Sekretion von prometastatischen Zytokinen dazu, dass die Zellen in die umliegende ECM eindringen, sich über den Blut- oder Lymphkreislauf ausbreiten und Metastasen bilden (Wang et. al., 2020) (22).

CD146 ist bei zahlreichen Krebsarten an der Regulierung der Metastasierung beteiligt. Beim Brustkrebs ist beschrieben, dass es die transendotheliale Migration (TEM) und somit die Interaktion zwischen zirkulierenden Zellen und der Endothelzelle beeinflusst. Einem Prozess, bei dem sowohl die wandernde Zelle als auch die Endothelzelle beteiligt sind., wobei die wandernde Zelle Zugang zum Gefäßsystem erhält (Mannion et. at., 2023) (20).

1.4.1. CD146 in der physiologischen Angiogenese

Angiogenese ist ein lebenswichtiger physiologischer Prozess, der essenziell für die Versorgung sämtlicher Körperteile mit Blut und Nährstoffen ist. Dieser Prozess ist somit nicht nur pathologisch für Tumoren von entscheidender Bedeutung.

CD146 spielt eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung des Gefäßsystems. Die Expression ist gewebeselektiv und wird räumlich und zeitlich reguliert (Joshkon et al., 2020) (23).

Studien zur Funktion von CD146 in der Organentwicklung haben seine wesentliche Rolle bei der Entwicklung und Gefäßbildung in Organen wie Nieren, Leber und Netzhaut aufgezeigt. Außerdem ist CD146 auch in den Beginn der Pubertät und dem Einsetzen des Menstruationszyklus bei Frauen involviert, indem die Expression von CD146 auf den Endothelzellen des Endometriums erhöht wird (Joshkon et al., 2020) (23).

1.4.2. CD146 im Zusammenhang mit Zytokinen

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)-A fungiert als entscheidender Faktor bei der Angiogenese, indem es die Bildung von Leitzellen (Tip Zellen) an den Spitzen angiogener Sprossen fördert. Zudem wird VEGF-A von einer Vielzahl von Zelltypen, wie etwa Endothelzellen, Muskelzellen und Fibroblasten, sezerniert. Sowie von etwa 60 % aller Tumoren. Die Sekretion von VEGF-A wird durch Ischämie und entzündliche Reize induziert (Wang et al., 2020) (22).

Es wurde festgestellt, dass CD146 mit VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR2) auf Endothelzellen interagiert und dabei als Co-Rezeptor fungiert. Diese Interaktion findet an der extrazellulären Proteindomäne von CD146 statt und ist unabhängig von VEGF-A.
Wenn CD146 mit Hilfe von siRNA gehemmt wird, wird die durch VEGF-A induzierte Phosphorylierung von VEGFR2 in Endothelzellen unterdrückt. Dies zeigt, dass die Interaktion von CD146 mit VEGFR2 entscheidend für die funktionelle VEGFR2-Signalgebung ist. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Zusammenhang zwischen CD146 und VEGF-A essenziell für die VEGFR2-vermittelte Signalübertragung in Endothelzellen ist (Wang et al., 2020) (22).

Zusätzlich ist VEGF-C ein wichtiges Zytokin in der Lymphangiogenese. Durch Bindung an seinen Rezeptor aktiviert VEGF-C Signalwege, die entscheidend für die Proliferation, Migration und das Wachstum lymphatischer Endothelzellen sind.

Studien haben gezeigt, dass sowohl der Verlust als auch die Überexpression von VEGF-C die Entwicklung der Lymphgefäße signifikant beeinflussen können (Wang et al., 2020) (22).

Es wurde festgestellt, dass VEGF-C auch an CD146 bindet. Diese Bindung aktiviert eine Phosphorylierung, wodurch die Sprossung der lymphatischen Endothelzellen gefördert wird. Dieser Mechanismus hat eine direkte Verbindung zur Tumormetastasierung. Eine Fehlsteuerung der durch VEGF-C ausgelösten Signalwege kann zur Ausbreitung von Tumoren über die Lymphgefäße führen, was besonders bei Krebsarten wie Brustkrebs, Lungenkrebs und Melanomen eine große klinische Herausforderung darstellt.
Daher könnten therapeutische Ansätze, die auf die Hemmung von CD146 abzielen, vielversprechende Strategien zur Verhinderung der lymphatischen Metastasierung darstellen.
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Therapie, die auf CD146 abzielt, eine vielversprechende Methode sein könnte, um die Ausbreitung von Metastasen zu verhindern, welche die Hauptursache für die meisten krebsbedingten Todesfälle darstellen (Wang et al., 2020) (22).

1.5. Ziel der Bachelorarbeit

In dieser Arbeit stellen wir die Hypothese auf, dass eine Reduktion der CD146 Expression im cOMM eine tumortherapeutische Wirkung aufweist. Diese kann in weiterer Folge in Kombination mit herkömmlichen Therapiemöglichkeiten wie Strahlentherapie zur Bekämpfung von cOMM genutzt werden. Unser Ziel ist es, vor allem radioresistente Tumorzellen durch die Expressionshemmung von CD146 für die Strahlentherapie empfindlicher zu machen.

In unseren Experimenten setzten wir siRNA ein, um zu untersuchen, ob die Hemmung der Expression von CD146 einen positiven Einfluss auf die Krebsbehandlung haben könnte, indem sie das Tumorwachstum und die Krebszellproliferation signifikant senkt.

Es wurden in den Experimenten canine Melanomzellen aus Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen mit unterschiedlichen CD146-Expressionsniveaus und Radiosensitivitäten untersucht.

Die Effektivität der CD146-Hemmung in Kombination mit Bestrahlung wurde durch die Analyse des Proliferationsverhaltens der Tumorzellen sowie auf Proteinebene dargestellt. Zusätzlich wurden die Zellüberstände der behandelten Zellen auf die Sekretion von Zytokinen analysiert.

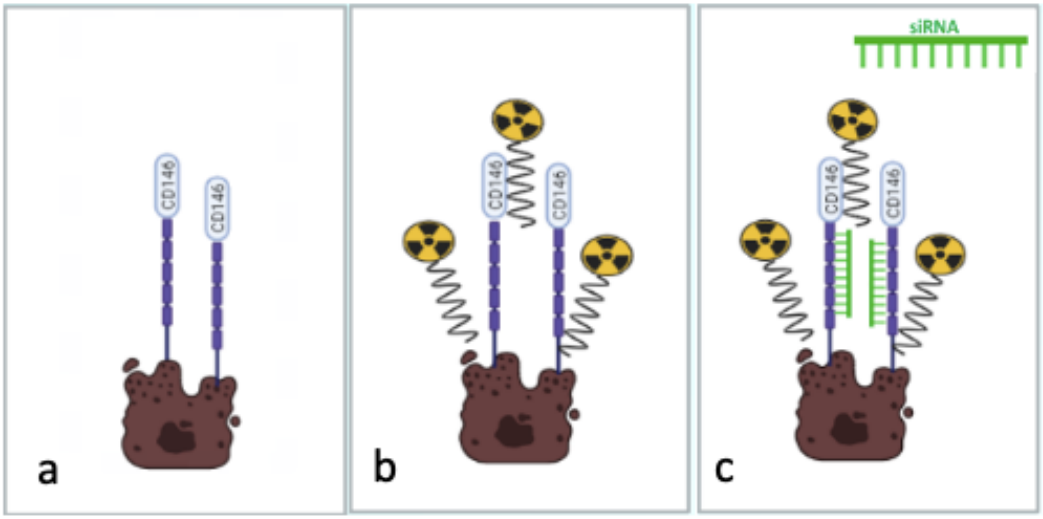


Abbildung 1| |Aufbau der Versuchsanordnung (Abbildung mit BioRander erstellt)

2. Materialien und Methoden

2.1. Tumorpatienten und Zellkultur

Für diese Arbeit haben wir insgesamt drei cOMM-Zelllinien untersucht. Details zu den Zelllinien sind in Tabelle 3 zu finden.
Diese wurden bis zur Verwendung bei -150 °C an der Abteilung für Innere Medizin Kleintiere der Veterinärmedizinischen Universität Wien gelagert. Eine weitere Zelllinie (Shadow, Lungenmetastase eines cOMMs) wurde als Referenzprobe verwendet, die freundlicherweise von Dr. J.F.Modiano zur Verfügung gestellt wurde. Die beiden Zelllinien aus Primärtumoren (cRGO1 und cRGO4) sowie die Referenzzellline sind bestrahlungssensitiv, die Zelllinie aus der Lymphknotenmetastase (cRGO1_2) zeigt eine verminderte Reaktion auf Bestrahlung, wie in bislang unveröffentlichten Vorexperimenten gezeigt werden konnte.

Die Zelllinien waren in Kryomedium bestehend aus DMEM, 30 % FCS (beides von Life Technologies Carlsbad, CA, USA) und 10 % DMSO (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) mit einer Dichte von 2 bis 4 × 10^6 Zellen/ml in NuncTM Cryo TubeTM Vials (Thermo Scientific, MA, USA) eingefroren, wobei der Einfriervorgang mit einer CoolCell® (BioCision, Mill Valley, CA, USA) durchgeführt wurde, um eine schonende Abkühlung der Zellen von -1 °C pro Minute auf -80 °C zu gewährleisten. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff zur Langzeitlagerung bei -150 °C überführt.

Zur Kultivierung wurden die Zelllinien bei 37 °C aufgetaut und in vorgewärmtem komplettem Medium (CM) suspendiert, das aus Dulbeccos Modified Eagle's Medium + GlutaMAX™ (DMEM, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) bestand und 10 % fötales Kälberserum (FCS, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) enthielt. Die Tumorzellen wurden in einem befeuchteten Inkubator bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert.

Tabelle 3|Patienten und Zelllinien

Code	Rasse	Alter (Jahre)	Geschlecht	Tumor-typ	Diagnose	Gewebe-material	Lokalisation
cRCO1	Mischling	11	w	Primär-tumor	Amelanotisches cOMM	Feinnadel-aspirationsbiopsie	hinterer harter Gaumen
cRGO1_2				LK-Metastase		Lymphknoten-gewebe 4cm Durchmesser	linker Unterkiefer-LK
cRGO4	Golden Retriever	9	m	Primär-tumor	cOMM	Tumorgewebe	rechter Unterkiefer

LK= Lymphknoten

Sämtliche Arbeitsschritte mit den verschiedenen Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen in einer biologischen Sicherheitswerkbank (LaboGene, Allerød, DK) durchgeführt. Diese Umgebung gewährleistet eine kontrollierte, sterile Atmosphäre und minimiert so das Risiko von Kontaminationen, was für die Genauigkeit und Zuverlässigkeit der Ergebnisse entscheidend ist.

2.2. Zweidimensionale Zellkultur

Für die 2D-Kultivierung wurden die Zellen in einer T75-Kulturflasche (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) unter Verwendung von CM kultiviert. Es erfolgte die Subkultivierung der Zellen und/oder der Wechsel des Kulturmediums alle drei bis vier Tage in einem Verhältnis zwischen 1:3 und 1:15, abhängig von der Proliferation der einzelnen Zelllinien.

Um die Zellen zu splitten, wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellschicht mit Dulbeccos Phosphatpuffer-Salzlösung (DPBS, Life Technologies, USA) gespült. Die Zellen wurden durch Zugabe von Trypsin (0,05 % Trypsin-EDTA (1×), Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) anschließend abgelöst.
Um sicherzustellen, dass sich alle Zellen abgelöst hatten, wurden sie unter einem invertierten Mikroskop (Leica DMi1, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) beobachtet.

Nachdem die Zellen vollständig abgelöst waren, wurden die Zellen in CM durch vorsichtiges Pipettieren resuspendiert. Entsprechend dem Teilungsverhältnis wurde die entsprechende Menge an Zellsuspension in eine neue T75-Flasche überführt und mit CM auf ein Endvolumen von 20 ml ergänzt. Für die einzelnen Experimente erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mit einem NucleoCounter®NC-250 unter Verwendung von „Lösung 18“ (ChemoMetec, Lillerod, Dänemark), die zur Erkennung von lebenden Zellen den Farbstoff Acridinorange und von toten Zellen 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) enthielt.

2.3. Reverse si-RNA-Transfektion

Für die Transfektion wurde pro Zellline eine Suspension von $2x10^5$ Zellen/ml in CM hergestellt. Zur Transfektion wurden eine Silencer®Select siRNA für CD146 und eine unspezifische Kontroll-siRNA (Ambion by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) verwendet.

Anschließend wurde für die Herstellung des Transfektionskomplexes die siRNA (Stock Konzentration 100 pmol/µl) 1:5 mit OptiMEM® Medium (LifeTechnologies, Carlsbad, CA USA) verdünnt und mit Lipofectamine® RNAiMAX (LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA) direkt in den Wells der jeweiligen Platten in entsprechendem Volumen zusammengefügt und zur Komplexbildung für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach erfolgter Inkubation wurden 2,5 ml der vorbereiteten Zellsuspension pro 6-Well und 100 µl pro 96-Well dem Komplex zugefügt und 24h bis zur Bestrahlung bei 37 °C, 5 % CO_2 und 98 % Feuchtigkeit inkubiert.

2.4. Bestrahlung und Zellproliferationstest

Zur Bestrahlung mit 6 Gray in einem Primus MiEenergy Linearbeschleuniger (Siemens, Österreich) mussten die Wells vollständig mit CM befüllt sein. Nach der Bestrahlung erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem CM (3 ml pro 6-well und 100 µl pro 96-well).
Eine Stunde nach der Bestrahlung erfolgte die erste Messung (Tag 0) des Proliferations-Assays. Weitere Messungen erfolgten an den Tagen 2, 4 und 6.

Der CellTiter 96® AQueous One Solution Zellproliferations Assay (Promega, USA) ist eine kolorimetrische Methode zur Messung proliferierenden Zellen, wobei der gemessene Absorptionswert des gebildeten Formazanproduktes bei 490 nm in direkter Proportionalität zur Anzahl der lebenden Zellen steht.

Kurz zusammengefasst wurden 20 µl/well des auf Raumtemperatur equilibrierten Reagenz zu den Zellen pipettiert. Die Platten wurden eine Stunde bei 37 °C in einer befeuchteten Kammer mit 5 % CO2 inkubiert und anschließend wurde die Absorption auf dem GloMax®Explorer-Plattenlesegerät (Promega, USA) mit aufgesetztem Deckel gemessen. Zur Korrektur der Hintergrund-Absorption wurde Zellkulturmedium ohne Zellen gemessen.

2.5. Western Blot

Mithilfe des Western Blots können extrahierte Proteine aus einer komplexen Mischung (Zelllysate) gelelektrophoretisch aufgetrennt und identifiziert werden.

Die Proteinlysate wurden 24 h nach der Bestrahlung zur Visualisierung der Herunterregulierung von CD146 vorbereitet.
Dazu wurden die Zellen direkt in den Wells mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit einem Mix aus Lysepuffer (0.14 M NaCl, 0.2 M Triethanolamine, 0.5 % NP-40, and 0.2 % Natriumdeoxycholate, pH 7.4) und Proteaseinhibitor-Mix (PIM) (alle Produkte von MERCK, Österreich) im Verhältnis von 1:1000 versetzt und mit einen Zellschaber in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesammelt. Für eine vollständige Lyse der Zellen wurden 3 Gefrier-/Tauzyklen mit flüssigem Stickstoff durchgeführt. Die Zelltrümmer wurden bei 9000 x g und 4 °C für 10 Minuten in einer Kühlzentrifuge (Centrifuge 5424 R, Eppendorf, Hamburg, DE) zentrifugiert und der Überstand wurde in frische Eppendorf Gefäße pipettiert. Diese wurden bis zur Messung der Proteinkonzentration auf -80 °C eingefroren.
Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proben auf Eis aufgetaut und die Menge an löslichen Proteinen wurde mittels Bradford-Analyse (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) anhand einer BSA (bovines Serum Albumin) Standardreihe quantifiziert.

Zur Auftrennung der Proteine wurden Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gele (SDS-PAGE) (10 %) vorbereitet und die Proteine mit einem reduzierenden Ladungspuffer (New England Biolabs, Frankfurt,BRD) vorbehandelt.
Die so vorbereiteten Proteinlysate (10 µg pro Probe) wurden anfangs mit geringer Spannung von 80 Volt für etwa 20 Minuten und anschließend mit 150 Volt vollständig aufgetrennt.
Der Transfer der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF) Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm (Thermo Scientific, MA, USA) erfolgte gekühlt bei 100 Volt für zwei Stunden.

Anschließend wurden die Membranen mit 1xPBS + 3 % fettfreier Trockenmilch (Merck, Darmstadt, DE) + 0,05 % Tween 20 (BioRad, USA) über Nacht bei 4 °C geblockt, um unspezifische Bindungen der im nächsten Schritt verwendeten Antikörper zu verhindern.

Nachfolgend wurde mit dem primären Kaninchen-Anti-CD146-Antikörper (Abcam, Cambridge,UK) im Verhältnis 1:500 und danach mit dem primären Maus-Anti-ß-Actin-Antikörper (Sigma/Merck, Darmstadt, DE), im Verhältnis 1:10.000 in Blocking-Puffer über Nacht inkubiert.
Die beiden sekundären Antikörper anti-Kaninchen-HRP (Cell Signaling, MA, USA) und anti-Maus-HRP (Cell Signaling, MA, USA) wurden beide 1:5000 in Blocking Puffer verdünnt und auf den Membranen für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
Im Anschluss daran wurden die Proteine mit Hilfe des SuperSignal West Femto Detection Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) auf einen ChemiDocMP Imaging System (BioRad, USA) detektiert.

2.6. Multiplex Sekretom-Analyse

Die Sekretom-Analyse aus Zellkulturüberständen erfolgte mit dem ProcartaPlex™ Canine Cytokine Chemokine Growth Factor Panel 1, 11-Plex (Invitrogen by ThermoFisherScientific, Österreich) nach den Angaben des Herstellers. Basierend auf einer Technologie, die magnetische Beads unterschiedlicher Größe verwendet, können mit diesem Assay folgende Analyten untersucht werden: IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10, IL-12p40, IL-2, IL-6, IL-8, MCP-1, SCF, VEGF-A und ß-NGF.

Die Zellkultur-überstände für diesen Assay wurden an den Tagen 0, 4 und 6 gesammelt und bei -80 °C bis zur Analyse gelagert. Zur Untersuchung der Zellkulturüberstände wurden diese vor dem Einfrieren bei 10 000 x g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, um Zellen und Zellbestandteile zu entfernen. Aus kostentechnischen Gründen wurde diese Analyse nicht mit der Referenzzelllinie durchgeführt.

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und die benötigten Reagenzien wurden nach Angaben des Herstellers vorbereitet. Der lyophilisierte Antigenstandard wurde in Zellkulturmedium rekonstituiert und eine 4-fach serielle Verdünnungsreihe für 8 Standardpunkte hergestellt.
Dafür wurden in Std1 200 µL Standardlösung pipettiert und dann jeweils 150 µL CM in Std2 bis Std7 vorgelegt. Anschließend wurden 50 µL von Std1 in Std2 übertragen, dies wurde bis Std7 durchgeführt. Das 8. Röhrchen diente als Leerprobe, in das 200 µl des Zellkulturmediums pipettiert wurden.

Im ersten Schritt des Assays wurden 50 µl der gut resuspendierten magnetischen Beads pro Well der 96-Well-Flachbodenplatte pipettiert und in einem magnetischen Plattenwascher für 2 Minuten inkubiert, um die Beads am Boden der Platte zu sammeln. Alle Waschschritte wurden in diesem Plattenwascher durchgeführt.

Im nächsten Schritt wurden 50 µL der vorbereiteten Standards oder der Proben in das jeweils vorgesehene Well pipettiert und die Platte mit einer Folie versiegelt, mit Mikroplattendeckel bedeckt, für 30 Minuten auf einer rotierenden Plattform geschüttelt und anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Vor dem nächsten Waschritt wurde die Platte nochmal bei Raumtemperatur für 30 Minuten auf einer Schüttelplatte inkubiert und anschließend wurden jeweils 25 µL des Detektionsantikörpers zu jedem Well hinzugefügt. Dann wurde die Platte weiter 30 Minuten mit Folie versiegelt auf einem Plattenschüttler bei 500 rpm inkubiert.

Nachfolgend zweier Waschschritte wurden 50 µL Streptavidin-PE zu jedem Well hinzugefügt und es wurde abermals für 30 Minuten auf einen Plattenschüttler bei Raumtemperatur und 500 rpm inkubiert.

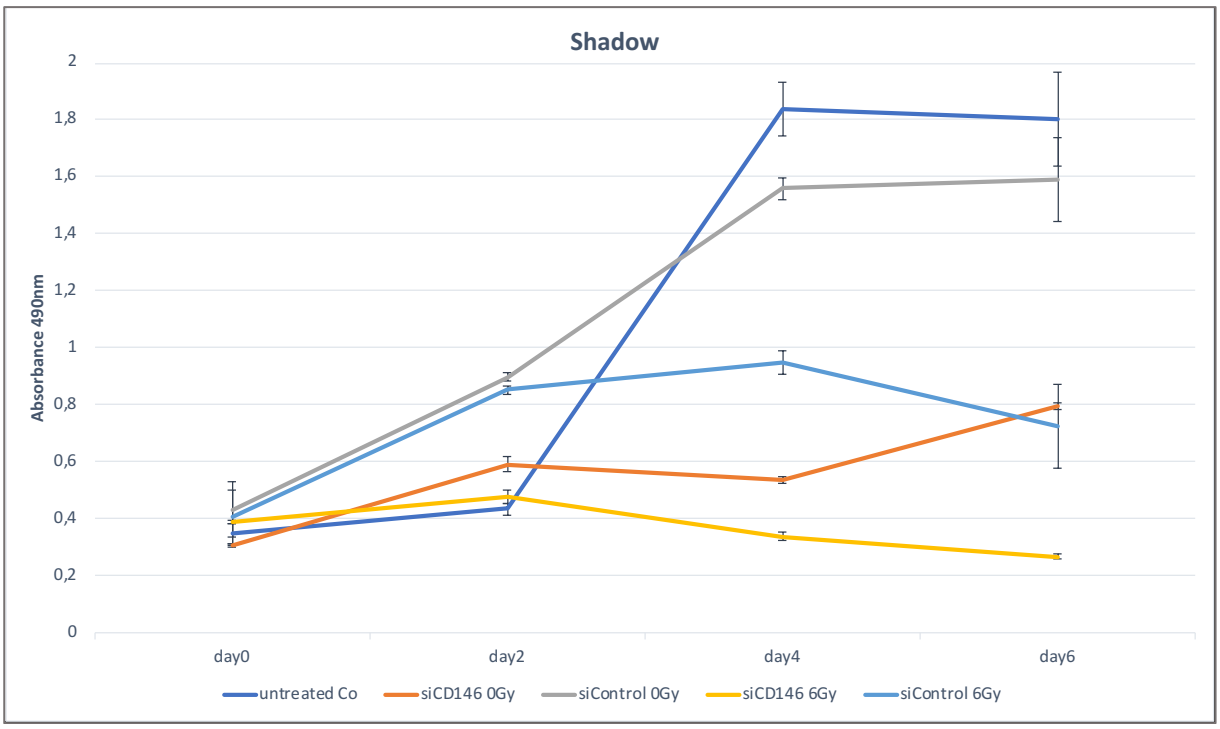
Nach abschließenden zwei Waschschritten wurden 120 µL Reading-Puffer in jedes Well pipettiert und die Platte wurde für 5 Minuten auf einem Plattenschüttler bei 500 rpm inkubiert, bevor die Plattenversiegelung entfernt wurde und die Messung mithilfe des Luminex Bioplex 200 (BioRad, USA) Gerätes stattfand.

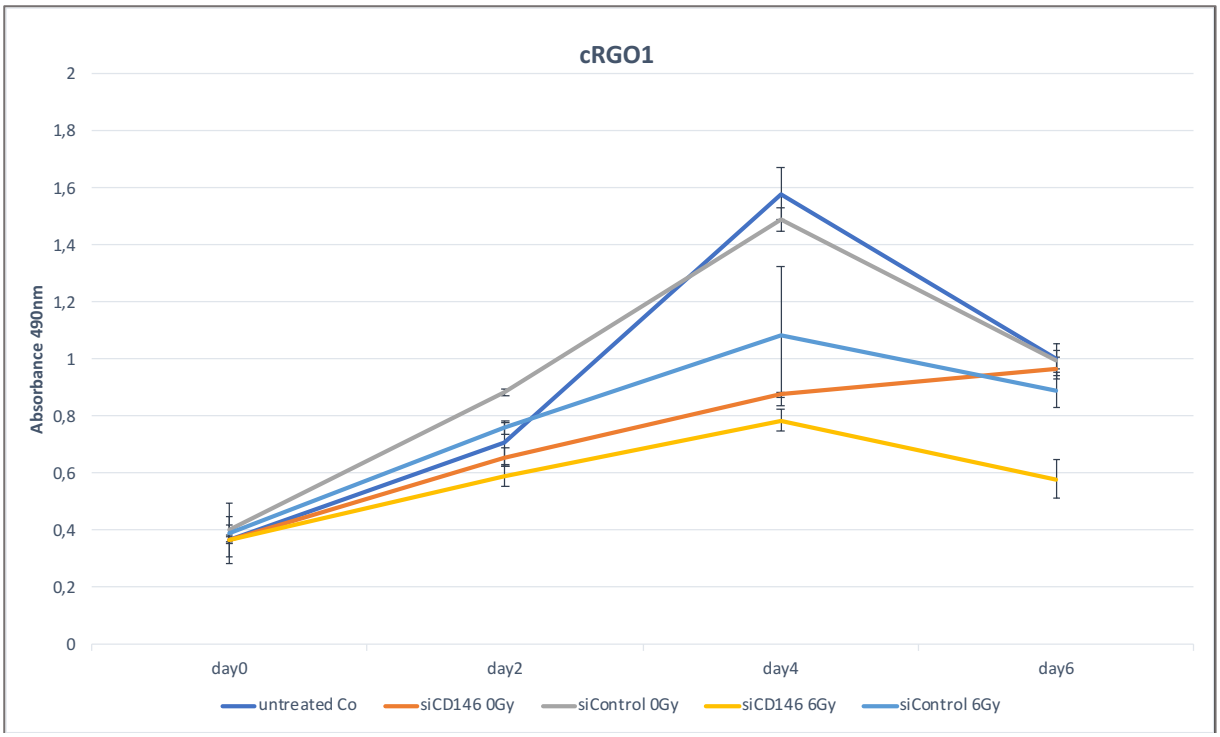
3. Ergebnisse

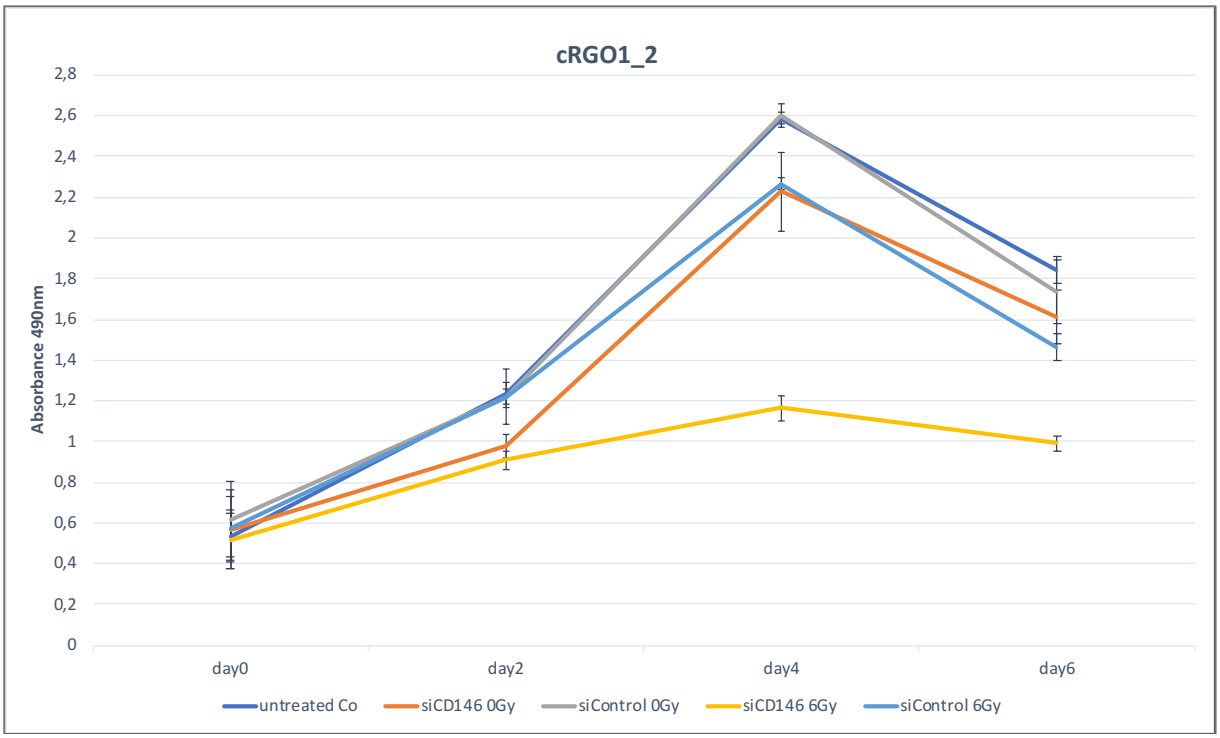
3.1. Proliferationsverhalten der Melanomzellen nach Einzel- und Kombinationstherapie mit Bestrahlung und Unterdrückung der CD146 Expression

3.1.1. Auswertung

Die Zelllinien wurden hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens an den Tagen 0, 2, 4 und 6 nach Einzeltherapie oder Kombinationstherapie untersucht. Die Absorption wurde bei 490 nm gemessen, da sie direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen ist und somit die Zellproliferation widerspiegelt.




cRGO1
Absorbance 490nm
2
1,8
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
day0
day2
day4
day6
untreated Co
siCD146 0Gy
siControl 0Gy
siCD146 6Gy
siControl 6Gy


cRGO1_2
Absorbance 490nm
2,8
2,6
2,4
2,2
2
1,8
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
day0
day2
day4
day6
untreated Co
siCD146 0Gy
siControl 0Gy
siCD146 6Gy
siControl 6Gy

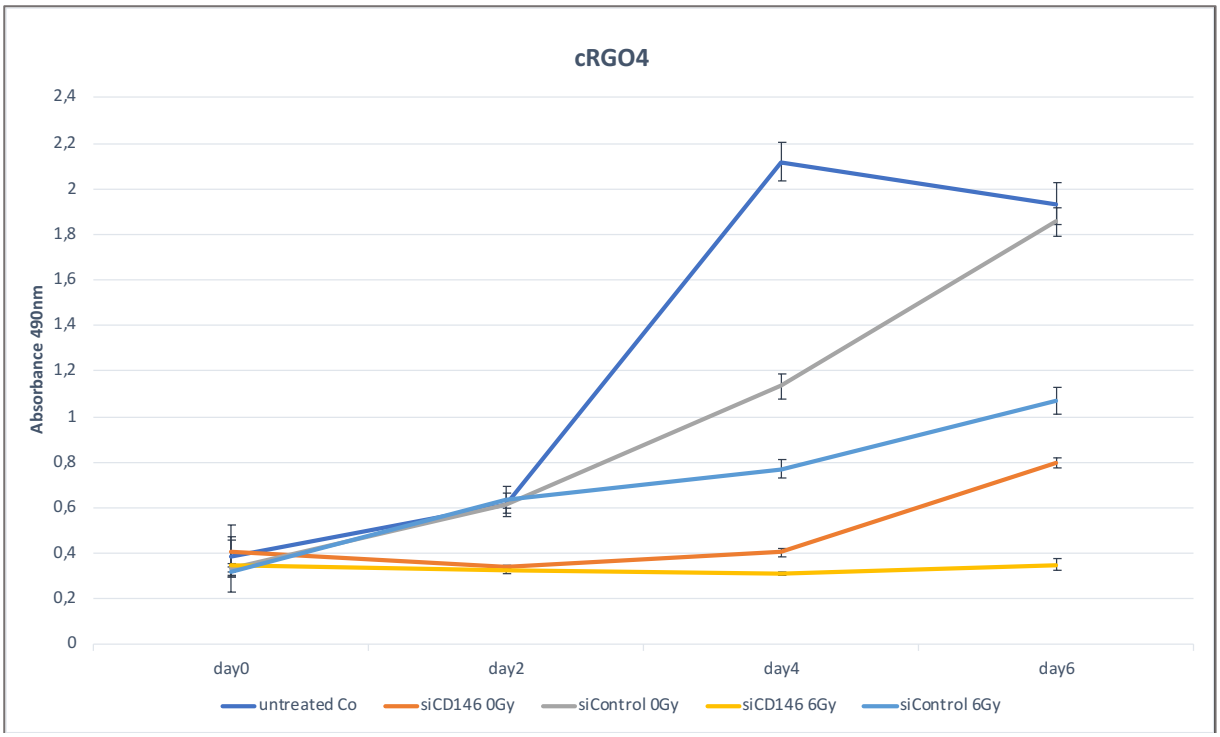


Abbildung 2|Zellproliferation der vier Zelllinien nach unterschiedlichen Behandlungen

Die Zelllinie Shadow zeigte bei der Kombinationstherapie eine deutliche Hemmung der Zellproliferation. Besonders im Vergleich zur unbehandelten Kontrollprobe wies die Kombinationstherapie eine signifikant höhere Hemmung auf.
Die alleinige Bestrahlung mit 6 Gy zeigt eine moderate Reduktion der Zellproliferation, die vor allem am Tag 4 beobachtet wurde.

Die aus einem Primärtumor explantierten Zellen (cRGO1) sprachen deutlich auf die Herabregulierung von CD146 in Kombination mit der Bestrahlung mit 6 Gray (siCD146 6 Gy) an. Dies zeigte sich in der reduzierten Proliferation der Zellen im Vergleich zur siControl 0 Gy-Probe.

Die Metastasen-Zelllinie cRGO1_2 wurde durch die Kombinationstherapie in ihrer Proliferation stark beeinträchtigt, was sich an den verringerten Absorptionswerten der Zelllinie von Tag 2 bis 6 deutlich zeigte.

Bei der Zelllinie cRGO4 wurde ebenfalls beobachtet, dass die Kombination aus siCD146-Behandlung und Bestrahlung zu einer verringerten Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle führte.
Der Einfluss der Kombinationstherapie war besonders ausgeprägt zwischen Tag 2 und Tag 4, wie die niedrigeren Absorptionswerte deutlich machten.

Allgemein reagieren alle Zelllinien gut auf die Einzeltherapien mit der Ausnahme von cRGO1_2, wo durch eine Einzelbehandlung keine signifikante Reduktion der Zellproliferation erzielt werden konnte. Die Kombinationstherapie zeigte hingegen bei allen untersuchten Zelllinien eine signifikante Inhibierung des Zellwachstums an den Tagen 4 und/oder 6.

Die verringerten Absorptionswerte der COMM-Zelllinien in den unbehandelten Proben an späteren Tagen kann auf eine starke Proliferation der Zelllinien zurückgeführt werden, die zu einer Übersäuerung des Mediums und anschließendem Zelltod führt.

3.1.2. Statistische Auswertung

Die Daten wurden als Mittelwert ± SD dargestellt (n=3). Die statistische Analyse erfolgte mittels T-Test für Tag 4 (Tabelle 4) sowie Tag 6 (Tabelle 5), wobei ein P-Wert <0,001 als statistisch signifikant betrachtet wurde.

Bei der Analyse der Daten von Shadow mittels T-Test wurde ein signifikanter Unterschied zwischen allen erhaltenen P-Werten festgestellt. Der Vergleich der Gruppen siCo 0Gy und siCo 6Gy bei der Zelllinie cRGO1 (an Tag 4 sowie Tag 6) und cRGO1_2 (an Tag 6) ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied, was darauf hinweist, dass die Bestrahlung allein keinen großen Einfluss auf die Zellproliferation hatte. Vor allem bei der Zelllinie cRGO1_2, die eine Metastase der Zelllinie cRGO1 darstellt, wurde Radioresistenz festgestellt. Interessanterweise zeigte sich bei der Kombination von 6 Gy Bestrahlung und der Herabregulierung von CD146 in allen Zelllinien ein signifikanter Unterschied, was unsere Hypothese unterstützt.

Die in Orange markierten P-Werte in Tabelle 4 und 5 sind statistisch nicht signifikant (P > 0,001), während die unmarkierten Werte als signifikant gelten (P < 0,001).

Tabelle 4|T-Tests Ergebnisse der vier Zelllinien für Tag 4

T-Test (Tag 4)	Shadow	cRGO1	cRGO1_2	cRGO4
siCo 0GY - siCo 6GY	0,00003654	0,02328158	0,00035744	0,00041617
siCo 0Gy - siCD146 6GY	0,00000043	0,00001155	0,00000349	0,00000693
siCo 6GY - siCD146 6GY	0,00001641	0,05419770	0,00000423	0,00002651

Tabelle 5|T-Tests Ergebnisse der vier Zelllinien für Tag 6

T-Test (Tag 6)	Shadow	cRGO1	cRGO1_2	cRGO4
siCo 0GY - siCo 6GY	0,00030730	0,05203889	0,02649909	0,00005300
siCo 0Gy - siCD146 6GY	0,00004923	0,00068225	0,00068230	0,00000171
siCo 6GY - siCD146 6GY	0,00003349	0,00235910	0,00028304	0,00001955

3.2. Western Blot

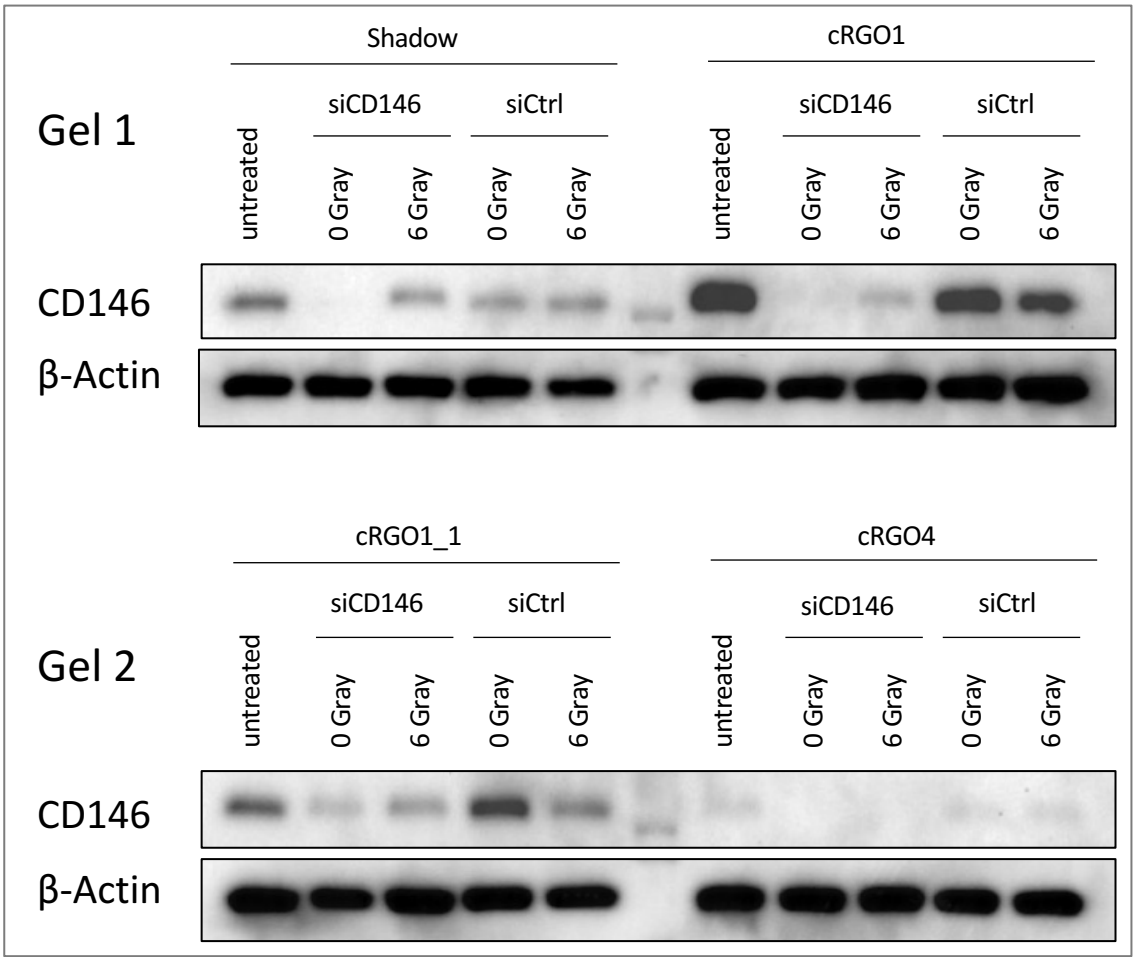


Abbildung 3|Western Blot-Ergebnisse für die vier Zelllinien

In unseren Experimenten wurde β-Actin als Ladekontrolle im Western Blot verwendet. Dies ermöglichte die Sicherstellung einer gleichmäßigen Proteinbeladung und kann zur Normalisierung der Signalintensitäten dienen.

Mittels Western Blot wurde untersucht, ob die Behandlung mit siRNA eine Wirkung auf die CD146-Produktion hatte. Die Ergebnisse zeigten, dass bei allen Zelllinien eine verringerte Expression von CD146 in den siCD146-behandelten Proben nachgewiesen werden konnte. Dies war durch die dünneren Banden bei den siCD146-Proben im Vergleich zu den siCtrl-Proben zu beobachten.

Bei den Proben der Zelllinien Shadow, cRGO1 und cRGO1_2 war eine höhere Proteinmenge in den siCD146-behandelten Proben bei 6 Gy im Vergleich zu 0 Gy zu sehen. Interessanterweise war aber bei den Kontrollproben, vor allem bei den Proben der Zelllinien cRGO1 und cRGO1_2, bei 0 Gy die Bandstärke höher als bei 6 Gy.

Bei den Proben der Zelllinie cRGO4 waren kaum sichtbare Banden zu erkennen, was eine geringe Basisexpression von CD146 darstellt, die durch die Transfektion von siCD146 vollständig inhibiert werden konnte.

3.3. Multiplex Sekretom-Analyse

3.3.1. Auswertung

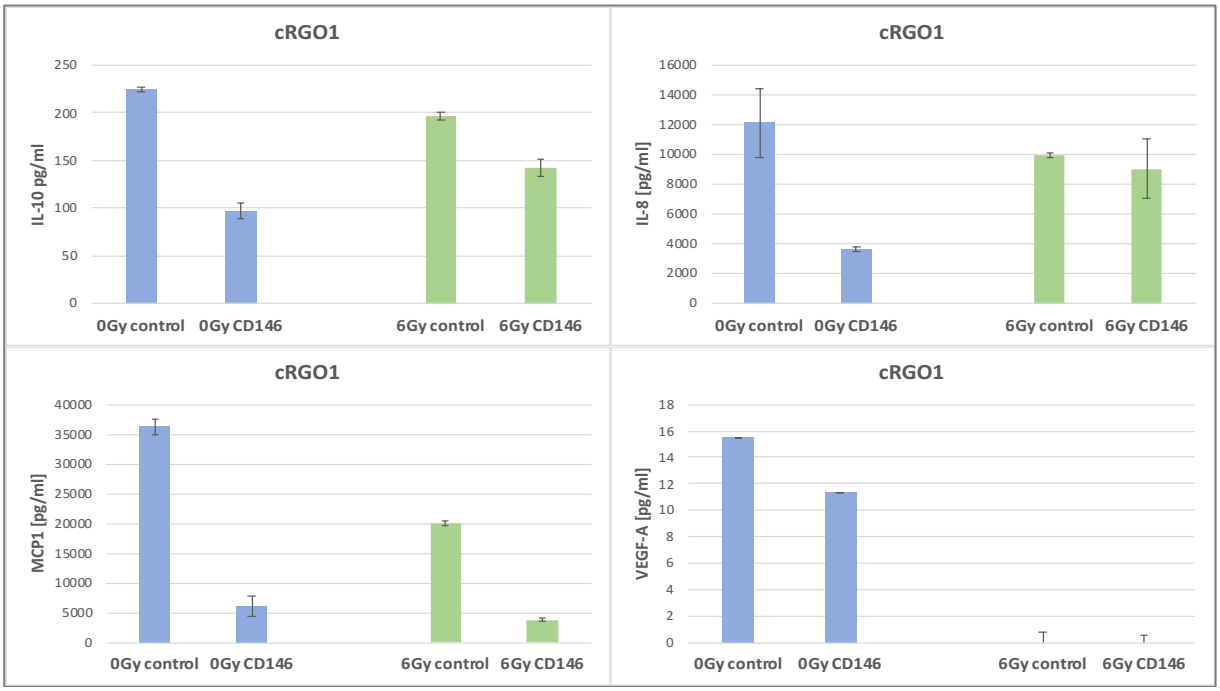


Abbildung 4|Zytokinausschüttung der cRGO1-Zelllinie

Bei der Auswertung der vier Zytokinkonzentrationen in der cRGO1-Zelllinie wurde bei allen Analyten festgestellt, dass die Zytokinkonzentrationen durch die CD146-Behandlung reduziert waren. Dies wurde beim Vergleich von 0 Gy CD146 und der 0 Gy Kontrolle deutlich.

Bei der 0 Gy Kontrolle, die die Basisexpression der Zellen darstellen sollte, wurde beobachtet, dass die Bestrahlung zu einer verringerten Expression von IL-10, IL-8 und MCP1 führte und dass dieser Effekt durch die Kombinationstherapie nochmals verstärkt wurde.
Bei VEGF-A war die Expression nach alleiniger Bestrahlung sowie bei der Kombination von Bestrahlung und CD146-Hemmung so gering, dass sie nicht mehr detektierbar war.
Interessanterweise zeigte sich eine erhöhte Expression von IL-10 sowie IL-8 bei der bestrahlten Probe, wenn man die CD146-behandelten Proben bestrahlt und unbestrahlt miteinander verglich. Dies könnte durch die im Western Blot gezeigte leicht erhöhte Expression von CD146 nach der Bestrahlung erklärt werden.
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Behandlung mit CD146-siRNA in Kombination mit Bestrahlung die Zytokinkonzentrationen von IL-8, IL-10, MCP1 und VEGF-A in der cRGO1-Zelllinie reduzierte.

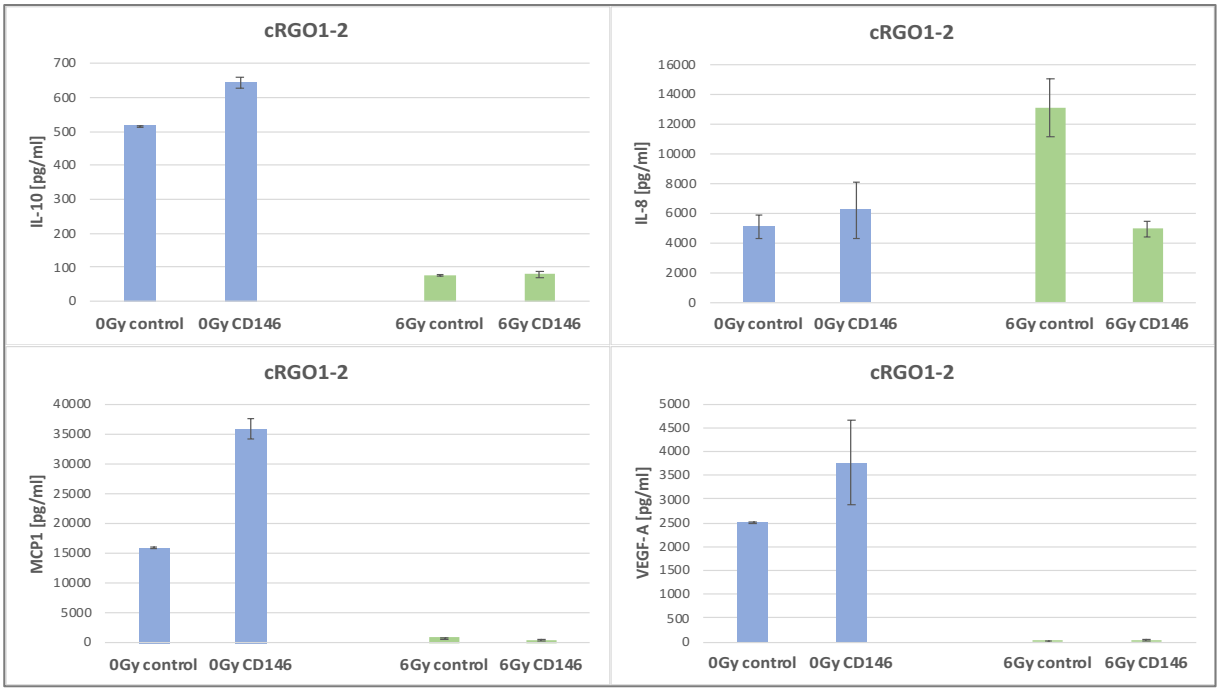


Abbildung 5|Zytokinausschüttung der cRGO1_2-Zelllinie

Bei der Zelllinie cRGO1_2 wurde bei den unbestrahlten Proben beim Vergleich der Kontrollprobe mit der CD146-siRNA-behandelten Probe festgestellt, dass die Zytokinkonzentration von IL-10, IL-8, MCP1 und VEGF-A zunahm.

Dies stand im Gegensatz zu den Ergebnissen des Primärtumors cRGO1, bei dem die Menge an Zytokinkonzentrationenen nach alleiniger CD146-Inhibierung deutlich abnahm.
Beim Vergleich der 6 Gy-Kontrolle mit der 6 Gy CD146- Probe wurde eine deutliche Abnahme der Zytokinkonzentration von IL-8 beobachtet, während bei den restlichen Zytokinen IL-10, MCP1 und VEGF-A kein Unterschied zwischen der Kombinationstherapie und der alleinigen Bestrahlung bemerkt wurde.
Bei der Kombinationstherapie zeigte sich für drei der vier Zytokine eine Reduktion im Vergleich zum Basisizustand (0 Gy Kontrolle). Diese Zytokine sind IL-8, MCP1 und VEGF-A, wobei bei IL-8 fast kein Unterschied sichtbar war.
Als die bestrahlten Proben mit der Kombinationstherapie verglichen wurden, zeigte sich für IL-8 ein unterschiedliches Verhalten im Vergleich zu den anderen drei Zytokinen. Die IL-8-Konzentration erfuhr bei der Kombinationstherapie fast keine Änderung.

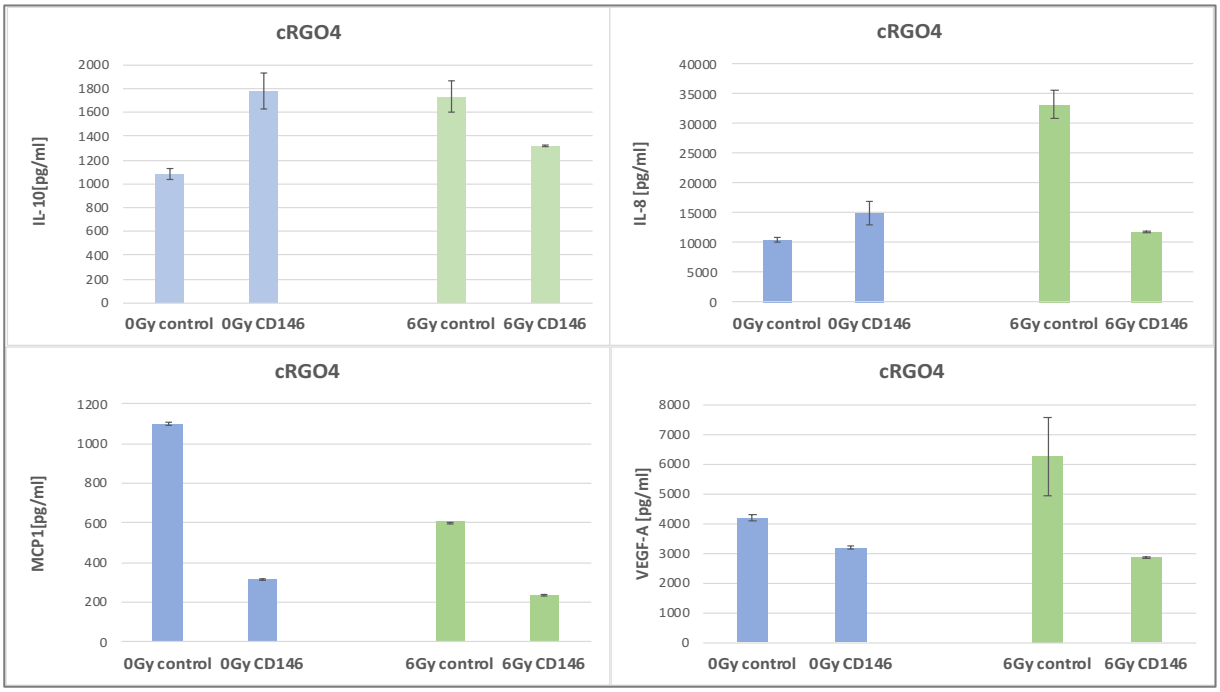


Abbildung 6|Zytokinausschüttung der cRGO4-Zelllinie

Bei den Ergebnissen der Zelllinie cRGO4 zeigten die CD146-inhibierten und unbestrahlten Proben im Vergleich zur Kombinationstherapie für die Analyten IL-8 und IL-10 eine Erhöhung der Konzentrationen. Es wurde jedoch eine Erhöhung der Zytokinkonzentrationen nach Bestrahlung und eine erneute Reduktion dieser bei Kombinationstherapie festgestellt. Bei IL-8 war dieser Unterschied zudem stärker sichtbar.

Der gleiche Effekt der Kombinationstherapie wurde auch für das Zytokin VEGF-A beobachtet. Jedoch kam es bei diesem Zytokin bei alleiniger CD146-Hemmung zur Reduktion von dessen Konzentration.

MCP1 zeigt eine Reduktion der Konzentration nach der Bestrahlung und eine signifikante Reduktion nach der Kombinationstherapie. Auch beim Vergleich der Kombinationstherapie mit der alleinigen Bestrahlung wurde eine Abnahme festgestellt.

3.3.2. Statistische Auswertung

Tabelle 6|T-Test der drei Zelllinien für Tag 6

T-Test (Tag6)	cRGO1	cRGO1_2	cRGO4
IL-10	0,05289670	0,03600216	0,00177824
IL-8	0,09482616	0,00465346	0,00000093
MCP1	0,00651922	0,01527157	0,00286504
VEGF-A	*	0,01723960	0,02687424

* Kein T-Test möglich, da die Konzentration nach Bestrahlung bereits unter dem Detektionslimit lag, was jedoch auf eine signifikante Reduktion hinweist.

Die Daten wurden als Mittelwert ± Standardabweichung (SD) dargestellt (n = 2). Eine statistische Analyse mittels T-Test wurde für den 6. Tag durchgeführt (siehe Tabelle 6), wobei ein P-Wert von <0,005 als statistisch signifikant angesehen wurde. In Tabelle 6 sind die nicht signifikanten Werte orange markiert. Es wurde festgestellt, dass die meisten Ergebnisse nicht signifikant waren. Nur die Zytokine IL-10, IL-8 und MCP1 der Zelllinie cRGO4 sowie das Zytokin IL-8 der Zelllinie cRGO1_2 zeigten statistisch signifikante Ergebnisse.

4. Diskussion

Das Melanom stellt die häufigste Todesursache unter den Hauterkrankungen dar. Obwohl es lediglich 1 % aller Hautkrebserkrankungen ausmacht, ist es dennoch für die meisten durch Hautkrebs bedingten Todesfälle verantwortlich (Ernst and Giubellino, 2022) (24).

Die Kombinationsbehandlung, bei der eine CD146-Hemmung durch siRNA mit einer Strahlentherapie von 6 Gy kombiniert wird, stellt eine vielversprechende Methode zur Proliferationshemmung von Tumorzellen dar und könnte eine effektive und wirkungsvolle Strategie im Kampf gegen Krebs sein. Besonders relevant ist dieser Ansatz für Tumorzellen, die eine Radioresistenz entwickelt haben. Die Resistenzentwicklung ist ein erhebliches Hindernis in der Krebsbehandlung, das durch verschiedene Mechanismen, wie Mutationen bestimmter Signalwege, verursacht werden kann (Vasilevska et al., 2024) (25).

Die Kombinationsbehandlung von CD146-Hemmung und Strahlentherapie könnte dazu beitragen, solche resistenten Tumorzellen gezielt zu behandeln, was neue Perspektiven für die Krebsbekämpfung eröffnet.

Frühere Experimente zeigten, dass die Zelllinie cRGO1_2 radioresistent ist, im Vergleich zu ihren Primärtumor cRGO1, die strahlenempfindlich sind. Dies deutet darauf hin, dass sich die Eigenschaften des Tumors im Verlauf der Metastasierung veränderten (Semp et al., 2021 (26), Krayem et al., 2022 (27))

Es ist jedoch wichtig zu beachten, dass sich die Zellen *in-vitro* anders verhalten als *in-vivo*, was auf verschiedene Faktoren wie die Mikroumgebung der Zellen zurückzuführen ist, die ihre Plastizität beeinflusst (Boumahdi and de Sauvage, 2020) (28).

In den Ergebnissen des Proliferationsassays der Signifikanzprüfung am Tag 4 wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den bestrahlten unbehandelten und bestrahlten behandelten Proben der Zelllinie cRGO1 festgestellt. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass eine alleinige Behandlung nicht ausreichend ist. Die signifikanten Unterschiede, die jedoch bei allen vier Zelllinien durch die Kombinationstherapie beobachtet wurden, deuten auf eine Verstärkung der Wirkung hin.

Da dies jedoch nur bei einer Zelllinie auftrat, lässt sich daraus noch keine allgemeine Schlussfolgerung ziehen. Dennoch könnte das Ergebnis die Bedeutung der Kombination beider Behandlungsansätze unterstreichen.
Ähnlich verhielt es sich bei den Ergebnissen am Tag 6 bei den Zelllinien cRGO1 und RGO1_2 im Vergleich der bestrahlen zu den unbestrahlten Kontrollproben. Dies zeigt das Potenzial dieses Ansatzes für die Behandlung strahlungsresistenter Tumoren.

Im Western Blot wurde die Hemmung der CD146-Expression durch siRNA bestätigt, wie durch schwächere Banden in den behandelten Proben im Vergleich zu den Kontrollproben ersichtlich war. Ein unerwartetes Phänomen wurde jedoch bei den Zelllinien Shadow, cRGO1 und cRGO1_2 beobachtet: Die Bandenintensität war bei den mit CD146-siRNA behandelten Proben nach Bestrahlung (6 Gy) dichter als bei 0 Gy. Dies könnte darauf hindeuten, dass die siRNA nach Bestrahlung in ihrer Wirkung inhibiert wurde, sodass die CD146-Expression nicht dauerhaft reduziert werden konnte. Alternativ könnte es sich um einen Escape-Mechanismus der Tumorzellen nach der Bestrahlung handeln. Diese Beobachtung verdeutlicht, dass die siRNA-Behandlung sorgfältig dosiert werden muss, da ihre Wirkung möglicherweise mit der Zeit nachlässt und durch Bestrahlung beeinflusst werden kann. In der Literatur wurde berichtet, dass die Antitumorwirkung von siRNA aufgrund ihrer Instabilität begrenzt ist, was jedoch durch chemische Modifikationen verbessert werden könnte (Savarin et al., 2021) (29).

Zytokine spielen bei Melanomzellen eine entscheidende Rolle in der Tumorbiologie. Sie fungieren als autokrine Wachstumsfaktoren und fördern das Tumorwachstum direkt. Gleichzeitig beeinflussen sie die Immunantwort des Wirts, indem sie eine tumorfreundliche Umgebung schaffen oder das Immunsystem in seiner Tumorbekämpfung einschränken. Ein tiefes Verständnis der Zytokinproduktion und -wirkung bei Melanomzellen ist entscheidend für die Entwicklung zielgerichteter Therapien (Armstrong et. Al., 1992) (30)
Maekawa et. al. berichtet über höhere IL-2- und IL-12-Konzentrationen bei Hunden mit cOMM, während niedrigere MCP1- und VEGF-A-Konzentrationen mit einem längeren Gesamtüberleben verbunden waren (Maekawa et al., 2022) (31).
In unseren Experimenten wurde eine hohe Ausgangskonzentration von MCP1 gemessen, die durch die Kombinationstherapie bei allen drei Zelllinien gehemmt werden konnte.

Im Fall von IL-8 führte die Bestrahlung zu einem Anstieg der Sekretion, da IL-8 ein proinflammatorisches Zytokin ist. Dieser Effekt ließ sich durch die Hemmung von CD146 und insbesondere durch die Kombinationstherapie zumindest auf das Ausgangsniveau zurückführen.
Zudem steht die IL-8-Menge in direkten Zusammenhang mit der Metastasierungsfähigkeit der Zellen und nimmt im Laufe der Tumorprogression immer weiter zu und verstärkt pro-metastatische Eigenschaften wie Invasion und Angiogenese (Filimon et al., 2022) (32).

Die Angiogenese wird durch VEGF gefördert und unterstützt das Tumorwachstum. Eine Dysbalance zwischen pro- und anti-angiogenetischen Faktoren während der Tumorangiogenese kann zu fehlgebildeten, durchlässigen Blutgefäßen führen, die ihre Barrierefunktion verlieren. Dies begünstigt die Ausbreitung von Tumorzellen, erhöht das Risiko der Metastasenbildung und wirkt sich negativ auf die Prognose der Patienten aus. Die Rekrutierung neuer Blutgefäße erfolgt unter anderem durch die verstärkte Freisetzung von VEGF-A. Bei Patienten mit fortgeschrittenem Melanom führte eine VEGF-A-Blockade zu einer erhöhten Infiltration von Immunzellen sowie zu einem verbesserten Überleben der Patienten. (Kasakovski et al., 2021) (33).
Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die klinische Wirksamkeit der Anti-VEGF-Therapie durch gezielte Behandlungen gegen CD146 verbessert werden kann (Wang et al., 2020) (22).
In unseren Experimenten bewirkte die Hemmung von CD146 einen Rückgang der VEGF-A-Konzentration in den Melanomzelllinien cRGO1 und cRGO1_2. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von CD146 in der Regulation der VEGF-abhängigen Tumorangiogenese und legen nahe, dass eine kombinierte Therapie vielversprechende Ansätze für die Behandlung des Melanoms bieten könnte.

Die Immuntherapie bietet Patienten mit Melanomen neue Therapieoptionen mit höherer Wirksamkeit und geringerer Toxizität. Die Möglichkeit, individualisierte Therapien zu entwickeln, die speziell auf den Tumor und die immunologische Umgebung des Patienten zugeschnitten sind, birgt das Potenzial, die Melanomtherapie grundlegend zu verändern (Ernst and Giubellino, 2022) (24).

Diese Fortschritte eröffnen nicht nur neue Perspektiven für die klinische Praxis, sondern weisen auch auf die Notwendigkeit hin, personalisierte Medizin weiter voranzutreiben. Da jeder Patient einzigartige Gene und eine spezifische Genexpression aufweist, wäre ein gezieltes Screening von großer Bedeutung, um die optimalen Therapien für jeden Patienten individuell zu identifizieren. Maßgeschneiderte Ansätze könnten die Lebensqualität der Patienten erheblich verbessern und stellen einen entscheidenden Fortschritt in der Krebstherapie dar.

5. Zusammenfassung

Das orale maligne Melanom ist der häufigste orale Tumor bei Hunden. Aufgrund der Aggressivität und der hohen Metastasierungs- und Mortalitätsrate ist es wichtig, Ursachen zu erforschen und neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln.

CD146 ist ein Rezeptor für Wachstumsfaktoren und Matrixproteine, der bei vielen Tumorarten, einschließlich Melanomen, hochreguliert ist. Eine hohe CD146-Expression wird mit einer schlechten Prognose und einer erhöhten Tumormetastasierung in Verbindung gebracht. Daher könnte die Hemmung der CD146-Expression die Tumorzellen empfindlicher für herkömmliche Therapien wie Bestrahlung machen und den Therapieerfolg verbessern.

In den Experimenten wurden Melanomzellen aus Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen mit unterschiedlicher CD146-Expression und Strahlensensitivität untersucht. Die Effektivität der CD146-Hemmung mithilfe von siRNA in Kombination mit Bestrahlung wurde durch das Proliferationsverhalten der Tumorzellen und auf Proteinebene analysiert. Zusätzlich wurden die Zellüberstände der behandelten Zellen auf die Sekretion von Zytokinen hin untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass die siRNA-vermittelte Herabregulation von CD146 die Tumorproliferation signifikant hemmt und selbst radioresistente Tumorzellen bei Kombinationstherapien im Wachstum einschränken kann. Zudem führt diese Therapie zu einer Reduktion der Sekretion proinflammatorischer Zytokine (IL-8, IL-10, MCP-1) und VEGF.

Zusammengefasst deutet dies darauf hin, dass die CD146-Hemmung das Tumorwachstum hemmen und die Strahlenempfindlichkeit erhöhen kann. Darüber hinaus kann sie die Krankheitsprogression durch reduzierte Sekretion tumorfördernder Zytokine verlangsamen, was sie zu einer vielversprechenden Ergänzung herkömmlicher Therapieansätze macht.

6. Summary

Oral malignant melanoma is the most common oral tumor in dogs. Due to its aggressive nature, high metastatic potential, and high mortality rate, it is crucial to investigate its underlying causes and develop new therapeutic strategies.

CD146 is a receptor for growth factors and matrix proteins, which is often upregulated in various tumor types, including melanoma. High CD146 expression is associated with poor prognosis and increased tumor metastasis. Therefore, inhibiting CD146 expression could make tumor cells more sensitive to conventional treatments such as radiation therapy, potentially improving treatment outcomes.

In the experiments, melanoma cells from primary tumors and lymph node metastases with varying CD146 expression and radiation sensitivity were examined. The effectiveness of CD146 inhibition using siRNA in combination with radiation therapy was assessed through the proliferation behavior of tumor cells and at the protein level. Additionally, the conditioned media from treated cells were analyzed for cytokine secretion.

The results indicate that siRNA-mediated downregulation of CD146 significantly inhibits tumor proliferation and can restrict the growth of otherwise radiation-resistant tumor cells when combined with radiation therapy. Furthermore, this treatment reduces the secretion of pro-inflammatory cytokines (IL-8, IL-10, MCP-1) and VEGF.

In summary, CD146 inhibition appears to hinder tumor growth and enhance radiation sensitivity. Moreover, it may slow disease progression by decreasing the secretion of tumor-promoting cytokines, making it a promising adjunct to conventional therapeutic strategies.

7. Literatur

1. Schmid F, Brodesser D, Reifinger M, Forte S, Semp P, Eberspächer-Schweda MC, et al. Canine oral primary melanoma cells exhibit shift to mesenchymal phenotype and phagocytic behaviour. Vet Comp Oncol. 2019 Sep;17(3):211–20.

2. Fonseca-Alves CE, Ferreira Ê, de Oliveira Massoco C, Strauss BE, Fávaro WJ, Durán N, et al. Current Status of Canine Melanoma Diagnosis and Therapy: Report From a Colloquium on Canine Melanoma Organized by ABROVET (Brazilian Association of Veterinary Oncology). Front Vet Sci. 2021 Aug 16;8:707025.

3. Martínez CM, Peñafiel-Verdú C, Vilafranca M, Ramírez G, Méndez-Gallego M, Buendía AJ, et al. Cyclooxygenase-2 expression is related with localization, proliferation, and overall survival in canine melanocytic neoplasms. Vet Pathol. 2011 Nov;48(6):1204–11.

4. Atherton MJ, Morris JS, McDermott MR, Lichty BD. Cancer immunology and canine malignant melanoma: A comparative review. Vet Immunol Immunopathol. 2016 Jan 1;169:15–26.

5. Ouhtit A, Gaur RL, Abd Elmageed ZY, Fernando A, Thouta R, Trappey AK, et al. Towards understanding the mode of action of the multifaceted cell adhesion receptor CD146. Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer. 2009 Apr 1;1795(2):130–6.

6. Thieme E-Journals - Zentralblatt für Chirurgie / Volltext [Internet]. [cited 2024 Sep 12]. Available from: https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-2000-10682

7. Natarelli N, Aleman SJ, Mark IM, Tran JT, Kwak S, Botto E, et al. A Review of Current and Pipeline Drugs for Treatment of Melanoma. Pharmaceuticals. 2024 Feb;17(2):214.

8. Krieter M, Schultz E, Debus D. Das maligne Melanom. MMW - Fortschritte Med. 2019 May 1;161(10):42–50.

9. Stevenson VB, Klahn S, LeRoith T, Huckle WR. Canine melanoma: A review of diagnostics and comparative mechanisms of disease and immunotolerance in the era of the immunotherapies. Front Vet Sci. 2023 Jan 6;9:1046636.

10. Sapin MR. [Lymphatic system and its significance in immune processes]. Morfol St Petersburg Russ. 2007;131(1):18–22.

11. Rosen RD, Sapra A. TNM Classification. In: StatPearls [Internet] [Internet]. StatPearls Publishing; 2023 [cited 2024 Jul 22]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553187/

12. Bergman PJ. Canine Oral Melanoma. Clin Tech Small Anim Pract. 2007 May 1;22(2):55–60.

13. Abdurakhmonov IY. RNA Interference. BoD – Books on Demand; 2016. 460 p.

14. Kartikasari AER, Huertas CS, Mitchell A, Plebanski M. Tumor-Induced Inflammatory Cytokines and the Emerging Diagnostic Devices for Cancer Detection and Prognosis. Front Oncol [Internet]. 2021 Jul 7 [cited 2024 Jul 23];11. Available from: https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2021.692142/full

15. Richter KR, Nasr AN, Mexas AM. Cytokine Concentrations Measured by Multiplex Assays in Canine Peripheral Blood Samples. Vet Pathol. 2018 Jan 1;55(1):53–67.

16. Estrela-Lima A, Araújo MSS, Soares RP, Ribeiro LGR, Damasceno KA, Costa AT, et al. Plasma biomarkers profile of female dogs with mammary carcinoma and its association with clinical and pathological features. Vet Comp Oncol. 2016;14(1):88–100.

17. Dana H, Chalbatani GM, Mahmoodzadeh H, Karimloo R, Rezaiean O, Moradzadeh A, et al. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. Int J Biomed Sci IJBS. 2017 Jun;13(2):48–57.

18. Takeshita F, Ochiya T. Therapeutic potential of RNA interference against cancer. Cancer Sci. 2006;97(8):689–96.

19. Zhang X, Kon T, Wang H, Li F, Huang Q, Rabbani ZN, et al. Enhancement of Hypoxia-Induced Tumor Cell Death In vitro and Radiation Therapy In vivo by Use of Small Interfering RNA Targeted to Hypoxia-Inducible Factor-1α. Cancer Res. 2004 Nov 17;64(22):8139–42.

20. Mannion AJ, Odell AF, Baker SM, Matthews LC, Jones PF, Cook GP. Pro- and anti-tumour activities of CD146/MCAM in breast cancer result from its heterogeneous expression and association with epithelial to mesenchymal transition. Front Cell Dev Biol. 2023 Apr 17;11:1129015.

21. Kocemba-Pilarczyk KA, Dudzik P, Leśkiewicz K. The relationship between expression of VIMENTIN and CD146 genes in breast cancer. Bio-Algorithms Med-Syst. 2021 Mar 1;17(1):1–7.

22. Wang Z, Xu Q, Zhang N, Du X, Xu G, Yan X. CD146, from a melanoma cell adhesion molecule to a signaling receptor. Signal Transduct Target Ther. 2020 Aug 11;5:148.

23. Joshkon A, Heim X, Dubrou C, Bachelier R, Traboulsi W, Stalin J, et al. Role of CD146 (MCAM) in Physiological and Pathological Angiogenesis—Contribution of New Antibodies for Therapy. Biomedicines. 2020 Dec;8(12):633.

24. Ernst M, Giubellino A. The Current State of Treatment and Future Directions in Cutaneous Malignant Melanoma. Biomedicines. 2022 Apr;10(4):822.

25. Vasilevska J, Cheng PF, Lehmann J, Ramelyte E, Gómez JM, Dimitriou F, et al. Monitoring melanoma patients on treatment reveals a distinct macrophage population driving targeted therapy resistance. Cell Rep Med [Internet]. 2024 Jul 16 [cited 2024 Jul 27];5(7). Available from: https://www.cell.com/cell-reports-medicine/abstract/S2666-3791(24)00315-X

26. Pia-Gloria Semp, Sabine Brandt, , Iwan Burgener, , Miriam Kleiter,, Barbara Pratscher,. Abstracts-Posters. Vet Comp Oncol. 2021;19(S1):18.

27. Krayem M, Ghanem GE, Van Gestel D. Recent advances in radiosensitivity determinants in melanoma. Curr Opin Oncol. 2022 Mar;34(2):131.

28. Boumahdi S, de Sauvage FJ. The great escape: tumour cell plasticity in resistance to targeted therapy. Nat Rev Drug Discov. 2020 Jan;19(1):39–56.

29. Savarin M, Kamensek U, Znidar K, Todorovic V, Sersa G, Cemazar M. Evaluation of a Novel Plasmid for Simultaneous Gene Electrotransfer-Mediated Silencing of CD105 and CD146 in Combination with Irradiation. Int J Mol Sci. 2021 Jan;22(6):3069.

30. Heterogenität der Zytokinproduktion durch menschliche maligne Melanomzellen - Armstrong - 1992 - Experimentelle Dermatologie - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2024 Jul 26]. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0625.1992.tb00070.x

31. Maekawa N, Konnai S, Asano Y, Sajiki Y, Deguchi T, Okagawa T, et al. Exploration of serum biomarkers in dogs with malignant melanoma receiving anti-PD-L1 therapy and potential of COX-2 inhibition for combination therapy. Sci Rep. 2022 Jun 3;12(1):9265.

32. Filimon A, Preda IA, Boloca AF, Negroiu G. Interleukin-8 in Melanoma Pathogenesis, Prognosis and Therapy—An Integrated View into Other Neoplasms and Chemokine Networks. Cells. 2022 Jan;11(1):120.

33. Kasakovski D, Skrygan M, Gambichler T, Susok L. Advances in Targeting Cutaneous Melanoma. Cancers. 2021 Jan;13(9):2090.

8. Anhänge

8.1. Liste der Abkürzungen

Canine oral malignant melanoma	cOMM
Human malignant melanoma	hMM
Small interfering RNA	siRNA
RNA-Interferenz	RNAi
Lymphknoten	LK
Hypoxie-induzierbarer Faktor-1α	HIF-1α
Epithelial-mesenchymal transition	EMT
transendotheliale Migration	TEM
Vascular Endothelial Growth Factor	VEGF
Vascular Endothelial Growth Factor Receptor	VEGFR
Dulbecco's Modified Eagle's Medium + GlutaMAX™	DMEM
fetal calf serum	FCS
Complete medium	CM
4',6-Diamidino-2-phenylindol	DAPI
Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gele	SDS-PAGE
Polyvinylidenfluorid	PVDF

8.2. Liste der Abbildungen

Abbildung 1| |Aufbau der Versuchsanordnung (Abbildung mit BioRander erstellt) 11
Abbildung 2|Zellproliferation der vier Zelllinien nach unterschiedlichen Behandlungen 21
Abbildung 3|Western Blot-Ergebnisse für die vier Zelllinien 24
Abbildung 4|Zytokinausschüttung der cRGO1-Zelllinie 25
Abbildung 5|Zytokinausschüttung der cRGO1_2-Zelllinie 26
Abbildung 6|Zytokinausschüttung der cRGO4-Zelllinie 28

8.3. Liste der Tabellen

Tabelle 1|TNM-basierte WHO Stadieneinteilung für maligne orale Melanome bei Hunden 4
Tabelle 2|Einstufungssystem der WHO für maligne orale Melanome bei Hunden 4
Tabelle 3|Patienten und Zelllinien 13
Tabelle 4|T-Tests Ergebnisse der vier Zelllinien für Tag 4 23
Tabelle 5|T-Tests Ergebnisse der vier Zelllinien für Tag 6 23
Tabelle 6|T-Test der drei Zelllinien für Tag 6 29