



Patrick Steinig (Autor)

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

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

**Wissenschaftliche Reihe  
der Klinik für Pferde**

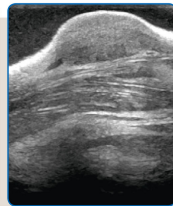
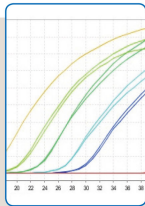
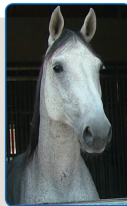
Herausgegeben von  
Karsten Feige, Peter Stadler,  
Harald Sieme, Bernhard Ohnesorge



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**

 Cuvillier Verlag Göttingen  
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/7543>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,  
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>



## 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 $\gamma$ ) .....	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 <sup>®</sup> -Vektoren .....	21
3 Material und Methode .....	23
3.1 Langzeiteffekte nach Behandlung mit MIDGE <sup>®</sup> -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 <sup>®</sup> -Vektoren .....	28
3.2.1 Vorversuche .....	28
3.2.1.1 Erstellung von Standardreihen (SYBR <sup>®</sup> 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	Tumorzvolumen lokal unbehandelter Tumore .....	66
4.1.3.2	Tumormessungen lokal intradermal behandelter Tumore .....	67
4.1.3.3	Vergleich lokal behandelter und unbehandelter 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	Tumervolumenentwicklung .....	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