

Aus dem Department für Kleintiere und Pferde
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut/Klinik für Pferdechirurgie
(Leiterin: Jenner, Florian, Dipl.ACVS Univ.-Prof. Dr.med.vet. Dipl.ECVS)

Einfluss der CD146-Expression auf die Proliferation von primären caninen Melanomzellen

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Carina Franczik

Wien, im November 2019

Betreuerinnen:

Priv.-Doz. Dipl.-Ing. Dr. nat. techn. Sabine Brandt

Forschungsgruppe Onkologie (RGO)

Department für Kleintiere und Pferde

Veterinärmedizinische Universität Wien

Mag. rer. nat. Dr. rer. nat. Barbara Pratscher

Forschungsgruppe Onkologie (RGO)

Department für Kleintiere und Pferde

Veterinärmedizinische Universität Wien

Vorgeschlagene Gutachterin:

Ao. Univ.-Prof. Dr. med. vet. Miriam Kleiter

Dipl. ACVR-RO Dipl. ECVIM-CA

Department/Universitätsklinik für Kleintiere und Pferde

Veterinärmedizinische Universität Wien

Danke Mama & Stella

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Canine Melanome	1
1.1.1 Einteilung Krankheitsstadium.....	2
1.1.2 Diagnostik.....	4
1.1.3 Therapie	5
1.2 CD146.....	8
1.3 si-RNA.....	9
1.4 Ziel und Hypothese	11
2. Material und Methoden	12
2.1 Zellen und Zellkultur	12
2.2 Transfektion	13
2.3 Western Blot.....	16
2.4 Proliferation caniner primärer Melanomzellen nach CD146-Expressionsinhibition.....	22
2.5 Statistik	22
3. Ergebnisse.....	23
3.1 CD146-Nachweis	23
3.2. Expressionsinhibition von CD146 mittels siRNA	25
3.3. Zeitkurve für 24/48/72 Stunden nach Transfektion	26
3.4. Proliferationsverhalten caniner oraler maligner Melanomzellen nach siRNA-vermittelter Herabregulierung von CD146.....	27
4. Diskussion	30
5. Zusammenfassung	32
6. Summary	33
7. Literaturverzeichnis.....	34
8. Tabellen – und Abbildungsverzeichnis.....	38
9. Abkürzungsverzeichnis	39

1. Einleitung

1.1 Canine Melanome

Melanome sind maligne Neoplasien der pigmentbildenden Zellen (Melanozyten) der Haut oder Schleimhaut. Die Entwicklung von malignen Melanomen ist generell charakterisiert durch eine Serie von Mutationen, welche aus Melanozyten, die sich in der Basalschicht der Epidermis befinden, entstehen. Melanome kommen beim Menschen und bei den meisten domestizierten Tierspezies vor, so auch beim Hund (Nishiya et al., 2016).

Etwa 3 % aller Neoplasien und 7 % aller malignen Tumoren beim Hund werden dem Melanom zugeschrieben (Almela and Anson, 2019). Tumoren der Pigmentzellen der Haut kommen beim Kleintier relativ häufig vor und machen beim Hund 5-7 % aller Hauttumoren aus (Kessler, 2012).

Rasseprädispositionen werden bei Dobermann Pinscher sowie Zwerg- und Riesenschnauzer beschrieben, da diese Rassen eine höhere Inzidenz für orale melanozytäre Tumoren aufweisen (Bolon et al., 1990).

Beim caninen malignen Melanom sind vorrangig Hunde zwischen 6 und 15 Jahren betroffen, mit der höchsten Inzidenz im Alter zwischen 10 und 13 Jahren (Goldschmidt and Goldschmidt, 2017).

Canine primäre Melanome treten üblicherweise an behaarten Hautstellen auf, dort präsentieren sie sich als dunkle Flächen, Knoten oder auch faltige Massen. Sie sind aber auch im Bereich von Nagelbett, Pfoten, Augen, Gastrointestinaltrakt oder an mukokutanen Übergängen und vor allem in der Mundhöhle zu finden (Bergman et al., 2013).

Im Vergleich zu behaarten Hautstellen, wo die Metastasierungsrate gering ist und die Prognose bei exzisionaler Therapie gut ist, besteht bei oralen und (inter-)digitalen Tumoren aggressiveres und oftmals therapieresistentes Verhalten mit hohem Potential zur Metastasierung. Dieses Verhalten ähnelt dem humanen malignen Melanom (Bergman et al., 2013).

Allgemein zeigen canine und humane maligne Melanome Ähnlichkeiten auf klinischer, histopathologischer und molekularer Ebene (Simpson et al., 2014).

1.1.1 Einteilung Krankheitsstadium

Das biologische Verhalten von caninen Melanomen ist variabel und wird beeinflusst durch anatomische Lage, Krankheitsstadium und histologische Parameter. Lokale Invasivität und Risiko einer Metastasierung ist häufig aufgrund der anatomischen Lokalisation vorhersagbar. Melanome, die an behaarter Haut auftreten, welche sich nicht in der Nähe von Schleimhäuten befindet, verhalten sich oft gutartig, während orale oder die Schleimhaut betreffende Melanome häufig maligne sind (Almela and Anson, 2019). Das vorliegende Krankheitsstadium wird durch Evaluierung der Größe des Primärtumors, Vorliegen einer Lymphknoteninvolvierung und Auftreten von Fernmetastasen bestimmt. Zum Beispiel werden Tumoren mit einem Durchmesser von unter 2 cm und ohne Hinweise auf Metastasen als Stadium I mit einer medianen Überlebensdauer von 19 Monaten beschrieben (Almela and Anson, 2019). Hingegen werden Tumoren mit einem Durchmesser von 2-4 cm, ohne Hinweise auf Metastasen, als Stadium II eingestuft. Diese weisen eine mediane Überlebensdauer von sechs Monaten auf (Almela and Anson, 2019). Histologische Parameter wie die Ki67 Expression, ein Protein, das als histologischer Marker für die Proliferation von Zellen dient, kann ebenfalls das Verhalten prognostizieren (Almela and Anson, 2019). Eine erhöhte Expression dieses Proteins korreliert mit einer moderaten bis hohen Neigung zur Metastasierung (Bergman et al., 2013).

Die TNM-Stadiumeinteilung (siehe Tab. 1) für COMM wurde von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) entwickelt. Das System von Tumor-Staging basiert auf der Bewertung der Größe des Primärtumors einschließlich der Beteiligung von Haut, Faszien, Muskulatur, Brust- und Bauchwand, der Beteiligung von Lymphknoten unter Berücksichtigung der Beweglichkeit, der Lokalisation und Metastasierung (+/-), sowie Anwesenheit von Fernmetastasen. Durch weitere Unterteilung dieser 3 Komponenten ergibt sich eine Abschätzung des Ausmaßes der Krankheit (Owen, 1980).

Tab. 1 WHO Krankheitsstadien

Stadium I	Stadium II	Stadium III		Stadium IV
Primärtumor <2 cm Durchmesser	Primärtumor 2-4 cm Durchmesser	Primärtumor >4 cm Durchmesser		Primärtumor jeglicher Größe
geringe Hautbeteiligung		starke Hautbeteiligung		
mit oder ohne Faszien – bzw. Muskelbeteiligung		Mit Brustwand – bzw. Bauchwandbeteiligung		
Keine Lymphknotenbeteiligung		+/- Lymphknoten- Metastasierung		
		Keine Fernmetastasen		Fernmetastasen

Das Melanom ist der häufigste orale bösartige Tumor beim Hund und weist eine hohe Invasivität und Neigung zu Metastasierung auf. Die mittlere Überlebenszeit für Hunde mit oralem Melanom beträgt bei chirurgischer Behandlung zwischen 3 und 18 Monaten, je nach vorliegendem WHO-Krankheitsstadium (Bergman et al., 2013).

Obwohl bereits viel neues Wissen durch Studien rund um Melanome zu Tage gebracht wurde, ist die Kontrolle dieser Krankheit sowohl im Humanbereich als auch in der Tiermedizin, insbesondere bei Hunden schwierig (Nishiya et al., 2016).

Beim Menschen ist das maligne Melanom die aggressivste, therapieresistenteste und tödlichste Form von Hautkrebs. Hierbei spielen Faktoren wie Heredität, charakteristische Haut- und Schleimhautpigmentierung, Sonneneinstrahlung und in diesem Zusammenhang besonders UVB-Strahlung eine Rolle. Hinsichtlich caniner Melanome sind einige ätiologische Einflüsse wie zum Beispiel Hormone, Traumata, genetische Prädisposition, sowie möglicherweise auch die Sonneneinstrahlung auf bestimmte Hautareale zwar involviert, jedoch gibt es hier keine Übereinstimmung bezüglich der Ätiologie (Nishiya et al., 2016).

1.1.2 Diagnostik

Maligne Melanome sind fleischige, häufig ulzerierende und nekrotisierende Zubildungen. Viele sind teilweise oder vollständig pigmentiert, seltener kommen pigmentlose oder pigmentarme maligne Melanome vor (Bergman et al., 2013; Kessler, 2012).

Tumore bestehen aus Zellen, deren Wachstum nicht der physiologischen Regulation unterliegen. Folglich proliferieren die Zellen mit einer höheren Rate. Aufgrund des schnellen, unkontrollierten Wachstums sind maligne Zellen unreif und schlecht differenziert, wodurch sie von gesunden Zellen unterscheidbar sind. Zur Beurteilung der Malignität von Zellen werden verschiedene Kriterien wie Zellkernvariation, Veränderungen der Nukleoli und des Zytoplasmas miteinbezogen (Yin and Nolte, 2014).

Melanome bei Hunden haben ein sehr unterschiedliches biologisches Verhalten, welches von einer Vielzahl an Faktoren abhängig ist. Zu diesen Faktoren zählen unter anderem Lokalisation, Krankheitsstadium und histologische Parameter (Withrow et al., 2013).

Orale Melanome werden je nach Zellmorphologie in Subtypen unterteilt. Der epitheloide bzw. polygonale Typ besteht aus runden bis ovalen Zellen mit Formation zu Zellnestern, reichlich Zytoplasma, deutlichen Zellrändern und großem zentralem Zellkern mit einem oder mehreren prominenten Nukleoli. Der Spindelzelltyp bzw. fibromatöse Typ weist einen eiförmigen oder länglichen Zellkern sowie kleine Nukleoli auf. Der dritte Subtyp weist sowohl epitheloide als auch spindelförmige Areale auf (Goldschmidt and Goldschmidt, 2017).

Die Identifikation von Zellen als Melanozyten beruht häufig auf einer zytologischen Untersuchung durch Nachweis des Pigments Melanin. Allerdings sollte die Zytologie nicht allein für prognostische Aussagen hinsichtlich Verhalten oraler melanozytärer Tumoren herangezogen werden, da neoplastische Zellen in ihrem Erscheinungsbild sehr variabel sind. Schlecht pigmentierte Melanome erlauben zwar oftmals eine Diagnose mittels Zytologie, jedoch werden für die endgültige Diagnosestellung und prognostische Einschätzung zusätzliche histologische Untersuchungen benötigt (Goldschmidt and Goldschmidt, 2017).

Zur Aufklärung von Metastasen werden regionale Lymphknoten nach Feinnadelaspiration zytologisch untersucht (Goldschmidt and Goldschmidt, 2017). Circa die Hälfte aller oralen Melanome metastasiert in Lymphknoten, allen voran in Mandibularlymphknoten. Aus diesem Grund sollten diese sowie alle anderen auftretenden knotigen Veränderungen am Körper auf nodale Metastasen untersucht werden (Herring et al., 2002).

Höchst maligne orale Melanome metastasieren nicht nur in Lymphknoten, sondern häufig auch in die Lunge. Lungenmetastasen weisen meist eine miliare Lungenzeichnung auf und werden auf einem Lungenröntgen oftmals nicht erkannt (Goldschmidt and Goldschmidt, 2017).

Melanome mit wenig oder gar keinem Pigment können zytologisch schwieriger zu differenzieren sein. Die endgültige Bestätigung eines Melanoms setzt die Identifikation von Melanin enthaltenden Zellen mittels Immunhistochemie voraus (Smedley et al., 2011).

Hier kann eine Diagnose von oralen melanozytären Neoplasien mit hoher Sensitivität und Spezifität durch immunhistologische Färbung mittels eines Antikörper-Cocktail (Melan-A, PNL-2 und tyrosinreaktive Proteine 1 und 2) erzielt werden (Goldschmidt and Goldschmidt, 2017).

In einer Studie von König et al. können etwa 90% amelanotischer Melanome und 75% pigmenthaltiger Melanome des Hundes immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen S100 diagnostiziert werden (Koenig et al., 2001). Im Vergleich zur klassischen Histologie, wird das Antigen Ki67 in der Immunhistochemie als zuverlässigerer prognostischer Indikator von potentiell malignem Verhalten für kutane Melanome beschrieben (Laprie et al., 2001). Ki67 ist ein Marker für das Wachstum von neoplastischen Zellen und prognostiziert die Zellproliferation exakter als zum Beispiel die Mitoserate (Goldschmidt and Goldschmidt, 2017).

Zu den prognostischen Indikatoren für humane orale Melanome zählt auch der Pigmentierungsgrad. Bei COMM gilt dieser Indikator allerdings als widersprüchlich, da die Variabilität der Zellpigmentierung innerhalb verschiedener Areale eines Tumors eine Einschätzung des gesamten Pigmentierungsgrades schwierig macht, insbesondere, wenn nur ein Teil der Masse evaluiert wird (Goldschmidt and Goldschmidt, 2017).

Um eine auf den jeweiligen Tumor genau abgestimmte Therapieform wählen zu können, ist es wichtig, die Tumorart zu bestimmen. Verschiedene Tumoren bedürfen verschiedener Therapien.

1.1.3 Therapie

Die Therapiemöglichkeiten beim caninen Melanom sind je nach Lokalisation, Aggressivität und betroffenen Organsystemen unterschiedlich. Grundsätzlich gibt es die chirurgische Variante, bei der möglichst der ganze Tumor, sofern möglich, in einer Operation entfernt werden soll. Die chirurgische Resektion sollte in das umliegende gesunde Gewebe reichen und zwar 2-3 cm vom Knochenrand bzw. 1 cm vom Weichteilrand (Nishiya et al., 2016). Zusätzlich

sollten auch die regionalen Lymphknoten mitentfernt werden, da laut einer Studie von 100 Hunden mit COMM 53 % zytologische oder histopathologische Anzeichen von Metastasen in den Mandibularlymphknoten zeigten, obwohl keine Lymphadenopathie vorlag (Williams and Packer, 2003).

Aufgrund der hohen Metastasierungsrate sollte bei chirurgischer Entfernung zusätzlich eine systematische Behandlung erfolgen (Withrow et al., 2013). Diese kann zum Beispiel in Form von Chemotherapie oder Immuntherapie erfolgen. Lokal kommt auch der Bestrahlung große Bedeutung zu.

Bestrahlungstherapie ist effektiv bei caninen malignen Melanomen und ist möglicherweise hilfreich bei der Kontrolle des Wachstums von Tumoren und der involvierten regionalen Lymphknoten. (Withrow et al., 2013). Bestrahlungstherapie wird auch häufig im Vorfeld einer chirurgischen Behandlung genutzt, um das Tumorwachstum zu verlangsamen bzw. zu stoppen oder auch um den Tumor in seiner Ausdehnung zu verkleinern, wodurch die Resektion erleichtert wird.

Obwohl Melanome lange Zeit als bestrahlungsresistente Erkrankung angesehen wurden, sprechen sich viele Studien für eine Bestrahlungstherapie als Behandlungsmöglichkeit von Melanomen aus (Khan et al., 2011).

Trotz der Behandlung durch lokale Therapien wie chirurgischer Entfernung und/oder Bestrahlungstherapie, weist das COMM durch Bildung von Metastasen eine schlechte Prognose auf. Daher werden systemische Therapien empfohlen (Nishiya et al., 2016).

Bei der Chemotherapie kommen verschiedene Zytostatika zum Einsatz, welche nach ihrem Wirkungsmechanismus in verschiedene Substanzgruppen unterteilt werden (Kessler, 2012). Häufig verwendete Zytostatika bei COMM sind nach Kessler (Kessler, 2012) Carboplatin bzw. eine Kombination davon mit Dacarbazine. Weiters kommen auch Cisplatin und Doxorubicin zur Anwendung (Eickhoff, 2005).

Tab. 2: Chemotherapeutika

Substanzgruppe	Vertreter	Wirkungsweise
Alkylantien	Dacarbazine	Überkreuzte Verknüpfung der DNS- Stränge

Antitumor-Antibiotika	Doxorubicin	Hemmung der Topoisomerase II Interkalation
Nicht klassifizierte Chemotherapeutika	Platinverbindungen (Carboplatin, Cisplatin)	Überkreuzte Verknüpfung der DNS-Stränge

Wie Bestrahlung, kann auch Chemotherapie als adjuvante Therapie vor bzw. nach chirurgischer Behandlung eingesetzt werden, um den Tumor zu verkleinern bzw. das Rezidivrisiko zu minimieren.

Aufgrund der geringeren Dosis, die in der Veterinärmedizin zur Anwendung kommt, sind auch die Nebenwirkungen einer Chemotherapie nicht mit denen in der Humanmedizin vergleichbar. Viele Forscher sind an der Verwendung und Entwicklung von Therapien beteiligt, die das Immunsystem von Hunden aktivieren soll. Die durch therapeutische Vakzine induzierte Immunantwort stellt eine Strategie für die Behandlung von Melanomen dar (Bergman et al., 2003)

Der Verdacht liegt nahe, dass das Immunsystem die Progression und Metastasierung von Melanomen modulieren könnte (Nishiya et al., 2016).

Dendritische Zellen (DC) könnten, als Antigen-präsentierende Zellen mit der Fähigkeit, die Immunantwort zu initiieren, als Vakzination zur Behandlung von humanen oder caninen Krebsarten geeignet sein. Verglichen mit humanen klinischen Versuchen, bei denen dendritische Zellen als Vakzine zum Einsatz kamen, gibt es in der Veterinärmedizin nur wenig Berichte über solche Versuche. Obwohl die Verwendung von DC-Vakzinen in der Immuntherapie als vielversprechende Strategie zur Kontrolle von malignen Melanomen gilt, gibt es Limitierungen in Form von Produktionskosten für den veterinärrechtlichen Gebrauch sowie die unvollständig verfügbaren bisherigen Forschungsergebnisse (Nishiya et al., 2016). Der Erfolg sowie die Prognose hängen von verschiedenen Faktoren ab und sind oftmals trotz Ausschöpfung aller medizinischen Kenntnisse schlecht (Harvey et al., 1981). Aus diesem Grund gilt es nach Möglichkeiten zu forschen, den Ausbruch dieser Krankheit zu verhindern.

1.2 CD146

CD146 ist ein Adhäsionsmolekül, auch bekannt als Melanomzelladhäsionsmolekül (MCAM) und gehört zu den Immunglobulinen (Lehmann et al., 1989). Es ist ein 113kD großes Membranglykoprotein, das fünf immunglobulinartige Domänen, eine Transmembranregion und einen kurzen zytoplasmatischen Schwanz umfasst (Sers et al., 1993).

Diese Moleküle sind in unterschiedliche biologische und pathologische Prozesse involviert, u.a. in die Regulation der Organogenese, Aufrechterhaltung der Gewebestruktur, Immun- und Entzündungsantwort, Wundheilung, Tumordinvasion und Metastasierung (Shih, 1999).

Angiogenese ist ein wichtiger Prozess, der Proliferation, Migration, Adhäsion und Kapillargefäßbildung durch Endothelzellen umfasst. Bei Mäusen konnte durch Injektion eines Anti-CD146 Antikörpers eine Gefäßreduktion in verschiedenen Modellen von xenotransplantierten Tumoren gezeigt werden. Somit spielt dieses Glykoprotein in der Tumor-Angiogenese eine wichtige Rolle (Stalin et al., 2017).

Bei einem gesunden Patienten exprimieren nur etwa 1 % der mononukleären Zellen des peripheren Blutes CD146 (Stalin et al., 2017). Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression des Proteins für B- und T-Lymphozyten gezeigt (Elshal et al., 2005).

Forschungen ergaben, dass ca. 1 % der B- Lymphozyten CD146 exprimieren und diese Expression durch Stimulation mit Interleukin-4 und CD40 um das Fünffache ansteigt (Stalin et al., 2017).

Das Zelladhäsionsprotein CD146 spielt eine vielfältige Rolle bei der Metastasierung und Progression von humanen malignen Melanomen. CD146 wird auf der Zelloberfläche und intrazellulär von Melanomzellen und Metastasen exprimiert (Schmid et al., 2019) während dieses Protein benignen Muttermalen fehlt (Lei et al., 2015).

Die Rolle von CD146 bei Tumoren wurde zunächst an humanen Melanomen erforscht (Stalin et al., 2017). Es wurde eine direkte Korrelation zwischen Anstieg der Fähigkeit zur Metastasierung und Anstieg der CD146-Expression festgestellt (Luca et al., 1993). Diese Ergebnisse wurden durch Verwendung von interferierender RNA gegen CD146, was zu einem Rückgang in Migration, Proliferation und Invasion in vitro führte, erzielt (Watson-Hurst and Becker, 2006).

Krebszellen werden in ihrem Wachstum und ihrer Verteilung durch CD146 beeinflusst (Stalin et al., 2017). Durch Untersuchungen wurde aufgedeckt, dass das CD146-Protein als eine Art Beschleuniger für protumorale inflammatorische Prozesse agiert, indem es den Ausbruch von proinflammatorischen Leukozyten erleichtert. Des Weiteren ist dieses Protein durch

Expressionsinhibition von Zelltod am Überleben von Melanomzellen beteiligt. CD146 steuert die Metastasierung mittels Durchtritt von Blutkörperchen durch unverletzte Gefäßwände, Zersetzung der extrazellulären Matrix, Unterstützung der Motilität von malignen Melanomzellen sowie Unterstützung der Tumolvaskularisierung (Schmid et al., 2019).

Die Expression von CD146 in melanozytären Zellen ist umgebungsbedingt durch epidermale Keratinozyten mittels direktem Zell-Zell-Kontakt reguliert (Shih, 1999).

In primären Melanomen korreliert die CD146-Expression stark mit der Tumordicke, mit steigender Immunintensität in Melanomzellen, die tief in die Haut eindringen. Im Gegensatz dazu zeigten viele andere Karzinome, Sarkome und neuroendokrine Tumoren keine CD146-Immunreaktivität (Shih, 1999).

Zusätzlich zum Melanom findet man CD146 auch in anderen Tumorzellen, wie beispielsweise bei Prostatakrebs oder Brustkrebs, wo es mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht wird (Stalin et al., 2017). Forscher kamen zum Schluss, dass die Inhibition der Expression dieses Proteins von therapeutischem Wert sein könnte (Jouve et al., 2015).

In Versuchen bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass durch Blockierung von CD146 die hämatogene Metastasierung in die Lunge verringert wurde und somit dieses Protein zur hämatogenen Verteilung von Melanomen beiträgt. CD146-defiziente Mäuse zeigten hierbei eine höhere Überlebensrate (Jouve et al., 2015).

CD146 könnte sich als potenter diagnostischer und prognostischer Marker für canine orale maligne Melanome anbieten (Schmid et al., 2019).

1.3 si-RNA

Unter RNA-Interferenz (RNAi) versteht man die Abschwächung oder Ausschaltung der Expression eines Zielgens durch selektive Inaktivierung seiner korrespondierenden mRNA mittels doppelsträngiger RNA (dsRNA). Dieser Mechanismus führt entweder bei Verwendung von „small interfering RNAs“ (siRNAs) oder „short hairpin RNAs“ (shRNAs) zu Degradation der Ziel-RNA, oder mittels microRNA (miRNA) zu Suppression der Translation von spezifischen mRNAs (O`Keefe, 2013).

Eine Rolle spielt dieser Mechanismus auch bei der viralen Replikation, bei der der Körper diese fremde RNA erkennt und zerstören kann. Zahlreiche Viren versuchen die an der RNA-Interferenz beteiligten Proteine zu hemmen, um so diesem Abwehrmechanismus zu entgehen (Haasnoot et al., 2007).

Je nach verwendetem Zelltyp gibt es verschiedene Protokolle für die Herstellung einer siRNA, da sich die unterschiedlichen Zelltypen in ihrer Sensitivität bezüglich Nukleinsäuren unterscheiden. Obwohl es einige Berichte über Transfektion der siRNAs in den Zellkern der Zielzelle gibt, vertritt man generell die Meinung, dass diese sich im Zytoplasma anreichern.

Bei der Wahl zwischen siRNAs und shRNAs ist die Länge der Probe zu beachten. Während siRNAs vorübergehend in Zellen exprimiert werden, können shRNAs dauerhaft in die virus-medierte Transduktion eingebunden werden (O`Keefe, 2013).

Bei der siRNA werden lange dsRNAs in einer Adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen Reaktion durch einen Dicer in siRNAs gespalten. Es folgt der Einbau der siRNAs in einen RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC). Der Übergang von doppelsträngiger RNA in Einzelstränge erfordert ebenfalls ATP (Izquierdo, 2005).

Um festzustellen, ob es sich bei den beobachteten Effekten nach RNAi – Einsatz tatsächlich um Unterdrückung der Genexpression handelt und nicht lediglich um die Aktivierung von RNAi-Signalwegen oder Einführung der siRNA/shRNA, ist es wichtig, entsprechende Kontrollen durchzuführen. Üblich sind hier randomisierte, nicht zielgerichtete Kontrollen (O`Keefe, 2013).

Transfektion und Elektroporation sind die am häufigsten verwendeten Nukleinsäure (NS)-Transduktionsmethoden. Transfektion schließt die NS-Komplexbildung durch Trägermoleküle, welche den Durchtritt durch die Zellmembran erlauben, ein und ist eine gängige Methode für das Einbringen der siRNAs in die Zellen. Die Effektivität der Transfektion ist unter anderem vom Zelltyp, Gesundheit und Konfluenz sowie DNA-Menge abhängig. Nicht alle Zelltypen können für RNAi verwendet werden. Da manche Zellen die Transfektion nicht tolerieren, besteht also eine gewisse Limitierung bei der Auswahl des Zellmaterials (O`Keefe, 2013).

Durch den Einsatz unterschiedlicher Strategien kann RNAi auch im Bereich der Onkologie gezielt für die Therapie gegen Krebs verwendet werden. Diese Strategien beinhalten etwa die Inhibition von überexprimierten Onkogenen, die Blockierung der Zellteilung durch Cyclin-E und ähnlichen Genen oder Förderung der Apoptose durch Suppression von anti-apoptotischen Genen. RNAi gegen Gene, die multiresistent gegen Therapeutika sind, oder chemoresistente Zielgene können ebenfalls für die Bekämpfung von Krebs hilfreich sein (Izquierdo, 2005).

Die Inhibition von überexprimierten Onkogenen wie „ras“ oder „myc“ blockiert den Signalweg, welcher für die Krebszellen wichtig ist. Bei den meisten Krebsarten könnte es jedoch von Wichtigkeit sein, die Signalwege an einem bestimmten Punkt zu blockieren oder überhaupt bestimmte Signalwege anzuvisieren. Eines der zentralen Ziele in der Krebsforschung ist die

Identifizierung von Genen, die im Zuge der malignen Tumorprogression verändert bzw. dereguliert werden (Izquierdo, 2005).

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurde spezifische si-RNA zur Blockierung der CD146-Expression verwendet, um Aussagen über Zusammenhänge zwischen Tumorzellen und deren Wachstumseigenschaften in Abhängigkeit zu diesem Protein treffen zu können.

1.4 Ziel und Hypothese

Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit ist es, herauszufinden, inwieweit die Blockierung der CD146-Proteinexpression mittels spezifischer si-RNA die Tumorzellproliferation einer COMM Zelllinie in-vitro hemmen kann.

Durch Erstellung einer Zeitkurve sollte der beste Zeitpunkt für die Transfektion mit si-RNA bestimmt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Zellen und Zellkultur

Es wurden primäre canine Melanomzelllinien verwendet, die von der Forschungsgruppe Onkologie der Pferdeklinik aus vier caninen Primärtumoren und zwei Metastasen zu einem Primärtumor etabliert wurden (Schmid et al., 2019). Des Weiteren wurde eine humane Melanomzelllinie SKMel 28 als Vergleichsprobe miteingeschlossen. Humane Zelllinien dienen als Kontrolle für den CD146- Antikörper (Schlagbauer-Wadl et al., 1999).

Das benötigte Gewebe zur Etablierung dieser Zelllinien wurde ursprünglich von COMM-Patienten der Klinik für Kleintiere der veterinärmedizinischen Universität Wien bzw. einer privaten Kleintierklinik mit der schriftlichen Einverständniserklärung der Besitzer, sowie in Übereinstimmung mit den Institutsrichtlinien bezüglich Gewebsexzision für therapeutische oder diagnostische Zwecke, welche für den wissenschaftlichen Gebrauch verwendet werden dürfen, entnommen.

Das Tumormaterial wurde mittels Feinnadelaspirationsbiopsie bzw. Biopsie gewonnen. Aliquote davon wurden auch einer histopathologischen Untersuchung unterzogen, die zu eindeutigen Diagnosen führte:

Tab. 3: canine Melanomzelllinien

Tumor von			Histopathologische Diagnose	Zelllinie daraus
Rasse	Geschlecht	Alter		
Mischling	Weiblich kastriert	11	Amelanotisches orales malignes Melanom (OMM), Primum, palatal	cRGO1
			Metastase rechter mandibulärer Lymphknoten	cRGO1.1
			Metastase linker mandibulärer Lymphknoten	cRGO1.2
Mischling	Männlich	15	Hoch aggressives, wenig pigmentiertes mandibuläres OMM (kaudal)	cRGO2
Papillon	Weiblich kastriert	11	Amelanotisches mandibuläres OMM (rostral)	cRGO3

Golden Retriever	Männlich	9	Mandibulares OMM	cRGO4
Spaniel	Männlich kastriert	11	Spindelzelliges OMM, palatal	cRGO5

Die canine maligne Melanomzelllinie „Shadow“ wurde von Dr. J.F. Modiano etabliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Ritt et al., 2000).

Für die Analyse wurden die primären Tumorzelllinien zunächst in Kultur gebracht (je 300.000 Zellen/Well in sechs Well-Platten). Als Nährmedium wurde DMEM Glutamax (#61965-026), supplementiert mit hitzeaktiviertem, fötalen Kälberserum (FCS, 10 %) und einem Antibiotikum (#15240-062) verwendet, das beim Umsetzen der Zellen oder bei Farbumschlag gewechselt wurde.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels händischer Auszählung in der Zählkammer. Um nicht nur eine quantitative Aussage treffen zu können, sondern auch den qualitativen Zustand miteinzubeziehen, wurden die Zellen mit 0,4 % Trypan-Blau-Lösung gefärbt. So konnte zwischen toten und lebenden Zellen unterschieden werden.

Die gewünschte Zelldichte für die Herstellung von Proteinlysaten betrug 300.000 Zellen per 6-Well. Beim Auszählen der Zellen wurden alle vier großen Eckquadrate ausgezählt, wobei die Zellzahl pro Eckquadrat mit dem Faktor 10.000 zu multiplizieren war, um die Zellzahl pro ml zu erhalten. Die Außenränder wurden in die Zählung miteinbezogen, die Innenränder hingegen nicht mitgezählt.

2.2 Transfektion

Inhibition der CD146-Expression in caninen Melanomzellen mittels siRNA

Für die Herabregulierung von CD146 wurden drei verschiedene siRNAs und eine Negativkontroll-siRNA verwendet:

Silencer select negative control siRNA#1	Ambion/LifeTech#AM4611	Lot ASO23FPI
Silencer select Custom siRNA #s530434	Ambion/LifeTech#43900827	Lot ASO25Y6Y
Silencer select Custom siRNA #s530435	Ambion/LifeTech#43900827	Lot ASO25Y6Z
Silencer select Custom siRNA #s530436	Ambion/LifeTech#43900827	Lot ASO25Y70

Die gelösten RNAi-duplex [100pmol/ μ l] wurden im Verhältnis 1:5 mit OptiMEM in Eppendorfröhrchen verdünnt. Um die optimale Konzentration für RNA-Interferenz zu erzielen, wurden verschiedene Konzentrationen getestet. Zur Vorbereitung von RNAi-duplex-Lipofectamine™ Komplexen wurde RNAi-duplex auf 30, 75 und 150 pmol in 500 μ l OptiMEM direkt in den Wells verdünnt. Somit erhielt man 3 verschiedene Konzentrationen der ausgewählten siRNAs sowie der Negativkontrolle. Zur Bildung des Transfektionskomplexes wurden jeweils 3,5 μ l Lipofectamine™ RNAiMAX/Well hinzugefügt. Nach sanftem Mischen wurde bei Raumtemperatur 20 Minuten inkubiert.

Zu dem RNAi duplex-Lipofectamine™ RNAiMAX-Komplexen wurden 2,5 ml der vorbereiteten Zellsuspension hinzugefügt, um ein finales Volumen von 3 ml und finale RNA-Konzentrationen von 10 nM, 25 nM und 50 nM zu erhalten:

Tab. 4: siRNAs

Negative control siRNA 10nM (1,5 μ l of 20pmo/ μ l dilution)	Negative control siRNA 25nM (3,75 μ l of 20pmo/ μ l dilution)	Negative control siRNA 50nM (7,5 μ l of 20pmo/ μ l dilution)
siRNA #s530434 10nM	siRNA #s530434 25nM	siRNA #s530434 50nM
siRNA #s530435 10nM	siRNA #s530435 25nM	siRNA #s530435 50nM
siRNA #s530436 10nM	siRNA #s530436 25nM	siRNA #s530436 50nM

Die Zellen wurden dann bei 37°C für 48 Stunden in einem CO₂-Inkubator inkubiert.

Die optimale Inkubationszeit wurde in einem weiteren Versuch mittels Zeitkurve für 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion mit siRNA ermittelt.

Nach Inkubation der Zellen mit siRNA wurden diese wieder lysiert. Anschließend erfolgte die Protein-Quantifizierung nach Bradford.

Das weitere Vorgehen basierte auf den Ergebnissen des Western Blots (WB) zur Bestimmung der optimalen siRNA-Konzentration. Die optimale Inkubationszeit und der Einfluss der CD146-Expression auf die Proliferation von caninen primären Melanomzellen wird in folgenden Transfektionsversuchen ermittelt.

Zeitkurve für 24/48/72 Stunden nach Transfektion si-RNA

Um die optimale Inkubationszeit mit si-RNA zu ermitteln, wurde eine Zeitkurve 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion erstellt. Das benötigte Material bestand wieder wie in Punkt 2.2 bereits beschrieben aus einer Negativkontrolle und drei verschiedenen si-RNAs sowie dem Transfektionsreagenz Lipofectamine® RNAiMAX. Es wurden die bereits zuvor beschriebenen si-RNAs mit einer Konzentration von 100 pmol/µL verwendet und 1:5 auf eine Konzentration von 20 pmol/µl in OptiMEM verdünnt.

Das Ablösen der Zellen erfolgte wie zuvor mit 0,05 % Trypsin – EDTA und die Resuspension in Medium mit FCS. Anschließend wurden die Zellen gezählt und bei einer Konzentration von 250.000 Zellen in 2,5 ml Medium verdünnt, um 100.000 Zellen/ml in einer 6-Well-Platte zu erhalten.

Es wurden je eine Negativkontrolle, eine Positivkontrolle, eine unbehandelte Probe sowie die si-RNA-Konzentration mit der höchsten Expressionsinhibition von CD146 für die Zeitpunkte 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion verwendet. Als weitere Kontrolle wurde die humane Melanomzelllinie SKMel28 verwendet. Beim darauffolgenden WB wurde die humane Kontrolle nicht immer miteinbezogen, da ein teils zu starkes β-Aktin-Signal andere Signale verdeckte. Die Zellen wurden bei 37 C für jeweils 24, 48 und 72 Stunden in einem CO₂ –Inkubator inkubiert, um eine Zeitkurve zu erstellen. Nach 24, 48 bzw. 72 Stunden Inkubation der Zellen mit si-RNA, wurden wiederum die Proteine mittels Lysis-Puffer isoliert. Anschließend erfolgte die Protein-Quantifizierung nach Bradford und die Durchführung eines WB zur Beurteilung der optimalen Inkubationszeit für die Inhibition von CD146.

Für den Proliferationsversuch erfolgte die Transfektion in 12-Well-Platten und Reagenzien wurden entsprechend der Wachstumsfläche/Well reduziert.

2.3 Western Blot

Probenvorbereitung

Zellyse mittels Lyse-Puffer

Durch den Aufschluss der Zellen mittels Lyse-Puffer wurden die Proteine herausgelöst. Als Lyse-Puffer wurden für 100 ml folgende Inhaltsstoffe verwendet:

Tab. 5: Lyse-Puffer

	Für 100 ml
0,14M NaCl (58,44g /mol)	0,81816 g
0,2M Triethanolamin (149,19g /mol)	2,9383 g
0,5 % NP-40 (Igepal CA-630)	0,5 ml
0,2 % Na-deoxycholat	0,2 g
Ph 7,4 (eingestellt mit HCl)	

Zu diesem Puffergemisch wurde ein Protease-Inhibitor-Cocktail (PIM) 1:1000 hinzugefügt.

Vor der Isolierung der Proteine wurden die Zellen zweimal mit 1ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und für 2-3 Minuten auf Eis gestellt. Es wurden 200 µl des Lyse-Puffers in jedes Well hinzugefügt.

Danach erfolgte ein Transfer der Lysate in Eppendorfröhrchen und dreimaliges Schockgefrieren. Nach dem Zentrifugieren bei 14.000 rpm/15 min/4°C wurde der Überstand wieder in neue Eppendorfröhrchen überführt.

Bradford-Protein-Quantifizierung

Der Bradford-Test ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen bis zu Konzentrationen im Bereich Mikrogramm pro Milliliter. Die Methode basiert auf einer Bindung zwischen einem Farbstoff namens Coomassie Brilliant Blue G-250 und Proteinen, wodurch es zu einer Veränderung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm kommt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm wird gemessen und ist zugleich ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung (Bradford, 1976).

Mittels diesem standardisiertem Verfahren konnte die Proteinkonzentration für die ausgewählten COMM-Proben gemessen werden. Hierzu benötigte man als Standardprotein bovines Serumalbumin (BSA), des weiteren Lyse-Puffer, H₂O sowie den Farbstoff (Protein Assay Fa. Biorad #500-0006) in 1:5 Verdünnung.

Der BSA-Standard ist ein geeigneter Standard, wenn die Proben überwiegend Albumin enthalten bzw. das zu untersuchende Protein ein ähnliches Färbeverhalten aufweist. Er ist in Konzentrationen von 0,125-2 mg/ml bereits vorverdünnt (Bio Rad Laboratories Inc., http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2969.pdf - Zugriff 21.06.2019).

Die Verdünnungsreihen für die Standardkurve und die Proben selbst wurden als vierfacher Ansatz angefertigt. Der Blank-Wert enthielt kein Protein und diente als Vergleichswert.

Für die Absorptionsmessung wurde eine 96-well-Platte verwendet, die Proben sowie der Blank-Wert und die Verdünnungen wurden für Dreifachbestimmung pipettiert, wobei die

Ränder der Platte ausgelassen wurden, um Messfehler zu vermeiden. Dann wurde die Absorption bei 595 nm photometrisch gemessen.

Aus der Proteinbestimmung ergab sich die Menge an Probenmaterial und Lyse-Puffer, die bei einer Proteinmenge von 10 µg und einem Totalvolumen von 30 µl für den Western Blot benötigt wird.

Bevor die Proben mit dem Lyse-Puffer in den berechneten Mengen vermischt wurden, wurde dem Lyse-Puffer noch ein Protease-Inhibitor (PIM) 1:1000 beigemischt.

Der 3xNatriumdodecylsulfat (SDS) Blue Ladepuffer (NEB#B7703S) diente zur gleichmäßigen negativen Ladung der Proteine, um diese anschließend entsprechend ihrer Größe zu trennen. Es wurden zwei Teile Ladepuffer und ein Teil der Probe gemischt und für 5 Minuten auf 99°C erhitzt, danach auf Eis abgekühlt und auf die Gele aufgetragen.

Western Blot: Gelproduktion

Für die Gelproduktion wurden 30 % Acrylamid/Bisacrylamid (Roth #3029.1) - Trenngele in 10%iger und Sammelgele in 5%iger Konzentration für 1,5 mm Dicke hergestellt (siehe Tab. 6 und 7). Der Gelgießstand wurde zusammengebaut und die Trenngele wurden gegossen, mit Butanol überschichtet und ca. 30 Minuten ausgehärtet. Danach wurde das Butanol mit Wasser ausgespült, getrocknet und die Sammelgele wurden gegossen. Die Kämme wurden sofort eingesteckt und die Gele ca. 20 Minuten ausgehärtet.

Tab. 6: Trenngel und Trenngelpuffer

Gelkonzentration	10 %	Trenngelpuffer	Für 200 ml
destilliertes Wasser	6,71 ml	1,5M Tris (121,14 g/Mol)	36,43g
30% A/BA Mischung	6,03 ml	0,4% (w/v) SDS	0,8g
Trenngelpuffer	4,68 ml	pH 8,8 mit HCl	Lagerung 4°C
10% Ammoniumpersulfat (APS)	180 µl		
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	18 µl		

Tab. 7: Sammelgel und Sammelgelpuffer

Gelkonzentration	5 %	Sammelgelpuffer	Für 200 ml
------------------	-----	-----------------	------------

destilliertes Wasser	5,1 ml	0,5M Tris (121,14 g/Mol)	12,114g
30% A/BA Mischung	1,25 ml	0,4% (w/v) SDS	0,8g
Sammelgelpuffer	1,02 ml	pH 6,8 mit HCl	Lagerung 4°C
10% APS Lösung	75 µl		
TEMED	7,5 µl		

Western Blot: Gelelektrophorese

Die Gele wurden in die Apparatur eingebaut und die Kammern innen mit 1x Laufpuffer (siehe Tab. 8) vollgefüllt, außen so viel, dass die Gele im Puffer standen.

Tab. 8: Laufpuffer

10x Laufpuffer (10xSDS-PAGE running buffer)	
15,02 g Tris	
75,1 g Glycin	
5g SDS	
destilliertes Wasser (A.dest.) ad 500 ml	Lagerung 4°C
1x SDS-PAGE Laufpuffer	25mM Tris
verdünnt mit A.dest.	200mM Glycin
	0,1% (w/v) SDS

Da die äußeren Lanes immer Randeffecte zeigen, wurden wichtige Proben eher mittig platziert. Für die Interpretation von Western Blots benötigt man Marker. Diese wurden eher an den Rand platziert.

Als Marker wurden verwendet:

->Page ruler prestained Protein Ladder Plus (#SM1819, Fermentas)

->Spectra multicolor broad range protein (#26634, ThermoScientific)

Die vorbereiteten Proben inkl. Marker wurden auf die Gele aufgetragen und die Elektrophorese bei 100 Volt gestartet, bis die Proben durch das Sammelgel gelaufen waren, danach wurde auf 150 Volt für ca. eine Stunde erhöht.

Western Blot: Übertragung der Proteine auf die Membran = Blotten

Die Gele wurden aus den Platten herausgenommen und in einen Blotting-Puffer für 10 Minuten äquibriert. Nach Rehydratisierung in Methanol wurden die PVDF-Membranen (Immobilon P Millipore #IPVH304F0) ebenfalls in Blotting-Puffer zum Äquilibrieren eingelegt. Die Whatman-Filterpapiere (#3030917) wurden in Gelgröße zugeschnitten. Danach wurden Schwamm, Filterpapier, Gel und Membran zum Blotten aufgebaut. Alle Bestandteile wurden gut mit Blotting-Puffer befeuchtet. Geblottet wurde auf Eis und mit Coolpacks bei 100 Volt für ca. eine Stunde.

Western Blot: Blockieren

Nach dem Blotten wurden die Membranen 10 Minuten in 1x phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) gewaschen und anschließend mit einer Blocking-Lösung (siehe Tab. 9) eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Es wurden dabei unspezifische Bindungsstellen blockiert, um zu erreichen, dass die Antikörper nur spezifisch binden.

Tab. 9: Blocking-Lösung

Blockinglösung	500 ml
Trockenmilchpulver (#A0830,0500)	14 g
0,1% Tween 20 (BioRad #170-6531)	0,5 ml
1x PBS	500 ml

Dann wurden die Membranen gespült und mit dem Primär-Antikörper, der in Blocking-Lösung verdünnt wurde, bei 4°C über Nacht am Schüttelinkubator inkubiert.

Für die Versuche wurden folgende primäre und sekundäre Antikörper verwendet:

Tab. 10: primäre und sekundäre Antikörper

primäre Antikörper	Katalog#	Verdünnung	kD
Anti-Mel Cam (P1H12) [0,5 µg/µl]	eBioisciences/ThermoFischer #14-1469-82	1:10.000	113-130
Anti-CD146 (EPR3208) [0,123 µg/µl]	Abcam #ab75769	1:10.000	113-130

Beta-Actin (AC-74) 2ml	Sigma #A5316	1:5.000	42
CD146 Rabbit polyclonal [0,2 µg/µl]	Abcam #ab28360-100	1:4.000	
MelCam (A32) [1 µg/µl]	Millipore/Upstate #05-755	1:10.000	
sekundäre Antikörper	Katalog#	Verdünnung	
Anti-mouse [10µg/ml]	Super Signal Western Femto	1:1.000	
Anti-rabbit [10µg/ml]	Super Signal Western Femto	1:1.000	
Anti-rat – HRP	GE Healthcare (Amersham)	1:5.000 – 1:10.000	

Grundsätzlich band der primäre Antikörper an das gesuchte Protein und wurde dann durch einen sekundären Antikörper mittels Farbstoff oder Enzym nachgewiesen.

Um auf dem Gel verbliebene Proteine nachzuweisen, wurde dieses mit einem Farbstoff (page blue protein staining solution) am Schüttelinkubator über Nacht inkubiert und am nächsten Tag mehrere Male mit Wasser gewaschen.

Western Blot: Detektion

Nachdem die Membranen über Nacht mit primären Antikörpern inkubiert hatten, wurden die Membranen 2x 10 Minuten mit Blocking-Lösung am Schüttelinkubator gewaschen. Danach wurden die Membranen mit dem verdünnten sekundären Antikörper für 30 Minuten inkubiert. Der nächste Schritt war das Waschen: 2x 10 Minuten mit Blocking-Lösung, dann 1x 10 Minuten mit 1x PBS am Schüttelinkubator.

Zur Visualisierung wurden die Membranen mit einem Substrat Super Signal West Femto (#34095) 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dabei händisch geschüttelt.

Nach der Inkubation wurden die Membranen abgetropft und die Antikörper-Proteinkomplexe via FluorChemImager (Biozym, Wien) visualisiert und fotografiert.

2.4 Proliferation caniner primärer Melanomzellen nach CD146-Expressionsinhibition

Um das Wachstumsverhalten von COMM nach Expressionsinhibition von CD146 mittels si-RNA zu ermitteln, wurde die cRGO1-Zellen 0, 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion analysiert. Es wurden bei beiden Versuchen je 5.000 Zellen/Well/ml in einer 12-Well-Platte ausgesät. Die Messung der Zellzahl erfolgte mittels NucleoCounter® NC – 250™ von Chemometec mit lebend/tod-Farbstoff (Acridinorange/DPI) in zwei unabhängigen Versuchen in Duplikaten.

2.5 Statistik

Ob Werte bei $p < 0.05$ normalverteilt waren, wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test (<https://www.socscistatistics.com/tests/kolmogorov/>) berechnet. Ob normalverteilte Werte signifikant voneinander abwichen, wurde mittels Varianzanalyse (Anova; <https://www.socscistatistics.com/tests/anova/>) untersucht.

3. Ergebnisse

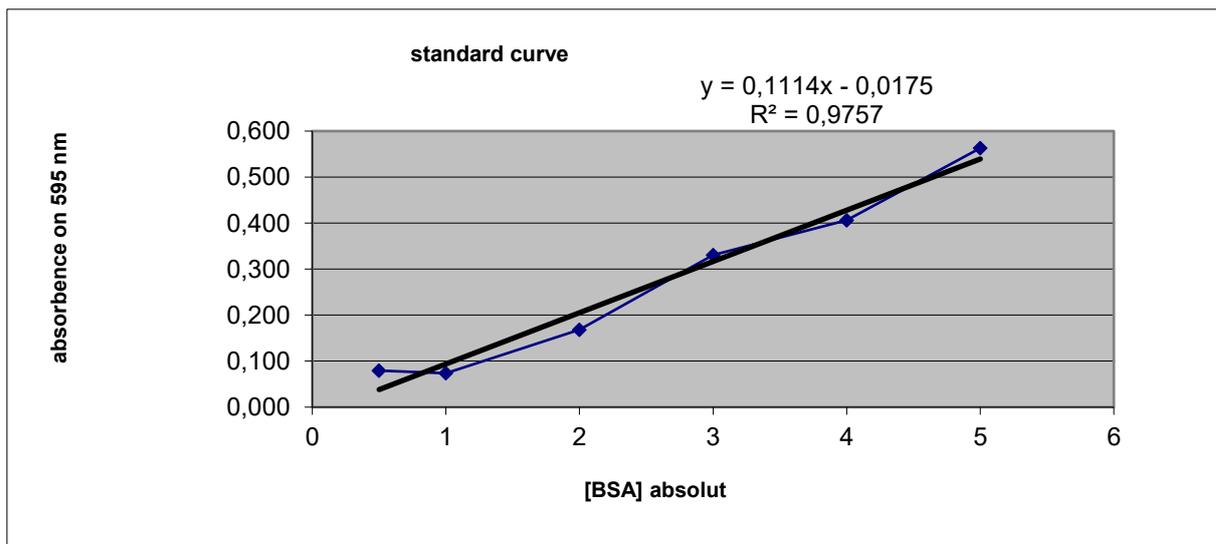
3.1 CD146-Nachweis

Für die Detektion von CD146 wurden die Zellen geerntet und zunächst mit Lysis-Puffer lysiert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Proteine mittels Bradford-Test. Folgende Proteinkonzentrationen wurden gemessen:

Tab. 11: Ergebnisse des Bradford-Tests

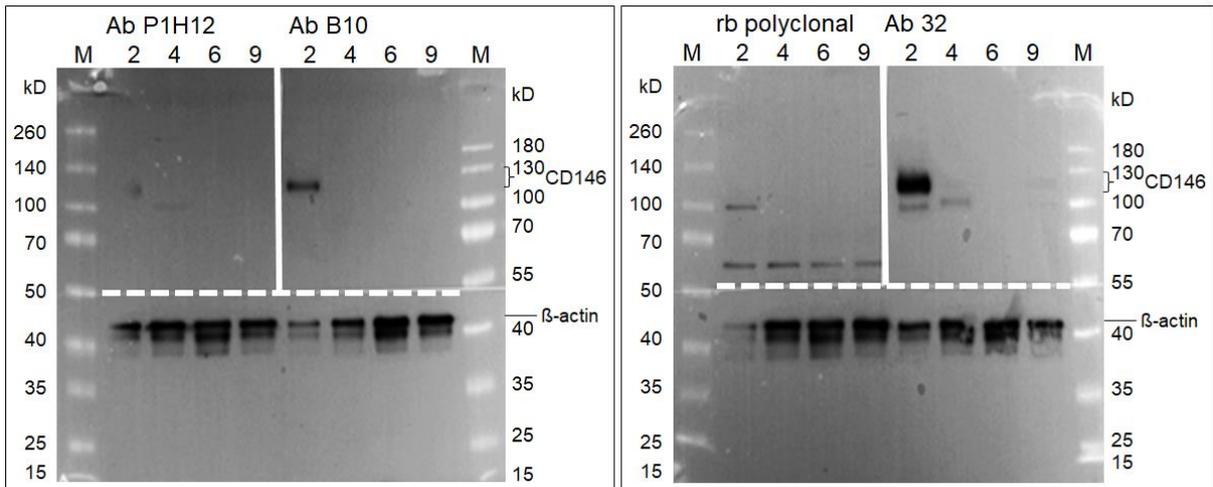
<u>Zellen</u>	<u>Passage</u>	<u>Optische Dichte (mittlere OD)</u>	<u>[Protein] µg / µl</u>
cRGO1	33	0,28	0,5378
cRGO1.1	35	0,53	0,9891
cRGO1.2	36	0,25	0,4816
cRGO2	37	0,48	0,8928
cRGO3	19	0,17	0,3349
cRGO4	39	0,19	0,3708
cRGO5	3	0,24	0,4618
Shadow	35	0,33	0,6222
SKMel 28	62	0,57	1,0574

Abb. 1: Die erhaltene Standardkurve belegte die technisch korrekte Durchführung des Bradford-Tests:



Im Anschluss wurden alle Zelllinien mittels Western Blot auf Anwesenheit des Proteins CD146 getestet, um die Zelllinie mit der höchsten CD146-Expression herauszufiltern und mit dieser dann weiter arbeiten zu können. Der Versuch wurde nicht-reduzierend (ohne Dithiothreitol) für je 5 µg Protein pro Lane erfolgreich durchgeführt:

Abb. 2: CD146-Western Blot unter Verwendung unterschiedlicher Antikörper



Lane 2: SKMe128; 4: cRGO1; 6: cRGO1.1; 9: Shadow; M- Marker

Tab. 12: Im Western Blot verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Kilo Dalton
Monoclonal mouse-anti-human CD146 Clone P1H12	1:10000	113-130
Monoclonal mouse-anti-human CD146 Clone B10	1:4000	113-130
Polyclonal rabbit-anti-human CD146	1:4000	113-130
Monoclonal mouse-anti-human CD146 Clone A32	1:10000	113-130
Monoclonal mouse-anti-human Beta-Actin Clone AC-74	1:3000	42

Bei allen Proben wies die Ladekontrolle (β -Actin) ein Signal in der korrekten Höhe von 42 kD auf (Abb. 2 untere Fotoabschnitte). Dies zeigte, dass das Experiment technisch korrekt durchgeführt worden war. Von den getesteten anti-CD146 Antikörpern (siehe Tabelle 12 und Abb. 2) reagierte der Klon A32 am deutlichsten und band nicht nur an humanes, sondern auch an canines CD146. Dies war etwa bei Klon B10 nicht der Fall. Klon P1H12 lieferte ein

insgesamt negatives Ergebnis, während der polyklonale Kaninchenantikörper (rb polyclonal) auch unspezifisch band, jedoch nur humanes CD146 spezifisch detektierte.

Punkto CD146-Expression in caninen Zellen wies cRGO1 das einzige, deutlich positive Ergebnis auf, weshalb mit dieser primären Zelllinie weitergearbeitet wurde.

3.2. Expressionsinhibition von CD146 mittels siRNA

Wie im Methodenteil beschrieben wurden verschiedene siRNAs (#34, #35 und #36) zur CD146-Expressionsinhibition mit unterschiedlichen Konzentrationen (10, 25 und 50nM) getestet. Eine Negativkontrolle für die jeweiligen Konzentrationen sowie eine Vergleichskontrolle (SKMe128) und Lysat unbehandelter Zellen wurden mit einbezogen.

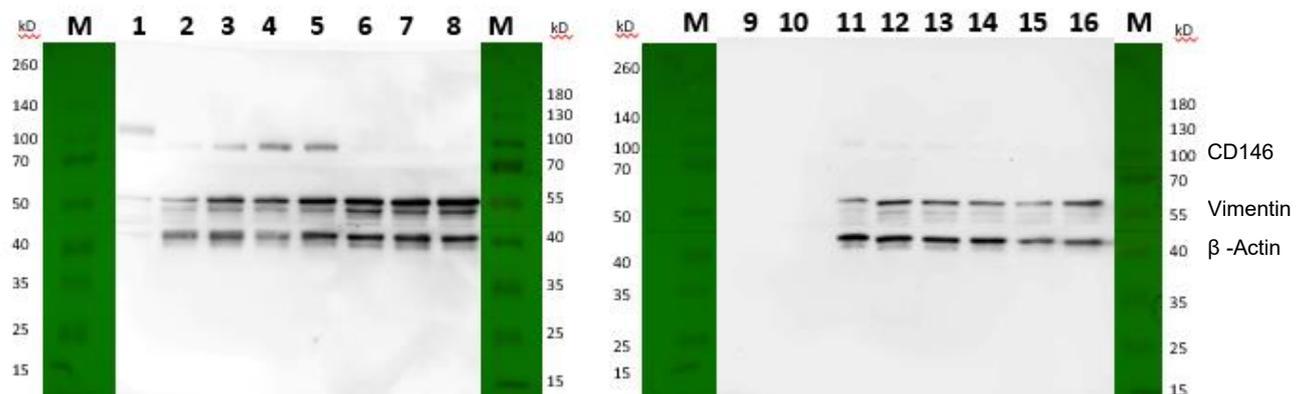
Die Ergebnisse zeigen, dass siRNA #s530434, 35 und 36 bei allen Konzentrationen die Expression von CD146 deutlich inhibierten (6-8, 11-16). Die drei Negativkontrollen (3,4 und 5), die ein deutliches Signal zeigten, bestätigten diese Beobachtung.

Für die Erstellung der Zeitkurve wurde im weiteren Verlauf die RNA #s530434 in der Konzentration 10nM (6) eingesetzt. Vimentin wurde hier neben β -Aktin als zusätzliche Kontrolle detektiert (Schmid et.al, 2019).

Abb. 3a und b: Inhibition der CD146-Expression durch siRNA

Abb.: 3a

Abb.: 3b



M Marker, **Lane 1:** SKMe128- p62, **2:** cRGO1 p35, **3:** cRGO1 p35 – siRNA –Ko 10nM, **4:** cRGO1 p35 – siRNA –Ko 25nM, **5:** cRGO1 p35 – siRNA –Ko 50nM, **6:** cRGO1 p35 – siRNA #34 10nM, **7:** cRGO1 p35 – siRNA #34 25nM, **8:** cRGO1 p35 – siRNA #34 50nM

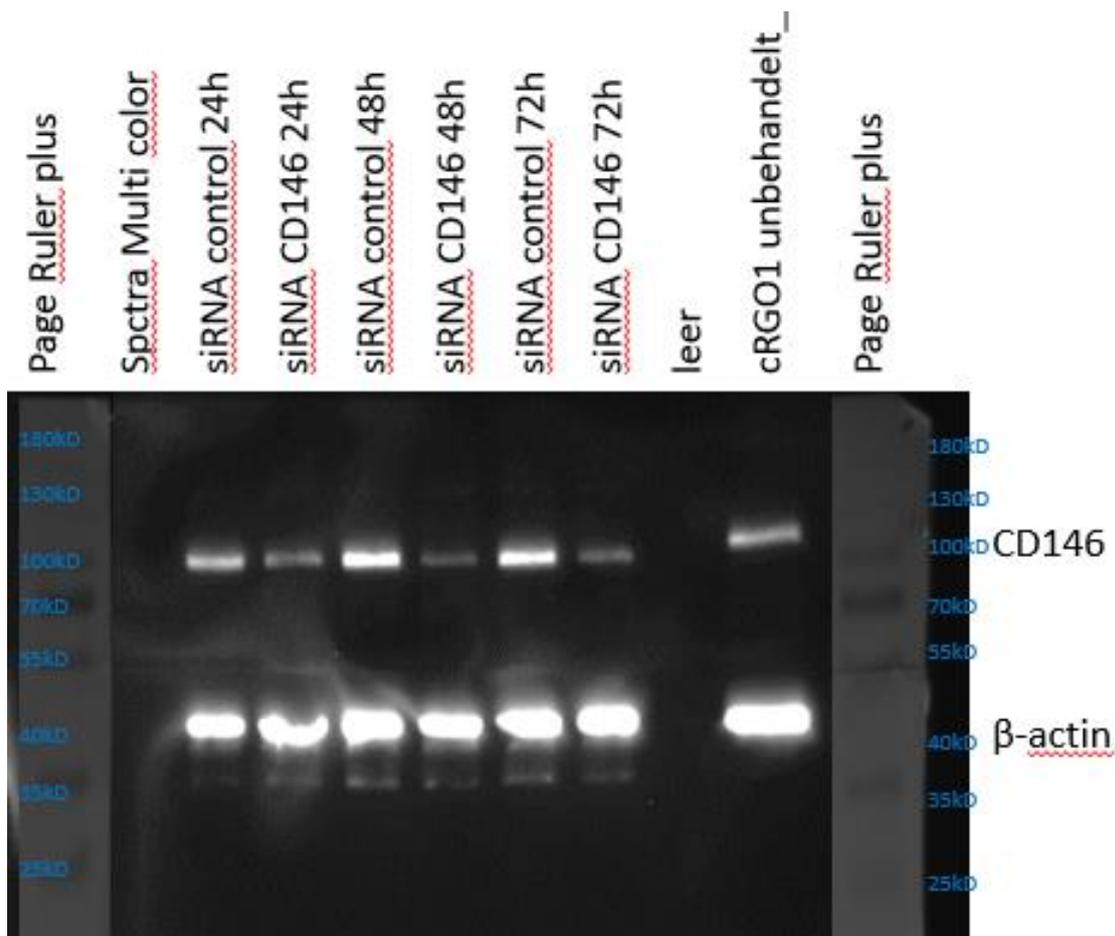
9: leer – Farbstoff in PBS, **10:** leer – Farbstoff in PBS, **11:** cRGO1 p35 – siRNA #35 10nM, **12:** cRGO1 p35 – siRNA #35 25nM, **13:** cRGO1 p35 – siRNA #35 50nM, **14:** cRGO1 p35 – siRNA #36 10nM, **15:** cRGO1 p35 – siRNA #36 25nM, **16:** cRGO1 p35 – siRNA #36 50nM

3.3. Zeitkurve für 24/48/72 Stunden nach Transfektion

Um den besten Zeitrahmen für die CD146-Inhibition mittels siRNA zu ermitteln, wurde eine Zeitkurve für 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion erstellt.

Die Beta-Aktin-Ladekontrolle ergab für alle Proteinlysate ein sehr deutliches, positives Signal in Form einer Bande bei 42 kD, die β -Aktin entsprach. Eine deutliche Reduktion der CD146-Expression konnte 48 h und 72h nach Transfektion mit siRNA erreicht werden.

Abb. 4: Inhibition der CD146-Expression 24, 48 und 72h nach siRNA-Transfektion



3.4. Proliferationsverhalten caniner oraler maligner Melanomzellen nach siRNA-vermittelter Herabregulierung von CD146

Um zu ermitteln, inwieweit CD146 Einfluss auf die Zellproliferation hat, wurde die Expression dieses Protein mittels siRNA in cRGO1 inhibiert bzw. nicht inhibiert und dann wurden die Zellen zu Beginn sowie 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion mit siRNA gezählt. Zwischen lebenden und toten Zellen wurde mittels Dapi/Acridinorange-Färbung differenziert. Tabelle 13 zeigt die Viabilität der unterschiedlich behandelten Zellen über den gesamten Zeitverlauf. Diese lag zwischen 94 und 99,7 %, war damit konstant hoch und unabhängig von der Art der Behandlung stabil.

Tab. 13: Viabilität der unterschiedlich behandelten cRGO1 im Zeitverlauf

		CD146 siRNA	Viabilität in %	Kontroll-siRNA	Viabilität in %	Transfektionskontrolle	Viabilität in %	unbehandelt	Viabilität in %
0h #1	Gesamtzellzahl	53020	94,3	53020	94,3	53020	94,3	53020	94,3
		51440	97,2	51440	97,2	51440	97,2	51440	97,2
	Lebendzellzahl	50000		50000		50000		50000	
		50000		50000		50000		50000	
0h #2	Gesamtzellzahl	53020	94,3	53020	94,3	53020	94,3	53020	94,3
		51440	97,2	51440	97,2	51440	97,2	51440	97,2
	Lebendzellzahl	50000		50000		50000		50000	
		50000		50000		50000		50000	
24h #1	Gesamtzellzahl	102000	94,0	116000	97,5	107000	96,9	104000	97,3
		115000	96,0	129000	96,7	102000	94,0	102000	94,0
	Lebendzellzahl	97500		113000		103000		101000	
		111000		125000		95700		96200	
24h #2	Gesamtzellzahl	122000	98,8	105000	92,8	117000	98,0	118000	97,6
		130000	96,0	101000	98,1	88600	95,7	99000	97,6
		121000		97200		114000		115000	

	Lebendzellularzahl	125000		99500		84800		96700	
48h #1	Gesamtzellzahl	140000	98,0	244000	97,7	200000	96,9	208000	97,3
		140000	98,6	206000	98,2	171000	96,1	151000	99,1
	Lebendzellzahl	137000		238000		194000		202000	
		138000		202000		164000		149000	
48h #2	Gesamtzellzahl	136000	94,1	170000	98,6	159000	98,2	171000	97,8
		103000	94,9	182000	98,4	180000	98,4	162000	99,7
	Lebendzellzahl	127000		168000		156000		167000	
		97600		179000		177000		161000	
72h #1	Gesamtzellzahl	134000	97,2	387000	97,9	340000	96,1	325000	97,7
		199000	96,2	502000	97,6	285000	97,5	295000	96,8
	Lebendzellzahl	130000		379000		327000		317000	
		191000		490000		278000		286000	
72h #2	Gesamtzellzahl	145000	96,7	389000	97,9	305000	97,2	297000	98,1
		118000	96,4	363000	98,4	255000	97,0	274000	96,7
	Lebendzellzahl	140000		381000		296000		291000	
		114000		357000		248000		265000	

Tabelle 14 verdeutlicht den Einfluss der CD146-Herabregulierung auf die Proliferation der lebenden Zellen.

Tab. 14: CD146-Inhibition hemmt die Proliferation von cRGO1

	CD146-siRNA	Mittelwert	Standardabweichung	Kontroll-siRNA	Mittelwert	Standardabweichung	Transfektionskontrolle	Mittelwert	Standardabweichung	unbehandelt	Mittelwert	Standardabweichung
0h #1	50000	50000	0	50000	50000	0	50000	50000	0	50000	50000	0
	50000			50000			50000					
0h #2	50000	50000	0	50000	50000	0	50000	50000	0	50000	50000	0
	50000			50000			50000					
24h #1	97500	113625	7211	113000	108675	12924	103000	99375	12288	101000	102225	8785
	111000			125000			95700			96200		
24h #2	121000	113625	7211	97200	108675	12924	114000	99375	12288	115000	102225	8785
	125000			99500			84800			96700		
48h #1	137000	124900	18865	238000	196750	30934	194000	172750	16601	202000	169750	22765
	138000			202000			164000			149000		
48h #2	127000	124900	18865	168000	196750	30934	156000	172750	16601	167000	169750	22765

#2	97600			179000			177000			161000		
72h	130000	143750	33270	379000	401750	59830	327000	287250	33079	317000	289750	21376
#1	191000			490000			278000			286000		
72h	140000			381000			296000			291000		
#2	114000			357000			248000			265000		

Vergleicht man die Zellzahlen, die 48 und 72h nach Transfektion mit CD146-inhibierender (grün) bzw. nicht inhibierender siRNA (blau) ermittelt wurden, erkennt man einen negativen Einfluss der CD146-Inhibition auf die Zellproliferation. Dieser konnte auch statistisch belegt werden.

CD146-inhibierte cRGO1 proliferierten nach 48h ($p = 0,0009$) und 72h ($p = 0,0001$) signifikant weniger als mit Kontroll-siRNA transfizierte cRGO1 (Abb. 5).

Abb. 5: Signifikant verringerte Proliferation von cRGO1 nach CD146-siRNA-Behandlung



***: Differenz statistisch signifikant mit $p < 0.0001$.

4. Diskussion

Wie schon einleitend beschrieben, handelt es sich bei CD146 um ein Zelladhäsionsmolekül – in Englisch „cell adhesion molecule“, was die alternative Bezeichnung „CAM“ und bei Melanomzellen „MCAM“ erklärt. Im Laufe der Zeit hat man herausgefunden, dass CD146 nicht nur wichtig für die Bindung von Zellen aneinander und an die Matrix ist, sondern auch bei vielen Krebserkrankungen eine wichtige Rolle spielt (Elshal et al., 2005; Shih, 1999; Wang and Yan, 2013). Besonders interessant ist, dass CD146 vermehrt an der Oberfläche von Endothelzellen jener Blutgefäße zu finden ist, die primäre humane Melanome und Metastasen versorgen (Johnson et al., 1996). Inzwischen weiß man, dass CD146 nicht nur an der Migration humaner Melanomzellen bis in die Blutgefäße beteiligt ist, sondern auch dafür benötigt wird, dass diese Zellen die Blutbahn wieder verlassen und Metastasen ausbilden können (Jouve et al., 2015). Da es sich also bei CD146 um ein sehr wichtiges Molekül handelt, das an der Pathogenese und Metastasierung von humanen Melanomen beteiligt ist, hat man begonnen, die Rolle von CD146 auch im caninen malignen Melanom zu untersuchen. In Vorarbeiten zu dieser Studie wurde gezeigt, dass 100% untersuchter histologischer Schnitte von COMMs und daraus etablierter Tumorzelllinien CD146 exprimierten. Eine Korrelation von CD146-Expression mit Migration konnte in den Zelllinien allerdings nicht beobachtet werden (Schmid et al., 2019). In dieser Arbeit wurde nun versucht, zu ermitteln, ob die Expression von CD146 Einfluss auf die Proliferation primärer caniner Melanomzellen hat.

In einem ersten Schritt wurde die primäre COMM-Zelllinie mit der höchsten CD146-Expression mittels Westernblot identifiziert. Dies war wie schon bei Schmid et al. (2019) cRGO1. Mittels Durchflusszytometrie hatte man da gezeigt, dass über 80% aller cRGO1 Zellen CD146 exprimierten. Entsprechend wurde mit dieser Zelllinie weitergearbeitet.

In einem nächsten Schritt wurde versucht, die Expression von CD146 in cRGO1-Zellen zu inhibieren. Das geschah auf mRNA –Ebene mit Hilfe so genannter „small interfering RNA“. Diese wurden so designed, dass sie an bestimmte Abschnitte der CD146-mRNA binden und damit die Translation zum CD146-Protein verhindern. Alle drei siRNAs, die gewählt wurden, zeigten in Vorversuchen CD146-inhibierende Wirkung, so dass eine Fortsetzung des Projekts mit jeder der drei Sonden möglich war. Es wurde dann mit siRNA #34 weitergearbeitet, da diese in der höchsten Konzentration vom Hersteller generiert worden war. Neben dieser inhibierenden siRNA wurde auch eine Kontroll-siRNA verwendet. Sie wurde erfolgreich darauf getestet, dass sie nicht an CD146-mRNA bindet. Entsprechend war es nun möglich, den Einfluss der CD146-Expression auf die Proliferation von cRGO1-Zellen zu messen.

Es konnte gezeigt und statistisch belegt werden, dass die Herabregulierung von CD146 großen Einfluss auf die Proliferation von cRGO1-Zellen hatte. Schon 48 Stunden nach Transfektion mit CD146-inhibierender siRNA lag die durchschnittliche Lebendzellzahl nur noch bei 124900 im Vergleich zu 196750 Kontrollzellen. Nach 72h war der Unterschied zwischen CD146-siRNA- und Kontroll-siRNA-behandelten Zellen punkto Proliferation mit 143750 gegenüber 401750 Zellen noch größer. Diese Daten lassen also darauf schließen, dass cRGO1-Zellen CD146 für ihre Proliferation benötigen.

Eine Verallgemeinerung dieser Ergebnisse ist momentan noch nicht möglich, weil erst eine primäre COMM-Zelllinie untersucht worden ist und auch keine in vivo Studien zu dieser Fragestellung gemacht wurden. Sofern das hier präsentierte Ergebnis durch weitere Untersuchungen bestätigt werden kann, wäre es aber denkbar, die Inhibition von CD146 beim caninen Melanom therapeutisch zu nutzen.

5. Zusammenfassung

Diese wissenschaftliche Arbeit hatte zum Ziel, Zusammenhänge zwischen Proteinexpression des Zelladhäsionsmolekül CD146 und dem Wachstum von caninen oralen malignen Melanomzellen aufzuzeigen. Nach Schmid et al. (2019) wird das Protein CD146 auf der Zelloberfläche und intrazellulär von caninen Melanomzellen und Metastasen exprimiert, fehlt jedoch bei benignen Muttermalen (Lei et al., 2015). Diese Merkmale lassen vermuten, dass die Expression von CD146 eine Rolle bezüglich Invasivität, Progression und Prognose von caninen oralen malignen Melanomen spielen könnte. Aufgrund der Aggressivität und hohen Metastasierungs- und Mortalitätsrate, die diese Art von Tumoren bei Hunden aufweisen, gilt es nach Ursachen und vor allem weiteren Therapiemöglichkeiten zu forschen.

Aus verschiedenen, histopathologisch charakterisierten caninen Melanomzelllinien wurde jene mit der höchsten CD146-Expression ermittelt und für die weiteren Versuche verwendet. Für die Herabregulierung von CD146 wurden verschiedene siRNAs sowie unterschiedliche Zeitpunkte für die Transfektion mit siRNA mittels Zeitkurve getestet. Das weitere Vorgehen basierte auf der Durchführung von Western Blots zur Bestimmung der optimalen siRNA-Konzentration, der optimalen Inkubationszeit und Einfluss der CD146-Expression auf die Proliferation von caninen primären Melanomzellen.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Zelllinie cRGO1 die höchste CD146-Expression aufwies. Die Inhibition der Expression wurde mit allen verwendeten siRNAs #s530434,35 und 36 in den jeweiligen Konzentrationen 10, 25 und 50 nM erzielt. Die weiteren Versuche wurden mit siRNA #s530434 in der Konzentration 10 nM vorgenommen. Achtundvierzig und 72 h nach Transfektion mit siRNA #34 wurde die Herabregulierung der Expression von CD146 am deutlichsten.

Bezüglich dem Proliferationsverhalten caniner oraler maligner Melanomzellen nach siRNA-vermittelter Herabregulierung von CD146 konnte mittels Auszählung der Gesamtzellzahl sowie Lebendzellzahl nach 0, 24, 48 und 72h gezeigt werden, dass die Proliferation von cRGO1 durch CD146-Inhibition signifikant gehemmt wurde. CD146-inhibierte cRGO1-Zellen proliferierten nach 48h und 72h signifikant weniger als mit Kontroll-siRNA transfizierte cRGO1. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Proliferation von cRGO1-Zellen unter anderem von CD146 abhängig ist und durch Inhibition dieses Proteins mittels siRNA das Wachstumsverhalten von caninen oralen malignen Melanomzellen vermutlich generell beeinflusst werden kann. Diese Erkenntnis könnte sich als wertvoll in Hinblick auf zukünftige Therapiemöglichkeiten beim caninen oralen malignen Melanom erweisen.

6. Summary

The aim of the thesis was to assess correlations between expression of the cell adhesion protein CD146 and proliferation of primary canine oral malignant melanoma cells.

According to Schmid et al. (2019) the expression of CD146 occurs on the surface of and within canine melanoma cells and metastases.

These features presume that CD146 expression may serve as diagnostic marker with respect to invasiveness, progression and prognosis of canine oral malignant melanoma.

Due to the aggressiveness and high metastatic potential of these canine neoplasms, further research is needed regarding their etiology and innovative treatment options.

Different canine melanoma cell lines were tested for CD146 expression. The cell line with highest expression rate was used in further experiments.

The downregulation of CD146 was executed with different siRNAs and also at different points to generate a time curve revealing the optimum siRNA incubation time. Western Blots were used to identify the ideal siRNA concentrations and incubation time and also to evaluate the impact of CD146 expression on proliferation of canine primary melanoma cells.

The results showed that the highest expression of CD146 was found in cell line cRGO1. The inhibition of expression was achieved by all used siRNAs (#s530434, 35 and 36) at all concentrations assessed (10, 25 and 50 nM). SiRNA #s530434 at a concentration of 10 nM was used in further experiments. Inhibition of CD146 expression by this siRNA was most effective 48 and 72 hours post infection. Regarding the proliferation behavior of canine oral malignant melanoma cells after CD146 downregulation by siRNA, total and living cell counting revealed that the proliferation of cRGO1 cells was blocked by CD146-inhibition.

In conclusion, proliferation of cRGO1 cells depended on CD146 expression, suggesting that canine oral malignant melanoma cells may need CD146 for their proliferation. Provided that this assumption can be confirmed, inhibition of CD146 may be an interesting treatment strategy for canine oral malignant melanoma in the future.

7. Literaturverzeichnis

- Almela, R.M., Anson, A., 2019. A Review of Immunotherapeutic Strategies in Canine Malignant Melanoma. *Vet Sci* 6.
- Bergman, P.J., Kent, M.S., Farese, J.P., 2013. Melanoma, in: Withrow, S.J., Vail, D.M., Page, R.L. (Eds.), *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. Elsevier/Saunders, St. Louis, Missouri, USA, pp. 321-334.
- Owen, L. N, World Health Organization. *Veterinary Public Health Unit & WHO Collaborating Center for Comparative Oncology*. (1980). *TNM Classification of Tumours in Domestic Animals/ edited by L.N. Owen*. World Health Organization
- Bergman, P.J., McKnight, J., Novosad, A., Charney, S., Farrelly, J., Craft, D., Wulderk, M., Jeffers, Y., Sadelain, M., Hohenhaus, A.E., Segal, N., Gregor, P., Engelhorn, M., Riviere, I., Houghton, A.N., Wolchok, J.D., 2003. Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: a phase I trial. *Clin Cancer Res* 9, 1284-1290.
- Bolon, B., Calderwood Mays, M.B., Hall, B.J., 1990. Characteristics of canine melanomas and comparison of histology and DNA ploidy to their biologic behavior. *Vet Pathol* 27, 96-102.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Eickhoff, 2005. *Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde bei Klein-und Heimtieren*, Enke Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co KG, *Maligne orale Tumoren* 11, 179.
- Elshal, M.F., Khan, S.S., Takahashi, Y., Solomon, M.A., McCoy, J.P., Jr., 2005. CD146 (Mel-CAM), an adhesion marker of endothelial cells, is a novel marker of lymphocyte subset activation in normal peripheral blood. *Blood* 106, 2923-2924.
- Goldschmidt, M., Goldschmidt, K., 2017. Epithelial and melanocytic tumors of the skin, in: Meuten, D. (Ed.), *Tumors in domestic animals*, 5th ed. John Wiley & Sons Inc.
- Haasnoot, J., Westerhout, E.M., Berkhout, B., 2007. RNA interference against viruses: strike and counterstrike. *Nat Biotechnol* 25, 1435-1443.
- Harvey HJ, MacEwen EG, Braun D, Patnaik AK, Withrow SJ, Jongeward S (1981) Prognostic criteria for dogs with oral melanoma. *J Am Vet Med Assoc* 178, 580-582.
- Herring, E.S., Smith, M.M., Robertson, J.L., 2002. Lymph node staging of oral and maxillofacial neoplasms in 31 dogs and cats. *J Vet Dent* 19, 122-126.

- Izquierdo, M., 2005. Short interfering RNAs as a tool for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 12, 217-227.
- Johnson, J.P., Rummel, M.M., Rothbacher, U., Sers, C., 1996. MUC18: A cell adhesion molecule with a potential role in tumor growth and tumor cell dissemination. *Curr Top Microbiol Immunol* 213 (Pt 1), 95-105.
- Jouve, N., Bachelier, R., Despoix, N., Blin, M.G., Matinzadeh, M.K., Poitevin, S., Aurrand-Lions, M., Fallague, K., Bardin, N., Blot-Chabaud, M., Vely, F., Dignat-George, F., Leroyer, A.S., 2015. CD146 mediates VEGF-induced melanoma cell extravasation through FAK activation. *Int J Cancer* 137, 50-60.
- Kessler, M., 2012. *Kleintieronkologie: Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen von Hund und Katze*, 3rd ed. Enke.
- Khan, N., Khan, M.K., Almasan, A., Singh, A.D., Macklis, R., 2011. The evolving role of radiation therapy in the management of malignant melanoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 80, 645-654.
- Koenig, A, Wojcieszyn, J, Weeks, BR, Modiano, JF: Expression of S-100a, vimentin, NSE, and melan A/MART-1 in seven canine melanoma cells lines and twenty-nine retrospective cases of canine melanoma. *Vet Pathol* 38:427–435, 2001
- Laprie, C., Abadie, J., Amardeilh, M.F., Net, J.L., Lagadic, M., Delverdier, M., 2001. MIB-1 immunoreactivity correlates with biologic behaviour in canine cutaneous melanoma. *Vet Dermatol* 12, 139-147.
- Lehmann, J.M., Riethmuller, G., Johnson, J.P., 1989. MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9891-9895.
- Luca, M., Hunt, B., Bucana, C.D., Johnson, J.P., Fidler, I.J., Bar-Eli, M., 1993. Direct correlation between MUC18 expression and metastatic potential of human melanoma cells. *Melanoma Res* 3, 35-41.
- Mahmood, T., Yang, P.C., 2012. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* 4, 429-434.
- Nishiya, A.T., Massoco, C.O., Felizzola, C.R., Perlmann, E., Batschinski, K., Tedardi, M.V., Garcia, J.S., Mendonca, P.P., Teixeira, T.F., Zaidan Dagli, M.L., 2016. Comparative Aspects of Canine Melanoma. *Vet Sci* 3.
- O'Keefe, E.P., 2013. siRNAs and shRNAs: tools for protein knockdown by gene silencing. *Materials and Methods*, 197.

- Ritt, M.G., Mayor, J., Wojcieszyn, J., Smith, R., Barton, C.L., Modiano, J.F., 2000. Sustained nuclear localization of p21/WAF-1 upon growth arrest induced by contact inhibition. *Cancer Lett* 158, 73-84.
- Schmid, F., Brodesser, D., Reifinger, M., Forte, S., Semp, P., Eberspacher-Schweda, M.C., Wolschek, M., Brandt, S., Kleiter, M., Pratscher, B., 2019. Canine oral primary melanoma cells exhibit shift to mesenchymal phenotype and phagocytic behaviour. *Vet Comp Oncol*.
- Schlagbauer-Wadl, H., Jansen, B., Müller, M., Polterauer, P., Wolff, K., Eichler, H.-G., Pehamberger, H., Konakand, E. and Johnson, J.P. (1999), Influence of MUC18/MCAM/CD146 expression on human melanoma growth and metastasis in SCID mice. *Int. J. Cancer*, 81: 951-955.
- Sers, C., Kirsch, K., Rothbacher, U., Riethmuller, G., Johnson, J.P., 1993. Genomic organization of the melanoma-associated glycoprotein MUC18: implications for the evolution of the immunoglobulin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8514-8518.
- Shih, I.M., 1999. The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology. *J Pathol* 189, 4-11.
- Simpson, R.M., Bastian, B.C., Michael, H.T., Webster, J.D., Prasad, M.L., Conway, C.M., Prieto, V.M., Gary, J.M., Goldschmidt, M.H., Esplin, D.G., Smedley, R.C., Piris, A., Meuten, D.J., Kiupel, M., Lee, C.C., Ward, J.M., Dwyer, J.E., Davis, B.J., Anver, M.R., Molinolo, A.A., Hoover, S.B., Rodriguez-Canales, J., Hewitt, S.M., 2014. Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 27, 37-47.
- Smedley, R.C., Lamoureux, J., Sledge, D.G., Kiupel, M., 2011. Immunohistochemical diagnosis of canine oral amelanotic melanocytic neoplasms. *Vet Pathol* 48, 32-40.
- Stalin, J., Vivancos, L., Bardin, N., Dignat-George, F., Blot-Chabaud, M., 2017. MCAM and its Isoforms as Novel Targets in Angiogenesis Research and Therapy, in: D., S., A., S. (Eds.), *physiologic and pathologic angiogenesis - signaling mechanisms and targeted therapy*, 1 ed. InTech, 51000 Rijeka, Croatia.
- Watson-Hurst, K., Becker, D., 2006. The role of N-cadherin, MCAM and beta3 integrin in melanoma progression, proliferation, migration and invasion. *Cancer Biol Ther* 5, 1375-1382.
- Williams, L.E., Packer, R.A., 2003. Association between lymph node size and metastasis in dogs with oral malignant melanoma: 100 cases (1987-2001). *J Am Vet Med Assoc* 222, 1234-1236.
- Withrow, S.J., Vail, D., Page, R.L., 2013. *Specific Malignancies in the Small Animal Patient, Small Animal Clinical Oncology*, 5 ed. Elsevier Saunders, St. Luis, Missouri 63043 USA.

Yin, S., Nolte, I., 2014. Onkologie, Praxisleitfaden Hund und Katze 3. ed. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG.

Lei, X., Guan, C., Song, Y. *et al.* The multifaceted role of CD146/MCAM in the promotion of melanoma progression. *Cancer Cell Int* 15, 3 (2015) doi:10.1186/s12935-014-0147-z

8. Tabellen – und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: WHO Krankheitsstadien

Tabelle 2: Chemotherapeutika

Tabelle 3: canine Melanomzelllinien

Tabelle 4: siRNAs

Tabelle 5: Lyse-Puffer

Tabelle 6: Trenngel und Trenngelpuffer

Tabelle 7: Sammelgel und Sammelgelpuffer

Tabelle 8: Laufpuffer

Tabelle 9: Blocking-Lösung

Tabelle 10: primäre und sekundäre Antikörper

Tabelle 11: Ergebnisse des Bradford-Tests

Tabelle 12: Im Western Blot verwendete Antikörper

Tabelle 13: Viabilität der unterschiedlich behandelten cRGO1 im Zeitverlauf

Tabelle 14: CD146-Inhibition hemmt die Proliferation von cRGO1

Abbildung 1: technisch korrekte Durchführung des Bradford-Tests anhand der Standardkurve

Abbildung 2: CD146-Western Blot unter Verwendung unterschiedlicher Antikörper

Abbildung 3a + b: Inhibition der CD146-Expression durch siRNA

Abbildung 4: Inhibition der CD146-Expression 24, 48 und 72 h nach siRNA-Transfektion

Abbildung 5: signifikant verringerte Proliferation von cRGO1 nach CD146-siRNA-Behandlung

9. Abkürzungsverzeichnis

APS.....	Ammoniumpersulfatlösung
ATP.....	Adenosintri-phosphat
BSA.....	bovines Serumalbumin
COMM.....	canine orale maligne Melanome
DC.....	dendritische Zellen
EDTA.....	Ethylendiamintetraacetat
FCS.....	hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum
dsRNA.....	doppelsträngige RNA
MCAM.....	Melanomzelladhäsionsmolekül
miRNA.....	micro RNA
mRNA.....	messenger RNA
NS.....	Nukleinsäure
OMM.....	orales malignes Melanom
PBS.....	phosphatgepufferte Salzlösung
PIM.....	Proteaseinhibitor
RISC.....	RNA induzierter Silencing-Komplex
RNAi.....	RNA Interferenz
SDS.....	Natriumdodecylsulfat
siRNA.....	small interfering RNA
shRNA.....	short hairpin RNA
TEMED.....	Tetramethylendiamin
WB.....	Western Blot
WHO.....	World Health Organization