

Wissenschaftliche Reihe der Klinik für Pferde

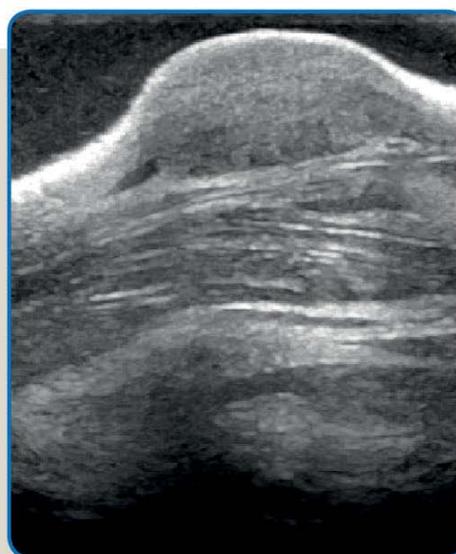
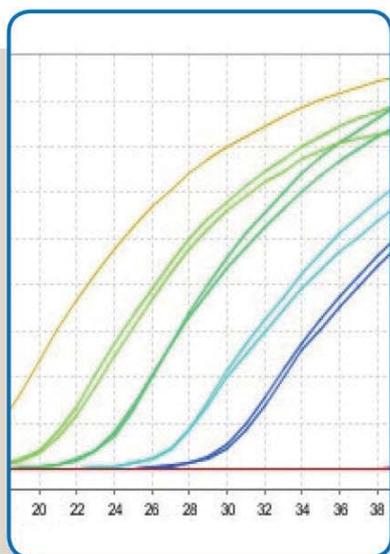
Herausgegeben von
Karsten Feige, Peter Stadler,
Harald Sieme, Bernhard Ohnesorge



Patrick Steinig

Langzeiteffekte der Behandlung equiner Melanome und Charakterisierung des Zytokinexpressionsprofils gesunder Pferde

Eine Studie zur Interleukin 12 und 18 Gentherapie *in vivo*



STIFTUNG TIERÄRZTLICHE HOCHSCHULE HANNOVER

27



Patrick Steinig

**Langzeiteffekte der Behandlung equiner Melanome
und Charakterisierung des
Zytokinexpressionsprofils gesunder Pferde**

**Eine Studie zur Interleukin 12 und
18 Gentherapie *in vivo***



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2017

Zugl.: Hannover (TiHo), Univ., Diss., 2017

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2017

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2017

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier aus nachhaltiger Forstwirtschaft.

ISBN 978-3-7369-9547-5

eISBN 978-3-7369-8547-6



Tierärztliche Hochschule Hannover

Langzeiteffekte der Behandlung equiner Melanome und
Charakterisierung des Zytokinexpressionsprofils gesunder Pferde

Eine Studie zur Interleukin 12 und 18 Getherapie *in vivo*

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
- Doctor medicinae veterinariae -
(Dr. med. vet.)

vorgelegt von
Patrick Steinig
Essen

Hannover 2017



Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Karsten Feige
Priv.-Doz. Dr. Jessika-M. V. Cavalleri
Klinik für Pferde

1. Gutachterin: Priv.-Doz. Dr. Jessika-M. V. Cavalleri
2. Gutachterin: Prof. Dr. Stefanie Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Mai 2017



Für meine Eltern
als Dank für ihre bedingungslose Unterstützung





Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

C.L. Schnabel, P. Steinig, H.-J. Schuberth, M. Koy, B. Wagner, B. Wittig, C. Juhls, S. Willenbrock, H. Murua Escobar, P. Jaehnig, K. Feige, J.-M. V. Cavalleri:

Influences of age and sex on leukocytes of healthy horses and their ex vivo cytokine release. *Veterinary Immunology and Immunopathology*; Volume 165, Issues 1–2, 15 May 2015, Pages 64-74, ISSN 0165-2427, DOI: 10.1016/j.vetimm.2015.02.011.

C.L. Schnabel, P. Steinig, M. Koy, H.-J. Schuberth, C. Juhls, D. Oswald, B. Wittig, S. Willenbrock, H. Murua Escobar, C. Pfarrer, B. Wagner, P. Jaehnig, A. Moritz, K. Feige, J.-M. V. Cavalleri:

Colour matters: immunological responses immunological responses of grey and non-grey horses to DNA constructs complexed with a cationic transfection reagent; Clinical Research Awards, selected Abstracts, European Veterinary Conference 2015, Amsterdam, Netherlands.





Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 Equine Melanome	2
2.2 Tumorimmunologie	4
2.2.1 Tumorzellelimination	4
2.2.2 Zelluläres Immunsystem	4
2.2.3 Funktion ausgewählter Zytokine in der Tumorimmunologie	7
2.2.3.1 Interleukin 2 (IL-2)	7
2.2.3.2 Interleukin 4 (IL-4)	8
2.2.3.3 Interleukin 10 (IL-10)	9
2.2.3.4 Interleukin 12 (IL-12)	10
2.2.3.5 Interleukin 18 (IL-18)	11
2.2.3.6 Interferon gamma (IFN γ)	13
2.2.3.7 CC-Motiv-Chemokin Ligand 2 (CCL2)	13
2.2.3.8 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 2 (CXCL2)	14
2.2.3.9 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8 (CXCL8)	15
2.2.3.10 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10 (CXCL10)	16
2.2.4 Tumorescape	16
2.3 Melanomtherapien bei Pferden	18
2.3.1 Konventionelle Therapie	18
2.3.2 Immuntherapie	18
2.4 DNA-Vektoren	20
2.5 MIDGE [®] -Vektoren	21
3 Material und Methode	23
3.1 Langzeiteffekte nach Behandlung mit MIDGE [®] -Vektoren	23
3.1.1 Pferde	23
3.1.2 Allgemeine klinische Untersuchung und Labordiagnostik	25
3.1.3 Größenmessung der Melanome	26
3.2 Klinische Studie zur Messung der Zytokinexpression nach intradermaler Applikation von MIDGE [®] -Vektoren	28
3.2.1 Vorversuche	28
3.2.1.1 Erstellung von Standardreihen (SYBR [®] Green)	28
3.2.1.2 Probenmaterial	30
3.2.1.3 Isolierung der RNA	30
3.2.1.4 Qualitäts- und Quantitätsbestimmung von RNA- und cDNA-Proben	31
3.2.1.5 Erzeugung komplementärer DNA	32
3.2.1.6 Konventionelle Polymerasekettenreaktion	33
3.2.1.7 Gelelektrophorese	36
3.2.1.8 Isolation der PCR Produkte	37
3.2.1.9 Klonierung und Transformation von <i>Escherichia coli</i>	38



3.2.1.10	Anzucht in Subkultur	39
3.2.1.11	Plasmidgewinnung	39
3.2.1.12	Sequenzierung	40
3.2.1.13	Restriktion der Plasmide	41
3.2.1.14	Verdünnung der Standardreihen	42
3.2.2	Primeroptimierung SYBR® Green PCR.....	43
3.2.3	Klinischer Versuch	45
3.2.3.1	Pferde.....	45
3.2.3.2	Behandlungsgruppen	45
3.2.3.3	Klinische Untersuchung.....	47
3.2.3.4	Labordiagnostische Untersuchung.....	48
3.2.3.5	Versuchsablauf.....	48
3.2.3.6	Probenentnahme	50
3.2.3.6.1	Blutproben	50
3.2.3.6.2	Hautbiopsien	50
3.2.3.7	RNA-Extraktion.....	51
3.2.3.7.1	Extraktion aus Blutproben.....	51
3.2.3.7.2	Extraktion aus Hautbiopsien	52
3.2.3.8	Messung der RNA-Qualität und -Quantität.....	54
3.2.3.9	Kontrolle der Reinheit der RNA-Proben	56
3.2.3.10	Zusätzliche Aufbereitung der RNA für Messung von IL-12.....	56
3.2.3.10.1	Zusätzliche DNase-Verdauung	57
3.2.3.10.2	Restriktionsverdauung der RNA-Proben.....	58
3.2.3.11	Erzeugung einer cDNA zur Analyse in der real-time PCR.....	59
3.2.3.12	Real-time SYBR® Green PCR.....	59
3.3	Statistische Auswertung	60
3.3.1	Statistisches Testverfahren zur Auswertung der Langzeiteffekte nach Behandlung mit MIDGE®-Vektoren.....	61
3.3.2	Klinische Studie zur Messung der Zytokinexpression nach Applikation von MIDGE®-Vektoren.....	62
4	Ergebnisse	64
4.1	Langzeiteffekte nach Behandlung mit MIDGE®-Vektoren.....	64
4.1.1	Besitzeranamnese	64
4.1.2	Allgemeine klinische und labordiagnostische Untersuchungen	65
4.1.3	Vermessung der Melanome.....	65
4.1.3.1	Tumorzellen lokal unbehandelter Tumore.....	66
4.1.3.2	Tumormessungen lokal intradermal behandelte Tumore	67
4.1.3.3	Vergleich lokal behandelte und unbehandelte Tumore	69
4.2	Klinische Studie zur Messung der Zytokinexpression nach Applikation von MIDGE®-Vektoren bei gesunden Pferden.....	70
4.2.1	Ausschluss von der statistischen Analyse	70
4.2.1.1	Versuchspferde	70
4.2.1.2	Nicht exprimierte Zytokine	70
4.2.1.3	Expression von IL-12.....	70
4.2.2	Untersuchung der systemischen Immunreaktion	71
4.2.3	Untersuchung der lokalen Immunreaktion	71



5	Diskussion.....	75
5.1	Langzeiteffekte nach Behandlung mit MIDGE [®] -Vektoren.....	75
5.1.1	Einfluss der Messtechnik auf die Ergebnisse.....	75
5.1.2	Unerwünschte Langzeitwirkungen	76
5.1.3	Tumorzvolumenentwicklung	76
5.2	Messung der Zytokinexpression nach Applikation von MIDGE [®] -Vektoren ...	79
5.2.1	Begrenzung der Aussagekraft von quantitativen mRNA-Analysen	79
5.2.2	Fehlender Nachweis von Zytokinen	79
5.2.3	Transfektionsnachweis	81
5.2.4	Immunstimulierende Komponenten der Vektoren.....	84
5.2.4.1	Einfluss des Transfektionsreagenz SAINT-18.....	84
5.2.4.2	Einfluss der CpG-Motive auf die Immunantwort	85
5.2.4.3	Einfluss der doppelsträngigen DNA.....	85
5.2.4.4	Einfluss der transgenen Expression (IL-12 und IL-18)	86
5.2.4.5	Erklärung einer möglichen antitumoralen Wirkung	87
5.3	Fazit.....	89
6	Zusammenfassung	91
7	Summary.....	93
8	Literaturverzeichnis	95
9	Anhang.....	145
9.1	Geräte	145
9.2	Klinikbedarf.....	146
9.3	Laborbedarf	146
9.4	Reagenzien	147
9.5	Kits	148
9.6	Enzyme	148
9.7	Biologische Materialien.....	149
9.8	Kulturmedien	149
9.9	Rohdaten.....	151
10	Danksagung.....	158



Abkürzungsverzeichnis

Einheiten

°C	Grad Celsius
cm ³	Kubikcentimeter
g	Gramm
Hz	Hertz
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Mol
m	Milli
m	Meter
n	Nano
μ	Mikro

Fellfarben

B	Brauner
F	Fuchs
R	Rappe
S	Schimmel

Sonstige Abkürzungen

APC	Antigenpräsentierende Zellen
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CCL	CC-Motiv-Chemokin Ligand
cDNA	Komplementäre DNA
CHO-Zellen	Zellen aus Ovarien des chinesischen Hamsters



CpG	Cytosin und Guanin getrennt durch Phosphat
CTL	Zytotoxische T-Zellen
CXCL	CXC-Motiv-Chemokin Ligand
CXCR	CXC-Motiv-Chemokin Rezeptor
DC	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethyl sulfoxide (CH ₃) ₂ SO
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
eq	Equin
ELR+	Untergruppe der CXC-Motiv-Chemokine, mit N-terminalen Aminosäurekette aus Glutamin, Leucin und Arginin
GM-CSF	recombinant Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
gp100	Glykoprotein100
h.	Human
ID	Identifikation
i.d.	Intradermal
i.m.	Intramuskulär
ICAM-I	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRF	Interferon Regulatory Factor
Max.	Maximal
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIDGE	Minimalistic Immunogenically Defined Gene Expression
Min.	Minimal



NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFκB	Nuclear Factor kappa B
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
PBMC	Periphere mononukleäre Zellen
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
qPCR	Quantitative real-time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.c.	Subkutan
SAINT-18	Synthetic, Amphiphilic, INTeractive (1-methyl-4-(cis-9-dioleyl) methyl-pyridinium-chloride)
TAM	Tumorassoziierte Makrophagen
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	Transforming Growth Factor
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tyr	Tyrosinase
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid



1 Einleitung

Beim equinen Melanom handelt es sich um einen Hauttumor des Pferdes, der insbesondere aufgrund seiner hohen Prävalenz bei Schimmeln von Bedeutung ist [1, 2]. Da keine erfolgsversprechenden Therapiemöglichkeiten bestehen, haben MÄHLMANN et al. (2012) Schimmel mit equinen Melanomen mit einer DNA-basierten Immuntherapie mit MIDGE[®]-Vektoren behandelt [3]. Die Studie fand im Jahr 2010 einen vorläufigen Abschluss. Es konnte dargestellt werden, dass die Gentherapie sicher war sowie eine Remission der Tumorumfänge hervorgerufen hat. Basierend auf diesen Erkenntnissen, wird der von MÄHLMANN et al. [3] erprobte Therapieansatz in der vorliegenden Studie weiterverfolgt.

Der erste Teil dieser Studie befasst sich mit der weiteren Entwicklung der durch MÄHLMANN et al. (2012) behandelten Pferde [3]. Insbesondere ist die Tumorentwicklung in der Langzeitperspektive zu evaluieren und zu prüfen, ob unerwünschte Langzeitwirkungen der Therapie aufgetreten sind.

Weiterhin soll in einem zweiten Teil der immunologische Wirkmechanismus der Therapie weiter erforscht werden. Diesbezüglich soll untersucht werden, ob die genutzten MIDGE[®]-Vektoren equine Gewebe *in vivo* transfizieren. Zusätzlich stellt die Identifizierung der immunstimulierenden Komponenten der verwendeten MIDGE[®]-Vektoren ein Ziel der Studie dar. Von besonderem Interesse sind der Nachweis sowie die Charakterisierung der frühen Immunantwort induziert durch die Applikation der Vektoren.



2 Literaturübersicht

2.1 Equine Melanome

Beim equinen Melanom handelt es sich um Hauttumore des Pferdes, die in der Dermis oder Subkutis lokalisiert sind [1]. Die Tumore sind in der Regel gut umschrieben sowie durch grob granuliertes Melanin charakterisiert [1]. Sie stellen sich beim Pferd häufig als multiple, schwarze, derbe, rundliche und gegenüber der Haut erhabene Umfangsvermehrungen dar [2; 4]. Größe und Volumen der Tumore variieren stark und die Oberflächen können ulzerieren [2].

Charakteristische Prädilektionsstellen für Melanome sind unbehaarte Hautareale, wie die ventrale Schweifrübe, das Perineum, die Lippen und Augenlider sowie der Bereich der *Glandula parotis* [2;4-7]. Equine Melanome treten vorwiegend bei Schimmeln auf. Sind diese älter als 15 Jahre, beträgt ihre Prävalenz bis zu 80 % [2]. Robertson gab 1996 im Rahmen einer retrospektiven Betrachtung für das Alter von erkrankten Pferden einen Median von 7,6 Jahren an [8]. Insgesamt lässt sich feststellen, dass sich die Wahrscheinlichkeit eines Schimmels, an Melanomen zu erkranken, mit dem Alter erhöht [9].

Melanome zeichnen sich beim Schimmel häufig durch eine geringe Invasivität aus [4; 10-12]. Es kann allerdings unabhängig von Wachstumsraten oder Größe zu hämatogener und lymphogener Metastasierung der Melanome kommen [5]. Zudem sind Melanommetastasen in Knochenmark, Mesenterium, Skelettmuskulatur oder anderen epithelialen Organen beschrieben [4; 5; 13-17]. Oft ist eine eindeutige Diagnose lediglich durch aufwendige weiterführende Untersuchungen (z.B. Ultraschografie) möglich. Organdysfunktionen durch metastasierte Melanome sind jedoch im Vergleich zur Häufigkeit des Vorkommens von equinen Melanomen selten beschrieben [2; 4; 17-20].

In der Regel zählen equine Melanome nicht zu den akut lebensbedrohenden Erkrankungen [2]. Klinisch können aber in Abhängigkeit von der Lokalisation Kotabsatzstörungen, Kolik, Gewichtsverlust, Ödeme, Atembeschwerden, Epistaxis, Paresen, Ataxien, Dysurie oder Priapismus auftreten und damit zu einer Störung des



Allgemeinbefindens der Pferde, bis hin zum letalen Ausgang, führen [4; 5; 15; 16; 18; 21-23].

Die genaue Ätiologie des equinen Melanoms ist noch ungeklärt. Obwohl frühere Autoren keinen neoplastischen Ursprung vermuteten [6; 24], ist heute unstrittig, dass es sich um eine neoplastische Erkrankung handelt [1; 5; 9; 15; 25].

In mehreren Studien wurde ein ätiologischer Zusammenhang zwischen der dominant vererbten Schimmelfarbe sowie der Entstehung von Melanomen hergestellt [7; 26-28]. Ferner gelangte die Genexpression in der Haut genauer zur Untersuchung. Dabei konnte herausgearbeitet werden, dass sich die Expression der in Melanozyten gebildeten Glykoproteine 100 (gp100) und gp75 beim Schimmel und einem farbigen Pferd differenziert [26]. Sogar innerhalb der Population von Schimmeln existieren Unterschiede in den Expressionsmengen [26].

Diese Erkenntnisse waren der Ursprung für eine Reihe an Untersuchungen, um genetische Ursachen der Melanomentstehung zu erforschen. Im Vergleich des Schimmelgenoms mit dem Genom von farbigen Pferden wurde eine Duplikation des Intron 6 im Gen Syntaxin-17 entdeckt [27; 29]. Pferde, die diese Variation Syntaxin-17 homozygot tragen, fallen durch eine erhöhte Prävalenz für Melanome auf [27; 29]. Eine weitere genetische Konstellation, für die eine erhöhte Prävalenz an Melanomen nachgewiesen wurde, ist der homozygote Genotyp für das *Agouti signaling peptide* Gen [27].



2.2 Tumormmunologie

2.2.1 Tumorzellelimination

Eine Tumorzellelimination stellt das Resultat einer effektiven antitumoralen Immunantwort dar. Gesteuert und begünstigt durch zahlreiche Faktoren werden Tumorzellen erkannt und durch das Immunsystem unschädlich gemacht. Diesbezüglich spielen die zelluläre und die humorale Immunreaktion eine entscheidende Rolle [30].

Humorale Komponenten des Immunsystems, insbesondere Antikörper (Ak), können hierbei einen körpereigenen Schutz vor entarteten Zellen bilden [31; 32]. Die Fab-Fragmente der Ak können an Antigene binden, die auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert werden. Die an Tumorzellen gebundenen Antikörper können durch ihr Fc-Fragment an Fc-Rezeptoren von Immunzellen, wie Makrophagen sowie neutrophile Granulozyten, binden. Durch diesen Mechanismus kann es zu einer antikörper-vermittelten Zytotoxizität (*antibody dependent cellular cytotoxicity*) kommen, die im Zelltod durch Phagozytose resultiert [33; 34].

2.2.2 Zelluläres Immunsystem

Die zentralen Effektorzellen der antitumoralen Immunreaktion sind T-Zellen und Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen), die durch antigenpräsentierende Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen) und Zytokine reguliert werden [35]. Es wurde nachgewiesen, dass eine lymphozytäre Infiltration von Tumorgewebe mit einer verbesserten Prognose einhergeht [36].

Unreife **dendritische Zellen (DC)** sind in der Haut in Form der Langerhanszellen anzutreffen [37]. Durch den Einfluss von „*danger signals*“, wie z.B. Interleukin 1 (IL-1), Lipopolysaccharid oder Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF α), kommt es zur Ausreifung der DC [38-41]. Im Rahmen der Ausreifung entwickeln die DC die Eigenschaft, zahlreiche verschiedene Moleküle (z.B. IL-12, *major histocompatibility complex II* (MHC-II)) zu exprimieren, wodurch sie die Funktionen einer



antigenpräsentierenden Zelle (APC) erlangen [42; 43]. Die Aktivierung durch *danger signals* kann ebenso zu einer gegen Tumorantigene gerichteten Immunreaktion führen [44]. Durch zahlreiche MHC-, Kostimulations- und Adhäsionsmoleküle sind DC darüber hinaus in der Lage, effektiv und gezielt eine antitumorale Reaktion auf humoraler und zellulärer Ebene zu induzieren [43; 45; 46].

CD⁴⁺-T-Zellen (T-Helfer-Zellen) aktivieren unter anderem CD⁸⁺-T-Zellen. Ihr T-Zellrezeptor bindet ausschließlich an MHC-II-Komplexe, die von APC und B-Zellen exprimiert werden. Die von den APC präsentierten MHC-II-Peptid-Komplexe bilden nach Bindung an den T-Zellrezeptor mit diesem zusammen eine immunologische Synapse [47]. Durch eine ausreichend lange und feste Bindung zwischen CD⁴⁺-T-Zellen und APC werden die CD⁴⁺-T-Zellen aktiviert. Die Aktivierung beinhaltet die Möglichkeit, vermehrt immunstimulatorische Zytokine, wie z.B. IL-2 oder Interferon gamma (IFN γ), zu sezernieren. Hierdurch wird die Aktivität der CD⁸⁺-T-Zellen gesteigert [48]. Die CD⁴⁺-T-Zellen können, vermittelt über CD40, APC aktivieren, wodurch eine gesteigerte Expression der MHC-Moleküle, Kostimulationsmoleküle, diverser Zytokine und überdies die weitere Aktivierung zytotoxischer T-Zellen (CD⁸⁺-T-Zellen, CTL) initiiert wird [49-51]. Ferner unterstützen sie B-Zellen dabei, deren Antikörperproduktion zu aktivieren.

CD⁴⁺-T-Zellen sezernieren außerdem nicht nur immunstimulatorische Zytokine. Es werden von unterschiedlichen Subtypen dieser T-Helferzellen auch inhibitorische Mediatoren wie z.B. IL-10 sezerniert. Durch diese sowie andere regulatorische Mechanismen wird eine zelluläre Immuntoleranz erreicht und eine Überstimulation vermieden [49]. Durch die Expression spezieller Rezeptoren auf T-Helferzellen wird die Bildung immunologischer Synapsen kompetitiv gehemmt [52].

CD⁸⁺-T-Zellen (zytotoxische T-Zellen, CTL) sind die Haupteffektorzellen der antitumoralen Immunreaktion. Sie binden an MHC-I-Molekül-Peptid-Komplexe, die intrazelluläre Proteinfragmente beinhalten können [35; 53; 54]. Die Rolle dieses Immunmechanismus in der Tumorbekämpfung wurde durch Versuche mit *knockout*-Mäusen untermauert [55; 56]. Tiere, die nicht in der Lage sind, eine Zelllyse durch CD⁸⁺-T-Zellen einzuleiten, zeigen eine erhöhte Tumorzinzidenz [55; 56].



CTL werden über zwei Signale aktiviert. Das erste Signal stellt die Bindung ihrer T-Zell-Rezeptoren (TCR) an MHC-I-Peptid-Komplexe dar, wobei die Signalstärke proportional zur Anzahl der Bindungen ist [35; 53]. Als zweites Signal fungieren sowohl Bindungen über Adhäsions- und Kostimulationsmoleküle als auch die Stimulation über Zytokine [47; 57]. Die Kombination der Signale führt zur Aktivierung der CTL, die mit der Sezernierung von Perforinen einhergeht [47].

Fehlt bei der Aktivierung naiver T-Zellen das zweite Signal, entstehen immuntolerante CTL. Diese mononukleären Zellen sind nicht in der Lage, Tumorzellen zu lysieren [58].

Natürliche Killer Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie ihre zytotoxische Wirkung unabhängig von der Erkennung spezifischer Antigene vermitteln. Allerdings hemmen autologe MHC-I-Moleküle ihre zytotoxische Aktivität. Dadurch lysieren NK-Zellen hauptsächlich Zellen ohne, mit wenigen oder mit fremden MHC-I-Molekülen. Dies bedeutet, dass körpereigene Zellen, da diese MHC-I-Moleküle auf der Zelloberfläche tragen, vor der zytotoxischen Wirkung der NK-Zellen geschützt werden [54; 59]. Die Inhibition der NK-Zellen durch solche *self-signals* steht in Balance gegenüber stimulierenden Signalen.

Nach einer Stimulation durch Zytokine oder Oberflächenmoleküle (exprimiert von z. B. DC) sezernieren NK-Zellen zahlreiche Zytokine ($\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-2, IL-3, IL-5, IL-8). Dadurch nehmen sie einen Einfluss auf weitere Effektorzellen, vor allem Makrophagen und T-Zellen [60; 61].

Die Fähigkeit, Tumorzellen direkt zu lysieren, ist bei NK-Zellen begrenzt, kann jedoch durch eine starke Stimulation mit IL-2 sowie der damit verbundenen Umwandlung in Lymphokin-aktivierte Killerzellen deutlich erhöht werden [62; 63].

Durch Forschungen am Chediak Higashi Syndrom wurde die Rolle der NK-Zellen in der humanen Tumorbekämpfung erkannt. Im Rahmen dieses Krankheitskomplexes kommt es zu einer verminderten zytotoxischen Wirkung von NK-Zellen [64]. Untersuchungen an NK-Zell-*knockout*-Mäusen erwiesen, dass NK-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Hemmung des Tumorwachstums und der



Metastasierung spielen [65; 66]. NK-Zellen besitzen eine entscheidende Bedeutung bei der Elimination von Tumorzellen, die keine oder wenig MHC-I Komplexe exprimieren, da NK-Zellen im Gegensatz zu CTLs diese Komplexe nicht zur Vermittlung des Zelltods benötigen [67].

NK-Zellen und CD⁸⁺-T-Zellen speichern in ihren Granula zytotoxische Substanzen/Mediatoren wie Perforine. Letztere führen, nach Einbau in die Zellmembran der Zielzellen, zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Zellmembran, wodurch der Zelltod herbeigeführt wird [68]. Durch Studien mit *knockout*-Mäusen, die nicht in der Lage waren, die perforin-vermittelte zytotoxische Reaktion zu nutzen, wurde die Bedeutung dieser Mediatoren in der antitumoralen Immunantwort geklärt. Es zeigte sich sowohl bei induzierten (Behandlung mit Methylcholanthrene) als auch bei spontanen Sarkomen eine schlechtere Prognose bei den Perforin-*knockout*-Mäusen [67; 69].

Makrophagen gehören zu den APC. Sie setzen Sauerstoffradikale frei und sezernieren TNF α und weitere Zytokine. Aufgrund dieser Sekretion und ihrer Funktion als APC sind sie regulatorisch am Immungeschehen beteiligt [70]. Ihr direkter antitumoraler Effekt resultiert in der Regel aus der Aktivierung unter Beteiligung von IFN γ [71; 72].

Eine Sonderform der Makrophagen stellen die tumorassoziierten Makrophagen dar. Durch die chemotaktische Wirkung von CCL2, das von Tumorzellen oder gereizten Zellen in Tumornähe sezerniert werden kann, infiltrieren Makrophagen das Tumorgewebe [73]. Diese Makrophagen können die tumorale Angiogenese sowohl fördern als auch hemmen [74].

2.2.3 Funktion ausgewählter Zytokine in der Tumorummunologie

2.2.3.1 Interleukin 2 (IL-2)

Eine der ersten Funktionen von IL-2, die entdeckt wurde, war die Optimierung der T-Zellproliferation und Differenzierung *in vitro* [75-78]. Daraus resultierte die vorläufige



Benennung als *T-cell growth factor*, bevor das Protein im Jahr 1979 entsprechend der systematischen Nomenklatur Interleukin 2 genannt wurde [75]. Studien konnten nachweisen, dass IL-2 nicht nur durch T-Helferzellen, sondern auch durch CTL, dendritische Zellen und regulatorische T-Zellen exprimiert wird [79; 80]. IL-2 spielt eine entscheidende Rolle bei der Proliferation sowie der Generationsdauer von T-Zellen, bei der Differenzierung von naiven T-Zellen zu Effektor- oder Gedächtnis-T-Zellen und kann sogar die Proliferationshemmung von anergischen T-Zellen überwinden [75-78; 81-90]. IL-2 wirkt allerdings nicht nur auf T-Zellen, sondern ebenfalls auf die Entwicklung von dendritischen Zellen und die Reifung von B-Zellen [91]. Im Gegensatz zu dieser immunstimulierenden Wirkung kann IL-2 jedoch auch die Apoptose von T-Zellen in Form eines *activation-induced cell death* vermitteln und die Zahl von antigenspezifischen T-Zellen reduzieren [92-101]. Zusätzlich kann IL-2 durch die Hemmung der IL-17-Produktion und die Stimulation der regulatorischen T-Zellen antiinflammatorisch wirken [102]. Folglich ist IL-2 ein entscheidender Faktor bei der Etablierung einer autologen Immuntoleranz [102-108].

Bei der Behandlung von Tumoren kommt IL-2 eine bedeutende Rolle hinsichtlich der Interleukintherapien zu. Bereits in den 1980er-Jahren gelangte IL-2 aufgrund seiner CTL-stimulierenden Eigenschaften als Therapeutikum gegen Tumore zum Einsatz [109-111]. In Studien an humanen metastasierenden Melanomen zeigte es positive Effekte als antitumorales Therapeutikum [109]. Diese gehen jedoch mit zahlreichen unerwünschten Nebeneffekten einher, die auf eine Veränderung der Permeabilität der Blutgefäße zurückzuführen sind [112; 113].

2.2.3.2 Interleukin 4 (IL-4)

Das Zytokin IL-4 wird vor allem von Th2-Zellen, Mastzellen und basophilen Granulozyten sezerniert [114; 115] und gilt als typisches Th2-Zytokin, da es eine entscheidende Funktion bei der Differenzierung von Th0-Zellen (unreife T-Effektorzelle) zu Th2-Zellen hat [116]. IL-4 führt überdies zu einer vermehrten Immunglobulin-Sekretion von B-Zellen [117]. Es hemmt die spontane und vermittelte



Zellapoptose von T- und B-Zellen, sodass sich das Generationsintervall der Zellen verlängert [118-121].

Eine antitumorale Wirkung von IL-4 auf Melanome ist beschrieben [115]. In diversen Tumorgeweben ließ sich eine höhere Konzentration von IL-4 nachweisen [122]. Durch dieses endogene IL-4 werden das Tumorwachstum sowie die Metastasierung gefördert, sodass endogenem IL-4 eine protumorale Rolle zukommt [123-125]. Durch IL-4 wird die zytotoxische Wirkung von CD⁸⁺-T-Zellen gehemmt, worüber ein Einfluss auf das Tumorwachstum zu erklären ist [126-128]. Neben dem hemmenden Einfluss auf die Zytotoxizität der T-Zellen ist für zahlreiche Tumorzellen eine IL-4 abhängige Resistenz gegenüber der Zellapoptose beschrieben [129-131].

2.2.3.3 Interleukin 10 (IL-10)

Unter dem Namen *cytokine synthesis inhibiting factor* wurde IL-10 erstmals beschrieben [132]. Die Hauptquelle von endogenem IL-10 sind Makrophagen, doch ebenso T- und B-Zellen, Monozyten, eosinophile Granulozyten, Mastzellen und Keratinozyten [132-139]. Es hemmt Entzündungsreaktionen sowie die zelluläre Immunreaktion und sorgt aus diesem Grund für die Verhinderung von überschießenden Immunreaktionen [134]. Die Wirkung von IL-10 beruht vor allem auf dessen Einfluss auf die APC. IL-10 hemmt z.B. in Monozyten die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und verhindert so eine effektive Antigenpräsentation [140-142]. In Makrophagen werden durch IL-10 die Zytokin- und Stickoxidproduktion gehemmt [143; 144]. Ebenso hemmt es die Funktion von APC der Haut [145; 146]. Zugleich induziert es die Bildung weiterer antiinflammatorischer Mediatoren [147; 148]. Interleukin-10 hemmt direkt und indirekt (über die Hemmung von IL-12) die Produktion von IFN γ in Makrophagen und begünstigt über die Hemmung einer Th1-Immunantwort eine Th2-Immunantwort [132; 141; 142; 145; 149]. Durch IL-10 wird die IFN γ -induzierte Transkription von Genen blockiert (z.B. CXCL10) [150-152]. Folglich besteht bei der Wirkung von IL-10 und IFN γ ein kompetitiver Zusammenhang [153]. Die Wirkung von IL-10 auf NK-Zellen weicht von der zuvor beschriebenen



generellen Wirkung auf Immunzellen ab. Interleukin-10 stimuliert die zytotoxische Wirkung von NK-Zellen und erhöht die durch IL-2 stimulierbare Produktion von $\text{IFN}\gamma$ [154]. Eine Stimulation des Mastzellwachstums und der Histaminliberation konnten ebenfalls nachgewiesen werden [137; 155].

Bei Untersuchungen an Melanomen, Metastasen und Melanomzelllinien zeigten diese eine erhöhte Menge an IL-10-mRNA im Vergleich zu den physiologischen Werten der Gewebe [156; 157]. Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass es sich bei IL-10 um einen autokrinen Wachstums- und Schutzfaktor von Melanomen handelt [158].

2.2.3.4 Interleukin 12 (IL-12)

Interleukin-12 ist ein Heterodimer. Die zwei Untereinheiten werden nach ihrer Größe als IL-12p35 (35 kDa) und IL-12p40 (40 kDa) benannt [159; 160]. Es wird durch phagozytierende und dendritische Zellen exprimiert [160; 161]. Verschiedene Pathogene induzieren eine vermehrte Expression von IL-12 [162]. Es verfügt über einen autokrinen positiven Feedbackmechanismus [160; 163-165]. Eine Synthesehemmung kann durch Zytokine wie IL-10, $\text{TNF}\alpha$ sowie *transforming growth factor beta* ($\text{TGF}\beta$) vermittelt werden [141; 166-168]. Die gleiche Wirkung auf die Synthese von IL-12 lässt sich über *guanine nucleotide-binding protein-coupled_{as}* (G_{as}PC)-, den $\alpha 2$ -adrenergen, den *adenosine_{2\alpha}*, den Histamin-2- oder den *vasoactive intestinal peptide*-Rezeptor vermitteln [169]. Rezeptoren für IL-12 befinden sich auf aktivierten T-Zellen, DC und NK-Zellen [170]. Interleukin-12 stellt ein charakteristisches Zytokin einer Th1-Immunreaktion dar und induziert die Differenzierung von T-Helferzellen zu Th1-Zellen und die Proliferation von aktivierten CD^{8+} und CD^{4+} T-Zellen [171-176]. Unter dem Einfluss von IL-12 steigt die Zytotoxizität von CD^{8+} - und NK-Zellen [174]. Hierbei kann eine vermehrte Expression von Effektorproteinen wie Granzym B, Perforin und Adhäsionsmolekülen nachgewiesen werden [177-181]. Zusätzlich produzieren Th1-Zellen durch die Stimulation mit IL-12 selbst eine Vielzahl an Zytokinen ($\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-2, IL-3, IL-8)



[182]. Ein essenzieller Aspekt hierbei ist der Stimulationseffekt des IL-12 auf die IFN γ -Synthese von T- und NK-Zellen [173]. Eine tumorassoziierte Wirkung von IL-12 bei Melanomen ist die Vermehrung der MHC-I und -II Moleküle auf der Zelloberfläche der Melanomzellen und dem *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-I). Dies erleichtert die Erkennung von Melanomzellen durch Immunzellen [183]. Gleichzeitig wurde eine hemmende Wirkung von IL-12 auf die Vaskularisierung von Tumoren festgestellt [184-188].

Die antitumorale Wirkung von IL-12 wurde mehrfach im Mausmodell an transplantierten und induzierten Melanomen beleuchtet [189-195]. Ebenso wurde ein metastasierungshemmender Effekt bei Melanomen auch nach der Behandlung mit DNA kodierend für IL-12 beschrieben [196; 197]. Rekombinantes IL-12 wurde beim humanen Melanom erfolgreich zur Verminderung der Metastasierung subkutan appliziert [198]. Im Mausmodell konnten eine verlängerte Überlebenszeit und eine Tumorremission nach einer Therapie mit IL-12-kodierender DNA nachgewiesen werden [199-201]. Beim humanen Melanom ist ebenfalls eine Tumorremission nach intratumoraler Behandlung mit DNA kodierend für IL-12 festgestellt worden [202]. Beim Pferd ist sowohl DNA kodierend für humanes [203] als auch für equines [204] IL-12 zur Behandlung von Melanomen eingesetzt worden. Eine Reduzierung der Größe der Tumoren wurde in beiden Studien erzielt. Der Einsatz von humaner DNA führte in einem Fall zu einer kompletten Remission eines Tumors bei einem Schimmel [203].

2.2.3.5 Interleukin 18 (IL-18)

Interleukin-18 ist ein Glykoprotein mit einer Größe von 18 kDa. Es weist eine entscheidende Bedeutung hinsichtlich der Induktion von IFN γ auf und wird deshalb auch *IFN γ -inducing-factor* genannt [205; 206]. IL-18 allein besitzt lediglich eine geringe IFN γ -induzierende Wirkung, wird aber durch andere Faktoren (z.B. IL-12) in seiner Wirkung potenziert [205; 207-209]. Synthetisiert wird IL-18 in dendritischen Zellen, Keratinozyten, Osteoblasten, Nebennierenzellen, Mikrogliazellen und



synovialen Fibroblasten [210-217]. Pathogene Stimuli wie LPS, Exotoxine grampositiver Bakterien sowie andere mikrobielle Produkte verursachen durch Aktivierung des Inflammasoms eine vermehrte Bildung dieses Interleukins [205]. Die zugehörigen IL-18-Rezeptoren befinden sich auf Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, NK-Zellen, dem Endothel und glatten Muskelzellen [218-220]. Bei NK-Zellen wird durch IL-18 die Expression vom *apoptosis stimulating fragment ligand* gefördert und die perforin-vermittelte Zytotoxizität induziert [221; 222]. In neutrophilen Granulozyten kann durch IL-18 die Bildung reaktiver Sauerstoffmetaboliten und die Zytokinexpression aktiviert werden [218]. Ebenfalls kann IL-18 die Expression von IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IFN γ und TNF α stimulieren [209; 223-225]. Interleukin-18 ist ferner nicht charakteristisch für eine Th1 oder Th2 polarisierte Immunreaktion, da es in beiden Polarisierungen anzutreffen ist, wird allerdings meistens als proinflammatorisch eingestuft, v.a. wenn gleichzeitig IL-1 β und IFN γ induziert sind. [226].

Die antitumorale Wirkung im Mausmodell konnte nach intratumoraler Injektion von DNA kodierend für IL-18 in Form eines erhöhten Vorkommens an T-Effektorzellen und NK-Zellen im peripheren Blut, der Milz und zusätzlich durch eine erhöhte IFN γ -Sekretion der CD4⁺-T-Zellen dargestellt werden [227]. Es konnte ein Zusammenhang zwischen IFN γ und der antitumoralen Wirkung von IL-18 festgestellt werden. Eine Transfektion von Melanomzelllinien mit IL-18 vor der Injektion in Mäuse erbrachte ein vermindertes Tumorwachstum und eine verringerte Vaskularisierung. Die Hemmung der Angiogenese wird durch eine IL-18-vermittelte Expression von antiangiogenetischen Chemokinen, vor allem CXCL10, und der gleichzeitig verminderten Ausschüttung von angiogenetischen Faktoren bewirkt [228]. Beim Pferd wurde nach intratumoraler Injektion von DNA kodierend für IL-18 in Melanome eine signifikante Tumorremission beobachtet [204].



2.2.3.6 Interferon gamma (IFN γ)

Bei Interferon gamma handelt es sich um ein Typ II Interferon. Gebildet wird IFN γ vor allem durch NK- und T-Zellen [229-232]. Die Expression von IFN γ wird durch IL-12 stimuliert [233-235]. Seine Wirkung wird über den zugehörigen Interferon gamma Rezeptor vermittelt, der von allen kernhaltigen Zellen exprimiert wird [236; 237]. IFN γ ist ein Leitzytokin der Th1-Immunantwort [238]. Es ist zusammen mit IL-12 entscheidend für die Entwicklung der Th1-Zellen verantwortlich [239]. Gleichzeitig unterdrückt IFN γ die Freisetzung von IL-4, welches charakteristisch für eine Th2-Antwort ist und hemmt die Proliferation von Th2-Zellen, sodass die Th1-Antwort begünstigt wird [240; 241].

Durch IFN γ werden die Tumorentwicklung und -entstehung gehemmt [56; 242]. Eine Ursache hierfür ist die gesteigerte Expression von MHC-I Molekülen auf Tumorzellen [243]. Zusätzlich wirkt IFN γ durch seine antiproliferative und antiangiogenetische Wirkung indirekt antitumoral [230; 244-246]. Durch seine regulatorische Wirkung auf die Expression immunologisch wirksamer Stoffe kann IFN γ apoptotisch wirken und verfügt dadurch über einen direkten antitumoralen Effekt [247-251].

IFN γ ist in der Lage, eine antitumorale T-Zellreaktion zu induzieren [252]. Diese Beobachtungen werden durch die Tatsache belegt, dass in IFN γ -*knockout* Mäusen, welche kein IFN γ produzieren, im Vergleich zu gesunden Kontrollmäusen vermehrt spontane Tumore auftreten. [55]. Überdies ist beschrieben, dass IFN γ -unempfindliche Tumorzellen zur Tumorentstehung in immunkompetenten Mäusen führen [253; 254].

2.2.3.7 CC-Motiv-Chemokin Ligand 2 (CCL2)

Das Chemokin CCL2 wird in der Literatur auch als *monocyte chemotactic protein 1* oder *monocyte chemotactic and activating factor* aufgeführt [255]. Es wird z.B. in Leber-, Milz-, Darm- und Nierengewebe exprimiert [256]. Es wird ebenso durch Tumorzellen exprimiert und ist deshalb auch als *tumor-derived chemotactic factor*



bekannt [257-260]. Das Chemokin wirkt *in vivo* und *in vitro* chemotaktisch auf Monozyten und T-Zellen [261-265]. Durch ein Zusammenspiel mit den exprimierenden Immunzellen (neutrophile und eosinophile Granulozyten) besitzt CCL2 die stärkste chemotaktische Wirkung auf Monozyten [265; 266]. Das equine CCL2 ist beteiligt an einer Th2-Immunantwort [256; 267]. Aus der Humanmedizin ist bekannt, dass CCL2 bei der Differenzierung von T0-Zellen zu Th2-Zellen eine Rolle spielt [267]. Allerdings wird von einigen Autoren eine duale Beeinflussung der T-Zellentwicklung nicht ausgeschlossen, da zum Teil ebenfalls ein Einfluss auf die Th1-Antwort durch CCL2 festgestellt wurde [265; 268; 269].

Die antitumorale Wirkung von CCL2 basiert vor allem auf der chemotaktischen Wirkung [261; 270]. Durch die CCL2-Expression kommt es zu einer Infiltration des Tumorgewebes mit tumorassoziierten Makrophagen (TAM) [259; 260; 271; 272]. Die Expressionsstärke von CCL2 korreliert mit der Infiltrationsstärke der TAM [260]. Diese Korrelation wird in der Humanmedizin zum Teil zur Prognostik genutzt [258; 272; 273], da mit der CCL2-Expression auch die Tumorstadiumsgeschwindigkeit und die Zeit bis zur Entstehung von Tumoren korreliert [274]. Neben der chemotaktischen Wirkung besteht zusätzlich ein direkter und indirekter Einfluss auf die Vaskularisierung von Tumoren [275-277].

2.2.3.8 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 2 (CXCL2)

Das Chemokin CXCL2 wird ebenfalls unter den Namen *growth-regulated protein beta macrophage inflammatory protein 2-alpha* oder *melanoma growth stimulating activity beta* geführt [255]. Es vermittelt seine Wirkung über die Bindung an den CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2 (CXCLR2) [278-280]. Das Chemokin weist einen chemotaktischen Effekt auf neutrophile Granulozyten auf [281-283]. Es zählt zu einer Untergruppe der CXC-Motiv-Chemokine, deren Gemeinsamkeit in einer N-terminalen Aminosäurekette aus Glutamin, Leucin und Arginin besteht (ELR+). Diese Gruppe zeichnet sich durch eine angiogenetische Wirkung aus [284-286].



In humanen Melanomen wurde eine erhöhte Expression von CXCL2 gegenüber nicht neoplastischem Gewebe festgestellt [287]. Im Rahmen einer Studie wurden murine Melanozytenzelllinien mit CXCL2 transfiziert. Diese Zelllinien waren, im Gegensatz zu der originären Form der Melanozyten, in der Lage, Tumore bei Mäusen zu bilden [287; 288]. Die Tumore verfügten im Vergleich zu B16-Melanomen (Kontrollgruppe) über eine starke Ähnlichkeit in der Vaskularisierung [287; 288]. Nach der Hemmung der Freisetzung von CXCL1, 2 und 3 zeigten die Melanome eine Tumorremission [287; 288]. Durch Versuche mit neutralisierenden Antikörpern für CXCL2 konnte dargelegt werden, dass CXCL2 eine protumorale Wirkung besitzt [289; 290]. Diese These wurde ferner unterstrichen durch Versuche, in denen gezeigt wurde, dass ein Mangel an CXCL2 das Wachstum von humanen Melanomen hemmt [289; 290].

2.2.3.9 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8 (CXCL8)

CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8 (CXCL8) wird auch als IL-8 bezeichnet [255]. Es wird unter anderem von Monozyten, NK-Zellen, Endothelzellen, Keratinozyten, Fibroblasten und glatten Muskelzellen exprimiert [291-296]. Die Expression wird durch proinflammatorische Mediatoren, wie IL-1 oder $TNF\alpha$, gesteigert [297; 298]. CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8 wirkt sowohl chemotaktisch als auch aktivierend auf neutrophile Granulozyten [299]. Seine Wirkung vermittelt CXCL8 über die Bindung an CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 1 und 2 (CXCR1 und CXCR2), die unter anderem auf neutrophilen Granulozyten und auf Keratinozyten exprimiert werden [296; 300; 301].

Es wurde nachgewiesen, dass humane Melanomzellen CXCL8 exprimieren [302; 303]. Auf ihrer Oberfläche wird vermehrt der CXCR2 sowie deutlich geringer der CXCR1 exprimiert [289; 304]. CXCL8 gehört wie CXCL2 zu den ELR+-Chemokinen und besitzt, ebenso wie CXCL2, einen über CXCR2 vermittelten angiogenetischen Effekt [285]. Andere Angiogenesefaktoren stimulieren die CXCL8-Produktion in Endothelzellen, sodass es zu einem positiven Feedback kommt [305-307]. CXCL8



übt auch einen Einfluss auf die Zellmigration aus und fördert das Tumorwachstum von Melanomen [289; 304].

2.2.3.10 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10 (CXCL10)

CXCL10 ist auch als *interferon γ -induced protein 10* bekannt [255]. Unter anderem kann CXCL10 nach der Stimulation mit IFN γ von neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten, Keratinozyten, Epithel-, Endothel- und Stromazellen synthetisiert werden [308-310]. Die Wirkung von CXCL10 wird über den Rezeptor CXCR3 vermittelt [311]. Dieser Rezeptor wird vorzugsweise auf aktivierten B- und T-Zellen, NK-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert [312]. CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10 steuert Chemotaxis, Apoptose, Zellwachstum und Angiogenese [313]. Es handelt sich hier um einen typischen Vertreter einer Th1-Immunantwort [314].

In der Tumorummunologie ist neben der chemotaktischen Wirkung auf aktivierte T-Zellen [315] insbesondere der Einfluss von CXCL10 auf die Angiogenese von Bedeutung. CXCL10 wirkt, im Gegensatz zu CXCL2 und CXCL8, hemmend auf die tumorale Angiogenese [285; 286; 316]. Vermittelt wird diese Wirkung ebenfalls über CXCR3 [317]. Daher fand CXCL10 auch als Therapeutikum bei Melanomen Einsatz. Nach retroviraler Transfektion mit CXCL10 konnte ein antitumoraler Effekt bei Mäusen nach Injektion tumorinduzierender Zelllinien festgestellt werden [318]. Eine Behandlung mit CXCL10 erzeugte sogar eine antiangiogenesebedingte Tumorstillstandshemmung [319].

2.2.4 Tumorescape

Um sich der Elimination durch das Immunsystem zu entziehen (*Escape*), sind mehrere Mechanismen bekannt, die von Tumorzellen genutzt werden. Es ist möglich, dass Tumorzellen keine spezifischen Antigene exprimieren, diese im Laufe der Entwicklung verloren gingen oder die Antigene nicht adäquat auf den Zellen



präsentiert werden [320-322]. Einen weiteren Tumorescapemechanismus stellt die Störung der T-Zell-vermittelten Immunreaktion dar. Es kann durch eine gestörte Tumorzellerkennung und ein verändertes Bindungsverhalten von MHC-I Komplexen zu Antigenen, die Herunterregulierung der MHC-Moleküle auf den Tumorzellen oder T-Zell-Rezeptoren zu einer Hemmung der Immunreaktion kommen [323]. Ebenso kann die zytotoxische Wirkung von T- und NK-Zellen, die durch Perforine vermittelt wird, gehemmt werden, indem eine Blockierung der Perforinbindung stattfindet [324].

Es sind jedoch auch viele Tumorescapemechanismen beschrieben, die physiologische Regulationsmechanismen des Immunsystems nutzen. So kann z.B. die Expression von wichtigen immunstimulierenden Liganden gehemmt werden [325; 326]. Tumorzellen können nicht nur die Expression von immunstimulierenden Liganden hemmen, sondern ebenfalls die Expression von immunsupprimierenden Faktoren (TGF- β , IL-10) forcieren [327-329]. Eine mögliche Wirkung von tumoral sezernierten Zytokinen kann die Aktivierung von T-Helferzellen darstellen [330]. Diese wiederum verfügen je nach Differenzierung über einen hemmenden Effekt auf die antitumorale Immunreaktion [330; 331].

Ein Beispiel für die Hemmung der antitumoralen Immunreaktion durch die biologische Aktivität von Tumoren ist die Produktion von Indolamin-2,3-dioxygenase, ein Enzym des Tryptophanstoffwechsels. Über diesen direkten Einfluss auf den Tryptophanstoffwechsel, vermittelt über das produzierte Enzym können Tumorzellen die Immunreaktion hemmen [332-334].

Bei der tumorassoziierten Angiogenese kann eine verminderte Ausprägung von endothelialen Adhäsionsmolekülen im neoplastischen Gewebe auftreten. Dies resultiert in einer verminderten Bindungsfähigkeit von Immunzellen ans Endothel, sodass diese infolge gehemmter Migration nicht an der lokalen Immunreaktion beteiligt werden können, wodurch die antitumorale Immunreaktion indirekt gehemmt wird [335].



2.3 Melanomtherapien bei Pferden

2.3.1 Konventionelle Therapie

Die **chirurgische** Entfernung von kleinen solitären Melanomen ist prinzipiell möglich [336], jedoch aufgrund des häufig multiplen Auftretens nicht immer kurativ [10]. In manchen Fällen ist die chirurgische Entfernung sinnvoll, um klinische Symptome zu mindern. Dabei ist allerdings zu bedenken, dass die anatomische Lage der Melanome zu Komplikationen beim Wundverschluss nach chirurgischer Entfernung führen kann [337]. Die anschließende Kryotherapie nach chirurgischer Entfernung hat in einer Studie gute Erfolgsquoten gezeigt [336].

Auch konnte durch die lokale Applikation von **Chemotherapeutika** eine Tumorremission erzielt werden [338-340]. Im Rahmen der lokalen Remission entstanden jedoch an anderer Lokalisation neue Melanome [338]. Aufgrund des multiplen Auftretens von Melanomen sowie der ausschließlich lokalen Wirkung der Chemotherapeutika erscheint eine lokale Therapie nicht als zielführend und kurativ [338]. Da die bereits dargestellten Therapieansätze nicht die gewünschten Erfolge bringen, ist die immunologische Therapie von equinen Melanomen in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus gerückt.

2.3.2 Immuntherapie

Seit geraumer Zeit ist bekannt, dass die Tumorummunologie einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung und Entwicklung von Tumoren nimmt [341; 342] und Immunreaktion und Prognose miteinander korrelieren [36; 343; 344]. Es gibt Berichte über spontane Tumorremissionen beim humanen Melanom, die den Verdacht erhärten, dass das Immunsystem unter bestimmten Umständen in der Lage ist, den Tumor effektiv zu bekämpfen [345; 346]. Unterstützt wird dies durch die Beobachtung, dass immunsupprimierte Patienten ein höheres Risiko aufweisen, an einem Tumor zu erkranken, als immunkompetente [347-351]. Aus den beschriebenen Beobachtungen resultiert die These, dass das Immunsystem eine



Schlüsselrolle bei der Bekämpfung von Neoplasien spielt [55; 343; 344; 352; 353]. Darauf aufbauend wurden diverse Therapieansätze zur Unterstützung der antitumoralen Immunreaktion entwickelt [354].

Einer dieser Therapieansätze gegen Tumore ist die Behandlung mit **Bacillus Calmette-Guérin** (BCG) als unspezifisches Immunstimulanz [355]. Hierbei werden die natürlich vorkommenden Cytosin-Phosphat-Guanin-Motive (CpG) als Immunstimulator genutzt. Die Resultate waren allerdings nicht erfolgversprechend [355].

Eine weitere Möglichkeit stellt die Behandlung von Melanomen mit dem Histamin-2-Rezeptorantagonisten **Cimetidin** dar [19; 356]. Histamin fördert die Aktivierung von T-Supressorzellen. Durch seine Wirkung als Antagonist des Histamin-2-Rezeptors hat Cimetidin einen stimulierenden Einfluss (Hemmung der T-Supressorzellaktivierung) auf die Immunreaktion [357; 358]. Die Erfolgsergebnisse der Therapie des equinen malignen Melanoms mit Cimetidin divergieren. GOETZ et al. [1990] beschreiben beispielsweise einen Remissionseffekt mit vereinzelter kompletter Entfernung des Tumors [19]. Aktuellere Veröffentlichungen zeigen hingegen keine signifikanten Effekte einer Cimetidintherapie [5; 356; 359].

Der Einsatz behandelter **autologer Tumorzellen** erfolgte bereits bei humanen Melanomen [360]. Autologe Tumorzellen wurden auch in Kombination mit anderen Therapieansätzen, wie gleichzeitiger Applikation von BCG [361; 362] oder *recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) erprobt [361-363]. Diese Therapien führten beim Menschen zu einer verlängerten Lebenserwartung [362], allerdings zum Teil auch zu einer Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ [361]. Bei der Behandlung von equinen Sarkoiden mit autologen Tumorzellen wurde eine Tumorremission nachgewiesen [364; 365]. Beim equinen Melanom konnten nach der Behandlung mit phenolbehandelten autologen Melanomzellen aber klinisch keine antitumoralen Effekte festgestellt werden [366].

Die Therapie mit autologen Melanomzellen wurde beim Pferd auch in Kombination mit Cimetidin eingesetzt, jedoch wurde hier klinisch kein antitumoraler Effekt



nachgewiesen [5]. In einer weiteren Studie wurde die Therapie mit autologen Tumorzellen mit einer chirurgischen Entfernung kombiniert [367]. Hier konnte eine partielle bzw. komplette Tumorremission beobachtet werden [367]. Die genutzten Melanomzellen wurden mit CHO-Zellen (Zellen aus Ovarien des chinesischen Hamsters), die humanes IL-2 und GM-CSF produzierten, versetzt und appliziert [367]. Zusätzlich kam ein DNA-lipoplex kodierend für die Thymidinkinase des Herpes-simplexvirus und Ganciclovir in der Schnittfläche zur Anwendung [367].

Tumorspezifische Proteine wurden mit dem Zweck einer gezielteren Immunantwort eingesetzt [368]. Beim Menschen konnten nach der intradermalen Behandlung mit dem melanozytenspezifischen Protein Tyrosinase vermehrt zytotoxische T-Zellen nachgewiesen werden [369]. Dendritische Zellen waren in der Lage, zytotoxische T-Zellen zu aktivieren sowie eine Tumormetastasierung zu verhindern [370-372]. Nach der Transfektion dendritischer Zellen mit humaner DNA kodierend für gp100, hatten diese bei Hunden mit malignem Melanom einen stimulierenden Effekt auf die zytotoxischen T-Zellen [373].

2.4 DNA-Vektoren

Im Vergleich zur Behandlung mit autologen Tumorzellen oder isolierten Proteinen weisen DNA-Vektoren den Vorteil der Wirtschaftlichkeit und Vielfältigkeit auf [336; 374]. Da Zytokine, wie z.B. IL-12, bei direkter Injektion zum Teil sehr starke Nebenwirkungen bis hin zum Tod haben, wird in der immunologischen Tumorthherapie häufig auf die nebenwirkungsärmere Zytokin-DNA zurückgegriffen [163; 197; 198; 375-380]. Im Gegensatz zum Protein ist Zytokin-DNA in der Lage, die Immunreaktion dauerhafter durch einen konstanteren und längeren Plasmaspiegel der exprimierten Zytokine zu unterstützen, ohne eine der Proteinapplikation vergleichbare Toxizität zu besitzen [163; 197].

Dabei können sowohl das humorale als auch das zelluläre Immunsystem durch die Vektoren beeinflusst werden [381; 382]. Es ist möglich, eine antitumorale Immunreaktion durch DNA zu erzeugen [374; 381; 383-386]. Die Effizienz der



aktiven Immunisierung mit DNA-Plasmiden wurde unter anderem von WHITE u. CORNY [2000] ausführlich untersucht und dargelegt [387]. Prinzipiell müssen bei der Wirkung von DNA-Vektoren unterschiedliche Wirkmechanismen Berücksichtigung finden. Es ist die Wirkung des exprimierten DNA-Vektor-Produkts von den unspezifischen Wirkungen der DNA abzugrenzen. Eine nachgewiesene Ursache dieser unspezifischen Wirkung von DNA-Vektoren basiert auf der immunologischen Wirkung der in der DNA enthaltenen CpG-Motive, die über den Toll-like-Rezeptor 9 (TLR9) wirken [388-390]. Die über den TLR9 vermittelte immunstimulierende Reaktion wurde ebenfalls beim Pferd beschrieben [391-394]. Auch die antitumorale Wirkung wurde schon beim Menschen und bei der Maus nachgewiesen [395-400]. Weitere unspezifische Immuneffekte von DNA-Vektoren werden heutzutage vermutet, allerdings sind sie für das Pferd nicht weiter untersucht. Es wird z.B. ein Zusammenhang zwischen doppelsträngiger DNA sowie der Aktivierung von intrazellulären DNA-Sensoren beschrieben [401].

2.5 MIDGE[®]-Vektoren

Eine weitere Möglichkeit der Gentherapie mit DNA-Vektoren stellt die Transfektion mit *minimalistic immunologically defined gene expression* (MIDGE[®]) Vektoren dar. Dabei handelt es sich um eine aus einem Plasmid synthetisierte lineare doppelsträngige DNA, die kovalent über Haarnadelschleifen an den Enden geschlossen ist [402]. Das Synthesziel ist, dass die Vektoren nur den Promoter, die kodierende Sequenz sowie einen Poly-A-Schwanz enthalten. Die MIDGE[®]-Vektoren enthalten durch ihre reduzierten *backbone*-Anteile insgesamt weniger CpG-Motive als Plasmide. Dies hat den Vorteil, dass die durch CpG-Motive vermittelten, unerwünschten Nebeneffekte in Form einer unspezifischen Immunreaktion verringert werden [403; 404]. Ein weiterer Vorteil ist, dass der Vektor im Gegensatz zu den meisten Plasmiden keine Antibiotikaresistenzgene enthält. Dadurch kann die Resistenz auch nicht auf den Zielorganismus transfiziert werden [402; 405]. Aufgrund der Reduktion der enthaltenen Informationen kann zudem die Gesamtmenge an applizierter DNA reduziert werden, um die gewünschte Anzahl der Zielgene zu



verabreichen. Den MIDGE[®]-Vektoren wurden das Nuclear-localization-sequence Peptid hinzugefügt, dass zusätzlich die Polarisierung zu einer Th1-Immunreaktion fördert [406; 407].

In der Vorgängerstudie zu dieser Arbeit kamen die Differenzierungsantigene Tyrosinase und gp100 in Kombination mit equinem IL-12 und IL-18 als Therapeutikum gegen das equine Melanom zum Einsatz. Den Pferden wurden MIDGE[®]-Th1-Vektoren kodierend für die zuvor genannten Interleukine und die Differenzierungsantigene appliziert [3]. In der Studie wurden sämtliche Gruppen mit den MIDGE[®]-Th1-Vektoren behandelt. Eine Gruppe erhielt keine für Antigene kodierende DNA, während die anderen beiden je eine Kombination aus MIDGE[®]-Th1-Vektor kodierend für die Zytokine mit Vektoren kodierend für die Antigene Tyrosinase bzw. gp100 erhielten. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen festgestellt werden. Allerdings zeigte sich insgesamt eine Tumorremission [3]. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass dieser Effekt höchstwahrscheinlich auf dem MIDGE[®]-Th1-Vektor kodierend für IL-12 und IL-18 als gemeinsame Komponente aller Gruppen beruhte [3]. Als Mechanismus kommen Effekte exprimierter IL-12 und IL-18-Moleküle sowie der DNA-Vektoren unabhängig vom kodierten Produkt infrage.



3 Material und Methode

Die vorliegende Arbeit ist zweigeteilt aufgebaut. Im ersten Teil wird auf die Langzeiteffekte nach Behandlung mit MIDGE[®]-Vektoren eingegangen (3.1). Hierzu wurden 19 an equinen Melanomen erkrankte Pferde, die bereits durch MÄHLMANN et al. (2012) behandelt wurden, erneut untersucht [3]. Den zweiten Teil stellt eine klinische Studie zur Messung der Zytokinexpression nach der Applikation von MIDGE[®]-Vektoren dar (3.2). In diesem Versuch wurden gesunde Pferde mit Genvektoren behandelt sowie die Immunreaktion auf RNA-Ebene lokal und systemisch untersucht. Bei den genutzten Behandlungsgenagzien handelt es sich um Komponenten, die bereits bei MÄHLMANN et al. (2012) zur Verwendung kamen [3]. Hierdurch soll der Wirkmechanismus der Therapie weiter erforscht werden.

3.1 Langzeiteffekte nach Behandlung mit MIDGE[®]-Vektoren

MÄHLMANN et al. (2012) behandelte 28 am equinen Melanom erkrankte Pferde mit Genvektoren kodierend für equines IL-12 und IL-18 [3]. Die Tumolvolumenentwicklung wurde gemessen und dokumentiert. Um die Langzeitentwicklung der Tumore der behandelten Pferde zu analysieren, wurden die Pferde aus der Studie von MÄHLMANN et al. (2012) erneut klinisch untersucht sowie die Tumolvolumina bestimmt [3].

3.1.1 Pferde

Neunzehn der ursprünglich 28 Versuchstiere aus der Studie MÄHLMANN et al. (2012) standen für die vorliegende Studie zur Verfügung (Tabelle 2) [3]. Die Pferde wurden einmalig im Heimatstall etwa zwei Jahre nach der ersten Behandlung im Rahmen der Studie MÄHLMANN et al. (2012) untersucht [3]. Die Besitzer wurden bezüglich erfolgter Therapieversuche gegen die Melanome und immunologischen Erkrankungen der Pferde seit der letzten Behandlung befragt. Zusätzlich wurde nach anderweitigen Behandlungen und Medikationen in den vier Wochen vor der



Untersuchung gefragt. Abschließend wurden alle Besitzer gebeten, den Verlauf der Erkrankung seit der letzten Behandlung durch MÄHLMANN et al. (2012) zu beschreiben [3].

Tabelle 1: Zusammensetzung der Testreagenzien zur Behandlung der 3 Versuchsgruppen [3].

Gruppe	Basislösung	Spezifischer Gruppenzusatz
IL-12/IL-18	SAINT-18, eqIL12-MIDGE- Th1 [®] , MIDGE-Th1 [®] eqILRAP-IL18	-
gp100		500 µg h. gp100 MIDGE-Th1 [®] -DNA
Tyrosinase		500 µg h. Tyrosinase MIDGE-Th1 [®] -DNA



Tabelle 2: Pferde, die im Rahmen der Studie untersucht wurden. Die Pferde sind zur besseren Vergleichbarkeit analog zu MÄHLMANN et al. (2012) nummeriert [3].

ID	Alter	Geschlecht	Behandlungsgruppe (Tabelle 1)
1	25	Stute	IL-12/IL-18
2	20	Wallach	IL-12/IL-18
8	22	Stute	IL-12/IL-18
18	19	Stute	IL-12/IL-18
24	16	Wallach	IL-12/IL-18
25	18	Stute	IL-12/IL-18
3	20	Wallach	gp100
7	20	Hengst	gp100
9	17	Hengst	gp100
16	16	Hengst	gp100
19	18	Stute	gp100
28	24	Stute	gp100
11	17	Hengst	Tyrosinase
12	22	Hengst	Tyrosinase
15	17	Stute	Tyrosinase
17	15	Stute	Tyrosinase
21	24	Wallach	Tyrosinase
26	15	Stute	Tyrosinase
27	13	Wallach	Tyrosinase

3.1.2 Allgemeine klinische Untersuchung und Labordiagnostik

Die Patienten wurden klinisch allgemein untersucht. Hierzu wurden das Verhalten, die Haltung, der Ernährungszustand, der Pflegezustand, der Habitus, die Pulsfrequenz, die Atemfrequenz sowie die Rektaltemperatur bestimmt. Ergänzend



wurden Herz und Lunge auskultiert, die Mandibularlymphknoten palpiert und die Auslösbarkeit des Hustenreflexes getestet. Abschließend erfolgte eine Untersuchung der Jugularvenen beidseits.

Zusätzlich wurden durch Punktion der *V. jugularis* 4 ml Blut entnommen, das mit EDTA stabilisiert wurde. Folgend wurden der Hämatokrit, die Erythrozytenzahl, die Hämoglobinkonzentration, die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration, das mittlere korpuskuläre Volumen, der mittlere korpuskuläre Hämoglobingehalt und die Gesamtleukozytenzahl mit dem Sysmex kx-21N (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt) bestimmt. Zusätzlich wurde die Gesamteiweißkonzentration refraktometrisch ermittelt. Die labordiagnostischen Untersuchungen wurden in der Klinik für Pferde der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführt. Nach der Blutentnahme wurden die Proben bis zur Untersuchung (maximal 13 Stunden) bei Raumtemperatur gelagert.

3.1.3 Größenmessung der Melanome

Eine der zentralen Fragen der Studie ist der Langzeiteffekt der untersuchten Therapie bezogen auf das Tumolvolumen. Aus diesem Grund wurden sämtliche von MÄHLMANN et al. (2012) vermessenen Melanome der 19 Pferde erneut mittels Schublehre und Ultraschall vermessen und die entsprechenden Volumina bestimmt [3].

Vor Beginn der Vermessung wurde bei allen Pferden die Hautoberfläche insbesondere an den typischen Prädilektionsstellen nach neu gebildeten Melanomen adspektorisch untersucht. Es wurden nur Melanome bis zu einer Gesamtzahl von sechs Melanomen erfasst. Bei Pferden mit mehr als sechs neuen Melanomen wurde lediglich dokumentiert, dass es sich um multiple neue Melanome handelt. Die Melanome wurden mittels Schublehre in zwei Dimensionen vermessen (Länge und Breite). Hierbei wurden die jeweils größten Durchmesser der Tumore aufgesucht. Die Ebenen lagen orthogonal zueinander in der Waagerechten und Senkrechten. Es fanden jeweils drei Messungen in jeder Ebene statt.



Zur ultrasonografischen Darstellung der Melanome gelangte ein LOGIQe (GE Healthcare, Little Chalfont, UK, Softwareversion Logiq e R5.01 LeBT07) mit einer intraoperativen Linearsonde 739-RS in einem Bereich von 8 bis 12 MHz zur Verwendung. Um eine optimale Ankopplung zu ermöglichen, wurden eine Vorlaufstrecke SONOKIT soft 100 x 100 x 20 mm (Sonogel Vertriebs GmbH, Bad Camberg) und Ultraschallgel (Sonogel Vertriebs GmbH, Bad Camberg) genutzt. Es wurden wie bei der Schublehrenmessung die maximalen Durchmesser in der horizontalen und vertikalen Ebene ermittelt. Die beiden Ebenen mussten ebenso orthogonal zueinander sein. Die Sonde wurde so an das Melanom angelegt, dass die zu vermessene Ebene mit ihren Begrenzungen sichtbar war. Zusätzlich wurde eine dritte Ebene (Tiefe) vermessen, die wiederum orthogonal zu den beiden anderen Ebenen sein musste. Hierzu wurde die Sonde auf die höchste Erhebung des Melanoms gelegt und die Ausbreitung des Melanoms in die Tiefe ultrasonografisch dargestellt. Alle Ebenen wurden dreimal aufgesucht und Bilder angefertigt. Die erzeugten Bilder wurden in das Patientenverwaltungsprogramm easyVET (IFS Informationssysteme GmbH, Hannover) transferiert und mit der integrierten Bildanalyse-Software ausgewertet. Aus den ermittelten Tumordimensionen wurde das Tumolvolumen berechnet (Abbildung 1). Die berechneten Volumina wurden dann im Folgenden weiter ausgewertet (3.3.1).

$$V_1 = l \cdot b \cdot t$$
$$V_2 = l \cdot b^2 \cdot 0,5$$

Abbildung 1: Formeln zur Berechnung der Tumolvolumina für die Messung mit Ultraschall und Schublehre [203; 408-410].

V_1 = Volumen bei Ultraschallmessung

V_2 = Volumen bei Schublehrenmessung

l = Länge, b = Breite, t = Tiefe)



3.2 Klinische Studie zur Messung der Zytokinexpression nach intradermaler Applikation von MIDGE[®]-Vektoren

Grundsätzlich erfolgten sämtliche Zentrifugationsschritte, sofern nicht anders angegeben, mit der Tischzentrifuge Hermle Z230M (Hermle, Gosheim) bei Raumtemperatur (RT).

3.2.1 Vorversuche

Zur Bestimmung der RNA-Expression von Interleukinen (IL-2, IL-4, IL-10, IL-12p35, IL-12p40), Chemokinen (CCL2, CXCL2, CXCL8, CXCL10) und IFN γ in Hautbiopsien und Blutproben wurden absolute quantitative real-time Polymerasekettenreaktionen (qPCR) mit dem StepOnePlus[™] Real-Time PCR System (Applied Biosystems[®], Darmstadt) durchgeführt.

3.2.1.1 Erstellung von Standardreihen (SYBR[®] Green)

Zur quantitativen Auswertung der PCR wurden Lösungen mit definierter Konzentration von Amplifikaten der gesuchten Sequenz als Referenzgröße in unterschiedlichen Verdünnungsstufen als Standardreihe (10^2 bis 10^6 Kopien pro μ l) genutzt. Die Standardreihe des jeweiligen Zytokins diene der Kalibrierung sowie Berechnung der Kopienzahl von im Doppelansatz gemessenen Proben unbekannter Konzentration (Abbildung 2).

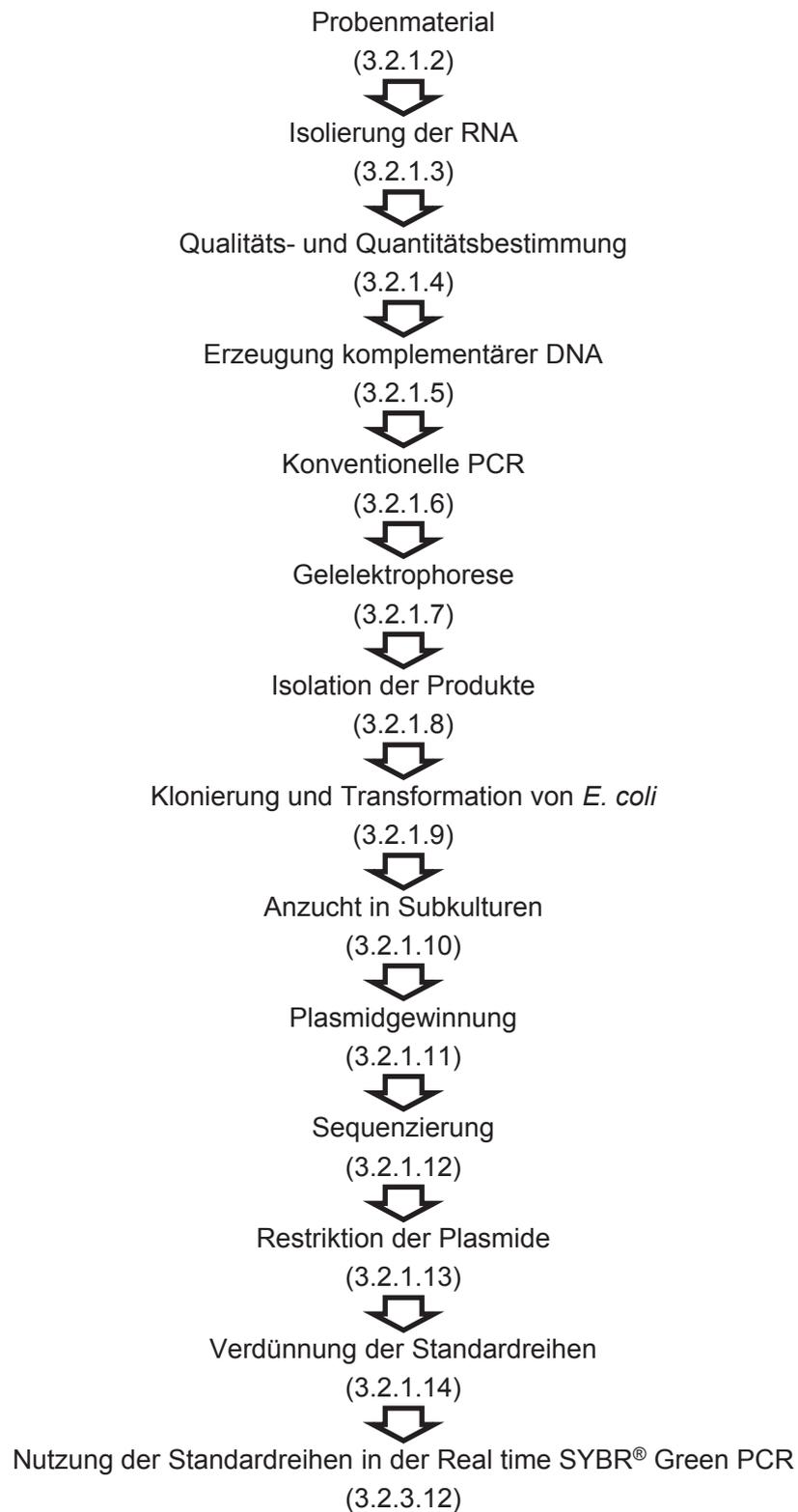


Abbildung 2: Darstellung der Arbeitsschritte zur Gewinnung von Standardreihen zur Nutzung in der qPCR unter Angabe der zugehörigen Kapitelnummern.



3.2.1.2 Probenmaterial

Zur Entwicklung der Standardreihen für den Einsatz in der qPCR gelangten equine Leber- und Uterusgewebeproben zur Nutzung. Alle Proben stammten von Pferden, die aus medizinischen Gründen in der Klinik für Pferde der Tierärztlichen Hochschule Hannover euthanasiert wurden. Die Proben wurden im direkten Anschluss an die Euthanasie entnommen, aliquotiert und bei -80 °C konserviert. Des Weiteren wurden Lysate von peripheren mononukleären Zellen aus den Beständen der Klinik für Pferde der Tierärztlichen Hochschule Hannover eingesetzt. Die PBMC wurden über eine Separation mithilfe eines Dichtegradienten (Lymphozytenseparations-medium[®] 1,077 g/ml) gewonnen. Die RNA wurde isoliert (3.2.1.3) und die gesuchten Zielsequenzen gezielt detektiert (3.2.1.5).

3.2.1.3 Isolierung der RNA

In einem ersten Schritt wurde die RNA aus dem Gewebe (3.2.1.2) isoliert. Hierzu wurde das Gewebe lysiert und die RNA über ein kommerziell erhältliches Puffer- und Filtersystem (RNeasy[®] Plus Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden) isoliert. Im Rahmen der Isolation wurde eine DNase zur Aufreinigung des Produkts genutzt. Die genaue Durchführung der Isolation gelangt im Folgenden zur Erläuterung.

In Vorbereitungsschritten wurde der mitgelieferte Puffer RLT Plus im Verhältnis 100:1 mit Mercaptoethanol (2-Hydroxyethylmercaptan; Sigma[®]-Aldrich, Steinheim) versetzt. Im Anschluss wurde der RPE-Puffer mit dem vierfachen Volumen Ethanol (ROTIPURAN[®] ≥ 99,8 % p.a.; Carl Roth GmbH, Karlsruhe) verdünnt.

Um die Kapazität der verwendeten Säulen nicht zu überschreiten, wurden pro Isolierung Gewebestücke mit einer Kantenlänge von max. drei mm bzw. 200 µl lysierte PBMC, mit je 350 µl Puffer RLT Plus versetzt und mithilfe eines Pistills mechanisch homogenisiert.

Die Proben wurden drei Minuten bei 13.000 x g zentrifugiert und der entstandene Überstand wurde für die Weiterverarbeitung verwendet. Dieser wurde in einem



nächsten Schritt auf eine QIAshredder Spin Column (Auffanggefäß mit aufsetzbarem Filtersystem zur Filtration) gegeben und für zwei Minuten bei 14.000 x *g* zentrifugiert. Der Filter wurde anschließend verworfen und der Durchfluss auf eine gDNA Eliminator Mini Spin Column (Auffanggefäß mit aufsetzbarer Filtersäule zur Bindung genomischer DNA) übertragen. Die Säule wurde im Anschluss für 30 Sekunden bei 10.000 x *g* zentrifugiert und der entstandene Durchfluss mit dem identischen Volumen von 70%-igem Ethanol (hergestellt aus Ethanol (ROTIPURAN® ≥ 99,8% p.a.; Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und RNase- und DNase-freiem Wasser (Sigma®-Aldrich, Steinheim)) ergänzt. Die Lösung wurde mithilfe einer Pipette gründlich durchmischt, um Homogenität zu gewährleisten. Im nächsten Schritt wurde die Lösung auf eine RNeasy Mini Spin Column gegeben und 15 Sekunden bei 10.000 x *g* zentrifugiert. Da die RNA im Filter gebunden wurde, wurde der Durchlauf verworfen und das Filtersystem mit enthaltener RNA weiter genutzt. Es schlossen sich vier Waschschrte an. Die ersten zwei erfolgten mit jeweils 350 µl Puffer RW1 und die letzten zwei mit 500 µl Puffer RPE. Jeder Waschschrte bestand aus der Zugabe eines der zuvor genannten Puffer, nachfolgender Zentrifugation (15 Sekunden bei 10.000 x *g*) sowie finalem Verwerfen des Durchlaufs. Nach dem letzten Waschschrte wurde der Filter nochmals ohne Pufferzugabe für fünf Minuten bei 13.000 x *g* zentrifugiert. Der Filter mit der gebundenen RNA wurde auf ein neues, steriles 2 ml Eppendorfgefäß gesteckt und 40 µl steriles RNase und DNase freies Wasser (Sigma®-Aldrich, Steinheim) auf das Filtersystem gegeben. Zur Eluierung der RNA wurde das Filtersystem eine Minute bei 14.000 x *g* zentrifugiert. Die im Durchlauf befindliche eluierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C konserviert.

3.2.1.4 Qualitäts- und Quantitätsbestimmung von RNA- und cDNA-Proben

Nach der RNA-Isolierung wurden die Proben quantitativ und qualitativ mit dem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) photometrisch analysiert. Die Untersuchung war notwendig, um einerseits sicherzustellen, dass reine RNA in ausreichender Qualität für die weitere Verwendung vorlag sowie andererseits in den nächsten Verarbeitungsschritten ein Maß für die Menge der verwendeten RNA vorhanden war.



Das Gerät wurde auf die entsprechend verwendete Verdünnung, in diesem Fall 2 µl Probe in 98 µl Trishydrochloridpuffer (pH 7,8; 10 mM), justiert. Anschließend wurde das Gerät vor jeder Messung mit 100 µl Trishydrochloridpuffer tariert (Blank).

Zur Berechnung der mRNA-Konzentration (c) der Proben wurde folgende Formel benutzt:

$$c \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right] = \text{OD}_{260} \times 50$$

Hierbei stand OD_{260} für die optische Dichte bei 260 nm.

Zur Bestimmung der Reinheit (r) der Proben wurde folgende Formel angewendet:

$$r = \frac{\text{OD}_{260}}{\text{OD}_{280}}$$

OD_{280} stand für die optische Dichte bei 280 nm.

Proben, bei denen der Reinheitsgrad (r) nicht zwischen 1,9 und 2,1 lag, wurden verworfen.

Analog wurden im weiteren Verlauf erzeugte Plasmide (3.2.1.11) photometrisch quantifiziert. Hierzu wurde lediglich die Einstellung des BioPhotometers (Eppendorf, Hamburg) von RNA auf dsDNA geändert. Das sonstige Verfahren blieb identisch zu dem der Messung von RNA.

3.2.1.5 Erzeugung komplementärer DNA

Zur Gewinnung einer komplementären DNA (cDNA) aus der isolierten RNA (3.2.1.3) kam eine reverse Transkriptase PCR zum Einsatz. In einem ersten Arbeitsschritt wurden 10 µl einer Ausgangslösung, bestehend aus RNase- und DNase-freiem Wasser (Sigma®-Aldrich, Steinheim) sowie der RNA-Lösung (3.2.1.3), hergestellt. Das Verhältnis der beiden Lösungen wurde so gewählt, dass die entstehende Lösung zwischen 1 ng und 5 µg RNA enthielt.



Anschließend wurden 1 µl ROTI[®]-MIX PCR 3 (pH 7) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und 1 µl Random Primers (Invitrogen[™], Karlsruhe) hinzugegeben. Diese Probe wurde im Biometra[®] TGradient (Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) für fünf Minuten bei 65° C inkubiert und im Anschluss direkt auf Eis gelagert. Zu der Probe wurden nach der Inkubation 4 µl 5X First-Strand Puffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂, Invitrogen[™], Karlsruhe), 2 µl 0,1 M DTT (Invitrogen[™], Karlsruhe) und 1 µl RNaseOUT[™] Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen[™], Karlsruhe) pipettiert und das Gemisch wiederum im Biometra[®] TGradient (Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) für zwei Minuten bei 25 °C inkubiert. Nun wurden 0,8 µl SuperScript[™] II RT (Invitrogen[™], Karlsruhe) zugegeben und das Gemisch 10 Minuten bei 25 °C, 50 Minuten bei 42 °C und final 15 Minuten bei 70 °C im Biometra[®] TGradient (Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) inkubiert. Die so gewonnene komplementäre DNA (cDNA) wurde bei -20 °C eingefroren bzw. direkt weiterverwendet (3.2.1.6).

3.2.1.6 Konventionelle Polymerasekettenreaktion

In dieser PCR erfolgte durch die Zugabe von spezifischen Primern eine gezielte Replikation der gewünschten DNA-Fragmente, die für die weitere Arbeit benötigt wurden.

Zu diesem Zweck wurde ein Reaktionsansatz (Tabelle 3) in einem 0,2 ml Eppendorfgefäß angemischt. Je 1,5 µl Forward- und Reverse-Oligonukleotidprimer (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) wurden in der Reaktion eingesetzt. Die Sequenzen sind in Tabelle 4 ersichtlich. Sie stammten aus bereits publizierten Daten bzw. wurden mit dem Primer-Blast der NCBI-Gen-Datenbank erzeugt. Die Primer wurden in einer Konzentration von 5 pmol/µl genutzt. Das erzeugte Reaktionsgemisch wurde im BIOMETRA[®] T-GRADIENT (Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) nach dem Schema in Tabelle 5 inkubiert. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.



Tabelle 3: Pipettierschemas der einzelnen Komponenten für die Reaktionsansätze der konventionellen PCR.

Komponente	Menge in μl
10X PCR Puffer (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl; Invitrogen™, Karlsruhe)	2
ROTI®-MIX PCR 3 (pH7; Carl Roth GmbH, Karlsruhe)	0,4
Magnesium Chloride (50 mM; Invitrogen™, Karlsruhe)	0,6
TaqDNA Polymerase (5 U/ μ l; Invitrogen™, Karlsruhe)	0,2
Forward-Primer (5 pmol/ μ l)	1,5
Reverse-Primer (5 pmol/ μ l)	1,5
cDNA (3.2.1.1.5)	1
RNase und DNase freies Wasser (Sigma®-Aldrich, Steinheim)	12,8



Tabelle 4: Verwendete Forward- und Reverse-Primer für die real-time SYBR® Green PCR mit deren Sequenzen sowie Produktlängen. Zusätzlich ist die zugehörige Accession-Nummer des National Center for Biotechnology Information abgebildet.

equine Zielgene	Forward-Primer (5'->3')	Reverse-Primer (5'->3')	Accession-Nummer	Länge Amplikon [bp]
IL-2	TGGCTTGCAATCGCACTAACT	ATTCTGTGGCCCTTCTTGGGC	NM_001085433.1	189
IL-4	GCCCGAAGAACACAGATGGA	CAGTACAGCAGGTCCCGTTT	NM_001082519.1	150
IL-10	GTGAACTCCCTGGGGGAAAA	TCTCCCAGAACCCCTGGATGG	NM_001082490.1	309
IL-12p35	GCTGACAGCCATTGACAAGCT	TCAAGGGAGGGCTTTTGTG	NM_001082511.1	76
IL-12p40	TGCTGTTCAACAAGCTCAAGTATGA	GGGTGGTCTGGTTTGATGA	NM_001082516.1	76
IL-18	TGCTGGACCAGTAGAAGACA	AGGTTCAAGCCCTGCCAAAGT	NM_001082512.1	124
CXCL2	CCGTGCAGGGGATTCACTT	GCTATGACTTCGGTTTGGGC	NM_001143955.1	85
CXCL8	CAGCATCTCGTCTGAACATGACT	AGAGCTGCAGAAAGCAGGAAGA	NM_001083951.1	73
CXCL10	GACTCTGAGTGGAACCTCAAGGAAT	GTGGCAATGATCTCAACACG	NM_001114940.1	153
CCL2	AAAGCCCAAACTCCAAGCC	CCCTCAACACCATCCCAAGG	NM_001081931.1	294
IFNY	GCTGTGTGGGATTTGGGTT	CTCAGGTTAGCTTTGGGCGA	NM_001081949.1	417



Tabelle 5: Temperaturprotokoll unter Angabe der Zeit und Temperatur, das bei der Durchführung der konventionellen PCR zur Anwendung kam.

Zeitdauer in Minuten	Temperatur in °C
10	95
0,5	95
0,5	56
0,5	72
10	72
∞	4

3.2.1.7 Gelelektrophorese

Für die Größenanalyse der PCR-Produkte erfolgte eine Gelelektrophorese mit Größenstandard. Diese Methode macht sich die Eigenschaft zunutze, dass sich DNA-Fragmente im elektrischen Feld in Abhängigkeit von ihrer Größe mit einer unterschiedlichen Geschwindigkeit bewegen. Durch einen Farbstoff kann die DNA im Gel sichtbar gemacht werden. Zur Auswertung wurde ein Größenmarker parallel auf das Gel aufgetragen.

Es wurde ein 2,5%-iges Agarosegel genutzt. Dieses wurde hergestellt, indem 1,25 g Agarose NEEO Ultra (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in 50 ml Pufferlösung, bestehend aus Rotiphorese[®] 10x TBE-Puffer (Carl Roth GmbH, Karlsruhe), zehnfach verdünnt mit Aqua dest. gelöst, gegeben wurde. Um eine homogene Lösung zu erzeugen, wurde das Gemisch aufgeköcht. Zur Beibehaltung der Osmolarität wurden Siedeverluste mit destilliertem Wasser ausgeglichen. Nach dem Abkühlen wurden der Lösung 4 µl GelStar[®] Nucleic Acid Gel Stain (Lonza, Rockland, USA) hinzugefügt. Aus dieser Lösung wurde das Agarosegel mit Kammern für die Proben in der Mini-Sub Cell[®] GT (BioRad Laboratories GmbH, München) gegossen.

Nach Abschluss der PCR (3.2.1.6) wurden 20 µl Probe mit jeweils 4 µl Gel Loading Dye Blue (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) versetzt, vermischt und



in die Kammern des Gels übertragen. Als Standard und Größenvergleich wurden jeweils 3 µl Quick-Load® 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) mit auf das Gel aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde in der Gelelektrophoresekammer (Mini-Sub Cell® GT, BioRad Laboratories GmbH, München) bei 85 Volt sowie 0,03 Ampere für 50 Minuten vorgenommen und das Gel nach Abschluss unter UV-Licht analysiert. Als Referenz wurden die zu erwartenden Produktlängen mit der Länge der Produkte der Gelelektrophorese verglichen und zur weiteren Verarbeitung (3.2.1.8) wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten.

3.2.1.8 Isolation der PCR Produkte

In einem nächsten Schritt musste die in den Gelbanden enthaltene DNA isoliert und in eine wässrige Lösung überführt werden. Hierzu fand das QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden) Nutzung.

Die zuvor ausgeschnittene Gelbande wurde gewogen und mit der dreifachen Menge des Eigengewichts (100 µg entsprechen 100 µl) von QIAEX I (Qiagen GmbH, Hilden) versetzt. Nachdem das Reagenz QIAEX II (Qiagen GmbH, Hilden) 30 Sekunden gevortext wurde, wurden 10 µl der Lösung zur Probe hinzugegeben. Die entstandene Lösung wurde bei 50 °C mindestens zehn Minuten inkubiert und dabei im Abstand von zwei Minuten gevortext, um die DNA in Lösung zu behalten. Wenn die Lösung nach zehn Minuten nicht homogen war, wurde die Inkubationszeit verlängert.

Im Anschluss wurde die Probe 30 Sekunden bei 12.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es schlossen sich drei Waschschrte an. Vor dem ersten Waschschrte wurden 500 µl QIAEX II (Qiagen GmbH, Hilden) zugegeben und vor den anderen beiden Waschschrten 500 µl Puffer PE (Qiagen GmbH, Hilden). Das zuvor entstandene Pellet wurde jeweils durch Vortexen im Puffer gelöst. Nach erfolgreicher Lösung wurde die Probe jeweils erneut 30 Sekunden bei 12.000 x g zentrifugiert und der entstandene Überstand verworfen.



Im Anschluss an den letzten Waschschrift wurde das Pellet luftgetrocknet, bis es kreideweiß war. Anschließend wurde das Pellet in 20 µl RNase- und DNase-freiem Wasser (Sigma[®]-Aldrich, Steinheim) resuspendiert sowie für fünf Minuten bei RT inkubiert. Darauf folgend wurde die Lösung 30 Sekunden bei 12.000 x g zentrifugiert und der Überstand, in dem sich nun die eluierte DNA befand, in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß übertragen.

Die DNA wurde sofort auf Eis gelagert oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

3.2.1.9 Klonierung und Transformation von *Escherichia coli*

Nachdem die gesuchten Sequenzen isoliert waren, wurden sie in ein Plasmid kloniert. Zur Vermehrung des Plasmids wurde *Escherichia coli* (*E. coli*) mit dem Plasmid transformiert und im Anschluss selektiv kulturell angezchtet. Es gelangte das Plasmid pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[™], Karlsruhe) zur Verwendung. Dieses Plasmid besitzt definierte Ligationsstellen für das PCR-Produkt, charakteristische Antibiotika-Resistenzen sowie Schnittstellen für Restriktionsenzyme.

Zur Transformation der One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen[™], Karlsruhe) wurde für die Ligation bzw. Klonierung das TOPO[®] TA Cloning[®] Kit (Invitrogen[™], Karlsruhe) eingesetzt. Eine Lösung bestehend aus 0,5 µl Saltsolution (Invitrogen[™], Karlsruhe), 0,5 µl pCR[™]4-TOPO[®] (Invitrogen[™], Karlsruhe) und 2 µl, der im Vorschrift (3.2.1.8) gewonnenen DNA, wurden in ein Eppendorfgefäß gegeben. Die Lösung wurde für 15 Minuten bei RT inkubiert. Fünf Minuten vor Ablauf der Inkubationszeit wurden die One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen[™], Karlsruhe), die bei -80 °C gelagert wurden, zum Antauen auf Eis verbracht. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden 2 µl der Lösung zu den One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen[™], Karlsruhe) gegeben und durch leichtes Bewegen vermischt. Die Mischung wurde im Anschluss für 30 Minuten auf Eis inkubiert, direkt im Anschluss daran im Heizblock (Techne Dri-Block DB.3, Thermo Dux, Wertheim) für 30 Sekunden auf 42 °C erhitzt



und sofort wieder auf Eis gelegt. Es wurden 250 µl S.O.C. Medium (Invitrogen™, Karlsruhe) hinzugefügt. Im Anschluss wurde die Lösung für 60 Minuten bei 37 °C und 250 rpm waagrecht im Schüttelinkubator (GFL-3031 Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel) inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden je 100 µl bzw. 200 µl der zuvor hergestellten Bakterienlösung auf einem der zwei vorgewärmten LB-Nährböden mit Zusätzen ausplattiert und für 16 Stunden bei 37 °C im Brutschrank (Baureihe 5060 Heraeus, Hanau) inkubiert. Als Zusätze der Nährböden wurden Ampicillin (Sigma®-Aldrich, Steinheim), 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) und Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) genutzt.

3.2.1.10 Anzucht in Subkultur

In der Subkultur sollte ein transformiertes *E. coli*-Isolat angereichert werden, das die Zielsequenz enthielt. Durch die Ampicillinresistenz (ungehemmtes Wachstum auf dem Nährboden mit Ampicillinzusatz) sowie die fehlende β-Galactosidase (Weißfärbung der Kolonie im Gegensatz zu den negativen blauen Kolonien) im transformierten TOPO®-Vektor, konnten die entsprechenden Kolonien makroskopisch identifiziert werden.

Die so identifizierten Kolonien wurden in 5 ml flüssiges LB-Medium (Anhang), dem 50 µg Ampicillin (Sigma®-Aldrich, Steinheim) zugesetzt wurde, überführt. Es folgte eine 16-stündige Kultivierung im Schüttelinkubator (GFL-3031 Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel) bei 37 °C und 250 rpm.

3.2.1.11 Plasmidgewinnung

Zur weiteren Verarbeitung wurden die Plasmide mit dem PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen™, Karlsruhe) aus den Bakterienkulturen (3.2.1.10) extrahiert. Vor Beginn wurden 13 ml des Puffers R3 mit 85 µl RNase A versetzt und der Puffer



W9 mit 30 ml sowie der Puffer W10 mit 17 ml Ethanol (ROTIPURAN® $\geq 99,8$ % p.a.; Carl Roth GmbH, Karlsruhe) ergänzt. Im Anschluss erfolgte eine Lagerung der verdünnten Pufferlösungen bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C. Die Bakteriensuspension (3.2.1.10) wurde bei 8.000 x *g* zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet weiterverwendet.

Das so entstandene Pellet wurde in 250 μ l Puffer R3 mit RNase A bis zu einer homogenen Suspension resuspendiert. Im Anschluss wurden 250 μ l Lysis Puffer L7 hinzugefügt und die Lösung durch Schwenken des Eppendorfgefäßes vermischt. Das Gefäß wurde für fünf Minuten bei RT inkubiert und im Anschluss wurden 350 μ l Precipitation Puffer N4 beigemischt. Durch Schwenken wurde eine homogene Mischung erzeugt. Das Lysat wurde im Anschluss für zehn Minuten bei 12.000 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde auf den Filter einer der mitgelieferten Zentrifugationssäulen überführt, für eine Minute bei 12.000 x *g* zentrifugiert sowie der Durchfluss verworfen. Auf den Filter wurden im Anschluss 500 μ l Waschpuffer W10 mit Ethanol gegeben und die Säule erneut für eine Minute bei 12.000 x *g* zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule mit 700 μ l Waschpuffer W9 mit Ethanol befüllt. Es schloss sich eine erneute Zentrifugation bei 12.000 x *g* für eine Minute an, in deren Anschluss der Durchfluss verworfen und danach die Zentrifugation, wie zuvor beschrieben, wiederholt wurde.

Nun wurde die Filtersäule in ein neues 1,5 ml-Sammelgefäß überführt und 75 μ l TE-Puffer zentral auf die Membran pipettiert. Das Gemisch wurde für eine Minute bei RT inkubiert, bevor die Säule für zwei Minuten bei 12.000 x *g* zentrifugiert wurde. Im Durchfluss befand sich nun das isolierte Plasmid, das bei -20 °C gelagert wurde, wenn es keine sofortige Verwendung fand.

3.2.1.12 Sequenzierung

Durch die Sequenzierung wurde sichergestellt, dass die Plasmide korrekt transformiert wurden. Die Analyse wurde von Sequence Laboratories Göttingen GmbH in Form von „Extended-HotShot“ vorgenommen. Hierzu wurden die zum



Plasmid gehörigen Primer T3 (Invitrogen™, Karlsruhe) und T7 (Invitrogen™, Karlsruhe) genutzt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Sequenzen der Primer, die zur Sequenzierung des Plasmides pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen™, Karlsruhe) genutzt wurden.

T7 Primer	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T3 Primer	5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3'

Von jedem transformierten Plasmid wurden zwei Reaktionsansätze zur Sequenzierung eingeschickt. Das Reaktionsgemisch bestand aus 600 bis 700 ng des Plasmids (photometrisch gemessen) und 1,2 µl des jeweiligen Primers, mit RNase- und DNase-freiem Wasser (Sigma®-Aldrich, Steinheim) auf ein Gesamtvolumen von 7 µl aufgefüllt. Von den sequenzierten Plasmiden wurden lediglich die positiv analysierten weiterverwendet (Tabelle 4). Positiv bedeutet hier, dass das Zielprodukt frei von Mutationen in die Plasmide transformiert wurde.

3.2.1.13 Restriktion der Plasmide

Nach erfolgreicher Sequenzierung wurden die Plasmide mittels der Restriktionsendonuklease Scal an definierten Stellen geschnitten und so linearisiert (Abbildung 3). Scal wurde gewählt, da es bei sämtlichen verwendeten transformierten Plasmiden nur eine Schnittstelle besitzt und es somit neben dem gewollten Schnitt im pCR®2.1-TOPO®-Plasmid nicht zu einer weiteren Durchtrennung in der gesuchten und eingefügten Sequenz kommt. Deshalb war es in der Lage, aus den zyklischen Plasmiden lineare DNA-Stränge zu erzeugen.

Ein Reaktionsansatz, bestehend aus 1 µl Scal (Thermo-Scientific, Schwerte), 2 µl 10 x Puffer Scal (Thermo-Scientific, Schwerte) sowie 1 µg des Plasmids, wurde mit



RNase- und DNase-freiem Wasser (Sigma[®]-Aldrich, Steinheim) auf 20 µl aufgefüllt. Die Reaktionslösung wurde bei 37 °C für eine Stunde im Wärmeschrank (Thermicon T, Heraeus, Hanau) inkubiert.

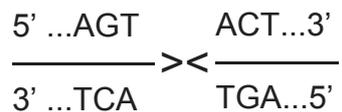


Abbildung 3: Die charakteristische Schnittstelle des Restriktionsenzym Scal, das zur Linearisierung des pCR[®]2.1-TOPO[®]-Plasmides genutzt wurde.

3.2.1.14 Verdünnung der Standardreihen

Zur Quantifizierung der Messungen wurden Lösungen mit bekannter Kopienzahl verwendet. Bei diesen Lösungen handelte es sich um Lösungen der Plasmide (3.2.1.13), in denen die Kopienzahl über die Konzentration berechnet wurde. Um die exakte Konzentration der Plasmide einstellen zu können, wurde in einem ersten Schritt die Konzentration der Plasmide analog zu 3.2.1.4 photometrisch bestimmt und dann rechnerisch die Konzentration der Plasmide ermittelt (Abbildung 4).



$$S \left[\frac{\text{Kopien}}{\mu\text{l}} \right] = \frac{6 \cdot 10^{23} \left[\frac{\text{Kopien}}{\text{mol}} \right] \cdot \text{DNA} \left[\frac{\text{g}}{\mu\text{l}} \right]}{\text{MW} \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]}$$

$$\text{MW} = P \cdot \frac{660 \text{ g}}{\text{mol}}$$

$$\text{MW} = P \cdot \frac{660 \text{ g}}{\text{mol}}$$

Abbildung 4: Formel zur Berechnung der Plasmidkonzentration nach photometrischer Messung einer Plasmidlösungen.

MW = Molekulargewicht des PCR-Produkts

P = PCR-Produktlänge in bp, S = Standardkonzentration

DNA = im Photometer gemessene DNA-Konzentration

$660 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ = Durchschnittliches molekulares Gewicht der Basen)

Ausgehend von der Konzentration der Plasmidlösung wurde durch Verdünnung der ursprünglichen Lösung mit RNase- und DNase-freiem Wasser (Sigma®-Aldrich, Steinheim) eine Lösung mit einer Konzentration von 10^9 Kopien pro μl erzeugt. Diese Verdünnungsstufe diente als Pool zur Erstellung einer Standardreihe. Die Standardreihe enthielt Stufen einer 10-fachen Verdünnung, ausgehend von der Stocklösung bis zu einer finalen Konzentration von 100 Kopien pro μl .

3.2.2 Primeroptimierung SYBR® Green PCR

Da die Menge und das Verhältnis der Primer eine PCR entscheidend beeinflussen, erfolgte zunächst eine Primeroptimierung. Die PCR-Reaktionsansätze wurden für die einzelnen Zielgene optimiert und folgende Konzentrationen und Mengen als optimal ermittelt (Tabelle 7, Tabelle 8).



Tabelle 7: Sechs Varianten des Mastermixes wurden ausprobiert, die sich in den Anteilen der einzelnen Komponenten unterscheiden, um zu ermitteln, unter welchen Bedingungen die qPCR optimal läuft.

Mastermix-Variante	1	2	3	4	5	6
Forwardprimer [µl]	1,5	1,5	1,5	4,5	4,5	4,5
Reverseprimer [µl]	0,25	1,5	4,5	0,25	1,5	4,5
SYBR® Green [µl]	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Wasser [µl]	9,75	8,5	5,5	6,75	5,5	2,5

Tabelle 8: Die optimalen Reaktionsansätze inklusive der idealen Verdünnungsstufe der Primer für die einzelnen Zytokine.

Zytokin	Mastermix	Primerverdünnung [pmol/µl]
IL-2	5	5
IL-4	2	5
IL-10	2	5
IL-12p35	3	0,5
IL-12p40	2	0,5
IL-18	2	5
CXCL2	5	0,5
CXCL8	6	0,5
CXCL10	3	5
CCL2	3	0,5
IFN γ	3	5



3.2.3 Klinischer Versuch

3.2.3.1 Pferde

Nach Genehmigung des Tierversuches unter dem Aktenzeichen 33.9-42502-04-11/0399 durch das niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit wurden 24 Pferde in die Studie aufgenommen. Die Einschlusskriterien wurden dazu wie folgt festgelegt: Alle Pferde waren in den vier Wochen vor Studienbeginn klinisch gesund und wurden nicht medikamentös behandelt. In der Anamnese wurden immunmodulierende Erkrankungen erfragt, um diese Pferde von der Studie auszuschließen. Nach Aufklärung und Einverständnis der Tierbesitzer konnten 24 Pferde in die Studie aufgenommen werden (Tabelle 9). Acht der Pferde waren Schimmel. Die Pferde wurden in vier Gruppen aufgeteilt. Hierbei erfolgte, soweit möglich, eine homogene Verteilung bezüglich Alter und Geschlecht.

3.2.3.2 Behandlungsgruppen

Jede der vier Gruppen wurde mit einem anderen Testreagenz behandelt. Die vier in diesem Versuch zu testenden Agenzien wurden extern verblindet und erst nach Auswertung der Ergebnisse des Gesamtversuches entblindet. Die vier Testreagenzen differenzierten sich jeweils untereinander in ihrer Zusammensetzung (Tabelle 10).



Tabelle 9: Pferde der klinischen Studie. Die Pferde sind sortiert nach der zugewiesenen ID. Dargestellt sind ihr Alter, Geschlecht, Typ, Farbe, Gewicht sowie die Zuordnung zu einer der vier Behandlungsgruppen. (ID: Identifikation, VB: Vollblut, WB: Warmblut; S: Schimmel, B: Braun, F: Fuchs, R: Rappe)

ID	Alter [Jahren]	Geschlecht	Typ	Farbe	Gewicht [kg]	Gruppe (Tabelle 10)
A	21	Stute	VB	S	550	SAINT-18
B	17	Stute	VB	S	518	IL-12/IL-18
C	2	Wallach	VB	S	438	ohne ATG
D	8	Stute	VB	B	453	ohne CpG
E	4	Stute	WB	S	425	SAINT-18
F	19	Wallach	WB	F	615	IL-12/IL-18
G	8	Stute	WB	S	600	ohne CpG
H	8	Wallach	WB	R	610	ohne ATG
I	11	Wallach	WB	B	655	SAINT-18
J	7	Wallach	WB	B	614	IL-12/IL-18
K	11	Wallach	WB	S	530	ohne ATG
L	10	Wallach	WB	B	650	ohne CpG
M	8	Wallach	WB	B	550	SAINT-18
N	5	Stute	WB	B	520	IL-12/IL-18
O	8	Wallach	WB	B	587	ohne ATG
P	14	Wallach	WB	R	582	ohne CpG
Q	13	Wallach	WB	R	674	SAINT-18
R	5	Wallach	WB	B	620	IL-12/IL-18
S	20	Wallach	WB	B	580	ohne ATG
T	17	Wallach	WB	S	680	ohne CpG
U	10	Hengst	WB	S	650	IL-12/IL-18
V	8	Wallach	WB	F	550	ohne CpG
W	9	Hengst	VB	B	520	SAINT-18
X	11	Hengst	VB	F	550	ohne ATG



Tabelle 10: Es sind jeweils die Kurznamen der vier Testreagenzien (SAINT-18, IL-12/IL-18, ohne ATG und ohne CpG) sowie deren Zusammensetzung dargestellt. Nur SAINT-18 enthielt keine DNA (eqIL-12-MIDGE-Th1[®] und eqILRAP-IL-18-MIDGE-Th1[®]). Die DNA der anderen drei Gruppen unterschieden sich allerdings bezogen auf das Startcodon und die CpG-Motive. Lediglich IL-12/IL-18 enthielt ein Startcodon (ATG) und CpG-Motive. Ohne ATG enthielt kein Startcodon, jedoch die 1,02-fache Menge von CpG-Motiven verglichen mit IL-12/IL-18. Ohne CpG enthielt kein Startcodon und nur inverse CpG-Motive.

Reagenz Name	PBS	Transfektionsreagenz SAINT-18	eqIL-12-MIDGE-Th1 [®]	eqILRAP-IL-18- MIDGE-Th1 [®]	Startcodon	CpG-Motive	Konzentration
SAINT-18	X	X					6 nmol/ml
IL-12/IL-18	X	X	X	X	X	X	0,75 µmol SAINT-18/mg DNA; 0,4 mg DNA/ ml PBS
ohne ATG	X	X	X	X		X	
ohne CpG	X	X	X	X			

3.2.3.3 Klinische Untersuchung

Vor dem Versuchsbeginn wurden die Pferde allgemein klinisch untersucht. Hierzu wurden das Verhalten, die Haltung, der Ernährungszustand, der Pflegezustand, der Habitus, die Pulsfrequenz, die Atemfrequenz sowie die Rektaltemperatur bestimmt. Ergänzend wurden Herz und Lunge auskultiert, die Mandibularlymphknoten palpiert und die Auslösbarkeit des Hustenreflexes getestet. Abschließend wurden die Jugularvenen beidseits untersucht. Diese Untersuchung wurde vor jeder Manipulation am Patienten während der Versuchsperiode wiederholt.



3.2.3.4 Labordiagnostische Untersuchung

Zusätzlich wurden bei jeder Untersuchung durch Punktion der *V. jugularis* 4 ml Blut entnommen, das mit EDTA stabilisiert wurde, und es fanden hämatologische Untersuchungen statt. Es wurden der Hämatokrit, die Erythrozytenzahl, die Hämoglobinkonzentration, die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration, das mittlere korpuskuläre Volumen, der mittlere korpuskuläre Hämoglobingehalt und die Gesamtleukozytenzahl mit dem Sysmex kx-21N (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt) bestimmt. Zusätzlich wurde die Gesamteiweißkonzentration refraktometrisch ermittelt. Die labordiagnostischen Untersuchungen wurden jeweils unverzüglich im Labor der Klinik für Pferde der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführt.

3.2.3.5 Versuchsablauf

Die Pferde wurden 96 Stunden vor der Behandlung aufgestallt, um eine Akklimatisierung an die Umgebung zu ermöglichen. Um den Stress während der Eingriffe zu minimieren, wurden die Pferde vor der Behandlung durch Konditionierung auf die Blutentnahme und die klinische Untersuchung vorbereitet. Achtundvierzig Stunden vor der Behandlung wurden drei Hautareale (rechte Seite 10 x 10 cm und 3 x 3 cm, linke Seite 10 x 10 cm) im Bereich des Halses für die intradermalen Injektionen geschoren und rasiert. Unmittelbar vor der Applikation (Zeitpunkt t-24 und t0) wurden die Areale aseptisch 4 Minuten mit Chlorhexidinseife (HibiScrub, Chlorhexidine gluconate 4%w/v, Regent Medical, Manchester, UK) gewaschen und im Anschluss mit steriler 0,9%-iger Natriumchloridlösung (Ecotainer®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) präpariert. Um eine Fehlapplikation durch Abwehrreaktionen der Pferde zu verhindern, erfolgte eine lokale Infiltrationsanästhesie mit 0,5 ml 2%-igem Lidocain (Vétoquinol AG, Ravensburg).

Den Pferden wurde 24 Stunden vor der Injektion der Testsubstanz (t-24) 0,5 ml PBS aseptisch intradermal in das vorbereitete Hautareal von 3 x 3 cm der rechten

Halsseite injiziert. Zeitgleich wurden weitere 0,5 ml PBS in die lange Sitzbeinmuskulatur appliziert. Zum Zeitpunkt t0 (Behandlung mit der Testsubstanz) wurden je 0,5 ml intradermal in die 10 x 10 cm großen Hautareale, wie zuvor beschrieben, appliziert. Hierbei handelte es sich auf der linken Seite um die Testsubstanz und auf der rechten Seite um PBS (Negativkontrolle). Zusätzlich wurden 0,5 ml Testsubstanz in die lange Sitzbeinmuskulatur verabreicht (Abbildung 5).

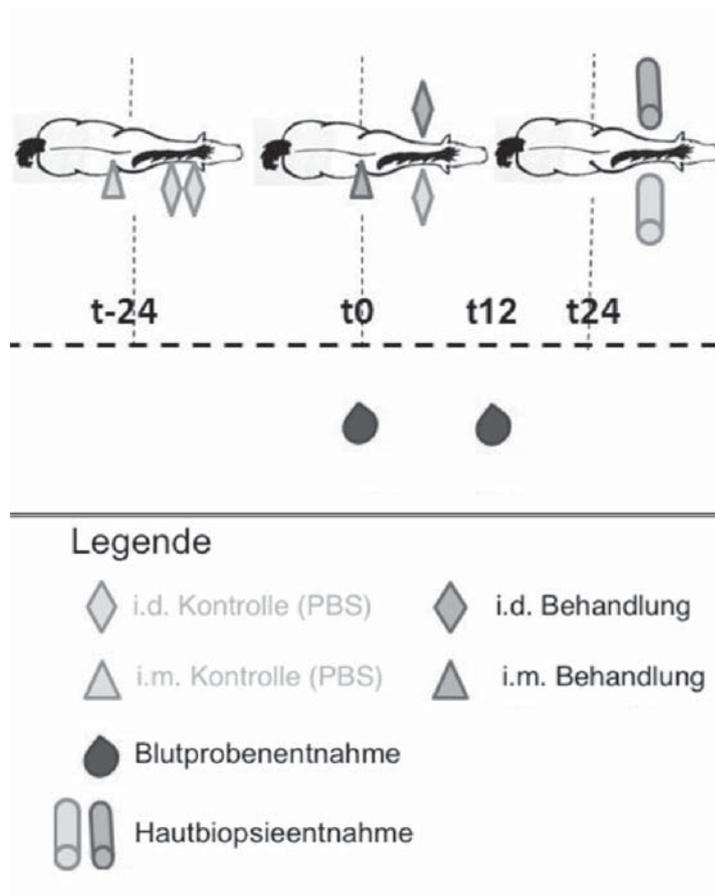


Abbildung 5: Probenentnahme (modifiziert nach SCHNABEL et al. (2015) [411])
 Der Probenentnahmezeitpunkt wird durch die Anordnung der Symbole auf einem fiktiven Zeitstrahl, verlaufend von links nach rechts (t-24 – t24), dargestellt. Zusätzlich sind die Probenentnahmeorte mithilfe der verwendeten Symbole an einem skizzierten Pferd dargestellt (i.d. = intradermal; i.m. = intramuskulär).



3.2.3.6 Probenentnahme

Es wurden zwei unterschiedliche Gewebetypen im Rahmen der Studie analysiert: Einerseits wurde der systemische Effekt der Testsubstanzen mithilfe von Blutproben sowie andererseits der lokale Immuneffekt mittels Hautbiopsien ermittelt.

3.2.3.6.1 Blutproben

Die Versuchstiere wurden zu zwei Zeitpunkten beprobt. Die ersten Proben wurden direkt vor der Behandlung mit den Testsubstanzen (t_0), die zweiten Proben 12 Stunden nach der Behandlung (t_{12}) entnommen.

Jede Probe bestand aus 2,5 ml steril entnommenem Blut, das mithilfe des Vacutainersystems (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) direkt in PAXgene blood tubes (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) überführt wurde. Die Proben wurden 24 Stunden bei RT und im Anschluss bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

3.2.3.6.2 Hautbiopsien

Die Hautbiopsien wurden nach aseptischer Vorbereitung und lokaler Infiltrationsanästhesie mit 10 ml 2%-igem Lidocain (Vétoquinol AG, Ravensburg) entnommen. Zur Entnahme gelangten 4 mm Hautstanzen (GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG, München) zum Einsatz. Nach erfolgreicher Entnahme wurden die Proben in ein mit 1 ml RNAlater[®] RNA Stabilisation Solution (Ambion[®], Kaufungen) gefülltes 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Auf diese Weise wurden vier Biopsien pro Halsseite entnommen (Abbildung 5). Die Biopsien wurden in einem Radius von 2 cm um die Injektionsstellen, jeweils um 90° versetzt, entnommen. Die entstandenen Wundränder wurden mithilfe von Einzelheften oder Wundklammern adaptiert und mit einer jodhaltigen Salbe abgedeckt. Die Biopsien wurden bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.



3.2.3.7 RNA-Extraktion

3.2.3.7.1 Extraktion aus Blutproben

Zur Extraktion der RNA aus den gesammelten Blutproben kam das PAXgene blood RNA Kit (Qiagen GmbH, Hilden) zur Verwendung. Das Prinzip des Filtersystems (3.2.1.3) wird auch bei dieser Technik genutzt. Vor Beginn der weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei RT aufgetaut und nach zwei Stunden weiterverarbeitet. Der Heizblock (Techne Dri-Block DB.3 Thermo Dux, Wertheim) wurde auf 65 °C und der Schüttelinkubator (GFL-3031 Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel) auf 55 °C vorgeheizt. Waschpuffer B4 (Qiagen GmbH, Hilden) wurde mit dem vierfachen Volumen an Ethanol (ROTIPURAN® ≥ 99,8 % p.a.; Carl Roth GmbH, Karlsruhe) verdünnt. Die mitgelieferte DNase aus dem PAXgene blood RNA Kit (Qiagen GmbH, Hilden) wurde mit 550 µl DNase Resuspensionspuffer (DRB, Qiagen GmbH, Hilden) verdünnt, aliquotiert sowie bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

Die PAXgene blood tubes (Becton Dickinson, Heidelberg) wurden zehn Minuten bei 4.000 x *g* zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus Instruments, Osterode). Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet mit 4 ml RNase- und DNase-freiem Wasser (Sigma®-Aldrich, Steinheim) durch Vortexen resuspendiert. Erneut wurden die Röhrchen wie zuvor zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu dem Pellet wurden danach 350 µl Resuspensionspuffer (BR1, Qiagen GmbH, Hilden) gegeben, gevortext, bis eine homogene Lösung entstand, und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Im Anschluss wurden 300 µl Bindungspuffer BR2 (Qiagen GmbH, Hilden) in Kombination mit 40 µl Proteinase K (PK, Qiagen GmbH, Hilden) der Lösung hinzugefügt und das Gemisch zehn Minuten bei 55 °C und 250 rpm im Schüttelinkubator (GFL-3031, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel) inkubiert.

Das Lysat wurde in eine PAXgene Shredder Spin Column (PSC, Qiagen GmbH, Hilden) überführt und für drei Minuten bei 14.000 x *g* zentrifugiert. Der Überstand des Durchflusses wurde in einem neuen 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 350 µl Ethanol (ROTIPURAN® ≥ 99,8 % p.a.; Carl Roth GmbH, Karlsruhe) versetzt.



Nach dem Vermischen wurde die Probe in eine PAXgene RNA Spin Column (PRC, Qiagen GmbH, Hilden) pipettiert und bei 10.000 x *g* für eine Minute zentrifugiert. Da das komplette Volumen der Probe die Kapazität der PRC überschreitet, wurde dieser Schritt mit der restlichen Probe wiederholt. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen, da sich die RNA in der Filtermembran der Säule und nicht im Durchfluss befand. Die Säule wurde mit 350 µl Waschpuffer BR3 (Qiagen GmbH, Hilden) befüllt und wiederum für eine Minute bei 10.000 x *g* zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen.

Eine DNase-Verdauung wurde angeschlossen. Hierzu wurde der Reaktionsansatz, bestehend aus 10 µl der DNase und 70 µl des DNA-Verdauungspuffers (RDD, Qiagen GmbH, Hilden), angemischt und auf die Säule gegeben. Die Säule wurde für 15 Minuten bei RT inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden erneut 350 µl BR3 auf die Säule gegeben, wie zuvor zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dieser Schritt wurde zweimal mit 500 µl Waschpuffer BR4 (Qiagen GmbH, Hilden) an Stelle von BR3 wiederholt. Im zweiten Schritt wurde die Säule allerdings zwei Minuten länger als zuvor zentrifugiert. Das Auffanggefäß wurde gewechselt, nachdem die Säule eine Minute ohne Zusatz trocken zentrifugiert wurde.

Zur abschließenden Elution der RNA wurden 40 µl Elutionspuffer (BR5, Qiagen GmbH, Hilden) direkt auf die Membran der Säule gegeben und die Säule eine Minute bei 10.000 x *g* zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt und der Durchfluss, in dem sich die RNA befand, im Anschluss für fünf Minuten bei 65 °C im Heizblock (Techne Dri-Block DB.3, Thermo Dux, Wertheim) inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

3.2.3.7.2 Extraktion aus Hautbiopsien

Da es sich bei der Haut um ein extrem widerstandsfähiges und kollagenreiches Gewebe handelt, wurde es im Vergleich zu den anderen Proben (3.2.1.3 und



3.2.3.7.1) einer stärkeren Homogenisierung unterzogen sowie mit stärker lysierenden Puffern behandelt. Ansonsten entspricht das Vorgehen 3.2.1.3.

Zur Extraktion gelangte das RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden) zur Anwendung, da es speziell für kollagenreiches Gewebe entwickelt wurde und über eine größere Lysekapazität verfügt. Als Vorbereitung für die Extraktion wurde dem Puffer RLT pro ml 10 µl Mercaptoethanol (2-Hydroxyethylmercaptan, Sigma®-Aldrich, Steinheim) zugesetzt und dem Puffer RPE das vierfache Volumen an Ethanol (ROTIPURAN® ≥ 99,8 % p.a., Carl Roth GmbH, Karlsruhe). Die mitgelieferte DNase wurde in 550 µl RNase- und DNase-freiem Wasser (Sigma®-Aldrich, Steinheim) gelöst und aliquotiert bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung asserviert.

Die bei -80 °C in RNAlater® RNA Stabilization Solution (Ambion®, Kaufungen) gelagerten Biopsien wurden in ein mit 300 µl RLT Puffer befülltes 2 ml Eppendorfgefäß mit rundem Boden gegeben. Es wurde eine Metallkugel mit einem Durchmesser von 5 mm ergänzt. Die Mischung wurde mithilfe des TissueLyser II (30 Herz, 4 x 5 Minuten, Qiagen GmbH, Hilden) homogenisiert.

Im nächsten Schritt wurden 590 µl RNase und DNase freies Wasser (Sigma®-Aldrich, Steinheim) sowie 10 µl Proteinase K den Proben hinzugefügt. Die Lösung wurde zehn Minuten bei 55 °C im Heizblock (Techne Dri-Block DB.3, Thermo Dux, Wertheim) inkubiert und im Anschluss für drei Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuen Eppendorfgefäß mit dem halben Volumen an Ethanol (ROTIPURAN® ≥ 99,8 % p.a., Carl Roth GmbH, Karlsruhe) gemischt. Der nächste Schritt bestand aus dem Überführen in eine RNeasy Mini Column und einer anschließenden 15 Sekunden dauernden Zentrifugation bei 10.000 x g. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt, bis die komplette Probe verbraucht war. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Nun wurden 350 µl Puffer RW1 auf die Säule aufgetragen, erneut, wie zuvor beschrieben, zentrifugiert und der Durchlauf verworfen.



Von der aliquotierten und eingefrorenen DNase-Lösung wurden 10 µl mit 70 µl Puffer RDD vermengt. Die 80 µl wurden auf den Filter der Säule gegeben und das Ganze für 15 Minuten bei RT inkubiert.

Es folgten drei Waschschriffe, getrennt durch Zentrifugationen von 15 Sekunden bei 10.000 x g. Im ersten Schritt wurden 350 µl Puffer RW1, dann zweimal 500 µl Puffer RPE auf die Säule gegeben und der nach der Zentrifugation entstandene Durchlauf verworfen. Nach dem dritten Waschdurchgang wurde die Säule zwei Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert. Das Filtersystem wurde in ein neues Auffanggefäß (1,5 ml Eppendorfgefäß) überführt und der Filter mit 40 µl RNase- und DNase-freiem Wasser (Sigma[®]-Aldrich, Steinheim) beschickt. Durch eine einminütige Zentrifugation bei 10.000 x g wurde die RNA im Durchfluss aufgefangen. Sie wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.3.8 Messung der RNA-Qualität und -Quantität

Zur Quantifizierung und zur Qualitätsbestimmung der im Rahmen der klinischen Studie aus den Hautbiopsien und den Blutproben gewonnenen RNA erfolgte eine automatisierte Kapillargelelektrophorese (Experion[™] System, Bio-Rad Laboratories GmbH, München).

Vor Beginn der Messungen wurden die Elektroden des Gerätes gereinigt. Hierbei wurde der Cleaning Chip (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) mit 800 µl Experion Electrode Cleaner (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) befüllt, für zwei Minuten ins Gerät verbracht und im Anschluss wieder entnommen und entleert. Es schlossen sich zwei weitere Durchgänge an, in denen RNase und DNase freies Wasser (Sigma[®]-Aldrich, Steinheim) verwendet sowie eine Verweildauer von fünf und einer Minute eingehalten wurde.

Alle im Folgenden eingesetzten Reagenzien (Experion[™] RNA StdSense Stain, RNA Gel, RNA StdSens Loading Puffer, Bio-Rad Laboratories GmbH, München), exklusive der Experion[™] RNA Ladder (Bio-Rad Laboratories GmbH, München), die



als Größenmarker verwendet wurde, wurden 15 Minuten bei RT belassen und im Anschluss gevortext und einer kurzen Zentrifugation (etwa drei Sekunden) unterzogen. Die Experion™ RNA Ladder (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) wurde auf Eis gelagert sowie bei der ersten Benutzung aliquotiert, um sie bei -80 °C zu lagern. Bei der ersten Benutzung wurden 600 µl des Experion™ RNA Gel (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) auf das mitgelieferte Filtersystem aufgetragen und für zehn Minuten bei 1 500 x g zentrifugiert. Das gefilterte Experion™ RNA Gel wurde lichtgeschützt bei 4 °C gelagert und maximal vier Wochen verwendet. In einem nächsten Schritt wurde die sogenannte GS-Lösung hergestellt. Im Rahmen dessen wurden 65 µl vom gefilterten Experion™ RNA Gel (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) mit 1 µl der Experion™ RNA StdSense Stain (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) versetzt, gevortext und kurz anzentrifugiert.

Zur Denaturierung des Größenmarkers und der RNA-Proben wurden 1,5 µl der Experion™ RNA Ladder und jeweils 1,5 µl der zu untersuchenden RNA-Lösungen in 0,2 ml Eppendorfgefäße überführt. Die Proben wurden in einem Heizblock (Biometra® TGradient, Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) für zwei Minuten auf 70 °C erhitzt und im Anschluss sofort auf Eis gelagert. Nach fünfminütiger Lagerung auf Eis wurden die Proben erneut kurz anzentrifugiert.

Von der hergestellten GS-Lösung wurden 9 µl in das orange unterlegte GS Feld des RNA StdSens Chips (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) überführt. Im Anschluss wurde der Chip in die Experion Priming Station (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gelegt und unter der Einstellung B1 geprimt. Nach dem Primen wurde der Chip erneut entnommen und die Rückseite adspektroskopisch auf Lufteinschlüsse kontrolliert.

Zum Vorbereiten des geprimten Chips wurden 9 µl GS zusammen mit 9 µl Experion™ RNA Gel in die dafür vorgesehenen Felder pipettiert. In die Felder für die Proben und Größenmarker wurden 5 µl Experion™ RNA StdSens Loading Puffer (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gegeben. In das Feld L wurde zusätzlich 1 µl, der auf Eis stehenden, zuvor denaturierten Experion™ RNA Ladder gegeben und in die Felder 1 bis 12 jeweils 1 µl, der auf Eis stehenden denaturierten Proben.



Nach der Befüllung wurde der Chip in der Experion Vortex Station (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) eine Minute gevortext. Im Anschluss wurde er in die Experion Electrophoresis Station (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) eingelegt und die Messung gestartet. Falls weniger als 12 Proben vorhanden waren, wurden die restlichen Felder mit RNase- und DNase-freiem Wasser (Sigma[®]-Aldrich, Steinheim) anstelle der Proben aufgefüllt.

3.2.3.9 Kontrolle der Reinheit der RNA-Proben

Die hergestellte RNA-Lösung wurde als Testsubstanz in der genutzte qPCR eingesetzt. Es wurden keine weitere DNA und keine reverse Transkriptase in der qPCR eingesetzt. Die Amplifikation von DNA wurde mittels qPCR gemessen (3.2.3.12).

3.2.3.10 Zusätzliche Aufbereitung der RNA für Messung von IL-12

Bei der Bestimmung der RNA Expression der RNA-Proben kam es zu positiven Messwerten für die Expression von IL-12 in den Hautproben. Die in dem Versuchsansatz verwendeten Primer für IL-12 binden an die endogene IL-12-RNA und nicht an die endogene IL-12-DNA. Der Grund hierfür besteht darin, dass Primer ausgewählt wurden, deren Bindungsstelle sich über zwei Exons spannen. Also wird die Bindungsstelle in der endogenen DNA durch ein Intron getrennt (Abbildung 6). Dadurch verhindert das Intron das Binden des Primers und somit die Replikation der endogenen DNA.

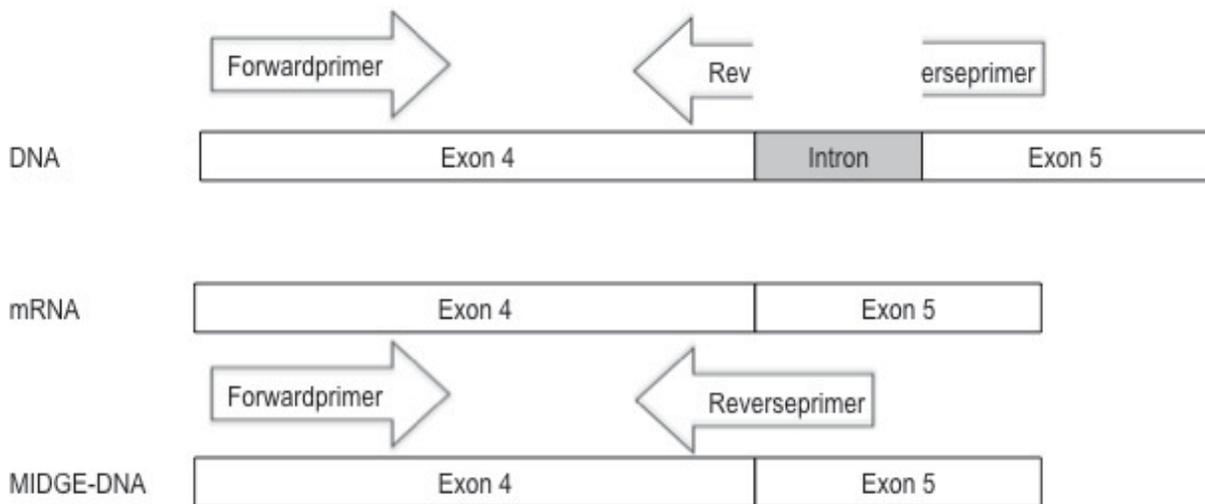


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Bindungsstellen der Primer für IL-12p40

Die applizierte MIDGE[®]-DNA ist allerdings nicht analog zur endogenen DNA aufgebaut. Stattdessen wurde auf die endogen vorhandenen Introns verzichtet (Abbildung 6). Dies hat zur Folge, dass die Primer sowohl an die MIDGE[®]-DNA als auch an die endogene RNA binden können. Da es so zu falsch positiven Messwerten in der qPCR kommen kann, wurden die Proben zusätzlich aufbereitet.

3.2.3.10.1 Zusätzliche DNase-Verdauung

Im Rahmen der RNA-Elution (3.2.3.7) fand bereits eine DNase-Verdauung statt. Da sich noch eine Kontamination mit MIDGE[®]-DNA in den RNA-Proben der Haut befand, erfolgte eine zusätzliche DNase-Verdauung der RNA-Proben.

Dazu wurde eine Reaktionslösung, bestehend aus 8 µl RNA-Lösung (3.2.3.7), mit einer maximalen Konzentration von 125 ng/µl, 1 µl RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Puffer und 1 µl RQ1 RNase-Free DNase, hergestellt. Insgesamt wurde die maximale Grenze von 1 µg RNA pro Reaktion nicht überschritten. Sofern es erforderlich war, um die maximale Grenze der genutzten RNA nicht zu überschreiten, wurde die Ursprungslösung der RNA mit RNase- und DNase-freiem Wasser (Sigma[®]-Aldrich, Steinheim) weiter verdünnt.



Die Reaktionslösung wurde 30 Minuten bei 37 °C im Thermicon T (Heraeus, Hanau) inkubiert. Im Anschluss wurde 1 µl RQ1 DNase Stop Solution zum Abbruch der Reaktion hinzugegeben sowie das Gemisch für 10 Minuten auf 65 °C erhitzt. Nach Inaktivierung der DNase wurden die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei 80 °C gelagert.

3.2.3.10.2 Restriktionsverdauung der RNA-Proben

Um Reste von MIDGE[®]-DNA in den RNA-Proben, die nicht durch die zusätzliche DNase-Verdauung inaktiviert werden konnten, zu eliminieren, gelangte das Restriktionsenzym Mlsl (Thermo-Scientific, Schwerte) zum Einsatz, um die MIDGE[®]-DNA zu verdauen und so die Replikation dieser DNA zu verhindern. Das Restriktionsenzym wurde so gewählt, dass die spezifische Sequenz, in der es schneidet, in der MIDGE[®]-DNA vorhanden ist, allerdings nicht in der endogenen RNA (Abbildung 7), sodass die Schnittstelle in der Promoterregion der MIDGE[®]-Vektoren gewählt wurde. Hierdurch sollte der Vektor destabilisiert werden, sodass er bei einer weiteren DNase-Verdauung (3.2.3.10.1) eliminiert werden kann.

Das Reaktionsgemisch bestand aus 2 µl Puffer R (Thermo-Scientific, Schwerte), 1 µl (Thermo-Scientific, Schwerte) und 0,5 bis 1 µg RNA. Es wurde auf das Gesamtvolumen von 20 µl mit RNase- und DNase-freiem Wasser (Sigma[®]-Aldrich, Steinheim) aufgefüllt und bei 37 °C eine Stunde im Thermicon T (Heraeus, Hanau) inkubiert. Um das Enzym zu inaktivieren, wurde das Gemisch im Anschluss im Heizblock (Techne Dri-Block DB.3, Thermo Dux, Wertheim) für 20 Minuten auf 65 °C erhitzt.

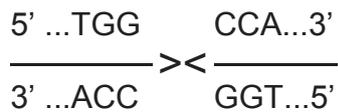


Abbildung 7: Spezifische Schnittstelle des Restriktionsenzymys Mlsl, das zur Aufreinigung der RNA-Proben genutzt wurde.

3.2.3.11 Erzeugung einer cDNA zur Analyse in der real-time PCR

Das prinzipielle Verfahren wurde bereits unter 3.2.1.5 beschrieben. Die cDNA wird im Folgenden mithilfe der real-time SYBR[®] Green PCR (3.2.3.12) untersucht. Um die Proben miteinander vergleichbar zu machen, wurde (im Gegensatz zu 3.2.1.5) eine definierte Menge von RNA in die PCR eingesetzt. Die RNA-Lösungen wurden so verdünnt, dass in jeder Probe 100 ng in 10 µl enthalten waren. Nach Beendigung der DNA-Synthese wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

3.2.3.12 Real-time SYBR[®] Green PCR

Zur Bestimmung der RNA-Expression in den Haut- und Blutproben fand eine real-time PCR statt. Als Marker für die Replikation wurde SYBR[®] Green (Applied Biosystems[®], Darmstadt) verwendet. Für die spezifischen Reaktionsansätze der einzelnen Zytokinuntersuchungen wurden die im Rahmen der Primeroptimierung (3.2.2) ermittelten optimalen Mastermixe für die jeweilige zu untersuchende cDNA eingesetzt (Tabelle 8, Tabelle 7). Pro Kavität der MicroAmp[®] Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0,1 ml (Applied Biosystems[®], Darmstadt) wurden 24 µl Mastermix mit 1 µl der Probe vermischt und hineinpipettiert. Bei den Proben handelt es sich um cDNA mit unbekannter Konzentration (3.2.3.11), Negativkontrollen (RNase und DNase freies Wasser (Sigma[®]-Aldrich, Steinheim)) und Proben der Standardreihen unterschiedlicher bekannter Konzentration (3.2.1.14). Es wurden die Standardreihen in den Verdünnungsstufen zwischen 10² und 10⁶ genutzt. Sie wurden auf jeder Platte zur Kalibrierung der Messungen mit untersucht. Gleiches galt ebenfalls für die



Negativproben. Die befüllte Platte wurde mit einem MicroAmp[®] Optical Adhesive Film (Applied Biosystems[®], Darmstadt) verschlossen. Die Platte wurde gerüttelt (AM69 Microshaker, Dynatec, Zug, Schweiz), um eine komplette Vermischung und Zusammenführung der Komponenten zu gewährleisten sowie in der Megafuge 1.0R (Heraeus Instruments, Osterode) etwa sechs Sekunden zentrifugiert.

Die Platte wurde im StepOnePlus[™] Real-Time PCR System (Applied Biosystems[®], Darmstadt) mithilfe der StepOne[™] Software Version 2.0 analysiert, wobei die Fluoreszenzintensität durch SYBR[®] Green erfasst wurde. Da es sich bei SYBR[®] Green um einen Farbstoff handelt, der mit der DNA interkaliert, wurde bei jedem Durchlauf eine Schmelzkurvenanalyse angeschlossen, um mögliche Kontaminationen durch unspezifische Primerbindungen zu erkennen. Sofern sich mehrere oder unspezifische Schmelzpunkte zeigten wurde die Messung verworfen.

Die Software ermittelte aus den aufgetragenen Standards (10^6 bis 10^2 Kopien pro Ansatz) mit bekannter Konzentration eine Standardreihe zur Kalibrierung und Quantifizierung (3.2.3.11). Es wurden ausschließlich Messungen zur weiteren Auswertung verwendet, deren Standardreihen eine Effizienz von 95–105 % aufwiesen bei einem Bestimmtheitsmaß (R^2) von $\geq 0,985$. Die untere Messgrenze wurde mit 100 Kopien definiert.

3.3 Statistische Auswertung

Alle Daten, die im Rahmen der Untersuchungen ermittelt wurden, wurden in Microsoft[®] Excel[®] für Mac 2011 (Version 14.4.2, Microsoft Corporation, Redmond, USA) übertragen sowie in Tabellenform archiviert. Die statistische Analyse erfolgte mithilfe des Statistikprogramms IBM SPSS Statistics (Version 20, IBM Deutschland GmbH, Ehningen). Das Signifikanzniveau wurde für sämtliche Analysen auf $p < 0,05$ festgelegt. Von einem hochsignifikanten Unterschied ist bei $p < 0,001$ auszugehen.



3.3.1 Statistisches Testverfahren zur Auswertung der Langzeiteffekte nach Behandlung mit MIDGE[®]-Vektoren

Zur statistischen Auswertung des Tumorzvolumens wurden, zusätzlich zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie (Tag 730), die Resultate der Tage 1 bis 120 der Studie von MÄHLMANN et al. (2012) herangezogen [3]. In den Untersuchungen wurden die relativen Tumorzvolumina (Bezugsgröße war das Volumen am Untersuchungstag 120) der Patienten analysiert. Zunächst wurden lediglich die Ergebnisse der lokal unbehandelten Tumoren betrachtet.

Es wurde in Bezug auf die Verteilung des relativen Tumorzvolumens zum Untersuchungszeitpunkt ein Vergleich zwischen den Behandlungsgruppen (gp100, tyr, IL-12/18) angestellt. Hierzu gelangte der **Kruskal-Wallis-Test** zum Einsatz (Tabelle 11).

Die **Friedman Zweifach-Rangvarianzanalyse** wurde genutzt, um die Volumenveränderung im Zeitverlauf zu analysieren. Hierbei erfolgten sowohl gruppenintern als auch gruppenübergreifend Untersuchungen. Zur genaueren Analyse wurde im Anschluss ein Vergleich zwischen den Volumina am Untersuchungstag 120 und 730 angestellt. Der **Dunn-Bonferroni Test** wurde zum paarweisen Vergleich genutzt. Das gleiche Verfahren wurde angewendet, um die Ergebnisse der lokal behandelten Tumoren statistisch auszuwerten.

Es schloss sich ein Vergleich der Verteilung der relativen Tumorzvolumina in Bezug auf die Behandlung an. Hierbei wurden die lokal behandelten mit den lokal unbehandelten Tumoren mittels **Mann-Whitney-U-Test** verglichen. Der Test fand sowohl behandlungsgruppenübergreifend als auch innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen statt. Das bis hierhin beschriebene Verfahren wurde auch mit den durch Ultraschall ermittelten Werten vorgenommen.

Abschließend wurde mithilfe des **Mann-Whitney-U-Tests** überprüft, ob abhängig von der Untersuchungstechnik (Schublehre oder Ultraschall) signifikante Unterschiede in der Verteilung der relativen Tumorzvolumina vorlagen. Diese Betrachtungen wurden



sowohl innerhalb der Behandlungsgruppen als auch Behandlungsgruppenübergreifend durchgeführt.

3.3.2 Klinische Studie zur Messung der Zytokinexpression nach Applikation von MIDGE[®]-Vektoren

Um die durch die Behandlung hervorgerufenen Veränderungen zu ermitteln, wurden die Differenzen der Expressionsmengen, gemessen in den Behandlungs- und Kontrollproben, der einzelnen Pferde gebildet. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen wurden mittels **Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test** auf ihre Signifikanz untersucht. Zusätzlich wurden die Gruppen jeweils gepaart mittels **Kruskal-Wallis-Test** auf signifikante Unterschiede in der Expression von Zytokinen nach der Behandlung untersucht.

Mithilfe des **Mann-Whitney-U-Tests** wurde untersucht, ob Schimmel sich von den Pferden mit anderen Fellfarben signifikant in der Zytokinexpression differenzieren und ob das Geschlecht zu signifikanten Unterschieden in der Expression führt.



Tabelle 11: Schematischer Überblick über die eingesetzten statistischen Testverfahren (statistischer Test durchgeführt: +; nicht durchgeführt: -)

a. Statische Verfahren zur Untersuchung von Langzeiteffekten nach Behandlung mit MIDGE®-Vektoren

Untersuchungs-technik	lokal behandelt	gruppeninterne Betrachtung	Kruskal-Wallis-Tests	Friedman Zweifach-Rangvarianz-analyse	Dunn-Bonferroni-Test	Mann-Whitney-U-Test
Schublehre	nein	nein	+	+	+	+
	ja	ja	-	+	+	+
Ultraschall	nein	nein	+	+	+	+
	ja	ja	-	+	+	+
unabhängig	unabhängig	ja	-	-	-	+

b. Statische Verfahren zur Untersuchung der Zytokinexpression nach intradermaler Applikation von MIDGE®-Vektoren

Untersuchungskriterium	gruppeninterne Betrachtung	Kruskal-Wallis-Tests	Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test	Mann-Whitney-U-Test
Behandlungsgruppe	nein	+	+	-
Geschlecht	ja	+	+	-
	nein	-	-	+
Fellfarbe	ja	-	-	+
	nein	-	-	+
	ja	-	-	+



4 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der zwei Teile der Arbeit getrennt wiedergegeben. Zunächst wird hierbei auf die Resultate der Langzeiteffekte nach Behandlung mit MIDGE[®]-Vektoren sowie anschließend auf die klinische Studie zur Messung der Zytokinexpression nach Applikation von MIDGE[®]-Vektoren eingegangen.

4.1 Langzeiteffekte nach Behandlung mit MIDGE[®]-Vektoren

Die Tumore von 19 Patienten, die zuvor von MÄHLMANN et al. (2012) behandelt wurden, wurden mittels Schublehre und Ultraschall vermessen [3]. Auf die Behandlungsgruppe ohne Differenzierungsantigene (IL-12/18) entfielen sechs Pferde, auf die Tyrosinasegruppe sieben Pferde und auf die Gruppe mit Differenzierungsantigen gp100 sechs Patienten (Tabelle 2). Alle Pferde wurden an Tag 1, 22 und 78 von MÄHLMANN et al. (2012) intradermal behandelt und nach zwei Jahren nachuntersucht (Tag 730) [3]. Insgesamt wurden 104 (Schublehre) bzw. 93 (Ultraschall) Melanome vermessen. Aufgrund fehlender Kooperation der Pferde fand bei drei Patienten keine Ultraschallvermessung und bei einem Patienten keine Schublehrenmessung statt.

4.1.1 Besitzeranamnese

Es erfolgten laut Angabe der Besitzer seit Abschluss der Studie von MÄHLMANN et al. (2012) keine erfolgreichen antitumoralen Therapieversuche [3]. Bei einem Pferd (ID 20) wurde eine Eigenbluttherapie und bei einem anderen Pferd (ID 8) eine homöopathische Behandlung vorgenommen. Beide Versuche blieben nach Aussage der Besitzer allerdings erfolglos. Ebenso waren den Besitzern keine immunologischen Erkrankungen ihrer Pferde bekannt. In den letzten vier Wochen vor der erneuten Untersuchung im Rahmen dieser Studie wurden keine Therapien an



den Pferden durchgeführt. Alle Besitzer der Pferde beschrieben den Verlauf der Erkrankung als progredient fortschreitend.

4.1.2 Allgemeine klinische und labordiagnostische Untersuchungen

Die erhobenen Befunde der Allgemeinuntersuchung der Patienten wiesen keine Abweichungen von den Normalwerten auf. In den Hautarealen der behandelten Melanome, in denen die Injektionen verabreicht wurden, konnte bei sämtlichen Pferden eine Depigmentation festgestellt werden. Diese entsprachen den von MÄHLMANN et al. (2012) beschriebenen Veränderungen [3]. Zusätzlich zeigte sich bei den Pferden eine Erhöhung der Anzahl der Melanome. Es haben sich seit der letzten Untersuchung an Tag 120 bei einem Pferd keine neuen Melanome gebildet (ID 14). Bei den anderen Pferden wurden weitere Melanome festgestellt. Die Anzahl schwankte zwischen einem und mehr als sechs neuen Melanomen. Die labordiagnostischen Untersuchungen waren unauffällig.

4.1.3 Vermessung der Melanome

Für die vorliegende Arbeit wurden die zuvor auch von MÄHLMANN et al. (2012) vermessenen Tumore der 19 Pferde mittels Schublehre und Ultraschall vermessen [3]. Da zum Untersuchungszeitpunkt 730 keine signifikanten Unterschiede in den relativen Volumina mittels der unterschiedlichen Messmethodik ermittelt werden konnten und somit ein Einfluss der Vermessungsmethode auf die erhobenen Daten ausgeschlossen werden kann, werden die Ergebnisse im Folgenden für beide Untersuchungstechniken zusammenfassend dargestellt. Unterschieden wird in der Betrachtung daher lediglich zwischen den lokal behandelten sowie den nicht lokal behandelten Tumoren.

4.1.3.1 Tumorzvolumen lokal unbehandelter Tumore

Das Volumen der nicht lokal behandelten Tumore hat im Betrachtungszeitraum im Mittel zugenommen. Die mittels Schublehre ermittelte Volumenänderung belief sich im Median auf 180 % (min. 37 %, max. 636 %) Prozentpunkte. Die Volumenzunahme war statistisch hochsignifikant (Schublehre, $p < 0,0001$, Friedman Zweifach-Rangvarianzanalyse und $p < 0,0001$, Dunn-Bonferroni Test) (Abbildung 8).

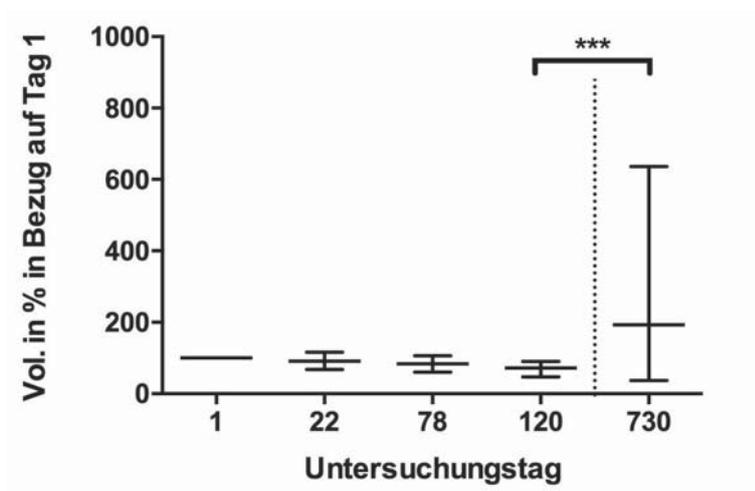


Abbildung 8: Relatives Tumorzvolumen dargestellt als Median und Spanne der lokal unbehandelten Tumore ($n = 104$) im zeitlichen Verlauf (Schublehre; Daten der Untersuchungstage 1 bis 120 MÄHLMANN et al. (2012) [3]). Hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,001$) sind mit drei Sternen markiert.

Auch innerhalb der Behandlungsgruppen konnte die Volumenzunahme nachvollzogen werden. Allerdings war lediglich der Anstieg des Tumorzvolumens in der Gruppe gp100 signifikant ($p = 0,003$, Dunn-Bonferroni Test) (Abbildung 9). Das relative Tumorzvolumen in dieser Gruppe stieg von 68 % (min. 53 %, max. 78 %) an Tag 120 auf 205 % (min. 95 %, max. 636 %) an Tag 730 (Schublehre).

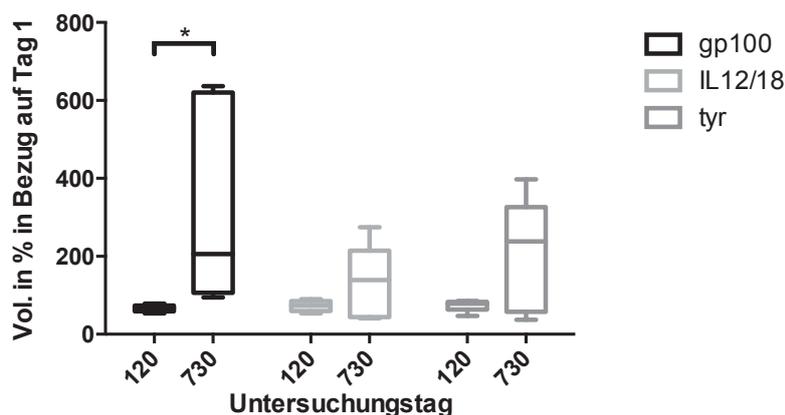


Abbildung 9: Verteilung relativer Tumorzumina nicht behandelter Tumore dargestellt als Boxplot mit Median und Spanne (Schublehre, $n = 104$, Daten von Tag 120 übernommen von MÄHLMANN et al. (2012) [3]). Der signifikante ($p < 0,05$) Anstieg ist mit einem Stern markiert.

4.1.3.2 Tumormessungen lokal intradermal behandelter Tumore

Die Volumenzunahme war ebenfalls bei den lokal intradermal behandelten Tumoren erkennbar. In den ultraschallgestützten Messungen lag das relative Tumorzumina im Median bei 146 % (min. 26 %, max. 941 %). Hervorzuheben ist, dass die Volumenzunahme hier bei beiden Messmethoden signifikant war (Ultraschall: $p = 0,002$, Friedman Zweifach-Rangvarianzanalyse und $p = 0,041$, Dunn-Bonferroni Test; Schublehre: $p = 0,001$, Friedman Zweifach-Rangvarianzanalyse und $p = 0,005$, Dunn-Bonferroni Test).

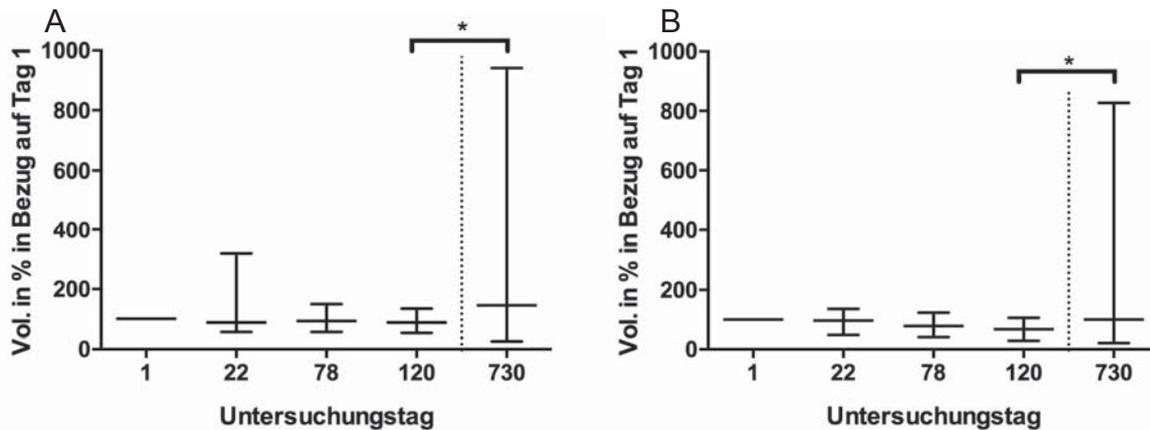


Abbildung 10: Relatives Tumolvolumen der lokal behandelten Tumore (Median inklusive Spanne). Der signifikante ($p < 0,05$) Anstieg ist mit einem Stern markiert. (A: Ultraschall, $n = 93$; B: Schublehre, $n = 104$; Daten der Untersuchungstage 1 bis 120 übernommen von MÄHLMANN et al. (2012) [3]).

In der Betrachtung der einzelnen Behandlungsgruppen wurde in der Gruppe IL-12/IL-18 eine statistisch signifikante Volumenzunahme bestimmt ($p = 0,009$, Friedman Zweifach-Rangvarianzanalyse und $p = 0,047$, Dunn-Bonferroni Test).

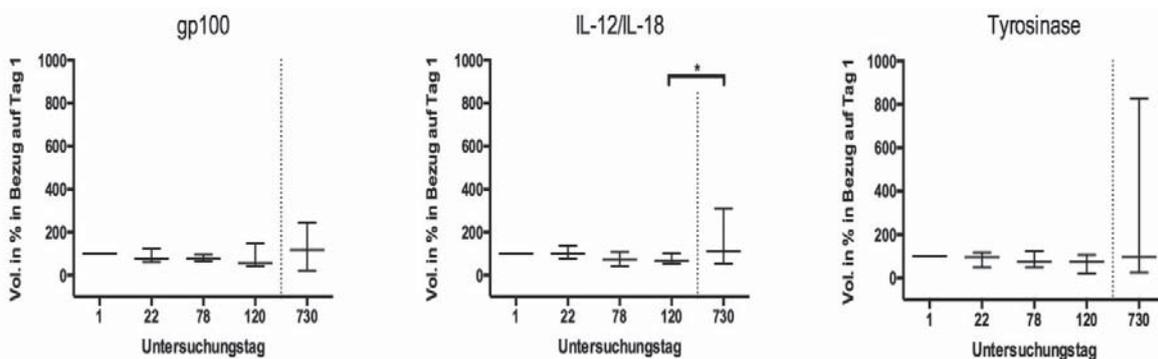


Abbildung 11: Entwicklung des relativen Tumolvolumens der lokal behandelten Tumore (gp100 und IL-12/IL-18: $n = 6$, Tyrosinase $n = 7$) im zeitlichen Verlauf in Abhängigkeit der Behandlungsgruppen (Schublehre; Daten der Untersuchungstage 1 bis 120 übernommen von MÄHLMANN et al. (2012) [3]). Dargestellt als Median inklusive Spanne. Der Stern markiert einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$).



4.1.3.3 Vergleich lokal behandelter und unbehandelter Tumore

Weiterhin wurden die relativen Volumina zwischen den behandelten sowie unbehandelten Tumoren verglichen. Hierbei fanden sowohl Vergleiche innerhalb der Behandlungsgruppen als auch zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen statt. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) in der Verteilung im Vergleich der Untersuchungszeitpunkte festgestellt werden.



4.2 Klinische Studie zur Messung der Zytokinexpression nach Applikation von MIDGE[®]-Vektoren bei gesunden Pferden

4.2.1 Ausschluss von der statistischen Analyse

4.2.1.1 Versuchspferde

Vorweg wurden die Rohdaten der Messungen auf Plausibilität geprüft. Hierzu wurde die Differenz zwischen den Proben nach Behandlung bzw. der behandelten Seite und der Kontrollprobe gebildet. Die Pferde mit der ID S und X wiesen im Vergleich zu den restlichen Pferden eine zum Teil mehr als 200-fach höhere Expression von CXCL2, CXCL8, CXCL10 und IL-18 auf und deshalb wurden die Pferde von der Auswertung ausgeschlossen.

4.2.1.2 Nicht exprimierte Zytokine

Bei der Untersuchung mittels qPCR konnten für die Parameter IL-2, IL-4, IL-10 und IFN γ keine Messwerte innerhalb des Messbereichs ermittelt werden. Die gemessenen Replikationszahlen befanden sich in der Regel unter der Nachweisgrenze von 100 Kopien und lediglich vereinzelte Proben lagen über der Nachweisgrenze. Aus diesem Grund fielen diese erhobenen Daten wegen fehlender Belastbarkeit aus der Ergebnisdarstellung heraus.

4.2.1.3 Expression von IL-12

Die Expression von IL-12 konnte sowohl im Rahmen der Reinheitskontrolle (3.2.3.9) der RNA-Proben als auch in den cDNA-Proben nachgewiesen werden. Die Expression war in den RNA-Proben ebenfalls nach der zusätzlichen Behandlung mit DNase und Restriktionsenzym nachweisbar (Tabelle 12).



Tabelle 12: Untersuchungen der RNA-Proben auf Kontamination mit MIDGE®-Vektoren. Dargestellt ist die Expressionsmenge in Kopien pro μl für IL-12 p35 und p40 jeweils für alle sechs Probanden der Gruppe IL-12/IL-18. Es wurde die Hautbiopsie der mit dem Vektor behandelten Seite untersucht.

ID	Gewebe	Expression IL-12 p35 [Kopien/ μl]	Expression IL-12 p40 [Kopien/ μl]
B	Haut		161
F	Haut		154
J	Haut	23.310.659.584	809.588
N	Haut		121
R	Haut	1.446.911.104	129.419
U	Haut	7.713.867.776	473.150

4.2.2 Untersuchung der systemischen Immunreaktion

Lediglich die Expressionsmengen von CCL2 und CXCL8 lagen im peripheren Blut vereinzelt innerhalb des Messbereichs (Tabelle 15). Im Vergleich der untersuchten Blutproben konnten deshalb keine signifikanten Expressionsunterschiede bei den untersuchten Zytokinen gefunden werden – dies gilt sowohl für Unterschiede zwischen den Gruppen als auch zwischen den Proben von einem Tier (vor und nach Behandlung).

4.2.3 Untersuchung der lokalen Immunreaktion

Bei der Untersuchung der lokalen Immunreaktion in der Haut konnte die Expression von IL-18, CCL2, CXCL2, CXCL8 und CXCL10 bestimmt werden.

Zum Nachweis einer endogenen Expression wurden die Hautbiopsien auf die Expression von **IL-18** analysiert. Zur Auswertung wurde jeweils die Expressionsdifferenz zwischen der behandelten und der unbehandelten Hautbiopsie betrachtet. Nach der Behandlung konnte eine höhere Expression von IL-18 in der Haut festgestellt werden. Hervorzuheben ist, dass sich in paarweisen Vergleichen

der Behandlungsgruppen zeigte, dass bei SAINT-18 eine signifikant geringere Expression von IL-18 verglichen mit den Behandlungsgruppen IL-12/IL-18 ($p = 0,0306$, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) und ohne CpG ($p = 0,0131$, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) messbar war (Abbildung 12). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Expression von IL-18 in den Gruppen, die DNA erhielten (IL-12/IL-18, ohne ATG, ohne CpG), unabhängig von der Expression der Vektoren zunahm.

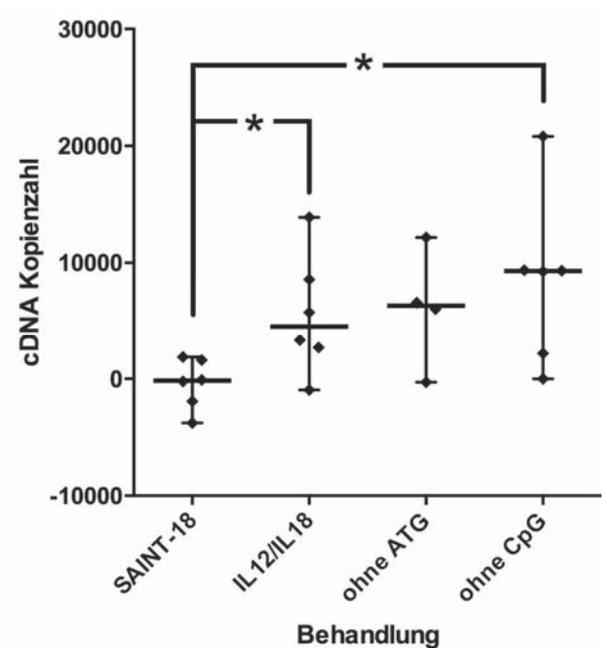


Abbildung 12: mRNA-Expression von IL-18 in Hautbiopsien – Die Expression ist als Differenz von der Expressionsmenge der Behandlungs- und Kontrollprobe dargestellt (Median und Spanne). Signifikanzen ($p < 0,05$) sind mit einem Stern markiert.

Die gleichen Verhältnisse konnten auch für das Zytokin **CCL2** nachvollzogen werden. Es zeigte sich ebenfalls eine deutlich geringere Expression von CCL2 in der SAINT-18 Gruppe. Der Unterschied zu den Gruppen IL-12/IL-18 ($p = 0,0453$, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) und ohne CpG Motive ($p = 0,0306$, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) war ebenfalls statistisch signifikant (Abbildung 13).

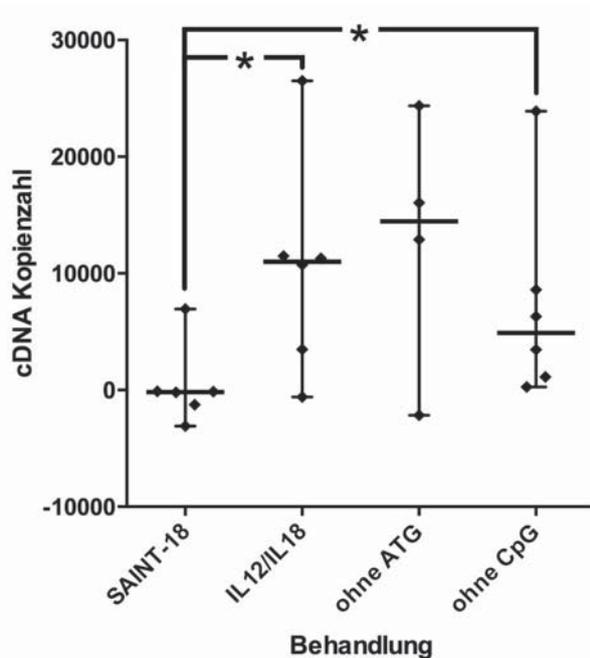


Abbildung 13: Differenzen der mRNA-Expression von CCL2 in Hautbiopsien–Vergleich der Behandlungsgruppen dargestellt als Median inklusive Spanne. Dargestellt jeweils als Expressionsdifferenz zwischen Behandlungs- und Kontrollprobe. Signifikanzen ($p < 0,05$) sind mit einem Stern markiert.

Die Messergebnisse für **CXCL2** und **CXCL8** zeigten keinen Unterschied zwischen den Gruppen. Die Messergebnisse sind in den Behandlungsgruppen sowie zwischen den Gruppen inhomogen verteilt (Tabelle 15).

Die Expressionsdifferenz von **CXCL10** befindet sich in der SAINT-18 Gruppe auf einem signifikant geringeren Niveau als in den anderen Gruppen (IL-12/IL-18 $p = 0,0051$; ohne ATG $p = 0,0142$; ohne CpG $p = 0,0051$, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Hervorzuheben ist, dass sich die Expressionsmengen in den Gruppen die DNA erhielten ebenfalls signifikant differenzieren. Es zeigt sich eine signifikant höhere Expression in der IL-12/IL-18 Gruppe, verglichen mit den beiden anderen Gruppen, die DNA erhielten (ohne ATG $p = 0,0252$; ohne CpG $p = 0,0051$, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) (Abbildung 14).

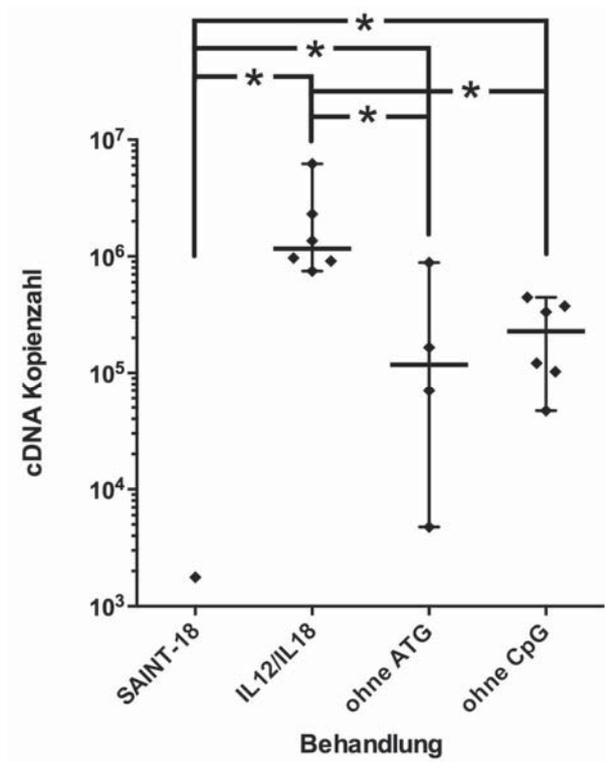


Abbildung 14: Differenzen der mRNA-Expression von CXCL10 in Hautbiopsien – Vergleich der Behandlungsgruppen dargestellt als Median inklusive Spanne. Die Expressionsmenge ist als Differenz der Expressionen in den Behandlungs- und Kontrollproben dargestellt. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit einem Stern markiert. Die Expressionsdifferenzen von fünf Pferden der Gruppe SAINT-18 sind nicht dargestellt, da sie negativ sind und es sich um eine logarithmische Skala handelt.



5 Diskussion

5.1 Langzeiteffekte nach Behandlung mit MIDGE®-Vektoren

5.1.1 Einfluss der Messtechnik auf die Ergebnisse

Es ist kritisch zu hinterfragen, ob Untersucher und Techniken zu abweichenden Befunden bei der Erfassung der Tumorgrößen führen. Aus diesem Grund wurde durch MÄHLMANN et al. (2012) überprüft, ob unterschiedliche Untersucher zu vergleichbaren Ergebnissen gelangen [3]. Durch Vergleichsmessungen von unterschiedlichen Untersuchern wurde die Wiederholbarkeit, Objektivität und die Unabhängigkeit vom Untersucher nachgewiesen. Um die Vergleichbarkeit mit MÄHLMANN et al. (2012) zu gewährleisten, wurden die Messmethoden von MÄHLMANN et al. (2012) übernommen, um vergleichbare Ergebnisse gewinnen zu können [3]. Die Vergleichbarkeit wird durch die statistischen Untersuchungen unterstützt, die keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untersuchungsmethoden erkennen lassen.

Die Standardabweichung der relativen Tumorumfänge war im Vergleich zu den Messungen von MÄHLMANN et al. (2012) höher [3]. Hier sind unterschiedliche Einflüsse als ursächlich denkbar. Einerseits könnte eine Ursache in der Biologie der Tumore liegen. Da zwischen den Untersuchungen von MÄHLMANN et al. (2012) deutlich kürzere Zeitintervalle lagen, fielen die Wachstumsgeschwindigkeiten der Tumore weniger ins Gewicht [3]. Bei Melanomen sind divergierende Wachstumsraten beschrieben [9]. Das maximal betrachtete Zeitintervall von MÄHLMANN et al. (2012) belief sich auf 120 Tage, während der Abstand zu den vorliegenden Untersuchungen etwa 600 Tage betrug. Genaue Analysen über Wachstumsraten und Langzeitentwicklung von Melanomen beim Pferd fehlen allerdings.



5.1.2 Unerwünschte Langzeitwirkungen

Es konnte im Rahmen der Untersuchungen nur die bereits durch MÄHLMANN et al. (2012) beschriebene Depigmentierung festgestellt werden [3]. Weitere unerwünschte Langzeitwirkungen waren nicht erkennbar. Dies lässt den Schluss zu, dass keine offensichtlichen negativen Langzeitwirkungen durch die getesteten Agenzien zu erwarten sind und die Therapie in der Langzeitbetrachtung (über zwei Jahre) als sicher einzustufen ist.

5.1.3 Tumolvolumenentwicklung

Die meisten Patienten zeigten im Vergleich zu der letzten Untersuchung durch MÄHLMANN et al. (2012) eine Zunahme in der Anzahl der Melanome [3]. Dies kann eine normale Entwicklung für von Melanomen betroffene Schimmeln darstellen. Melanome bei Schimmeln treten typischerweise multipel auf und weisen progressives Wachstum in unterschiedlicher Ausprägung auf [9].

Bei den Messungen an Tag 730 konnte insgesamt eine Volumenzunahme im Vergleich zu den Messungen an Tag 120 festgestellt werden. Dabei ist die Ausprägung der Volumenzunahme unterschiedlich stark ausgeprägt. Die in der Studie von MÄHLMANN et al. (2012) behandelten Patienten zeigten bis zum Tag 120 nach der Behandlung eine Tumorremission, unabhängig von der Behandlungsgruppe [3]. Dies galt sowohl für die Ultraschall- als auch für die Schublehrenmessungen. Dieser Trend war unabhängig von der Behandlung und unabhängig davon, ob der Tumor lokal behandelt wurde, erkennbar. Fraglich ist, ob die Änderung des Tumorwachstums auf eine Wirkung der applizierten Vektoren zurückzuführen ist. Diesbezüglich ist entscheidend, ob der Vektor nach einem so großen Zeitraum weiterhin eine Wirkung besitzt, bereits eliminiert wurde oder aber eine stabile Immunantwort getriggert hat, welche weiterhin fort dauert.

In Untersuchungen zur intradermalen tumorassoziierten Applikation von IL-12-Plasmiden konnten direkte Effekte der Applikation in der Regel bis zu 60 Stunden



nachgewiesen werden [412]. Nach der Applikation von muIL-12 Plasmiden bei Mäusen erreichten die nachgewiesenen Plasmalevel von IL-12 nach 20 Tagen ihren höchsten Wert [196]. Hingegen konnte bei Mäusen nach einer Vakzinierung (Plasmid kodierend für humanes Mucin) ein antitumoraler Effekt für 150 Tage nachgewiesen werden [413]. Langzeituntersuchungen zur Wirkung der verwendeten MIDGE[®]-Vektoren beim Pferd liegen derzeit nicht vor. Eine Transfektion durch die verwendeten Vektoren wurde an CHO-Zellen erfolgreich nachgewiesen [414]. Es konnte zusätzlich durch Versuche mit MIDGE[®]-Vektoren in Kombination mit Luciferase belegt werden, dass eine Transfektion beim Pferd *in vivo* prinzipiell möglich ist und die Expression, nachgewiesen durch die Luciferasenachweis, über zwei Wochen anhält [3]. Ergänzt werden diese Ergebnisse durch Untersuchungen die zeigen, dass sich MIDGE[®]-Vektoren über einen langen Zeitraum am Applikationsort nachweisen lassen [415]. Auch wenn MIDGE[®]-Vektoren über einen Zeitraum lokal nachweisbar sind, ist nach 730 Tagen unter Berücksichtigung der Untersuchungen zu Plasmiden nicht mehr mit einer lokalen Wirkung zu rechnen. Da im Rahmen der Studie keine Hautbiopsien zum Nachweis der Vektoren entnommen wurden, konnte ein direkter Nachweis der Vektoren im Gewebe nicht erbracht werden. Dadurch können die Dauer der Wirkung sowie das Vorhandensein von MIDGE[®]-Vektoren in equinen Geweben nach zwei Jahren nicht belegt werden.

Ebenso verhält es sich mit dem antitumoralen Effekt, der durch die MIDGE[®]-Vektoren hervorgerufen wird. Deshalb ist die Tumorumfangzunahme zum Tag 730 auf das Wachstum der Melanome ohne effektive Therapie nach Ende der Wirkzeit der Vektoren zurückzuführen. Es ist unwahrscheinlich, dass das Wachstum durch die Therapie mit MIDGE[®]-Vektoren induziert oder gesteigert wurde. Durch das Fehlen einer direkten Kontrollgruppe kann dies anhand der vorliegenden Daten allerdings nicht bewiesen werden. Ein langfristiger antitumoraler oder tumorstatischer Effekt durch dreimalige Applikation von MIDGE[®]-Vektoren codierend für IL-12 und IL-18 konnte nach 730 Tagen jedoch nicht mehr nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte kein antimetastatischer Effekt nach diesem Zeitraum beobachtet werden.



Vereinzelt zeigten Melanome eine Volumenabnahme. Hierbei ist unklar, ob dieser Effekt auf die Behandlung mit Vektoren zurückzuführen ist. Es besteht der Verdacht, dass es sich bei den beobachteten Volumenabnahmen um spontane Remissionen handelt. Auffällig ist jedoch, dass es sich bei den Melanomen in der Mehrzahl um die Melanome handelt, die auch in der Studie von MÄHLMANN et al. (2012) besonders positiv auf die Therapie angesprochen haben [3]. Ein direkter Bezug zu einer abweichenden lokalen Immunreaktion kann jedoch anhand der vorliegenden Daten nicht beurteilt werden. Hierzu wären weitere Untersuchungen, insbesondere zur spezifischen lokalen Immunreaktion auch auf zellulärer Ebene erforderlich.

In der Gesamtbetrachtung zeigte sich eine Zunahme des Volumens und der Anzahl der Melanome. Dies spricht dafür, dass die Melanome eine ohne eine therapeutische Hemmung einer Wachstumstendenz zeigen. Diese Wachstumstendenz kann den Melanomen auch für den Zeitraum der Studie MÄHLMANN et al. (2012) zugeschrieben werden [3]. Insbesondere diese natürliche Wachstumstendenz steht im Kontrast zu der durch MÄHLMANN et al. (2012) beschriebenen Tendenz der Volumenabnahme [3]. Daher ist davon auszugehen, dass die Volumenabnahme der Melanome auf die Therapie zurückzuführen ist. Die Tendenz der Volumenzunahme nach der Therapie kann daher ein indirektes Zeichen für die Wirksamkeit der Therapie mit den Vektoren darstellen.



5.2 Messung der Zytokinexpression nach Applikation von MIDGE®-Vektoren

5.2.1 Begrenzung der Aussagekraft von quantitativen mRNA-Analysen

Das Verhältnis zwischen mRNA- sowie Proteinmenge ist nicht linear. Die Ursache hierfür liegt unter anderem in den regulatorischen Kontrollmöglichkeiten der Translation [416]. Es kann einerseits die Translation direkt reguliert werden, jedoch auch die RNA-Abbaurrate, was zu einer indirekten Regulation der Translation führt, indem z.B. dasselbe mRNA-Molekül mehrfach translatiert werden kann [416]. Weiterhin können Moleküle in Vorläuferformen, z.B. Pro-IL-18, gespeichert werden, deren Sekretion durch die Induktion proteolytischer Enzyme reguliert wird, welche die Vorläufer in die aktive Form überführen, z.B. IL-18. Daher ist die Messung einer Veränderung der mRNA-Expression nicht gleichzusetzen mit den Veränderungen auf Proteinebene und den daraus resultierenden physiologischen Änderungen.

Das eingesetzte System der SYBR® Green PCR nutzt als untere Nachweisgrenze den Nachweis von 100 Kopien pro μl . Dies entspricht der höchsten Verdünnungsstufe der Standardreihen. Folglich gilt ein Nachweis als negativ, obwohl zum Teil geringe Mengen mRNA Mengen vorhanden sind. Wenn man nun die zuvor dargestellten regulatorischen Prozesse bedenkt, könnten geringe Mengen von mRNA wiederum zu einer Synthese von Proteinen und entsprechenden immunologischen Reaktionen führen [416]. Es wurden allerdings insbesondere bei der Betrachtung von CXCL10 exponentielle Anstiege der Expression festgestellt. Eine Expression von unter 100 Kopien pro μl ist daher als vernachlässigbar anzusehen.

5.2.2 Fehlender Nachweis von Zytokinen

Für die Zytokine IL-2, IL-4, IL-10 und IFN γ wurde keine Expression im Rahmen der Messung mittels qPCR nachgewiesen. Eine mögliche Ursache hierfür wäre, dass in den Proben keine bzw. zu wenig mRNA vorhanden gewesen ist. Dies könnte am



Zeitpunkt der Probenahme liegen. Im vorliegenden Fall wurden die Zeitpunkte auf Grundlage der klinischen Erfahrungen von MÄHLMANN et al. (2012) ermittelt [3]. Hier zeigten die Patienten 12 Stunden nach Applikation eine Erhöhung der Rektaltemperatur. Dies ist ein Zeichen dafür, dass zu diesem Zeitpunkt eine Immunreaktion vorhanden war. Allerdings ist der Zeitpunkt der klinischen Symptome gegebenenfalls nicht identisch mit dem Nachweis der mRNA. Die der Immunreaktion zugrunde liegende mRNA könnte bereits wieder abgebaut sein. In einer vergleichbaren Studie, in der Pferden Plasmid DNA kodierend für equines IL-12 intratumoral verabreicht wurde, wurde jedoch die aus der Stimulation mit IL-12 resultierende IFN γ -mRNA bis zu 60 Stunden nach der Injektion nachgewiesen [412]. Aus diesem Grund war ein Nachweis der Zytokinexpression in dem ausgewählten Zeitfenster zu erwarten.

Trotz der zahlreichen untersuchten Parameter stellen die Untersuchungen zum Expressionsprofil lediglich einen kleinen Ausschnitt aus der Immunreaktion dar. Für Pferde ist derzeit noch nicht klar, welche Biomarker zum Nachweis einer antitumoralen Immunreaktion geeignet sind. Zusätzlich ist die Expression in einem komplexen Gewebe wie der Haut derzeit nicht vorhersagbar. Die vorliegende Studie gibt erste Hinweise auf die Anwendbarkeit der hier ausgewählten Parameter als Biomarker einer antitumoralen Immunantwort.

Ergänzend ist dabei zu beachten, dass es sich bei den untersuchten Zytokinen um unterschiedliche Funktionsträger des Immunsystems handelt. Ein Ziel der Arbeit stellt die Charakterisierung der Immunantwort dar. Daher wurden die Messparameter so gewählt, dass unterschiedliche Immunreaktionen dargestellt werden können. Es wurde eine Th1 polarisierte Immunantwort unter dem Einfluss einer IL-12- und IL-18-Expression erwartet. Deshalb wurde charakteristische Zytokine einer Th1 Immunantwort als Parameter ausgewählt. Da es sich jedoch lediglich um eine Hypothese handelte, wurden zum Vergleich sowie zum Nachweis einer Th2 polarisierten Immunantwort korrespondierende Zytokine einer Th2 Immunantwort parallel gemessen. Es war demzufolge auch zu erwarten, dass die Expression nicht bei sämtlichen Parametern induziert wird, da in der Regel durch die Polarisierung



eine deutliche Gewichtung der Expression festzustellen ist und die Zytokinexpression der gegenläufigen Polarisierung lediglich unerheblich ist.

Zusätzlich wurde das Untersuchungsspektrum durch die eingeschränkten etablierten Nachweisverfahren beim Pferd limitiert. Es wurden deswegen aus der jeweiligen Polarisierung drei sich gegenüberstehende Zytokine ausgewählt, deren Nachweis mittels qPCR sicher und verlässlich möglich ist. Zusätzlich wurden Zytokine ausgewählt, die als Nachfolgeprodukte einer erfolgreichen Transfektion zu erwarten sind. Das Untersuchungsspektrum (IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-18, CCL2, CXCL2, CXCL8, CXCL10 und IFN γ) war jedoch auf die ausgewählten Parameter beschränkt.

5.2.3 Transfektionsnachweis

Anhand der Expression von IL-12 und IL-18 sollte die Transfektion in Geweben der Pferde mit dem eingesetzten Vektor nachgewiesen werden. Es wurde ein Anstieg der Expression von IL-12 in den Hautbiopsien nach der Behandlung mit den Vektoren gemessen, allerdings ist der spezifische Nachweis von IL-12 mRNA in den lokalen Hautbiopsien nicht gelungen. Dieser scheinbare Widerspruch gelangt im Folgenden näher zur Erläuterung. Mögliche Ursachen für falsch-positive Ergebnisse der IL-12 qPCR wären die Detektion endogener IL-12 DNA sowie von Vektor-DNA anstelle der transkribierten (endogenen oder transgenen) RNA.

Physiologischerweise befinden sich im codogenen Strang der DNA Introns und Exons [416]. Mit der Transkription wird die prä-mRNA gebildet, die transkribierte Introns und Exons enthält [416]. Jedoch sind die Introns nicht Teil der codierenden RNA-Sequenz und werden über das Spleißen entfernt [416]. Die verwendeten intronübergreifenden Primer für IL-12 binden daher prinzipiell an endogene korrekt gespleißte IL-12-RNA, nicht aber an die endogene IL-12-DNA. Die applizierte (transgene) MIDGE[®]-DNA ist jedoch nicht analog zur endogenen DNA aufgebaut. Stattdessen wurde auf die endogen vorhandenen Introns verzichtet. Dies hat zur Folge, dass die intronübergreifenden Primer sowohl an die MIDGE[®]-DNA als auch an die aus der endogenen RNA gewonnene cDNA binden können. Somit wäre bei einer



Messung mittels qPCR nicht zwischen endogener mRNA- und transgenem Vektor zu unterscheiden.

Um zu klären, ob in den Hautbiopsien nach Extraktion durch die lokale Applikation der Vektoren eine Kontamination mit MIDGE[®]-DNA vorliegt und zu falsch-positiven Nachweisen führt, fand die qPCR mit RNA anstelle von cDNA statt. In der qPCR kommt eine DNA-Polymerase zum Einsatz, die lediglich an einem Doppelstrang, sprich einer DNA und keiner RNA, binden und synthetisieren kann. Bei einer reinen RNA-Lösung, extrahiert aus den Gewebeproben, ohne eine Kontamination mit dem doppelsträngigen Vektor hätte keine DNA-Synthese erfolgen können. Ebenso hätte eine Kontamination mit endogener IL-12-DNA zu keiner Replikation geführt, da dies durch das Primer-Design ausgeschlossen wurde. Das Ergebnis der qPCR zeigte allerdings die erfolgreiche Replikation von IL-12 Produkten. Somit liegt eine Kontamination der extrahierten Proben mit der applizierten MIDGE[®]-DNA vor und die Messergebnisse entsprechen nicht der Menge von exprimiertem IL-12.

Da die Sequenzen der Vektoren und der mRNA zu identisch waren, war ein Primerdesign zur ausschließlichen Bindung an die mRNA nicht möglich. Daher wurde eine zusätzliche DNase-Verdauung zur Aufreinigung der RNA-Proben genutzt. Ziel dieses Schrittes war eine endgültige Eliminierung der restlichen DNA-Vektoren vor der Erzeugung der cDNA. Zusätzlich wurden die Vektoren so konzipiert, dass das Restriktionsenzym Mlsl eingesetzt werden kann, um den Vektor in seiner Promotorregion anzugreifen. Das Restriktionsenzym bindet und schneidet nicht die endogenen Produkte. Durch die Trennung in der Promoterregion sollte eine Instabilisierung der DNA-Vektoren trotz der zuvor beschriebenen Probleme gewährleistet werden. Angeschlossene Reinheitsuntersuchungen ergaben jedoch, dass weiterhin aufgrund der Kontamination mit DNA-Vektoren keine Messung der Expression von IL-12 möglich ist. Als ursächlich ist hier der besonders kompakte und stabile Aufbau der MIDGE[®]-DNA zu betrachten [402]. Dieser ist nicht vergleichbar mit dem Aufbau von endogenen Strukturen und soll insbesondere die Stabilität gewährleisten. Vor einem erneuten Einsatz sollte die Vektorsequenz so angepasst



werden, dass ein spezifischer Nachweis möglich ist. Hierzu könnten vergleichbar mit dem IL-18 Vektor mit Introns und Exons gearbeitet werden.

Für die Expression von IL-18 war ein spezifischer Nachweis mit der angewandten Methodik möglich, da lediglich die transgene und endogene IL-18 Expression nachgewiesen wurde. Der Nachweis von MIDGE[®]-DNA konnte aufgrund des Primerdesigns ausgeschlossen werden. Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe IL-12/IL-18 und der Gruppe ohne Applikation eines Vektors (SAINT-18) festgestellt werden. Jedoch differenzierten sich die anderen drei Gruppen (IL-12/IL-18, ohne ATG und ohne CpG) nicht signifikant voneinander. Dies lässt an der signifikanten Expression von transgenem IL-18 zweifeln, da diese erwarten ließe, dass IL-18 in der Gruppe mit IL-12/IL-18 weiterhin deutlich erhöht wäre im Vergleich zu den Gruppen mit nicht-exprimierenden Vektoren.

Bei einer erfolgreichen Transfektion würden die entsprechenden Produkte transkribiert werden. Deshalb wäre ein erhöhter Nachweis von IL-18 in der Gruppe IL-12/IL-18 verglichen mit den Gruppen, die nicht-exprimierende Vektoren erhielten, zu erwarten gewesen. Dies konnte in der Studie nicht beobachtet werden. Untersuchungen an Ratten und Pferden zeigten, dass MIDGE[®]-Th1-Vektoren langfristig in der Haut nachweisbar waren [3; 415]. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass bei der Messung nach 24 Stunden bereits alle exprimierenden Vektoren ausgeschwemmt oder abgebaut wurden. Dies wird durch die falsch-positiven Nachweise von IL-12 in der aus der Haut gewonnenen RNA der behandelten Pferde unterstützt. Die Biopsien wurden nach 24 Stunden entnommen und enthielten nachweisbare Mengen der Vektoren. In vergleichbaren Studien mit der Applikation von Plasmiden beim Pferd konnten die aus dem Plasmid resultierende Produkte bis zu 60 Stunden lang nachgewiesen werden [196; 412]. Folglich wurde kein direkter Nachweis der Transfektion über IL-18 in der vorliegenden Studie nach Applikation von MIDGE[®]-Th1-Vektoren erbracht.

Es wurde jedoch in der Gruppe IL-12/IL-18 ein signifikanter Anstieg der CXCL10 Expression beobachtet. IL-18 fördert in Synergie mit IL-12 die IFN γ -Synthese und das IFN γ hat wiederum einen fördernden Einfluss auf die Expression von CXCL10



[209; 223-225; 228]. Dass in der Gruppe, die kodierende Vektoren erhielt, der stärkste CXCL10-Anstieg ermittelt wurde, kann ein indirekter Hinweis auf eine gelungene *In-vivo*-Transfektion sein. Die Produktion der Nachfolgeprodukte von IL-12 und IL-18 ist das gewünschte Resultat einer Transfektion. In einer Studie zum Nachweis der Transfektion von Pferden mit einem Plasmid kodierend für IL-12 wurde IFN γ als Nachweis für die Transfektion angeführt [412]. Der indirekte Transfektionsnachweises sollte durch weiterführende Untersuchungen untermauert werden, da weitere Einflussgrößen auf die Expression von CXCL10 nicht ausgeschlossen werden können sowie Widersprüche zu den direkten Nachweisen in dieser Studie bestehen.

5.2.4 Immunstimulierende Komponenten der Vektoren

Genvektoren können aufgrund unterschiedlicher Komponenten immunologische Reaktionen auslösen. Zentrale Bedeutung kommt diesbezüglich dem DNA-Doppelstrang, den darin enthaltenen CpG-Motiven und den translatierten Produkten zu [417; 418]. Um einen Rückschluss auf die immunologisch wirksamen Komponenten ziehen zu können, wurden die Gruppen so gestaltet, dass Effekte der einzelnen Komponenten an den Gruppen verglichen werden konnten.

5.2.4.1 Einfluss des Transfektionsreagenz SAINT-18

In der Gruppe, die SAINT-18 erhielt, kann aus den Resultaten die Wirkung des Transfektionsreagenz abgeleitet werden. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Expressionsmenge verglichen mit der ausschließlichen Behandlung mit PBS. Von dem Transfektionsreagenz SAINT-18 geht keine signifikante immunologische Wirkung aus [419]. Dies kann auch mit der vorliegenden Studie bestätigt werden.



5.2.4.2 Einfluss der CpG-Motive auf die Immunantwort

Um den Einfluss der CpG-Motive beurteilen zu können, wurde eine Gruppe mit Vektoren mit invertierten CpG behandelt (ohne CpG). Durch die Invertierung der Motive ändert sich die Struktur und damit auch die Immunogenität [420]. Hierbei konnten in der Expression von CXCL10 keine signifikanten Unterschiede zu den Gruppen mit Vektoren, die CpG-Motive enthielten, gefunden werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die CpG-Motive in der vorliegenden Studie keine zentrale Rolle in der Immunstimulation einnahmen. Dieser Schluss wird ebenso von Ergebnissen der Untersuchungen von SCHNABEL et al. (2015) gestützt [411]. Hier konnte in der Gesamtbetrachtung der Immunreaktion auf der Proteinebene kein wesentlicher Unterschied in der Immunreaktion in Abhängigkeit von den CpG-Motiven gesehen werden.

Weitere Studien zur Immunstimulation durch CpG-Motive zeigen allerdings, dass CpG-Motive prinzipiell ein immunologisches Potential besitzen. Es konnte dargestellt werden, dass die CpG-Motive über TLR-9 eine Immunstimulation hervorrufen. In der durch Bindung an diesen Rezeptor induzierten Signalkaskade führen *myeloid differentiation primary response gene 88*, *interleukin-1 receptor-associated kinases*, *TNF receptor-associated factor 3* und *6* zu einer Aktivierung des *nuclear factor kappa B* und dem *interferon regulatory factor 7* [390; 421; 422]. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass unterschiedliche CpG-Motive in equinen Geweben zu unterschiedlich ausgeprägten Immunreaktionen führen können [423]. Hier besteht allerdings weiterer Forschungsbedarf vor einer abschließenden Beurteilung.

5.2.4.3 Einfluss der doppelsträngigen DNA

In allen Gruppen, die doppelsträngige DNA erhielten, konnte ein Anstieg der Expression von IL-18, CCL2 und CXCL10 nachvollzogen werden. Diese Effekte lassen sich aufgrund der Gruppenkonstellationen auf die doppelsträngige DNA zurückführen.



Die DNA wurde mit einem Transfektionsreagenz (SAINT-18) appliziert. Dadurch wird die DNA komplexiert, was ein Erreichen des Zytosols fördert [424; 425]. Im Zytosol bewirkt doppelsträngige DNA durch Stimulation der zyklischen GMP-AMP-Synthase einen Anstieg der zyklischen GMP-AMP [426]. Dies führt wiederum zu einer Aktivierung des *stimulator of interferon genes* [426]. Als Resultat werden *interferon regulatory factor* (IRF) 3, IRF7 und *nuclear factor kappa B* (NFκB) aktiviert [427]. Weiterhin wirkt DNA im Zytosol auf *absent in melanoma 2*, das wiederum die Caspase-1-Aktivität unterstützt. Caspase 1 ist in der IL-1-Familie (z.B. IL-18) bei der Umwandlung der Vorstufen in die aktiven Formen der Interleukine essenziell [427; 428]. Zusätzlich kann im Rahmen der Signalkaskade der zyklischen GMP-AMP-Synthase eine Erhöhung der Expression von CXCL10 auftreten [429].

5.2.4.4 Einfluss der transgenen Expression (IL-12 und IL-18)

In der Gruppe, die für IL-12 und IL-18 kodierende Vektoren erhielt, konnte in den Hautbiopsien eine signifikant höhere Expression von CXCL10 festgestellt werden als in allen anderen Gruppen. In Vorgängerstudien wurde bereits dargelegt, dass die Vektoren equines Gewebe *in vivo* transfizieren [3]. Der Unterschied zu den anderen Gruppen ist, dass bei den kodierenden Vektoren eine Translation von transgenem IL-12 und IL-18 zu erwarten ist. Wie bereits dargestellt, konnte ein Anstieg der transgenen Zytokine nicht direkt nachgewiesen werden. Allerdings handelt es sich bei CXCL10 um ein Folgeprodukt der IL-12- und IL-18-Kaskade. Daher könnte, wie oben bereits erläutert, erhöhtes CXCL10 indirekt auf eine erfolgreiche *In-vivo*-Transfektion hinweisen.

Der Anstieg der CXCL10-Expression ist Ausdruck einer Immunstimulation. Diese Immunstimulation konnte durch die Untersuchungen von SCHNABEL et al. (2015) auf Proteinebene ebenfalls nachvollzogen werden [411]. Die erhöhte Zytokinexpression von CXCL10 und IL-18 spricht außerdem für die Begünstigung der Immunantwort in Richtung einer Th1-Immunreaktion [314]. Diese Polarisation wird



durch IL-12 und IL-18 stark begünstigt [171-176; 226] und stellte ein Ziel der hier untersuchten Immuntherapie dar.

Es liegen indirekte Anzeichen einer erfolgreichen Transfektion in Form einer Th1-polarisierten Immunreaktion vor. Diese Immunreaktion könnte die Wirkung der Vektoren, wie sie durch MÄHLMANN et al. (2012) beschrieben wurde, erklären [3].

5.2.4.5 Erklärung einer möglichen antitumoralen Wirkung

Der Mechanismus der antitumoralen Wirkung von MIDGE[®]-Th1-Vektoren codierend für IL-12 und IL-18 konnte von MÄHLMANN (2012) nicht dargestellt werden [3]. Ein Nachweis antitumoraler Antikörper oder spezifischer T-Zellen war nicht möglich. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb kurzfristige und primär unspezifische Effekte untersucht und Effekte von DNA, CpG-Motiven und transgenen Produkten (IL-12 und IL-18) an gesunden Pferden charakterisiert.

In der vorliegenden Studie kam es zu einem Anstieg der IL-18- und CXCL10-Expression durch IL-12 und IL-18 kodierende Vektoren. Hierbei ist die Wirkung der Vektoren nicht zwingend alleine auf die direkte Wirkung der exprimierten Vektoren zurückzuführen. Die immunologische Wirkung der mit SAINT-18 komplexierten DNA ist hierbei ebenfalls als Auslöser zu sehen. IL-18 und CXCL10 sind Bestandteil einer Th1-Ausrichtung der Immunreaktion [314]. IL-18 fördert zusätzlich in Synergie mit IL-12, über eine IFN γ -Synthese, die Expression von CXCL10 [209; 223-225; 228]. Die Erhöhung der CXCL10-Expression ist daher auch indirekt ein Indikator für die Aktivität von IL-12 und IL-18 sowie ein Hinweis auf ein frühzeitiges ‚Priming‘ der Immunantwort zu dieser Polarisation.

Interleukin-18 und CXCL10 sind Bestandteil antitumoraler Immunreaktionen. Im Rahmen dessen ist IL-18 an einer Anreicherung von T-Effektorzellen und NK-Zellen ursächlich beteiligt [227]. Zusätzlich fördert IL-18 die Zytotoxizität der Immunzellen, sodass eine effektive Bekämpfung von Tumorzellen ermöglicht werden kann [221; 222]. Eine weitere antitumorale Wirkung von IL-18 ist der indirekte Einfluss auf die



Tumorangiogenese, vermittelt über Chemokine wie CXCL10 [228]. Durch die Hemmung der Angiogenese kommt es zu einem hemmenden Einfluss auf die Tumorentwicklung.

In der vorliegenden Studie wurde ein signifikanter Anstieg der Expression von CXCL10 in der Gruppe IL-12/IL-18 festgestellt. Der über Antiangiogenese vermittelte antitumorale Effekt wäre deshalb bei der Behandlung mit diesem Vektor im Vergleich am deutlichsten ausgeprägt. Dieser Effekt kann ein Mechanismus der von MÄHLMANN et al. (2012) dargestellten antitumoralen Wirkung sein [3].

Zusätzlich konnte in den Proben der behandelten Hautareale ein Anstieg der CCL2-Expression festgestellt werden. CCL2 besitzt ebenfalls einen antitumoralen Effekt. Es wirkt chemotaktisch auf Monozyten und Lymphozyten und ist in der Lage, die infiltrierende Subpopulation an Immunzellen mitzubestimmen [259-265; 270-272]. Es wurde nachgewiesen, dass die Expressionsstärke von CCL2 mit der Infiltrationsstärke des Gewebes mit TAM korreliert [260]. Die chemotaktische Wirkung wird dadurch demonstriert, dass SCHNABEL et al. (2015) in den behandelten Hautarealen eine Infiltration mit Leukozyten nachwies [411]. Die zuvor beschriebene Polarisierung der Immunantwort zu einer Th1 Immunreaktion steht ebenfalls in keinem Konflikt zu dem Nachweis von CCL2. CCL2 beeinflusst Th1 Immunreaktionen und wird ebenfalls bei dieser Art von Immunreaktion exprimiert [265; 268; 269]. Der antitumorale Effekt in der Studie von MÄHLMANN (2012) wurde somit wahrscheinlich durch die chemotaktische Wirkung der Vektor-Applikation unterstützt [3].

Die Untersuchung von gesunden Pferden ist erforderlich, da so eine Einschränkung der Einflussfaktoren vorgenommen wurde. Es ist ungeklärt, ob die Ergebnisse, die bei gesunden Pferden erlangt wurden, auf an Melanomen erkrankte Pferde übertragen werden können. Bei der Gesamtbetrachtung des antitumoralen Effekts ist somit einschränkend zu berücksichtigen, dass in dieser Studie gesunde Pferde behandelt wurden. Die Untersuchungen zielen auf die Erklärung des prinzipiellen immunologischen Prozesses ab, unabhängig von tumorbedingten Immunmodulationen. Die Übertragung auf Pferde mit Melanomen stellt einen Folgeschritt zu dieser Studie dar.



5.3 Fazit

Es zeigten sich keine unerwünschten Nebeneffekte bei der Langzeitbetrachtung nach Behandlung von Schimmeln mit equinen Melanomen mit MIDGE[®]-Vektoren, kodierend für equines IL-12 und IL-18 auch kombiniert mit Tyrosinase und gp100. Allerdings konnten ebenso keine über den kurzfristigen Erfolg hinaus gehenden therapeutischen Effekte nachgewiesen werden. Jedoch schmälert das ohne weitere Therapie wieder einsetzende Wachstum der Melanome nicht die von MÄHLMANN et al. (2012) beschriebenen antitumoralen Effekte in der Kurzzeitbetrachtung, sondern demonstriert, dass der Verlauf des Wachstums durch die Therapie moduliert wurde [3].

Ein besseres Verständnis der immunologischen Wirkungen der eingesetzten MIDGE[®]-Vektoren zur Behandlung des Schimmelmelanoms könnte zu einer Steigerung der Effektivität einer Therapie führen. Im Rahmen der durchgeführten Studie kann ein erster Rückschluss auf die Art der Immunreaktion gezogen werden, die induziert wird. Es handelt sich um eine proinflammatorische und Th1-polarisierte Immunreaktion, die antiangiogenes Potenzial besitzt. Weitere Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen den Vektoren sowie den hauptsächlich nachgewiesenen Effekten auf die Expression von CCL2 und CXCL10 sind allerdings notwendig.

Die veränderte Expression von CCL2, CXCL10 und IL-18 könnte eine Erklärung für den von MÄHLMANN et al. (2012) beschriebenen antitumoralen Effekt darstellen [3]. Dabei kommt den kodierenden Vektoren und deren Konstitution als doppelsträngige DNA eine zentrale Bedeutung in der Induktion der Immunreaktion zu.

Es ist notwendig, die in der vorliegenden Arbeit an gesunden Pferden gewonnenen Erkenntnisse an Pferden mit Melanomen zu überprüfen und zu verifizieren. Insbesondere ist zu verifizieren, ob die immunologische Reaktion vergleichbar ausfällt. Die Korrelation zur Beeinflussung des Tumorumfanges muss ebenfalls noch hergestellt werden. Die Studie verdeutlicht, dass eine Th1-Immunantwort durch die Vektoren ausgelöst wird. Deshalb wäre in einer nachfolgenden Studie das Untersuchungsspektrum auf die für eine Th1-Immunantwort charakteristischen



Parameter einzuschränken. Gleichzeitig empfiehlt es sich, das Untersuchungsspektrum im zeitlichen Verlauf zu betrachten, um den Verlauf der Immunreaktion beschreiben zu können. Eine gezielte engmaschige Therapie von Pferden mit wenig Melanomen eines geringen Volumens könnte in einem nächsten Schritt die Verbindung der immunologischen Erkenntnisse dieser Studie mit den klinischen Erkenntnissen aus der Studie von MÄHLMANN et al. (2012) herstellen [3]. Zur Klärung der Wirkung der Therapie wären weitere Untersuchungen zur tumoralen Angiogenese hilfreich. Insbesondere die durch CXCL10 bedingte Beeinflussung der Angiogenese wäre diesbezüglich interessant.

Zu klären ist überdies, ob der Anstieg der Expression von CXCL10 unabhängig von IL-12, IL-18 und IFN γ zustande kommt. Hierzu sind weitere Untersuchungen zur Regulation der Expression von CXCL10 beim Pferd erforderlich.

Zusammenfassend ist weitere Forschung auf diesem Gebiet erforderlich, um von den hier erzielten grundlegenden Erkenntnissen der Immunmechanismen zur zufriedenstellenden Verbesserung der Therapie zu gelangen. Es wären engmaschige Verlaufsuntersuchungen der lokalen Zytokinexpression sowie Messungen der Zytokinexpression in Tumorgewebe sinnvoll.



6 Zusammenfassung

Patrick Steinig

Langzeiteffekte der Behandlung equiner Melanome und Charakterisierung des Zytokinexpressionsprofils gesunder Pferde

Eine Studie zur Interleukin-12 und -18 Gentherapie *in vivo*

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Langzeiteffekte der Behandlung equiner Melanome nach Behandlung mit Genvektoren kodierend für IL-12 und IL-18 aufzuzeigen und Zytokinprofile zur Charakterisierung der Immunantwort bei gesunden Pferden zu erstellen. Die antitumorale Wirksamkeit von Vektoren kodierend für equines IL-12 und IL-18 wurde bereits in einer Vorläuferstudie klinisch demonstriert. Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um weiteres Verständnis der immunologischen Abläufe zu erlangen.

Es wurden 19 Pferde der Vorläuferstudie 650 Tage nach der letzten Behandlung mit DNA erneut untersucht. Ziel war die Evaluation des Melanomwachstums und die Erfassung unerwünschter Effekte. Insgesamt zeigten die untersuchten Tumore eine Volumenzunahme. Dies weist darauf hin, dass die Tumorremission, die in der Vorgängerstudie beschrieben wurde, als Therapieerfolg zu werten ist, da bei Aussetzen der Therapie das für Melanome typische Wachstum wieder einsetzt.

Die Volumenzunahme in der Langzeitbetrachtung zeigt, dass die behandelten Melanome ohne Behandlung eine Wachstumstendenz besitzen. Dies bedeutet einerseits, dass die in der Vorgängerstudie erzielte Remission als Erfolg zu werten ist und andererseits, dass das Therapiekonzept in Bezug auf die Behandlungsdauer und Frequenz bei einem erneuten Einsatz als Therapeutikum angepasst werden muss.

In einer zweiten klinischen Studie wurde die Zytokinexpression nach einmaliger lokaler und systemischer Behandlung mit MIDGE[®]-Th1-Vektoren kodierend für equines IL-12 und IL-18 in Kombination mit der Transfektionreagenz SAINT-18 bei 24 gesunden Pferden gemessen. Die Pferde wurden in vier Behandlungsgruppen



aufgeteilt, die alle SAINT-18, zum Teil kombiniert mit Vektoren kodierend für IL-12 und IL-18, Vektoren ohne Startcodon oder Vektoren mit invertierten CpG-Motiven behandelt wurden. Zur Ermittlung der Zytokinexpression von IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-18, CCL2, CXCL2, CXCL8, CXCL10 und IFN γ wurde eine quantitative PCR (SYBR[®] Green) etabliert. Bei den Untersuchungen zeigte sich eine Zunahme der Expression von IL-18, CXCL10 und CCL2 in der Haut von Pferden, die DNA erhielten. Interessanterweise hatte der Gehalt an CpG-Motiven keinen Einfluss auf die Stärke der gemessenen kurzfristigen Immunantwort. Die kodierenden Vektoren zeigten jedoch die höchste Expression von CXCL10. Daher wurden die kodierenden Vektoren und die doppelsträngige DNA als ursächlich für immunologische Effekte der Therapie ausgemacht.

Auch wenn ein direkter Nachweis der Transfektion nicht erbracht werden konnte, wurde, indirekt in Form des CXCL10-Anstiegs, ein Nachweis der Aktivierung der IL-12/IL-18 Kaskade erbracht.

Die ermittelten Veränderungen in der Zytokinexpression zeigen, dass durch die Vektoren eine proinflammatorische Immunreaktion ausgelöst wird, die ursächlich für den antitumoralen Effekt sein kann. Daher wäre eine Untersuchung an Pferden mit equinen Melanomen und eine Fokussierung auf die hier dargelegten Immunmechanismen anzustreben.



7 Summary

Patrick Steinig

Long-term effects of the treatment of equine melanoma and characterization of the cytokine expression profiles of healthy horses

A study on interleukin-12 and -18 gene therapy *in vivo*

The present study aimed to demonstrate long-term effects of the treatment with gene expression vectors encoding for IL-12 and IL-18 on equine melanoma. Additionally, cytokine profiles to characterize the immune response to these linear DNA-vectors coding for IL-12 and 18 were assessed in healthy horses. Clinically, the antitumor activity of vectors encoding for equine IL-12 and IL-18 was demonstrated in an earlier study. To elucidate the underlying immunological processes the present study was performed.

First, 19 melanoma-bearing horses of the initial study were re-examined approximately 650 days after the last therapeutic DNA-application to assess melanoma growth and side effects. Overall, the examined tumors were increased in volume. This demonstrates that the tumor remission, which was described in the previous study, was not maintained after cessation of the treatment. No side-effects except for the previously described local depigmentations were recorded.

Second, cytokine expression was measured after a single local and systemic treatment with SAINT-18 formulated (complexed) MIDGE[®]-Th1-vectors encoding for equine IL-12 and IL-18 in 24 healthy horses. Horses were assigned to four groups, all received SAINT-18. The groups were treated with either complexed IL-12 and IL-18 encoding MIDGE-DNA, complexed nonsense DNA or complexed nonsense DNA without CpG. One Group received the transfection agent SAINT-18 alone. To determine the expression of the cytokines/chemokines, IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-18, CCL2, CXCL2, CXCL8, CXCL10 and IFN γ a quantitative PCR (SYBR[®] Green) was established and applied. An increase in expression of IL-18, CXCL10 and CCL2 was demonstrated in all DNA receiving groups. Interestingly, the CpG content of the vector did not elevate the response. The immunogenicity of the different vectors was



similar comparing the groups. However, the interleukin expressing vectors induced the highest expression of CXCL10 in the skin at the injection site. Hence, double-stranded DNA and the encoded cytokines were identified as main immune stimulants.

Although a direct proof of transfection could not be provided, a detection of the activation of the IL-12/IL-18 cascade was obtained indirectly. The CXCL10-elevation demonstrated served as an indicator of effects of transgene IL-12/IL-18.

In summary, the increase of tumor volumes displays that the treated melanoma resume growth without further treatment. This means on the one hand, that the remission reached in the previous study is considered a success attributable to the treatment, and secondly implies, that the therapy concept for the used vectors in relation to the duration and frequency of treatment have to be adapted. The changes in cytokine expression demonstrated in healthy horses treated with IL-12/IL-18 vectors indicate that a pro-inflammatory immune response is triggered by the treatment. This could be causative for the antitumor effect. Therefore, an examination of horses with equine melanomas focusing on the immune mechanisms shown in this study would be desirable.



8 Literaturverzeichnis

1. SELTENHAMMER, M. H., E. HEERE-RESS, S. BRANDT, T. DRUML, B. JANSEN, H. PEHAMBERGER u. G. W. NIEBAUER (2004):
Comparative histopathology of grey-horse-melanoma and human malignant melanoma.
Pigment Cell Res 17, 674-681.
2. MCFADYEAN, J. (1933):
EQUINE MELANOMATOSIS.
Melanom Journal of Comparative Pathology and Therapeutics Volume 46, Pages 186-204.
3. MÄHLMANN, K. (2012):
Minimalistic Immunologically Defined Gene Expression T Helper Cell 1 (MIDGE-Th1) Vectors Coding for Interleukin 12 and-18 in Combination with the Transfection Agent SAINT-18 Have Systemic Antitumoral Effects on Equine Melanomas.
Cuvillier Verlag.
4. FLEURY, C., F. BERARD, B. BALME u. L. THOMAS (2000):
The study of cutaneous melanomas in Camargue-type gray-skinned horses (1): clinical-pathological characterization.
Pigment Cell Res 13, 39-46.
5. MACGILLIVRAY, K. C., R. W. SWEENEY u. F. DEL PIERO (2002):
Metastatic melanoma in horses.
J Vet Intern Med 16, 452-456.
6. RODRÍGUEZ, M., V. GARCÍA-BARONA, L. PEÑA, M. CASTAÑO u. A. RODRÍGUEZ (1997):
Grey horse melanotic condition: A pigmentary disorder.
J Equine Vet Sci 17, 677-681.
7. SELTENHAMMER, M. H., H. SIMHOFER, S. SCHERZER, R. ZECHNER, I. CURIK, J. SOLKNER, S. M. BRANDT, B. JANSEN, H. PEHAMBERGER u. E. EISENMENGER (2003):
Equine melanoma in a population of 296 grey Lipizzaner horses.
Equine Vet J 35, 153-157.
8. ROONEY, J. R. u. J. L. ROBERTSON (1996):
Equine pathology.
Iowa State University Press.



9. MOORE, J. S., C. SHAW, E. SHAW, V. BUECHNER-MAXWELL, W. K. SCARRATT, M. CRISMAN, M. FURR u. J. ROBERTSON (2013):
Melanoma in horses: Current perspectives.
Equine Veterinary Education 25, 144-151.
10. VALENTINE, B. A. (1995):
Equine melanocytic tumors: a retrospective study of 53 horses (1988 to 1991).
J Vet Intern Med 9, 291-297.
11. BAKER, J. R. u. A. LEYLAND (1975):
Histological survey of tumours of the horse, with particular reference to those of the skin.
Vet Rec 96, 419-422.
12. SMITH, S. H., M. H. GOLDSCHMIDT u. P. M. MCMANUS (2002):
A comparative review of melanocytic neoplasms.
Vet Pathol 39, 651-678.
13. SASAKI, N., T. MINAMI, K. YAMADA, M. SATOH, H. INOKUMA, Y. KOBAYASHI, H. FURUOKA u. H. YAMADA (2007):
MDCT Images of the Head of a Horse with Malignant Melanoma.
Journal of Equine Science 18, 55-58.
14. GERLACH, K., M. CRONAU, R. MCMULLEN A. H. GERHARDS (2007):
Magnetresonanztomographische Untersuchungen von Melanomen im Kopfbereich bei drei Pferden.
Pferdeheilkunde 23, 259-262.
15. PATTERSON-KANE, J. C. u. P. E. GINN (2003):
Dermal malignant melanoma in a horse with multifocal pancytokeratin expression.
J Vet Diagn Invest 15, 54-56.
16. RODRIGUEZ, F., J. FORGA, P. HERRAEZ, M. ANDRADA u. A. FERNANDEZ (1998):
Metastatic melanoma causing spinal cord compression in a horse.
Vet Rec 142, 248-249.
17. GARVICAN, E. R., Y. A. ELCE, K. WOOLARD u. A. T. BLIKSLAGER (2007):
Preputial melanoma with systemic metastasis in a pony gelding and disseminated metastatic melanoma in a Thoroughbred gelding.
Equine Veterinary Education 19, 312-315.
18. BLANCHARD, T. L., J. SCHUMACHER, J. F. EDWARDS, D. D. VARNER, R. D. LEWIS, K. EVERETT u. J. R. JOYCE (1991):
Priapism in a stallion with generalized malignant melanoma.
J Am Vet Med Assoc 198, 1043-1044.



19. GOETZ, T. E., G. K. OGILVIE, K. G. KEEGAN u. P. J. JOHNSON (1990):
Cimetidine for treatment of melanomas in three horses.
J Am Vet Med Assoc 196, 449-452.
20. SCHOTT, H. C., M. D. MAJOR, B. D. GRANT u. W. M. BAYLY (1990):
Melanoma as a cause of spinal cord compression in two horses.
J Am Vet Med Assoc 196, 1820-1822.
21. TRAVER, D. S., J. N. MOORE, L. P. THORNBURG, J. H. JOHNSON u. J. R. COFFMAN (1977):
Epidural melanoma causing posterior paresis in a horse.
J Am Vet Med Assoc 170, 1400-1403.
22. KIRKER-HEAD, C. A., D. LOEFFLER u. J. P. HELD (1985):
Pelvic limb lameness due to malignant melanoma in a horse.
J Am Vet Med Assoc 186, 1215-1217.
23. DE BLAAUW, J. A., A. B. RIJKENHUIZEN, R. A. VAN NIEUWSTADT, G. C. GRINWIS u. W. BACK (2003):
[Malignant melanoma of the pelvis as a possible cause of pelvic limb lameness in two gray mares].
Tijdschr Diergeneeskd 128, 512-518.
24. SUTTON, R. H., COLEMAN, G.T. (1997):
A study of the grey horse melanoma, with special reference to prevalence, tumour structure and biology and associated pigment metabolism abnormalities.
25. GORHAM, S., ROBL M. (1986):
Melanoma in the gray horse: The darker side of equine aging.
Veterinary medicine 81, 446-.
26. RIEDER, S., C. STRICKER, H. JOERG, R. DUMMER u. G. STRANZINGER (2000):
A comparative genetic approach for the investigation of ageing grey horse melanoma.
Journal of Animal Breeding and Genetics 117, 73-82.
27. ROSENGREN PIELBERG, G., A. GOLOVKO, E. SUNDSTROM, I. CURIK, J. LENNARTSSON, M. H. SELTENHAMMER, T. DRUML, M. BINNS, C. FITZSIMMONS, G. LINDGREN, K. SANDBERG, R. BAUMUNG, M. VETTERLEIN, S. STROMBERG, M. GRABHERR, C. WADE, K. LINDBLAD-TOH, F. PONTEN, C. H. HELDIN, J. SOLKNER u. L. ANDERSSON (2008):
A cis-acting regulatory mutation causes premature hair graying and susceptibility to melanoma in the horse.
Nat Genet 40, 1004-1009.



28. SUNDSTROM, E., A. Z. KOMISARCZUK, L. JIANG, A. GOLOVKO, P. NAVRATILOVA, S. RINKWITZ, T. S. BECKER u. L. ANDERSSON (2012):
Identification of a melanocyte-specific, microphthalmia-associated transcription factor-dependent regulatory element in the intronic duplication causing hair greying and melanoma in horses.
Pigment Cell and Melanoma Research 25, 28-36.
29. SUNDSTROM, E., F. IMSLAND, S. MIKKO, C. WADE, S. SIGURDSSON, G. R. PIELBERG, A. GOLOVKO, I. CURIK, M. H. SELTENHAMMER, J. SOLKNER, K. LINDBLAD-TOH u. L. ANDERSSON (2012):
Copy number expansion of the STX17 duplication in melanoma tissue from Grey horses.
BMC Genomics 13, 365.
30. MAHLKE, K., K. M. MURPHY, P. TRAVERS, M. WALPORT, L. SEIDLER u. I. HAUSSE-SILLER (2009):
Janeway Immunologie.
Heidelberg: Spektrum
31. DI GAETANO, N., E. CITTERA, R. NOTA, A. VECCHI, V. GRIECO, E. SCANZIANI, M. BOTTO, M. INTRONA u. J. GOLAY (2003):
Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo.
J Immunol 171, 1581-1587.
32. WEINER, L. M., R. SURANA u. S. WANG (2010):
Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy.
Nat Rev Immunol 10, 317-327.
33. CARTRON, G., L. DACHEUX, G. SALLES, P. SOLAL-CELIGNY, P. BARDOS, P. COLOMBAT u. H. WATIER (2002):
Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene.
Blood 99, 754-758.
34. NIMMERJAHN, F. u. J. V. RAVETCH (2006):
Fcgamma receptors: old friends and new family members.
Immunity 24, 19-28.
35. ELMSLIE, R. E. u. S. W. DOW (1997):
Genetic immunotherapy for cancer.
Semin Vet Med Surg (Small Anim) 12, 193-205.



36. GALON, J., A. COSTES, F. SANCHEZ-CABO, A. KIRILOVSKY, B. MLECNIK, C. LAGORCE-PAGÈS, M. TOSOLINI, M. CAMUS, A. BERGER, P. WIND, F. ZINZINDOHOUE, P. BRUNEVAL, P.-H. CUGNENC, Z. TRAJANOSKI, W.-H. FRIDMAN u. F. PAGÈS (2006):
Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome.
Science 313, 1960-1964.
37. ALBERT, M. L., S. F. PEARCE, L. M. FRANCISCO, B. SAUTER, P. ROY, R. L. SILVERSTEIN u. N. BHARDWAJ (1998):
Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes.
J Exp Med 188, 1359-1368.
38. CELLA, M., D. SCHEIDEGGER, K. PALMER-LEHMANN, P. LANE, A. LANZAVECCHIA u. G. ALBER (1996):
Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation.
J Exp Med 184, 747-752.
39. KATO, T., H. YAMANE u. H. NARIUCHI (1997):
Differential effects of LPS and CD40 ligand stimulations on the induction of IL-12 production by dendritic cells and macrophages.
Cell Immunol 181, 59-67.
40. LABEUR, M. S., B. ROTERS, B. PERS, A. MEHLING, T. A. LUGER, T. SCHWARZ u. S. GRABBE (1999):
Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage.
J Immunol 162, 168-175.
41. HUGHES, R. M. (2004):
Strategies for cancer gene therapy.
J Surg Oncol 85, 28-35.
42. HART, D. N. (1997):
Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response.
Blood 90, 3245-3287.
43. BANCHEREAU, J. u. R. M. STEINMAN (1998):
Dendritic cells and the control of immunity.
Nature 392, 245-252.
44. MATZINGER, P. (1994):
Tolerance, danger, and the extended family.
Annu Rev Immunol 12, 991-1045.



45. STEINMAN, R. M. (1991):
The dendritic cell system and its role in immunogenicity.
Annu Rev Immunol 9, 271-296.
46. DELON, J., N. BERCOVICI, G. RAPOSO, R. LIBLAU u. A. TRAUTMANN (1998):
Antigen-dependent and -independent Ca²⁺ responses triggered in T cells by dendritic cells compared with B cells.
J Exp Med 188, 1473-1484.
47. RIBAS, A., L. H. BUTTERFIELD u. J. S. ECONOMOU (2000):
Genetic immunotherapy for cancer.
Oncologist 5, 87-98.
48. ARMSTRONG, A. C. u. R. E. HAWKINS (2001):
Vaccines in oncology: background and clinical potential.
Br J Radiol 74, 991-1002.
49. MOSMANN, T. R. u. R. L. COFFMAN (1989):
TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties.
Annu Rev Immunol 7, 145-173.
50. SCHOENBERGER, S. P., R. E. TOES, E. I. VAN DER VOORT, R. OFFRINGA u. C. J. MELIEF (1998):
T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions.
Nature 393, 480-483.
51. BENNETT, S. R., F. R. CARBONE, F. KARAMALIS, R. A. FLAVELL, J. F. MILLER u. W. R. HEATH (1998):
Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling.
Nature 393, 478-480.
52. BLUESTONE, J. A. (1997):
Is CTLA-4 a master switch for peripheral T cell tolerance?
J Immunol 158, 1989-1993.
53. DAVIS, M. M., J. J. BONIFACE, Z. REICH, D. LYONS, J. HAMPL, B. ARDEN u. Y. CHIEN (1998):
Ligand recognition by alpha beta T cell receptors.
Annu Rev Immunol 16, 523-544.
54. FOSS, F. M. (2002):
Immunologic mechanisms of antitumor activity.
Semin Oncol 29, 5-11.



55. SHANKARAN, V., H. IKEDA, A. T. BRUCE, J. M. WHITE, P. E. SWANSON, L. J. OLD u. R. D. SCHREIBER (2001):
IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity.
Nature 410, 1107-1111.
56. SWANN, J. B. u. M. J. SMYTH (2007):
Immune surveillance of tumors.
J Clin Invest 117, 1137-1146.
57. VAN SEVENTER, G. A., Y. SHIMIZU u. S. SHAW (1991):
Roles of multiple accessory molecules in T-cell activation.
Curr Opin Immunol 3, 294-303.
58. ABBAS, A. K. (2005):
Cellular and molekular immunology.
In: Abbas, A.K., A.H. Lichtman, J.S. Pober, Philadelphia, S. 391-410.
59. MORETTA, A., C. BOTTINO, M. VITALE, D. PENDE, R. BIASSONI, M. C. MINGARI u. L. MORETTA (1996):
Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells.
Annu Rev Immunol 14, 619-648.
60. KOS, F. J. (1998):
Regulation of adaptive immunity by natural killer cells.
Immunol Res 17, 303-312.
61. FERNANDEZ, N. C., A. LOZIER, C. FLAMENT, P. RICCIARDI-CASTAGNOLI, D. BELLET, M. SUTER, M. PERRICAUDET, T. TURSZ, E. MARASKOVSKY u. L. ZITVOGEL (1999):
Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo.
Nat Med 5, 405-411.
62. YASUMURA, S., W. C. LIN, H. HIRABAYASHI, N. L. VUJANOVIC, R. B. HERBERMAN u. T. L. WHITESIDE (1994):
Immunotherapy of liver metastases of human gastric carcinoma with interleukin 2-activated natural killer cells.
Cancer Res 54, 3808-3816.
63. ABBAS, A., A. LICHTMANN u. J. POBER (1996):
Tumorimmunität.
Immunologie. Verlag Hans Huber; Bern 428-451.
64. KOBAYASHI, N. (1985):
Malignant neoplasms in registered cases of primary immunodeficiency syndrome.
Jpn J Clin Oncol 15 Suppl 1, 307-312.



65. HALIOTIS, T., J. K. BALL, D. DEXTER u. J. C. RODER (1985):
Spontaneous and induced primary oncogenesis in natural killer (NK)-cell-deficient beige mutant mice.
Int J Cancer 35, 505-513.
66. SMYTH, M. J. (2008):
NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma.
Int Immunol 20, 631.
67. SMYTH, M. J., K. Y. THIA, S. E. STREET, E. CRETNEY, J. A. TRAPANI, M. TANIGUCHI, T. KAWANO, S. B. PELIKAN, N. Y. CROWE u. D. I. GODFREY (2000):
Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells.
J Exp Med 191, 661-668.
68. MASSON, D. u. J. TSCHOPP (1985):
Isolation of a lytic, pore-forming protein (perforin) from cytolytic T-lymphocytes.
J Biol Chem 260, 9069-9072.
69. STREET, S. E., E. CRETNEY u. M. J. SMYTH (2001):
Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis.
Blood 97, 192-197.
70. KLIMP, A. H., E. G. DE VRIES, G. L. SCHERPHOF u. T. DAEMEN (2002):
A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer.
Crit Rev Oncol Hematol 44, 143-161.
71. METCALF, D., C. G. BEGLEY, D. J. WILLIAMSON, E. C. NICE, J. DE LAMARTER, J. J. MERMED, D. THATCHER u. A. SCHMIDT (1987):
Hemopoietic responses in mice injected with purified recombinant murine GM-CSF.
Exp Hematol 15, 1-9.
72. GREEN, S. J., T. Y. CHEN, R. M. CRAWFORD, C. A. NACY, D. C. MORRISON u. M. S. MELTZER (1992):
Cytotoxic activity and production of toxic nitrogen oxides by macrophages treated with IFN-gamma and monoclonal antibodies against the 73-kDa lipopolysaccharide receptor.
J Immunol 149, 2069-2075.
73. ZHANG, L., A. KHAYAT, H. CHENG u. D. T. GRAVES (1997):
The pattern of monocyte recruitment in tumors is modulated by MCP-1 expression and influences the rate of tumor growth.
Lab Invest 76, 579-590.



74. SUNDERKOTTER, C., K. STEINBRINK, M. GOEBELER, R. BHARDWAJ u. C. SORG (1994):
Macrophages and angiogenesis.
J Leukoc Biol 55, 410-422.
75. MORGAN, D. A., F. W. RUSCETTI u. R. GALLO (1976):
Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows.
Science 193, 1007-1008.
76. SMITH, K. A. (1988):
Interleukin-2: inception, impact, and implications.
Science 240, 1169-1176.
77. GILLIS, S. u. K. A. SMITH (1977):
Long term culture of tumour-specific cytotoxic T cells.
Nature 268, 154-156.
78. GILLIS, S., P. E. BAKER, F. W. RUSCETTI u. K. A. SMITH (1978):
Long-term culture of human antigen-specific cytotoxic T-cell lines.
J Exp Med 148, 1093-1098.
79. NELSON, B. H. (2004):
IL-2, regulatory T cells, and tolerance.
J Immunol 172, 3983-3988.
80. ANTONY, P. A., C. M. PAULOS, M. AHMADZADEH, A. AKPINARLI, D. C. PALMER, N. SATO, A. KAISER, C. S. HINRICHS, C. A. KLEBANOFF, Y. TAGAYA u. N. P. RESTIFO (2006):
Interleukin-2-dependent mechanisms of tolerance and immunity in vivo.
J Immunol 176, 5255-5266.
81. CHO, J. H., O. BOYMAN, H. O. KIM, B. HAHM, M. P. RUBINSTEIN, C. RAMSEY, D. M. KIM, C. D. SURH u. J. SPRENT (2007):
An intense form of homeostatic proliferation of naive CD8+ cells driven by IL-2.
J Exp Med 204, 1787-1801.
82. KE, Y., H. MA u. J. A. KAPP (1998):
Antigen is required for the activation of effector activities, whereas interleukin 2 is required for the maintenance of memory in ovalbumin-specific, CD8+ cytotoxic T lymphocytes.
J Exp Med 187, 49-57.



83. BAMFORD, R. N., A. J. GRANT, J. D. BURTON, C. PETERS, G. KURYS, C. K. GOLDMAN, J. BRENNAN, E. ROESSLER u. T. A. WALDMANN (1994):
The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells.
Proc Natl Acad Sci U S A 91, 4940-4944.
84. SMITH, K. A., K. J. GILBRIDE u. M. F. FAVATA (1980):
Lymphocyte activating factor promotes T-cell growth factor production by cloned murine lymphoma cells.
Nature 287, 853-855.
85. BLATTMAN, J. N., J. M. GRAYSON, E. J. WHERRY, S. M. KAECH, K. A. SMITH u. R. AHMED (2003):
Therapeutic use of IL-2 to enhance antiviral T-cell responses in vivo.
Nat Med 9, 540-547.
86. GILLIS, S., P. J. CONLON, D. COSMAN, T. P. HOPP, S. K. DOWER, V. PRICE, D. Y. MOCHIZUKI u. D. L. URDAL (1986):
Lymphokines: from conjecture to the clinic.
Semin Oncol 13, 218-227.
87. WALDMANN, T. A. (1991):
The interleukin-2 receptor.
J Biol Chem 266, 2681-2684.
88. SCHWARTZ, R. H. (1996):
Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism?
J Exp Med 184, 1-8.
89. POWELL, J. D., J. A. RAGHEB, S. KITAGAWA-SAKAKIDA u. R. H. SCHWARTZ (1998):
Molecular regulation of interleukin-2 expression by CD28 co-stimulation and anergy.
Immunol Rev 165, 287-300.
90. KUNDIG, T. M., A. SHAHINIAN, K. KAWAI, H. W. MITTRUCKER, E. SEBZDA, M. F. BACHMANN, T. W. MAK u. P. S. OHASHI (1996):
Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells.
Immunity 5, 41-52.
91. CIVALLERO, M., S. BARNI, R. NANO u. E. CAPELLI (2000):
Dendritic cells and interleukin-2: cytochemical and ultrastructural study.
Histol Histopathol 15, 1077-1085.
92. LEONARD, E. J., A. SKEEL u. T. YOSHIMURA (1991):
Biological aspects of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1).
Adv Exp Med Biol 305, 57-64.



93. DAI, Z., A. ARAKELOV, M. WAGENER, B. T. KONIECZNY u. F. G. LAKKIS (1999):
The role of the common cytokine receptor gamma-chain in regulating IL-2-dependent, activation-induced CD8⁺ T cell death.
J Immunol 163, 3131-3137.
94. REFAELI, Y., L. VAN PARIJS, C. A. LONDON, J. TSCHOPP u. A. K. ABBAS (1998):
Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis.
Immunity 8, 615-623.
95. ZHENG, L., C. L. TRAGESER, D. M. WILLERFORD u. M. J. LENARDO (1998):
T cell growth cytokines cause the superinduction of molecules mediating antigen-induced T lymphocyte death.
J Immunol 160, 763-769.
96. MINAMI, Y., T. KONO, T. MIYAZAKI u. T. TANIGUCHI (1993):
The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes.
Annu Rev Immunol 11, 245-268.
97. GESBERT, F., M. DELESPINE-CARMAGNAT u. J. BERTOGLIO (1998):
Recent advances in the understanding of interleukin-2 signal transduction.
Journal of Clinical Immunology 18, 307-320.
98. VAN PARIJS, L., A. BIUCKIANS, A. IBRAGIMOV, F. W. ALT, D. M. WILLERFORD u. A. K. ABBAS (1997):
Functional responses and apoptosis of CD25 (IL-2R alpha)-deficient T cells expressing a transgenic antigen receptor.
J Immunol 158, 3738-3745.
99. KU, C. C., M. MURAKAMI, A. SAKAMOTO, J. KAPPLER u. P. MARRACK (2000):
Control of homeostasis of CD8⁺ memory T cells by opposing cytokines.
Science 288, 675-678.
100. KNEITZ, B., T. HERRMANN, S. YONEHARA u. A. SCHIMPL (1995):
Normal clonal expansion but impaired Fas-mediated cell death and anergy induction in interleukin-2-deficient mice.
Eur J Immunol 25, 2572-2577.
101. KHORUTS, A., A. MONDINO, K. A. PAPE, S. L. REINER u. M. K. JENKINS (1998):
A natural immunological adjuvant enhances T cell clonal expansion through a CD28-dependent, interleukin (IL)-2-independent mechanism.
J Exp Med 187, 225-236.



102. LAURENCE, A., C. M. TATO, T. S. DAVIDSON, Y. KANNO, Z. CHEN, Z. YAO, R. B. BLANK, F. MEYLAN, R. SIEGEL, L. HENNIGHAUSEN, E. M. SHEVACH u. J. O'SHEA J (2007):
Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation.
Immunity 26, 371-381.
103. KLEBB, G., I. B. AUTENRIETH, H. HABER, E. GILLERT, B. SADLACK, K. A. SMITH u. I. HORAK (1996):
Interleukin-2 is indispensable for development of immunological self-tolerance.
Clin Immunol Immunopathol 81, 282-286.
104. FONTENOT, J. D., J. P. RASMUSSEN, M. A. GAVIN u. A. Y. RUDENSKY (2005):
A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells.
Nat Immunol 6, 1142-1151.
105. D'CRUZ, L. M. u. L. KLEIN (2005):
Development and function of agonist-induced CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling.
Nat Immunol 6, 1152-1159.
106. PAPIERNIK, M., M. L. DE MORAES, C. PONTOUX, F. VASSEUR u. C. PENIT (1998):
Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency.
Int Immunol 10, 371-378.
107. SUZUKI, H., T. M. KUNDIG, C. FURLONGER, A. WAKEHAM, E. TIMMS, T. MATSUYAMA, R. SCHMITS, J. J. SIMARD, P. S. OHASHI, H. GRIESSER u. ET AL. (1995):
Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta.
Science 268, 1472-1476.
108. WOLF, M., A. SCHIMPL u. T. HUNIG (2001):
Control of T cell hyperactivation in IL-2-deficient mice by CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁻⁾ and CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ T cells: evidence for two distinct regulatory mechanisms.
Eur J Immunol 31, 1637-1645.
109. ATKINS, M. B., M. T. LOTZE, J. P. DUTCHER, R. I. FISHER, G. WEISS, K. MARGOLIN, J. ABRAMS, M. SZNOL, D. PARKINSON, M. HAWKINS, C. PARADISE, L. KUNKEL u. S. A. ROSENBERG (1999):
High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993.
J Clin Oncol 17, 2105-2116.



110. SMITH, F. O., S. G. DOWNEY, J. A. KLAPPER, J. C. YANG, R. M. SHERRY, R. E. ROYAL, U. S. KAMMULA, M. S. HUGHES, N. P. RESTIFO u. C. L. LEVY (2008):
Treatment of metastatic melanoma using interleukin-2 alone or in conjunction with vaccines.
Clinical Cancer Research 14, 5610-5618.
111. KLAPPER, J. A., S. G. DOWNEY, F. O. SMITH, J. C. YANG, M. S. HUGHES, U. S. KAMMULA, R. M. SHERRY, R. E. ROYAL, S. M. STEINBERG u. S. ROSENBERG (2008):
High-dose interleukin-2 for the treatment of metastatic renal cell carcinoma : a retrospective analysis of response and survival in patients treated in the surgery branch at the National Cancer Institute between 1986 and 2006.
Cancer 113, 293-301.
112. BOYMAN, O., C. D. SURH u. J. SPRENT (2006):
Potential use of IL-2/anti-IL-2 antibody immune complexes for the treatment of cancer and autoimmune disease.
113. MCDERMOTT, D. F. u. M. B. ATKINS (2004):
Application of IL-2 and other cytokines in renal cancer.
Expert Opin Biol Ther 4, 455-468.
114. OKADA, H. u. N. KUWASHIMA (2002):
Gene therapy and biologic therapy with interleukin-4.
Curr Gene Ther 2, 437-450.
115. NELMS, K., A. D. KEEGAN, J. ZAMORANO, J. J. RYAN u. W. E. PAUL (1999):
The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions.
Annu Rev Immunol 17, 701-738.
116. MURPHY, K. P., P. TRAVERS, M. WALPORT u. C. JANEWAY (2009):
Immunologie.
Spektrum Akad. Verlag,
117. MARONE, G., G. FLORIO, M. TRIGGIANI, A. PETRAROLI u. A. DE PAULIS (2000):
Mechanisms of IgE elevation in HIV-1 infection.
Crit Rev Immunol 20, 477-496.
118. WURSTER, A. L., V. L. RODGERS, M. F. WHITE, T. L. ROTHSTEIN u. M. J. GRUSBY (2002):
Interleukin-4-mediated protection of primary B cells from apoptosis through Stat6-dependent up-regulation of Bcl-xL.
J Biol Chem 277, 27169-27175.



119. CAREY, G. B., E. SEMENOVA, X. QI u. A. D. KEEGAN (2007):
IL-4 protects the B-cell lymphoma cell line CH31 from anti-IgM-induced growth arrest and apoptosis: contribution of the PI-3 kinase/AKT pathway.
Cell Res 17, 942-955.
120. NAKANISHI, K., K. MATSUI, S. KASHIWAMURA, Y. NISHIOKA, J. NOMURA, Y. NISHIMURA, N. SAKAGUCHI, S. YONEHARA, K. HIGASHINO u. S. SHINKA (1996):
IL-4 and anti-CD40 protect against Fas-mediated B cell apoptosis and induce B cell growth and differentiation.
Int Immunol 8, 791-798.
121. TAMADA, K., M. HARADA, K. ABE, T. LI u. K. NOMOTO (1998):
IL-4-producing NK1.1+ T cells are resistant to glucocorticoid-induced apoptosis: implications for the Th1/Th2 balance.
J Immunol 161, 1239-1247.
122. SHURIN, M. R., L. LU, P. KALINSKI, A. M. STEWART-AKERS u. M. T. LOTZE (1999):
Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy.
In: Springer Semin Immunopathol, 339-359.
123. STREMMEL, C., E. GREENFIELD, E. HOWARD, G. FREEMAN u. V. KUCHROO (1999):
B7-2 expressed on EL4 lymphoma suppresses antitumor immunity by an interleukin 4-dependent mechanism.
J Exp Med 189, 919-930.
124. KEMP, R. A. u. F. RONCHESE (2001):
Tumor-specific Tc1, but not Tc2, cells deliver protective antitumor immunity.
The Journal of Immunology 167, 6497-6502.
125. KOBAYASHI, M., H. KOBAYASHI, R. B. POLLARD u. F. SUZUKI (1998):
A pathogenic role of Th2 cells and their cytokine products on the pulmonary metastasis of murine B16 melanoma.
The Journal of Immunology 160, 5869-5873.
126. ERARD, F., M.-T. WILD, J. A. GARCIA-SANZ u. G. LE GROS (1993):
Switch of CD8 T cells to noncytolytic CD8-CD4-cells that make TH2 cytokines and help B cells.
Science 260, 1802-1805.
127. KIENZLE, N., K. BUTTIGIEG, P. GROVES, T. KAWULA u. A. KELSO (2002):
A clonal culture system demonstrates that IL-4 induces a subpopulation of noncytolytic T cells with low CD8, perforin, and granzyme expression.
The Journal of Immunology 168, 1672-1681.



128. KIENZLE, N., S. OLVER, K. BUTTIGIEG, P. GROVES, M. L. JANAS, A. BAZ u. A. KELSO (2005):
Progressive differentiation and commitment of CD8⁺ T cells to a poorly cytolytic CD8^{low} phenotype in the presence of IL-4.
The Journal of Immunology 174, 2021-2029.
129. TODARO, M., M. ZERILLI, L. RICCI-VITIANI, M. BINI, M. P. ALEA, A. M. FLORENA, L. MICELI, G. CONDORELLI, S. BONVENTRE u. G. DI GESÙ (2006):
Autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10 is required for survival and growth of thyroid cancer cells.
Cancer Res 66, 1491-1499.
130. STASSI, G., M. TODARO, M. ZERILLI, L. RICCI-VITIANI, D. DI LIBERTO, M. PATTI, A. FLORENA, F. DI GAUDIO, G. DI GESÙ u. R. DE MARIA (2003):
Thyroid cancer resistance to chemotherapeutic drugs via autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10.
Cancer Res 63, 6784-6790.
131. CONTICELLO, C., F. PEDINI, A. ZEUNER, M. PATTI, M. ZERILLI, G. STASSI, A. MESSINA, C. PESCHLE u. R. DE MARIA (2004):
IL-4 protects tumor cells from anti-CD95 and chemotherapeutic agents via up-regulation of antiapoptotic proteins.
The Journal of Immunology 172, 5467-5477.
132. FIORENTINO, D. F., M. W. BOND u. T. R. MOSMANN (1989):
Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones.
J Exp Med 170, 2081-2095.
133. DE WAAL MALEFYT, R., J. ABRAMS, B. BENNETT, C. G. FIGDOR u. J. E. DE VRIES (1991):
Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes.
J Exp Med 174, 1209-1220.
134. SPITS, H. u. R. DE WAAL MALEFYT (1992):
Functional characterization of human IL-10.
Int Arch Allergy Immunol 99, 8-15.
135. PISTOIA, V. (1997):
Production of cytokines by human B cells in health and disease.
Immunol Today 18, 343-350.
136. NAKAJIMA, H., G. J. GLEICH u. H. KITA (1996):
Constitutive production of IL-4 and IL-10 and stimulated production of IL-8 by normal peripheral blood eosinophils.
J Immunol 156, 4859-4866.



137. LIN, T. J. u. A. D. BEFUS (1997):
Differential regulation of mast cell function by IL-10 and stem cell factor.
J Immunol 159, 4015-4023.
138. ENK, A. H. u. S. I. KATZ (1992):
Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10.
J Immunol 149, 92-95.
139. TEUNISSEN, M. B., C. W. KOOMEN, J. JANSEN, R. DE WAAL MALEFYT, E. SCHMITT, R. M. VAN DEN WIJNGAARD, P. K. DAS u. J. D. BOS (1997):
In contrast to their murine counterparts, normal human keratinocytes and human epidermoid cell lines A431 and HaCaT fail to express IL-10 mRNA and protein.
Clin Exp Immunol 107, 213-223.
140. FIORENTINO, D. F., A. ZLOTNIK, P. VIEIRA, T. R. MOSMANN, M. HOWARD, K. W. MOORE u. A. O'GARRA (1991):
IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells.
J Immunol 146, 3444-3451.
141. D'ANDREA, A., M. ASTE-AMEZAGA, N. M. VALIANTE, X. MA, M. KUBIN u. G. TRINCHIERI (1993):
Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells.
J Exp Med 178, 1041-1048.
142. DE WAAL MALEFYT, R., J. HAANEN, H. SPITS, M. G. RONCAROLO, A. TE VELDE, C. FIGDOR, K. JOHNSON, R. KASTELEIN, H. YSSEL u. J. E. DE VRIES (1991):
Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression.
J Exp Med 174, 915-924.
143. FIORENTINO, D. F., A. ZLOTNIK, T. R. MOSMANN, M. HOWARD u. A. O'GARRA (1991):
IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages.
J Immunol 147, 3815-3822.
144. CHERNOFF, A. E., E. V. GRANOWITZ, L. SHAPIRO, E. VANNIER, G. LONNEMANN, J. B. ANGEL, J. S. KENNEDY, A. R. RABSON, S. M. WOLFF u. C. A. DINARELLO (1995):
A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. Inhibition of inflammatory cytokine production and immune responses.
J Immunol 154, 5492-5499.



145. ENK, A. H., V. L. ANGELONI, M. C. UDEY u. S. I. KATZ (1993):
Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance.
J Immunol 151, 2390-2398.
146. MITRA, R. S., T. A. JUDGE, F. O. NESTLE, L. A. TURKA u. B. J. NICKOLOFF (1995):
Psoriatic skin-derived dendritic cell function is inhibited by exogenous IL-10. Differential modulation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression.
J Immunol 154, 2668-2677.
147. JENKINS, J. K., M. MALYAK u. W. P. AREND (1994):
The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils.
Lymphokine Cytokine Res 13, 47-54.
148. HART, P. H., E. K. HUNT, C. S. BONDER, C. J. WATSON u. J. J. FINLAY-JONES (1996):
Regulation of surface and soluble TNF receptor expression on human monocytes and synovial fluid macrophages by IL-4 and IL-10.
J Immunol 157, 3672-3680.
149. ASADULLAH, K., W. STERRY u. U. TREFZER (2002):
Cytokine therapy in dermatology.
Exp Dermatol 11, 97-106.
150. ITO, S., P. ANSARI, M. SAKATSUME, H. DICKENSHEETS, N. VAZQUEZ, R. P. DONNELLY, A. C. LARNER u. D. S. FINBLOOM (1999):
Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma-induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1.
Blood 93, 1456-1463.
151. YAMAOKA, K., T. OTSUKA, H. NIRO, H. NAKASHIMA, Y. TANAKA, S. NAGANO, E. OGAMI, Y. NIHO, N. HAMASAKI u. K. IZUHARA (1999):
Selective DNA-binding activity of interleukin-10-stimulated STAT molecules in human monocytes.
J Interferon Cytokine Res 19, 679-685.
152. MOORE, K. W., R. DE WAAL MALEFYT, R. L. COFFMAN u. A. O'GARRA (2001):
Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor.
Annu Rev Immunol 19, 683-765.



153. ICHIKAWA, T., K. NAKAO, K. NAKATA, M. YAMASHITA, K. HAMASAKI, M. SHIGENO, S. ABIRU, H. ISHIKAWA, N. ISHII u. K. EGUCHI (2002):
Involvement of IL-1beta and IL-10 in IFN-alpha-mediated antiviral gene induction in human hepatoma cells.
Biochem Biophys Res Commun 294, 414-422.
154. CARSON, W. E., M. J. LINDEMANN, R. BAIOCCHI, M. LINETT, J. C. TAN, C. C. CHOU, S. NARULA u. M. A. CALIGIURI (1995):
The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells.
Blood 85, 3577-3585.
155. THOMPSON-SNIPES, L., V. DHAR, M. W. BOND, T. R. MOSMANN, K. W. MOORE u. D. M. RENNICK (1991):
Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors.
J Exp Med 173, 507-510.
156. KRUGER-KRASAGAKES, S., K. KRASAGAKIS, C. GARBE, E. SCHMITT, C. HULS, T. BLANKENSTEIN u. T. DIAMANTSTEIN (1994):
Expression of interleukin 10 in human melanoma.
Br J Cancer 70, 1182-1185.
157. DUMMER, W., B. C. BASTIAN, N. ERNST, C. SCHANZLE, A. SCHWAAF u. E. B. BROCKER (1996):
Interleukin-10 production in malignant melanoma: preferential detection of IL-10-secreting tumor cells in metastatic lesions.
Int J Cancer 66, 607-610.
158. YUE, F. Y., R. DUMMER, R. GEERTSEN, G. HOFBAUER, E. LAINE, S. MANOLIO u. G. BURG (1997):
Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules.
Int J Cancer 71, 630-637.
159. KOBAYASHI, M., L. FITZ, M. RYAN, R. M. HEWICK, S. C. CLARK, S. CHAN, R. LOUDON, F. SHERMAN, B. PERUSSIA u. G. TRINCHIERI (1989):
Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes.
J Exp Med 170, 827-845.
160. D'ANDREA, A., M. RENGARAJU, N. M. VALIANTE, J. CHEHIMI, M. KUBIN, M. ASTE, S. H. CHAN, M. KOBAYASHI, D. YOUNG, E. NICKBARG u. ET AL. (1992):
Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells.
J Exp Med 176, 1387-1398.



161. MACATONIA, S. E., N. A. HOSKEN, M. LITTON, P. VIEIRA, C. S. HSIEH, J. A. CULPEPPER, M. WYSOCKA, G. TRINCHIERI, K. M. MURPHY u. A. O'GARRA (1995):
Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells.
J Immunol 154, 5071-5079.
162. MA, X. u. G. TRINCHIERI (2001):
Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells.
Adv Immunol 79, 55-92.
163. COLOMBO, M. P. u. G. TRINCHIERI (2002):
Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy.
Cytokine Growth Factor Rev 13, 155-168.
164. STERN, A. S., F. J. PODLASKI, J. D. HULMES, Y. C. PAN, P. M. QUINN, A. G. WOLITZKY, P. C. FAMILLETTI, D. L. STREMLO, T. TRUITT, R. CHIZZONITE u. ET AL. (1990):
Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells.
Proc Natl Acad Sci U S A 87, 6808-6812.
165. PERUSSIA, B., S. H. CHAN, A. D'ANDREA, K. TSUJI, D. SANTOLI, M. POSPISIL, D. YOUNG, S. F. WOLF u. G. TRINCHIERI (1992):
Natural killer (NK) cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on the proliferation of TCR-alpha beta+, TCR-gamma delta+ T lymphocytes, and NK cells.
The Journal of Immunology 149, 3495-3502.
166. ASTE-AMEZAGA, M., X. MA, A. SARTORI u. G. TRINCHIERI (1998):
Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10.
J Immunol 160, 5936-5944.
167. ADACHI, O., T. KAWAI, K. TAKEDA, M. MATSUMOTO, H. TSUTSUI, M. SAKAGAMI, K. NAKANISHI u. S. AKIRA (1998):
Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function.
Immunity 9, 143-150.
168. ALEXOPOULOU, L., A. C. HOLT, R. MEDZHITOV u. R. A. FLAVELL (2001):
Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3.
Nature 413, 732-738.
169. BRAUN, M. C. u. B. L. KELSALL (2001):
Regulation of interleukin-12 production by G-protein-coupled receptors.
Microbes and Infection 3, 99-107.



170. PRESKY, D. H., H. YANG, L. J. MINETTI, A. O. CHUA, N. NABAVI, C.-Y. WU, M. K. GATELY u. U. GUBLER (1996):
A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two β -type cytokine receptor subunits.
Proceedings of the National Academy of Sciences 93, 14002-14007.
171. HSIEH, C., S. MACATONIA, C. TRIPP, S. WOLF, A. O'GARRA u. K. MURPHY (1993):
Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages.
Science 260, 547-549.
172. MANETTI, R., P. PARRONCHI, M. G. GIUDIZI, M. P. PICCINNI, E. MAGGI, G. TRINCHIERI u. S. ROMAGNANI (1993):
Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells.
J Exp Med 177, 1199-1204.
173. TRINCHIERI, G. (2003):
Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity.
Nat Rev Immunol 3, 133-146.
174. ROBERTSON, M. J. u. J. RITZ (1996):
Interleukin 12: Basic Biology and Potential Applications in Cancer Treatment.
Oncologist 1, 88-97.
175. ROMAGNANI, S. (1992):
Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response?
Immunol Today 13, 379-381.
176. SCOTT, P. (1993):
IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity.
Science 260, 496-497.
177. CESANO, A., S. VISONNEAU, S. C. CLARK u. D. SANTOLI (1993):
Cellular and molecular mechanisms of activation of MHC nonrestricted cytotoxic cells by IL-12.
J Immunol 151, 2943-2957.
178. SALCEDO, T. W., L. AZZONI, S. F. WOLF u. B. PERUSSIA (1993):
Modulation of perforin and granzyme messenger RNA expression in human natural killer cells.
J Immunol 151, 2511-2520.



179. ASTE-AMEZAGA, M., A. D'ANDREA, M. KUBIN u. G. TRINCHIERI (1994):
Cooperation of natural killer cell stimulatory factor/interleukin-12 with other stimuli in the induction of cytokines and cytotoxic cell-associated molecules in human T and NK cells.
Cell Immunol 156, 480-492.
180. ROBERTSON, M. J., R. J. SOIFFER, S. F. WOLF, T. J. MANLEY, C. DONAHUE, D. YOUNG, S. H. HERRMANN u. J. RITZ (1992):
Response of human natural killer (NK) cells to NK cell stimulatory factor (NKSF): cytolytic activity and proliferation of NK cells are differentially regulated by NKSF.
J Exp Med 175, 779-788.
181. RABINOWICH, H., R. B. HERBERMAN u. T. L. WHITESIDE (1993):
Differential effects of IL12 and IL2 on expression and function of cellular adhesion molecules on purified human natural killer cells.
Cell Immunol 152, 481-498.
182. TRINCHIERI, G. (1993):
Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells.
Immunol Today 14, 335-338.
183. YUE, F. Y., R. GEERTSEN, S. HEMMI, G. BURG, J. PAVLOVIC, E. LAINE u. R. DUMMER (1999):
IL-12 directly up-regulates the expression of HLA class I, HLA class II and ICAM-1 on human melanoma cells: a mechanism for its antitumor activity?
Eur J Immunol 29, 1762-1773.
184. VOEST, E. E., B. M. KENYON, M. S. O'REILLY, G. TRUITT, R. J. D'AMATO u. J. FOLKMAN (1995):
Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12.
J Natl Cancer Inst 87, 581-586.
185. COUGHLIN, C. M., K. E. SALHANY, M. WYSOCKA, E. ARUGA, H. KURZAWA, A. E. CHANG, C. A. HUNTER, J. C. FOX, G. TRINCHIERI u. W. M. LEE (1998):
Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis.
J Clin Invest 101, 1441-1452.
186. YAO, L., S. E. PIKE, J. SETSUDA, J. PAREKH, G. GUPTA, M. RAFFELD, E. S. JAFFE u. G. TOSATO (2000):
Effective targeting of tumor vasculature by the angiogenesis inhibitors vasostatin and interleukin-12.
Blood 96, 1900-1905.



187. HEINZERLING, L., R. DUMMER, J. PAVLOVIC, J. SCHULTZ, G. BURG u. K. MOELLING (2002):
Tumor regression of human and murine melanoma after intratumoral injection of IL-12-encoding plasmid DNA in mice.
Exp Dermatol 11, 232-240.
188. GEE, M. S., H. M. SAUNDERS, J. C. LEE, J. F. SANZO, W. T. JENKINS, S. M. EVANS, G. TRINCHIERI, C. M. SEHGAL, M. D. FELDMAN u. W. M. F. LEE (2001):
Doppler Ultrasound Imaging Detects Changes in Tumor Perfusion during Antivascular Therapy Associated with Vascular Anatomic Alterations.
Cancer Res 61, 2974-2982.
189. BRUNDA, M. J., L. LUISTRO, R. R. WARRIER, R. B. WRIGHT, B. R. HUBBARD, M. MURPHY, S. F. WOLF u. M. K. GATELY (1993):
Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors.
J Exp Med 178, 1223-1230.
190. BRUNDA, M. J. u. M. K. GATELY (1995):
Interleukin-12: potential role in cancer therapy.
Important Adv Oncol 3-18.
191. NASTALA, C. L., H. D. EDINGTON, T. G. MCKINNEY, H. TAHARA, M. A. NALESNIK, M. J. BRUNDA, M. K. GATELY, S. F. WOLF, R. D. SCHREIBER, W. J. STORKUS u. ET AL. (1994):
Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production.
J Immunol 153, 1697-1706.
192. MU, J., J. P. ZOU, N. YAMAMOTO, T. TSUTSUI, X. G. TAI, M. KOBAYASHI, S. HERRMANN, H. FUJIWARA u. T. HAMAOKA (1995):
Administration of recombinant interleukin 12 prevents outgrowth of tumor cells metastasizing spontaneously to lung and lymph nodes.
Cancer Res 55, 4404-4408.
193. ZOU, J. P., N. YAMAMOTO, T. FUJII, H. TAKENAKA, M. KOBAYASHI, S. H. HERRMANN, S. F. WOLF, H. FUJIWARA u. T. HAMAOKA (1995):
Systemic administration of rIL-12 induces complete tumor regression and protective immunity: response is correlated with a striking reversal of suppressed IFN-gamma production by anti-tumor T cells.
Int Immunol 7, 1135-1145.
194. FALLARINO, F., C. UYTENHOVE, T. BOON u. T. F. GAJEWSKI (1996):
Endogenous IL-12 is necessary for rejection of P815 tumor variants in vivo.
The Journal of Immunology 156, 1095-1100.



195. NOGUCHI, Y., A. JUNGBLUTH, E. C. RICHARDS u. L. J. OLD (1996):
Effect of interleukin 12 on tumor induction by 3-methylcholanthrene.
Proc Natl Acad Sci U S A 93, 11798-11801.
196. SCHULTZ, J., L. HEINZERLING, J. PAVLOVIC u. K. MOELLING (2000):
Induction of long-lasting cytokine effect by injection of IL-12 encoding plasmid DNA.
Cancer Gene Ther 7, 1557-1565.
197. SCHULTZ, J., J. PAVLOVIC, B. STRACK, M. NAWRATH u. K. MOELLING (1999):
Long-lasting anti-metastatic efficiency of interleukin 12-encoding plasmid DNA.
Hum Gene Ther 10, 407-417.
198. BAJETTA, E., M. DEL VECCHIO, R. MORTARINI, R. NADEAU, A. RAKHIT, L. RIMASSA, C. FOWST, A. BORRI, A. ANICHINI u. G. PARMIANI (1998):
Pilot study of subcutaneous recombinant human interleukin 12 in metastatic melanoma.
Clin Cancer Res 4, 75-85.
199. MENDIRATTA, S. K., A. QUEZADA, M. MATAR, J. WANG, H. L. HEBEL, S. LONG, J. L. NORDSTROM u. F. PERICLE (1999):
Intratumoral delivery of IL-12 gene by polyvinyl polymeric vector system to murine renal and colon carcinoma results in potent antitumor immunity.
Gene Ther 6, 833-839.
200. WANG, C., M. E. QUEVEDO, B. J. LANNUTTI, K. B. GORDON, D. GUO, W. SUN u. A. S. PALLER (1999):
In vivo gene therapy with interleukin-12 inhibits primary vascular tumor growth and induces apoptosis in a mouse model.
J Invest Dermatol 112, 775-781.
201. RAKHMILEVICH, A. L., J. TURNER, M. J. FORD, D. MCCABE, W. H. SUN, P. M. SONDEL, K. GROTA u. N. S. YANG (1996):
Gene gun-mediated skin transfection with interleukin 12 gene results in regression of established primary and metastatic murine tumors.
Proceedings of the National Academy of Sciences 93, 6291-6296.
202. MAHVI, D. M., M. B. HENRY, M. R. ALBERTINI, S. WEBER, K. MEREDITH, H. SCHALCH, A. RAKHMILEVICH, J. HANK u. P. SONDEL (2007):
Intratumoral injection of IL-12 plasmid DNA--results of a phase I/IB clinical trial.
Cancer Gene Ther 14, 717-723.
203. HEINZERLING, L., K. FEIGE, S. RIEDER, M. K. AKENS, R. DUMMER, G. STRANZINGER u. K. MOELLING (2001):
Tumor regression induced by intratumoral injection of DNA coding for human interleukin 12 into melanoma metastases in gray horses.
J Mol Med (Berl) 78, 692-702.



204. MÜLLER, J. M. V., K. FEIGE, P. WUNDERLIN, A. HODL, M. L. MELI, M. SELTENHAMMER, P. GREY, L. NICOLSON, C. SCHELLING u. L. M. HEINZERLING (2011):
Double-blind placebo-controlled study with interleukin-18 and interleukin-12-encoding plasmid DNA shows antitumor effect in metastatic melanoma in gray horses.
J Immunother 34, 58-64.
205. DINARELLO, C. A. (1999):
Interleukin-18.
Methods 19, 121-132.
206. KOHNO, K., J. KATAOKA, T. OHTSUKI, Y. SUEMOTO, I. OKAMOTO, M. USUI, M. IKEDA u. M. KURIMOTO (1997):
IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12.
J Immunol 158, 1541-1550.
207. FANTUZZI, G., A. J. PUREN, M. W. HARDING, D. J. LIVINGSTON u. C. A. DINARELLO (1998):
Interleukin-18 regulation of interferon gamma production and cell proliferation as shown in interleukin-1beta-converting enzyme (caspase-1)-deficient mice.
Blood 91, 2118-2125.
208. DINARELLO, C. A., D. NOVICK, A. J. PUREN, G. FANTUZZI, L. SHAPIRO, H. MUHL, D. Y. YOON, L. L. REZNIKOV, S. H. KIM u. M. RUBINSTEIN (1998):
Overview of interleukin-18: more than an interferon-gamma inducing factor.
J Leukoc Biol 63, 658-664.
209. NETEA, M. G., B. J. KULLBERG, I. VERSCHUEREN u. J. W. VAN DER MEER (2000):
Interleukin-18 induces production of proinflammatory cytokines in mice: no intermediate role for the cytokines of the tumor necrosis factor family and interleukin-1beta.
Eur J Immunol 30, 3057-3060.
210. CONTI, B., J. W. JAHNG, C. TINTI, J. H. SON u. T. H. JOH (1997):
Induction of interferon-gamma inducing factor in the adrenal cortex.
J Biol Chem 272, 2035-2037.
211. MATSUI, K., T. YOSHIMOTO, H. TSUTSUI, Y. HYODO, N. HAYASHI, K. HIROISHI, N. KAWADA, H. OKAMURA, K. NAKANISHI u. K. HIGASHINO (1997):
Propionibacterium acnes treatment diminishes CD4+ NK1.1+ T cells but induces type I T cells in the liver by induction of IL-12 and IL-18 production from Kupffer cells.
J Immunol 159, 97-106.



212. STOLL, S., H. JONULEIT, E. SCHMITT, G. MULLER, H. YAMAUCHI, M. KURIMOTO, J. KNOP u. A. H. ENK (1998):
Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development.
Eur J Immunol 28, 3231-3239.
213. STOLL, S., G. MULLER, M. KURIMOTO, J. SALOGA, T. TANIMOTO, H. YAMAUCHI, H. OKAMURA, J. KNOP u. A. H. ENK (1997):
Production of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) messenger RNA and functional protein by murine keratinocytes.
J Immunol 159, 298-302.
214. UDAGAWA, N., N. J. HORWOOD, J. ELLIOTT, A. MACKAY, J. OWENS, H. OKAMURA, M. KURIMOTO, T. J. CHAMBERS, T. J. MARTIN u. M. T. GILLESPIE (1997):
Interleukin-18 (interferon-gamma-inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon-gamma to inhibit osteoclast formation.
J Exp Med 185, 1005-1012.
215. GRACIE, J. A., R. J. FORSEY, W. L. CHAN, A. GILMOUR, B. P. LEUNG, M. R. GREER, K. KENNEDY, R. CARTER, X. Q. WEI, D. XU, M. FIELD, A. FOULIS, F. Y. LIEW u. I. B. MCINNES (1999):
A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis.
J Clin Invest 104, 1393-1401.
216. PIZARRO, T. T., M. H. MICHIE, M. BENTZ, J. WORARATANADHARM, M. F. SMITH, JR., E. FOLEY, C. A. MOSKALUK, S. J. BICKSTON u. F. COMINELLI (1999):
IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells.
J Immunol 162, 6829-6835.
217. PRINZ, M. u. U. K. HANISCH (1999):
Murine microglial cells produce and respond to interleukin-18.
J Neurochem 72, 2215-2218.
218. LEUNG, B. P., S. CULSHAW, J. A. GRACIE, D. HUNTER, C. A. CANETTI, C. CAMPBELL, F. CUNHA, F. Y. LIEW u. I. B. MCINNES (2001):
A role for IL-18 in neutrophil activation.
J Immunol 167, 2879-2886.



219. HYODO, Y., K. MATSUI, N. HAYASHI, H. TSUTSUI, S. KASHIWAMURA, H. YAMAUCHI, K. HIROISHI, K. TAKEDA, Y. TAGAWA, Y. IWAKURA, N. KAYAGAKI, M. KURIMOTO, H. OKAMURA, T. HADA, H. YAGITA, S. AKIRA, K. NAKANISHI u. K. HIGASHINO (1999):
IL-18 up-regulates perforin-mediated NK activity without increasing perforin messenger RNA expression by binding to constitutively expressed IL-18 receptor.
J Immunol 162, 1662-1668.
220. GERDES, N., G. K. SUKHOVA, P. LIBBY, R. S. REYNOLDS, J. L. YOUNG u. U. SCHONBECK (2002):
Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for atherogenesis.
J Exp Med 195, 245-257.
221. DAO, T., K. OHASHI, T. KAYANO, M. KURIMOTO u. H. OKAMURA (1996):
Interferon-gamma-inducing factor, a novel cytokine, enhances Fas ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper 1 cells.
Cell Immunol 173, 230-235.
222. TSUTSUI, H., K. NAKANISHI, K. MATSUI, K. HIGASHINO, H. OKAMURA, Y. MIYAZAWA u. K. KANEDA (1996):
IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones.
J Immunol 157, 3967-3973.
223. HOSHINO, T., R. H. WILTROUT u. H. A. YOUNG (1999):
IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response.
J Immunol 162, 5070-5077.
224. HOSHINO, T., H. YAGITA, J. R. ORTALDO, R. H. WILTROUT u. H. A. YOUNG (2000):
In vivo administration of IL-18 can induce IgE production through Th2 cytokine induction and up-regulation of CD40 ligand (CD154) expression on CD4+ T cells.
Eur J Immunol 30, 1998-2006.
225. YOSHIMOTO, T., H. MIZUTANI, H. TSUTSUI, N. NOBEN-TRAUTH, K. YAMANAKA, M. TANAKA, S. IZUMI, H. OKAMURA, W. E. PAUL u. K. NAKANISHI (2000):
IL-18 induction of IgE: dependence on CD4+ T cells, IL-4 and STAT6.
Nat Immunol 1, 132-137.



226. XU, D., V. TRAJKOVIC, D. HUNTER, B. P. LEUNG, K. SCHULZ, J. A. GRACIE, I. B. MCINNES u. F. Y. LIEW (2000):
IL-18 induces the differentiation of Th1 or Th2 cells depending upon cytokine milieu and genetic background.
Eur J Immunol 30, 3147-3156.
227. CHANG, C. Y., J. LEE, E. Y. KIM, H. J. PARK, C. H. KWON, J. W. JOH u. S. J. KIM (2007):
Intratumoral delivery of IL-18 naked DNA induces T-cell activation and Th1 response in a mouse hepatic cancer model.
BMC Cancer 7, 87.
228. NAGAI, H., I. HARA, T. HORIKAWA, M. OKA, S. KAMIDONO u. M. ICHIHASHI (2002):
Gene transfer of secreted-type modified interleukin-18 gene to B16F10 melanoma cells suppresses in vivo tumor growth through inhibition of tumor vessel formation.
J Invest Dermatol 119, 541-548.
229. BARCHET, W., A. BLASIUS, M. CELLA u. M. COLONNA (2005):
Plasmacytoid dendritic cells: in search of their niche in immune responses.
Immunol Res 32, 75-83.
230. IKEDA, H., L. J. OLD u. R. D. SCHREIBER (2002):
The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting.
Cytokine Growth Factor Rev 13, 95-109.
231. FARRAR, M. A. u. R. D. SCHREIBER (1993):
The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor.
Annu Rev Immunol 11, 571-611.
232. BOEHM, U., T. KLAMP, M. GROOT u. J. C. HOWARD (1997):
Cellular responses to interferon-gamma.
Annu Rev Immunol 15, 749-795.
233. SHEEHAN, K. C., K. S. LAI, G. P. DUNN, A. T. BRUCE, M. S. DIAMOND, J. D. HEUTEL, C. DUNGO-ARTHUR, J. A. CARRERO, J. M. WHITE, P. J. HERTZOG u. R. D. SCHREIBER (2006):
Blocking monoclonal antibodies specific for mouse IFN-alpha/beta receptor subunit 1 (IFNAR-1) from mice immunized by in vivo hydrodynamic transfection.
J Interferon Cytokine Res 26, 804-819.
234. YANG, J., T. L. MURPHY, W. OUYANG u. K. M. MURPHY (1999):
Induction of interferon-gamma production in Th1 CD4+ T cells: evidence for two distinct pathways for promoter activation.
Eur J Immunol 29, 548-555.



235. BERENSON, L. S., N. OTA u. K. M. MURPHY (2004):
Issues in T-helper 1 development--resolved and unresolved.
Immunol Rev 202, 157-174.
236. BACH, E. A., M. AGUET u. R. D. SCHREIBER (1997):
The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling.
Annu Rev Immunol 15, 563-591.
237. PESTKA, S., C. D. KRAUSE u. M. R. WALTER (2004):
Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors.
Immunol Rev 202, 8-32.
238. MURPHY, K. M., W. OUYANG, J. D. FARRAR, J. YANG, S. RANGANATH, H. ASNAGLI, M. AFKARIAN u. T. L. MURPHY (2000):
Signaling and transcription in T helper development.
Annu Rev Immunol 18, 451-494.
239. MURPHY, T. L., M. G. CLEVELAND, P. KULESZA, J. MAGRAM u. K. M. MURPHY (1995):
Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF-kappa B half-site.
Mol Cell Biol 15, 5258-5267.
240. SZABO, S. J., N. G. JACOBSON, A. S. DIGHE, U. GUBLER u. K. M. MURPHY (1995):
Developmental commitment to the Th2 lineage by extinction of IL-12 signaling.
Immunity 2, 665-675.
241. GAJEWSKI, T. F. u. F. W. FITCH (1990):
Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. IV. Murine CTL clones produce IL-3 and GM-CSF, the activity of which is masked by the inhibitory action of secreted IFN-gamma.
J Immunol 144, 548-556.
242. DUNN, G. P., L. J. OLD u. R. D. SCHREIBER (2004):
The three Es of cancer immunoediting.
Annu Rev Immunol 22, 329-360.
243. DUNN, G. P., C. M. KOEBEL u. R. D. SCHREIBER (2006):
Interferons, immunity and cancer immunoediting.
Nat Rev Immunol 6, 836-848.
244. BROMBERG, J. F., C. M. HORVATH, Z. WEN, R. D. SCHREIBER u. J. E. DARNELL, JR. (1996):
Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma.
Proc Natl Acad Sci U S A 93, 7673-7678.



245. CHIN, Y. E., M. KITAGAWA, W. C. SU, Z. H. YOU, Y. IWAMOTO u. X. Y. FU (1996):
Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1.
Science 272, 719-722.
246. LUSTER, A. D. u. P. LEDER (1993):
IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo.
J Exp Med 178, 1057-1065.
247. SCHRODER, K., P. J. HERTZOG, T. RAVASI u. D. A. HUME (2004):
Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions.
J Leukoc Biol 75, 163-189.
248. CHIN, Y. E., M. KITAGAWA, K. KUIDA, R. A. FLAVELL u. X. Y. FU (1997):
Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis.
Mol Cell Biol 17, 5328-5337.
249. XU, X., X. Y. FU, J. PLATE u. A. S. CHONG (1998):
IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression.
Cancer Res 58, 2832-2837.
250. MENG, R. D. u. W. S. EL-DEIRY (2001):
p53-independent upregulation of KILLER/DR5 TRAIL receptor expression by glucocorticoids and interferon-gamma.
Exp Cell Res 262, 154-169.
251. TAKEDA, K., M. J. SMYTH, E. CRETNEY, Y. HAYAKAWA, N. KAYAGAKI, H. YAGITA u. K. OKUMURA (2002):
Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development.
J Exp Med 195, 161-169.
252. WATANABE, Y., K. KURIBAYASHI, S. MIYATAKE, K. NISHIHARA, E. NAKAYAMA, T. TANIYAMA u. T. SAKATA (1989):
Exogenous expression of mouse interferon gamma cDNA in mouse neuroblastoma C1300 cells results in reduced tumorigenicity by augmented anti-tumor immunity.
Proceedings of the National Academy of Sciences 86, 9456-9460.
253. DIGHE, A. S., E. RICHARDS, L. J. OLD u. R. D. SCHREIBER (1994):
Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors.
Immunity 1, 447-456.



254. KAPLAN, D. H., V. SHANKARAN, A. S. DIGHE, E. STOCKERT, M. AGUET, L. J. OLD u. R. D. SCHREIBER (1998):
Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice.
Proc Natl Acad Sci U S A 95, 7556-7561.
255. ZLOTNIK, A. u. O. YOSHIE (2000):
Chemokines: a new classification system and their role in immunity.
Immunity 12, 121-127.
256. BENARAF, C., F. M. CUNNINGHAM, A. S. HAMBLIN, D. W. HOROHOV u. M. E. COLLINS (2000):
Cloning of equine chemokines eotaxin, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, MCP-2 and MCP-4, mRNA expression in tissues and induction by IL-4 in dermal fibroblasts.
Vet Immunol Immunopathol 76, 283-298.
257. BOTTAZZI, B., F. COLOTTA, A. SICA, N. NOBILI u. A. MANTOVANI (1990):
A chemoattractant expressed in human sarcoma cells (tumor-derived chemotactic factor, TDCF) is identical to monocyte chemoattractant protein-1/monocyte chemotactic and activating factor (MCP-1/MCAF).
Int J Cancer 45, 795-797.
258. UENO, T., M. TOI, H. SAJI, M. MUTA, H. BANDO, K. KUROI, M. KOIKE, H. INADERA u. K. MATSUSHIMA (2000):
Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer.
Clin Cancer Res 6, 3282-3289.
259. NEGUS, R. P., G. W. STAMP, J. HADLEY u. F. R. BALKWILL (1997):
Quantitative assessment of the leukocyte infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of C-C chemokines.
Am J Pathol 150, 1723-1734.
260. OHTA, M., Y. KITADAI, S. TANAKA, M. YOSHIHARA, W. YASUI, N. MUKAIDA, K. HARUMA u. K. CHAYAMA (2002):
Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human esophageal squamous cell carcinomas.
Int J Cancer 102, 220-224.
261. ZACHARIAE, C. O., A. O. ANDERSON, H. L. THOMPSON, E. APPELLA, A. MANTOVANI, J. J. OPPENHEIM u. K. MATSUSHIMA (1990):
Properties of monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) purified from a human fibrosarcoma cell line.
J Exp Med 171, 2177-2182.



262. FUENTES, M. E., S. K. DURHAM, M. R. SWERDEL, A. C. LEWIN, D. S. BARTON, J. R. MEGILL, R. BRAVO u. S. A. LIRA (1995):
Controlled recruitment of monocytes and macrophages to specific organs through transgenic expression of monocyte chemoattractant protein-1.
J Immunol 155, 5769-5776.
263. RUTLEDGE, B. J., H. RAYBURN, R. ROSENBERG, R. J. NORTH, R. P. GLADUE, C. L. CORLESS u. B. J. ROLLINS (1995):
High level monocyte chemoattractant protein-1 expression in transgenic mice increases their susceptibility to intracellular pathogens.
J Immunol 155, 4838-4843.
264. KRANKEL, N., K. KUSCHNERUS, P. MADEDDU, T. F. LUSCHER u. U. LANDMESSER (2011):
A novel flow cytometry-based assay to study leukocyte-endothelial cell interactions in vitro.
Cytometry A 79, 256-262.
265. HUANG, D. R., J. WANG, P. KIVISAKK, B. J. ROLLINS u. R. M. RANSOHOFF (2001):
Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis.
J Exp Med 193, 713-726.
266. KUZIEL, W. A., S. J. MORGAN, T. C. DAWSON, S. GRIFFIN, O. SMITHIES, K. LEY u. N. MAEDA (1997):
Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2.
Proc Natl Acad Sci U S A 94, 12053-12058.
267. KARPUS, W. J. u. K. J. KENNEDY (1997):
MIP-1alpha and MCP-1 differentially regulate acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis as well as Th1/Th2 lymphocyte differentiation.
J Leukoc Biol 62, 681-687.
268. LU, B., B. J. RUTLEDGE, L. GU, J. FIORILLO, N. W. LUKACS, S. L. KUNKEL, R. NORTH, C. GERARD u. B. J. ROLLINS (1998):
Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice.
J Exp Med 187, 601-608.
269. BORING, L., J. GOSLING, S. W. CHENSUE, S. L. KUNKEL, R. V. FARESE, JR., H. E. BROXMEYER u. I. F. CHARO (1997):
Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice.
J Clin Invest 100, 2552-2561.



270. ROLLINS, B. J. u. M. E. SUNDAY (1991):
Suppression of tumor formation in vivo by expression of the JE gene in malignant cells.
Mol Cell Biol 11, 3125-3131.
271. DRAGHICIU, O., M. WALCZAK, B. N. HOOGEBOOM, K. L. FRANKEN, K. J. MELIEF, H. W. NIJMAN u. T. DAEMEN (2013):
Therapeutic immunization and local low-dose tumor irradiation, a reinforcing combination.
Int J Cancer.
272. LEEK, R. D., C. E. LEWIS, R. WHITEHOUSE, M. GREENALL, J. CLARKE u. A. L. HARRIS (1996):
Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma.
Cancer Res 56, 4625-4629.
273. STEELE, R. J., O. EREMIN, M. BROWN u. R. A. HAWKINS (1984):
A high macrophage content in human breast cancer is not associated with favourable prognostic factors.
Br J Surg 71, 456-458.
274. WALTER, S., B. BOTTAZZI, D. GOVONI, F. COLOTTA u. A. MANTOVANI (1991):
Macrophage infiltration and growth of sarcoma clones expressing different amounts of monocyte chemotactic protein/JE.
Int J Cancer 49, 431-435.
275. SALCEDO, R., M. L. PONCE, H. A. YOUNG, K. WASSERMAN, J. M. WARD, H. K. KLEINMAN, J. J. OPPENHEIM u. W. J. MURPHY (2000):
Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression.
Blood 96, 34-40.
276. WEBER, K. S., P. J. NELSON, H. J. GRONE u. C. WEBER (1999):
Expression of CCR2 by endothelial cells : implications for MCP-1 mediated wound injury repair and In vivo inflammatory activation of endothelium.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 19, 2085-2093.
277. NESBIT, M., H. SCHAIDER, T. H. MILLER u. M. HERLYN (2001):
Low-level monocyte chemoattractant protein-1 stimulation of monocytes leads to tumor formation in nontumorigenic melanoma cells.
J Immunol 166, 6483-6490.



278. HASKILL, S., A. PEACE, J. MORRIS, S. A. SPORN, A. ANISOWICZ, S. W. LEE, T. SMITH, G. MARTIN, P. RALPH u. R. SAGER (1990):
Identification of three related human GRO genes encoding cytokine functions.
Proc Natl Acad Sci U S A 87, 7732-7736.
279. MUELLER, S. G., W. P. SCHRAW u. A. RICHMOND (1994):
Melanoma growth stimulatory activity enhances the phosphorylation of the class II interleukin-8 receptor in non-hematopoietic cells.
J Biol Chem 269, 1973-1980.
280. ADDISON, C. L., T. O. DANIEL, M. D. BURDICK, H. LIU, J. E. EHLERT, Y. Y. XUE, L. BUECHI, A. WALZ, A. RICHMOND u. R. M. STRIETER (2000):
The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity.
J Immunol 165, 5269-5277.
281. BAGGIOLINI, M., B. DEWALD u. B. MOSER (1994):
Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines.
Adv Immunol 55, 97-179.
282. LEE, J., G. CACALANO, T. CAMERATO, K. TOY, M. W. MOORE u. W. I. WOOD (1995):
Chemokine binding and activities mediated by the mouse IL-8 receptor.
J Immunol 155, 2158-2164.
283. KOHLER, A., K. DE FILIPPO, M. HASENBERG, C. VAN DEN BRANDT, E. NYE, M. P. HOSKING, T. E. LANE, L. MANN, R. M. RANSOHOFF, A. E. HAUSER, O. WINTER, B. SCHRAVEN, H. GEIGER, N. HOGG u. M. GUNZER (2011):
G-CSF-mediated thrombopoietin release triggers neutrophil motility and mobilization from bone marrow via induction of Cxcr2 ligands.
Blood 117, 4349-4357.
284. LUSTER, A. D. (1998):
Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation.
N Engl J Med 338, 436-445.
285. BELPERIO, J. A., M. P. KEANE, D. A. ARENBERG, C. L. ADDISON, J. E. EHLERT, M. D. BURDICK u. R. M. STRIETER (2000):
CXC chemokines in angiogenesis.
J Leukoc Biol 68, 1-8.
286. STRIETER, R. M., P. J. POLVERINI, S. L. KUNKEL, D. A. ARENBERG, M. D. BURDICK, J. KASPER, J. DZUIBA, J. VAN DAMME, A. WALZ, D. MARRIOTT u. ET AL. (1995):
The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis.
J Biol Chem 270, 27348-27357.



287. LUAN, J., R. SHATTUCK-BRANDT, H. HAGHNEGAHDAR, J. D. OWEN, R. STRIETER, M. BURDICK, C. NIRODI, D. BEAUCHAMP, K. N. JOHNSON u. A. RICHMOND (1997):
Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression.
J Leukoc Biol 62, 588-597.
288. OWEN, J. D., R. STRIETER, M. BURDICK, H. HAGHNEGAHDAR, L. NANNEY, R. SHATTUCK-BRANDT u. A. RICHMOND (1997):
Enhanced tumor-forming capacity for immortalized melanocytes expressing melanoma growth stimulatory activity/growth-regulated cytokine beta and gamma proteins.
Int J Cancer 73, 94-103.
289. NORGAUER, J., B. METZNER u. I. SCHRAUFSTATTER (1996):
Expression and growth-promoting function of the IL-8 receptor beta in human melanoma cells.
J Immunol 156, 1132-1137.
290. LAWSON, D. H., H. G. THOMAS, R. G. ROY, D. S. GORDON, R. K. CHAWLA, D. W. NIXON u. A. RICHMOND (1987):
Preparation of a monoclonal antibody to a melanoma growth-stimulatory activity released into serum-free culture medium by Hs0294 malignant melanoma cells.
J Cell Biochem 34, 169-185.
291. BAGGIOLINI, M., A. WALZ u. S. L. KUNKEL (1989):
Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils.
J Clin Invest 84, 1045-1049.
292. SCHRODER, J. M., U. MROWIETZ, E. MORITA u. E. CHRISTOPHERS (1987):
Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity.
J Immunol 139, 3474-3483.
293. SCHRODER, J. M., M. STICHERLING, H. H. HENNEICKE, W. C. PREISSNER u. E. CHRISTOPHERS (1990):
IL-1 alpha or tumor necrosis factor-alpha stimulate release of three NAP-1/IL-8-related neutrophil chemotactic proteins in human dermal fibroblasts.
J Immunol 144, 2223-2232.
294. WALZ, A., P. PEVERI, H. ASCHAUER u. M. BAGGIOLINI (1987):
Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes.
Biochem Biophys Res Commun 149, 755-761.



295. MATSUSHIMA, K., K. MORISHITA, T. YOSHIMURA, S. LAVU, Y. KOBAYASHI, W. LEW, E. APPELLA, H. F. KUNG, E. J. LEONARD u. J. J. OPPENHEIM (1988):
Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor.
J Exp Med 167, 1883-1893.
296. KULKE, R., E. BORNSCHEUER, C. SCHLUTER, J. BARTELS, J. ROWERT, M. STICHERLING u. E. CHRISTOPHERS (1998):
The CXC receptor 2 is overexpressed in psoriatic epidermis.
J Invest Dermatol 110, 90-94.
297. SINGH, R. K., M. GUTMAN, R. RADINSKY, C. D. BUCANA u. I. J. FIDLER (1994):
Expression of interleukin 8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice.
Cancer Res 54, 3242-3247.
298. MOHLER, T., C. SCHEIBENBOGEN, J. HAFELE, M. WILLHAUCK u. U. KEILHOLZ (1996):
Regulation of interleukin-8 mRNA expression and protein secretion in a melanoma cell line by tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma.
Melanoma Res 6, 307-311.
299. MUKAIDA, N. (2000):
Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation.
Int J Hematol 72, 391-398.
300. HOLMES, W. E., J. LEE, W. J. KUANG, G. C. RICE u. W. I. WOOD (1991):
Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor.
Science 253, 1278-1280.
301. MURPHY, P. M. u. H. L. TIFFANY (1991):
Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor.
Science 253, 1280-1283.
302. COLOMBO, M. P., C. MACCALLI, S. MATTEI, C. MELANI, M. RADRIZZANI u. G. PARMIANI (1992):
Expression of cytokine genes, including IL-6, in human malignant melanoma cell lines.
Melanoma Res 2, 181-189.



303. FÖRSTER, E., R. KIRNBAUER, A. URBANSKI, A. KÖCK, T. A. LUGER u. T. SCHWARZ (1991):
Human melanoma cells produce interleukin-8 which functions as an autocrine growth factor.
Arch Dermatol Res 283, 23.
304. WANG, J. M., G. TARABOLETTI, K. MATSUSHIMA, J. VAN DAMME u. A. MANTOVANI (1990):
Induction of haptotactic migration of melanoma cells by neutrophil activating protein/interleukin-8.
Biochem Biophys Res Commun 169, 165-170.
305. NOR, J. E., J. CHRISTENSEN, J. LIU, M. PETERS, D. J. MOONEY, R. M. STRIETER u. P. J. POLVERINI (2001):
Up-Regulation of Bcl-2 in microvascular endothelial cells enhances intratumoral angiogenesis and accelerates tumor growth.
Cancer Res 61, 2183-2188.
306. SCHRUEFER, R., N. LUTZE, J. SCHYMEINSKY u. B. WALZOG (2005):
Human neutrophils promote angiogenesis by a paracrine feedforward mechanism involving endothelial interleukin-8.
Am J Physiol Heart Circ Physiol 288, H1186-1192.
307. HEIDEMANN, J., H. OGAWA, M. B. DWINELL, P. RAFIEE, C. MAASER, H. R. GOCKEL, M. F. OTTERSON, D. M. OTA, N. LUGERING, W. DOMSCHKE u. D. G. BINION (2003):
Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2.
J Biol Chem 278, 8508-8515.
308. DYER, K. D., C. M. PERCOPO, E. R. FISCHER, S. J. GABRYSZEWSKI u. H. F. ROSENBERG (2009):
Pneumoviruses infect eosinophils and elicit MyD88-dependent release of chemoattractant cytokines and interleukin-6.
Blood 114, 2649-2656.
309. LUSTER, A. D. u. J. V. RAVETCH (1987):
Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10).
J Exp Med 166, 1084-1097.
310. LO, B. K., M. YU, D. ZLOTY, B. COWAN, J. SHAPIRO u. K. J. MCELWEE (2010):
CXCR3/ligands are significantly involved in the tumorigenesis of basal cell carcinomas.
Am J Pathol 176, 2435-2446.



311. LOETSCHER, M., B. GERBER, P. LOETSCHER, S. A. JONES, L. PIALI, I. CLARK-LEWIS, M. BAGGIOLINI u. B. MOSER (1996):
Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes.
J Exp Med 184, 963-969.
312. SALLUSTO, F., D. LENIG, C. R. MACKAY u. A. LANZAVECCHIA (1998):
Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes.
J Exp Med 187, 875-883.
313. NEVILLE, L. F., G. MATHIAK u. O. BAGASRA (1997):
The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10 kD (IP-10): a novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily.
Cytokine Growth Factor Rev 8, 207-219.
314. ANTONELLI, A., S. M. FERRARI, D. GIUGGIOLI, E. FERRANNINI, C. FERRI u. P. FALLAHI (2014):
Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL) 10 in autoimmune diseases.
Autoimmunity reviews 13, 272-280 %@ 1568-9972.
315. TAUB, D. D., A. R. LLOYD, K. CONLON, J. M. WANG, J. R. ORTALDO, A. HARADA, K. MATSUSHIMA, D. J. KELVIN u. J. J. OPPENHEIM (1993):
Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells.
J Exp Med 177, 1809-1814.
316. ANGIOLILLO, A. L., C. SGADARI, D. D. TAUB, F. LIAO, J. M. FARBER, S. MAHESHWARI, H. K. KLEINMAN, G. H. REAMAN u. G. TOSATO (1995):
Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo.
J Exp Med 182, 155-162.
317. YANG, J. u. A. RICHMOND (2004):
The angiostatic activity of interferon-inducible protein-10/CXCL10 in human melanoma depends on binding to CXCR3 but not to glycosaminoglycan.
Mol Ther 9, 846-855.
318. FELDMAN, A. L., J. FRIEDL, T. E. LANS, S. K. LIBUTTI, D. LORANG, M. S. MILLER, E. M. TURNER, S. M. HEWITT u. H. R. ALEXANDER (2002):
Retroviral gene transfer of interferon-inducible protein 10 inhibits growth of human melanoma xenografts.
Int J Cancer 99, 149-153.



319. ARENBERG, D. A., S. L. KUNKEL, P. J. POLVERINI, S. B. MORRIS, M. D. BURDICK, M. C. GLASS, D. T. TAUB, M. D. IANNETTONI, R. I. WHYTE u. R. M. STRIETER (1996):
Interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10) is an angiostatic factor that inhibits human non-small cell lung cancer (NSCLC) tumorigenesis and spontaneous metastases.
J Exp Med 184, 981-992.
320. ALGARRA, I., T. CABRERA u. F. GARRIDO (2000):
The HLA crossroad in tumor immunology.
Hum Immunol 61, 65-73.
321. MARINCOLA, F. M., E. M. JAFFEE, D. J. HICKLIN u. S. FERRONE (2000):
Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance.
Adv Immunol 74, 181-273.
322. SELIGER, B., M. J. MAEURER u. S. FERRONE (2000):
Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth.
Immunol Today 21, 455-464.
323. BUBENIK, J. (2004):
MHC class I down-regulation: tumour escape from immune surveillance? (review).
Int J Oncol 25, 487-491.
324. LEHMANN, C., M. ZEIS, N. SCHMITZ u. L. UHAREK (2000):
Impaired binding of perforin on the surface of tumor cells is a cause of target cell resistance against cytotoxic effector cells.
Blood 96, 594-600.
325. REAL, L. M., P. JIMENEZ, A. KIRKIN, A. SERRANO, A. GARCIA, J. CANTON, J. ZEUTHEN, F. GARRIDO u. F. RUIZ-CABELLO (2001):
Multiple mechanisms of immune evasion can coexist in melanoma tumor cell lines derived from the same patient.
Cancer Immunol Immunother 49, 621-628.
326. SHIN, M. S., H. S. KIM, S. H. LEE, W. S. PARK, S. Y. KIM, J. Y. PARK, J. H. LEE, S. K. LEE, S. N. LEE, S. S. JUNG, J. Y. HAN, H. KIM, J. Y. LEE u. N. J. YOO (2001):
Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers.
Cancer Res 61, 4942-4946.
327. ZHANG, X. M. u. Q. XU (2001):
Metastatic melanoma cells escape from immunosurveillance through the novel mechanism of releasing nitric oxide to induce dysfunction of immunocytes.
Melanoma Res 11, 559-567.



328. BECK, C., H. SCHREIBER u. D. ROWLEY (2001):
Role of TGF-beta in immune-evasion of cancer.
Microsc Res Tech 52, 387-395.
329. KAWAMURA, K., R. BAHAR, W. NATSUME, S. SAKIYAMA u. M. TAGAWA (2002):
Secretion of interleukin-10 from murine colon carcinoma cells suppresses systemic antitumor immunity and impairs protective immunity induced against the tumors.
Cancer Gene Ther 9, 109-115.
330. CURIEL, T. J. (2007):
Tregs and rethinking cancer immunotherapy.
J Clin Invest 117, 1167-1174.
331. COLLISON, L. W., C. J. WORKMAN, T. T. KUO, K. BOYD, Y. WANG, K. M. VIGNALI, R. CROSS, D. SEHY, R. S. BLUMBERG u. D. A. VIGNALI (2007):
The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function.
Nature 450, 566-569.
332. UYTENHOVE, C., L. PILOTTE, I. THEATE, V. STROOBANT, D. COLAU, N. PARMENTIER, T. BOON u. B. J. VAN DEN EYNDE (2003):
Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase.
Nat Med 9, 1269-1274.
333. MUNN, D. H. u. A. L. MELLOR (2007):
Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance.
J Clin Invest 117, 1147-1154.
334. KOWALCZYK, D. W. (2002):
Tumors and the danger model.
Acta Biochim Pol 49, 295-302.
335. RYSCHICH, E., J. SCHMIDT, G. J. HAMMERLING, E. KLAR u. R. GANSS (2002):
Transformation of the microvascular system during multistage tumorigenesis.
Int J Cancer 97, 719-725.
336. PILSWORTH, R. C. u. D. KNOTTENBELT (2006):
Melanoma.
Equine Veterinary Education 18, 228-230.
337. ROWE, E. L. u. K. E. SULLINS (2004):
Excision as treatment of dermal melanomatosis in horses: 11 cases (1994-2000).
J Am Vet Med Assoc 225, 94-96.



338. THEON, A. P., W. D. WILSON, K. G. MAGDESIAN, N. PUSTERLA, J. R. SNYDER u. L. D. GALUPPO (2007):
Long-term outcome associated with intratumoral chemotherapy with cisplatin for cutaneous tumors in equidae: 573 cases (1995-2004).
J Am Vet Med Assoc 230, 1506-1513.
339. SPUGNINI, E. P., G. L. D'ALTERIO, I. DOTSINSKY, T. MUDROV, E. DRAGONETTI, R. MURACE, G. CITRO u. A. BALDI (2011):
Electrochemotherapy for the Treatment of Multiple Melanomas in a Horse.
J Equine Vet Sci 31, 430-433.
340. HEWES, C. A. u. K. E. SULLINS (2006):
Use of cisplatin-containing biodegradable beads for treatment of cutaneous neoplasia in equidae: 59 cases (2000-2004).
J Am Vet Med Assoc 229, 1617-1622.
341. BURNET, F. M. (1967):
Immunological aspects of malignant disease.
Lancet 1, 1171-1174.
342. EHRLICH, P. (1909):
Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung.
Ned. Tijdschr. Geneeskd
343. CLARK, W. H., JR., D. E. ELDER, D. T. GUERRY, L. E. BRAITMAN, B. J. TROCK, D. SCHULTZ, M. SYNNESTVEDT u. A. C. HALPERN (1989):
Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression.
J Natl Cancer Inst 81, 1893-1904.
344. CLEMENTE, C. G., M. C. MIHM, JR., R. BUFALINO, S. ZURRIDA, P. COLLINI u. N. CASCINELLI (1996):
Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma.
Cancer 77, 1303-1310.
345. NATHANSON (1976):
Spontaneous regression of malignant melanoma: a review of the literature on incidence, clinical features, and possible mechanisms.
Natl Cancer Inst Monogr 44, 67-76.
346. FERRADINI, L., A. MACKENSEN, C. GENEVEE, J. BOSQ, P. DUVILLARD, M. F. AVRIL u. T. HERCEND (1993):
Analysis of T cell receptor variability in tumor-infiltrating lymphocytes from a human regressive melanoma. Evidence for in situ T cell clonal expansion.
J Clin Invest 91, 1183-1190.



347. PENN, I. (1988):
Tumors of the immunocompromised patient.
Annu Rev Med 39, 63-73.
348. BIRKELAND, S. A., H. H. STORM, L. U. LAMM, L. BARLOW, I. BLOHME, B. FORSBERG, B. EKLUND, O. FJELDBORG, M. FRIEDBERG, L. FRODIN u. ET AL. (1995):
Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986.
Int J Cancer 60, 183-189.
349. MA, X., J. M. CHOW, G. GRI, G. CARRA, F. GEROSA, S. F. WOLF, R. DZIALO u. G. TRINCHIERI (1996):
The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells.
J Exp Med 183, 147-157.
350. SHEIL, A. G., A. P. DISNEY, T. H. MATHEW, B. E. LIVINGSTON u. A. M. KEOGH (1997):
Lymphoma incidence, cyclosporine, and the evolution and major impact of malignancy following organ transplantation.
Transplant Proc 29, 825-827.
351. DUNN, G. P., L. J. OLD u. R. D. SCHREIBER (2004):
The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting.
Immunity 21, 137-148.
352. IKEHARA, S., R. N. PAHWA, G. FERNANDES, C. T. HANSEN u. R. A. GOOD (1984):
Functional T cells in athymic nude mice.
Proc Natl Acad Sci U S A 81, 886-888.
353. BOASBERG, P. D., D. S. HOON, L. D. PIRO, M. A. MARTIN, A. FUJIMOTO, T. S. KRISTEDJA, S. BHACHU, X. YE, R. R. DECK u. S. J. O'DAY (2006):
Enhanced survival associated with vitiligo expression during maintenance biotherapy for metastatic melanoma.
J Invest Dermatol 126, 2658-2663.
354. RIBAS, A., L. H. BUTTERFIELD, J. A. GLASPY u. J. S. ECONOMOU (2003):
Current developments in cancer vaccines and cellular immunotherapy.
J Clin Oncol 21, 2415-2432.
355. KOBLUK, C. N., T. R. AMES u. R. J. GEOR (1995):
The horse: diseases and clinical management.
356. WARNICK, L., GRAHAM, ME, AND VALENTINE, BA (1995):
Evaluation of cimetidine treatment for melanomas in seven horses.
Equine Practice 17, 17-22.



357. ROCKLIN, R. u. A. HABEREK-DAVIDSON (1981):
Histamine activates suppressor cells *in vitro* using a coculture technique.
Journal of Clinical Immunology 1, 73-79.
358. OSBAND, M. E., D. HAMILTON, Y. J. SHEN, E. COHEN, M. SHLESINGER,
P. LAVIN, A. BROWN u. R. MCCAFFREY (1981):
Successful tumour immunotherapy with cimetidine in mice.
Lancet 1, 636-638.
359. LAUS, F., M. CERQUETELLA, E. PAGGI, G. IPPEDICO, M. ARGENTIERI, G.
CASTELLANO, A. SPATERNA u. B. TESEI (2010):
Evaluation of cimetidine as a therapy for dermal melanomatosis in grey horse.
Isr J Vet Med 65, 48-52.
360. LOTEM, M., A. MACHLENKIN, T. HAMBURGER, A. NISSAN, L. KADOURI,
S. FRANKENBURG, Z. GIMMON, O. ELIAS, I. B. DAVID, A. KUZNETZ, E. SHILONI
u. T. PERETZ (2009):
Autologous melanoma vaccine induces antitumor and self-reactive immune
responses that affect patient survival and depend on MHC class II expression on
vaccine cells.
Clin Cancer Res 15, 4968-4977.
361. BAARS, A., A. M. CLAESSEN, A. J. VAN DEN EERTWEGH, H. E. GALL, A.
G. STAM, S. MEIJER, G. GIACCONE, C. J. MEIJER, R. J. SCHEPER, J.
WAGSTAFF, J. B. VERMORKEN u. H. M. PINEDO (2000):
Skin tests predict survival after autologous tumor cell vaccination in metastatic
melanoma: experience in 81 patients.
Ann Oncol 11, 965-970.
362. LOTEM, M., T. PERETZ, O. DRIZE, Z. GIMMON, D. AD EL, R. WEITZEN, H.
GOLDBERG, I. BEN DAVID, D. PRUS, T. HAMBURGER u. E. SHILONI (2002):
Autologous cell vaccine as a post operative adjuvant treatment for high-risk
melanoma patients (AJCC stages III and IV). The new American Joint Committee on
Cancer.
Br J Cancer 86, 1534-1539.
363. LEONG, S. P., P. ENDERS-ZOHR, Y. M. ZHOU, S. STUNTEBECK, F. A.
HABIB, R. E. ALLEN, JR., R. W. SAGEBIEL, A. B. GLASSBERG, D. W.
LOWENBERG u. F. A. HAYES (1999):
Recombinant human granulocyte macrophage-colony stimulating factor (rhGM-CSF)
and autologous melanoma vaccine mediate tumor regression in patients with
metastatic melanoma.
J Immunother 22, 166-174.



364. HALLAMAA, R. E. (2007):
Bio-immunotherapy in the treatment of equine sarcoid, the commonest tumour of the horse.
Cancer Ther/A5 143-150.
365. ESPY, B. M. K. (2008):
How to Treat Equine Sarcoids by Autologous Implantation Proceedings.
Am Assoc Equine Pract 54, 68-73.
366. MERTENS, V. E. (1924):
aktive Immunisierung gegen ein sarkom (Melanom eines Schimmelpferdes.).
Deutsche Zeitschrift für Chirurgie 187, 216-245.
367. FINOCCHIARO, L. M., M. D. RIVEROS u. G. C. GLIKIN (2009):
Cytokine-enhanced vaccine and suicide gene therapy as adjuvant treatments of metastatic melanoma in a horse.
Vet Rec 164, 278-279.
368. MANDELBOIM, O., E. VADAI, M. FRIDKIN, A. KATZ-HILLEL, M. FELDMAN, G. BERKE u. L. EISENBACH (1995):
Regression of established murine carcinoma metastases following vaccination with tumour-associated antigen peptides.
Nat Med 1, 1179-1183.
369. LEWIS, J. J., S. JANETZKI, S. SCHAEDE, K. S. PANAGEAS, S. WANG, L. WILLIAMS, M. MEYERS, L. BUTTERWORTH, P. O. LIVINGSTON, P. B. CHAPMAN u. A. N. HOUGHTON (2000):
Evaluation of CD8(+) T-cell frequencies by the Elispot assay in healthy individuals and in patients with metastatic melanoma immunized with tyrosinase peptide.
Int J Cancer 87, 391-398.
370. THURNER, B., I. HAENDLE, C. RODER, D. DIECKMANN, P. KEIKAVOUSSI, H. JONULEIT, A. BENDER, C. MACZEK, D. SCHREINER, P. VON DEN DRIESCH, E. B. BROCKER, R. M. STEINMAN, A. ENK, E. KAMPGEN u. G. SCHULER (1999):
Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma.
J Exp Med 190, 1669-1678.
371. BANCHEREAU, J., A. K. PALUCKA, M. DHODAPKAR, S. BURKEHOLDER, N. TAQUET, A. ROLLAND, S. TAQUET, S. COQUERY, K. M. WITTKOWSKI, N. BHARDWAJ, L. PINEIRO, R. STEINMAN u. J. FAY (2001):
Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine.
Cancer Res 61, 6451-6458.



372. LINETTE, G. P., D. ZHANG, F. S. HODI, E. P. JONASCH, S. LONGERICH, C. P. STOWELL, I. J. WEBB, H. DALEY, R. J. SOIFFER, A. M. CHEUNG, S. G. EAPEN, S. V. FEE, K. M. RUBIN, A. J. SOBER u. F. G. HALUSKA (2005):
Immunization using autologous dendritic cells pulsed with the melanoma-associated antigen gp100-derived G280-9V peptide elicits CD8+ immunity.
Clin Cancer Res 11, 7692-7699.
373. GYORFFY, S., J. C. RODRIGUEZ-LECOMPTE, J. P. WOODS, R. FOLEY, S. KRUTH, P. C. LIAW u. J. GAULDIE (2005):
Bone marrow-derived dendritic cell vaccination of dogs with naturally occurring melanoma by using human gp100 antigen.
J Vet Intern Med 19, 56-63.
374. WEIDE, B., C. GARBE, H. G. RAMMENSEE u. S. PASCOLO (2008):
Plasmid DNA- and messenger RNA-based anti-cancer vaccination.
Immunol Lett 115, 33-42.
375. ORANGE, J. S., T. P. SALAZAR-MATHER, S. M. OPAL, R. L. SPENCER, A. H. MILLER, B. S. MCEWEN u. C. A. BIRON (1995):
Mechanism of interleukin 12-mediated toxicities during experimental viral infections: role of tumor necrosis factor and glucocorticoids.
J Exp Med 181, 901-914.
376. ATKINS, M. B., M. J. ROBERTSON, M. GORDON, M. T. LOTZE, M. DECOSTE, J. S. DUBOIS, J. RITZ, A. B. SANDLER, H. D. EDINGTON, P. D. GARZONE, J. W. MIER, C. M. CANNING, L. BATTIATO, H. TAHARA u. M. L. SHERMAN (1997):
Phase I evaluation of intravenous recombinant human interleukin 12 in patients with advanced malignancies.
Clin Cancer Res 3, 409-417.
377. MOTZER, R. J., A. RAKHIT, L. H. SCHWARTZ, T. OLENCKI, T. M. MALONE, K. SANDSTROM, R. NADEAU, H. PARMAR u. R. BUKOWSKI (1998):
Phase I trial of subcutaneous recombinant human interleukin-12 in patients with advanced renal cell carcinoma.
Clin Cancer Res 4, 1183-1191.
378. PORTIELJE, J. E., W. H. KRUIT, M. SCHULER, J. BECK, C. H. LAMERS, G. STOTER, C. HUBER, M. DE BOER-DENNERT, A. RAKHIT, R. L. BOLHUIS u. W. E. AULITZKY (1999):
Phase I study of subcutaneously administered recombinant human interleukin 12 in patients with advanced renal cell cancer.
Clin Cancer Res 5, 3983-3989.
379. COHEN, J. (1995):
IL-12 deaths: explanation and a puzzle.
Science 270, 908.



380. LEONARD, J. P., M. L. SHERMAN, G. L. FISHER, L. J. BUCHANAN, G. LARSEN, M. B. ATKINS, J. A. SOSMAN, J. P. DUTCHER, N. J. VOGELZANG u. J. L. RYAN (1997):
Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production.
Blood 90, 2541-2548.
381. HAUPT, K., M. ROGGENDORF u. K. MANN (2002):
The potential of DNA vaccination against tumor-associated antigens for antitumor therapy.
Exp Biol Med (Maywood) 227, 227-237.
382. DUNHAM, S. P. (2002):
The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine.
Res Vet Sci 73, 9-16.
383. CHEN, Y., D. HU, D. J. ELING, J. ROBBINS u. T. J. KIPPS (1998):
DNA vaccines encoding full-length or truncated Neu induce protective immunity against Neu-expressing mammary tumors.
Cancer Res 58, 1965-1971.
384. SCHREURS, M. W., A. J. DE BOER, C. G. FIGDOR u. G. J. ADEMA (1998):
Genetic vaccination against the melanocyte lineage-specific antigen gp100 induces cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor protection.
Cancer Res 58, 2509-2514.
385. ZHOU, W. Z., Y. KANEDA, S. HUANG, R. MORISHITA u. D. HOON (1999):
Protective immunization against melanoma by gp100 DNA-HVJ-liposome vaccine.
Gene Ther 6, 1768-1773.
386. MENDIRATTA, S. K., G. THAI, N. K. ESLAHI, N. M. THULL, M. MATAR, V. BRONTE u. F. PERICLE (2001):
Therapeutic tumor immunity induced by polyimmunization with melanoma antigens gp100 and TRP-2.
Cancer Res 61, 859-863.
387. WHITE, S. u. R. CONRY (2000):
DNA vaccines.
Principles and Practice of the Biologic Therapy of Cancer. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins 674-686.
388. HACKER, G., V. REDECKE u. H. HACKER (2002):
Activation of the immune system by bacterial CpG-DNA.
Immunology 105, 245-251.



389. HACKER, H. (2000):
Signal transduction pathways activated by CpG-DNA.
Curr Top Microbiol Immunol 247, 77-92.
390. MUTWIRI, G., R. PONTAROLLO, S. BABIUK, P. GRIEBEL, S. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, A. MENA, C. TSANG, V. ALCON, A. NICHANI, X. IOANNOU, S. GOMIS, H. TOWNSEND, R. HECKER, A. POTTER u. L. A. BABIUK (2003):
Biological activity of immunostimulatory CpG DNA motifs in domestic animals.
Vet Immunol Immunopathol 91, 89-103.
391. LEISE, B. S., C. YIN, A. PETTIGREW u. J. K. BELKNAP (2010):
Proinflammatory cytokine responses of cultured equine keratinocytes to bacterial pathogen-associated molecular pattern motifs.
Equine Vet J 42, 294-303.
392. WATTRANG, E., M. BERG u. M. MAGNUSSON (2005):
Immunostimulatory DNA activates production of type I interferons and interleukin-6 in equine peripheral blood mononuclear cells in vitro.
Vet Immunol Immunopathol 107, 265-279.
393. WATTRANG, E., A. K. PALM u. B. WAGNER (2012):
Cytokine production and proliferation upon in vitro oligodeoxyribonucleotide stimulation of equine peripheral blood mononuclear cells.
Vet Immunol Immunopathol 146, 113-124.
394. ZHANG, Y. W., E. G. DAVIS, F. BLECHA u. M. J. WILKERSON (2008):
Molecular cloning and characterization of equine Toll-like receptor 9.
Vet Immunol Immunopathol 124, 209-219.
395. BROWN, L., J. RODA, C. TERRELL, A. R. CHAUDHURY, T. CRESPIN, W. E. CARSON u. G. B. LESINSKI (2006):
Interferon alpha and CPG oligodeoxynucleotides elicit additive immunostimulatory and antitumor effects.
Surgery 140, 297-306.
396. HAFNER, M., R. ZAWATZKY, C. HIRTREITER, W. A. BUURMAN, B. ECHTENACHER, T. HEHLGANS u. D. N. MANNEL (2001):
Antimetastatic effect of CpG DNA mediated by type I IFN.
Cancer Res 61, 5523-5528.
397. HOFMANN, M. A., C. KORS, H. AUDRING, P. WALDEN, W. STERRY u. U. TREFZER (2008):
Phase 1 evaluation of intralesionally injected TLR9-agonist PF-3512676 in patients with basal cell carcinoma or metastatic melanoma.
J Immunother 31, 520-527.



398. MICONNET, I., S. KOENIG, D. SPEISER, A. KRIEG, P. GUILLAUME, J. C. CEROTTINI u. P. ROMERO (2002):
CpG are efficient adjuvants for specific CTL induction against tumor antigen-derived peptide.
J Immunol 168, 1212-1218.
399. MOLENKAMP, B. G., P. A. VAN LEEUWEN, S. MEIJER, B. J. SLUIJTER, P. G. WIJNANDS, A. BAARS, A. J. VAN DEN EERTWEGH, R. J. SCHEPER u. T. D. DE GRUIJL (2007):
Intradermal CpG-B activates both plasmacytoid and myeloid dendritic cells in the sentinel lymph node of melanoma patients.
Clin Cancer Res 13, 2961-2969.
400. OLBERT, P. J., A. J. SCHRADER, C. SIMON, A. DALPKE, P. BARTH, R. HOFMANN u. A. HEGELE (2009):
In vitro and in vivo effects of CpG-Oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) on murine transitional cell carcinoma and on the native murine urinary bladder wall.
Anticancer Research 29, 2067-2076.
401. UNTERHOLZNER, L. (2013):
The interferon response to intracellular DNA: why so many receptors?
Immunobiology 218, 1312-1321.
402. LEUTENEGGER, C. M., F. S. BORETTI, C. N. MISLIN, J. N. FLYNN, M. SCHROFF, A. HABEL, C. JUNGHANS, S. A. KOENIG-MEREDIZ, B. SIGRIST, A. AUBERT, N. C. PEDERSEN, B. WITTIG u. H. LUTZ (2000):
Immunization of cats against feline immunodeficiency virus (FIV) infection by using minimalistic immunogenic defined gene expression vector vaccines expressing FIV gp140 alone or with feline interleukin-12 (IL-12), IL-16, or a CpG motif.
J Virol 74, 10447-10457.
403. HEMMI, H., O. TAKEUCHI, T. KAWAI, T. KAISHO, S. SATO, H. SANJO, M. MATSUMOTO, K. HOSHINO, H. WAGNER, K. TAKEDA u. S. AKIRA (2000):
A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA.
Nature 408, 740-745.
404. KLINMAN, D. M., S. KLASCHIK, T. SATO u. D. TROSS (2009):
CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases.
Adv Drug Deliv Rev 61, 248-255.
405. GLENTING, J. u. S. WESSELS (2005):
Ensuring safety of DNA vaccines.
Microb Cell Fact 4, 26.



406. SCHIRMBECK, R., S. A. KONIG-MEREDIZ, P. RIEDL, M. KWISSA, F. SACK, M. SCHROFF, C. JUNGHANS, J. REIMANN u. B. WITTIG (2001):
Priming of immune responses to hepatitis B surface antigen with minimal DNA expression constructs modified with a nuclear localization signal peptide.
J Mol Med 79, 343-350.
407. ZHENG, C., C. JUHLS, D. OSWALD, F. SACK, I. WESTFEHLING, B. WITTIG, L. A. BABIUK u. S. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK (2006):
Effect of different nuclear localization sequences on the immune responses induced by a MIDGE vector encoding bovine herpesvirus-1 glycoprotein D.
Vaccine 24, 4625-4629.
408. EUHUS, D. M., C. HUDD, M. C. LAREGINA u. F. E. JOHNSON (1986):
Tumor measurement in the nude mouse.
J Surg Oncol 31, 229-234.
409. TOMAYKO, M. M. u. C. P. REYNOLDS (1989):
Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice.
Cancer Chemother Pharmacol 24, 148-154.
410. STÄHLI, P. (2005)
Einsatz von Interleukin-12 und Interleukin-18 kodierender Plasmid-DNA zur Therapie von Melanomen beim Schimmel.
411. SCHNABEL, C. L., P. STEINIG, M. KOY, H. J. SCHUBERTH, C. JUHLS, D. OSWALD, B. WITTIG, S. WILLENBROCK, H. MURUA ESCOBAR, C. PFARRER, B. WAGNER, P. JAEHNIG, A. MORITZ, K. FEIGE u. J. M. CAVALLERI (2015):
Immune response of healthy horses to DNA constructs formulated with a cationic lipid transfection reagent.
BMC Veterinary Research 11, 140.
412. MULLER, J. M., J. WISSEMANN, M. L. MELI, G. DASEN, H. LUTZ, L. HEINZERLING u. K. FEIGE (2011):
In vivo induction of interferon gamma expression in grey horses with metastatic melanoma resulting from direct injection of plasmid DNA coding for equine interleukin 12.
Schweiz Arch Tierheilkd 153, 509-513.
413. JOHNNEN, H., H. KULBE u. G. PECHER (2001):
Long-term tumor growth suppression in mice immunized with naked DNA of the human tumor antigen mucin (MUC1).
Cancer Immunol Immunother 50, 356-360.



414. MÄHLMANN, K., K. FEIGE, C. JUHLS, A. ENDMANN, H.-J. SCHUBERTH, D. OSWALD, M. HELLIGE, M. DOHERR u. J.-M. V. CAVALLERI (2015):
Local and systemic effect of transfection-reagent formulated DNA vectors on equine melanoma.
BMC Veterinary Research 11, 1 %@ 1746-6148.
415. ENDMANN, A., D. OSWALD, O. RIEDE, E. G. TALMAN, R. E. VOS, M. SCHROFF, C. KLEUSS, M. H. RUITERS u. C. JUHLS (2014):
Combination of MIDGE-Th1 DNA vaccines with the cationic lipid SAINT-18: studies on formulation, biodistribution and vector clearance.
Vaccine 32, 3460-3467.
416. BERG, J. M., A. HELD, L. STRYER, C. LANGE, K. MAHLKE, G. MAXAM, L. SEIDLER, N. ZELLERHOFF, B. HÄCKER u. B. U. H. B. G. D. B. I. D. JAROSCH (2015):
Stryer Biochemie.
Springer Berlin Heidelberg.
417. HUNT, K. K., S. A. VORBURGER u. S. G. X. SWISHER (2007):
Gene Therapy for Cancer.
Springer Science & Business Media.
418. PISETSKY, D. S. (1996):
The immunologic properties of DNA.
J Immunol 156, 421-423.
419. ENDMANN, A., M. BADEN, E. WEISERMANN, K. KAPP, M. SCHROFF, C. KLEUSS, B. WITTIG u. C. JUHLS (2010):
Immune response induced by a linear DNA vector: Influence of dose, formulation and route of injection.
Vaccine 28, 3642-3649.
420. SCHNARE, M., A. C. HOLT, K. TAKEDA, S. AKIRA u. R. MEDZHITOV (2000):
Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88.
Current Biology 10, 1139-1142.
421. HACKER, H., R. M. VABULAS, O. TAKEUCHI, K. HOSHINO, S. AKIRA u. H. WAGNER (2000):
Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6.
J Exp Med 192, 595-600.
422. FRESE, S. u. B. DIAMOND (2011):
Structural modification of DNA--a therapeutic option in SLE?
Nat Rev Rheumatol 7, 733-738.



423. KLIER, J., A. MAY, S. FUCHS, U. SCHILLINGER, C. PLANK, G. WINTER, H. GEHLEN u. C. COESTER (2011):
Immunostimulation of bronchoalveolar lavage cells from recurrent airway obstruction-affected horses by different CpG-classes bound to gelatin nanoparticles.
Vet Immunol Immunopathol 144, 79-87.
424. AUDOUY, S. A., L. F. DE LEIJ, D. HOEKSTRA u. G. MOLEMA (2002):
In vivo characteristics of cationic liposomes as delivery vectors for gene therapy.
Pharm Res 19, 1599-1605.
425. TROS DE ILARDUYA, C., Y. SUN u. N. DUZGUNES (2010):
Gene delivery by lipoplexes and polyplexes.
Eur J Pharm Sci 40, 159-170.
426. MANSUR, D. S., G. L. SMITH u. B. J. FERGUSON (2014):
Intracellular sensing of viral DNA by the innate immune system.
Microbes Infect 16, 1002-1012.
427. WU, J. u. Z. J. CHEN (2014):
Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids.
Annu Rev Immunol 32, 461-488.
428. HORNUNG, V., A. ABLASSER, M. CHARREL-DENNIS, F. BAUERNFEIND, G. HORVATH, D. R. CAFFREY, E. LATZ u. K. A. FITZGERALD (2009):
AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC.
Nature 458, 514-518.
429. MOTANI, K., S. ITO u. S. NAGATA (2015):
DNA-Mediated Cyclic GMP–AMP Synthase–Dependent and –Independent Regulation of Innate Immune Responses.
The Journal of Immunology 194, 4914-4923.



9 Anhang

9.1 Geräte

<i>Aqua dest.</i> Aufbereitungsanlage Umkehr-Osmose Anlage, „Typ RO 50/14SMB Typ I“	Wasser und Regenerierstation, Barsbüttel
<i>Aqua tridest.</i> Aufbereitungsanlage „SG Reinstwasser System Typ SG-RS90-4 UF“	Wasser und Regenerierstation, Barsbüttel
Autoklav Typ GE406	Getinge AB, Getinge/Schweden
Biometra T-Gradient	Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank mit CO ₂ -Begasung, Baureihe 5060	Heraeus, Hanau
Bunsenbrenner mit automatischer Zündung	Wartewig (6.001.000), Göttingen
Eismaschine Typ UBE 30-10	Ziegra, Isernhagen
Experion Priming Station	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Experion Vortex Station	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Experion Electrophoresis station	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Heizblock Techne Dri-Block [®] DB.3	Thermo Dux, Wertheim
Kühlschrank mit Gefrierfach (-20 °C)	Einzelhandel
Kühlzentrifuge Varifuge K mit Tragwinkelrotor, Hochgeschwindigkeitsaufsatz und Mikrotiterplattenrotor	Heraeus Instruments, Osterode
Laborfeinwaage „B6“	Mettler, Zürich/Schweiz
Mikrowelle	Quelle, Hannover
Mini-Sub [®] Cell GT Gelelektrophorese-Kammer	BioRad Laboratories GmbH, München



Minizentrifuge	National Labnet CO., Woodbrige, NJ, USA
Optima™ LE-80K Ultracentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
Pinzette, gebogen, anatomisch	Eickemeyer, Tuttlingen
Pipette, einstellbar „Transferpette®“ (2-20 µl)	Brand, Wertheim
Pipetten, einstellbar „pipetman“ (1-20 µl, 10 -100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Gilson, Villers Le Bel/Frankreich
Pipettierhilfe „accu-jet®“	Brand, Wertheim
Plastikbox mit Gittereinsatz	Einzelhandel
Plattenzentrifuge mit Plattenrotor (UJ II KS)	Heraeus-Christ. Osterode
Reinwerkbank Laminair HL2448	Heraeus-Christ., Hanau
Rüttler für Mikrotiterplatten „AM69 Microshaker“	Dynatec, Zug, Schweiz
Schüttelinkubator GFL-3031	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
StepOnePlus® Real-Time PCR System	Applied Biosystems®, Darmstadt
Tischzentrifuge „Hermle Z230M“	Hermle, Gosheim
Zentrifuge „Megafuge 1.0R“	Heraeus Instruments, Osterode
Zentrifuge Multifuge 1 S-R	Thermo Scientific, Osterode

9.2 Klinikbedarf

Vacutainer Brand Luer Adapters	Becton Dickinson, Heidelberg
Vacutainer® System, Halter	Becton Dickinson, Heidelberg
PAXgene blood tubes	Becton Dickinson, Heidelberg

9.3 Laborbedarf

MicroAmp® Optical Adhesive Film	Applied Biosystems®, Darmstadt
Combitips 1,25 mL	Eppendorf (0030069.420), Hamburg



Combitips 2,5 mL	Eppendorf (0030069.447), Hamburg
Einmal-Küvetten Ultra Vette 8,5 mm	Brand (5406210), Wertheim
Einmal-Pasteurpipetten aus Pe-Ld	Merck (612F1767), Darmstadt
Eppendorf Reaktionsgefäß 1,5 mL	Greiner (616201), Frickenhausen
Eppendorf Reaktionsgefäß 2 mL	HLL Landgraf Laborsysteme (294762320), Langenhagen
PCR-Platten Micro Amp™ Fast 96-well plate	Applied Biosystems®, Darmstadt
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 mL	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen 200 und 1000 µL	Sarstedt (70/762002) (70/7600002), Frickenhausen
Pipettenspitzen safe seal Tipps 10, 100, 1000 µL	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Zentrifugenröhrchen (Falcons), 50 mL aus Polypropylen, steril	Corning (430829), Wiesbaden
Zentrifugenröhrchen, 15 mL aus Polypropylen, steril	Sarstedt (62.554.502), Nürnberg

9.4 Reagenzien

Agarose NEEO Ultra	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma®-Aldrich (A-9518), Steinheim
ROTI®-MIX PCR 3 (pH7)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma®-Aldrich (D-5879), Steinheim
Ethanol (ROTIPURAN® ≥ 99,8 % p.a.)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Gel Star® Nucleic Acid Stain	Lonza (50535), Rockland, Maine/USA
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	Invitrogen™ (15529-019), Karlsruhe
LB-Agar	Invitrogen™ (22700-025), Karlsruhe
2%-iges Lidocain	Vétoquinol AG, Ravensburg



Oligo (dt) ₁₂₋₁₈ Primer	Invitrogen™ (18418-012), Karlsruhe
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) Dulbecco, ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Biochrom (L18210), Berlin
Quick-Load® 100 bp DNA Ladder	New England Biolabs GmbH
RNase und DNase freies Wasser (Sigma®-Aldrich, Steinheim)	Sigma®-Aldrich, Steinheim
RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen™ (10777-019), Karlsruhe
RQ1 RNase free DNase	Promega, Mannheim
SYBR-Green® PCR Master Mix	Applied Biosystems®, (4309155), Darmstadt
Tris (Trizma Base)	Sigma®-Aldrich (T-8524), Steinheim
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid)	Invitrogen™ (15520-034), Karlsruhe

9.5 Kits

RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen GmbH (74134), Hilden
RNeasy fibrous tissue Mini Kit	Qiagen GmbH (74704), Hilden
PAXgene blood RNA Kit	Qiagen GmbH (762174), Hilden
QIAEX® II Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH (20021), Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH (27104), Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen GmbH (28104), Hilden
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen™ (K 450641), Karlsruhe

9.6 Enzyme

Restriktionsenzym MspI	Thermo-Scientific, Schwerte
RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen™ (10777-019), Karlsruhe
Restriktionsenzym Scal	Thermo-Scientific, Schwerte
Superscript™ II Reverse Transkriptase	Invitrogen™ (18064-014), Karlsruhe



9.7 Biologische Materialien

E. coli TOP10

Invitrogen™ (K151-01), Karlsruhe

Genotyp: F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mrcBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 rec A1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG

9.8 Kulturmedien

Ampicillin (Sigma®-Aldrich, Steinheim): 100 mg/mL in *A. tridest.*, Lagerung aliquotiert bei -20°C

IPTG: 100 mg/mL in *A. tridest.*, Lagerung aliquotiert bei -20°C

X-Gal: 100 mg/mL in Dimethylformid (DMF), Lagerung aliquotiert bei -20°C

Flüssiges LB-Medium

20 g LB-Agar (Lennox) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) wurden in 1 L *A. tridest.* gelöst und bei 135°C und 2,8 bar für 20 Min. autoklaviert (Autoklav Typ GE406 (Getinge AB, Getinge/Schweden)). Bis zur Verwendung wurde das Medium bei 4 °C gelagert.

LB-Agar mit Ampicillin, IPTG und X-Gal

Es wurden 32g LB-Agar-Pulver in 1 L *A. tridest.* gelöst und für 20 Min. bei 135°C und 2,8 bar autoklaviert. Nach Abkühlung auf ca. 55°C wurden der Flüssigkeit 100 µg/mL Ampicillin (Sigma®-Aldrich, Steinheim), 80 µg/mL X-Gal und 40 µg/mL IPTG hinzugegeben. Anschließend wurden unter sterilen Bedingungen Petrischalen mit dem Agar ausgegossen und diese dann bis zur fertigen Aushärtung bei RT steril belassen. Die Platten konnten daraufhin – bei 4°C gelagert – 1 Monat verwendet werden.



Tabelle 13: Zusammensetzung des LB-Nährbodens

Reagenz	Menge
Aqua tridest	500 ml
LB-Agar Pulver (Invitrogen™, Karlsruhe)	16 g
Ampicillin (Sigma®-Aldrich, Steinheim)	50 mg
X-Gal (Invitrogen™, Karlsruhe)	40 mg
IPTG (Invitrogen™, Karlsruhe)	59,6 mg



9.9 Rohdaten

Tabelle 14: Relative Volumen der untersuchten Tumore von 19 Pferden in Relation zum Volumen am Tag 1 der Untersuchungen durch MÄHLMANN et al. (2012) [3]. Zusätzlich ist die Zu- oder Abnahme des Volumens im Vergleich zum relativen Volumen an Tag 120 als Differenz in Prozentpunkten angegeben. Es sind die lokal behandelten und nicht lokal behandelten Tumore dargestellt.

Gruppe	ID	Melanom (Nummer)	Lokale Behandlung	Ultraschall		Schublehre	
				Relatives Volumen (Tag 730) [%]	Volumen-änderung zu Tag 120 [%]	Relatives Volumen (Tag 730) [%]	Volumen-änderung zu Tag 120 [%]
IL-12/IL-18	1	1	nein	118	51	136	38
		2	nein	2985	2909	193	69
		3	nein	134	17	124	17
		4	nein	74	5	110	41
		5	nein	194	78	129	19
		6	nein	159	53	100	17
		7	nein	234	134	174	108
		8	nein	239	147	148	78
		9	ja	941	874	309	226
	2	1	nein	86	24	47	-12
		2	ja	94	26	64	2
	8	1	nein	152	80	243	147
		2	ja	215	135	202	135
		3	nein	211	157	548	455
		4	nein	175	77	31	0
	18	1	nein	-	-	-	-
		2	ja	-	-	100	43
		3	nein	-	-	35	-53
		4	nein	-	-	47	-45
	24	1	ja	-	-	53	0
	25	1	nein	92	6	118	39
		2	nein	141	69	154	73
		3	nein	146	55	165	105
		4	nein	168	49	137	41
		5	ja	177	62	121	48



Gruppe	ID	Melanom (Nummer)	Lokale Behandlung	Ultraschall		Schublehre	
				Relatives Volumen (Tag 730) [%]	Volumen- änderung zu Tag 120 [%]	Relatives Volumen (Tag 730) [%]	Volumen- änderung zu Tag 120 [%]
IL-12/IL-18	25	6	nein	143	33	205	113
		7	nein	185	70	139	51
		8	nein	134	70	78	-19
		9	nein	57	-66	241	144
gp100	3	1	ja	455	364	63	-85
	7	1	nein	163	63	1201	60
		2	ja	114	33	75	7
		3	nein	21	21	100	61
		4	nein	-	-	240	215
		5	nein	40	-21	339	272
		6	nein	223	136	228	134
		7	nein	134	48	-	-
	9	1	nein	53	-17	168	83
		2	nein	116	17	119	-3
		3	nein	96	18	70	19
		4	nein	116	35	360	290
		5	nein	-	-	298	188
		6	ja	181	124	160	118
		7	nein	275	201	185	142
		8	nein	116	37	3678	3609
		9	nein	64	-16	212	135
	16	1	nein	105	26	93	37
		2	nein	368	279	140	63
		3	nein	103	14	67	-33
		4	nein	71	-18	35	-6
		5	ja	384	297	238	184
		6	nein	150	65	51	-22
		7	nein	591	492	122	43
		8	nein	301	229	209	146
		9	nein	287	186	227	127
	19	1	nein	190	93	250	191
		2	nein	77	-12	192	115
		3	nein	48	-53	103	28
		4	nein	93	-11	347	266



Gruppe	ID	Melanom (Nummer)	Lokale Behandlung	Ultraschall		Schublehre		
				Relatives Volumen (Tag 730) [%]	Volumen- änderung zu Tag 120 [%]	Relatives Volumen (Tag 730) [%]	Volumen- änderung zu Tag 120 [%]	
gp100	19	5	ja	26	-73	21	-62	
		6	nein	337	281	100	53	
		7	nein	138	53	2959	2894	
		8	nein	-	-	-	-	
		9	nein	359	289	277	198	
	28	1	nein	-	-	62	-26	
		2	nein	-	-	55	0	
		3	nein	-	-	105	78	
		4	ja	-	-	244	190	
		5	nein	-	-	196	110	
		6	nein	-	-	108	32	
		7	nein	-	-	42	-58	
	Tyrosinase	11	1	ja	73	-19	32	11
			2	nein	62	6	95	37
3			nein	66	4	102	24	
4			nein	72	-12	482	389	
5			nein	101	36	186	92	
6			nein	61	9	318	250	
7			nein	20	-18	140	105	
8			nein	105	42	408	274	
9			nein	100	11	231	162	
12		1	nein	54	-54	100	56	
		2	nein	243	136	356	302	
		3	nein	438	324	237	194	
		4	ja	107	28	124	49	
15		1	nein	22	-48	25	-43	
		2	nein	-	-	-	-	
		4	ja	225	147	25	-4	
		5	nein	134	46	-	-	
		6	nein	145	54	93	39	
		7	nein	66	-3	77	8	
17		1	ja	-	-	97	-2	
		2	nein	-	-	37	-30	



Gruppe	ID	Melanom (Nummer)	Lokale Behandlung	Ultraschall		Schublehre	
				Relatives Volumen (Tag 730) [%]	Volumen- änderung zu Tag 120 [%]	Relatives Volumen (Tag 730) [%]	Volumen- änderung zu Tag 120 [%]
Tyrosinase	21	1	nein	187	110	103	58
		2	nein	139	63	78	26
		3	nein	406	319	258	175
		4	nein	1029	833	135	44
		5	nein	252	162	869	785
		6	nein	1569	1451	570	473
		7	nein	133	12	106	-5
		8	ja	78	25	248	168
		9	nein	-	-	-	-
	26	1	nein	-	-	105	9
		2	ja	-	-	827	745
		3	nein	558	500	918	804
		4	nein	64	-19	176	105
		5	nein	660	592	391	329
	27	1	ja	102	3	96	-11



Tabelle 15: Dargestellt ist die Expression der Zytokine CXCL2, CXCL8, CXCL10, IL-18 und CCL2 im arithmetischen Mittel des Doppelansatz in Kopien pro μl .

Gruppe	ID	Gewebe	Behandlung	CXCL2 [Kopien / μl]	CXCL8 [Kopien / μl]	IL-18 [Kopien / μl]	CXCL10 [Kopien / μl]	CCL2 [Kopien / μl]
SAINT-18	A	Haut	PBS	66323	49505	4236	1840	571
	A	Haut	Testsubstanz	4718	7009	5840	615	362
	E	Haut	PBS	9890	535	2338	1058	508
	E	Haut	Testsubstanz	6104	709	2256	309	378
	I	Haut	PBS	24380	1612	4277	2494	5189
	I	Haut	Testsubstanz	11260	3647	2366	213	2102
	M	Haut	PBS	1859	423	4110	2517	457
	M	Haut	Testsubstanz	4587	422	5980	637	7393
	Q	Haut	PBS	6822	4329	7827	1275	5852
	Q	Haut	Testsubstanz	3379	1508	4062	3044	4605
	W	Haut	PBS	3296	2160	5037	11303	1466
	W	Haut	Testsubstanz	1276	967	4826	7533	1354
	A	Blut	PBS	125	141	1041	408	
	A	Blut	Testsubstanz	7266	171		324	
	E	Blut	PBS	320		104		
	E	Blut	Testsubstanz	2329		2986	5024	
	I	Blut	PBS	2741		948	622	
	I	Blut	Testsubstanz	3438		1068	3547	
	M	Blut	PBS	560			189	
	M	Blut	Testsubstanz	401		108	154	
Q	Blut	PBS	11917		1662	796		
Q	Blut	Testsubstanz	7917		674	388	767	
W	Blut	PBS				1484		
W	Blut	Testsubstanz				1771		
IL-12/IL-18	B	Haut	PBS	7153	14102	3874	689	271
	B	Haut	Testsubstanz	6480	43235	9622	912500	3764
	F	Haut	PBS	8367	2785	3162	1103	733
	F	Haut	Testsubstanz	14855	2678	11743	970059	11474
	J	Haut	PBS	5292	7079	2228	4611	1293
	J	Haut	Testsubstanz	14763	8934	4921	1364252	27798
	N	Haut	PBS	819	959	8387	1479	1647
	N	Haut	Testsubstanz	14566	2735	22281	749520	13128
	R	Haut	PBS	6033	7627	3948	5022	1934
	R	Haut	Testsubstanz	3089	3997	2994	2314734	1328
	U	Haut	PBS	21415	1739	5472	8100	3675



Gruppe	ID	Gewebe	Behandlung	CXCL2 [Kopien / µl]	CXCL8 [Kopien / µl]	IL-18 [Kopien / µl]	CXCL10 [Kopien / µl]	CCL2 [Kopien / µl]
IL-12/IL-18	U	Haut	Testsubstanz	4134	4613	8811	6238640	14958
	B	Blut	PBS	7527	607	4570	1820	
	B	Blut	Testsubstanz	22378	521	6852	842	
	F	Blut	PBS	8554		3272	1948	
	F	Blut	Testsubstanz	222			1921	
	J	Blut	PBS	1354			17475	
	J	Blut	Testsubstanz	8839		2637	25537	
	N	Blut	PBS	1913		7166	147	
	N	Blut	Testsubstanz	2170		1073	159	
	R	Blut	PBS	8975		1451	2965	1516
	R	Blut	Testsubstanz	1658		251	189	
	U	Blut	PBS	6221		2506	934	
	U	Blut	Testsubstanz	5114		1624	609	
ohne ATG	C	Haut	PBS	12150	12874	5470	1010	1472
	C	Haut	Testsubstanz	10461	25366	12066	167000	14368
	G	Haut	PBS	11608	1610	4375	1998	1950
	G	Haut	Testsubstanz	14819	1864	6547	48957	3071
	K	Haut	PBS	6064	8432	4777	405	1805
	K	Haut	Testsubstanz	12290	8967	16938	886388	26167
	O	Haut	PBS	1747	2493	8660	680	5052
	O	Haut	Testsubstanz	2731	1485	8376	5455	2883
	S	Haut	PBS	11702	8000	3179	13661	6968
	S	Haut	Testsubstanz	293646	365416	58879	6242624	32806
	X	Haut	PBS	1276	1246	3128	3416	449
	X	Haut	Testsubstanz	235462	286347	48232	3531666	42692
	C	Blut	PBS	8539	296	2674	2323	
	C	Blut	Testsubstanz	1492	232	1720	3722	
	G	Blut	PBS	1436		2676	8344	
	G	Blut	Testsubstanz	12094		4728	10308	
	K	Blut	PBS	6390		6355	3025	
	K	Blut	Testsubstanz	10757		2649	3025	
	O	Blut	PBS	2116		2017	3942	
	O	Blut	Testsubstanz	9106		2078	1191	
	S	Blut	PBS	591		2150	106790	
S	Blut	Testsubstanz	6301		817	3162		
X	Blut	PBS				6131		
X	Blut	Testsubstanz				1397		



Gruppe	ID	Gewebe	Behandlung	CXCL2 [Kopien / µl]	CXCL8 [Kopien / µl]	IL-18 [Kopien / µl]	CXCL10 [Kopien / µl]	CCL2 [Kopien / µl]
ohne CpG	D	Haut	PBS	15581	12228	9278	17300	908
	D	Haut	Testsubstanz	23450	15522	30103	463000	7220
	H	Haut	PBS	47567	13900	2980	4343	6316
	H	Haut	Testsubstanz	29530	4812	9031	74200	22360
	L	Haut	PBS	19003	5846	6793	4493	3267
	L	Haut	Testsubstanz	11904	2767	16129	107566	3535
	P	Haut	PBS	3253	3745	1250	2506	129
	P	Haut	Testsubstanz	6922	4817	10505	123934	3601
	T	Haut	PBS	4807	3421	7441	3295	8876
	T	Haut	Testsubstanz	16287	2921	16820	377911	32774
	V	Haut	PBS	3403	621	5190	2904	1326
	V	Haut	Testsubstanz	2780	2838	5195	336990	9930
	D	Blut	PBS	11151	553		652	
	D	Blut	Testsubstanz	1140	398	5486	3046	
	H	Blut	PBS	2919		786	858	
	H	Blut	Testsubstanz	2467		599	565	
	L	Blut	PBS	3801		1464	368	
	L	Blut	Testsubstanz	3795		678	1005	
	P	Blut	PBS	1214		3560	8591	
	P	Blut	Testsubstanz		123			2907
	T	Blut	PBS	16020		4295	2294	
	T	Blut	Testsubstanz	20342		2289	829	
	V	Blut	PBS				6269	
	V	Blut	Testsubstanz				1589	



10 Danksagung

Die letzten Seiten meiner Dissertation sollen nicht dem Thema oder mir gewidmet werden, sondern den Menschen die dieses Projekt ermöglicht haben.

Danke für eure Hilfe und Unterstützung!!!

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Karsten Feige, der mir das notwendige Vertrauen entgegenbrachte indem er mir das Thema dieser Dissertation überließ und jederzeit ein offenes Ohr hatte.

Herrn Prof. Dr. Joachim Schuberth, der mir das Teuerste und Wichtigste seiner AG überließ. Die uneingeschränkte Unterstützung seiner Arbeitsgruppe und seine kritische und konstruktive Unterstützung in der Entwicklung des Projekts.

Frau Dr. Jessika-M. V. Cavalleri. Bei unserer ersten Begegnung im Notdienst der Pferdeklinik hast du es geschafft meine Begeisterung für Internistik zu wecken. Du hast mir über die Jahre viel praktisch und theoretisch beigebracht. Ich danke dir außerdem dafür, dass du mir die Möglichkeit gegeben hast, neben dieser Dissertation meinen beruflichen Weg zu verfolgen, ohne mir jemals das Gefühl zu geben, dass du mich nicht unterstützt.

Frau Dr. Mirja Koy. Du bist wahrscheinlich das Beste was mir im Rahmen der Doktorarbeit passiert ist. Du hast mir nicht nur das Fingerspitzengefühl und Wissen im Labor vermittelt, sondern auch das wissenschaftliche Arbeiten beigebracht. In jeder Phase dieser Studie hast du unerbittlich für mich und meinen Erfolg gekämpft. Insbesondere bin ich dankbar für die persönliche Unterstützung. Ich wurde in den richtigen Momenten von dir getriezt, oder einfach in den Arm genommen, wenn es notwendig war. Ich wüsste nicht, ob ich ohne diese Unterstützung das Projekt gemeistert hätte.



Frau Dr. Christiane Schnabel, die der perfekte Gegenpart und Gefährte war. Aus tiefstem Herzen danke ich dir, dass du nicht nur Kollegin und Mitstreiterin warst, sondern auch „bad cop“ und gute Freundin. Ich bin froh, dass wir diese schwierige Zeit zusammen durchgestanden haben. Du hast mir immer den Rücken freigehalten und hast meine Probleme immer zu deinen gemacht. Ich glaube du bist mit Abstand die Person, die am meisten zu meinem Erfolg beigetragen hat. Ich bin dankbar, dass deine Unterstützung und unsere Freundschaft nicht mit dem Projekt endeten, sondern unsere Dissertationen nur der Anfang waren.

Den Mitarbeitern der Pferdeklinik und den anderen Doktoranden für die Unterstützung bei den klinischen Versuchen und dem alltäglichen Wahnsinn.

Den Mitarbeitern der Immunologie für die Unterstützung und die freundliche Aufnahme in ihr Team.

Der Stadt Bochum, die mir ermöglicht hat neben meiner beruflichen Tätigkeit dieses aufwendige Forschungsprojekt umzusetzen.

Herrn Hans-Jürgen Rink, der mein Mentor und einer meiner großen Unterstützer ist. Sie haben mich persönlich und beruflich gefördert und geprägt, dafür meinen Dank.

Frau Dr. Anette Ferdinand und **Herrn Hans Deppe**, die mir als meine Vorgesetzten die Freiheit ermöglicht haben, neben meinen beruflichen Verpflichtungen, dieses Projekt zu realisieren.

Frau Dr. Barbara Finke, Frau Dr. Elke Heise, Herrn Dr. Sassan Sohrab, Frau Anne Suska und Herrn Dr. Roland Voß. Ihr habt ohne Berücksichtigung eurer eigenen Interessen jederzeit meine Arbeit übernommen und mir den Rücken freigehalten, wenn meine Verpflichtungen im Rahmen der Doktorarbeit es erforderten. Ihr habt mir immer vermittelt, dass das Projekt Doktorarbeit unser und nicht bloß mein Projekt ist. Ich bin dankbar euch als Kollegen zu haben.



Meinen Kollegen des Veterinäramts Bochum, die einen weiten Teil der Strecke mit mir zusammen gegangen sind. Ihr habt mich nach dem Studium in euer Team aufgenommen und nach Kräften unterstützt. Ob amtlicher Fachassistent, amtlicher Tierarzt oder Verwaltungsmitarbeiter, ich wurde jederzeit unterstützt und dafür bin ich dankbar.

Meinen Kollegen des Fachbereichs 86 des LANUV NRW, die mir in der finalen Phase den Rücken freigehalten haben, so dass ich mich voll und ganz auf die Dissertation fokussieren konnte.

Frau Dr. Nicole Steffensen, die meine größte Kritikerinnen und auch größte Unterstützerin ist. Du hast mich jederzeit bedingungslos unterstützt und mir immer zur Seite gestanden. Das hat aber nie verhindert, dass du mich auch kritisch hinterfragt hast und mich so zu Höchstleistungen angespornt hast. Ich danke dir für die letzten 11 Jahre und bin froh, dass mein Portemonnaie kaputt war und du mein Kleingeld aufgehoben hast.

Frau Dr. Sandra Vagt, die mir immer eine treue Freundin war und mich bei meiner abenteuerlichen Tour zum Vermessen der Melanome begleitet hat. Ich werde nie wieder Chicken McNuggets essen können ohne an dich zu denken.

Herrn Patrick Hahne, der uns in der Versuchsphase mit allem Lebensnotwendigen versorgt hat und dafür gesorgt hat, dass ich diese Phase der Studie heil überstehe. Zusätzlich danke ich ihm, dass er die Arbeit wiederholt kritisch gelesen hat.

Herrn Benjamin Brederhöft, der mir zu jeder Zeit Obhut geboten hat, nachdem ich Hannover den Rücken gekehrt hatte und dem kein Aufwand zu gering war, um mir den Erfolg zu ermöglichen.

Frau Kathrin Rochholl, die in den letzten 5 Jahren jede Hasstirade, Verzweiflung und Euphorie von mir geduldig ertragen hat und immer Verständnis dafür hatte, dass ich mit der Doktorarbeit voll ausgelastet war. Danke, dass du immer für mich da bist, auch wenn ich mich in stressigen Zeiten nicht ausreichend um dich gekümmert habe.



Frau Dr. Nicola Pirron, die mir nicht nur berufliches Vorbild, sondern insbesondere auch gute Freundin ist. Ich verspreche die ewigen Beschwerden über die Doktorarbeit enden nun.

Frau Dr. Anna Tönissen und **Frau Anna Wagner**, die mit mir die Pferdewelt erkundet haben, mich zu jeder Zeit bei meinen Entscheidungen unterstützt haben und mir das Gefühl gegeben habe, dass ich nicht alleine bin.

Herrn Bruno Francese, der immer an mich geglaubt hat.

Meinen Brüdern **Daniel** und **Tobias Steinig**, die immer für mich da sind und mir immer wieder aufs Neue beweisen, dass in schweren Zeiten die Familie immer voll füreinander einsteht. Ich bin froh euch an meiner Seite zu wissen.

Meinen Eltern **Martina** und **Norbert Steinig** die mich nicht nur zu dem Menschen gemacht haben der ich bin, sondern in den letzten 5 Jahren wahrscheinlich mehr gelitten haben als ich. Ihr habt mich immer unterstützt und euch mit Allem was ihr habt für mich eingesetzt. Ich danke euch für Alles was ihr für mich getan habt und hoffe es euch eines Tages zurückgeben zu können.





