

# Evaluation einer neuen murinen Hautmelanomzelllinie als potentielles Mausmodell für das intraokuläre Melanom

Marta M. Kilian<sup>1</sup>, Karin U. Löffler<sup>1</sup>, Hans E. Grossniklaus<sup>2</sup>, Frank G. Holz<sup>1</sup>, Christiane Pfarrer<sup>3</sup>, Christian Kurts<sup>4</sup>, Martina C. Herwig<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universitäts-Augenklinik Bonn, Universität Bonn, Deutschland <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Emory University, Atlanta, GA, USA,

<sup>3</sup>Anatomisches Institut, Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland <sup>4</sup>Institute für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie, Universität Bonn, Deutschland

Marta.Kilian@ukb.uni-bonn.de

## Zielsetzung

- Ziel dieser Studie war die Charakterisierung der Wachstums- und Metastasierungseigenschaften von intravitreal injizierten HCmel12-Zellen, welche eine neue, murine, kutane Melanomzelllinie darstellen und sich durch eine hohe Entzündungszellinfiltration, angiotropes Wachstum und spontanes Metastasierungsverhalten auszeichnen.
- Durch den Vergleich mit Eigenschaften von B16LS9-Zellen, welche intraokulär injiziert das einzige bisher etablierte metastasierende Aderhautmelanom-Modell darstellen, sollte die Eignung von HCmel12-Zellen für ein murines Aderhautmelanom-Modell evaluiert werden.

## Methoden

- Untersuchungen wurden an zwanzig CX<sub>3</sub>Cr1-GFP knock-in Mäusen durchgeführt, welche eine einseitige intravitreale Injektion von jeweils 1x10<sup>5</sup> HCmel12 (n=10) oder B16LS9 Zellen (n=10) erhielten (Tag 0).
- Enukleierte Augen (Tag 9 HCmel12; Tag 5 B16LS9) wurden histologisch (H&E, PAS) auf PAS-positive Strukturen, Immunzellinfiltrate, intraokuläre Wachstumseigenschaften und extraokuläre Anteile untersucht und vergleichend beurteilt.
- Je zwei CX<sub>3</sub>Cr1-GFP knock-in Mäuse erhielten eine subkutane Injektion von 1x10<sup>5</sup> HCmel12- bzw. B16LS9-Melanomzellen und wurden an Tag 10 euthanasiert.
- Nach Euthanasie (Tag 42 HCmel12; Tag 28 bzw. 73-91 B16LS9) wurden die Metastasen histologisch und immunhistochemisch (HMB45/Melan-A-Marker) identifiziert.

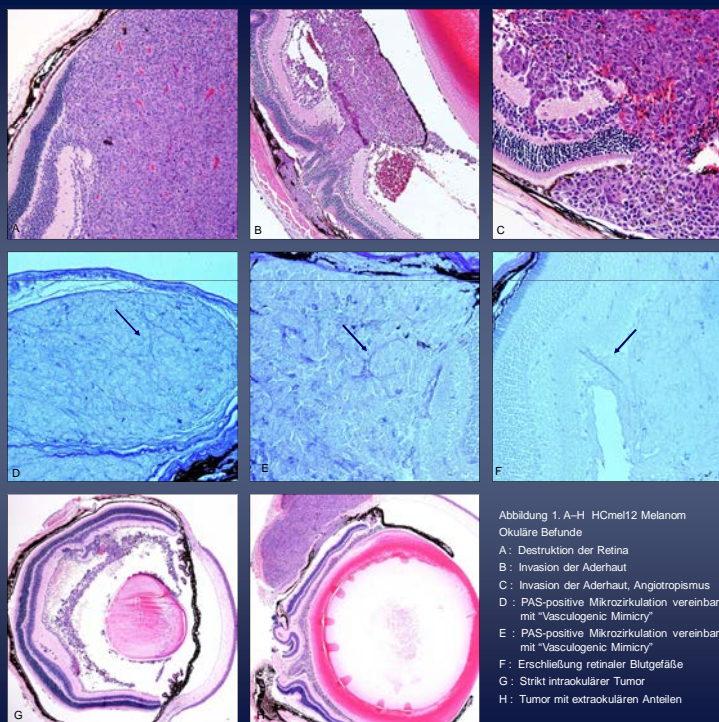
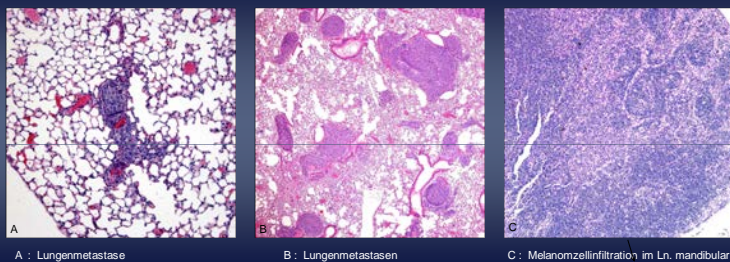


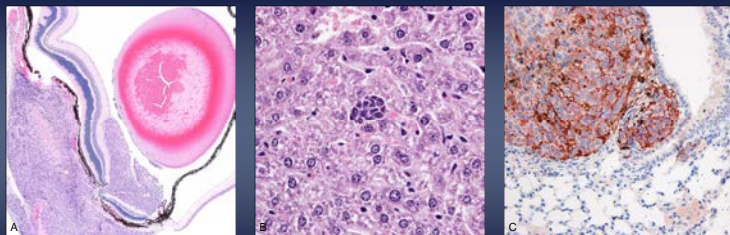
Abbildung 1. A-H HCmel12 Melanom Okuläre Befunde  
A: Destruktion der Retina  
B: Invasion der Aderhaut  
C: Invasion der Aderhaut, Angiotropismus  
D: PAS-positive Mikrozirkulation vereinbar mit "Vasculogenic Mimicry"  
E: PAS-positive Mikrozirkulation vereinbar mit "Vasculogenic Mimicry"  
F: Erschließung retinaler Blutgefäße  
G: Strikingly intraokulärer Tumor  
H: Tumor mit extraokulären Anteilen

Abbildung 2. A-C HCmel 12 Metastasen:



A: Lungenmetastase B: Lungenmetastasen C: Melanozellinfiltration im Ln. mandibularis

Abbildung 3. A-C B16 LS9 Melanom:



A: Okulärer Tumor mit extraokulären Anteilen B: Mikrometastase in der Leber C: Immunhistochemisch (HMB45/Melan-A Marker) positive Metastase in der Lunge

## Ergebnisse

- HCmel12-Zellen zeichneten sich aus durch solides Tumorstadium mit aggressiven Wachstumseigenschaften: Destruktion der Retina, Invasion der Aderhaut, Angiotropismus, teilweise extraokuläre Ausbreitung (**Abb.1A-C**).
- Histologisch zeigten sie Entzündungszellinfiltrate und verschiedene Formen der Mikrozirkulation: Erschließung retinaler Blutgefäße und Bildung blutführender Strukturen aus extrazellulärer Matrix (**Abb.1D-F**).
- Bei fünf mit HCmel12-Zellen inokulierten Augen blieb Tumorstadium auf das Auge beschränkt, wohingegen weitere fünf Augen extraokuläre Anteile aufwiesen (**Abb.1G-H**). B16LS9-Tumorstadium blieb in zwei Fällen auf das Augeninnere beschränkt, in acht Augen fanden sich extraokuläre Anteile.
- Metastasen von HCmel12-Tumoren fanden sich in Lungen und drainierenden Lymphknoten (**Abb.2A-C**), für B16LS9 zusätzlich in der Leber (**Abb.3B-C**).
- Die Metastasierungsrate für HCmel12-Zellen betrug 30%, wobei Metastasen ausschließlich in Mäusen mit extraokulären Anteilen des Primärtumors auftraten.
- Metastasen nach subkutaner Injektion konnten für beide Zelllinien in den drainierenden Lymphknoten, der Lunge, der Leber und der Milz gefunden werden. Damit unterschieden sich die sekundären Manifestationsorte zwischen der subkutanen und intravitrealen Injektion nicht wesentlich.

## Schlussfolgerungen

- Intravitreal injizierte HCmel12-Zellen führten zu malignem Tumorstadium mit Entzündungszellinfiltraten und Bildung von blutführenden, matrixreichen Strukturen, die "Vasculogenic Mimicry" vermuten lassen.
- Ein rein hämatogener Metastasierungsweg, wie er für das humane uveale Melanom beschrieben ist, erscheint für HCmel12-Zellen unwahrscheinlich, da keine Metastasierung bei strikt intraokulären Tumoren erfolgte. Letztere fand somit vermutlich unter Beteiligung des Lymphsystems der Orbita statt.
- Bis zum Zeitpunkt der Enukleation nimmt das intraokuläre Mikromilieu demnach keinen Einfluss auf die Art der Dissemination der Melanomzellen und deren Kolonisation in sekundären Manifestationsorten.
- Damit eignen sich HCmel12-Melanomzellen nur bedingt als potentielles Modell für das humane metastasierende uveale Melanom, allerdings weisen sie melanomtypische Wachstumseigenschaften auf und erlauben somit Untersuchungen zur allgemeinen Tumorbilologie.

## Literatur

- Diaz, C. E., D. Rusciano, et al. (1999). "B16LS9 melanoma cells spread to the liver from the murine ocular posterior compartment (PC)." *Curr. Eye Res.* 18(2): 125-9.
- Dithmar, S., D. Rusciano, et al. (2000). "A new technique for implantation of tissue culture melanoma cells in a murine model of metastatic ocular melanoma." *Melanoma Res.* 10(1): 2-8.
- Dithmar, S., D. M. Albert, et al. (2000). "Animal models of uveal melanoma." *Melanoma Res.* 10(3): 195-211.

## Unterstützt von



DOG 2013 - Potentielle Interessenkonflikte  
1. nein 2. nein 3. nein 4. Bontor 5. nein