



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**

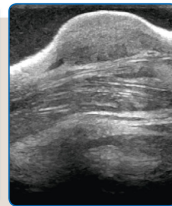
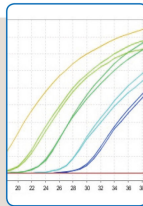
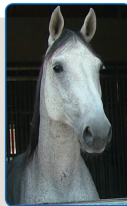
Herausgegeben von
Karsten Feige, Peter Stadler,
Harald Sieme, Bernhard Ohnesorge



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, 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 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	Tumorzvolumen lokal unbehandelter Tumore	66
4.1.3.2	Turmormessungen 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	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