

AUS DER KLINIK FÜR PFERDE  
DES FACHBEREICHS VETERINÄRMEDIZIN DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

# Nicht-viraler Gentransfer mittels Magnetofektion bei primären Zellen des Equinen Sarkoids

---

In-vitro-Studie im Hinblick auf eine adjuvante  
Gentherapie des Equinen Sarkoids

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin an der  
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von  
Barbara Wärther  
Tierärztin aus Karlsruhe**

**Berlin 2013**

**Journal-Nr.: 3636**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Gehlen  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopffleisch  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Corinna Eule

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

horses, sarcoid, sarcoid, gene transfer, plasmid vectors, magnetic field,  
nanoparticles, lipids, fluorescence, luciferase (Renilla luciferin), cell culture

Tag der Promotion: 22.01.2014

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86387-443-8

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2014

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

*Meiner Familie*



<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>4</b>
<b>2 LITERATUR .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Das Equine Sarkoid .....</b>	<b>5</b>
2.1.1 Definition und Vorkommen .....	5
2.1.2 Histologie .....	5
2.1.3 Klassifikation .....	6
2.1.4 Ätiologie .....	6
2.1.5 Prädisposition .....	7
2.1.6 Behandlungsmöglichkeiten .....	8
<b>2.2 Papillomaviren .....</b>	<b>10</b>
2.2.1 Immunologie der Papillomaviren .....	11
2.2.2 Papillomaviren und Krebs .....	11
2.2.3 Bovine Papillomaviren .....	12
2.2.3.1 Einteilung .....	12
2.2.3.2 Onkoprotein E5 der Bovinen Papillomaviren .....	12
2.2.3.3 BPV-Infektion beim Rind .....	12
2.2.3.4 Speziesfremde Infektionen .....	13
<b>2.3 Methoden des Gentransfers .....</b>	<b>13</b>
2.3.1 Transduktion .....	13
2.3.2 Transfektion .....	14
2.3.3 Magnetofektion .....	15
<b>2.4 Das Luciferase-Assay .....</b>	<b>16</b>
2.4.1 Biolumineszenz .....	16
2.4.2 Luciferin-Luciferase-Systeme .....	16
2.4.3 Firefly-Luciferase aus Photinus pyralis .....	17
2.4.4 Anwendung der Firefly-Luciferase .....	17
<b>2.5 Immunologische Grundlagen .....</b>	<b>18</b>
2.5.1 Major Histocompatibility Complex (MHC) .....	18
2.5.2 Zytokine .....	18
2.5.2.1 Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor .....	19
2.5.2.2 Interferon- $\gamma$ .....	19
<b>2.6 Tumorummunologie .....</b>	<b>20</b>
2.6.1 Tumorantigene .....	20
2.6.1.1 Tumorassozierte Antigene (TAAs) .....	21

2.6.1.2 Tumorspezifische Antigene (TSAs) .....	22
2.6.2 Tumor escape-Mechanismen .....	23
<b>2.7 Gentherapie in der Veterinär-onkologie .....</b>	<b>25</b>
<b>2.8 Zusammenfassung der Literaturrecherche .....</b>	<b>26</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Pferde und Tumormaterial .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2 Methoden .....</b>	<b>28</b>
3.2.1 Behandlung des Ausgangsmaterials .....	28
3.2.2 Zellkultur .....	29
3.2.2.1 Gewinnung von Einzelzellen .....	29
3.2.2.2 Passagieren der Zellen .....	30
3.2.2.3 Kryokonservierung .....	30
3.2.2.4 Lebend-Tot-Färbung .....	30
3.2.3 Nicht-viraler Gentransfer bei Zellen des Equinen Sarkoids mit Magnetofektion .....	30
3.2.3.1 Transfektionen .....	30
3.2.3.2 Magnetofektion .....	31
3.2.3.3 Messung der gebildeten Luciferase .....	32
3.2.3.4 Messung des gebildeten Zellproteins .....	32
3.2.3.5 Standardkurven .....	32
3.2.4 Stimulation equiner Sarkoidzellen mit feline(n) Zytokin-Genen .....	33
3.2.4.1. Transfektionen .....	33
3.2.4.2 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe .....	34
3.2.4.3 Fluoreszenzmarkierungen .....	34
3.2.4.4 Durchflusszytometrie .....	35
3.2.5 ELISA (Enzyme-linked-Immuno-sorbant-Assay) .....	36
<b>3.3 Hypothesen .....</b>	<b>37</b>
3.3.1 Arbeitshypothese der vorliegenden Arbeit .....	37
3.3.2 Nullhypothese der vorliegenden Arbeit .....	37
<b>3.4 Statistische Analyse und Darstellung der Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1 Pferde und Tumormaterial .....</b>	<b>38</b>
<b>4.2 Tumormaterial und pathologisch-histologische Untersuchung .....</b>	<b>39</b>

4.2.1 Untersuchung auf Bovine Papillomaviren.....	39
<b>4.3 Ergebnisse des nicht-viralen Gentransfers mittels Magnetofektion .....</b>	<b>40</b>
4.3.1 Vergleich vier verschiedener Transfektionsreagenzien.....	40
4.3.2 Einfluss des Magnetfeldes auf den Transfektionserfolg.....	41
4.3.2.1 Kulturmedium DMEM+FKS.....	41
4.3.2.2 Kulturmedium DMEM + autologes Pferdeserum.....	45
<b>4.4 Stimulation von Zelllinien Equiner Sarkoide mit feline Zytokin-Genen .....</b>	<b>49</b>
4.4.1 Stimulation equiner Sarkoidzellen mit pBfeIFN- $\gamma$ .....	49
4.4.2 Stimulation Equiner Sarkoidzellen mit pBfeGM-CSF.....	50
4.4.3 Stimulation Equiner Sarkoidzellen mit pBfeIFN- $\gamma$ und pBfeGM-CSF.....	51
4.4.4 Ergebnisse der ELISAs .....	52
4.4.4.1 Transfektion mit pBfeIFN- $\gamma$ .....	52
4.4.4.2 Transfektion mit pBfeGM-CSF.....	53
4.4.4.3 Transfektion mit pBfeIFN- $\gamma$ und pBfeGM-CSF.....	54
4.4.5 Korrelation zwischen MHC-I-Expression und Zytokinen im Überstand .....	55
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>56</b>
<b>5.1 Diskussion der Methode .....</b>	<b>56</b>
5.1.1 Kultur neoplastischer Fibroblasten.....	56
5.1.2 Transfektion primärer Zellen.....	56
5.1.3 Einsatz heterologer Zytokine.....	57
5.1.4 Nicht-viraler Gentransfer equiner Zellen .....	59
5.1.5 Statistische Auswertung .....	59
<b>5.2 Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>60</b>
5.2.1 Positiver Einfluss der Magnetofektion auf den Transfektionserfolg .....	60
5.2.2 Einfluss des Transfektionsreagenten auf den Transfektionserfolg.....	61
5.2.3 Einfluss des gewählten Kulturmediums auf den Transfektionserfolg .....	62
5.2.4 Einfluss der Transfektion heterologer Zytokingene .....	63
<b>5.3 Beantwortung der Fragen aus der Einleitung.....</b>	<b>65</b>
<b>5.4 Schlussfolgerungen.....</b>	<b>66</b>
<b>5.5 Weiterführende Untersuchungen .....</b>	<b>66</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>67</b>
<b>7 SUMMARY.....</b>	<b>69</b>

<b>8 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>71</b>
<b>9 ANHANG .....</b>	<b>95</b>
<b>9.1 Materialnachweis .....</b>	<b>95</b>
9.1.5 Zellkulturmedien und Zusätze .....	95
<b>9.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>98</b>
9.2.1 Abbildungsverzeichnis .....	98
9.2.2 Tabellenverzeichnis.....	100
<b>9.3 Zelllinien aus Equinen Sarkoiden .....</b>	<b>101</b>
<b>9.4 Multiple Testproblematik.....</b>	<b>102</b>

## Glossar und Verzeichnis der in Text und Abbildungen verwendeten Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikrolitrier
∅	Durchschnitt
Abb.	Abbildung
Antigen	Artfremder Stoff, der eine Immunantwort hervorruft
Antikörper	Abwehrstoff, der als Reaktion auf Antigene gebildet wird
APC	Antigen-präsentierende Zelle
autolog	körpereigen
BCG	Bacillus Calmette Guérin
BL	Burkitts Lymphom
bovin	lateinisch: dem Rind zugehörig
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beispielsweise
BPV-1 und -2	Bovines Papillomavirus 1 und 2
[c]	Konzentration
°C	Grad Celsius
CD4/CD8	Glykoproteine an der Oberfläche von Zellen des Immunsystems
cDNA	engl: complimentary DNA; DNS die mit dem Enzym Reverse Transkriptase aus RNA hergestellt wird
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Codon	Abfolge einer Sequenz von drei Nukleobasen (Basentriplet) der mRNA, die im genetischen Code für eine Aminosäure codiert
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanosin Abfolge der Nukleotidbasen in der DNA
d	Tag(e)
DC	Dendritische Zelle (Zellen des Immunsystems)
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulphoxid
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNA-Vakzination	Einbringen nicht-replizierender bakterieller Plasmide, die für bestimmte therapeutische Proteine kodieren
EBNA	Epstein-Barr nukleares Antigen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Gerinnungshemmer)
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay
Emulsion	Mischung zweier normalerweise nicht mischbarer Flüssigkeiten
engl.	Englisch
eq-	equin, lateinisch: dem Pferd zugehörig
EPV	Equines Papillomavirus
FACS	Fluorescence activated cell sorting (engl: Durchflusszytometrie)
fe-	felin, lateinisch: der Katze zugehörig
FIV	Felines Immunschwäche Virus
FKS	Fetales Kälberserum
ggf.	gegebenenfalls
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
h	Stunde(n)
hämatopoetisch	Blut bildend
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
heterolog	von fremder Herkunft, nicht übereinstimmend

homolog	stammesgeschichtlich übereinstimmend, von entwicklungsgeschichtlich gleicher Herkunft
HPV	Humanes Papillomavirus
HRP	horse radish peroxidase
IFN	Interferon (natürlich vorkommendes Glykoproteine)
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IL	Interleukin (körpereigener Botenstoff der Zellen des Immunsystems)
inert	reaktionslos, reaktionsträge
Immunogenität	Eigenschaft eines Stoffes, im menschlichen oder tierischen Körper eine als Immunantwort bezeichnete Reaktion des Immunsystems auszulösen
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
MAGE	Melanoma Antigen
MART/MELAN-A	engl: Melanoma Antigen recognized by T-Cells
MHC I/II	Major-Histokompatibility Complex I und II
mg	Milligramm
mRNA	engl: messenger RNA; RNA Transkript, das zu einem Teilabschnitt der DNA gehört
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD <sub>450</sub>	optische Dichte (im Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen)
Opsonierung	Mechanismus, durch den die Oberfläche von in den Körper eingedrungenen Fremdzellen mit Immunglobulinen (Ig) und Faktoren des Komplementsystems bedeckt wird
ORF	Open Reading Frame (Bereich der DNA, dessen Leserahmen zwischen einem Start- und einem Stopp-Codon liegt)
p	Signifikanzniveau
pg	Pikogramm
pBfeGM-CSF	Plasmid, welches für das feline Zytokin-Gen GM-CSF kodiert
pBfeIFN- $\gamma$	Plasmid, welches für das feline Zytokin-Gen IFN- $\gamma$ kodiert
pBluc	Plasmid, welches für das Enzym Luciferase kodiert
PBS	Phosphate-buffered-saline, engl. phosphatgepufferte Salzlösung
parenteral	Verabreichungsform für sterile Zubereitungen, die zur Injektion, Infusion oder Implantation in den menschlichen oder tierischen Körper bestimmt sind, unter Umgehung des Darms
Prävalenz	Kennzahl, die aussagt wie viele Individuen einer bestimmten Gruppe an einer Krankheit leiden
resp.	respektive
rhGM-CSF	rekombinanter humaner Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
Rituximab	monoklonaler Anti-CD-20 Antikörper
RNA/RNS	Ribonukleinsäure
s	Standardabweichung
s.	siehe
SAGE	Sarkoma Antigen
Serokonversion	Bildung spezifischer Antikörpern gegen Antigene eines Fremdkörpers im Rahmen einer Infektion oder einer Impfung
Sialomucin	Schleimstoff, dessen Kohlehydrat-Gruppen Sialinsäure enthalten
siRNA	small interfering RNA

s.o.	siehe oben
sog.	so genannt
ssm	Standardfehler
s.u.	siehe unten
TAA	Tumorassoziiertes Antigen
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-bufferd-saline
TF	Transfektion
tributär	Bezeichnung des Gebiets, welches ein Lymphknoten drainiert
TSA	Tumorspezifisches Antigen
UPM	Umdrehungen/Minute
Virion	extrazelluläres einzelnes Virusteilchen
Vitiligo	Pigmentstörung der Haut mit Ausbildung weißer, pigmentfreier Areale
Tab.	Tabelle
V./v.	Vene; lat.: vena
z.B.	zum Beispiel



# 1 EINLEITUNG

Mit der zunehmenden Nutzung des einstigen Arbeitstieres „Pferd“ als Sport- und vor allem Freizeitpartner haben sich sowohl die Lebensumstände als auch die Lebenserwartung der Tiere verändert. Damit einher geht die Zunahme vieler altersbedingter Erkrankungen, darunter die Tumorerkrankungen. Anders als viele Tumore, deren Inzidenz mit steigendem Alter der Individuen zunimmt, kommt das Equine Sarkoid, ein Hauttumor mit hoher Rezidivrate, schon bei sehr jungen Tieren vor (REES 2004; SUNDBERG et al. 1977). Durch diesen Tumor sind die Nutzung und der materielle Wert betroffener Tiere häufig eingeschränkt. Eine effektive und günstige Therapie zum Erreichen einer dauerhaften Heilung ist deshalb wünschenswert, bisher jedoch nicht verfügbar.

Die Vielzahl der von Tierärzten angewandten Behandlungsmöglichkeiten und deren unterschiedlicher Erfolg zeigen, dass es, neben den durch Tierhalter und Tierarzt beeinflussbaren Faktoren, auch Einflüsse des tierischen Organismus selbst auf den Behandlungserfolg geben muss. Deshalb wird neben der klassischen chirurgischen Tumorentfernung immer mehr auf begleitende oder alleinige medikamentöse Therapiemöglichkeiten gebaut. Dazu gehört auch die Immuntherapie, welche auf eine Stärkung der körpereigenen Abwehr ausgerichtet ist. Dabei halten, ausgehend von entsprechenden Therapiemöglichkeiten aus der Humanmedizin, vermehrt gentherapeutische Ansätze Einzug in die Tiermedizin. Allerdings bedeutet eine Immuntherapie immer ein gewisses Risiko, weshalb es selbstverständlich sein sollte, dass neue Therapieansätze zuerst ausreichend im *in vitro*-Verfahren erforscht werden.

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines neuen Therapieansatzes zur Behandlung Equiner Sarkoide. Dazu soll zunächst die Möglichkeit eines nicht-viralen Gentransfers bei primären Zellen des Equinen Sarkoids evaluiert werden. Zusätzlich soll untersucht werden, ob sich durch Einsatz physikalischer Methoden wie der Magnetofektion die Effizienz der Proteinproduktion verbessern lässt. Desweiteren soll geprüft werden, ob durch Transfektion heterologer Zytokine die Oberflächeneigenschaften primärer Zellen des Equinen Sarkoids verändert werden können.

Konkret soll dabei folgenden Fragen nachgegangen werden:

## **Hauptfrage:**

- Ist ein nicht-viraler Gentransfer bei Zellen des Equinen Sarkoids möglich und beeinflusst die Anwendung der Magnetofektion das Ergebnis des Gentransfers positiv?

## **Detailfragen:**

- Lassen sich durch Transfektion mit heterologen Zytokin-Genen die Oberflächeneigenschaften von Zellen des Equinen Sarkoids *in vitro* beeinflussen?
- Wirkt sich der Einfluss dieser Zytokine positiv im Hinblick auf eine Immuntherapie des Equinen Sarkoids aus?

## 2 LITERATUR

### 2.1 Das Equine Sarkoid

#### 2.1.1 Definition und Vorkommen

Equine Sarkoide sind nicht-metastasierende Hauttumore, die bei Pferden und anderen Equiden beschrieben sind. Aufgrund ihres lokal-invasiven Wachstums und ihrer Rezidivneigung wird diese Neoplasie als semimaligne eingestuft (MARTI et al. 1993). Equine Sarkoide sind nicht direkt lebensbedrohlich, sie verringern jedoch aufgrund ihres bevorzugten Auftretens an Stellen wie Gurt- und Sattellage und der damit verbundenen Nutzungseinschränkung den materiellen Wert bei Reit- und Kutschpferden. Hinzu kommen die Kosten für Behandlungen und die emotionale Belastung der Tierbesitzer, welche darüber hinaus oft zeitaufwendige Nachbehandlungen durchführen müssen (MARTI et al. 1993; GOODRICH et al. 1998). Die Prävalenz des Equinen Sarkoids bewegt sich zwischen 0,5 und 2 % (GERBER 1993; MARAIS et al. 2007), wobei in einigen Pferdepopulationen bis zu 11,9 % der Tiere von Sarkoiden betroffen sind (MELE et al. 2007; STUDER et al. 2007). Neben Pferden entwickeln auch Esel, Maulesel, Maultiere und Zebras Sarkoide (MARAIS et al. 2007). Der Anteil dieses Hauttumors an den Neoplasien bei Pferden beträgt 12,9 bis 67 % (SULLINS et al. 1986) und 90 % aller beim Pferd beschriebenen Hauttumore stellen eine Form des Equinen Sarkoids dar (MARTI et al. 1993).

#### 2.1.2 Histologie

Obwohl die Diagnose „Equines Sarkoid“ meist bereits klinisch aufgrund des charakteristischen Erscheinungsbildes getroffen werden kann, ist eine pathologisch-histologische Untersuchung notwendig, insbesondere um ein neoplastisch entartetes Gewebe von übermäßigem Granulationsgewebe zu differenzieren (GOODRICH et al. 1998; GERBER 1993; MARTI et al. 1993). Für die pathologisch-histologische Diagnose vor Therapiebeginn ist die Entnahme einer Biopsie notwendig, was jedoch einige Arten des Tumors zu aggressiverem Wachstum anregen kann (REES 2004). Die Diagnose stützt sich auf das Vorhandensein einer blutgefäßarmen, fibroblastischen Proliferation, bei der die Zellen moderat bis sehr dicht vorliegen und von einer von Tumor zu Tumor variablen Menge an Kollagen umgeben werden. Die Fibroblasten zeigen eine spindelförmige Morphologie und richten sich senkrecht zur Basalmembran aus, was als *picket fence* (engl. Lattenzaun) bezeichnet wird. Bei noch bestehender, intakter Epidermis kommt es zu einer *rete peg formation*, dem Ineinandergreifen von Epidermis und Dermis. Alle Formen des Equinen Sarkoids zeigen eine höhere Dichte an dermalen Fibroblasten verglichen mit normaler Haut. Allerdings ist die dermale Komponente bei Equinen Sarkoiden des nodulären und okkulten Typs (s.u.) oft weniger deutlich ausgeprägt. Fibroblastische Equine Sarkoide (s.u.) zeigen darüber hinaus oft eine Infiltration durch polymorphkernige Entzündungszellen (MARTENS et al. 2000). Die Diagnose „Equines Sarkoid“ beruht auf dem Vorhandensein der typischen dermalen und epithelialen Veränderungen (CARR et al. 2001b).

### 2.1.3 Klassifikation

Das Equine Sarkoid wird nach seiner Erscheinungsform in sechs verschiedene Formen eingeteilt (KNOTTENBELT 2008; REES 2004; PASCOE und KNOTTENBELT 1999):

Das *okkulte Equine Sarkoid* stellt sich als haarlose, hyperkeratotische Erhabenheit oder Knötchen dar. Diese finden sich vornehmlich an Körperoberflächen mit dünner, wenig behaarter Haut. Oft sind mehrere Läsionen mit einem Durchmesser von zwei bis fünf Millimeter zu finden. Das *verruköse Equine Sarkoid* ist durch eine warzenartige Umfangsvermehrung gekennzeichnet, die bevorzugt am Kopf, dem Körperstamm, am Präputium und in der Perianalgegend zu finden ist. Das Wachstum ist langsam, zusätzlich ist das verruköse Equine Sarkoid oft von verdickter Haut umgeben. Die *noduläre Form* stellt ein festes, erhabenes, unter der intakten Haut verschiebbares Gebilde dar. Oft tritt diese Form in großer Anzahl an Augenlidern, Leiste, Präputium und in der Perianalgegend auf. Das *fibroblastische Equine Sarkoid* entwickelt sich oft an Stellen vorausgegangener Traumatisierung der Haut oder als Rezidiv nach Entfernung anderer Formen des Equinen Sarkoids. Es ist von fleischigem, ulzeriertem Aussehen und kann mit Granulationsgewebe verwechselt werden. Das hauptsächliche Vorkommen ist an den Augenlidern, in der Leistengegend, am Präputium und an den distalen Gliedmaßen, beispielsweise am Kronrand. KNOTTENBELT (2008) unterscheidet zusätzlich zwei Arten des fibroblastischen Equinen Sarkoids. Der Typ 1 ist durch einen schmalen Stiel mit der Haut verbunden, wohingegen Typ 2 eine breite Basis besitzt. Die *gemischte Form* besteht meist aus Gewebe des verrukösen oder okkulten Typs, welches sich an der gleichen Stelle wie Gewebe des fibroblastischen bzw. nodulären Typs befindet. Oft kommt es nach Traumatisierung oder als Folge einer länger bestehenden Umfangsvermehrung zur Ausbildung des gemischten Typs. Davon sind besonders Tumore des okkulten oder verrukösen Typs nach Biopsien betroffen. Das *malevolente Equine Sarkoid* stellt eine Mischform zwischen dem fibroblastischen und dem okkulten Typ dar. Es besitzt einen lokalinvasiven Wachstumsverlauf, in Folge dessen es zu einer Vergrößerung der tributären Lymphknoten kommt. Die umgebenden Lymphgefäße entwickeln ein strangartiges Aussehen, allerdings ist in den vergrößerten Lymphknoten kein histologischer Nachweis eines fibroblastischen Tumors möglich. Trotz des lokalinvasiven Wachstumsverlaufs metastasiert das malevolente Equine Sarkoid selten.

### 2.1.4 Ätiologie

Bereits JACKSON (1936) erwähnt in seiner Erstbeschreibung des Equinen Sarkoids die Möglichkeit einer viralen Komponente bei der Entstehung dieses Tumors. Das gelegentlich gehäufte Auftreten von Neuerkrankungen innerhalb einer Population unterstützt diese Annahme. So beschreiben RAGLAND und Mitarbeiter (1966) eine Häufung Equiner Sarkoide in einer Herde, die aus Pferden verschiedener Rassen bestand. Während einer sechswöchigen Zeitspanne erkrankten 18 % der Tiere dieser Gruppe. Aufgrund der Neuerkrankungen nach Integration einer größeren Anzahl neuer Tiere in die Herde wurde eine infektiöse Ursache vermutet.

Der Nachweis viraler DNA der bovinen Papillomaviren-1 und -2 (BPV-1 und -2) in Equinen Sarkoiden ist mehrfach dokumentiert. OTTEN und Mitarbeiter (1993) untersuchten insgesamt 119 Gewebeproben von Pferden und Eseln auf das Vorhandensein von Genfragmenten boviner Papillomaviren mittels Polymerase-Kettenreaktion (engl.: Polymerase-Chain-

Reaction, PCR). Darunter waren 58 histologisch bestätigte Tumorproben von 32 Pferden und zwei Eseln. Alle diese Proben waren in der PCR-Untersuchung positiv, 55 Proben enthielten BPV-1 und drei Proben BPV-2 DNA. CARR und Mitarbeiter (2001a) konnten mittels PCR BPV DNA in 98 % der Tumore nachweisen, genau wie in 65 % der Proben normaler Haut erkrankter Tiere. Desweiteren können durch Übertragung von Warzenmaterial von Rindern kutane Zubildungen bei Pferden hervorgerufen werden, die äußerlich natürlich vorkommenden Equinen Sarkoiden ähneln. Diese experimentell hervorgerufenen Umfangsvermehrungen zeigen jedoch zu 100 % spontane Regression (RAGLAND und SPENCER 1969). Die Inokulation gesunder Pferde mit Tumormaterial aus Equinen Sarkoiden führt nicht zur Ausbildung entsprechender Zubildungen (CARR et al. 2001a), was darauf hinweist, dass es sich bei der Infektion von Pferden mit bovinen Papillomaviren um eine nicht-produktive Infektion handelt (CARR et al. 2001b).

Der Zusammenhang zwischen bovinen Papillomaviren und Equinem Sarkoid ist mittlerweile von unabhängigen Forschergruppen akzeptiert (NASIR und CAMPO 2008; YUAN et al. 2007; CHAMBERS et al. 2003a; NASIR und REID 1999; TRENFIELD et al. 1985). Darüber hinaus ist in Sarkoid-Proben das transformierende E5-Gen des bovinen Papillomavirus nachweisbar (CARR et al. 2001b). In Biopsiematerial Equiner Papillome ist dagegen das E5-Gen nicht zu finden, wodurch das Equine Papillomavirus als Auslöser Equiner Sarkoide ausgeschlossen werden kann (CARR et al. 2001a). Allerdings kann Genmaterial boviner Papillomaviren auch bei gesunden Pferden nachgewiesen werden, die weder in Kontakt mit erkrankten Pferden noch Rindern leben (BOGAERT et al. 2008; BOGAERT et al. 2005).

### 2.1.5 Prädisposition

Neben der Infektion mit Papillomaviren werden Kofaktoren als notwendig bzw. prädisponierend zur Ausbildung Equiner Sarkoide vermutet. Das gehäufte familiäre Auftreten wird als Hinweis auf eine vererbare Neigung oder Abwehrschwäche des Immunsystems angesehen (REES 2004). BROSTROM (1995) stellt eine Verbindung zwischen der Ausprägung verschiedener Allele des Equinen-Leukozyten-Antigens (ELA) und einer erhöhten Rezidivrate nach chirurgischer Entfernung (ELA-W13), einem frühen Auftreten der Erkrankung (ELA-A5) und einer allgemein erhöhten Prävalenz (ELA-A3W13) Equiner Sarkoide her. Diese Allele sind verantwortlich für die phänotypische Ausprägung des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes-II (engl.: Major-Histocompatibility-Complex II, MHC-II), welcher in der Immunantwort zur Antigenpräsentation nötig ist (s. 2.5.1). Ähnliche Häufungen von Equinen Sarkoiden bzw. Sommerkzemen bei Pferden mit bestimmten Ausprägungen der ELAs fanden LAZARY und Mitarbeiter (1994). Die Tatsache, dass mehr als 70 % der Sarkoide bei Pferden unter vier Jahren entstehen (REES 2004) stützt die Theorie einer genetischen Prädisposition.

ANGELOS und Mitarbeiter (1988) stellten retrospektiv fest, das Quarter Horses doppelt so häufig und Traber nur halb so oft wie Vollblüter Sarkoide entwickeln. Ähnliche Ergebnisse erhielten MOHAMMED und Mitarbeiter (1992), die darüber hinaus ein häufigeres Auftreten von Neuerkrankungen bis zu einem Alter von 15 Jahren feststellten.

Eine Traumatisierung der Haut in Form von Verletzungen oder selektiven Eingriffen (z.B. Kastration) wird ebenfalls als prädisponierender Faktor angesehen. So sehen MOHAMMED und Mitarbeiter (1992) die Begründung für ein gehäuftes Auftreten bei Wallachen im Vergleich zu Hengsten im vorausgegangen Trauma der Kastration. Bei Eseln konnte diese Annahme jedoch nicht bestätigt werden (REID und MOHAMMED 1997). Es wurde sogar ein häufigeres Vorkommen bei Eselhengsten im Vergleich zu Eselwallachen nachgewiesen (REID et al. 1994). Ein schützender Einfluss weiblicher Geschlechtshormone wird ebenfalls

diskutiert. In der untersuchten Eselpopulation nahm der Anteil an weiblichen, von Sarkoiden betroffenen Tieren mit dem Alter der Tiere zu. Hier wird der mit dem Alter nachlassende Einfluss der Geschlechtshormone für das häufigere Auftreten bei älteren Eselstuten angenommen (REID et al. 1994).

### 2.1.6 Behandlungsmöglichkeiten

Die Behandlungsmöglichkeiten Equiner Sarkoide umfassen chirurgische und medikamentöse Ansätze, sowie eine Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten:

#### Chirurgie

Zu den Möglichkeiten der chirurgischen Therapie gehören die alleinige konventionelle Entfernung, die Verödung der Umfangsvermehrung mit dem Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>)-Laser (CARSTANJEN et al. 1997) oder eine Kombination der beiden Behandlungen durch die Anwendung des Lasers am Tumorbett nach der blutigen Entfernung. Der CO<sub>2</sub>-Laser kombiniert das Schneiden mit einer gleichzeitigen Verödung des Gewebes, so dass eventuell verbleibende Tumorzellen absterben. Bei der alleinigen chirurgischen Entfernung wird von einer 50%igen Rezidivrate ausgegangen (DIETZ und HUSKAMP 1999) wohingegen nach der CO<sub>2</sub>-Laser Chirurgie lediglich zwischen 19 und 38 % der Equinen Sarkoide wiederkehren (CARSTANJEN et al. 1997).

#### Chemotherapie

Der Einsatz von Chemotherapeutika umfasst Zytostatika wie Cisplatin und 5-Fluorouracil (5-FU).

*Cisplatin* (cis-diammindichloroplatinum) besteht aus einem zentralen Platin-Ion, welches von zwei Chlor-Ionen und zwei Ammonium-Ionen in *cis*-Konfiguration umgeben ist. Das Molekül wird intrazellulär aktiviert, indem bei Anwesenheit von Wasser die Chlorid-Ionen abgespalten werden. Eine Aktivierung kann nicht in Anwesenheit großer Chlorid-Mengen stattfinden, wie z.B. in physiologischer Kochsalz-Lösung oder im Extrazellulärraum. Die antineoplastische Wirkung des Cisplatins beruht auf einer Blockade der DNA-Synthese. Durch Chloridabspaltung werden Bindungsstellen aktiviert, die an DNA-Basen ansetzen. Somit wird eine Replikation der DNA verhindert. Die Wechselwirkung des Cisplatins mit DNA soll darüber hinaus zur Bildung von Sauerstoffradikalen (engl.: Reactive oxygen species, ROS) beitragen, was zusätzlich (Krebs-) Zellen schädigt (BARABAS et al. 2008). Nebenwirkungen eines systemischen Einsatzes von Cisplatin sind Nephro-, Neuro- und Ototoxizität. Darüber hinaus ist die Ausbildung von Resistenzen gegenüber Cisplatin bekannt (BARABAS et al. 2008; FUERTES et al. 2003). Der Einsatz von Cisplatin in der Tiermedizin umfasst die Behandlung von Osteosarkomen, Übergangszell- und Plattenepithelkarzinomen beim Hund und Hauttumoren beim Pferd (BARABAS et al. 2008). Die Behandlung beim Pferd beruht auf der lokalen intra- oder peritumoralen Applikation von 1 mg Cisplatin pro cm<sup>3</sup> Tumorgewebe in einer Emulsion mit Sesamöl (REES 2004). THEON und Mitarbeiter veröffentlichten 2007 eine retrospektive Studie über den Einsatz von Cisplatin zur Therapie von Hauttumoren bei Pferden. Die Behandlung erfolgte durch viermalige intra- oder peritumorale Injektion einer Cisplatin-Öl-Emulsion in zweiwöchigen Abständen. Die Studie beinhaltete unter anderem 386 Pferde mit 409 Equinen Sarkoiden wovon 96 % der Patienten innerhalb von zwei Jahren nach einmaliger Behandlung rezidivfrei waren. Allerdings wurden in diese Studie sowohl Pferde mit als auch ohne zusätzliche chirurgische (Teil-) Entfernung der Umfangsvermehrungen aufgenommen.

Die zytostatische Wirkung von *5-Fluorouracil* (5-FU) beruht auf seiner Strukturähnlichkeit mit den Pyrimidinbasen Cytosin und Thymidin (DNA) und Uracil (RNA). Der Einbau von 5-FU in die Nukleinsäuresequenz macht die entstehende DNA funktionslos. In einer Studie zur Behandlung Equiner Sarkoide mit 5-FU konnten STEWARD und Mitarbeiter (2006) bei 61,5 % der Patienten Rezidivfreiheit innerhalb eines dreijährigen Beobachtungszeitraums erreichen. Allerdings schließt diese lediglich 14 Patienten ein und es wurden sowohl Erstbehandlungen als auch Rezidive nach vorhergehenden Therapieversuchen in die Studie aufgenommen. Das Behandlungsregime umfasste die alleinige intratumorale Injektion von 5-FU (50 mg/cm<sup>3</sup> Tumormasse) bei Tumoren < 5 cm<sup>3</sup> oder in Kombination mit chirurgischer Entfernung bei größeren Tumoren. Die Injektionen erfolgten in zweiwöchigen Abständen und es wurden maximal sieben Injektionsbehandlungen durchgeführt. Als Nebenwirkungen einer systemischen 5-FU-Behandlung können hämatologische Veränderungen (Leukopenie, Anämie, Thrombozytopenie), Hautirritationen (Dermatitis, Krustenbildung, Alopezie, Photosensitivität) und neurologische Ausfälle (Ataxie, Konzentrationsprobleme) auftreten (HAN et al. 2008; HANSEN et al. 1989). Eine weitere Veröffentlichung beschreibt die lokale Behandlung mit einer 5%igen 5-FU-Salbe bei drei Pferden mit Plattenepithelkarzinom (PATERSON 1997).

### **Immuntherapie**

Immuntherapeutische Ansätze haben zum Ziel, die Immunogenität eines Tumors zu erhöhen und somit dem Immunsystem die Chance zur Elimination der Läsion zu geben.

*Bacillus Calmette Guérin* (BCG) wurde ursprünglich als Tuberkulose-Impfstoff für den Menschen eingeführt. Die Behandlung mit diesem mikrobiologischen Produkt stellte lange die häufigste immuntherapeutische Behandlung Equiner Sarkoide dar. Der Einsatz des kommerziellen BCG-Impfstoffes, der aus ganzen inaktivierten Mikroorganismen besteht, kann allerdings bei wiederholtem Einsatz zu Todesfällen durch anaphylaktische Schockreaktionen führen (RUSH und FLAMINIO 2000; VANSELOW et al. 1988; WINSTON et al. 1979). Weitere Studien zur Behandlung Equiner Sarkoide mit BCG verwendeten mikrobielle Zellwandbestandteile. OWEN und JAGGER (1987) berichten von einem erfolgreichen Einsatz dieser mikrobiellen Zellwandbestandteile zur Behandlung periokulärer Sarkoide. In der Studie verschwanden die Umfangsvermehrungen um die Augen nach durchschnittlich vier Injektionen. Dabei blieben alle Tiere (7/7) acht Monate nach der letzten Behandlung rezidivfrei. Pferde, deren Sarkoide anderer Lokalisationen im Rahmen der Studie gleichartig behandelt wurden, zeigten nur zu 20 % Rezidivfreiheit. Eine weitere Studie zur Immuntherapie mit Zellwandbestandteilen von BCG wurde von VANSELOW und Mitarbeitern (1988) durchgeführt. Erkrankte Tiere erhielten bis zu vier Injektionen einer Emulsion, die bei 59 % der behandelten Tiere zu einer völligen Regression und bei 18 % zu einem Rückgang der Tumorgöße führte. Insgesamt erhielten in dieser Studie 24 Tiere wiederholte Behandlungen, wovon ein Tier aufgrund eines anaphylaktischen Schocks verstarb, obwohl lediglich Zellwandbestandteile von BCG verwendet wurden. Aufgrund der Risiken einer solchen Behandlung und der fehlenden Verfügbarkeit von BCG wird eine derartige Immuntherapie zur Behandlung Equiner Sarkoide in Deutschland nicht durchgeführt.

ESPY (2008) behandelte 15 Pferde durch Transplantation von autologem, in flüssigem Stickstoff gefrorenem Tumormaterial unter die Haut des Mähnenkamms. Bei zwölf Tieren erfolgte eine komplette Regression des Tumors. Die Zeitspanne bis zum Verschwinden der Tumore erstreckte sich über 90 bis 180 Tage. Auch KINNUNEN und Mitarbeiter (1999) wendeten eine autologe Vakzine bei primären und rezidivierenden Equinen Sarkoiden an. Dabei verschwanden die Tumore bei elf von zwölf Pferden mit primären und bei fünf von neun Pferden mit rezidivierenden Sarkoiden.

Die Ergebnisse eines Therapieversuchs mit einem kommerziell erhältlichen unspezifischen Immunstimulans (Baypamun<sup>®</sup>, Bayer AG, Leverkusen, heute Zylexis<sup>®</sup>) zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Tumorrückgangs im Vergleich zur Behandlung mit einem Placebo. Dagegen wurde ein Einfluss der Dauer der bestehenden Erkrankung festgestellt, da Sarkoide, die weniger als drei Monate bestanden, häufiger eine spontane Regression zeigten (STUDER et al. 1997).

SPOORMAKERS und Mitarbeiter (2003) dagegen behandelten gesamt 35 Pferde und einen Esel mit wiederholten intra-tumoralen Injektionen des pro-inflammatorischen Zytokins Interleukin-2 (IL-2) über fünf bzw. zehn Tage. Das Ergebnis wurde mit der kombinierten Behandlung einer hohen Dosis an intratumoralem IL-2 und Cisplatin verglichen. Ein Jahr nach Therapie konnten signifikante Unterschiede zwischen den drei Behandlungsgruppen gezeigt werden, wobei 36 und 50 % der Tiere, die nur mit IL-2 behandelt wurden, Tumorfreiheit zeigten. In der Gruppe, die mit einer Kombination aus Cisplatin und einer hohen Dosis IL-2 behandelt wurden, waren sogar 80 % ohne Sarkoid(e).

Viele der Präparate, die eine Behandlung Equiner Sarkoide durch immunologische Ansätze zum Ziel haben, sind als Salben verfügbar. Der Vorteil einer lokalen Salbenbehandlung liegt bei der Anwendbarkeit durch die Besitzer, allerdings sind die Präparate meist nur über spezialisierte Kliniken erhältlich und die Dauer der Behandlung erstreckt sich über mehrere Wochen. NOGUEIRA und Mitarbeiter (2006) berichten vom Einsatz einer Salbe mit dem Wirkstoff *Imiquimod* (ein Imidazoquinolin-Derivat), welches in der Lage ist, die Immunantwort erkrankter Gewebe zu verändern und bereits beim Menschen zur Behandlung genitaler Warzen eingesetzt wurde. Von den in dieser Studie untersuchten und verfolgten Tumoren erfuhren 80 % eine Größenreduktion um mehr als drei Viertel und 60 % der Umfangsvermehrungen verschwanden vollständig.

Eine weitere Salbe zur topischen Behandlung (*XX-Terra*; University of Colorado) enthält Sanguinarin, ein Benzophenanthridin-Alkaloid aus der Wurzel der kanadischen Blutwurz (*Sanguinaria canadensis*) und Zinkchlorid. Sanguinarin besitzt antineoplastische, antimikrobielle und anti-inflammatorische Eigenschaften (CHATURVEDI et al. 1997; LENFELD et al. 1981). In einer Studie konnte die selektive Wirkung von Sanguinarin *in vitro* auf Zellkulturen des humanen epidermalen Karzinoms nachgewiesen werden. In dieser Veröffentlichung induzierte der Wirkstoff den nekrotischen Zelltod der Krebszellen, wohingegen Zellkulturen von Hautfibroblasten nicht beeinträchtigt wurden (AHMAD et al. 2000). Zur Behandlung Equiner Sarkoide mit diesem Wirkstoff existieren allerdings noch keine Veröffentlichungen.

## 2.2 Papillomaviren

Zurzeit sind 118 Papillomaviren genauer beschrieben, davon 96 humane Papillomaviren (HPV) und 22 Papillomaviren verschiedener Tierspezies. Obwohl beim Menschen am intensivsten erforscht, können Papillomaviren bei allen näher untersuchten Säugetieren, mit Ausnahme von Labormäusen, und bei Vögeln nachgewiesen werden (DE VILLIERS et al. 2004; ZUR HAUSEN und DE VILLIERS 1994). Das Genom der Papillomaviren liegt als zirkuläre Doppelstrang-DNA mit einer Größe von ca. acht Kilobasen (kb) vor. Die drei Onkoproteine E5, E6 und E7 regulieren den Transformations-Prozess einer infizierten Zelle, zwei regulatorische Proteine, E1 und E2, steuern die Replikation und Transkription und zwei strukturelle Proteine L1 und L2 stellen die Virushülle dar (NASIR und CAMPO 2008). Zu den ersten Papillomaviren, deren Genom sequenziert werden konnte, gehört das Bovine Papillomavirus-1 (BPV-1) (CHEN et al. 1982). Das offene Leseraster (engl.: open reading

frame, ORF) von L1 ist das am besten konservierte Gen der Papillomaviren und wird zur Identifikation neuer Isolate herangezogen. Verschiedene Genera besitzen weniger als 60 % Übereinstimmung in der Nukleotid-Sequenz des L1 ORF. Innerhalb eines Genus werden mehrere Spezies versammelt. Diese besitzen untereinander eine 60 – 70%ige Homologie der Nukleotid-Sequenzen. Desweiteren sind innerhalb einer Spezies die Nukleotid-Sequenzen des L1 ORF verschiedener Papillomavirus-Typen zu 71 – 89 % konserviert (DE VILLIERS et al. 2004).

### **2.2.1 Immunologie der Papillomaviren**

Der virale Replikationszyklus der Papillomaviren findet innerhalb von Keratinozyten statt und komplette Virione verlassen anschließend die infizierte Zelle während des Abschuppungsprozesses (Desquamation). Dadurch kommt es zu einer nur geringen lokalen und systemischen Präsentation viraler Antigene durch professionelle antigen-präsentierende Zellen (APCs) (FRAZER 1996). Diese Eigenschaften erlauben es dem Virus, latent in gesundem epithelialem Gewebe vorhanden zu sein (FRAZER 1996; CAMPO 2002). Anteile des viralen Genoms sind auch in zirkulierenden Lymphozyten von Menschen und Rindern (CAMPO 1997), sowie bei an Equinen Sarkoiden erkrankten Pferden nachweisbar (BRANDT et al. 2008).

### **2.2.2 Papillomaviren und Krebs**

In der Humanmedizin wird angenommen, dass weltweit ca. 20 % der Neoplasien auf Infektionen zurückgeführt werden können (DAMANIA 2007). Dafür sind in 15 % der Fälle DNA-Viren verantwortlich, gefolgt von Bakterien (*Helicobacter pylori*) und parasitischen Einzellern (ZUR HAUSEN 2001).

Bei Frauen sind 12 % der Krebserkrankungen Gebärmutterhalskarzinome (ZUR HAUSEN 2002). Zu Beginn der 80er Jahre konnten direkt aus Biopsien von Gebärmutterhalskrebs anogenitale humane Papillomaviren isoliert werden (BOSHART et al. 1984; DÜRST et al. 1983) und diese Neoplasie ist die erste, deren infektiöse Ursache von der WHO anerkannt wurde (BOSCH et al. 2002). Verantwortlich für Gebärmutterhalskrebs sind sog. *high-risk papillomaviruses*, zu denen die Humanen Papillomaviren (HPV)-16 und -18 gehören. Obwohl bis zu 95 % der Infektionen selbstlimitierend sind und innerhalb von Monaten oder Jahren verschwinden, kann sich in 5 % der Infektionen Krebs entwickeln (FRAZER 2004). Die Onkogene E6 und E7 humaner Papillomaviren verändern die intrazelluläre Expression von Genen. Sie verhindern die Differenzierung epithelialer Zellen und das damit verbundene Aussetzen des Zellzyklus. Wird das virale Episom in die Wirts-DNA integriert, verliert das E2-Gen seine regulierende Wirkung auf E6 und E7, was zu dysplastischem Epithel als Vorstufe einer malignen zervikalen Läsion führen kann (WOODMAN et al. 2007; FRAZER 2004).

## 2.2.3 Bovine Papillomaviren

### 2.2.3.1 Einteilung

Es sind zehn verschiedene Typen des Bovinen Papillomavirus bekannt, die vier verschiedenen Genera angehören (NASIR und CAMPO 2008). Zu den Delta-Papillomaviren gehören BPV-1 und BPV-2, die sowohl das Epithel als auch die anliegende Dermis infizieren und Fibropapillome verursachen. Dagegen sind Xi-Papillomaviren epitheliotroph, d.h. sie infizieren ausschließlich Epithelien und induzieren damit echte Papillome. Dazu gehören BPV-3; BPV-4; BPV-6; BPV-9 und BPV-10. Ein weiteres Genus besitzt Eigenschaften sowohl der Delta- als auch der Xi-Papillomaviren und verursacht sowohl Fibropapillome als auch epitheliale Papillome. Zu diesem Genus der Epsilon-Papillomaviren gehören BPV-5 und BPV-8. BPV-7 wurde 2007 erstmals aus Gewebe von japanischen Rindern isoliert und aufgrund phylogenetischer Analysen einem neuen Genus zugeordnet (OGAWA et al. 2007).

### 2.2.3.2 Onkoprotein E5 der Bovinen Papillomaviren

Das Onkoprotein E5 stellt das wichtigste transformierende Protein der Bovinen Papillomaviren, besonders BPV-1, dar. In 95 % der untersuchten Proben Equiner Sarkoide ist BPV-E5 nachweisbar, wobei in 85 % ebenfalls mRNA-Transkripte dieses Proteins vorliegen (CHAMBERS et al. 2003b). Es befindet sich im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat der Wirtszellen. Das Protein aktiviert Wachstumsfaktoren und interagiert mit den MHC-I-Molekülen der Wirtszelle. Die intrazelluläre Produktion von mRNA, die für MHC-I-heavy-chain Moleküle kodiert, wird durch BPV-E5 vermindert und die intrazellulären Anteile an MHC-I-Molekülen erhöht (ASHRAFI et al. 2002; MARCHETTI et al. 2002). ASHRAFI und Mitarbeiter (2002) konnten *in vitro* eine verminderte Ausprägung von MHC-I-Molekülen auf Rinderzellen und einer standardisierten Zelllinie aus Mausfibroblasten, die das Onkoprotein E5 exprimieren, nachweisen. In natürlich vorkommenden Papillomen des Rindes ist ebenfalls die MHC-I-Expression vermindert, was als Ursache für das lange Bestehen der Umfangsvermehrungen angenommen wird. (ARAIBI et al. 2004). In-vitro-Experimente zeigen, dass durch BPV-1 E5 in fetalen Pferdezellen ebenfalls die Transkription der MHC-I-heavy-chain-Moleküle vermindert wird und eine Retention von MHC-I-Komplexen im Golgi-Apparat erfolgt (MARCHETTI et al. 2009).

### 2.2.3.3 BPV-Infektion beim Rind

Die Infektion mit BPV führt bei Rindern zu gutartigen, in der Regel spontan verschwindenden Papillomen der Haut oder Schleimhaut (CAMPO 2002). Das Krankheitsbild bei Rindern variiert je nach infizierendem Virustyp. Dazu gehören Hautwarzen (BPV-1 und BPV-2) und Papillome im oberen Verdauungstrakt (BPV-4) sowie Papillomatose an Zitzen, Euter (BPV-1, BPV-3, BPV-5) und Penis (BPV-1). Neben den gutartigen Verlaufsformen der Infektion sind BPV-1 und BPV-2 an der Entstehung von Karzinomen des Urogenitaltrakts (CAMPO 1997; YUAN et al. 2007) und BPV-4 an Neoplasien des oberen Verdauungstraktes (CAMPO 1997) beteiligt. Ausschlaggebend für die Entstehung maligner Neoplasien ist die Aufnahme von Adlerfarn durch BPV-infizierte Tiere. Adlerfarn enthält neben immunsupprimierenden Stoffen Quercetin, ein mutagenes und kanzerogenes Flavonoid. In Gegenden, in denen die

Pflanze natürlich vorkommt, leiden Rinder regelmäßig an chronischer enzootischer Hämaturie, ausgelöst durch Neoplasien des Urogenitaltraktes wie Hämangiome, Hämangiosarkome, Übergangszellkarzinome, Fibrome und Adenokarzinome (YUAN et al. 2007). CAMPO und Mitarbeiter (1992) konnten experimentell das synergistische Zusammenspiel der Fütterung von Adlerfarn und der Infektion mit Papillomaviren im Hinblick auf die Entstehung von Blasenkrebs bei Rindern nachweisen. In dieser Studie führte jedoch die alleinige Gabe von Quercetin an BPV-infizierte Tiere nicht zu Neoplasien, was die Notwendigkeit einer zusätzlichen Immunsuppression zur Entstehung maligner Entartung verdeutlicht.

#### 2.2.3.4 Speziesfremde Infektionen

Wie alle Papillomaviren gelten auch die Bovinen Papillomaviren als spezies-spezifisch (SMITH et al. 1984; FRAZER 1996). Eine Ausnahme stellen BPV-1 und seltener auch -2 dar, die als Ursache des Equinen Sarkoids des Pferdes (NASIR und CAMPO 2008; CARR et al. 2001a; TRENFIELD et al. 1985) und genitaler Warzen beim Wasserbüffel (SILVESTRE et al. 2009) angesehen werden. Damit sind diese Papillomaviren die einzig bekannten, die unter natürlichen Bedingungen in der Lage zu speziesfremden Infektionen (engl.: cross-species infection) sind. Diese Infektionen führen nicht zur Produktion kompletter viraler Partikel, da dies nur in differenzierten Keratinozyten des natürlichen Wirts möglich scheint (CARR et al. 2001b). Unter experimentellen Bedingungen können darüber hinaus Mäuse, Hamster, Pfeifhasen und Ratten infiziert werden. Bei Hamstern lassen sich durch BPV-1 experimentell transplantierbare Sarkome erzeugen (JAUREGUIBERRY et al. 1983)

### 2.3 Methoden des Gentransfers

Im Hinblick auf eine genterapeutische Anwendung von (Fremd-) DNA ist der Einsatz von Vektoren in Form sog. „Genfähren“ notwendig, da die Applikation „nackter“ DNA zu geringe Effizienz besitzt und für einen systemischen Gebrauch nicht geeignet ist (GARDLIK et al. 2005; EL-ANEED 2004). Der Vektor erfüllt mehrere Funktionen, indem er das Eindringen der Genprodukte in Zellen und Zellkerne ermöglicht, vor Degradierung schützt und für die Transkription der Gene in den Zielzellen sorgt (GARDLIK et al. 2005). Dabei lässt sich die *Transduktion*, welche den Einsatz viraler (biologischer) Vektoren umfasst, von der *Transfektion* als Möglichkeit des nicht-viralen Gentransfers unterscheiden.

#### 2.3.1 Transduktion

Transduktion ist definiert als eine nicht-replizierende Infektion, mit der funktionelle genetische Information über einen modifizierten Vektor in die Zielzelle eingebracht wird (KAY et al. 2001). Die Methode bedient sich rekombinanter Viren als Vektoren für den Gentransfer. Im Gegensatz zu sog. Wildtyp-Viren fehlen diesen Viren Gene, die für die Replikation viraler Partikel, das Zusammenfügen zu neuen Viren und eine aktive Infektion der Zielzellen notwendig sind. Ihr Hauptvorteil ist der effektive und schnelle Gentransfer. Die Produktion dieser rekombinanten Viren findet in Verpackungszelllinien statt (engl.: packaging cell lines, PCLs). Diese produzieren Capsidproteine, die dem Virus fehlen, und

ersetzen ihm damit die verlorenen Funktionen. Allerdings kann das rekombinante Virus aufgrund von Interaktionen mit der Wirtszelle während des Replikationsprozesses die Gene, die ihnen infektiöses Potential verleihen, zurückgewinnen und im Gegenzug therapeutische Gene eliminieren. Sie besitzen dann wieder alle Eigenschaften des Wildtyps (GARDLIK et al. 2005; NIIDOME und HUANG 2002). Unerwünschte Effekte sind darüber hinaus akute Toxizität durch das Einbringen von fremdem biologischen Material, Immunreaktionen gegen transduzierte Zellen bzw. therapeutische Genprodukte und die Möglichkeit von insertionellen Mutationen durch bestimmte, sich integrierende Vektoren. Darüber hinaus ist die Produktion dieser biologischen Vektoren aufwendig und die Menge an Genen, die in Zielzellen geschleust werden können, begrenzt (GARDLIK et al. 2005; EL-ANEED 2004; KAY et al. 2001). Einsatz als Vektoren finden Herpesviren, Adenoviren, Retroviren, Poxviren, Alphaviren und Adeno-assoziierte Viren (GARDLIK et al. 2005, KAY et al. 2001). Einige dieser Vektoren lassen die Wirtszelle unbeschädigt (nicht-lytische Viren), andere wiederum zerstören diese jedoch im Zuge des Replikationsprozesses (lytische Viren).

### 2.3.2 Transfektion

Nicht-virale Vektoren stellen eine sichere und technisch einfache Möglichkeit des Gentransfers dar. Sie bilden Komplexe mit DNA, welche therapeutische Gene enthält, und erleichtern die Aufnahme in die Zielzellen (GOVERDHANA et al. 2005). Ihre Produktion ist in großer Menge durchführbar und sie rufen nur milde Reaktionen des Immunsystems hervor, weshalb wiederholte Anwendungen problemlos möglich sind (GARDLIK et al. 2005). Allerdings ist ihre Effizienz verglichen mit biologischen Vektoren geringer. Verschiedene Ansätze wie die Elektroporation, die *gene gun*-Methode, der therapeutische Ultraschall, der Einsatz kationischer Lipide oder die Magnetofektion (s. 2.3.3.), verbessern den Erfolg eines nicht-viralen Gentransfers.

Bei der *Elektroporation* erzeugen kurze elektrische Impulse ein Transmembranpotential. Alle Protokolle bedienen sich der lokalen Injektion von „nackter“ oder Plasmid-DNA, gefolgt von der Einwirkung eines elektrischen Feldes, um die Aufnahme durch die Zielzellen zu erhöhen. Dieses verursacht kleine Poren in der Zellwand wodurch die DNA leichter in die Zelle eindringen kann (GARDLIK et al. 2005). Gewebe, die sich für die Anwendung dieser Methode besonders eignen, sind Haut und Muskeln (NIIDOME und HUANG 2002).

Die *gene gun*-Methode bedient sich kleiner Goldkugeln, die mit Plasmiden beschichtet und unter Druck in Gewebe gedrückt werden (JANEWAY 2007; LOEHR et al. 2000). In einer Studie zur DNA-Immunsation von Mäusen konnte eine 5000fach höhere Effizienz der *gene gun*-Methode, verglichen mit dem alleinigen Einsatz „nackter“ DNA erreicht werden (PERTMER et al. 1995).

Im Gegensatz zum diagnostischen Ultraschall, der mit niedriger Energie und hoher Frequenz arbeitet, induziert der *therapeutische Ultraschall* durch Schallwellen hoher Energie und niedriger Frequenz eine vorübergehende Perforation der Zellmembran (WELLS 2010). Dieser Effekt wird als *Sonoporation* bezeichnet und ermöglicht das Eindringen kleiner Moleküle und DNA in die Zellen (MILLER et al. 2002). Durch die Kombination von Ultraschall und Nanopartikeln aus Luft oder inertem Gas, das von einer Proteinhülle umgeben ist (sog. Mikrobläschen, engl.: *microbubbles*), lässt sich der Kontrast des diagnostischen Ultraschalls verbessern. Gleichzeitig werden die Mikrobläschen durch die Schallwellen in Schwingung versetzt und induzieren so ebenfalls eine transiente Perforation der umgebenden Zellen

(WELLS 2010). Die Kombination von Schallwellen und Nanopartikeln erlaubt Gentransfer bei niedriger Frequenz und niedriger Energie (NEWMAN und BETTINGER 2007).

Als synthetische Genföhren für den non-viralen Gentransfer werden hauptsächlich zwei Arten von Reagenten verwendet, *kationische Polymere* wie Poly-L-Lysine (PLL) oder Polyethylenimine (PEI) und *kationische Lipide* (GARDLIK et al. 2005; GOVERDHANA et al. 2005). Diese Arten des Gentransfers werden demzufolge als Polyfektion bzw. Lipofektion bezeichnet. Die negative geladene DNA bildet einen Komplex mit den positiv geladenen Transfektionsreagenten, was eine Aufnahme in die Zielzellen durch Endozytose ermöglicht. Lipide gehören zu den meist verwendeten Vektoren für einen nicht-viralen Gentransfer und bestehen aus einem kationischen Kopfteil, der mit einem hydrophoben Lipid verbunden ist. Die kationische Ladung bewirkt eine Bindung der negativen DNA, und das hydrophobe Gerüst bewirkt eine Selbstassoziation des Vektors. Die Gebilde aus DNA und kationischen Lipiden bezeichnet man als Lipoplexe (EL-ANEED 2004; MASSON et al. 2003). Der Einsatz kationischer Lipide beschränkt sich hauptsächlich auf In-vitro-Experimente und nur in 12,8 % der klinischen Studien, die Gentransfer anwenden, werden Lipoplexe eingesetzt (MASSON et al. 2003).

### 2.3.3 Magnetofektion

Die Effizienz eines nicht-viralen Gentransfers lässt sich durch Einsatz der noch neuen Methode der Magnetofektion (MF) verbessern. Dabei werden Genvektoren mit superparamagnetischen Nanopartikeln (meist Eisenoxid) assoziiert, die zur Stabilisierung mit kationischen Polymeren, wie zum Beispiel Polyethylenimin (PEI) beschichtet sind. Anschließend werden sie dem Einfluss eines Magnetfeldes ausgesetzt, was eine zielgerichtete Transfektion von Zellen ermöglicht (PLANK et al. 2003; SCHERER et al. 2002). Ein Neodymium-Eisen-Bor-Magnet (Nd-Fe-B), der in der Lage ist, ein starkes Magnetfeld zu erzeugen, bewirkt, dass bereits nach einer kurzen Inkubationszeit von zehn Minuten die meisten Zellen *in vitro* transfiziert werden können. Bei den konventionellen nicht-viralen Transfermethoden dauert die Transfektion zwei bis vier Stunden (SCHERER et al. 2002). Erwähnenswert bei dieser Methode ist, dass die Effizienz der Magnetofektion bei geringeren Konzentrationen an DNA stärker hervortritt, was sich positiv auf die Viabilität der transfizierten Zellen auswirkt (ZHOU et al. 2007; PLANK et al. 2003; KROTZ et al. 2003a; SCHERER et al. 2002).

Die Magnetofektion ermöglicht darüber hinaus einen erfolgreichen Gentransfer besonders bei primären Zellen, die normalerweise schwer transfizierbar sind. KROTZ und Mitarbeiter (2003a) konnten bei kultivierten humanen Endothelzellen aus der Nabelvene mittels Magnetofektion einen erfolgreichen Gentransfer erzielen. Dagegen erfordern Transfektionsversuche mit Hilfe kationischer Lipide oft hohe Dosen an Vektor und DNA, worauf die Zellen mit Apoptose und der Bildung von Sauerstoffradikalen reagieren. GERSTING und Mitarbeiter (2004) transfizierten sowohl standardisierte Zelllinien als auch primäre Epithelzellen der Trachea mit dem Luciferase-Reportergen. Durch Anwendung der Magnetofektion konnte bei Zelllinien aus Lungenepithel eine 400- und 2500fache Steigerung der Genexpression gegenüber dem alleinigen Ansatz der Poly- und Lipofektion erreicht werden. Auch in dieser Studie erfolgte die maximale Expression des Transgens bereits nach erheblich kürzerer Zeit. Primäre Zellen aus humanem Lungenepithel zeigten bei Einsatz der Magnetofektion eine bis zu 60fach stärkere Genexpression als bei alleinigem nicht-viralem Gentransfer.

Diese Vorteile machen die Methode besonders für einen Einsatz *in vivo* interessant. Dieselbe Arbeitsgruppe von KROTZ und Mitarbeitern (2003b) beschreiben den erfolgreichen Einsatz der Magnetofektion *in vivo*, bei der nach Injektion einer DNA-Magnetpartikel-Lösung in die Femoralvene von Mäusen die Genexpression im Musculus cremaster beurteilt wurde. Durch Einwirkung des Magnetfeldes konnte die DNA im Muskel der jeweiligen Seite akkumuliert werden, wohingegen dies im entsprechenden Muskel der Gegenseite ohne Einwirkung des Magnetfeldes nicht möglich war.

*In vivo* wurde die Methode ebenfalls erfolgreich zur Verbesserung der Immunantwort nach intramuskulärer DNA-Vakzination von Mäusen und Kaninchen angewendet. Nach Einbringen der DNA mit Magnetofektion konnte schon nach einer Woche bei allen behandelten Mäusen Serokonversion beobachtet werden, wohingegen dies nach Injektion nackter DNA erst nach fünf Wochen erreicht wurde (ZHOU et al. 2007). Auf klinische Studien, in denen die Methode angewandt wurde, wird in Kapitel 2.8 eingegangen.

## 2.4 Das Luciferase-Assay

### 2.4.1 Biolumineszenz

Dieser Begriff bezeichnet eine chemische Reaktion der Lichterzeugung (Chemilumineszenz), an der mindestens zwei, unter physiologischen Bedingungen in oder in Verbindung mit einem Organismus vorkommende, Moleküle beteiligt sind. Dabei wird das Substratmolekül als Luciferin und das umwandelnde Enzym als Luciferase bezeichnet (GREER und SZALAY 2002). Die Effizienz der Lichterzeugung wird als Quantenausbeute (engl.: *quantum yield*) bezeichnet und stellt das Verhältnis der erzeugten Photonen zur Anzahl der reagierenden Moleküle dar (SELIGER und MC ELROY 1960; WHITE et al. 1971).

### 2.4.2 Luciferin-Luciferase-Systeme

Als *Luciferase* wird ein Enzym bezeichnet, welches in einem Biolumineszenz-System an der Erzeugung von Licht beteiligt ist. Es handelt sich hierbei um einen künstlichen Sammelbegriff, da keine der vorkommenden Enzyme Sequenzhomologien zeigen. Aus phylogenetischen Analysen lässt sich ableiten, dass Luciferin-Luciferase-Systeme aus mehr als 30 voneinander unabhängigen Systemen stammen. Diese vielen bekannten Biolumineszenz-Systeme lassen sich grob in fünf Gruppen einteilen (GREER und SZALAY 2002):

- **Bakterielles Luciferin:** Dabei handelt es sich um ein reduziertes Riboflavin-Phosphat, welches von einer Luciferase zusammen mit einem langkettigen Aldehyd und einem Sauerstoff-Molekül oxidiert wird.
- Das **Luciferin aus Dinoflagellaten** ähnelt dem Porphyrin des Chlorophylls. Im Dinoflagellaten *Gonycaulax* ist dieses Luciferin bei einem pH von 8 vom Zugriff der Luciferase geschützt und steht bei einem sauren pH von 6 dem Enzym zur Oxidation zur Verfügung.
- Das **Luciferin des marinen Muschelkrebses** *Vargula* wird als Vargulin bezeichnet.

- **Coelenterazin** ist das am besten bekannte **Luciferin** und kommt in Nesseltieren, Ruderfußkrebse, Strahlentierchen, Zehnfüßern, Schwebegarnelen und einigen Fischarten vor. Seine Aktivität ist von der Konzentration an Calcium abhängig und es besitzt Ähnlichkeiten mit dem Calcium-bindenden Protein Calmodulin.
- Das **Luciferin** aus **Leuchtkäfern** (Firefly Luciferase) ist ein Benzothiazol, welches ausschließlich in Leuchtkäfern der Gattungen *Photinus* oder *Luciola* vorkommt. Es benötigt Adenosintriphosphat (ATP) als Kofaktor, um in aktives Luciferin überführt zu werden, und wurde deshalb schon frühzeitig zum Nachweis von ATP verwendet.

### 2.4.3 Firefly-Luciferase aus *Photinus pyralis*

Die Luciferase aus *Photinus pyralis* besteht aus einem einzigen Peptid aus 550 Aminosäuren und einer Größe von 62 kD. Das Enzym katalysiert die Oxidation von D-Luciferin (LH<sub>2</sub>) zu Oxyluciferin (P) und Licht (hν) in Anwesenheit von ATP, Mg<sup>2+</sup> und Sauerstoff (O<sub>2</sub>) (SELIGER und MC ELROY 1960; GOULD und SUBRAMANI 1988). *In vitro* sind zwei Emissionsspektren möglich: Bei neutralem und alkalischem pH im gelb-grünlichen Bereich (562 nm) und bei saurem pH im roten Bereich (620 nm). Das Emissionsspektrum im grünen Bereich entspricht der Lichterzeugung *in vivo* und ist effektiver als im roten Lichtbereich (SELIGER und MC ELROY 1960; GOULD und SUBRAMANI 1988). Die untere Nachweisgrenze des Enzyms liegt bei 10<sup>-19</sup> mol Luciferase (2,4 x 10<sup>5</sup> Moleküle) (GOULD und SUBRAMANI 1988). Ursprünglich wurde eine Quantenausbeute von 0,88 angenommen (GOULD und SUBRAMANI 1988; SELIGER und MC ELROY 1960; ANDO et al. 2008), neuere Untersuchungen haben allerdings niedrigere (0,41) maximale Quantenausbeuten bei alkalischem (8,5) pH gezeigt (ANDO et al. 2008). Diese Korrektur ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass das Vorhandensein optischer Isomere von Luciferin erst später bekannt wurde und lediglich das D-Isomer zur Biolumineszenz beiträgt (ANDO et al. 2008). Dennoch gehört das Luciferin-Luciferase-System aus *Photinus pyralis* zu den effektivsten, verglichen z.B. mit einer Quantenausbeute von 0,28 bei *Cypridina kilgendorffii* (Muschelkreb) (JOHNSON 1962), 0,17 bei der marinen Qualle *Aequora* (SHIMOMURA 1986) und 0,30 bei bakteriellem Luciferin (HASTINGS und NEALSON 1977).

### 2.4.4 Anwendung der Firefly-Luciferase

Die cDNA des Luciferase Gens aus *Photinus pyralis* wurde zuerst 1985 von DE WET und Mitarbeitern sequenziert und geklont. Die Übereinstimmung der Aminosäureabfolge verschiedener Luciferasen aus Insekten beträgt 40 – 50 % (WILSON und HASTINGS 1998). Seither wurde es vor allem als Promoter-Gen verwendet. Dabei wird DNA, welche die Expression eines zu untersuchenden Gens kontrolliert, in ein Plasmid, welches die cDNA für Luciferase enthält, hineinkloniert. Die Messung der Luciferase-Aktivität erlaubt somit einen Rückschluss auf die Aktivität des Promoters. Dabei kann Luciferase sowohl *in vitro*, nach Extraktion des Zellproteins, als auch *in vivo* bestimmt werden (GOULD und SUBRAMANI 1988).

## 2.5 Immunologische Grundlagen

### 2.5.1 Major Histocompatibility Complex (MHC)

Jede Körperzelle besitzt auf der Oberfläche Moleküle des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (engl.: *major histocompatibility complex*, MHC) (RIBAS et al. 2000), von denen zwei Arten unterschieden werden können.

MHC-I-Moleküle werden auf der Mehrheit aller Körperzellen exprimiert und präsentieren intrazelluläre Antigene an CD8<sup>+</sup>-(oder zytotoxische) T-Zellen (ARMSTRONG und HAWKINS 2001; CRESSWELL et al. 1999; RIBAS et al. 2000). MHC-I-Moleküle bestehen aus drei Untereinheiten, der transmembranären schweren Kette (engl: *heavy chain*, hc),  $\beta_2$ -Mikroglobulin und einem weiteren Peptid aus acht bis zehn Aminosäuren, welches das zu präsentierende Antigen oder Epitop darstellt (RIBAS et al. 2000). In einem pH-abhängigen Prozess (REICH et al. 1997; GROMME et al. 1999) wird die transmembranäre schwere Kette im endoplasmatischen Retikulum beladen und durch das Zytosol zur Plasmamembran transportiert. Das  $\beta_2$ -Mikroglobulin und das Peptid schützen dabei vor dem Abbau durch das Proteasom der Zelle (CRESSWELL et al. 1999). Somit erlauben MHC-I-Moleküle dem Immunsystem einen Einblick in die Abläufe im Inneren der Zelle.

Im Gegensatz zu MHC-I-Molekülen werden MHC-II-Moleküle hauptsächlich von speziellen Antigen-präsentierenden-Zellen (APCs) wie B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen (DCs) exprimiert (ARMSTRONG und HAWKINS 2001). MHC-II-Moleküle bestehen aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit und einem Peptid. Sie assoziieren mit größeren Peptiden von 15 – 34 Aminosäuren aus der Umgebung der APCs und präsentieren diese Antigene an CD4<sup>+</sup>-(oder T-Helfer) Zellen (RIBAS et al. 2000). Wenn Tumorzellen zerstört und intrazelluläre Bestandteile frei werden, können deren tumorspezifischen Antigene von APCs über MHC-II-Moleküle aufgenommen und CD4<sup>+</sup>-Zellen präsentiert werden.

### 2.5.2 Zytokine

Zytokine sind kleine körpereigene Proteine von ca. 25 kD, die von verschiedenen Körperzellen als Reaktion auf einen Stimulus freigesetzt werden können. Sie binden an spezifische Rezeptoren und können autokrine, parakrine und manchmal sogar endokrine Wirkungen hervorrufen. Es können zwei strukturelle Arten von Zytokinen unterschieden werden. Zu den **hämatopoetischen** Zytokinen gehören Wachstumshormone und viele Interleukine der angeborenen und erworbenen Immunität. Die zweite Familie der Zytokine umfasst die Gruppe der **Tumor-Nekrose-Faktoren**, die oft membrangebunden sind (JANEWAY et al. 2007).

Funktionell lässt sich eine Einteilung in Typ-1 und Typ-2 Zytokine vornehmen. Zu den Typ-1 Zytokinen gehören beispielsweise IL-2, IL-12, IL-15, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  und IFN- $\gamma$ , sie sind der T<sub>H</sub>-1 Immunantwort zugeordnet und modulieren die zelluläre Immunantwort. Typ-2 Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 gehören zur T<sub>H</sub>-2 Immunantwort und vermitteln Toleranz im Rahmen des humoralen Immunsystems (BELARDELLI und FERRANTINI 2002).

Im Folgenden soll lediglich auf den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) eingegangen werden, da diese Zytokine im praktischen Teil dieser Doktorarbeit verwendet wurden.

### 2.5.2.1 Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor

Die cDNA des murinen Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktors (GM-CSF) wurde zuerst von GOUGH und Mitarbeitern (1984) sequenziert und kloniert. Inzwischen sind die Gensequenzen des humanen Zytokins (CANTRELL et al. 1985) sowie vieler Haustierspezies bekannt, darunter ovines (MC INNESS und HAIG 1991, O'BRIEN et al. 1991), equines (MAUEL 2002), porcines (INUMARU und TAKAMATSU 1995); bovines (LEONG et al. 1989; MALISZEWSKI et al. 1988), kanines (SHIN et al. 2001; NASH et al. 1991) und felines (DUNHAM und ONIONS 2001; YAMAMOTO et al. 2001) GM-CSF. Aber auch von Wildtieren wie dem Murmeltier (WU et al. 2001) und dem Gerbil (GAUCHER und CHADEE 2002) liegen die Gensequenzen vor. GM-CSF gehört zu den hämatopoetischen Zytokinen und wird von T-Zellen produziert. Seine Wirkung auf Stammzellen des Knochenmarks stimuliert die Produktion von Makrophagen und Granulozyten, die wichtige Effektorzellen sowohl der humoralen als auch der zellvermittelten Immunität sind (JANEWAY et al. 2007; METCALF 1986). Desweiteren ist GM-CSF ein essenzieller Faktor zur Differenzierung von Makrophagen zu dendritischen Zellen und Langerhans-Zellen (ROMANI et al. 1994; CAUX et al. 1992) und kann die Expression von MHC-II-Molekülen auf APCs steigern (WING et al. 1989). Die antineoplastischen Eigenschaften des Zytokins bestehen in der Aktivierung von Makrophagen aus peripherem Blut, so dass diese in der Lage sind, maligne Tumorzellen *in vitro* zu lysieren (GRABSTEIN et al. 1986). Nach parenteraler Gabe von rekombinantem humanem GM-CSF bei Krebspatienten kann eine vermehrte Anzahl peripherer Blutmonozyten beobachtet werden. Die ebenfalls erhöhte Produktion von Superoxiden durch diese Zellen verstärkt die Abwehr gegen mikrobielle Infektionen bei Patienten nach Chemotherapie (WING et al. 1989; KAPLAN et al. 1989). APTE und Mitarbeiter (2006) behandelten Ovarialkarzinom-Patientinnen mit subkutanen Injektionen von GM-CSF und IFN- $\gamma$  sowohl vor als auch nach Chemotherapie mit Carboplatin. Bei allen Patientinnen konnte ein signifikanter Anstieg der Leukozyten-Gesamtpopulation, der Makrophagen und neutrophilen Granulozyten erreicht werden.

### 2.5.2.2 Interferon- $\gamma$

Interferone (IFN) sind eine Familie natürlich vorkommender Glykoproteine, die antivirale, antiproliferative und immunmodulierende Eigenschaften besitzen (WADLER und SCHWARTZ 1990). Zu den Typ-1-Interferonen gehören IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\delta$ ; IFN- $\omega$  und IFN- $\tau$ , deren Wirkung hauptsächlich antiviraler und antiproliferativer Natur ist. Sie werden von nahezu allen Zellen als Reaktion auf das Vorhandensein doppelsträngiger RNA nach Virusinfektionen produziert (JANEWAY 2007; BILLIAU 2006; JONASCH und HALUSKA 2001). Das einzige Typ-2-Interferon ist IFN- $\gamma$  mit hauptsächlich immunmodulierenden und erst in zweiter Linie antiviralen Eigenschaften (BILLIAU 2006; FARRAR und SCHREIBER 1993). Es gehört zu den Zytokinen, die den größten Einfluss auf das Immunsystem besitzen (YOUNG und HARDY 1995). Im Weiteren soll nur auf IFN- $\gamma$  genauer eingegangen werden. Die Gensequenzen von IFN- $\gamma$  des Menschen (DERYNCK et al. 1982; DEVOS et al. 1982) und vieler Haustierspezies sind bekannt, darunter bovines (CERETTI et al. 1986), ovines (RADFORD et al. 1991; MC INNES et al. 1990), caprines (BEYER et al. 1998), kanines (ZUCKER et al. 1992) und felines IFN- $\gamma$  (ARGYLE et al. 1995). Die cDNA des equinen IFN- $\gamma$  wurde von zwei Arbeitsgruppen sequenziert (CURRAN et al. 1994; GRUNIG et al. 1994). Darüber hinaus ist bei vielen Wildtierspezies das Zytokin bereits kloniert und sequenziert, wie bzw. beim Nashorn (MORAR et al. 2007), dem amerikanischen Elch (SWEENEY et al.

2001), dem Delphin (INOUE et al. 1999), dem Hirsch (SEOW et al. 1993), dem großen Panda (TAO et al. 2010), dem Löwen und dem Geparden (MAAS et al. 2010). Aber auch von nicht-Säugetieren wie dem Huhn (DIGBY und LOWENTHAL 1995) und dem Truthahn (LOA et al. 2001) ist das Genom bekannt.

Interferon- $\gamma$  wird hauptsächlich von aktivierten Zellen des angeborenen Immunsystems, wie NK, NKT und  $\gamma\delta$ -T-Zellen (BLATTMANN und GREENBERG 2004; BOEHM et al. 1997; CURRAN et al. 1994), aber auch von professionellen APCs produziert (FRUCHT et al. 2001). Es stimuliert die angeborene zelluläre Immunität durch NK-Zellen und die Aktivierung von Makrophagen. Die Expression der kostimulatorischen Moleküle B7.1 und B7.2 und der antigenpräsentierenden MHC-I- und MHC-II-Moleküle wird verstärkt und eine zytotoxische Immunreaktion gefördert (ZHOU 2009; JONASCH und HALUSKA 2001; BOEHM et al. 1997). IFN- $\gamma$  hemmt die Wirkung von Typ-2-Lymphozyten ( $T_H$ -2-Lymphozyten) und vermindert die Produktion von Zytokinen der  $T_H$ -2-Immunantwort, so dass die Gewichtung von einer humoralen hin zu einer zytotoxischen Immunantwort verschoben wird (FARRAR und SCHREIBER 1993). Rezeptoren für IFN- $\gamma$  finden sich auf allen Zelltypen mit Ausnahme von Erythrozyten (STARK et al. 1998).

Das Zytokin besitzt selbst antitumoröse Eigenschaften und stimuliert im Rahmen eines positiven Feedbacks weitere Zellen des angeborenen Immunsystems (Makrophagen, DCs) zur Produktion von IL-12 (JANEWAY 2007; BLATTMANN und GREENBERG 2004; JONASCH und HALUSKA 2001; BOEHM et al. 1997). Desweiteren wird auch auf Krebszellen die Expression von MHC-I-Molekülen verstärkt und Makrophagen können in Tumorgewebe gelockt werden. Letztere bewirken hier nicht nur die direkte Zerstörung von Tumorzellen, sondern dienen auch als professionelle APCs (WEINBERG 2007). IFN- $\gamma$  verleiht mit LPS als zusätzlichem Aktivator Makrophagen aus peripherem Blut zytotoxische Eigenschaften gegen maligne Tumorzellen *in vitro* (GRABSTEIN et al. 1986). Modifizierte Krebszellen, denen der IFN- $\gamma$  Rezeptor fehlt, besitzen in Wildtyp-Mäusen potentere kanzerogene Eigenschaften als Tumorzellen, die auf IFN- $\gamma$  reagieren können. Labormäuse, deren Zellen überhaupt keine Rezeptoren für das Zytokin besitzen, sind 20 – 50-mal häufiger anfällig für chemische Kanzerogene (WEINBERG 2007).

## 2.6 Tumormunologie

### 2.6.1 Tumorantigene

Die Bekämpfung von Tumorzellen durch das Immunsystem beruht auf dem Vorhandensein von Antigenen, die auf normalem Gewebe nicht oder nur zu einem sehr geringen Anteil exprimiert werden. Es lassen sich tumorspezifische Antigene (TSAs) von tumorassoziierten Antigenen (TAAs) unterscheiden (WEINBERG 2007; ARMSTRONG et al. 2001; ARMSTRONG und HAWKINS 2001).

### 2.6.1.1 Tumorassoziierte Antigene (TAAs)

*Onkofetale Antigene* finden sich in frühen embryonalen Stadien auf Zellen und verschwinden, bevor immunologische Toleranz entsteht. Physiologisch finden sich onkofetale Antigene auf den Keimzellen der Hoden und in der Plazenta (CABALLERO und CHEN 2009; ARMSTONG und HAWKINS 2001; BOON und VAN DER BRUGGEN 1996). Ein Beispiel hierfür ist der Fas-Ligand. Dieses Molekül, das durch Bindung an spezielle Rezeptoren den extrinsischen Apoptosweg auslöst, und die verminderte Expression von MHC-I-Molekülen schaffen ein immunprivilegiertes Gewebe und verhindern einen Angriff des Immunsystems (WEINBERG 2007). Diese Antigene sind häufig wieder auf Krebszellen nachweisbar und ermöglichen dem Immunsystem eine gezielte Bekämpfung. Weitere dieser Tumorantigene, die auch als *Cancer Testis* (CT-) Antigene bezeichnet werden, sind beispielsweise die MAGE-, SAGE- und BAGE-Antigene, die häufig auf Melanomen, Blasen- und Lungenkarzinomen und Sarkomen exprimiert werden (CABALLERO und CHEN 2009; BOON und VAN DER BRUGGEN 1996). Zwar finden sich auch in somatischen Zellen kleine Mengen an mRNA, die für CT Antigene kodiert, allerdings ist ihre Menge im Verhältnis zu Hodengewebe sehr gering (< 1 %) und auf Proteinebene sind CT-Antigene in physiologischem Gewebe überhaupt nicht nachweisbar (CABALLERO und CHEN 2009). Ein weiteres onkofetales Antigen, CEA (*Carcinoembryonic antigen*), dient als Adhäsionsmolekül im fetalen Kolon (PIGNATELLI et al. 1990) und findet sich auf Kolonkarzinomzellen erneut in hoher Dichte (ARMSTONG und HAWKINS 2001). Zirkulierendes CEA dient auch als ein prognostischer Faktor nach chirurgischer Resektion von Lebermetastasen (WATINE et al. 2001).

*Idiotypische Antigene:* B-Zelllymphome entstehen aus einem einzigen mutierten B-Zellklon und besitzen individuelle antigenetische Eigenschaften, die von den variablen Regionen der Immunglobulin-Gene bestimmt werden (WEINBERG 2007; STEVENSON et al. 1995). Diese als Idiotypen (Id) bezeichneten Antigene stellen attraktive Ziele für eine Immunisierung dar. Die jeweiligen Idiotypen sind sowohl für den einzelnen Patienten als auch für die entsprechende Zelllinie charakteristisch (ARMSTRONG und HAWKINS 2001). Diese Tatsache macht maßgeschneiderte idiotypische Vakzinen für jeden einzelnen Patienten nötig (WEINBERG 2007; RUFFINI et al. 2002).

*Gewebespezifische Antigene* werden während des Differenzierungsprozesses auf Vorläufern somatischer Zellen exprimiert und sind auch auf Tumorzellen zu finden. Diese Antigene stellen einen Angriffspunkt für zytotoxische T-Lymphozyten dar.

MELAN-1, Tyrosinase, gp100 und gp75 sind als Epitope auf Melanomzellen zu finden (JÄGER et al. 2001; BOON und VAN DER BRUGGEN 1996). Vorläuferzellen zytotoxischer T-Lymphozyten können *in vitro* mit autologen Tumorzellen stimuliert werden und rufen im Patienten eine spezifische antineoplastische Reaktion hervor. Dabei tritt regelmäßig auch Vitiligo gesunder Hautareale als besondere Form einer Autoimmunreaktion auf (WEINBERG 2007), was allerdings einen günstigen prognostischen Faktor darstellt (GOGAS et al. 2006).

Auf B-Zellen verschiedener Differenzierungsstadien und auf B-Zelllymphomen wird CD20, ein Oberflächenantigen, exprimiert. Der entsprechende monoklonale Antikörper, Rituximab (anti-CD20), wird erfolgreich zur begleitenden Behandlung vieler Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) eingesetzt (FERRIS et al. 2010; WEINBERG 2007).

### 2.6.1.2 Tumorspezifische Antigene (TSAs)

#### **Virale Tumorantigene**

Zu den Viren, die im Zusammenhang mit der Entwicklung maligner Neoplasien beim Menschen stehen, gehören unter anderem das Epstein-Barr-Virus (EBV), das Humane Papillomavirus (HPV) und das Hepatitis B Virus (HBV).

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) wird mit der Entstehung von Burkitts-Lymphomen (BL), nasopharyngealen Karzinomen, einigen Hodgkins-Lymphomen und T-Zelllymphomen, Posttransplantations-Lymphomen und Magenkarzinomen in Verbindung gebracht (DAMANIA 2007). In der westlichen Welt sind ungefähr 90 % der Erwachsenen mit EBV infiziert (WEINBERG 2007). Infizierte B-Lymphozyten exprimieren virale Proteine und können von Effektorzellen des Immunsystems eliminiert werden. Allerdings kann das Virusgenom in B-Zellen, die keine viralen Proteine produzieren, persistieren. Somit werden die infizierten B-Lymphozyten nicht durch das Immunsystem erkannt (KLEIN et al. 2010). Diese Zellen besitzen mehrere nukleäre Antigene (EBNA) und latente Membranproteine (LMP), die für die Replikation und die Weitergabe viraler Episome an Tochterzellen verantwortlich sind, als Transkriptionsfaktoren dienen und anti-apoptotische Eigenschaften besitzen (BORNKAMM 2009; POLACK et al. 1996; REEDMAN und KLEIN 1973). EBV-positive Zellen exprimieren *in vivo* das EBNA-1 Antigen, das nicht immunogen zu sein scheint, nicht aber die anderen nukleären Antigene (POLACK et al. 1996; LEVITSKAYA et al. 1995). In 95 % der Fälle von BL in tropischen Regionen ist das EBNA-1 Antigen vorhanden, allerdings ist es bei HIV-infizierten BL Patienten nur in 40 – 50 % und in den sporadischen Fällen von BL zu 10 – 20 % vorhanden (BORNKAMM 2009). CHARO und Mitarbeitern (1999) gelang es durch DNA-Immunisierung von Mäusen mit einem Vektor, der für EBNA-4 kodiert, einen 100%igen Schutz gegen Tumorzellen, die EBNA-4 exprimieren, zu erreichen.

Gebärmutterhalskrebs ist die erste Neoplasie, welche die WHO als zu 100 % auf eine Infektion zurückgehend anerkannte (BOSCH et al. 2002). Über 99 % der Gebärmutterhalskarzinome enthalten einen der 15 HPV-Genotypen, die als *high-risk papillomaviruses* klassifiziert sind, davon findet sich in 50 – 60 % der Fälle HPV-16 und in 10 – 20 % HPV-18 (RODEN und WU 2006, SCHILLER und DAVIES 2004). Rekombinantes L1-Kapselprotein der HPV assoziiert sich selbst zu immunogenen sog. *virus-like particles* (VPLs) (KIRNBAUER et al. 1992). Eine Vakzination mit rekombinantem HPV-16-L1-VPLs führte in einer Studie bei 99,7 % der geimpften Frauen zu Serokonversion (KOUTSKY et al. 2002).

Die Entwicklung eines Hepatozellulären Karzinoms ist in 53 % der Fälle auf eine Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus und in 25 % auf die Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus zurückzuführen (PERZ et al. 2006). Die Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV) geschieht oft bei jungen Individuen, die anschließend häufig eine chronische Form einer Hepatitis entwickeln (WEINBERG 2007; ANZOLA 2004). Das Genom des Virus kodiert auch für Hüllproteine (HBsAg), die in präventiven Impfungen verwendet werden (ANZOLA 2004). Durch Impfprogramme in endemischen Gebieten konnte die Inzidenz Hepatozellulärer Karzinome um 75 % und die einer chronischen HBV-Infektion um 90 % gesenkt werden (CHANG et al. 2005). Die Entwicklung therapeutischer Vakzine gegen chronische Hepatitis B hat eine Serokonversion HBsAg positiver Individuen zum Ziel. ZHOU und Mitarbeiter (2010) entwickelten eine DNA-Vakzine, die für das HBsAg kodiert. In HBV-transgenen Mäusen konnte eine CD8<sup>+</sup>- und CTL-vermittelte Immunantwort sowie ein Rückgang an zirkulierendem HBsAg und HBV-DNA erreicht werden. Eine Studie zur

adjuvanten, therapeutischen Immunisierung mit HBsAg führte bei Patienten mit CHB zwar zu hohen anti-HBsAg-Titern, allerdings konnte keine signifikant erhöhte Anzahl an Serokonversionen verglichen mit einer alleinigen antiviralen Therapie erreicht werden (VANDEPAPELIERE et al. 2007).

### **Antigene aus mutierten Genprodukten**

Das p53-Protein wird von fast allen Zellen in Geweben von Säugetieren exprimiert. Seine Funktion besteht darin, den Zellmetabolismus zu überwachen und ggf. die Apoptose einzuleiten, falls die jeweilige Zelle so sehr geschädigt ist, dass ihr Weiterbestehen ernsthafte negative Auswirkungen für den Organismus hat. Desweiteren unterdrückt p53 die Zellproliferation, weshalb es auch als Tumorsuppressor-Gen kategorisiert wurde. Erfährt das offene Leseraster (engl.: *open reading frame*, ORF) von p53 allerdings Punktmutationen, erhält das Protein wachstumsfördernde Eigenschaften. Mutierte Allele des p53-Tumorsuppressor-Gens führen darüber hinaus zu einer veränderten Proteinstruktur, die Tumorzellen immunogen macht. Beim Hepatozellulären Karzinom ist eine Punktmutation des Codons 249 bei fast der Hälfte der Patienten, die dem Karzinogen Aflatoxin B 1 aus dem Schimmelpilz *Aspergillus flavus* ausgesetzt waren, zu finden. Lungen- und Mammakarzinome von Rauchern weisen ebenfalls die gleichen spezifischen Mutationen der P53-Allele auf (WEINBERG 2007). Mutationen von p53 finden sich in 30 – 50 % der humanen Tumore (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER 2008; DISIS und CHEEVER 1996).

Ras ist ein kleines G-Protein aus der Ras-Familie (Ras, Rho, Rac, Cdc42), welches in verschiedenen Signalwegen die Zellproliferation vermittelt (JANEWAY 2007). Durch aktivierende Mutationen bleibt der Übergang von Ras in den inaktiven Zustand aus. Diese Konformationsänderungen gehören zu den häufigsten Mutationen (JANEWAY 2007) und sind in 15 % humaner Tumore zu finden (DISIS und CHEEVER 1996). Ras Onkoproteine entstehen aus Aminosäuren-Substitutionen der vier Ras-Proteine normaler Zellen und können ein Oligopeptid-Antigen darstellen, das eine Immunantwort provoziert (WEINBERG 2007).

### **2.6.2 Tumor escape-Mechanismen**

Jede Körperzelle kann im Lauf der Zeit entarten und verliert in Folge dessen ihre Funktion innerhalb des Zellverbandes. Solche veränderten und damit nutzlosen Zellen werden in der Regel durch das Immunsystem erkannt und eliminiert. Allerdings werden auch bei einem gut funktionierenden Immunsystem nicht alle entarteten Körperzellen zerstört. Diese können als Ausgangspunkt einer malignen Neoplasie dienen. Um dem Immunsystem zu entkommen, bedienen sich Tumore sog. *tumor escape*-Mechanismen (BLATTMANN und GREENBERG 2004; KUMAR und PENNY 1982).

Eine verminderte Immunogenität der Tumorzellen resultiert aus einer reduzierten Expression von Molekülen des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (MHC) auf Tumorzellen. Allerdings führt eine völlige Abwesenheit von MHC-I-Molekülen auf Zellen zu einer sofortigen Zerstörung durch NK-Zellen und würde keinen Schutz vor dem Immunsystem bieten. Deshalb erfolgt durch den Tumor eine Selektion von Zellklonen, welche wenige MHC-I-Moleküle besitzen (ELMSLIE und DOW 1997), ein Vorgang, der als *immunoediting* bezeichnet wird (WEINBERG 2007; DUNN et al. 2004). Das Fehlen kostimulatorischer Moleküle trägt ebenfalls zu einer herabgesetzten Immunogenität von Tumoren bei. Begegnet der T-Zellrezeptor einem potentiellen Antigen in Abwesenheit dieser Signale (wie z.B. CD40)

ist das Ergebnis die fehlende Reaktion durch Abschalten der Immunantwort der T-Zellen gegenüber diesem Antigen (Anergie). Daraus resultiert eine immunologische Toleranz. Weitere kostimulatorische Moleküle, B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), gehören der Immunglobulin-Familie an und werden nur auf Zellen, die für die T-Zell-Proliferation zuständig sind, wie z.B. dendritische Zellen (DC), exprimiert (LOEHR et al. 2000). Anti-B7-Antikörper verhindern im Experiment eine T-Zellantwort (JANEWAY et al. 2007; GAJEWSKI et al. 2006; ARMSTRONG und HAWKINS 2001). In Melanomen wurde eine verminderte bzw. fehlende Expression von B7.1 und B7.2 bei gleichzeitiger Anwesenheit von APCs nachgewiesen (GAJEWSKY et al. 2006). Zusätzlich zu einer herabgesetzten Immunogenität können Tumorzellen durch Kapselbildung aus Sialomucinen das Immunsystem räumlich ausschließen (KUMAR und PENNY 1982).

Viele Tumore sind in der Lage, immunsuppressive Substanzen zu produzieren. Zirkulierende Tumor-Antigene bilden Immunkomplexe mit spezifischen, gegen den Tumor gerichteten Antikörpern. Die Komplexe verhindern eine zellvermittelte Zytotoxizität des Immunsystems. Eine weitere immunsuppressive Eigenschaft dieser Komplexe beruht darauf, dass freie Bruchstücke von Antigen-reaktiven Zellen gebunden und durch den Antikörper opsoniert werden (KUMAR und PENNY 1982). Diese Opsonierung der Immunkomplex-Bruchstücke bietet die Angriffsmöglichkeit für Makrophagen, die somit indirekt die Effektorzellen des Immunsystems zerstören. Darüber hinaus wird eine pro-inflammatorische Reaktion des Immunsystems durch die Produktion verschiedener anti-entzündlicher und immunsuppressiver Zytokine unterdrückt (CURIEL 2007; WEINBERG 2007; GAJEWSKI et al. 2006; BLATTMANN und GREENBERG 2004). Von diesen sind IL-10 und der *transforming-growth-factor-β* (TGF-β) am besten beschrieben. IL-10 besitzt anti-entzündliche Eigenschaften, verhindert die Reifung von T-Zellen zu zytotoxischen T-Lymphozyten und induziert die Apoptose zytotoxischer T-Zellen. Darüber hinaus blockiert IL-10 bereits die Rekrutierung dendritischer Zellen nach anti-neoplastischer Behandlung mit GM-CSF (GAJEWSKY et al. 2006). Die immunsuppressiven Eigenschaften von TGF-β bestehen in der Einleitung der Apoptose dendritischer Zellen, Makrophagen und zytotoxischer T-Zellen (WEINBERG 2007). Darüber hinaus fördert das Zytokin die Vermehrung regulatorischer T-Zellen (GAJEWSKI et al. 2006).

Die **Inaktivierung des Wirts-Immunsystems** beruht auf der Induktion regulatorischer T-Zellen. Zusätzlich zum CD4-Antigen besitzen regulatorische T-Zellen das CD25-Antigen auf der Oberfläche und ihre Entwicklung wird durch den Transkriptionsfaktor *forkhead box protein P3* (FOXP3) reguliert. Natürliche regulatorische T-Zellen hemmen periphere autoreaktive Zellen, die der Depletion im Thymus entkommen sind, und haben eine wichtige physiologische Bedeutung bei der Verhinderung von Autoimmun-Reaktionen. Dagegen entwickeln sich adaptive regulatorische T-Zellen im Verlauf entzündlicher Reaktionen, wie Infektionen oder Neoplasien. Ihre Präsenz im Lymphknoten verhindert die Aktivierung von T-Helferzellen durch dendritische Zellen (WEINBERG 2007), und blockiert CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-Effektor-T-Zellen. Die Mechanismen dieser Inaktivierung der Effektor-Zellpopulationen sind noch nicht vollständig bekannt, beruhen aber höchstwahrscheinlich auf Zell-Zell-Kontakt vermittelten Effekten und der Sezernierung von TGF-β und IL-10 (WEINBERG 2007; CURIEL 2007). Ein weiterer Mechanismus, der als *tumor counterattack* bezeichnet wird, ist die Inaktivierung des extrinsischen Apoptosewegs durch Tumorzellen (WEINBERG 2007; LEE und FERGUSON 2003). Der extrinsische Apoptoseweg wird über sog. Todes-Rezeptoren (engl.: *death receptors*) der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Familie ausgelöst, indem diese ihre entsprechenden Liganden binden. Der erste *death receptor*, der charakterisiert wurde, ist der Fas-Rezeptor (TRAUTH et al. 1989; YONEHARA et al. 1989), der durch die Bindung des entsprechenden Fas-Liganden (FasL) aktiviert wird. Physiologischerweise exprimieren z. B. Körperzellen immunprivilegiierter Organe hohe

Konzentrationen von FasL, um sich vor Angriffen des Immunsystems zu schützen. Dies sind beispielsweise die vordere Augenkammer, die Sertolizellen der Hoden, das Gehirn, die Ovarien, der Uterus und die Plazenta während der Schwangerschaft (LEE und FERGUSON 2003). Fas-vermittelte Apoptose ist ein wichtiger Mechanismus der zellulären Immunantwort (WALCZAK und KRAMMER 2000). Tumorzellen können eine Resistenz gegenüber der FasL-induzierten Apoptose besitzen und produzieren lösliche Formen des Fas-Liganden, die im ganzen Körper nachgewiesen werden können. Dazu gehören besonders maligne Tumore wie Kolon-, Brust-, Ovar-, Blasen-, Lungen- und Kopf-Hals-Karzinome, Melanome und Astrozytome (ZIELINSKA et al. 2008). Diese löslichen Formen des Fas-Liganden aktivieren den Fas-Rezeptor auf der Oberfläche verschiedener Lymphozyten und können die Apoptose einleiten (ZIELINSKA et al. 2008; WEINBERG 2007; LEE und FERGUSON 2003).

## 2.7 Gentherapie in der Veterinär-onkologie

Das Hauptziel der Gentherapie ist der erfolgreiche Gentransfer *in vivo* in spezifische Zielzellen, um die Heilung des Organismus herbeizuführen (EL-ANEED 2004). Die Schlüsselemente hierfür sind eine eindeutige Definition der Erkrankung und des therapeutischen Gens, die Verfügbarkeit eines geeigneten Vektors und die Identifikation der Zielzellen für den Gentransfer (ARGYLE 1999). In der tiermedizinischen Onkologie sind bislang erst wenige Therapieansätze dieser Art publiziert.

HEINZERLING und Mitarbeiter (2001) berichten vom Einsatz eines Plasmids, welches für humanes Interleukin-12 (huIL-12) kodiert, bei Pferden, die an Equinen Melanomen erkrankt waren. Die Tumore der in dieser Studie behandelten Tiere erfuhren eine Größenreduktion auf 41 % der Ausgangsgröße nach intratumoraler Injektion von humanem IL-12, wobei alle Tiere die Injektionen gut vertrugen. Die Bioaktivität des humanen IL-12 durch die vermehrte IFN- $\gamma$  Produktion equiner PBMNCs nach Zugabe von rekombinantem huIL-12 wurde *in vitro* nachgewiesen. In dieser Studie besaß huIL-12 keinen antiproliferativen Effekt auf Zellkulturen equiner Melanome und eine Hochregulierung von MHC-II-Molekülen auf equinen PBMNCs konnte nicht nachgewiesen werden. Desweiteren kam es nicht zu messbaren IL-12 Konzentrationen im Blut der Patienten. Melanome, die durch Injektion mit Kontroll-Plasmiden behandelt wurden, zeigten nur eine Reduktion auf 88 % der Ausgangsgröße.

DOW und Mitarbeiter (1998) behandelten Hunde mit oralem Melanom über einen Zeitraum von 12 Wochen in zweiwöchigen Abständen mit intratumoralen Plasmid-DNA-Injektionen. Es wurden Kombinationen von Staphylococcus-Enterotoxin-B (SEB) mit kaninem GM-CSF respektive kaninem IL-2 angewandt. Bei 46 % der Tiere konnte eine komplette oder partielle Remission erzielt werden und die mediane Überlebenszeit im Vergleich zu Tieren, die in der Vergangenheit mit kaninem oralem Melanom vorgestellt wurden (historische Kontrollgruppe), verlängerte sich von 15 auf 66 Wochen. Aktuell ist bereits eine DNA-Vakzine gegen das kanine orale Melanom durch das US-amerikanische Landwirtschaftsministerium zugelassen worden. Das Medikament enthält ein Plasmid, welches für das humane Enzym Tyrosinase kodiert und soll die Überlebenszeit der Tiere verlängern (United States Department of Agriculture, 2010).

In einer Studie zur adjuvanten Immuntherapie des felines Fibrosarkoms erhielten Katzen zwei Injektionen von Plasmiden, die für felines GM-CSF kodieren. Vierzehn und sieben Tage vor Tumorentfernung wurden vier verschiedene Dosierungen des Plasmids injiziert, wobei selbst die höchste gegebene DNA-Menge ohne Nebenwirkungen für den Patienten blieb. Die

Plasmide wurden mit magnetischen Nanopartikeln (Magnetofektion) versetzt, um einen gezielten und effizienten Gentransfer in die Tumorzellen zu erreichen. Im Beobachtungszeitraum von einem Jahr nach chirurgischer Tumorentfernung blieben zehn von 20 Tieren rezidivfrei (HÜTTINGER et al. 2008). Die gleiche Arbeitsgruppe veröffentlichte eine Phase-I-Studie zur adjuvanten Immuntherapie des felines Fibrosarkoms. Dazu wurden Plasmide, die für die felines Zytokin-Gene IL-2, GM-CSF und IFN- $\gamma$  kodieren, in vier verschiedenen Konzentrationsstufen mit magnetischen Nanopartikeln verabreicht. Die Injektionen wurden ebenfalls intratumoral sieben und 14 Tage vor der Operation durchgeführt. Im Rahmen der Studie traten nur bei einem Tier in der höchsten Dosisstufe systemische Nebenwirkungen auf, die auf die Genterapie zurückgeführt werden können. Insgesamt wurde bei sechs von 20 Tieren im Beobachtungszeitraum von einem Jahr nach Entfernung des Fibrosarkoms ein Rezidiv beobachtet, wovon vier präoperativ mit der höchsten DNA-Menge behandelt wurden. Dies verdeutlicht, dass die Wirkung vieler Zytokine nicht mit steigender Dosis zunehmen muss (JAHNKE et al. 2007).

## 2.8 Zusammenfassung der Literaturrecherche

Aus der Literaturübersicht geht hervor, dass das Equine Sarkoid mit seinen verschiedenen Erscheinungen schon immer eine Herausforderung hinsichtlich der Therapie darstellte.

Trotz einer Vielzahl an chirurgischen und medikamentösen Möglichkeiten ist eine komplette Heilung aufgrund der hohen Rezidivraten in vielen Fällen nur schwer zu erreichen. Hinzu kommt, dass viele der chemotherapeutischen Möglichkeiten zu Nebenwirkungen beim Tier sowie beim Anwender führen können, sei es ein Tierarzt oder der Besitzer als Laie. Eine Besonderheit in der Ätiologie des Equinen Sarkoids stellt die Infektion mit den Bovinen Papillomaviren BPV-1 und -2 dar, da diese Viren eigentlich strikt spezies-spezifisch sind. Eine virale Ätiologie besteht auch bei vielen menschlichen Krebserkrankungen und Erkenntnisse aus der Humanonkologie fließen in die Entwicklung von Therapiemöglichkeiten in der Tiermedizin ein. Gleichzeitig unterliegt die Behandlung in der Tiermedizin weniger strengen ethischen Auflagen, was die Möglichkeit bietet, das Equine Sarkoid als Modell für ähnliche Leiden in der Humanmedizin heranzuziehen.

Verschiedene Möglichkeiten der Immuntherapie zur Behandlung der Erkrankung werden bereits in unterschiedlichen Ansätzen seit längerem eingesetzt. Trotz zum Teil vielversprechender Ergebnisse und sorgfältiger Durchführung beinhaltet eine immunmodulierende Therapie aufgrund der komplexen Wirkungsweise des Immunsystems immer das Risiko unerwünschter, lebensbedrohlicher Nebenwirkungen. Durch *in vitro* Studien können Effekte auf isolierte Zellsysteme herausgefunden werden, was ineffektive Ansätze frühzeitig ausschließen kann. Aufgrund der Komplexität von Systemen *in vivo* können Studien *in vitro* jedoch nicht immer Aufschluss über mögliche unwirksame oder riskante Therapieoptionen geben. Dennoch sind sie zur Planung nachfolgender klinischer Studien essentiell.

Tumore sind in der Lage, über die Expression verschiedener Antigene eine Immunantwort hervorzurufen, allerdings verfügen viele Neoplasien gleichzeitig über die Fähigkeit das Immunsystem auf Distanz zu halten oder über verschiedene Mechanismen die Angriffsmöglichkeiten des Immunsystems zu inaktivieren und sich somit zu „maskieren“. Die Immuntherapie, mit dem Ziel eine körpereigene Abwehrreaktion gegen Neoplasien hervorzurufen, bietet einen vielversprechenden Ansatz zu Behandlung von Tumoren sowohl in der Human- als auch der Tiermedizin.

Verschiedene Ansätze, die in der Humanmedizin bereits etabliert sind, finden mittlerweile in angepasster Form auch in der tiermedizinischen Onkologie Einsatz. Dazu gehört auch die

Gentherapie, die aufgrund vielfältiger Anwendungsmöglichkeiten und zum Teil technisch einfacher Durchführbarkeit nicht mehr nur in präklinischen Studien, sondern bereits mit kommerziell erhältlichen Produkten durchführbar ist.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

Zielsetzung der eigenen Versuche war die Untersuchung, inwiefern Zellen des Equinen Sarkoids eingebrachte genetische Informationen *in vitro* umsetzen können. Dazu wurden primäre Zellen des Equinen Sarkoids benötigt. Diese Tumorzellen wurden unter sterilen Bedingungen von erkrankten Tieren, die zur operativen Entfernung der Tumore an der Pferdeklinik der LMU München vorgestellt wurden, gewonnen und kultiviert. Zunächst wurden die primären Zellen mit dem Promotergen Luciferase (aus *Photinus pyralis*) transfiziert. Darüber hinaus wurde evaluiert, ob der Einfluss eines Magnetfeldes den Erfolg des nicht-viralen Gentransfers verbessert (Magnetofektion). Um den Einfluss verschiedener Nährlösungen festzustellen, wurden verschiedene Kulturmedien verwendet. Dazu wurden Zellen in Standardmedium mit fetalem Kälberserum (FKS) kultiviert und zusätzlich wurde Kulturmedium, supplementiert mit autologem Pferdeserum, eingesetzt. Desweiteren wurden zwei verschiedene Transfektionsreagenzien eingesetzt, um auch hier die Einflüsse der jeweiligen Chemikalie zu beurteilen.

Im zweiten Versuchsteil wurde die genetische Information für heterologe Zytokine eingebracht, um eine Immunstimulation der Tumorzellen *in vitro* zu erreichen. Zusätzlich wurde die Menge der gebildeten Zytokine mit einem standardisierten ELISA gemessen. Der Effekt dieser Zytokine auf die stimulierten Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie (engl: *fluorescence activated cell sorting*, FACS) gemessen.

#### 3.1 Pferde und Tumormaterial

Das Tumormaterial stammte von zwölf Pferden, welche im Zeitraum von März 2009 bis März 2010 zur Entfernung eines Equinen Sarkoids in der Klinik für Pferde der LMU München vorgestellt wurden. Die Auswahl der Tiere erfolgte dabei zufällig ohne Berücksichtigung eventuell vorheriger Behandlungsversuche. Teilweise bestand zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung in der Klinik lediglich die Verdachtsdiagnose „Equines Sarkoid“. Das Tumormaterial aller Patienten wurde deshalb nach der chirurgischen Entfernung zusätzlich pathologisch-histologisch untersucht (Fachpraxis für Tierpathologie, Dr. v. Bomhard, München).

Den Patienten wurde darüber hinaus zur Gewinnung von Serum für die spätere Zellkultur Blut entnommen. Dies erfolgte im Rahmen der allgemeinen Operationsvorbereitung beim Legen des Venenverweilkatheters in die Vena jugularis.

#### 3.2 Methoden

##### 3.2.1 Behandlung des Ausgangsmaterials

Direkt nach der chirurgischen Entfernung der Umfangsvermehrung wurde ein Teil des Gewebes in 7%igem Formalin fixiert und zur histologischen Untersuchung versandt (Fachpraxis für Tierpathologie, Dr. v. Bomhard, München). Bei den Pferden Nr. 6 bis Nr. 12 (*Eq\_6 – Eq\_12*) wurde zusätzlich die Untersuchung des Probenmaterials mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) auf das Onkoprotein E5 des Bovinen Papillomavirus (BPV E5) durch ein Fremdlabor (Friedrich-Loeffler Institut, Insel Riems, Abteilung für experimentelle Tierhaltung und Biosicherheit) eingeleitet. Das restliche Tumormaterial wurde von der

Schnittfläche aus mit steriler Pinzette und Skalpellklinge abpräpariert, um äußere Teile des krankhaften Gewebes und die umgebende Haut zu entfernen und eine bakterielle Kontamination der späteren Zellkultur zu verhindern. Die steril gewonnenen Anteile des Tumors wurden zunächst kurz in Phosphate-buffered-saline (PBS) geschwenkt und danach in 25 ml gekühltem (4°C) Zellkulturmedium bis zur Verbringung in das Zellkulturlabor aufbewahrt. Die weitere Bearbeitung der Tumorproben erfolgte innerhalb von zwei Stunden nach Gewinnung.

Um das Tumormaterial auch in Eigenserum zu kultivieren, erfolgte der Transport des Blutes gekühlt in 10 ml Serumröhrchen. Nach dem makroskopischen Absetzen der zellulären Blutbestandteile folgte eine Zentrifugation (3000 UPM/5 min). Das so gewonnene Serum wurde zur Kryokonservierung in 2 ml Mikrozentrifugenröhrchen gefüllt. Die Lagerung erfolgte im Gefrierschrank bei -80°C.

### 3.2.2 Zellkultur

#### 3.3.2.1 Gewinnung von Einzelzellen

Zuerst erfolgte die Zerkleinerung der Tumormasse in ca. 0,5 x 0,5 x 0,5 cm große Stücke unter sterilen Bedingungen in der Zellkulturbank. Um Einzelzellen zu gewinnen, wurden zwei verschiedene Methoden gewählt: Die *Auswanderung aus Tumormaterial* stellt ein zellschonendes aber zeitlich langwieriges Verfahren dar, so dass unter Umständen erst nach mehreren Wochen genügend Zellen für aufwändige Versuche zur Verfügung stehen. Bei der Methode des *Kollagenaseverdaus* erhält man dagegen bereits nach wenigen Tagen eine große Menge an Zellen. Allerdings ist die Methode für sehr empfindliches Gewebe oft nicht schonend genug, so dass das Risiko des Verlusts der gesamten Zelllinie besteht.

Zur *Auswanderung aus Tumormaterial* wurde ein Teil des Tumormaterials in 5 ml Zellkulturschalen ausgelegt. Dabei wurden zwei verschiedene Zellkulturmedien verwendet. Ein Ansatz erfolgte mit Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), supplementiert mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) (DMEM/FKS) und ein weiterer mit DMEM Medium supplementiert mit 10 % autologem Pferdeserum (DMEM/Pfd). Beide Medien erhielten einen Antibiotikazusatz (100 µg/ml Streptomycin; 100 IE/ml Penicillin). Bis zur Ausbildung einer durchgehenden Zellschicht verblieben die Proben in der jeweiligen Zellkulturschale. Ein Medienwechsel wurde zwei Tage nach Erstansatz und im Weiteren nach Bedarf und Geschwindigkeit des Zellwachstums alle vier bis sieben Tage durchgeführt.

Der *Kollagenaseverdau* wurde aus der restlichen zerkleinerten Tumormasse hergestellt. Das Material wurde in 7 ml PBS und 3 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung (Biochrom AG) verbracht und über 30 min unter Schütteln (500 – 600 UPM) inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und verworfen. Zur verbleibenden Zellmasse wurden 7 ml Zellkulturmedium (DMEM/FKS) und 3 ml einer Kollagenase Lösung (c: 10 mg/ml) gegeben. Der Ansatz wurde unter Schütteln (500 – 600 UPM) in einem Zellkulturschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> für 12-24 h inkubiert. Die Dauer der Inkubation wurde von der Ausgangsmenge des Tumormaterials bestimmt. Nach Auflösung der Gewebestruktur wurde der Überstand abzentrifugiert (1000 UPM/5 min) und verworfen.

Das verbliebene Zellpellet wurde mit PBS gewaschen, aufgelöst und auf zwei Ansätze (DMEM/FKS bzw. DMEM/Pfd) in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen verteilt.

### 3.2.2.2 Passagieren der Zellen

Die verschiedenen Ansätze wurden nach Bedarf in angemessenen Abständen gesplittet und passagiert. Zunächst wurde der Überstand abgesaugt und die adhärennten Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 1,5 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung (Biochrom AG) auf die Zellkultur gegeben und über 5 Minuten im Zellkulturschrank (37°C/5 % CO<sub>2</sub>) belassen. Nach Kontrolle unter dem Lichtmikroskop wurden die abgelösten Zellen in 7 ml serum-freies Medium aufgenommen und in 15 ml-Zentrifugen-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation (1200 UPM/5 min) wurde das Pellet beurteilt und entsprechend der Größe die Hälfte bis ein Drittel der Zellen wieder in die Zellkulturflasche verbracht und die restlichen Zellen kryokonserviert.

### 3.2.2.3 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen in 1,5 ml Einfriermedium, bestehend aus 90 % FKS und 10 % DMSO, gelöst und in Einfrier Röhrchen überführt. Zunächst erfolgte eine Lagerung in vorgekühlten (4°C) Einfrierboxen (Isopropanol) bei -80°C. Nach 24 Stunden wurden sie aus den Einfrierboxen genommen und für die weitere Lagerung im -80°C Kühlschrank belassen.

### 3.2.2.4 Lebend-Tot-Färbung

Zur Beurteilung des Zellwachstums und der Zellzahlermittlung vor Beginn eines Transfektionsversuchs wurden die Zellen einer Lebend-Tot-Färbung unterzogen. Dazu wurden 10 µl einer 0,4%igen Trypan-Blau-Lösung mit 10 µl der Zellsuspension vermischt, die gefärbte Zellsuspension in eine mit einem Deckgläschen versehene Neubauer-Zählkammer gefüllt und die Zellzahl manuell unter dem Lichtmikroskop bestimmt.

## **3.2.3 Nicht-viraler Gentransfer bei Zellen des Equinen Sarkoids mit Magnetofektion**

### 3.2.3.1 Transfektionen

Zur Transfektion mit dem Promotergen Luciferase wurden die Zellen wie zur gewöhnlichen Passagierung aus den Zellkulturflaschen gelöst und die Zellzahl bestimmt. In eine 96-well-Flachboden-Zellkulturplatte wurden 7000 Zellen/well in 150 µl des entsprechenden Mediums ausgelegt und über Nacht bei 37°C/5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die Herstellung der Transfektionslösung sowie der Verdünnungsreihe erfolgte in 96-well Rundbodenzellkulturplatten. Da lediglich zwei verschiedene Transfektionsreagenten verwendet wurden, konnten auf einer 96-well Zellkulturplatte sowohl die Ansätze mit Einwirkung des Magnetfeldes (MAG +) als auch die Kontrollansätze (MAG -) durchgeführt werden. Der Ansatz der Transfektionslösung und der Verdünnungsreihe erfolgte in Triplets, d.h. in einer Menge an Transfektionslösung, die nötig war, um drei Reihen der Zellkulturplatte zu transfizieren, und wurde in einer Reihe der 96-well Rundbodenzellkulturplatte angesetzt.

Zuerst wurden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen 1304,6 µl des entsprechenden serum-freien Mediums vorgelegt. Dazu wurden 5,8 µl einer kommerziell erhältlichen Plasmid-DNA-Lösung (pBluc, Plasmid Factory, Bielefeld, [c] 5 µg/µl) pipettiert, so dass die Konzentration an DNA in der Stock-Solution 0,022 µg/µl betrug. In ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen wurden pro zu transfizierenden Triplets 28,8 µl des jeweiligen Transfektionsreagenten (DreamfectGold<sup>®</sup> bzw. Lipofectamine<sup>™</sup>2000; ([c] 5 µg/µl) pipettiert und anschließend 328 µl der DNA-Stock-Solution zugegeben. Das Verhältnis von Plasmid-DNA-Lösung und Transfektionsreagenten betrug somit 1:4 (Tab. 3.1).

Es folgte eine Inkubationszeit von 20 Minuten, damit sich die anionische Plasmid-DNA mit den kationischen Transfektionsreagenten verbinden konnte. In der Zwischenzeit wurde 3,6 µl einer kationischen Eisenoxid-Nanopartikel-Lösung ([c] 1 µg/µl) in die entsprechenden wells der Zeile A und 180 µl des entsprechenden serumfreien Mediums in die wells der Zeilen B-H der 96-well-Rundboden Zellkulturplatte pipettiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die gesamte Flüssigkeitsmenge (356,8 µl) des 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchens in das entsprechende well der Reihe A der Rundbodenplatte pipettiert und mit derselben Pipette die magnetische Eisenpartikel-Lösung und die Transfektionslösung vermischt. Das Gesamtvolumen in den wells der Reihe A betrug 360,4 µl.

Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt, in dem je 180 µl der Transfektionslösung aus der Zeile A in die wells der nächsten Zeile übertragen und vorsichtig mit der Pipette gemischt wurden. Diese Schritte wurden insgesamt siebenmal durchgeführt und die überschüssige Flüssigkeitsmenge (180 µl) aus den wells der Reihe H verworfen (Tab. 3.1).

**Tab. 3.1: Übersicht über die Konzentrationen der einzelnen Bestandteile der Transfektionslösung**

Reihe	[c] pBluc (µg)	[c] Transfektionsreagent (µg)	[c] Magnet-Nanopartikel (µg)	Verhältnis DNA:Transfektionsreagenz	Verhältnis DNA:Magnetpartikel
<b>A</b>	1	4	1		
<b>B</b>	0,5	2	0,5		
<b>C</b>	0,25	1	0,25		
<b>D</b>	0,125	0,5	0,125		
<b>E</b>	0,0625	0,25	0,0625	1:4	1:1
<b>F</b>	0,03125	0,125	0,03125		
<b>G</b>	0,015625	0,0625	0,015625		
<b>H</b>	0,0078125	0,03125	0,0078125		

Mit einer Multikanalpipette erfolgte der Übertrag von je 50 µl der fertigen Verdünnungsreihe der Transfektionslösung mit den Transfektionsreagenten Lipofectamine<sup>™</sup>2000 und DreamfectGold<sup>®</sup> auf die festgelegten wells der 96-well Zellkulturplatte (Transfektion).

### 3.2.3.2 Magnetofektion

Direkt nach Übertrag der Transfektionslösung mit den kationischen Transfektionsreagenten (Lipofectamine<sup>™</sup> bzw. 2000 DreamfectGold<sup>®</sup>) auf zwei Triplets wurde die Zellkulturplatte

im Zellkulturschrank (37°C/5 % CO<sub>2</sub>) für 30 Minuten einem Magnetfeld (Eisen-Neodymium-Bor Magnet) ausgesetzt (MAG +). Anschließend erfolgte die Übertragung von je 50 µl der Verdünnungsreihe auf die entsprechenden wells der Zellkulturplatte, die als Kontrollansatz dienten und ohne Einwirkung des Magnetfeldes (MAG -) inkubiert wurden.

### 3.2.3.3 Messung der gebildeten Luciferase

Zunächst wurde der Überstand aus der 96-well-Flachbodenzellkulturplatte verworfen und die Zellkultur mit je 150 µl PBS Dulbecco/well gewaschen. Anschließend wurde in jedes well 100 µl des Lyse-Puffers pipettiert. Nach 10 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Zellkulturplatte auf Eis verbracht. Je 50 µl der lysierten Zellsuspension wurden mit einer Multikanalpipette in entsprechende wells einer schwarzen 96-well-Flachbodenplatte übertragen. Nach Zugabe von 100 µl des Luciferase-Puffers wurde die resultierende Fluoreszenz sofort photometrisch ermittelt (TopCount Microplate Scintillation and Luminiscence Counter, Canberra Packard GmbH).

### 3.2.3.4 Messung des gebildeten Zellproteins

Zunächst wurde 10 µl der lysierten Zellsuspension auf eine neue 96-well-Flachbodenplatte und 40 µl BioRad-Reagenz zugegeben. Anschließend wurde in jedes well 150 µl ddH<sub>2</sub>O zugegeben und die Flüssigkeiten vorsichtig durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gleichmäßig gemischt. Die Messung des gebildeten Zellproteins erfolgte optometrisch bei 590 nm (Victor<sup>2</sup>™ 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer, Fremont USA).

### 3.2.3.5 Standardkurven

Die Ermittlung der *Standardkurve für Luciferase-Messungen* erfolgte in schwarzen 96-well-Flachbodenplatten (Corning Costar Corporation, Cambridge UK). Zunächst wurde in die Vertiefungen der Spalten 1 und 3 je 50 µl und in die Spalten 2 und 4 je 40 µl Luciferase Puffer gegeben. In die Vertiefung A1 wurde zusätzlich noch 48 µl Luciferase-Puffer und 2 µl des Luciferase-Standards ([c] 100 ng/µl) pipettiert. Das Ausgangsvolumen der Vertiefung A betrug 100 µl. Anschließend wurden je 50 µl von A1→B1→C1→D1→E1 →F1→ G1 → H1 pipettiert. Von H1 wurden 50 µl nach A3 übertragen. Die Verdünnungsreihe endete mit der Übertragung von 50 µl aus F3 nach G3. Die Vertiefung H3 blieb nur mit Lyse-Puffer belegt. Je 10 µl aus den Vertiefungen von Spalte 1 wurden in die entsprechenden Vertiefungen der Spalte 2 und 10 µl aus den Vertiefungen der Spalte 3 in die entsprechenden Vertiefungen der Spalte 4 übertragen. Die Messung der gebildeten Fluoreszenz erfolgte photometrisch (TopCount Microplate Scintillation and Luminiscence Counter, Canberra Packard GmbH). Die Ergebnisse der Luciferase-Messungen aus den Spalten 2 und 4 wurden zur Ermittlung der Standardkurve herangezogen.

Die Ermittlung der *Standardkurve zu den Proteinmessungen* erfolgte in einer 96-well-Flachbodenplatte. Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe in den wells A1 bis A12 angefertigt. Dazu wurden in jedes well der Reihe A 25 µl dd H<sub>2</sub>O vorgelegt und in das well A1 zusätzlich 50 µl BSA ([c] 1,45 mg/ml) gegeben. Nach Mischen mit der Pipette wurden je 10 µl der Flüssigkeit auf das jeweils nächste well übertragen (A1→A2→A3→A4→A5→A6→A7→A8→A9 →A10→A11). Das well A12 blieb nur mit ddH<sub>2</sub>O belegt. Anschließend wurden aus den wells der Reihe A je 10 µl der Verdünnungsreihe in die entsprechenden wells der Reihe B pipettiert und in jedes well der Reihe B zusätzlich 40 µl Biorad Reagenz und 150 µl ddH<sub>2</sub>O gegeben. Danach wurde die Flüssigkeit in den wells der Reihe B durch Auf- und Abpipettieren vermischt und die Werte der Standardkurve optometrisch bei 590 nm (Victor<sup>2</sup><sup>TM</sup> 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer) ermittelt. Zur Festlegung der Standard-Kurve dienten die Werte der wells B1 bis B12.

### 3.2.4 Stimulation equiner Sarkoidzellen mit feline Zytokin-Genen

Die Stimulation der Equinern Sarkoidzellen erfolgte mit den feline Zytokin-Genen Interferon gamma (feIFN- $\gamma$ ; [c] 5 mg/ml) und dem feline Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (feGM-CSF; [c] 5 mg/ml).

#### 3.2.4.1. Transfektionen

Für den Hauptversuch wurden in zwei 6-well Flachboden-Zellkulturplatten je 300 000 Zellen pro well in vier Milliliter DMEM/FKS ausgelegt und über Nacht im Zellkulturschrank (37°C und 5 % CO<sub>2</sub>) bebrütet.

Insgesamt wurden für den Hauptversuch vier verschiedene Transfektionslösungen hergestellt:

1. Transfektion mit dem feline Zytokin-Gen Interferon gamma (feIFN- $\gamma$ )
2. Transfektion mit dem feline Zytokin-Gen GM-CSF (feGM-CSF)
3. Transfektion mit dem Luciferase-Gen (pBluc)
4. Transfektion mit einer Kombination der feline Zytokin-Gene Interferon gamma und GM-CSF (feIFN- $\gamma$ /feGM-CSF)

Pro verwendetem Zytokin-Gen wurden drei mittlere Dosisstufen aus dem Vorversuch als Basis für die Berechnung der Plasmidmenge herangezogen und die DNA-Menge der Zellzahl im Hauptversuch (300 000 Zellen/well) angepasst.

0,25 µg Plasmid / 7 Tsd. Zellen → 10,71 µg Plasmid-DNA / 300 000 Zellen  
 0,125 µg Plasmid / 7 Tsd. Zellen → 5,36 µg Plasmid-DNA / 300 000 Zellen  
 0,0625 µg Plasmid / 7 Tsd. Zellen → 2,68 µg Plasmid-DNA / 300 000 Zellen

Die insgesamt benötigte Menge an Plasmiden (18,75 µg Plasmid) wurde wiederum mit dem Sicherheitsfaktor 1,2 multipliziert. In ein 1,5 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen wurden 326,65 µl serum-freies Dulbeccos Modifed Eagle Medium, supplementiert mit 100 IE/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin pipettiert und die errechnete Menge an Plasmid (22,5 µg Plasmid-DNA = 4,5 µl Plasmid-DNA-Lösung) zugegeben.

Die DNA-Stock-Solution für eine kombinierte Transfektionslösung mit feIFN- $\gamma$  und feGMCSF wurde mit je 22,5  $\mu\text{g}$  der entsprechenden Plasmid-DNA-Lösung (feIFN- $\gamma$  & feGM-CSF; [c] 5 mg/ml) und 292,5  $\mu\text{l}$  serum-freies Dulbeccos Modified Eagle Medium, supplementiert mit 100 IE/ml Penicillin und 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin, hergestellt.

In ein zweites 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen wurden 18  $\mu\text{l}$  des Transfektionsreagenten DreamfectGold<sup>®</sup> vorgelegt und das gesamte Volumen der DNA-Stock-Solution zugegeben. Für die kombinierte Transfektionslösung wurden 36  $\mu\text{l}$  des Transfektionsreagenten vorgelegt. Das Verhältnis von Plasmid-DNA zu Transfektionsreagent betrug 1:4.

Die DNA-Lösung wurde mit dem Transfektionsreagenten vermischt und über 20 Minuten bei Raumtemperatur belassen.

Währenddessen wurden in drei wells der Reihe A einer 96-well Rundloch-Platte je 11,25  $\mu\text{l}$  der magnetischen Eisenoxid-Nanopartikel-Lösung ([c] 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) und in die zwei folgenden wells der Reihe B und C je 180  $\mu\text{l}$  serum-freies Medium vorgelegt.

Für den kombinierten Stimulationsversuch wurde in ein viertes well 22,5  $\mu\text{l}$  der magnetischen Eisenoxid-Nanopartikel-Lösung ([c] 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) vorgelegt und die folgenden wells der Reihen B und C mit 180  $\mu\text{l}$  serum-freies Mediums gefüllt. Das Verhältnis von Plasmid-DNA zu magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln betrug 1:1.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Gesamtmenge aus dem jeweiligen Mikrozentrifugenröhrchen in die markierten wells mit der Magnetpartikel-Lösung überführt und nach sorgfältigem Vermischen 180  $\mu\text{l}$  der Transfektionslösung weiterpipettiert (Verdünnungsreihe).

Die gesamte Transfektionslösung wurde anschließend auf die entsprechenden markierten Schalen der 6-well Zellkulturplatte übertragen und während 30 Minuten der Einwirkung eines Neodymium-Eisen-Bor-Magneten ausgesetzt (Magnetofektion).

24 Stunden nach Transfektion wurde ein Medienwechsel durchgeführt und die Überstände bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### 3.2.4.2 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Als Primärantikörper zur Beurteilung der MHC-I-Expression auf primären Zellen des Equinen Sarkoids wurde ein kommerziell erhältlicher Mouse-Anti-Equine MHC Class I-Antikörper verwendet (AbD Serotec, Düsseldorf). Als Negativkontrolle zum Ausschluss falsch-positiver Signale diente ein ebenfalls kommerziell erhältlicher Mouse-IgG2a-Antikörper (AbD Serotec, Düsseldorf). Beide Primärantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:10 verwendet. Der verwendete Goat-Anti-Mouse-IgG-Sekundärantikörper wurde ebenfalls kommerziell bezogen (AbD Serotec, Düsseldorf) und in einer Verdünnung von 1:50 verwendet. Der Sekundärantikörper lag bereits fluoreszenzkonjugiert (DyLight 488, Spektrum 493 nm (Absorption) – 518 nm (Emission)) vor und war gegenüber Fremdspezies adsorbiert. Zur Identifikation nicht-vitaler Zellen wurde Propidium Iodide (PI, Spektrum 536 nm (Absorption) – 617 nm (Emission)) in einer Verdünnung von 1:100 verwendet.

#### 3.2.4.3 Fluoreszenzmarkierungen

Fünf Tage nach Transfektion wurden die Überstände eingefroren, die Zellen mit 3 ml PBS Dulbecco (Biochrom AG) gewaschen und mit 300  $\mu\text{l}$  einer Trypsin-EDTA Lösung (Biochrom AG) inkubiert. Nach 1 – 2 Minuten wurde das Enzym durch Zugabe von 4 ml FACS-Puffer (PBS Dulbecco supplementiert mit 1 % FKS) geblockt und die Zellsuspension in

entsprechend markierte Zentrifugen-Röhrchen (15 ml) überführt. Nach Zentrifugation (3 min/900 RPM) wurde der Überstand abgesaugt, das entstandene Zellpellet in 600 µl FACS-Puffer resuspendiert und auf 3 wells einer 96-well-Rundlochplatte verteilt.

Die Fluoreszenzmarkierungen wurden in Dreifach-Ansätzen durchgeführt (s.o.). Zur Bestimmung des Anteils und der Intensität der Eigenfluoreszenz der Zellen wurde ein Ansatz nur mit FACS-Puffer inkubiert. Je ein Ansatz wurde mit der Negativ-Kontrolle (Mouse IgG2a) zum Ausschluss falsch-positiver Signale und mit dem Mouse-Anti-Equine MHC Class I-Antikörper zur Beurteilung der Expression von MHC-I-Molekülen durchgeführt.

Die in 96-well-Rundbodenplatten aufgebraachten Proben wurden zunächst einem Waschschrift unterzogen. Dazu wurde die Zellkulturplatte zentrifugiert (30s/1300 UPM), um das Zellpellet auf dem Grund der Platte zu positionieren. Der Überstand wurde verworfen und 200 µl FACS-Puffer (1 % FKS in PBS Dulbecco) zugegeben. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen (= Waschen) und durch vorsichtiges Klopfen das Pellet gelockert. Anschließend wurden je 30 µl FACS-Puffer und die Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung aufgetragen und die Proben für 20 – 25 Minuten bei 4°C inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschschrift, um nicht gebundene Antikörper aus dem Überstand zu entfernen. Anschließend wurden 30 µl des Goat-Anti-Mouse-IgG-Sekundärantikörpers in der Verdünnung 1:50 auf jede Probe pipettiert und die Zellkulturplatte über 15 Minuten gekühlt inkubiert. Es folgte ein Waschgang, wiederum um nicht gebundene Sekundärantikörper aus den Proben zu entfernen. Der nächste Waschschrift erfolgte mit einem Zusatz von Propidium Iodide (PI [c] 1:100) zur Markierung nicht-vitaler Zellen. Die Waschlösung wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur auf den Proben belassen. Ein weiterer Zentrifugations- und Waschschrift folgten.

Zuletzt wurde das gefärbte Zellpellet in 200 µl FACS-Puffer gelöst und in entsprechend gekennzeichnete Messröhrchen für die Durchflusszytometrie, in die bereits 200 µl FACS-Puffer vorgelegt wurden, überführt.

#### 3.2.4.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder (engl.: *fluorescence-activated-cell-sorting*, (FACS)) ermöglicht die Beurteilung der räumlichen und fluoreszierenden Eigenschaften suspendierter Partikel. Dazu werden diese einzeln an einem Laser oder einem anderem Lichtstrahl vorbeigeführt, wobei das auftreffende Licht gestreut wird. Bei den untersuchten Partikeln handelt es sich meist um Zellen. Die Messparameter stellen sich als Änderungen im Streulicht, im absorbierten und emittierten Licht dar. Die Ablenkung der Strahlen nach vorne wird als Vorwärtstreulicht (Forwardscatter, FSC) und die Ablenkung der Strahlen zur Seite als Seitwärtstreulicht (Sidescatter, SCC) bezeichnet. Der Forwardscatter erlaubt die Beurteilung der relativen Zellgröße und der Sidescatter die Beurteilung der Zellgranularität. Somit können unterschiedliche Populationen im gesamten gemessenen (Zell-) Material definiert und Zellen mit bestimmten Eigenschaften separiert werden (Cell-Sorting). Ein Histogramm stellt die relative Fluoreszenz der Anzahl der gemessenen positiven Signale (Events) gegenüber. Durch ein zusätzliches Auswertverfahren, das „Schleusen“ von Zellen (engl.: *gating*), können die Eigenschaften eines bestimmten Anteils der gemessenen Zellen noch genauer beurteilt werden und so unter anderem Zelldébris aus der Auswertung herausgenommen werden.

Die Daten der untersuchten Zelllinien wurden mit dem Gerät BD FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, USA) erhoben.

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Untersuchungen erfolgte mit dem Programm FlowJo<sup>®</sup> Version 8.8.6 für Macintosh (Tree Star Inc, Ashland, USA).

### 3.2.5 ELISA (Enzyme-linked-Immunesorbant-Assay)

Um den Transfektionserfolg des Hauptversuchs zu überprüfen und zu objektivieren wurden die Überstände der Zellkulturen aus dem Hauptversuch mit einem ELISA untersucht. Dazu kamen kommerziell erhältliche ELISA-Sets (feIFN- $\gamma$  Duo Set Kit und feGM-CSF Duo Set Kit, beide R&D Systems) zum Einsatz. Bei den verwendeten Sets handelt es sich um sog. „Sandwich-ELISAs“, wobei das gesuchte Antigen zwischen zwei Antikörpern gebunden wird. Diese ELISAs sind speziell für die Untersuchung von Zellkulturüberständen entwickelt worden.

Der erste Antikörper („capture antibody“) wurde in der vorgegebenen Arbeitskonzentration in PBS gelöst (anti-feIFN- $\gamma$ : [c] 4  $\mu\text{g/ml}$  und anti-feGM-CSF: [c] 1  $\mu\text{g/ml}$ ). Es wurden je 100  $\mu\text{l}$  dieser Lösungen in entsprechende wells einer 96-well-Analysenplatte (nunc 96 well ELISA plate) überführt und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden zur Vermeidung von Interferenzen Antikörper, die nicht an den Boden der ELISA-Platte gebunden waren, entfernt. Dies erfolgte automatisch (ImmunoWash Model 1575) durch dreimaliges Spülen und nachfolgende Aspiration mit je 400  $\mu\text{l/well}$  Waschpuffer (0,05 % Tween 20 in PBS). Am Ende des Waschvorgangs wurde eventuell verbliebene Restflüssigkeit durch kräftiges Klopfen der umgekehrten Platte auf Zellstoff entfernt. Der nächste Schritt erfolgte durch Zugabe von 300  $\mu\text{l}$  Blockpuffer (IFN- $\gamma$ : 1 % BSA in PBS mit 0,05 %  $\text{NaN}_3$ ; GM-CSF: 1 % BSA in PBS) pro well. Dadurch wurden frei gebliebene Bereiche zwischen dem gebundenen capture antibody geblockt und unspezifische Bindungen an den Boden der ELISA-Platte vermieden. Dieser Vorgang benötigte mindestens eine Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Restlicher Blockpuffer wurde durch dreimaliges Waschen und Aspirieren der Flüssigkeit mit Waschpuffer entfernt. Anschließend konnten in jedes well 100  $\mu\text{l}$  Probenmaterial bzw. Standard aufgetragen werden. Die Platte wurde mit einer adhäsiven Folie bedeckt und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte ein erneuter dreimaliger Waschvorgang, um nicht-gebundenes Probenmaterial zu entfernen. Im Anschluss wurden in jedes well 100  $\mu\text{l/well}$  des, in der entsprechenden Arbeitskonzentration (IFN- $\gamma$ : 800 ng/ml in 0,1 % BSA und 0,05 % TWEEN 20 in TBS; GM-CSF: 500 ng/ml und 1 % BSA in PBS) verdünnten, detection antibody hinzugegeben und die Platten für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Zeit schloss sich der dreimalige Waschvorgang an. Es folgte die Zugabe des an Streptavidin gebundenen Enzyms horseradishperoxidase (HRP). Auch dieses Reagenz wurde zuvor in der entsprechenden Arbeitskonzentration (IFN- $\gamma$ : 0,5 % HRP, 0,1 % BSA und 0,05 % Tween 20 in TBS; GM-CSF: 0,5 % HRP und 1 % BSA in PBS) hergestellt. 100  $\mu\text{l/well}$  der Streptavidin-HRP Lösung wurden zugegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur unter Vermeidung von direktem Lichteinfall inkubiert. Ein dreimaliger Waschgang entfernte wieder ungebundenes Reagenz. Zur Sichtbarmachung der Reaktion wurde 100  $\mu\text{l/well}$  des Enzym-Substrats zugegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur unter Vermeidung von direktem Lichteinfall inkubiert. Die Substrat-Lösung besteht aus einer 1:1 Mischung von „color reagent A“ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und „color reagent B“ (Tetramethylbezidin). Enthielten die Proben das gesuchte Zytokin zeigte sich eine blaue Verfärbung. Die Reaktion wurde mit 50  $\mu\text{l/well}$  einer 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  Lösung („stop solution“) gestoppt und die Platte vorsichtig geklopft, um eine einwandfreie Vermischung zu garantieren. Es zeigten sich Farbumschläge nach gelb, die quantitativ photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt wurden (Victor<sup>2</sup><sup>™</sup> 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Fremont, USA). Die Nachweisgrenzen der ELISA Duo Set Kits lagen bei 31,2-4000

pg/ml (feIFN- $\gamma$ ) bzw. 15,6-2000 pg/ml (feGM-CSF).

### 3.3 Hypothesen

#### 3.3.1 Arbeitshypothese der vorliegenden Arbeit

- a) Der Einsatz der Magnetofektion beeinflusst die Ergebnisse eines nicht-viralen Gentransfers (Transfektion) bei Zellen des Equinen Sarkoids positiv.
- b) Durch Transfer von Plasmiden, die für heterologe Zytokine kodieren, lässt sich die Expression von MHC-I-Molekülen in Zellkulturen des Equinen Sarkoids erhöhen.

#### 3.3.2 Nullhypothese der vorliegenden Arbeit

- a) Der Einsatz der Magnetofektion hat keinen Effekt auf die Effizienz eines nicht-viralen Gentransfers bei Zellen des Equinen Sarkoids.
- b) Der Transfer heterologer Zytokin-Gene erhöht die MHC-I-Expression auf Zellkulturen des Equinen Sarkoids nicht.

### 3.4 Statistische Analyse und Darstellung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel Version 2003 sowie dem statistischen Programmpaket SPSS für Windows Version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Das Vorhandensein und das Ausmaß einfacher bivariater Zusammenhänge quantitativer Messgrößen wurden anhand des rangbasierten Korrelationskoeffizienten von Spearman statistisch evaluiert. Aufgrund des mehrfaktoriellen Versuchsplans mit den Experimentkonfigurationsvariablen Zelllinie (sechs Faktorstufen), Dosisstufe (acht Faktorstufen) und Kulturmedium (zwei Faktorstufen), erfolgte die deskriptive sowie konfirmatorische Datenanalyse unter der Verwendung allgemeiner linearer Modelle. Um die Korrelationsstruktur der primären Zielgrößen „Luciferase“ und „MHC-1-Komplex“ innerhalb der einzelnen Versuchssettings adäquat zu berücksichtigen, erfolgte die Berechnung der Modelle auf Basis des GEE (Generalized Estimation Equations) Modellansatzes. Da die Luciferase-Werte eine rechtsschiefe Verteilung aufwiesen, wurden anstelle der Originalwerte die logarithmierten Luciferase-Messungen (Transformationsfunktion: natürlicher Logarithmus) als abhängige Größe in den Regressionsmodellen verwendet. Basierend auf diesem statistischen Modell wurden dann marginale Mittelwertschätzung mit den korrespondierenden Standardfehlern bzw. 95 % Konfidenzintervallen für interessierende Faktorstufenausprägungen berechnet und in Form von Fehlerbalkendiagrammen vergleichend dargestellt. Zweiseitige Hypothesentests hinsichtlich der Einflussnahme der verschiedenen applizierten Plasmiddosen bzw. der beiden verwendeten Kulturmedien wurden basierend auf den Koeffizientenschätzungen und den dazugehörigen Wald-Tests bzw. den ANOVA (engl.: *analysis of variance*) F-Tests der jeweiligen Regressionsmodelle vorgenommen. Für die Interpretation der resultierenden p-Werte wurde ein lokales Signifikanzniveau von 5 % zu Grunde gelegt. Für eine übersichtlichere Präsentation der Ergebnisse insbesondere in der grafischen Darstellung, wird folgende Symbolik verwendet:

p < 0,05      signifikant auf dem 5% Signifikanzniveau \*

p < 0,01      signifikant auf dem 1% Signifikanzniveau \*\*

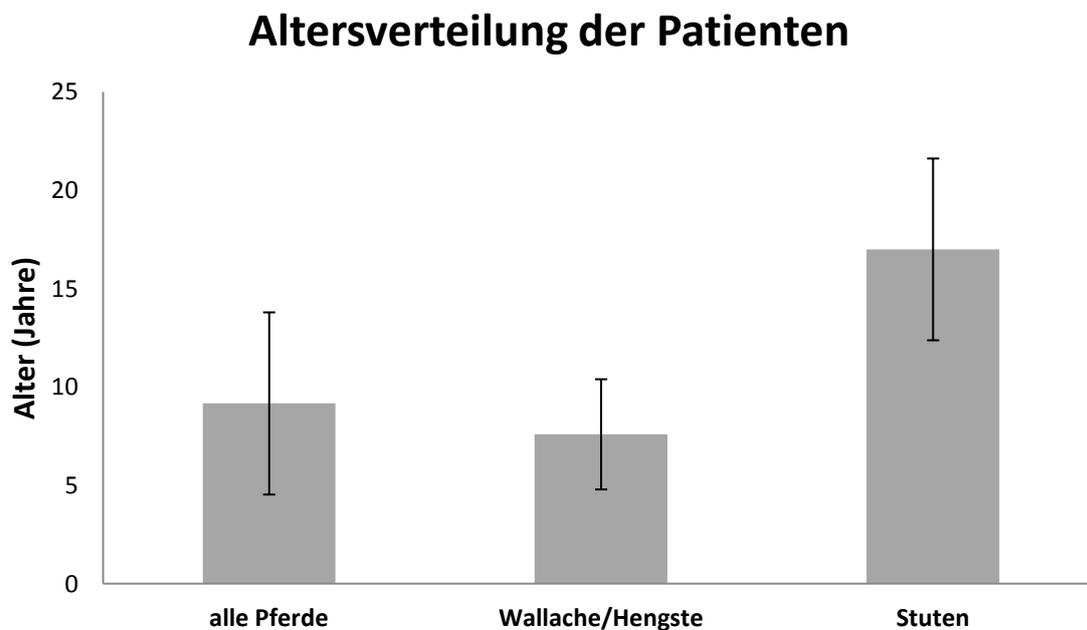
p < 0,001     signifikant auf dem 0,1% Signifikanzniveau \*\*\*

## 4 ERGEBNISSE

Alle Tiere wurden in Allgemeinanästhesie operiert und aus allen Tumoren konnten Zelllinien gewonnen werden (*Eq\_1* – *Eq\_12*). Diese wurden entweder nach Gewinnung einer Einzelzellsuspension durch Kollagenaseverdau oder mittels des Auswanderungsverfahrens aus Tumorstückchen kultiviert.

### 4.1 Pferde und Tumormaterial

Insgesamt wurde Tumormaterial von zwölf Pferden in Allgemeinanästhesie gewonnen und aus allen Tumoren konnten Zelllinien kultiviert werden. Die erkrankten Pferde waren im Durchschnitt mittleren Alters ( $\bar{x}$  9,17 Jahre;  $s = \pm 4,63$  Jahre;  $n = 12$ ). Im Patientengut befanden sich hauptsächlich Wallache. Die männlichen Tiere waren deutlich jünger ( $\bar{x}$  7,6 Jahre;  $s = \pm 2,8$  Jahre;  $n = 10$ ) als die Stuten ( $\bar{x}$  17 Jahre;  $s = \pm 4,62$  Jahre;  $n = 2$ ) (Abb. 4.1). Als Rassen waren überwiegend Warmblüter vertreten ( $n = 8$ ), die übrigen Pferde waren Süddeutsche Kaltblüter ( $n = 2$ ), ein Quarter Horse und ein Haflinger.



**Abb. 4.1** Altersverteilung der Patienten.  
Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an

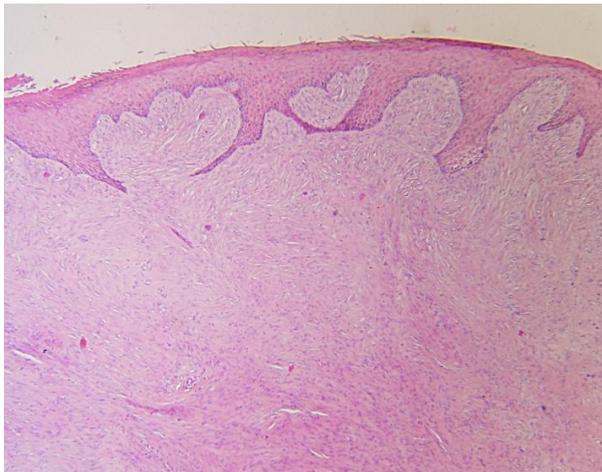
## 4.2 Tumormaterial und pathologisch-histologische Untersuchung

Das Tumormaterial wurde verschiedenen klinischen Formen des Equinen Sarkoids zugeordnet (Tierpathologie Dr. v. Bomhard, München; Tab. 4.1):

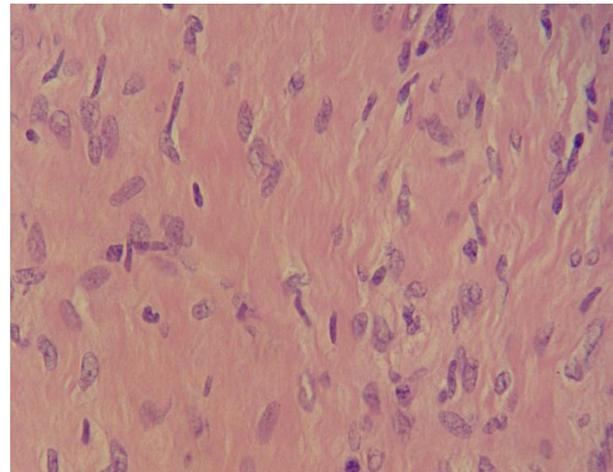
**Tab. 4.1: Klinische Formen des gewonnenen Tumormaterials**

<i>Klinische Form</i>	<i>Anzahl</i>
Fibroblastisch	8
Nodulär	2
Verrukös	1
Gemischt	1

Nach der Entfernung der Umfangsvermehrungen wurde das gewonnene Material pathologisch-histologisch untersucht. Bei elf Patienten konnte die klinische Verdachtsdiagnose „Equines Sarkoid“ auch pathologisch-histologisch bestätigt werden (Abb. 4.2 a) und 4.2 b)). Bei einem Tier (*Eq\_7*) wurde die klinische Verdachtsdiagnose „Equines Sarkoid“ nicht bestätigt. Die Umfangsvermehrung dieses Pferdes wurde als „Schwannom“ diagnostiziert.



**Abb.4.2 a)**



**Abb.4.1 b)**

**Abb. 4.2:** Schnittpräparat der Umfangsvermehrung von Pferd #4, Hämatoxylin-Eosin Färbung;

- a) Vergrößerung 4x
- b) Vergrößerung 40x

(Aufnahmen: Tierpathologie Dr. v. Bomhard, München)

### 4.2.1 Untersuchung auf Bovine Papillomaviren

Bei sechs Pferden wurde ein Fragment des E5 Gens von BPV-1 oder BPV-2 mit einer Länge von 244 Basenpaaren nachgewiesen (Friedrich-Löffler Institut, Insel Riems). Das Tier, bei dem die Untersuchung ein negatives Ergebnis erbrachte, war jenes, bei dem durch die mikroskopische Untersuchung der Umfangsvermehrung die Diagnose „Schwannom“ gestellt wurde (Tab. 4.2).

Tab. 4.2: Ergebnisse der Untersuchung auf das Onkoprotein BPV E5

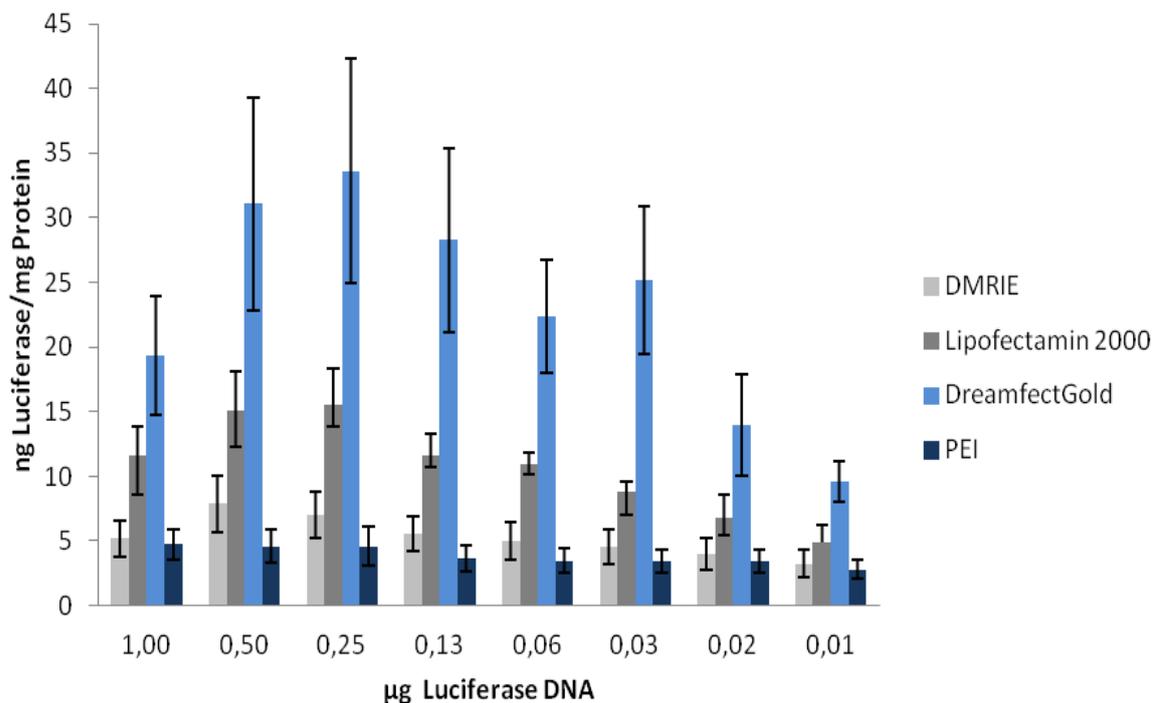
	<b>BPV E5</b>	<b>Diagnose</b>
Pferd 6	positiv	Equines Sarkoid
Pferd 7	negativ	Schwannom
Pferd 8	(schwach) positiv	Equines Sarkoid
Pferd 9	positiv	Equines Sarkoid
Pferd 10	positiv	Equines Sarkoid
Pferd 11	positiv	Equines Sarkoid
Pferd 12	positiv	Equines Sarkoid

### 4.3 Ergebnisse des nicht-viralen Gentransfers mittels Magnetofektion

#### 4.3.1 Vergleich vier verschiedener Transfektionsreagenzien

Zunächst wurden Zelllinien von drei Pferden (*Eq\_1* – *Eq\_3*) mit dem Luciferase-Plasmid pBluc transfiziert. Der Gentransfer wurde mit vier verschiedenen kationischen Lipidpartikeln durchgeführt. Dies erfolgte mit Zusatz der Eisenoxid-Nano-Partikel-Lösung aber ohne Einwirkung des Magnetfeldes, um zunächst den Einfluss der verschiedenen Substanzen zu beurteilen.

Mit den Transfektionsreagenzien *Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000* und *DreamfectGold<sup>®</sup>* wurden die besten Transfektionsergebnisse erreicht (Abb. 4.3). Im weiteren Vorversuch wurde deshalb der Einfluss des Magnetfeldes bei Transfektionen nur mit diesen beiden Substanzen beurteilt.



**Abb. 4.3:** Darstellung des Transfektionserfolges bei Verwendung von vier verschiedenen Transfektionsreagenzien. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (ssm) an. Die Angabe der eingesetzten Menge an Luciferase-DNA ist aus Gründen der Übersichtlichkeit auf zwei Dezimalstellen gerundet.

### 4.3.2 Einfluss des Magnetfeldes auf den Transfektionserfolg

Im weiteren Vorversuch wurde der Einfluss des Magnetfeldes bei Verwendung der Transfektionsreagenzien *Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000* und *DreamfectGold<sup>®</sup>* untersucht. Die Versuche wurden mit primären Zellkulturen von je sechs Tieren durchgeführt. Die gleichen Zellkulturen wurden ebenfalls mit dem Zusatz von autologem Pferdeserum transfiziert. Somit konnte sowohl der Einfluss des Zellkulturmediums als auch des verwendeten Transfektionsreagenz beurteilt werden.

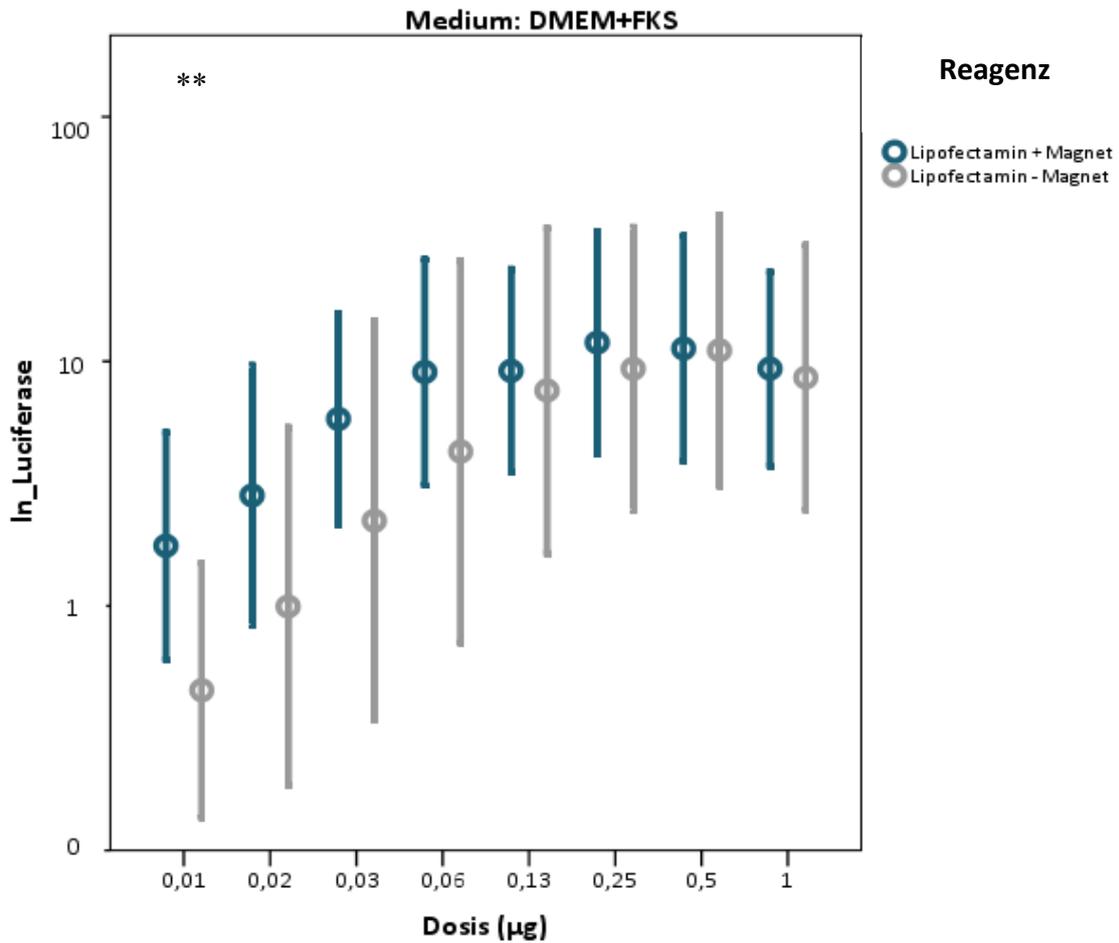
#### 4.3.2.1 Kulturmedium DMEM+FKS

Durch die Einwirkung des Magnetfeldes konnte bei Zellen, die in diesem Standardmedium kultiviert wurden, die Transfektionseffizienz durch die Einwirkung des Magnetfeldes gesteigert werden. Dies war bei beiden eingesetzten Transfektionsreagenzien (*Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000* resp. *DreamfectGold<sup>®</sup>*) der Fall. Als Maß für den Transfektionserfolg diente die Menge der gebildeten Luciferase. Eine Übersicht über die durchschnittliche Steigerung des gebildeten Luciferase-Proteins (pg/mg) bei Einsatz der Magnetofektion gibt Tabelle 4.3. Die Werte wurden über alle Dosisstufen gemittelt.

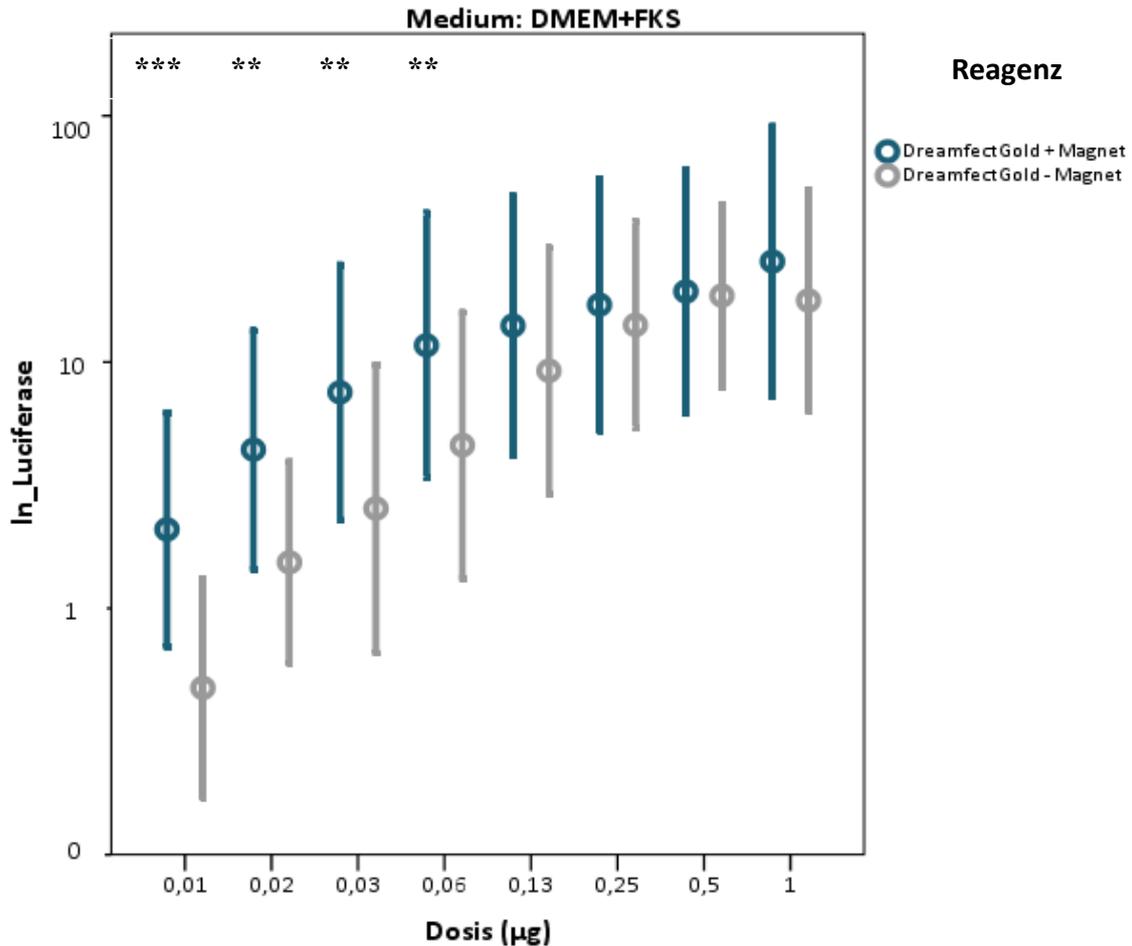
**Tab. 4.3: Einfluss der Magnetofektion auf die gebildete Luciferase-Menge. Darstellung der durchschnittlichen Steigerung gemittelt über alle Dosisstufen.**

Transfektionsreagent	Einfluss der Magnetofektion	Standardabweichung (s)	Signifikanz (p-Werte)
<i>Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000</i>	+ 58 %	30 %	0,305
<i>Dreamfect Gold<sup>®</sup></i>	+ 70 %	19 %	0,002

Die relative Niveauänderung der Luciferase-Menge je Dosishalbierung betragen bei Verwendung von *Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000* mit Einfluss des Magnetfeldes noch durchschnittlich 78 % der nächsthöheren eingesetzten DNA-Menge ( $s = \pm 4\%$ ,  $p < 0,001$ ), wohingegen ohne Magnetofektion im Mittel lediglich 64 % der Ausgangsmenge erreicht wurden ( $s = \pm 3\%$ ,  $p < 0,001$ ) (Abb.4.4). Bei Einsatz des zweiten Transfektionsreagenz *DreamfectGold<sup>®</sup>* betrug die relative Niveauänderung der Luciferase-Menge je Dosishalbierung bei Verwendung des Magnetfeldes noch durchschnittlich 72 % der nächsthöheren eingesetzten DNA-Menge ( $s = \pm 2\%$ ,  $p < 0,001$ ), wohingegen ohne Magnetofektion im Mittel lediglich 59 % der Ausgangsmenge erreicht wurden ( $s = \pm 4\%$ ,  $p < 0,001$ ) (Abb.4.5).

**Abb. 4.4:**

Transfektion mit dem Transfektionsreagenz *Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000* bei primären Zellen die in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) mit Zusatz von fetalem Kälberserum (FKS) kultiviert wurden. Logarithmische Darstellung der relativen Unterschiede in der Luciferase-Menge. Die Fehlerbalken zeigen das 95 %-Konfidenzintervall des Mittelwertes. Die Angabe der eingesetzten Menge an Luciferase-DNA ist aus Gründen der Übersichtlichkeit auf zwei Dezimalstellen gerundet. \*\*p < 0,01



**Abb. 4.5:** Transfektion mit dem Transfektionsreagenz *DreamfectGold*<sup>®</sup> bei primären Zellen die in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) mit Zusatz von fetalem Kälberserum (FKS) kultiviert wurden. Die Fehlerbalken zeigen das 95 %-Konfidenzintervall des Mittelwerts. Logarithmische Darstellung zur Abbildung der relativen Unterschiede in der Luciferase-Menge. Die Angabe der eingesetzten Menge an Luciferase-DNA ist aus Gründen der Übersichtlichkeit auf zwei Dezimalstellen gerundet. \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001

Die Substanzvergleiche innerhalb der jeweiligen Dosisstufen zeigten, dass sowohl bei Verwendung von *Lipofectamin*<sup>TM</sup>2000 als auch von *DreamfectGold*<sup>®</sup> der Einfluss der Magnetofektion mit niedrigeren DNA-Mengen ansteigt. Bei niedrigeren eingesetzten DNA-Mengen waren signifikante Unterschiede (Tab. 4.4, grau unterlegt) zwischen Zellen, die mit Magnetofektion und solchen, die ohne Einfluss des Magnetfeldes transfiziert wurden, zu sehen (Abb. 4.4 – 4.6) und Tabelle 4.4). Bei *DreamfectGold*<sup>®</sup> traten bereits bei höheren DNA-Mengen signifikante Unterschiede auf (Tab. 4.4, grau unterlegt).

Tab. 4.4: Darstellung der Signifikanzwerte für die jeweiligen Dosisstufen. Adjustierung der p-Werte innerhalb des Mediums DMEM+FKS

$\mu\text{g DNA}$	<i>Lipofectamin</i> <sup>TM</sup> 2000	<i>DreamfectGold</i> <sup>®</sup>
1	>0,99	>0,99
0,5	>0,99	>0,99
0,25	>0,99	>0,99
0,125	>0,99	>0,99
0,0625	>0,99	0,002
0,03125	>0,99	0,020
0,015625	0,370	0,027
0,0078125	0,005	0,000

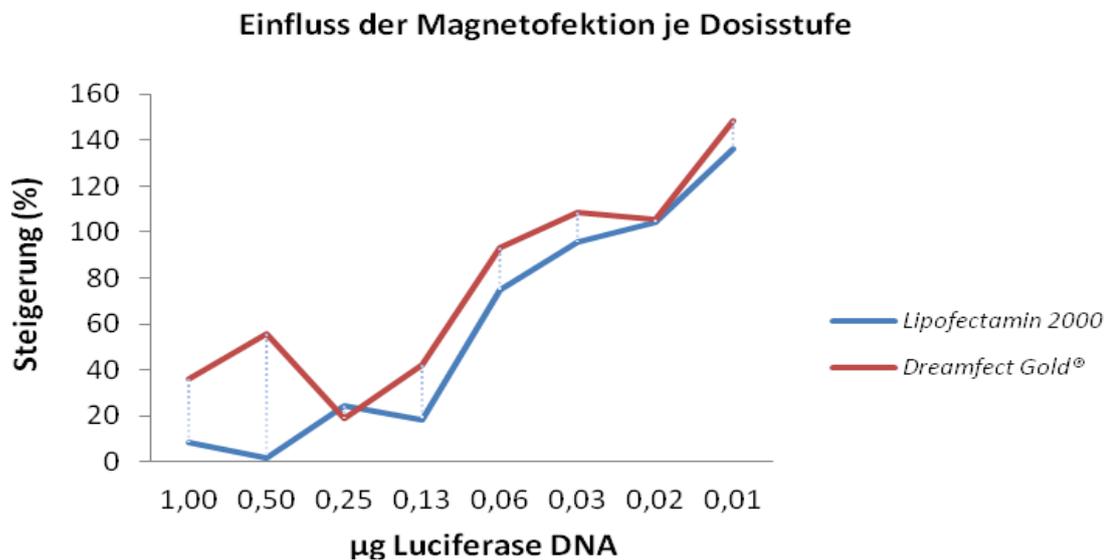


Abb. 4.6: Direkter Vergleich der Anstiege in der gebildeten Luciferase-Menge pro Dosisstufe bei Einsatz der Magnetofektion. Die Angabe der eingesetzten Menge an Luciferase-DNA ist aus Gründen der Übersichtlichkeit auf zwei Dezimalstellen gerundet.

## 4.3.2.2 Kulturmedium DMEM + autologes Pferdeserum

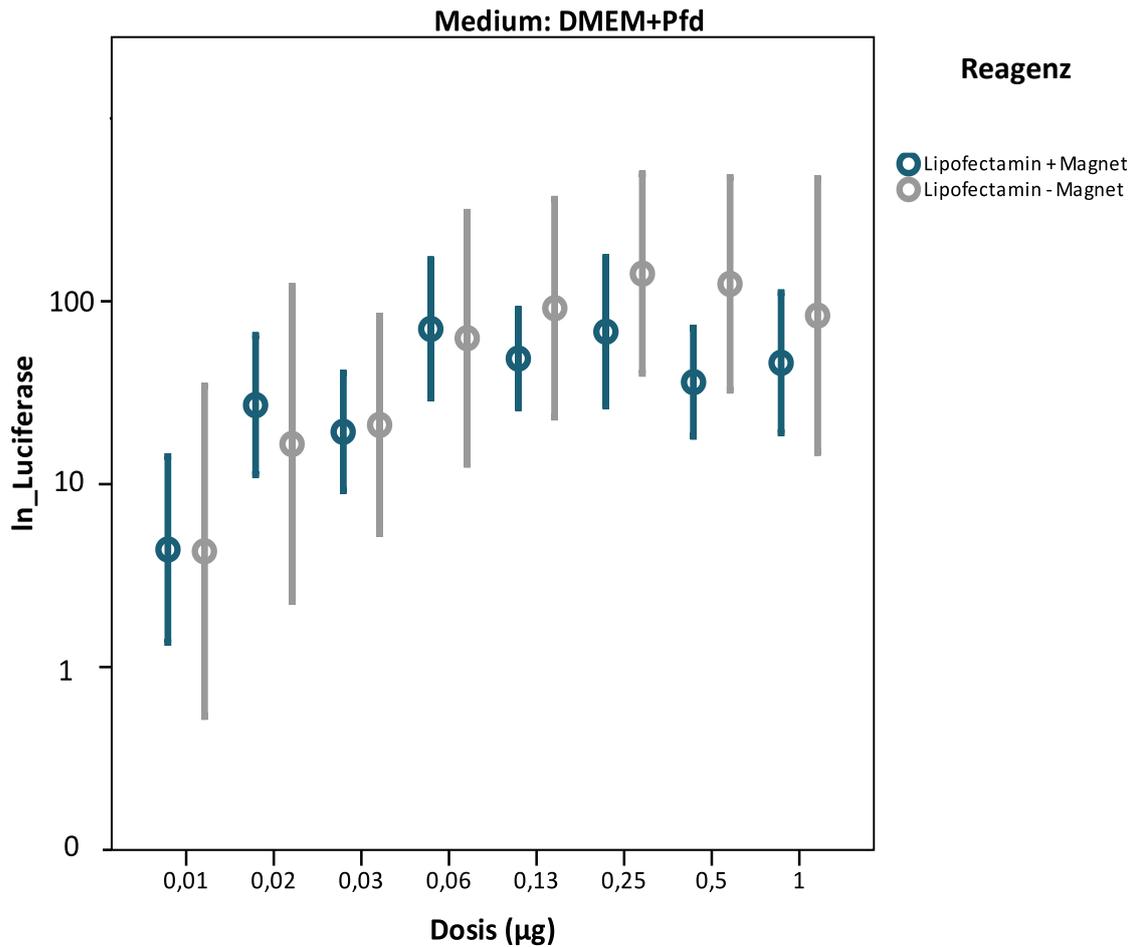
Wurden die Zellen in Medium mit Zusatz von autologem Serum kultiviert, stellte sich der Unterschied in der Produktion der Luciferase als weniger deutlich dar. Dennoch konnte auch in diesem Teilversuch die positive Wirkung des Magnetfeldes beobachtet werden. Tab. 4.5 gibt eine Übersicht über die durchschnittliche Steigerung der gebildeten Luciferase bei Einsatz der Magnetofektion.

**Tab. 4.5 Einfluss der Magnetofektion auf die gebildete Luciferase. Darstellung der durchschnittlichen Steigerung gemittelt über alle Dosisstufen.**

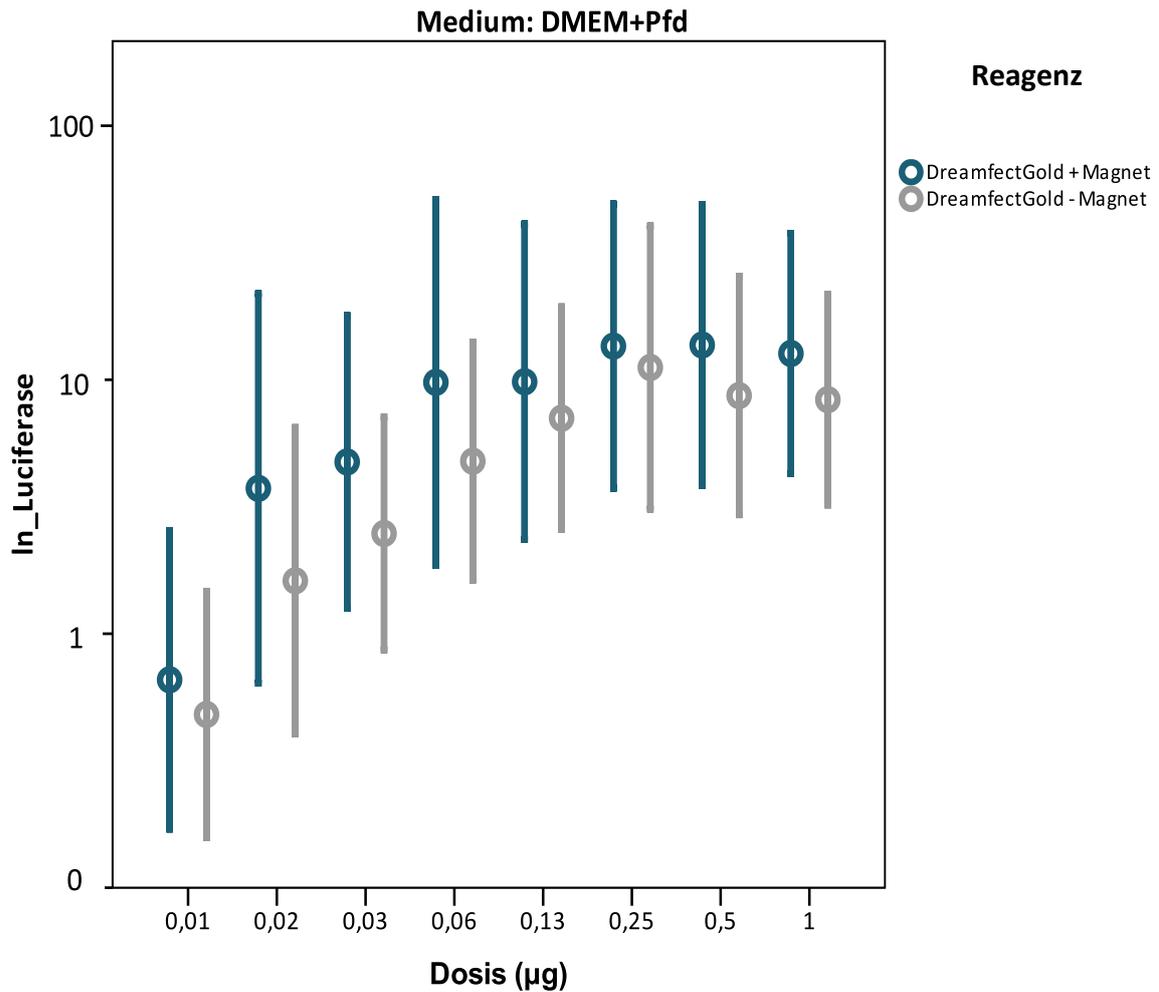
<b>Transfektionsreagent</b>	<b>Einfluss der Magnetofektion</b>	<b>Standardabweichung (s)</b>	<b>Signifikanz (p-Werte)</b>
<i>Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000</i>	+ 33 %	45 %	1
<i>Dreamfect Gold<sup>®</sup></i>	+ 49 %	23 %	0,197

Die relativen Niveauunterschiede der einzelnen Substanzgruppen bei den Zellen, die mit autologem Serum supplementiert wurden, betrug bei Verwendung von *Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000* noch durchschnittlich 77 % der nächst höheren Dosisstufe ( $s = \pm 8 \%$ ;  $p = 0,003$ ), wenn die Magnetofektion angewandt wurde. Ohne Einwirkung des Magnetfeldes wurde noch 64 % der Luciferase-Menge der nächsthöheren DNA-Dosis erzielt ( $s = \pm 12 \%$ ;  $p < 0,001$ ) (Abb. 4.7).

Bei Verwendung des zweiten Transfektionsreagenz *DreamfectGold<sup>®</sup>* wurde mit Magnetofektion noch durchschnittlich 69 % der Luciferase-Menge der nächsthöheren Dosisstufe ( $s = \pm 2 \%$ ;  $p = p < 0,001$ ) erreicht. Ohne Einwirkung des Magnetfeldes wurde noch 67 % der Luciferase-Menge erzielt ( $s = \pm 2 \%$ ;  $p < 0,001$ ) (Abb. 4.8). Beim direkten Vergleich der einzelnen Dosisstufen konnte nur bei Einsatz von  $0,02 \mu\text{g}$  eine Tendenz zur Signifikanz ( $p = 0,068$ ) festgestellt werden (Tab. 4.6, grau unterlegt).



**Abb. 4.7:** Transfektion mit dem Transfektionsreagenz *Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000* bei primären Zellen, die in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) mit Zusatz von autologem Pferdeserum (DMEM+Pfd) kultiviert wurden. Die Fehlerbalken zeigen das 95 %-Konfidenzintervall des Mittelwerts. Logarithmische Darstellung zur Abbildung der relativen Unterschiede in der Luciferase-Menge. Die Angabe der eingesetzten Menge an Luciferase-DNA ist aus Gründen der Übersichtlichkeit auf zwei Dezimalstellen gerundet.

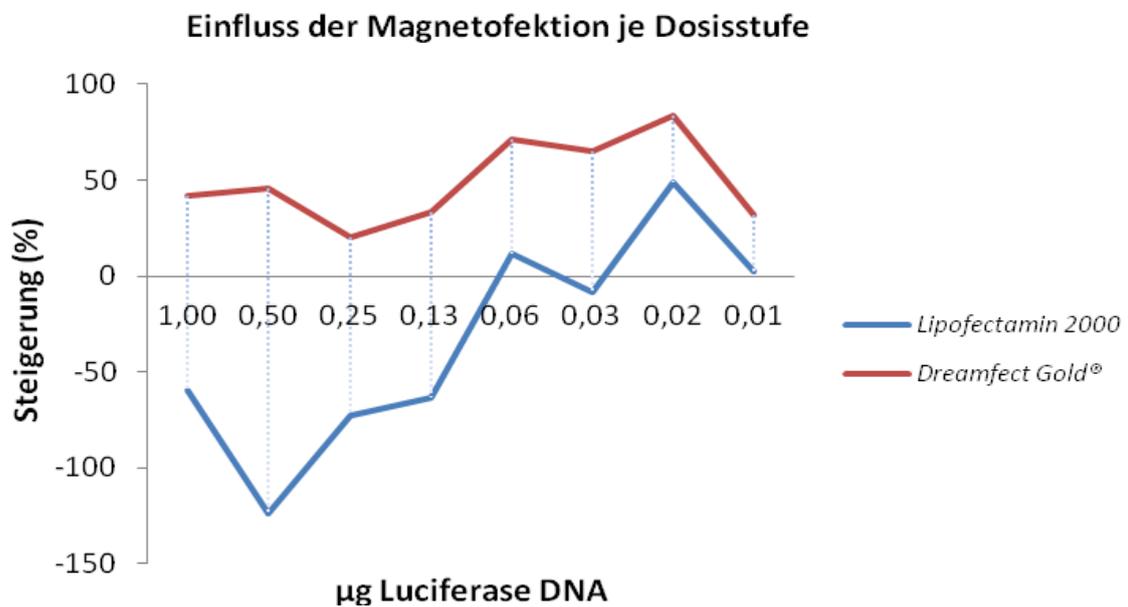


**Abb. 4.8:** Transfektion mit dem Transfektionsreagenz *DreamfectGold*<sup>®</sup> bei primären Zellen, die in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) mit Zusatz von autologem Pferdeserum (DMEM+Pfd) kultiviert wurden. Die Fehlerbalken zeigen das 95 %-Konfidenzintervall des Mittelwerts. Logarithmische Darstellung zur Abbildung der relativen Unterschiede in der Luciferase-Menge. Die Angabe der eingesetzten Menge an Luciferase-DNA ist aus Gründen der Übersichtlichkeit auf zwei Dezimalstellen gerundet.

Bei Verwendung von Medium, welches mit autologem Serum supplementiert wurde, waren in den direkten Substanzvergleichen deutlichere Unterschiede zwischen den verwendeten Transfektionsreagenzien zu sehen. Bei Einsatz des Transfektionsreagenz *Lipofectamin*<sup>TM</sup> 2000 war bei höheren eingesetzten DNA-Mengen sogar ein negativer Effekt der Magnetofektion zu sehen (Abb. 4.9).

Tabelle 4.5: Darstellung der Signifikanzwerte für die jeweiligen Dosisstufen. Adjustierung der p-Werte innerhalb des Mediums DMEM+Pfd.

$\mu\text{g DNA}$	<i>Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000</i>	<i>DreamfectGold<sup>®</sup></i>
1	>0,99	0,723
0,5	0,029	0,325
0,25	0,128	>0,99
0,125	>0,99	>0,99
0,0625	>0,99	>0,99
0,03125	>0,99	0,317
0,015625	>0,99	0,068
0,0078125	>0,99	>0,99



**Abb. 4.9:** Direkter Vergleich der Anstiege in der gebildeten Luciferase-Menge pro Dosisstufe bei Einsatz der Magnetofektion. Die Angabe der eingesetzten Menge an Luciferase-DNA ist aus Gründen der Übersichtlichkeit auf zwei Dezimalstellen gerundet.

#### 4.4 Stimulation von Zelllinien Equiner Sarkoide mit feline Zytokin-Genen

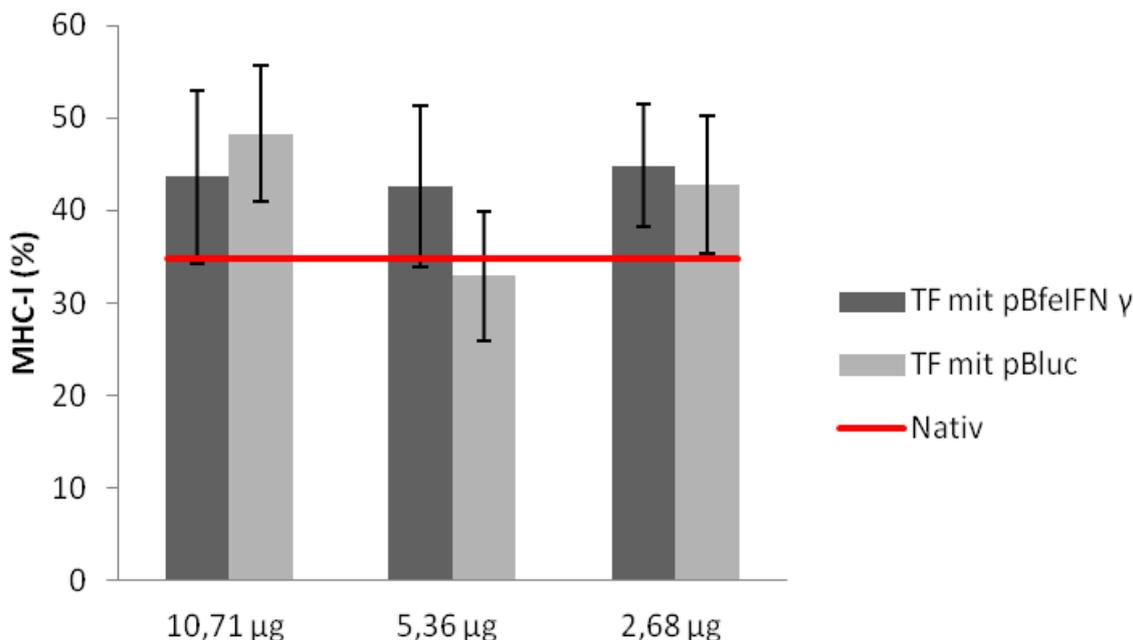
Die Zellkulturen, die für den Hauptversuch verwendet wurden, stammten von Tieren, deren Tumore das Onkoprotein BPV E5 nachgewiesen wurde (Tab. 4.2). Insgesamt wurden die Stimulationsversuche mit Zellkulturen von sechs Tieren (*Eq\_6*; *Eq\_8* – *Eq\_12*) durchgeführt. Zellen, die weder mit Zytokin-Genen noch mit dem Luciferase-Gen transfiziert wurden (Nativ-Zellen), wiesen eine durchschnittliche MHC-I-Expression von 34,88 % auf.

Nachfolgend sind die Ergebnisse des Stimulationsversuchs getrennt nach dem verwendeten feline Zytokin dargestellt. Die Ergebnisse der Transfektion mit dem Luciferase-Gen (Mock-Transfektion) werden parallel dargestellt, um die Auswirkung einer unspezifischen Stimulation auf die MHC-I-Expression zu veranschaulichen.

##### 4.4.1 Stimulation equiner Sarkoidzellen mit pBfeIFN- $\gamma$

Die Transfektion mit Plasmiden, welche für felines Interferon- $\gamma$  kodieren, führte in den jeweiligen Dosisabstufungen zu einer leichten Steigerung der MHC-I-Expression, die allerdings nicht signifikant war. Auch konnte kein Einfluss der eingesetzten DNA-Menge auf die MHC-I-Expression festgestellt werden.

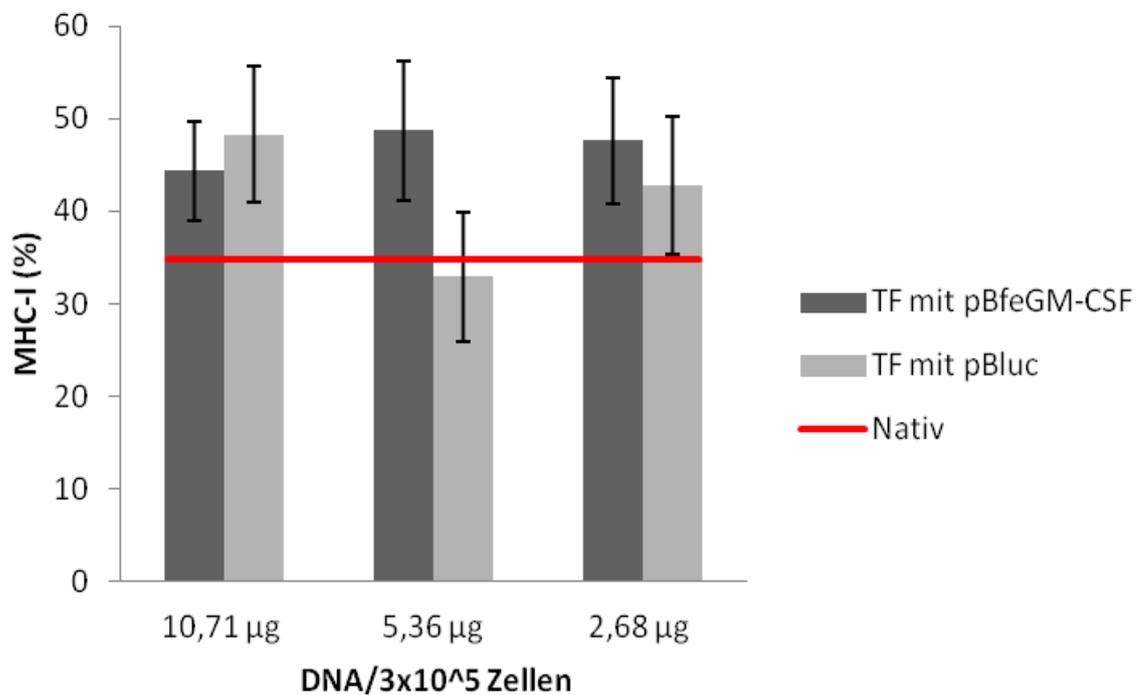
Bei Einsatz von 10,71  $\mu\text{g}$  DNA betrug die MHC-I-Expression 43,65 % (ssm =  $\pm 9,37$  %), bei 5,36  $\mu\text{g}$  DNA 42,57 % (ssm =  $\pm 8,67$  %) und bei 2,68  $\mu\text{g}$  DNA 44,83 % (ssm =  $\pm 6,6$  %) (Abb. 4.10). Zellen, die mit dem Luciferase-Plasmid (Mock-Transfektion) transfiziert wurden, reagierten bei Einsatz der höchsten Plasmidmenge von 10,71  $\mu\text{g}$  sogar deutlicher (48,28 %, ssm =  $\pm 7,23$  %) als bei Transfektion mit Zytokin-Genen. Wurden 5,36  $\mu\text{g}$  und 2,68  $\mu\text{g}$  Luciferase-DNA eingesetzt, betrug die MHC-I-Expression 32,94 % (ssm =  $\pm 6,98$  %) und 42,78 % (ssm =  $\pm 7,41$  %) (Abb. 4.10).



**Abb. 4.10:** Auswirkung der Transfektion (TF) mit pBfeIFN- $\gamma$  und pBluc auf die MHC-I-Expression bei Zelllinien aus Equinen Sarkoiden. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (ssm) an. Die rote Linie gibt das Niveau der MHC-I-Expression nicht-transfizierter Zellen (Nativ: 34,88 %) an.

#### 4.4.2 Stimulation Equiner Sarkoidzellen mit pBfeGM-CSF

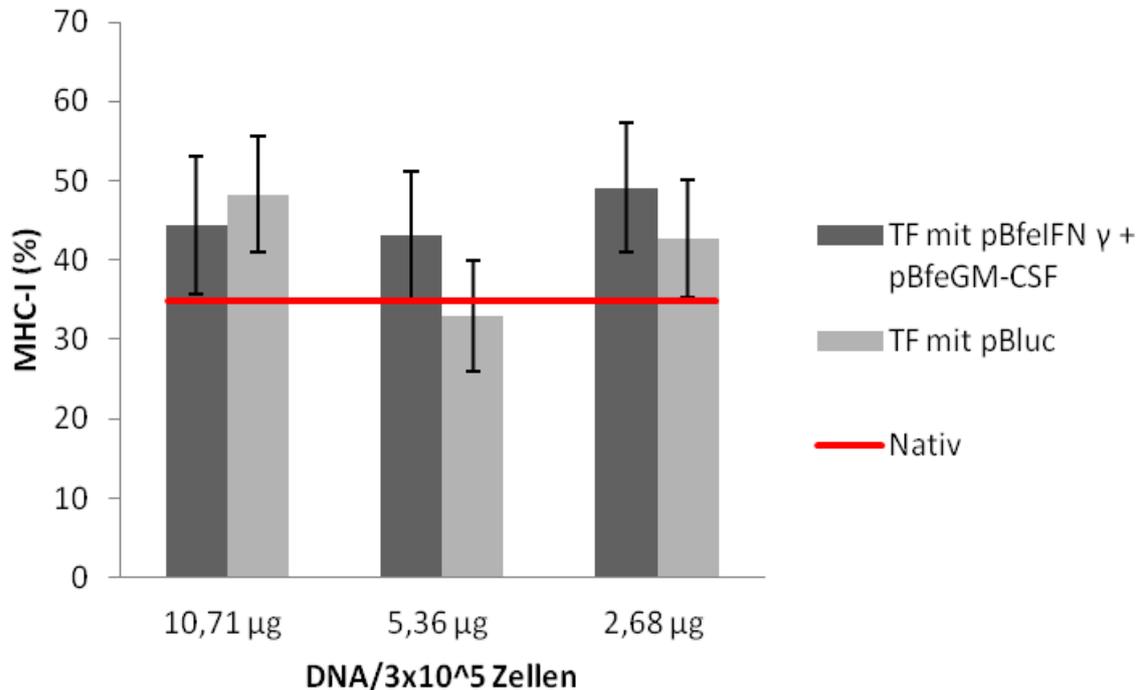
Die Transfektion Equiner Sarkoidzellen mit Plasmiden, die für felines GM-CSF kodieren, führte ebenfalls zu einer leichten, wenn auch nicht signifikanten Steigerung der MHC-I-Expression. Bei Einsatz von 10,71  $\mu\text{g}$  DNA betrug die MHC-I-Expression 44,34 % (ssm =  $\pm 5,4$  %) und war damit ebenfalls niedriger als bei der Mock-Transfektion mit Luciferase (48,28 %, ssm =  $\pm 7,23$  %). Wurden 5,36 bzw. 2,68  $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt, betrug die MHC-I-Expression 48,76 % (ssm =  $\pm 7,53$  %) und 47,65% (ssm =  $\pm 6,82$  %). Damit war die Steigerung zwar höher als bei Verwendung des Luciferase-Plasmids, allerdings waren die Unterschiede auch hier nicht signifikant (Abb. 4.11).



**Abb. 4.11:** Auswirkung der Transfektion (TF) mit pBfeGM-CSF und pBluc auf die MHC-I-Expression bei Zelllinien aus Equinen Sarkoiden. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (ssm) an. Die rote Linie gibt das Niveau der MHC-I-Expression nicht-transfizierter Zellen (Nativ: 34,88 %) an.

#### 4.4.3 Stimulation Equiner Sarkoidzellen mit pBfeIFN- $\gamma$ und pBfeGM-CSF

Bei der Transfektion mit einer Kombination der Plasmide (Abb. 4.12), die für felines Interferon- $\gamma$  und felines GM-CSF kodieren, betrug die durchschnittliche MHC-I-Expression der Zellen bei Einsatz von je 10,71  $\mu\text{g}$  Plasmid 44,44 % (ssm =  $\pm 8,69$  %), bei Verwendung von je 5,36  $\mu\text{g}$  der jeweiligen DNA 43,14 % (ssm =  $\pm 8,03$  %) und bei Transfektion mit je 2,68  $\mu\text{g}$  49,14 % (ssm =  $\pm 8,15$  %).



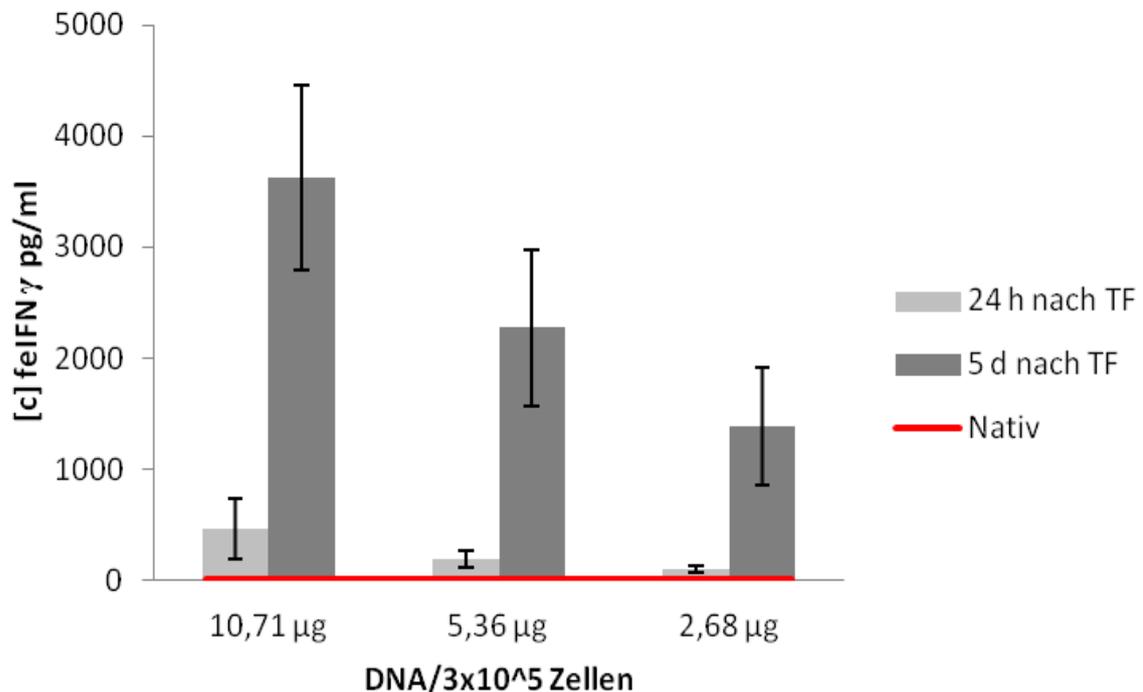
**Abb. 4.12:** Auswirkung der kombinierten Transfektion (TF) mit pBfeIFN- $\gamma$ /pBfeGM-CSF und der Transfektion mit pBluc auf die MHC-I-Expression bei Zelllinien aus Equinen Sarkoiden. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (ssm) an. Die rote Linie gibt das Niveau der MHC-I-Expression nicht-transfizierter Zellen (Nativ: 34,88 %) an.

#### 4.4.4 Ergebnisse der ELISAs

Um zu überprüfen, ob die durchgeführten Transfektionen erfolgreich waren, wurde von den Überständen aus der Zellkultur ein ELISA der jeweiligen Zytokine durchgeführt. Je eine Probe der Zellkulturüberstände wurde beim Medienwechsel 24 Stunden (h) und 5 Tage (d) nach Transfektion untersucht. Bei allen Transfektionen wurde eine Steigerung der produzierten Menge an Zytokinen sowohl mit ansteigenden Mengen an DNA als auch mit längerem Zeitpunkt nach der Transfektion festgestellt. Da die ELISAs lediglich zur Kontrolle der beabsichtigten Transfektion durchgeführt wurden, sind keine statistischen Auswertungsverfahren durchgeführt worden.

##### 4.4.4.1 Transfektion mit pBfeIFN- $\gamma$

Die durchschnittliche Zytokinproduktion 24 h nach Transfektion betrug bei Einsatz von 10,71  $\mu\text{g}$  DNA 462,89 pg/ml (ssm =  $\pm 273,28$  pg/ml), bei Verwendung von 5,36  $\mu\text{g}$  und 2,68  $\mu\text{g}$  DNA 191,09 pg/ml (ssm =  $\pm 71,05$  pg/ml) bzw. 96,51 pg/ml (ssm =  $\pm 31,99$  pg/ml). Bei der zweiten Messung 5 d nach Transfektion wurden im Überstand 3629,35 pg/ml (ssm =  $\pm 833,07$  pg/ml) bei Einsatz von 10,71  $\mu\text{g}$  DNA, 2277,11 pg/ml (ssm =  $\pm 703,09$  pg/ml) bei Einsatz von 5,36  $\mu\text{g}$  DNA und 1392,81 pg/ml (ssm =  $\pm 529,39$  pg/ml) bei Einsatz von 2,68  $\mu\text{g}$  DNA gemessen (Abb. 4.13).

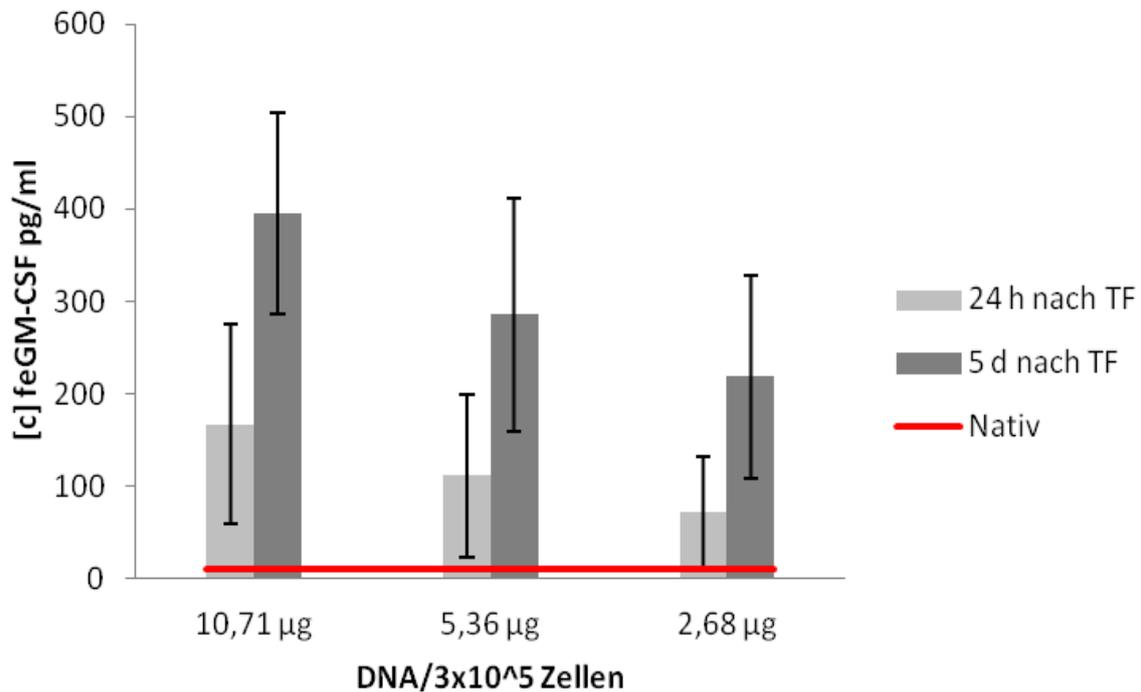


**Abb. 4.13:** Felines Interferon- $\gamma$  im Überstand kultivierter Equiner Sarkoidzellen nach Transfektion (TF) mit pBfeIFN- $\gamma$ . Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (ssm) an. Die rote Linie gibt das Ergebnis des ELISAs bei nicht-transfizierten Zellen (Nativ) an.

## 4.4.4.2 Transfektion mit pBfeGM-CSF

Wurden die kultivierten Zellen mit dem Plasmid pBfeGM-CSF transfiziert, betrug die durchschnittliche Zytokinproduktion 24 h nach Transfektion bei Einsatz von 10,71 µg DNA 166,83 pg/ml (ssm = ±107,60 pg/ml), bei Verwendung von 5,36 µg und 2,68 µg DNA 111,58 pg/ml (ssm = ±88,08 pg/ml) bzw. 72,15 pg/ml (ssm = ±59,51 pg/ml).

Bei der zweiten Messung 5 d nach Transfektion wurden im Überstand 395,05 pg/ml (ssm = ±108,26 pg/ml) bei Einsatz von 10,71 µg DNA, 285,47 pg/ml (ssm = ±126,00 pg/ml) bei Einsatz von 5,36 µg DNA und 218,47 pg/ml (ssm = ±109,91 pg/ml) bei Einsatz von 2,68 µg DNA (Abb. 4.14).

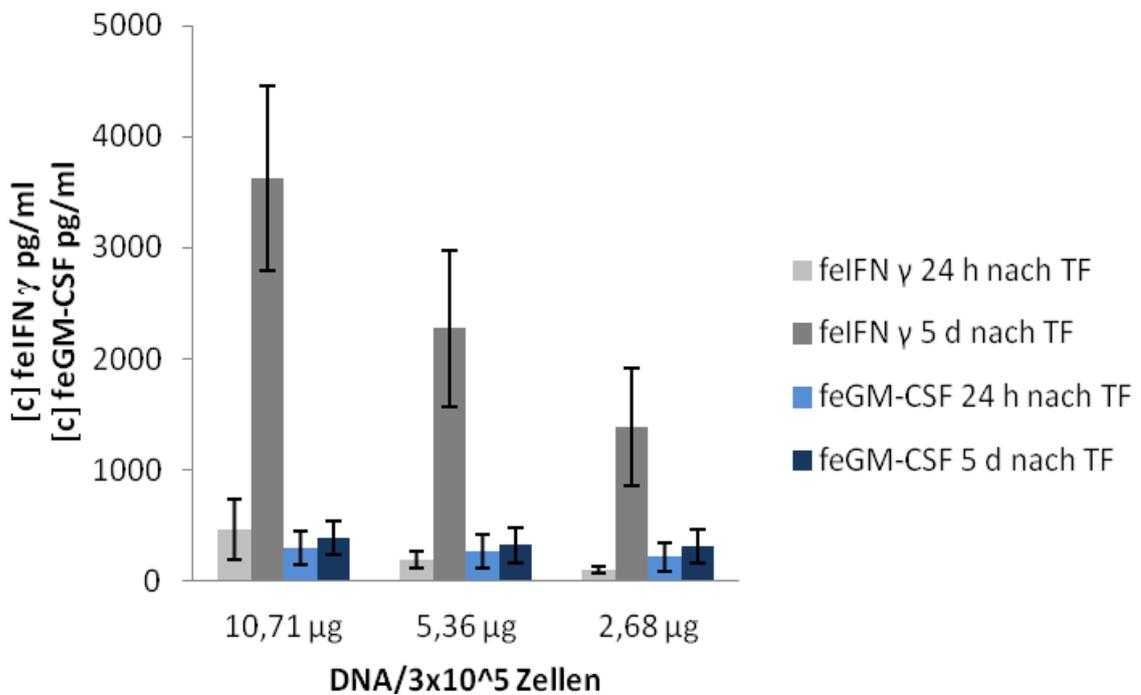


**Abb. 4.14:** Felines GM-CSF im Überstand kultivierter Equiner Sarkoidzellen nach Transfektion (TF) mit pBfeGM-CSF. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (ssm) an. Die rote Linie gibt das Ergebnis des ELISAs bei nicht-transfizierten Zellen (Nativ) an.

4.4.4.3 Transfektion mit pBfeIFN- $\gamma$  und pBfeGM-CSF

Die durchschnittliche Zytokinproduktion 24 h nach Transfektion betrug bei Einsatz von 10,71  $\mu\text{g}$  DNA 1639,97 pg/ml IFN- $\gamma$  (ssm =  $\pm 968,83$  pg/ml) und 296,59 pg/ml GM-CSF (ssm =  $\pm 47,20$  pg/ml). Bei Verwendung von 5,36  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA 1389,79 pg/ml IFN- $\gamma$  (ssm =  $\pm 858,47$  pg/ml) und 272,54 pg/ml GM-CSF (ssm =  $\pm 150,01$  pg/ml). Nach Transfektion mit 2,68  $\mu\text{g}$  DNA wurden im Überstand 935,44 pg/ml IFN- $\gamma$  (ssm =  $\pm 641,29$ ) und 219,67 pg/ml GM-CSF (ssm =  $\pm 130,01$  pg/ml) gemessen.

Die zweite Messung 5 d nach Transfektion ergab bei Einsatz von 10,71  $\mu\text{g}$  DNA 2636,34 pg/ml IFN- $\gamma$  (ssm =  $\pm 1413,71$  pg/ml) und 388,67 pg/ml GM-CSF (ssm =  $\pm 152,73$ ). Nach Einsatz von 5,36  $\mu\text{g}$  DNA wurden 2327,94 pg/ml IFN- $\gamma$  (ssm =  $\pm 1373,76$ ) und 322,88 pg/ml GM-CSF (ssm =  $\pm 155,31$ ) gemessen. Die Transfektion mit je 2,68  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA führte zu Zytokinkonzentration von 2108,21 pg/ml IFN- $\gamma$  (ssm =  $\pm 1240,11$  pg/ml) und 307,57 pg/ml GM-CSF (ssm =  $\pm 151,76$  pg/ml) (Abb 4.15).



**Abb. 4.15:** Felines Interferon- $\gamma$  und felines GM-CSF im Überstand kultivierter Equiner Sarkoidzellen nach Transfektion (TF) mit pBfeIFN- $\gamma$  und pBfeGM-CSF. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (ssm) an.

#### 4.4.5 Korrelation zwischen MHC-I-Expression und Zytokinen im Überstand

Um herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen der MHC-I-Expression transfizierter Zellen und der Konzentration an Zytokinen im Überstand besteht, wurden die Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman ermittelt. Bei Zellen, die mit IFN- $\gamma$  transfiziert wurden, bewegte sich der Rangkorrelationskoeffizient bei allen drei Dosisstufen um den Wert 0, weshalb nur von einer schwach positiven (bei Einsatz von 10,71 und 5,36  $\mu\text{g}$  DNA) bzw. negativen (bei Einsatz von 2,68  $\mu\text{g}$  DNA) und nicht signifikanten Korrelation ausgegangen werden kann (Tab. 4.7).

**Tab. 4.6: Korrelationskoeffizienten bei Transfektion mit pBfeIFN- $\gamma$**

Dosisstufe ( $\mu\text{g}$ DNA)	10,71	5,36	2,68
Korrelationskoeffizient	0,086	0,086	-0,029
(Signifikanz)	(0,872)	(0,872)	(0,957)

Bei den Zellen, die mit pBGM-CSF transfiziert wurden, konnte bei Einsatz von 10,71  $\mu\text{g}$  DNA eine schwache und bei Transfektion mit 5,36  $\mu\text{g}$  DNA eine moderate positive Korrelation zwischen der gebildeten Menge an Zytokin und der MHC-I-Expression festgestellt werden. Die Ergebnisse der Transfektion mit 2,68  $\mu\text{g}$  DNA wiesen auf eine schwach negative Korrelation hin. Jedoch zeigte keiner der Korrelationskoeffizienten eine Signifikanz. Insgesamt waren die Korrelationskoeffizienten bei dieser Versuchsreihe aber deutlicher als bei der Transfektion mit pBIFN- $\gamma$  (Tab. 4.8).

**Tab. 4.7 Korrelationskoeffizienten bei Transfektion mit pBfeGM-CSF**

Dosisstufe ( $\mu\text{g}$ DNA)	10,71	5,36	2,68
Korrelationskoeffizient	0,143	0,600	-0,314
(Signifikanz)	(0,787)	(0,208)	(0,544)

Die Ergebnisse der gleichzeitigen Transfektion mit pBIFN- $\gamma$  und pBGM-CSF ergaben bei der Transfektion mit je 10,71  $\mu\text{g}$  DNA sehr schwache (IFN- $\gamma$ ) und schwach (GM-CSF) negative Korrelationen, bei Verwendung von je 5,36  $\mu\text{g}$  DNA schwach negative Korrelationen (IFN- $\gamma$  und GM-CSF) und bei Einsatz von 2,68  $\mu\text{g}$  DNA schwach positive Korrelationen (IFN- $\gamma$  und GM-CSF). Alle Rangkorrelationskoeffizienten waren jedoch nicht signifikant (Tab. 4.9).

**Tab. 4.8: Korrelationskoeffizienten bei Transfektion mit pBIFN- $\gamma$  und pBfeGM-CSF**

Dosisstufe ( $\mu\text{g}$ DNA)	10,71	5,36	2,68
Korrelationskoeffizient IFN- $\gamma$	-0,029	-0,143	0,086
(Signifikanz)	(0,957)	(0,787)	(0,872)
Korrelationskoeffizient GM-CSF	-0,314	-0,029	0,086
(Signifikanz)	(0,544)	(0,957)	(0,872)

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Diskussion der Methode

#### 5.1.1 Kultur neoplastischer Fibroblasten

Eine dermale Neoplasie, die als Equines Sarkoid angesprochen wird, beruht auf dem Vorhandensein der typischen dermalen und epidermalen Veränderungen. Dabei handelt es sich bei dem übermäßig gebildeten Zellmaterial um diffus proliferierte Fibroblasten (CARR et al. 2001b). Die definitive Bestätigung einer deartigen Neoplasie ist bereits histologisch eindeutig möglich und wurde bei allen Tumorproben, die in dieser Arbeit verwendet wurden durchgeführt. Bei den untersuchten Proben konnte nur ein Verdacht nicht bestätigt werden (s. 4.2) und diese Zellen wurden in weiteren Experimenten nicht herangezogen. Bei Probenmaterial, welches darüber hinaus für die Transfektionsversuche im zweiten Versuchsteil herangezogen wurde, ist vor Beginn der Zellkulturen das E5-Gen von BPV-1 nachgewiesen worden. Diese Analysemethoden zur Identifikation von Tumorzellen des Equinen Sarkoids wurden ebenfalls in einer anderen Arbeit, die auf Transfektionsversuchen beruht, angewandt (COTUGNO et al. 2013).

Desweiteren ist eine verminderte Expression von MHC-I-Komplexen auf der Zelloberfläche kennzeichnend für das Equine Sarkoid, wie es auch in dieser Arbeit der Fall war. Im Durchschnitt zeigten lediglich 34,88 % der untersuchten Zellen Expression von MHC-I-Komplexen.

Da es sich bei Zellen den Equinen Sarkoids um übermäßig wachsende Fibroblasten handelt ist ein „Aussortieren“ eventuell vorhandener physiologischer Fibroblasten durch Oberflächenmarker nicht praktikabel, da Tumorzellen die gleichen Oberflächenantigene aufweisen können.

#### 5.1.2 Transfektion primärer Zellen

In der eigenen Studie wurden die Versuchsreihen mit primären Sarkoidzellen durchgeführt. Die Transfektion primärer Zellen liefert häufig weniger zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse als bei der Verwendung standardisierter Zelllinien. Dabei repräsentieren jedoch primäre Tumorzellen optimaler die Heterogenität von Tumoren *in vivo* als dies standardisierte Zelllinien tun (VARGO-GORGOLA und ROSEN 2007). Desweiteren besitzen Zellen aus krankem Gewebe andere Eigenschaften als solche aus gesundem Material. Dies ist auf das Vorhandensein von krankheitsbedingten Stoffwechselprodukten und Entzündungsfaktoren zurückzuführen (LORENZ und RICHTER 2006). Diese können zu Wechselwirkungen mit den eingesetzten Transfektionsreagenzien führen. Bei der Verwendung primärer Zellen ist eine Evaluierung in Frage kommender Transfektionsreagenzien und -methoden deshalb besonders angezeigt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Transfektionen der einzelnen Zelllinien sowohl mit verschiedenen Transfektionsreagenzien als auch mit unterschiedlichen Kulturmedien durchgeführt. Dies geschah, um eine objektive Aussage hinsichtlich der Effizienz der gewählten Methode „Magnetofektion“ bei Zellen des Equinen Sarkoids treffen zu können.

Die geläufigste Methode des nicht-viralen Gentransfers bei primären Zellen ist die Lipofektion, da andere Verfahren wie die Elektroporation oder die *gene-gun*-Methode zu hoher Zellmortalität führen (GRESCH et al. 2004). Um den positiven Effekt der gewählten Methode „Magnetofektion“ aufzuzeigen, wurden die Versuche in der vorliegenden Arbeit mit

Tumorzellen verschiedener Tiere durchgeführt. Die Zelllinien stammten von einer insgesamt geringen Anzahl ( $n = 6$ ) von Tieren, wobei in anderen Veröffentlichungen zur Transfektion primärer Zellen sogar noch weniger unterschiedliche Zelllinien verwendet wurden. So führten GOBEIL und Mitarbeiter (2009) einen nicht-viralen Gentransfer bei Zelllinien aus Equinen Sarkoiden durch, die von zwei verschiedenen Tumoren stammen. In dieser Studie wurden die Zelllinien bis zu fünfmal in siebentägigem Abstand mittels des Vektors *Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000* transfiziert. ABUL-HASSAN und Mitarbeiter (2000) verwendeten für ihre Transfektionsversuche (humane) primäre retinale Pigmentepithelzellen von drei Spendern. Die Transfektionen mit dem Luciferase-Plasmid wurden dabei, wie in der vorliegenden Studie, mit der Lipofektions-Methode durchgeführt. Die erzielten Transfektionsraten waren im Vergleich zu Calciumphosphat ( $\text{CaPO}_4$ ) und Diethylaminoethyl- (DEAE-) Dextran basiertem Gentransfer signifikant höher. Darüber hinaus waren bei Liposomen-transfizierten Zellen keine zytotoxischen Effekte auf die Zellen festzustellen. Eine weitere Studie, in der liposomale Transfektion bei primären Zellen angewandt wird, wurde von ESENDAGLI und Mitarbeitern (2009) veröffentlicht: Darin werden chemisch hervorgerufene, murine Mammatumore *ex vivo* mit dem *CD40L*-Gen transfiziert, um immunologische Effekte auf die Präsentation von Oberflächenantigenen und die Produktion proinflammatorischer Zytokine zu beurteilen.

Die Lipofektion stellt somit eine geläufige und unkompliziert durchführbare Methode des nicht-viralen Gentransfers bei primären Zellen dar. Der große Vorteil dieser Methode ist die geringe Zelltoxizität verglichen mit anderen Verfahren des nicht-viralen Gentransfers. Diese Eigenschaften konnten auch in den eigenen Experimenten nachvollzogen werden und führten zu reproduzierbaren Ergebnissen der Transfektion bei primären Zellen des Equinen Sarkoids.

### 5.1.3 Einsatz heterologer Zytokine

In der klinischen veterinärmedizinischen Forschung und -therapie ist die Verfügbarkeit homologer rekombinanter Zytokine oder deren Gensequenzen in Plasmidform eingeschränkt, weshalb auf heterologe Proteine bzw. Gensequenzen zurückgegriffen wird (HEINZERLING et al. 2001). Meist handelt es sich dabei um humane Gensequenzen: TZANNES und Mitarbeiter (2008) behandelten einen zehnjährigen Hund, der an einem epitheliotrophen Lymphom des Präputiums litt, mit rekombinantem humanem Interferon- $\alpha 2a$  (rhIFN-2a). Diese Therapie wurde nach siebenwöchiger Chemotherapie als adjuvante Therapie begonnen und resultierte bereits nach vier Tagen in einer partiellen Regression des Tumors. Obwohl 17 Wochen nach Therapiebeginn ein epitheliotrophes Lymphom im Maulbereich auftrat, hielt die Regression des Tumors am Präputium an.

Rekombinante humane Zytokine zur alleinigen antineoplastischen Behandlung wurden von STEWART und Mitarbeitern (2005) eingesetzt. In dieser Studie wurden Rinder, die an Plattenepithelkarzinomen des Auges litten, mit rekombinantem humanem Interleukin-2 (rhIL-2) bzw. rekombinantem humanem Interleukin-12 (rhIL-12) oder einer Kombination aus beidem behandelt. Das Behandlungsschema bestand aus fünf Injektionen im Abstand von 24 Stunden. Das beste Therapieergebnis wurde bei den Tieren, die mit rhIL-2 behandelt wurden, erreicht. Nach zwölf Monaten zeigten diese zu 63 % eine komplette Regression der Tumore. Rinder, die eine Kombination aus beiden rekombinanten Zytokinen erhielten, zeigten lediglich zu 37,5 % eine komplette Regression und in der Gruppe, die mit rhIL-12 behandelt wurde, kam es bei keinem Tier zu einer kompletten Regression.

Leukopenie und Anämie sind häufige Begleiterscheinungen bei FIV-infizierten Katzen. ARAI und Mitarbeiter (2000) erreichten durch den Einsatz von rekombinantem humanem GM-CSF (rhGM-CSF) eine Steigerung der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten und des Hämatokrits. Allerdings entwickelten 75 % der behandelten Katzen Antikörper gegen rhGM-CSF, wobei keine eindeutigen neutralisierenden Eigenschaften dieser Antikörper und keine Korrelation zum Anstieg der weißen Blutkörperchen festgestellt werden konnten.

Auch bei Pferden wurden bereits heterologe Zytokine in Form einer Gentherapie zur Behandlung von Tumoren eingesetzt: Den klinischen Einsatz heterologer Zytokine beim equinen Melanom beschreiben HEINZERLING und Mitarbeiter (2001). In dieser Arbeit erreichten sie durch intratumorale Injektionen eines Plasmids, welches für humanes Interleukin-12 (huIL-12) kodiert, einen Rückgang der Tumore auf 41 % der Ausgangsgröße. Durch die Induktion einer IFN- $\gamma$  Produktion in diesen Tumoren und in equinen mononukleären Zellen des peripheren Bluts (engl: *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) wurde die biologische Wirksamkeit des huIL-12 auf Pferdezellen nachgewiesen.

Diese wenigen Studien zeigen bereits auf, dass durch den Einsatz humaner Zytokine in der Veterinärmedizin zufriedenstellende Ergebnisse hinsichtlich eines klinischen Heilungsergebnisses erreicht werden können. Beim Einsatz heterologer Zytokine wurden in keiner der Studien negative Auswirkungen auf das Allgemeinbefinden der Tiere beobachtet (TZANNES et al. 2008; STEWART et al. 2005; HEINZERLING et al. 2001).

Zum Zeitpunkt der eigenen Versuchsdurchführung gab es noch keine kommerziell erhältlichen Plasmide, die für equines GM-CSF und equines IFN- $\gamma$  kodieren. Am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München waren solche Plasmide zum Zeitpunkt der Versuche ebenfalls nicht verfügbar. Aus diesem Grund wurden Plasmide, die für feline Zytokine kodieren, verwendet.

Diese feline Zytokingene wurden gewählt, da sie eine höhere Homologie zu den equinen Zytokinen besitzen als die entsprechenden humanen Zytokine: so besitzen humanes und equines IFN- $\gamma$  eine Homologie von 76 % der DNA-Sequenz und von 66 % auf Proteinebene (STEINBACH et al. 2002). Dagegen beträgt die Homologie des feline IFN- $\gamma$  zu equinem IFN- $\gamma$  83,3 % auf cDNA-Ebene und 77,8 % auf Proteinebene (SCHWARZ 2005). Im Fall von GM-CSF beträgt die Homologie des humanen zum equinem Zytokin 83,7 % auf cDNA-Ebene und 76,4 % auf Proteinebene (VECCHIONE et al. 2002). Die Homologie von equinem zu feline GM-CSF beträgt 84,8 % auf cDNA-Ebene und 73,8 % auf Proteinebene (SCHWARZ 2005).

Die Kreuzreaktivität eines Zytokins auf speziefremde Zellen ist wahrscheinlich, wenn auf Proteinebene eine Homologie von mehr als 60 % vorliegt (SCHEERLINCK 1999), eine Voraussetzung, die im Fall der feline und equinen Zytokine gegeben ist. Darüber hinaus konnte durch den Einsatz heterologer Plasmidgene in dieser Studie eine bessere Unterscheidung getroffen werden, welche Zytokine durch den nicht-viralen Gentransfer gebildet wurden und welche Moleküle durch anderweitige Stimulation der Zellen vorhanden waren.

#### 5.1.4 Nicht-viraler Gentransfer equiner Zellen

Zum nicht-viralen Gentransfer beim Pferd sind bislang nur wenige Studien veröffentlicht worden. Meist werden dazu ebenfalls primäre Zelllinien verwendet. MÜLLER und Mitarbeiter (2011) transfizierten zwei Zelllinien aus equinen Melanomen. Diese Zelllinien wurden mittels Lipofektion (*Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000*) mit Plasmiden, die für equines IL-12 kodieren, transfiziert. Die Beurteilung des Transfektionserfolgs erfolgte dabei, im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, indirekt durch Bestimmung der IFN- $\gamma$  Produktion equiner PBMCs, die mit dem Überstand der transfizierten Zelllinien stimuliert wurden. In dieser Studie reagierten PBMCs, die mit Überstand aus transfizierten Melanomzelllinien versetzt wurden, mit einer Produktion von IFN- $\gamma$ , wohingegen die Zugabe des Transfektionsreagenz und des Kulturmediums alleine keine IFN- $\gamma$  Produktion initiierte. Allerdings induzierte auch der Überstand einer der beiden Zelllinien, die mit einem leeren Plasmid (Mock Transfektion) transfiziert wurde, eine IFN- $\gamma$  Produktion durch PBMCs.

Im Gegensatz zur eigenen Arbeit wurde bei der Studie von MÜLLER und Mitarbeitern (2011) lediglich ein einziges Transfektionsreagenz (*Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000*) verwendet, die Methode des nicht-viralen Gentransfers unterscheidet sich allerdings nicht.

#### 5.1.5 Statistische Auswertung

Aufgrund der Komplexität der Fragestellung der vorliegenden Arbeit und der daraus resultierenden Vielzahl an statistischen Vergleichs- und Zusammenhangsuntersuchungen, konnte der Problematik des „multiplen Testens“ (siehe ausführliche Erläuterungen im Anhang: Multiple Testproblematik) nicht effizient Rechnung getragen werden, da eine Korrektur des Signifikanzniveaus für alle vorgenommenen Tests zu stark konservativen Ergebnissen (geringe Power) führen würde. Die statistischen Testergebnisse können daher nicht ohne Weiteres in ihrer ursprünglichen konzeptionellen Definition als Entscheidungsinstrument (Verwerfung einer spezifischen Nullhypothese: ja/nein) interpretiert werden. SAVILLE (1990) schlägt vor, keine Korrekturen für multiples Testen vorzunehmen, sondern vielmehr alle Ergebnisse und vorgenommenen Tests vollständig zu berichten und auf die multiple Testproblematik hinzuweisen. Dem Leser wird somit die Möglichkeit gegeben, im Zuge der Interpretation der Resultate selbst eine informelle Adjustierung des Signifikanzniveaus vorzunehmen. Dieses Vorgehen entspricht einem Kompromiss, in welchem sowohl den statistischen Anforderungen als auch dem klinischen Forschungsinteresse, die erhobenen Daten möglichst umfassend auszuwerten, entsprochen wird. SAVILLE (1990) bezeichnet dies als „praktikable Lösung des multiplen Testproblems“.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 Positiver Einfluss der Magnetofektion auf den Transfektionserfolg

Bei allen durchgeführten Versuchsreihen dieser Studie führte die Anwendung der Magnetofektion zu einer Steigerung der produzierten Luciferase im Vergleich zum nicht-viralen Gentransfer mittels Lipofektion. Die positiven Effekte der Magnetofektion waren besonders in den Versuchen mit niedrigen DNA-Mengen ausgeprägt und relativierten sich mit dem Einsatz höherer Mengen an eingesetzter DNA. Dieser Effekt stimmt mit den Ergebnissen vorausgegangener Studien zur Magnetofektion überein. KROTZ und Mitarbeiter (2003a) erreichten mit der Methode der Magnetofektion eine bis zu 224-fache Steigerung der Transfektionseffizienz bei primären Zellen aus der Nabelvene, verglichen mit der alleinigen Transfektion mit *Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000*. Wie in der vorliegenden Arbeit wurde auch in dieser Veröffentlichung die höchste Steigerung, verglichen mit konventionellen Transfektionsmethoden, bei niedrigeren Mengen an DNA erreicht. Diese Studie verdeutlicht auch, dass sich primäre Zellen verschiedener Herkunft unterschiedlich gut transfizieren lassen. So ließen sich bei primären Zellen aus der Aorta vom Schwein die Transfektionsraten mit Hilfe der Magnetofektion lediglich um das 5,9-fache, verglichen mit konventionellen nicht-viralen Transfermethoden steigern. In dieser, wie auch in anderen Arbeiten (DOUGHERTY et al. 2011), wird die Transfektionseffizienz allerdings durch den Prozentsatz an transfizierten Zellen definiert. In der eigenen Arbeit wurde dieser Begriff als Menge an produzierter Luciferase (ng) pro mg Zellprotein festgelegt.

Allgemein ist bei einer höheren Konzentration an Transfektionsreagenten und eingesetzter DNA von einem deutlichen negativen Effekt auf die Vitalität transfizierter Zellen auszugehen (DOUGHERTY et al. 2011).

Zwischen den verschiedenen eingesetzten Zelllinien der eigenen Arbeit kam es zu einer starken Varianz der Ergebnisse. Dies ist mit dem Einsatz primärer Zellen und der damit verbundenen Schwierigkeit gleiche Voraussetzungen hinsichtlich der Robustheit und Qualität der Zellen zu schaffen, zu begründen. In der eigenen Arbeit erreichten die absoluten Mengen an gebildeter Luciferase nicht die Mengen anderer Studien. Dennoch konnten in der vorliegenden Arbeit durch den Einsatz der Magnetofektion auch hochsignifikante Steigerungen gegenüber konventionellen nicht-viralen Transfektionsmethoden erreicht werden. Die absolut niedrigeren erreichten Werte lassen sich wiederum auf den Einsatz primärer Zellen zurückführen. So wurden beispielsweise in der Arbeit von GERSTING und Mitarbeitern (2004) mit den gleichen Methoden eine standardisierte Zelllinie (16HBE14o) und primäre humane Zellkulturen aus Lungenepithel transfiziert. Während bei den 16HBE14o-Zellen eine bis zu 400fache Steigerung der produzierten Luciferase bei Einsatz der Magnetofektion verzeichnet wurde, erreichte man mit der gleichen Methode lediglich eine 60fache Steigerung bei der primären Zellkultur gegenüber der alleinigen Transfektion mit PEI. Dies verdeutlicht die oft niedrigere Toleranz primärer Zelllinien gegenüber eingebrachten Fremdgenen, wie es auch in der angefertigten Arbeit der Fall war.

### 5.2.2 Einfluss des Transfektionsreagenten auf den Transfektionserfolg

Zu Beginn der Arbeit lagen noch keine Erkenntnisse über den nicht-viralen Gentransfer mittels Magnetofektion bei Zellkulturen des Equinen Sarkoids vor. Deshalb wurden zunächst in Vorversuchen mehrere Arten an liposomalen Transfektionsreagenzien miteinander verglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass zwischen verschiedenen liposomalen Transfektionsreagenzien deutliche Unterschiede in der Transfektionseffizienz bestehen können. Die Gegenüberstellung dieser verschiedenen Substanzen war zwar nicht der eigentliche Arbeitsinhalt der Studie. Im Hinblick auf einen möglichst effizienten Transfer von Zytokin-Genen, der in den nachfolgenden Experimenten durchgeführt werden sollte, wurde dieser Vergleich aber als sinnvoll erachtet. In dieser Arbeit stellte sich heraus, dass von den eingesetzten Transfektionsreagenzien *DreamfectGold*<sup>®</sup> zur Transfektion Equiner Sarkoidzellen am besten geeignet ist. Deshalb wurde der anschließende Gentransfer von Zytokin-Genen mit diesem Transfektionsreagenz durchgeführt.

In der Literatur wird *DreamfectGold*<sup>®</sup> allerdings weniger häufig eingesetzt als *Lipofectamin*<sup>™</sup>2000. SHAO und Mitarbeiter (2009) nutzten es beispielsweise zur Transfektion humaner Ovarialkarzinomzellen (SKOV3) mit dem Enzym Gewebe-Transglutaminase (engl.: Tissue Transglutaminase, TG2). Direkte Vergleiche zwischen verschiedenen Transfektionsreagenzien sind aber selten. MARKOVA und Mitarbeiter (2008) verwendeten sowohl *DreamfectGold*<sup>®</sup> als auch *Lipofectamin*<sup>™</sup>2000 um die DNA eines Chlorid empfindlichen Sensors in Ovarzellen des Chinesischen Hamsters (engl.: Chinese Hamster Ovary; CHO) und eine primäre Nervenzellkultur aus dem Hippocampus zu transfizieren. Eine Aussage, ob eines der Protokolle besser geeignet war, wird in dieser Arbeit jedoch nicht getroffen.

Die Wahl eines bestimmten Transfektionsreagenz hat unter Umständen bedeutenden Einfluss auf die Resultate des Gentransfers mittels Magnetofektion. KROTZ und Mitarbeiter (2003b) verglichen die Transfektionseffizienz von vier Transfektionsreagenzien (Effectene, FuGENE, DOTAP-Cholesterol und Polyethylenimine (PEI)) mit und ohne Einfluss eines Magnetfeldes. Dabei zeigte sich, dass, verglichen mit konventionellen Methoden, bei Verwendung von FuGENE in Verbindung mit der Einwirkung des Magnetfeldes lediglich die 0,15fache Menge der Zellen transfiziert wurde. Dies wird mit einer Aggregation der Eisen-Lipid-Komplexe bei Einfluss des Magnetfeldes begründet, die eine Aufnahme durch die Zellen verhindert. Einen Vergleich verschiedener Transfektionsmethoden bei equinen Zellen führten DOUGHERTY und Mitarbeiter (2011) durch, indem sie Knorpelzellen mit small interfering RNA (siRNA) alleine und in Verbindung mit liposomalen kationischen Molekülen transfizierten. Dabei war es überraschend, dass die Transfektion mit siRNA alleine zwar zu einem deutlich größeren Prozentsatz an transfizierten Zellen führte, aber die Menge an intrazellulären siRNA-Molekülen bei Verwendung kationischer Lipide höher war. Dieser Effekt lässt sich laut Aussage der Autoren darauf zurückführen, dass die Größe der Lipid-siRNA-Komplexe eine Aufnahme in Knorpelzellen erschwert, dafür aber durch den Zell-zu-Komplex-Kontakt die endozytotische Aufnahme von siRNA in die Zelle gefördert wird.

### 5.2.3 Einfluss des gewählten Kulturmediums auf den Transfektionserfolg

In den Experimenten zeigte sich ein deutlich positiver Effekt der Magnetofektion besonders bei Verwendung von Zellen, die mit Zusatz von fetalem Kälberserum (FKS) supplementiert waren. Im Gegensatz zur Transfektion von Zellen, die mit Zusatz von autologem Serum kultiviert wurden, produzierten diese Zellen deutlich mehr Luciferase. Dieser Effekt konnte sowohl bei Verwendung von *Lipofectamin<sup>TM</sup>2000* als auch *DreamfectGold<sup>®</sup>* als Transfektionsreagenzien gezeigt werden

Vom Einsatz autologen Serums als Supplement des Zellkulturmediums erhofften wir uns in der vorliegenden Arbeit eine höhere Vitalität der Zellen und damit bessere Transfektionsergebnisse. In dieser Arbeit konnten die positiven Auswirkungen auf die Robustheit von Zellen, die mit autologem Serum kultiviert wurden, jedoch nicht nachvollzogen werden. Dies wäre im Hinblick auf effizientere Transfektionsergebnisse wünschenswert gewesen. Deshalb wurden im weiteren Verlauf der Arbeit zur Transfektion mit heterologen Zytokinen Zellen verwendet, die in Medium mit fetalem Kälberserum kultiviert wurden.

Die Zellkultur mit autologem Serum ist eine wenig verbreitete Alternative zur Verwendung von Medium, welches mit fetalem Kälberserum supplementiert wird. Dabei besitzen Zellen, die in Medium mit autologem Serum kultiviert werden, ähnliche Ausprägungen von Oberflächenmarkern wie solche, die im Medium mit fetalem Kälberserum wachsen (LINDROOS et al. 2010). LINDROOS und Mitarbeiter (2010) setzten allerdings eine höhere Konzentration von autologem Serum ein, um ähnliche Proliferationsraten, verglichen mit der Kultur in FKS-supplementiertem Medium, zu erhalten. Signifikante Unterschiede ließen sich dagegen in der Expression von Genen, die den Zellzyklus und den TGF- $\beta$ -Signalweg regulieren, feststellen. Diese Gene waren bei Einsatz autologen Serums vermehrt exprimiert. Der Einsatz einer größeren Menge an autologen Pferdeserums für die Zellkultur wurde in unserer Arbeit nicht beurteilt, da ein Vergleich der erzielten Transfektionsraten nicht mehr unter gleichen Voraussetzungen möglich gewesen wäre.

Im Hinblick auf eine Transplantation von ex-vivo-kultivierten Zellen oder Gewebe minimiert der Zusatz von autologem Serum die Gefahr von Immunreaktionen und auf den Einsatz von Wachstumsfaktoren kann weitgehend verzichtet werden (AGHAYAN et al. 2011; TONTI und MANELLO 2008; CHACHQUES et al. 2004). Durch Transplantation von Kardiomyoblasten, die in Medium mit autologem Serum statt FKS kultiviert wurden, konnten beispielsweise lebensbedrohliche Arrhythmien verhindert werden. Diese traten auf, nachdem ex-vivo-kultivierte humane Herzmuskelzellen, die in Medium mit Zusatz von FKS kultiviert wurden, ihren Spendern in ischämisch geschädigtes Gewebe transplantiert wurden.

Die resultierende Entzündung, die zu den Arrhythmien führte, war eine Reaktion auf fremde Proteine des Kulturmedium, welche die Oberfläche der Herzmuskelzellen veränderten (CHACHQUES et al. 2004).

Darüber hinaus war es in unseren Experimenten aufgrund der gewählten Tierart „Pferd“ einfach, eine größere Menge an Serum für die spätere Zellkultur zu gewinnen. Bei Experimenten in denen die primären Zellen von anderen Spezies oder dem Menschen gewonnen werden, ist es unter Umständen nicht oder nur durch mehrmalige Blutabnahme möglich, ausreichend Serum für die Zellkultur zu erhalten.

#### 5.2.4 Einfluss der Transfektion heterologer Zytokingene

Im zweiten Versuchsteil dieser Arbeit wurde der Einfluss heterologer Zytokine auf die MHC-I-Präsentation auf der Zelloberfläche von Zellkulturen des Equinen Sarkoids beurteilt. Für diesen Versuch wurden nur Zelllinien verwendet, die aus Tumoren stammen, in denen BPV E5 nachgewiesen wurde.

Die Ausprägung von MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche der untersuchten Zellen ließ sich durch die Transfektion mit den felines Zytokin-Genen IFN- $\gamma$  und GM-CSF nicht deutlich positiv beeinflussen. Interessant waren allerdings die Ergebnisse der Transfektionen mit der höchsten Menge an Plasmid-DNA (10,71  $\mu$ g DNA). Diese Zellen reagierten zwar mit einem leichten Anstieg der MHC-I-Moleküle auf der Zelloberfläche, allerdings war dieser bei Einsatz des Luciferase-Plasmids („Mock“-Transfektion) höher als bei der Transfektion mit Zytokin-Genen. Dieser Effekt konnte bei den Versuchsteilen mit feIFN- $\gamma$ , feGM-CSF und der Kombination aus beiden Zytokinen beobachtet werden.

Bei den Dosisstufen 5,36 und 2,68  $\mu$ g Plasmid-DNA konnte ebenfalls ein leichter Anstieg der MHC-I-Moleküle erreicht werden. Dieser war allerdings bei Transfektion mit Zytokin-Genen höher als bei der Kontrolle („Mock“-Transfektion mit pBluc). Dabei war bei niedrigeren Mengen an DNA (2,68  $\mu$ g) eine deutlichere Ausprägung festzustellen.

Diese Effekte zeigen, dass die eingesetzten Zytokine die Ausprägung der MHC-I-Komplexe positiv beeinflussen können. Die Tatsache, dass die positiven Effekte mit niedrigerer eingesetzter DNA-Menge ausgeprägter waren, lässt allerdings auf eine zu hoch gewählte Menge an DNA schließen.

Um herauszufinden, ob sich hohe Mengen an produzierten Zytokinen negativ auf die Ausprägung von MHC-I-Molekülen an der Zelloberfläche auswirkten, wurden die Ergebnisse auf eine Korrelation dieser beiden Parameter hin untersucht. Dabei konnte allerdings bei keiner der untersuchten Zytokine in den jeweiligen Dosisstufen ein deutlicher Zusammenhang festgestellt werden. Ähnliche Erfahrungen wurden bei Versuchen mit humanen Tumoren gemacht. BANDER und Mitarbeiter (1997) stellten fest, dass der Anstieg von MHC-I-Komplexen auf Krebszellen durch den Einfluss von Zytokinen nicht proportional mit der eingesetzten Menge erfolgt. Dort wurden Zellkulturen von Prostatakarzinomen mit ansteigenden Mengen an Interferon- $\gamma$  inkubiert, wobei bereits bei relativ niedrigen Dosen die maximal mögliche Steigerung der Ausprägung von MHC-I-Komplexen erreicht wurde. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch GASTL und Mitarbeiter (1996), die primäre Zellkulturen von Nierenkarzinomen mit Interferon- $\gamma$  inkubierten. Zytokine haben allerdings auch negative Auswirkungen auf die Zellvitalität und den Gesamtorganismus, was zu systemischen Nebenwirkungen führen kann. ELLERHORST und Mitarbeiter (1994) wurden beim systemischen Einsatz von Interferon- $\gamma$  zur Behandlung von Nierenkarzinom-Patienten mit systemischer Toxizität, wie Myalgien und Fieber konfrontiert. Die sehr unterschiedlichen Mengen an Zytokin in den Zellüberständen der von uns transfizierten Zellen legen nahe, dass zum Teil zu hohe Mengen an Zytokin produziert wurden, was sich negativ auswirkte.

In der vorliegenden Arbeit lassen die fehlenden Signifikanzen der Ergebnisse auch die Annahme zu, dass die beobachtete Steigerung der MHC-I-Komplexe zum Teil auf eine unspezifische Immunstimulation durch das Einbringen von Fremdmaterial zurückzuführen ist. Dieses Fremdmaterial wurde in Form von Fremd-DNA, den Transfektionsreagenten (*Lipofectamin<sup>TM</sup>2000* und *DreamfectGold<sup>®</sup>*) und den Eisenoxid-Nanopartikeln zugesetzt. Besonders die in bakterieller (Plasmid-) DNA vorhandenen unmethylierten CpG-Motive besitzen immunstimulierende Eigenschaften auf Säugerzellen und können die Produktion von

T<sub>H</sub>-1-Zytokinen, wie beispielsweise Interferon- $\gamma$ , bewirken. Das Plasmid-DNA-Rückgrat alleine stellt somit bereits ein Immunstimulans dar (KRIEG 2002, TIGHE et al. 1998). HAFNER und Mitarbeiter (2001) beobachteten antimetastatische, immunstimulierende Effekte von Plasmid-DNA unabhängig davon, ob es sich um kodierende oder um „leere“ Plasmide handelte. Dies entspricht den Beobachtungen in dieser Arbeit, wo der Einsatz des Kontrollplasmids ähnliche Effekte wie die kodierenden Plasmide hervorrief. Auch wurden keine direkten zytotoxischen Wirkungen der Plasmide auf Tumorzellen beobachtet. Vielmehr sind die antimetastatischen Eigenschaften auf eine Induktion eigener Zytokine, wie beispielsweise IFN- $\gamma$ , zurückzuführen. Um diesen Effekt auch in der vorliegenden Arbeit festzustellen, wäre ein ELISA für equine Zytokine der Zellkulturüberstände aussagekräftig gewesen.

Die Notwendigkeit eines Einsatzes von Transfektionsreagenten für erfolgreiche Versuche *in vitro* wird in der Studie von WATTRANG und Mitarbeitern (1995) deutlich. Dort wurden verschiedene immunstimulierende CpG-Motive und Plasmid-DNA hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Produktion von Typ-1 Interferonen zu induzieren, verglichen. Ohne Zugabe eines Transfektionsreagenten konnte keine Zytokin-Produktion durch die Einwirkung der CpG-Motive bzw. des Plasmids erreicht werden. Die Inkubation mit dem Transfektionsreagenten alleine bewirkte dagegen keine Steigerung der Zytokinproduktion. Der Einfluss des Transfektionsreagenten ist deshalb nicht für eine Immunstimulation verantwortlich zu machen und ist auch in dieser Studie als unwesentlich zu beurteilen.

Die erfolgreiche Transfektion mit feline Zytokin-Genen wurde in dieser Arbeit mit dem entsprechenden, kommerziell erhältlichen ELISA nachgewiesen. Dabei zeigten sich große Unterschiede in der produzierten Zytokinmenge zwischen den einzelnen Zelllinien. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen von DOW und Mitarbeitern (1998) überein, die canine Melanomzellen *in vitro* mit Staphylokokkus-Enterotoxin-B (SEB) transfizierten. Wie in der vorliegenden Studie erzielten sie große Variabilitäten in der Synthese der Transfektionsprodukte bei gleichen Mengen an eingesetztem Plasmid. Dieser Effekt wurde mit zellspezifischen Unterschieden bei der Transfektionseffizienz, der Produktion und dem Ausschleusen der synthetisierten Proteine durch die primären Melanomzelllinien begründet.

### 5.3 Beantwortung der Fragen aus der Einleitung

- Ist ein nicht-viraler Gentransfer bei Zellen des Equinen Sarkoids möglich und beeinflusst die Anwendung der Magnetofektion das Ergebnis des Gentransfers positiv?

Die Gewinnung primärer Zellen aus nativen Tumorpräparaten war mit Standardmethoden aus der Zellkultur zuverlässig durchführbar. Alle Zelllinien ließen sich nach Vermehrung und Aussaat in entsprechende 96-well-Platten nach der üblichen Methode mit dem Plasmid pBluc transfizieren.

In den durchgeführten Experimenten zum nicht-viralen Gentransfer wurden mit der Methode der Magnetofektion durchweg bessere Ergebnisse erzielt. Die Steigerungen in der produzierten Luciferase waren zum Teil hochsignifikant, verglichen mit der Referenzmethode (Lipofektion) ohne Einwirkung des Magnetfeldes. Obwohl große Unterschiede je nach verwendetem Transfektionsreagenz und dem Supplement des Kulturmediums bestehen, war bei allen Teilversuchen deutlich der positive Effekt des Magnetfeldes, besonders bei Einsatz niedriger Dosen an Plasmid-DNA, zu sehen. In den unteren Dosisstufen waren dabei die signifikanten Unterschiede feststellbar. Dies stimmt mit Ergebnissen anderer Studien zum Einsatz der Magnetofektion überein. Da auch der nicht-virale Gentransfer eine Belastung für die jeweiligen Zellen darstellt, ist dies im Hinblick auf einen klinischen Einsatz von Plasmid-DNA von besonderem Interesse. Durch eine Dosisreduktion der eingesetzten Plasmide ließen sich somit unerwünschte Nebeneffekte wie Apoptose transfizierter Zellen oder systemische Verbreitung der Plasmid-DNA nahezu ausschließen. Desweiteren erlaubte die Wahl der Luciferase-Plasmid-DNA eine objektive Beurteilung des Transfektionserfolgs.

- Lassen sich durch Transfektion mit heterologen Zytokin-Genen die Oberflächeneigenschaften von Zellen des Equinen Sarkoids *in vitro* beeinflussen?

Die Magnetofektion ist eine effektive Methode um (Fremd-)DNA in Zellkulturen Equiner Sarkoide einzubringen. Die Transfektion heterologer Zytokin-Gene führte zu einer hohen Produktion dieser Botenstoffe, allerdings konnte in dieser Studie kein deutlich positiver Effekt auf die Zellkulturen beobachtet werden. Die erreichten Steigerungen in der Präsentation der MHC-I-Komplexe auf den untersuchten Zellkulturen können auch auf die „Mock-Transfektion“ mit dem Luciferase-Plasmid zurückzuführen sein.

Dies verdeutlicht die Wirkung einer unspezifischen Stimulation durch das Einbringen von Fremd-DNA auf die Immunantwort der Zellen.

- Wirkt sich der Einfluss dieser Zytokine positiv im Hinblick auf eine Immuntherapie des Equinen Sarkoids aus?

Im Hinblick auf eine Immuntherapie des Equinen Sarkoids ist der Einsatz der felines Zytokingene IFN- $\gamma$  und GM-CSF nicht angezeigt. Die Magnetofektion heterologer Zytokin-Gene stellt vielmehr ein unspezifisches Immunstimulans dar. Die Ergebnisse dieser Studie weisen vielmehr auf die Notwendigkeit homologer Plasmid-DNA für einen Einsatz *in vivo* hin. Diese sollten jedoch zunächst ebenfalls *in vitro* auf ihre Funktionstüchtigkeit und den Einfluss auf Zellkultursysteme getestet werden.

## 5.4 Schlussfolgerungen

Die Magnetofektion ist eine geeignete Methode zum nicht-viralen Gentransfer beim Pferd *in vitro*. Dabei sind die Möglichkeit der Dosisreduktion eingesetzter Plasmide und die lokal begrenzte Applikationsmöglichkeit die wesentlichen Vorteile, auch für einen späteren Einsatz *in vivo*. Im Hinblick auf einen gentherapeutischen Einsatz ist es aus tierschutzrechtlichen Gründen notwendig, erwartete Belastungen möglichst gering zu halten und dabei trotzdem eine höchstmögliche Wirksamkeit zu erreichen. Diese Voraussetzungen wären mit dem Einsatz dieser Methode gegeben.

Um dem Körper im Rahmen einer Immuntherapie die Möglichkeit zu geben entartetes Gewebe zu erkennen, ist ein ausreichendes Vorhandensein von MHC-Molekülen notwendig. Die Präsenz von MHC-I-Molekülen auf Tumorzellen ist eine weitverbreitete Methode um die Immunogenität von Tumoren zu evaluieren. Das Ziel, diese Komplexe auf Tumorzellen zu erhöhen, ist deshalb ein zentraler Bestandteil vieler Therapieansätze. Gerade beim Equinen Sarkoid sind aufgrund der viralen Ätiologie (BPV-1 und -2) die Synthese und der Transport von MHC-Molekülen an die Zelloberfläche beeinträchtigt. Damit stellt die Anzahl dieser Komplexe eine gute Möglichkeit zur Beurteilung der Effektivität geplanter Therapieformen dar.

Der Einsatz der feline Zytokine GM-CSF und Interferon- $\gamma$  hat keine statistisch signifikanten positiven Auswirkungen auf die Ausprägung von MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche von Zellen des Equinen Sarkoids. Trotz der höheren Homologie als bei den humanen Zytokinen reagierten die primären Zellkulturen nicht mit einer signifikant stärkeren Ausprägung der MHC-I-Moleküle. Darüber hinaus können die beobachteten leichten Steigerungen auf eine unspezifische Immunstimulation zurückzuführen sein. Die unspezifische Immunstimulation durch die zugesetzte Plasmid-DNA ist allerdings nicht ausreichend, um einen signifikanten Unterschied zu nicht-transfizierten (nativen) Zellen zu erreichen.

## 5.5 Weiterführende Untersuchungen

Im Rahmen einer Weiterführung dieser Arbeit wäre es angezeigt, eine größere Anzahl an Zelllinien in die Experimente mit einzubeziehen. Dadurch können zuverlässigere Schlüsse hinsichtlich der Effizienz gewählter Methoden getroffen werden. Um möglichst zellschonende Verfahren weiter zu verfolgen, wäre eine Lebend-Tot-Auswertung transfizierter Zellen interessant. Dies ist im Hinblick auf einen klinischen Einsatz von besonderer Bedeutung, da somit Zellnekrosen verhindert werden können.

Um zu beurteilen, inwieweit Zellkulturen des Equinen Sarkoids auf den Zusatz von Zytokinen mit einer Hochregulierung der MHC-I-Komplexe reagieren, könnten zunächst die primären Zellen unter Zusatz von Zytokinen kultiviert werden. Dafür könnten sowohl heterologe als auch equine Zytokine herangezogen werden und das Spektrum der Zytokine erweitert werden. Eine Klonierung der equinen Zytokin-Gene Interferon- $\gamma$  und GM-CSF in Plasmidform ist im Hinblick auf einen geplanten klinischen Einsatz angezeigt. Der Einfluss dieser equinen Zytokine auf primäre Zellkulturen sollte vorab evaluiert werden. Dazu eignet sich wiederum die FACS-Auswertung und die Wirksamkeit produzierter Botenstoffe ließe sich durch Inkubation von PBMNCs mit entsprechenden Zellkulturüberständen beurteilen (Proliferationsassay).

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

### **Nicht-viraler Gentransfer mittels Magnetofektion bei Zellen des Equinen Sarkoids In-vitro-Studie im Hinblick auf eine adjuvante Gentherapie des Equinen Sarkoids**

Equine Sarkoide gehören zu den häufigsten Tumorerkrankungen beim Pferd und stellen mehr als 90 % der Hauttumore bei dieser Spezies dar. Obwohl die Neoplasie nicht metastasiert und nicht direkt lebensbedrohlich ist, entstehen den Besitzern betroffener Pferde häufig hohe Kosten. Diese sind in der hohen Rezidivneigung Equiner Sarkoide und der Notwendigkeit wiederholter und langwieriger Behandlungen begründet. Darüber hinaus führt das gehäufte Auftreten in Sattel- oder Gurtlage und am Kopf zu einer Nutzungseinschränkung und somit zu einem Wertverlust der Tiere.

Als Ursache der Erkrankung wird eine Infektion der Pferde mit den bovinen Papillomaviren-1 und -2 in Verbindung mit einer genetischen Prädisposition angesehen. Diese Infektion führt zu einer Verminderung oder gar Verlust von MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche infizierter Hautzellen, so dass das Immunsystem entartete Zellen nicht erkennen und bekämpfen kann.

Es besteht eine Vielzahl an verfügbaren Therapieformen, die von der konventionellen Chirurgie über die Herstellung autologer Vakzine bis zu diversen Ansätzen der Immuntherapie reichen. Viele dieser Behandlungen setzen invasive Eingriffe voraus und die Rezidivneigung ist hoch. Ziel einer gentherapeutischen Behandlung Equiner Sarkoide ist die Anregung des körpereigenen Immunsystems zur Heilung der Tumore und damit eine verminderte Rezidivbildung. Gentherapeutische Ansätze zur Behandlung von Krebs und anderen Erkrankungen sind in der Humanmedizin weitverbreitet und werden auch im Kleintierbereich zur Behandlung bereits mit guten Erfolgen eingesetzt.

Ziel dieser Arbeit war es, eine effektive und sichere Methode des Gentransfers für primäre Zellkulturen des Equinen Sarkoids zu finden, die sich auch für einen zukünftigen Einsatz *in vivo* eignet. Deshalb wurden Methoden des nicht-viralen Gentransfers beurteilt.

Zur Gewinnung der primären Zellkulturen wurde Tumorgewebe von zwölf Tieren, die zur Entfernung Equiner Sarkoide in der Pferdeklinik der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München behandelt wurden, verwendet.

Um eine effektive Methode des nicht-viralen Gentransfers für primäre Zellen des Equinen Sarkoids zu finden, wurden Zelllinien von sechs Tieren jeweils mit der Methode der Magnetofektion und dem Standard-Transfektionsvorgehen „Lipofektion“ transfiziert und die Ergebnisse miteinander verglichen. Dabei zeigten sich Unterschiede bei Verwendung verschiedener Transfektionsreagenzien und Kulturmedien. Bei allen durchgeführten Teilversuchen zeigte sich eine höhere Transfektionseffizienz, gemessen an Nanogramm Luciferase pro Milligramm produziertem Zellprotein, bei Einsatz der Magnetofektion. In den unteren eingesetzten Dosisstufen konnten durch die Einwirkung des Magnetfeldes hochsignifikante Steigerungen erreicht werden. Diese Ergebnisse stimmen mit denen vorangegangener Studien im Bereich der Kleintier- und Humanmedizin überein. Damit ist die Methode Magnetofektion für einen späteren Einsatz zum nicht-viralen Gentransfer bei Equinen Sarkoiden *in vivo* geeignet.

Im zweiten Versuchsteil wurden Zellkulturen des Equinen Sarkoids mit Plasmiden, die für feline Zytokin-Gene kodieren, transfiziert. Dies erfolgte auch mit der Methode der Magnetofektion. Dazu wurden primäre Zellen aus Equinen Sarkoiden von sechs Tieren, bei denen das Onkoprotein E5 der Bovinen Papillomaviren-1 und-2 nachgewiesen wurde, verwendet. Ziel dieses Experiments war es, den Einfluss feliner Zytokine auf die Ausprägung der MHC-I-Moleküle auf der Oberfläche der Zellen zu evaluieren. Die erreichten Steigerungen bei der MHC-I-Ausprägung wurden allerdings auch bei Transfektion mit dem

Kontrollplasmid pBluc erreichen. Dabei ließen sich sowohl bei der Transfektion mit den feline Plasmidgenen IFN- $\gamma$  und GM-CSF leichte Steigerungen der MHC-I-Moleküle erreichen. Diese vermehrte Ausprägung kultivierter Zellen des Equinen Sarkoids kann auf eine unspezifische Immunstimulation aufgrund des DNA-Gerüsts der eingesetzten Plasmide zurückgeführt werden. Weiterführende Untersuchungen sollten deshalb zunächst mit den entsprechenden equinen Plasmidgenen durchgeführt werden. Darüber hinaus sollte ein Proliferationsassay durchgeführt werden, um die biologische Aktivität der Zytokine nachzuweisen.

## 7 SUMMARY

### **Non-viral gene transfer of primary cells from Equine Sarcoids using the magnetofection method**

#### **-In vitro study regarding an adjuvant gene therapy for the Equine Sarcoid-**

Equine Sarcoids are the most common tumors in horses and represent more than 90% of skin tumors in this species. Although it is a non-metastasising neoplasia and not directly life-threatening, the owners of affected horses are often confronted with high costs. These are due to the high recurrence rate of Equine Sarcoids and the need for repeated and extensive treatments. In addition the frequent occurrence on sites like saddle and girth region and head lead to a restricted use and thus to a loss of value of the animals.

An infection of horses with the Bovine Papillomavirus 1 and -2 in combination with a genetic predisposition of certain individuals, is considered as the cause of the disease. This infection leads to a reduction or even loss of MHC I molecules on the cell surface of infected skin cells, so that the immune system can not detect and fight malignant cells. There is a variety of available therapies, ranging from conventional surgery on the production of autologous vaccines to various approaches of immunotherapy. Many of these treatments require invasive procedures and the continued tendency to relapse is high. The aim of gene therapy in treating Equine Sarcoids is to stimulate the body's immune system to cure tumors and thus reduce the incidence of relapse. Gene therapy methods for the treatment of cancer and other diseases are widely used in human medicine and there are already promising results in small animal medicine.

The aim of this work was to find an effective method of non-viral gene transfer for primary cell cultures of Equine Sarcoids, which should also be suitable for a future use *in vivo*. To obtain the primary cell cultures, tumor tissue from twelve animals was harvested. These horses were treated for removal of Equine Sarcoids in the Equine Clinic of the Veterinary Faculty of Ludwig-Maximilians University in Munich.

To find an effective method of non-viral gene transfer, primary cell lines of six horses were transfected using each the standard method "lipofection" and the relatively new method "magnetofection". Here, differences were found when using different transfection reagents and culture media. In all experiments carried out, cells transfected using the magnetofection protocol showed higher transfection efficiency, measured in nanogram luciferase per milligram of cell protein produced. In the lower dose levels used, highly significant increases could be achieved by the action of the magnetic field. These results are consistent with those of previous studies in the field of small animal and human medicine. Thus, the method is suitable for later use for non-viral gene transfer in Equine Sarcoids *in vivo*.

In the second trial, the effect of heterologous feline cytokines on the presentation of MHC-I molecules on the surface of cultured tumor cells of the Equine Sarcoid was investigated. These cells were primary cells from Equine Sarcoids of six animals in which the oncoprotein E5 of Bovine Papillomavirus-1 and -2 was detected. Transfection using the magnetofection method with both the feline plasmid genes IFN- $\gamma$  and GM-CSF achieved a slight increase of MHC I molecules. This increased expression of MHC-I molecules, however, was also obtained when cells were transfected with the control plasmid pBluc. The effect of the introduced plasmids on the surface properties of cultured cells of the Equine Sarcoid might therefore be the effect of nonspecific immune stimulation. This is due to the DNA backbone of the plasmids used.

Further studies should therefore first be carried out with the corresponding equine plasmid genes. To evaluate whether the cytokines produced from these plasmids are biologically active, a proliferation assay should also be carried out.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

ABUL-HASSAN, K., R. WALMSLEY und M. BOULTON (2000).

"Optimization of non-viral gene transfer to human primary retinal pigment epithelial cells."  
Curr Eye Res **20**(5): 361-366.

AGHAYAN, H. R., B. ARJMAND, A. NOUROUZI-JAVIDAN, H. SABERI,  
M. SOLEIMANI, S. A. TAVAKOLI, A. KHODADADI. N. TIRGAR und F.  
MOHAMMADI-JAHANI (2011).

"Clinical grade cultivation of human Schwann cell, by the using of human autologous serum instead of fetal bovine serum and without growth factors."  
Cell Tissue Bank.

AHMAD, N., S. GUPTA, M. M. HUSAIN, K. M. HEISKANEN und H. MUKHTAR (2000).

"Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells."  
Clin Cancer Res **6**(4): 1524-1528

ANDO, Y., K. NIWA, N. YAMADA, T. ENOOTO, T. IRIE, H. KUBOTA, Y. OHMIYA und  
H. AKIYAMA (2008).

"Firefly bioluminescence quantum yield and colour change by pH-sensitive green emission."  
Nat. Photonics **2**, 44-47.

ANGELOS J., Y. OPPENHEIM, W. REBHUN, H. MOHAMMED und D. F. ANTCZAK  
(1988).

"Evaluation of breed as a risk factor for sarcoid and uveitis in horses."  
Anim Genet **19**(4): 417-425.

ANZOLA, M. (2004).

"Hepatocellular carcinoma: role of hepatitis B and hepatitis C viruses proteins in hepatocarcinogenesis."  
J Viral Hepat **11**(5): 383-393.

APTE, S. M., S. VADHAN-RAJ, L. COHEN, R. L. BASSETT, I. O. GORDON,  
C. F. LEVENBACK, P. T. RAMIREZ, S. T. GALLARDO, R. S. PATENIA, M. E. GARCIA,  
R. B. IYER und R. S. FREEDMAN (2006).

"Cytokines, GM-CSF and IFN $\gamma$  administered by priming and post-chemotherapy cycling in recurrent ovarian cancer patients receiving carboplatin."  
J Transl Med **4**: 16.

ARAI, M., J. DARMAN, A. LEWIS und J. K. YAMAMOTO (2000).

"The use of human hematopoietic growth factors (rhGM-CSF and rhEPO) as a supportive therapy for FIV-infected cats."  
Vet Immunol Immunopathol **77**(1-2): 71-92.

ARAIBI, E. H., B. MARCHETTI, G. H. ASHRAFI und M. S. CAMPO (2004).

"Downregulation of major histocompatibility complex class I in bovine papillomas."  
J Gen Virol **85**(Pt 10): 2809-2814.

ARGYLE, D. J. (1999).

"Gene therapy in veterinary medicine."

Vet Rec **144**(14): 369-376.

ARGYLE, D. J., K. SMITH, K. MCBRIDE, R. FULTON und D. E. ONIONS (1995).

"Nucleotide nad predicted peptide sequence of feline interferon-gamma (IFN-gamma)."

DNA Seq **5**(3): 169-171.

ARMSTRONG, A.C. und R.E. HAWKINS (2001).

Vaccines in oncology: background and clinical potential.

Br J Radiol **74**, 991-1002.

ARMSTRONG, A. C., D. EATON und J. C. EWING (2001).

"Science, medicine, and the future: Cellular immunotherapy for cancer."

BMJ **323**(7324): 1289-1293.

ASHRAFI, G. H., E. TSIRIMONAKI, B. MARCHETT, P. M. O'BRIEN, G. J SIBBET,  
L. ANDREW und M. S. CAMPO (2002).

"Down-regulation of MHC class I by bovine papillomavirus E5 oncoproteins."

Oncogene **21**(2): 248-259.

BANDER N. H., D. YAO, H. LIU, Y.-T. CHEN, M. STEINER, W. ZUCCARO und P. MOY  
(1997)

"MHC class I and II expression in prostate carcinoma and modulation by interferon-alpha  
and -gamma."

Prostate **33**(4): 233-239.

BARABAS, K., R. MILNER, D. LURIE und C. ADIN (2008).

"Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications."

Vet Comp Oncol **6**(1): 1-18.

BELARDELLI, F. und M. FERRANTINI (2002).

"Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity."

Trends Immunol **23**(4): 201-208.

BEYER, J. C., R. W. STICH, D. S. HOOVER, W.C. BROWN und W.P. CHEEVERS (1998).

"Cloning and expression of caprine interferon-gamma."

Gene **210**(1): 103-108.

BILLIAU, A. (2006).

"Interferon: the pathways of discovery I. Molecular and cellular aspects."

Cytokine Growth Factor Rev **17**(5): 381-409.

BLATTMANN, J. N. und P. D. GREENBERG (2004).

"Cancer immunotherapy: a treatment for the masses."

Science **305**(5681): 200-205.

BOEHM, U., T. KLAMP, M. GROOT, J. C. HOWARD (1997).

"Cellular responses to interferon-gamma."

Annu Rev Immunol **15**: 749-795.

- BOGAERT, L., A. MARTENS, C. DE BAERE und F. GASTHUYS (2005).  
"Detection of bovine papillomavirus DNA on the normal skin and in the habitual surroundings of horses with and without equine sarcoids."  
Res Vet Sci **79**(3): 253-258.
- BOGAERT, L., A. MARTENS, M. VAN POUKE, R. DUCATELLE, H. DE COCK, J. DEWULF, C. DE BAERE, L. PEELMAN, F. GASTHUYS (2008).  
"High prevalence of bovine papillomaviral DNA in the normal skin of equine sarcoid-affected and healthy horses."  
Vet Microbiol **129**(1-2): 58-68.
- BOON, T. und P. VAN DER BRUGGEN (1996).  
"Human tumor antigens recognized by T lymphocytes."  
J Exp Med **183**(3): 725-729.
- BORNKAMM, G. W. (2009).  
"Epstein-Barr virus and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: more questions than answers."  
Int J Cancer **124**(8): 1745-1755.
- BOSCH, F. X., A. LORINCZ, N. MUNOZ, C. J. L. M. MEIJER und K. V. SHAH (2002).  
"The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer."  
J Clin Pathol **55**(4): 244-265.
- BOSHART, M., L. GISSMANN, H. IKENBERG, A. KLEINHEINZ, W. SCHEURLLEN und H. ZUR HAUSEN (1984).  
"A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer."  
EMBO J **3**(5): 1151-1157.
- BRANDT, S., R. HARALAMBUS, S. SHAFTI-KERAMAT, R. STEINBORN, C. STANEK und R. KIRNBAUER (2008).  
"Peripheral blood mononuclear cells represent a reservoir of bovine papillomavirus DNA in sarcoid-affected equines."  
J Gen Virol **89**(Pt 6): 1390-1395.
- BROSTROM, H., (1995).  
Equine sarcoids. A clinical and epidemiological study in relation to equine leucocyte antigens (ELA).  
Acta Vet Scand **36**, 223-236.
- CABALLERO, O. L. und Y. T. CHEN (2009).  
"Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy."  
Cancer Sci **100**(11): 2014-2021.
- CAMPO, M.S., (2002).  
Animal models of papillomavirus pathogenesis.  
Virus Res **89**, 249-261.

CAMPO, M.S., (1997).

Bovine papillomavirus and cancer.

Vet J 154, 175-188.

CAMPO, M.S., W.F JARRETT, R. BARRON, B.W. O'NEIL, und K.T. SMITH, (1992).

Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle.

Cancer Res 52, 6898-6904.

CANTRELL, M. A., D. ANDERSON, D. P. CERETTI, V. PRICE, K. MC KERECHAN, R. J. TUSHINSKY, D. Y. MOCHIZUKI, A. LARSEN, K. GRABSTEIN, S. GILLIS und D. COSMAN, (1985).

"Cloning, sequence, and expression of a human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor."

Proc Natl Acad Sci U S A 82(18): 6250-6254.

CARR, E.A., A. P. THEON, B. R. MADEWELL, S. M. GRIFFEY und M. E. HITCHCOCK (2001a).

Bovine papillomavirus DNA in neoplastic and nonneoplastic tissues obtained from horses with and without sarcoids in the western United States.

Am J Vet Res 62, 741-744.

CARR, E. A., A. P. THEON, B. R. MADEWELL, M. E. HITCHCOCK, R. SCHLEGEL und J. T. SCHILLER, (2001b).

"Expression of a transforming gene (E5) of bovine papillomavirus in sarcoids obtained from horses."

Am J Vet Res 62(8): 1212-1217.

CARSTANJEN, B. P. JORDAN und O.M. LEPAGE (1997)

Carbon dioxide laser as asurgical instrument for sarcoid therapy – A retrospective study on 60 cases.

Can Vet J Volume 38, December 1997

CAUX, C., C. DEZUTTER-DAMBUYANT, D. SCHMITT und J. BANCHEREAU (1992).

"GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells."

Nature 360(6401): 258-261.

CERETTI, D. P., K. MCKERECHAN, A. LARSEN, D. COSMAN, S.GILLIS und P. E. BAKER (1986).

"Cloning, sequence, and expression of bovine interferon-gamma."

J Immunol 136(12): 4561-4564.

CHACHQUES, J. C., J. HERREROS, J. TRAININI, A. JUFFE, E. RENDAL, F. PROSPER und J. GENOVESE (2004).

"Autologous human serum for cell culture avoids the implantation of cardioverter-defibrillators in cellular cardiomyoplasty."

Int J Cardiol 95 Suppl 1: S29-33.

CHAMBERS, G., V. A. ELLSMORE, P. M. O'BRIEN, S. W. J. REID, S. LOVE, M. S. CAMPO und L. NASIR (2003a).

"Association of bovine papillomavirus with the equine sarcoid."

J Gen Virol **84**(Pt 5): 1055-1062.

CHAMBERS, G., V. A. ELLSMORE, P.M. O'BRIEN, S.W.J. REID, S. LOVE, M.S. CAMPO und L NASIR (2003b).

"Sequence variants of bovine papillomavirus E5 detected in equine sarcoids."

Virus Res **96**(1-2): 141-145.

CHANG, M. H., T. H. CHEN, H.-M. HSU, T.-C. WU, M.-S. KONG, D.-C. LIANG, Y.-H. NI, C.-J. CHEN und D.-S. CHEN (2005).

"Prevention of hepatocellular carcinoma by universal vaccination against hepatitis B virus: the effect and problems."

Clin Cancer Res **11**(21): 7953-7957.

CHARO, J., A. M. CIUPITU, A. LE CHVALIER DE Preville, P. TRIVEDI, G. KLEIN, J. HINKULA und R. KIESSLING (1999).

"A long-term memory obtained by genetic immunization results in full protection from a mammary adenocarcinoma expressing an EBV gene."

J Immunol **163**(11): 5913-5919.

CHATURVEDI, M. M., A. KUMAR, B. G. DARNAY, G. B. N. CHAINY, S. AGARWAL und B. B. AGGARWALET (1997).

"Sanguinarine (pseudochelethrythrine) is a potent inhibitor of NF-kappaB activation, IkappaBalpha phosphorylation, and degradation."

J Biol Chem **272**(48): 30129-30134.

CHEN, E.Y., P.M. HOWLEY, A.D. LEVINSON und P.H. SEEBURG, (1982).

The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome  
Nature **299**, 529-534.

COTUGNO, R., D. GALLOTTA, M. D'AVENIA, A. CORTEGGIO, G. ALTAMURA, F. ROPERTO, M. A. BELISARIO und G. BORZACCHIELLO (2013)

"BAG3 protects Bovine Papillomavirus type 1-transformed equine fibroblast against pro-death signals"

Vet Res **44**(1):61

CRESSWELL, P., N. BANGIA, T. DICK und G. DIEDRICH (1999).

The nature of the MHC class I peptide loading complex.

Immunol Rev **172**, 21-28.

CURIEL, T. J. (2007).

"Tregs and rethinking cancer immunotherapy."

J Clin Invest **117**(5): 1167-1174.

CURRAN, J. A., D. J. ARGYLE, P. COX, D. E. ONIONS und L. NICHOLSON (1994).

"Nucleotide sequence of the equine interferon gamma cDNA."

DNA Seq **4**(6): 405-407.

DAMANIA, B. (2007).

"DNA tumor viruses and human cancer."

Trends Microbiol **15**(1): 38-44.

DERYNCK, R., D. W. LEUNG, P. W. GRAY und D. V. GOEDDEL (1982).

"Human interferon gamma is encoded by a single class of mRNA."

Nucleic Acids Res **10**(12): 3605-3615.

DE VILLIERS, E.M., C. FAUQUET, T.R. BROKER, H.U. BERNARD und H. ZUR HAUSEN, (2004).

„Classification of papillomaviruses.“

Virology **324**, 17-27.

DEVOS, R., H. CHEROUTRE, Y. TAYA, W. DEGRAVE, H. VAN HEUVERSWYN und W. FIERS (1982).

"Molecular cloning of human immune interferon cDNA and its expression in eukaryotic cells."

Nucleic Acids Res **10**(8): 2487-2501.

DE WET JR, W.K., D. R. HELINSKI, und M. DE LUCA (1985).

“Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*.”

Proc. Natl Acad. Sci. **82**, 7870-7873.

DIETZ, O. und B. HUSKAMP (1999):

Handbuch Pferdepraxis

2. Aufl. Verlag Enke, Stuttgart, S. 250 – 251

DISIS, M. L. und M. A. CHEEVER (1996).

"Oncogenic proteins as tumor antigens."

Curr Opin Immunol **8**(5): 637-642.

DIGBY, M. R. und J. W. LOWENTHAL (1995).

"Cloning and expression of the chicken interferon-gamma gene."

J Interferon Cytokine Res **15**(11): 939-945.

DOUGHERTY, S. S., K. S. SANTANGELO und A. L. BERTONE (2011).

"Evaluation of the ability of two transfection reagents to deliver small interfering RNA molecules to equine and guinea pig cartilage in vitro."

Am J Vet Res **72**(6): 813-819.

DOW, S. W., R. E. ELMSLIE, A. P. WILLSON, L. ROCHE, C. GORMAN, und T. A. POTTER (1998).

“In vivo tumor transfection with superantigen plus cytokine genes induces tumor regression and prolongs survival in dogs with malignant melanoma.”

J Clin Invest **101**(11): 2406-2414.

- DÜRST, M., L. GISSMANN, H. IKENBERG und H. ZUR HAUSEN (1983).  
"A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions."  
Proc Natl Acad Sci U S A **80**(12): 3812-3815.
- DUNHAM, S. P. und D. E. ONIONS (2001).  
"Isolation, nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding feline granulocyte colony-stimulating factor."  
Cytokine **14**(6): 347-351.
- DUNN, G. P., L. J. OLD und R.D. SCHREIBER (2004).  
"The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting."  
Immunity **21**(2): 137-148.
- EL-ANEED, A. (2004).  
"An overview of current delivery systems in cancer gene therapy."  
J Control Release **94**(1): 1-14.
- ELLERHORST, J. A., R. G. KILBOURN, R. J. AMATO, A. A. ZUKIWSKI, E. JONES und C. J. LOGOTHETIS (1994).  
"Phase II trial of low dose gamma-interferon in metastatic renal cell carcinoma."  
J Urol **152**(3): 841-845.
- ELMSLIE, R. E. und S. W. DOW (1997).  
"Genetic immunotherapy for cancer."  
Semin Vet Med Surg (Small Anim) **12**(3): 193-205.
- ESENDAGLI, G., H. CANPINAR, G. YILMAZ, A. GUNEL-OZCN, M. OGUZ-GUC, E. KANSU und D. GUC (2009).  
"Primary tumor cells obtained from MNU-induced mammary carcinomas show immune heterogeneity which can be modulated by low-efficiency transfection of CD40L gene."  
Cancer Biol Ther **8**(2): 136-142.
- ESPY, B. M. K. (2008).  
"How to Treat Equine Sarcoids by Autologous Implantation."  
Proceedings of the Annual Convention of the AAEP, San Diego, CA, USA,.
- FARRAR, M. A. und R. D. SCHREIBER (1993).  
"The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor."  
Annu Rev Immunol **11**: 571-611.
- FERRIS, R. L., E. M. JAFFEE und S. FERRONE (2010)."  
"Tumor Antigen-Targeted, Monoclonal Antibody-Based Immunotherapy: Clinical Response, Cellular Immunity, and Immunoescape."  
J Clin Oncol.
- FRAZER, I.H, (1996).  
"Immunology of papillomavirus infection."  
Curr Opin Immunol **8**, 484-491

FRAZER, I. H. (2004).

"Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination."  
Nat Rev Immunol **4**(1): 46-54.

FRUCHT, D. M., T. FUKAO, C. BOGDAN, H. SCHINDLER, J. J. O'SHEA und S. KOYASU (2001).

"IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge."  
Trends Immunol **22**(10): 556-560.

FUERTE, M. A., J. CASTILLA, C. ALONSO und J.M. PEREZ (2003).

"Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways."  
Curr Med Chem **10**(3): 257-66

GAJEWSKI, T. F., Y. MENG und H. HARLING (2006).

"Immune suppression in the tumor microenvironment."  
J Immunother **29**(3): 233-240.

GARDLIK, R., R. PALFFY, J. HODOSY, J. LUKÁCS, J. TURNA, und P. CELEC (2005).

"Vectors and delivery systems in gene therapy."  
Med Sci Monit **11**(4): RA110-21.

GASTL, G., T. EBERT, C. L. FINSTAD, J. SHEINFELD, A. GOMHR, W. AULITZKY und N. H. BANDER (1996).

"Major histocompatibility complex class I and class II expression in renal cell carcinoma and modulation by interferon gamma."  
J Urol **155**(1): 361-367.

GAUCHER, D. und K. CHADEE (2002).

"Molecular cloning and expression of gerbil granulocyte/macrophage colony-stimulating factor."  
Gene **294**(1-2): 233-238

GERBER, H., (1993).

"Viruses, tumours and the MHC."  
Equine vet. J. (25)

GERSTING, S. W., U. SCHILLINGER, J. LAUSIER, P. NICKLAUS, C. RUDOLPH, C. PLANK, D. REINHARDT und J. ROSENECKER (2004).

"Gene delivery to respiratory epithelial cells by magnetofection."  
J Gene Med **6**(8): 913-922

GOBEIL, P. A., Z. YUAN, E. A. GAULT, I. M. MORGAN, M. S. CAMPO und L. NASIR (2009).

"Small interfering RNA targeting bovine papillomavirus type 1 E2 induces apoptosis in equine sarcoid transformed fibroblasts."  
Virus Res **145**(1): 162-165.

GOGAS, H., J. IOANNOVICH, U. DAFNI, C. STAVROPOULOU-GIOKAS, K. FRANGIA, D. TSOUTSOS, P. PANAGIOTOU, A. POLYZOS, O. PAPADOPOULOS, A. STRATIDOS, C. MARKOPOULOS, D. BAFALOUKOS, D. PECTASIDES, G. FOUNTZILAS und J. M. KIRKWOOD, (2006).

"Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon."  
N Engl J Med **354**(7): 709-718.

GOODRICH, L., H. GERBER, E. MARTI und D.F. ANTCZAK, (1998).

"Equine sarcoids."

Vet Clin North Am Equine Pract **14**, 607-623, vii.

GOUGH, N. M., J. GOUGH, D. METCALF, A. KELSO, D. GRAIL, N. A. NICOLA, A. W. BURGESS und A. R. DUNN (1984).

"Molecular cloning of cDNA encoding a murine haematopoietic growth regulator, granulocyte-macrophage colony stimulating factor."

Nature **309**(5971): 763-767.

GOULD, S.J. und S. SUBRAMANI (1988).

Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology.

Anal Biochem **175**, 5-13.

GOVERDHANA, S., M. PUNTEL, W. XIONG, J. M. ZIRGER, C. BARCIA, J. F. CURTIN, E. B. SOFFER, S. MONDKAR, G. D. KING, J. HU, S. A. SCIASCIA, M. CANDOLFI, D. S. GREENGOLD, P. R. LOWENSTEIN und M. G. CASTRO (2005).

"Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges."

Mol Ther **12**(2): 189-211.

GRABSTEIN, K. H., D. L. URDAL, R. J. TUSHINSKI, D. Y. Mochizuki, V. L. PRICE, M. A. CANTRELL, S. GILLIS und P. J. COLON (1986).

"Induction of macrophage tumoricidal activity by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor."

Science **232**(4749): 506-508.

GREER, L.F., 3<sup>rd</sup> und A.A. SZALAY, A.A. (2002).

Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review.

Luminescence **17**, 43-74.

GRESCH, O., F. B. ENGEL, D. NESIC, T. T. TRAN, H. M. ENGLAND, E. S. HICKMAN, I. KÖRNER, L. GAN, S. CHEN, S. CASRO-OBREGON, R. HAMMERMANN, J. WOLF, H. MÜLLER-HARTMANN, M. NIX, G. SIEBENKOTTEN, G. KRAUS und K. LUN (2004).

"New non-viral method for gene transfer into primary cells."

Methods **33**(2): 151-163.

GROMME, M., F. G. UYTDEHAAG, H. JANSSEN, J. CALAFAT, R. S. VAN BINNENDIJK, M. J. KENTER, A. TULP, D. VERWOERD und J. NEEFJES (1999).

"Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading."

Proc Natl Acad Sci U S A **96**(18): 10326-10331.

- GRUNIG, G., A. HIMMLER und D. ANTCZAK (1994).  
"Cloning and sequencing of horse interferon-gamma cDNA."  
Immunogenetics **39**(6): 448-449.
- HAFNER, M., R. ZAWATZKY und C. HIRTREITER (2001).  
"Antimetastatic effect of CpG DNA mediated by type I IFN."  
Cancer Res **61**(14): 5523-5528.
- HAN, R., Y. M. YANG, J. DIETRICH, A. LUEBKE, M. MAYER-PRÖSCHEL und  
M. NOBLE (2008).  
"Systemic 5-fluorouracil treatment causes a syndrome of delayed myelin destruction in the  
central nervous system."  
J Biol **7**(4): 12.
- HANSEN, R., E. QUEBBEMAN, R. AUSMAN, J. FRICK, P. RITCH, W. SCHULTE,  
C. HAAS, P. BEATTY und T. ANDERSON (1989).  
"Continuous systemic 5-fluorouracil infusion in advanced colorectal cancer: results in 91  
patients."  
J Surg Oncol **40**(3): 177-81
- HASTINGS, J.W. und K.H. NEALSON, (1977).  
Bacterial bioluminescence.  
Annu. Rev. Microbiol. **31**, 549–595.
- HEINZERLING, L. M., K. FEIGE, S. RIEDER, M. K. AKENS, R. DUMMER,  
G. STRANZINGER und 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 **78**(12): 692-702.
- HÜTTINGER, C., J. HIRSCHBERGER, A. JAHNKE, R. KÖSTKIN, T. BRILL, C. PLANK,  
H. KÜCHENHOFF, S. KRIEGER und U. SCHILLINGER (2008).  
"Neoadjuvant gene delivery of feline granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using  
magnetofection for the treatment of feline fibrosarcomas: a phase I trial."  
J Gene Med **10**(6): 655-667.
- INOUE, Y., T. ITOU, T. OIKE und T. SAKAI (1999).  
"Cloning and sequencing of the bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*) interferon-gamma  
gene."  
J Vet Med Sci **61**(8): 939-942.
- International Agency for Research on Cancer (2008)  
"TP53 genetic variations in human cancer"  
IARC Release R 13
- INUMARU, S. und H. TAKAMATSU (1995)  
"cDNA cloning of porcine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor."  
Immunol Cell Biol **73**(5): 474-476.

JACKSON, C., (1936).

“The incidence and pathology of tumours of domesticated animals in South Africa; a study of the Onderstepoort collection of neoplasms with special reference to histopathology.”

Onderstepoort J. Vet. Sci. **6**, 378–385.

JÄGER, D., E. JÄGER und A. KNUTH (2001).

"Immune responses to tumour antigens: implications for antigen specific immunotherapy of cancer."

J Clin Pathol **54**(9): 669-674.

JAHNKE, A., J. HIRSCHBERGER, C. FISCHER, T. BRILL, R. KÖSTLIN, C. PLANK, H. KÜCHENHOFF, S. KRIEGER, K. KAMENICA und U. SCHILLINGER (2007).

"Intra-tumoral gene delivery of feIL-2, feIFN-gamma and feGM-CSF using magnetofection as a neoadjuvant treatment option for feline fibrosarcomas: a phase-I study."

J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med **54**(10): 599-606.

JANEWAY C. A., P. TRAVERS, M. WALPORT u. M. SHLOMCHIK (2007).

Immunobiology - the immune system in health and disease.

7. Aufl. Verlag Garland Science Publishing, New York, USA

JAUREGUIBERRY, G., M. FAVRE und G. ORTH (1983).

"Bovine papillomavirus type 1 genome in hamster sarcoma cells in vivo and in vitro: variation in the level of transcription."

J Gen Virol **64**(Pt 5): 1199-1204.

JOHNSON, F.H. (1962).

Quantum Efficiency of *Cypridina* Luminescence, With a Note on That of *Aequorea*.

J. Cell. Comp. Physiol. **60**, 85–104

JONASCH, E. und F. G. HALUSKA (2001). "

“Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities."

Oncologist **6**(1): 34-55.

KAPLAN, S. S., R. E. BASFORD, E. J. WING und R. K. SHADDUCK (1989).

"The effect of recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor on neutrophil activation in patients with refractory carcinoma."

Blood **73**(3): 636-638.

KAY, M. A., J. C. GLORIOSO und L. NALDIN (2001).

"Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics."

Nat Med **7**(1): 33-40.

KINNUNEN, R. E., T. TALLBERG, H. STENBACK und S. SARNA (1999).

"Equine sarcoid tumour treated by autogenous tumour vaccine."

Anticancer Res **19**(4C): 3367-3374.

- KIRNBAUER, R., F. BOOY, N. CHENG, D. R. LOWRY und J. T. SCHILLER, (1992).  
"Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic."  
Proc Natl Acad Sci U S A **89**(24): 12180-12184.
- KLEIN, G., E. KLEIN und E. KASHUBA (2010).  
"Interaction of Epstein-Barr virus (EBV) with human B-lymphocytes."  
Biochem Biophys Res Commun **396**(1): 67-73.
- KNOTTENBELT, D.C., (2008).  
Proceedings of the 10th International Congress of World Equine Veterinary Association
- KOUTSKY, L. A., K. A. AULT, C. M. WHEELER, D. R. BROWN, E. BARR , F. B. ALVAREZ, L. M. CHIACCHIERINI und K. U. JANSEN (2002).  
"A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine."  
N Engl J Med **347**(21): 1645-1651.
- KRIEG, A. M. (2002).  
"CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects."  
Annu Rev Immunol **20**: 709-760.
- KROTZ, F., H. Y. SOHN, T. GLOE, C. PLANK und U. POHL (2003a).  
"Magnetofection potentiates gene delivery to cultured endothelial cells."  
J Vasc Res **40**(5): 425-434.
- KROTZ, F., C. DE WIT, H.Y. SOHN, S. ZAHLER, T. GLOE, U. POHL und C. PLANK, (2003b).  
"Magnetofection--a highly efficient tool for antisense oligonucleotide delivery in vitro and in vivo."  
Mol Ther **7**(5 Pt 1): 700-710.
- KUMAR, R. K. und R. PENNY (1982).  
"Escape of tumours from immunological destruction."  
Pathology **14**(2): 173-179.
- LAZARY, S., E. MARTI, G. SZALAI, C. GAILLARD und H. GERBER (1994).  
"Studies on the frequency and associations of equine leucocyte antigens in sarcoid and summer dermatitis."  
Anim Genet **25 Suppl 1**: 75-80.
- LEE, H. O. und T. A. FERGUSON (2003).  
"Biology of FasL."  
Cytokine Growth Factor Rev **14**(3-4): 325-335
- LENFELD, J., M. KROUTIL, E. MARSALEK, J. SLAVIK, V. PREININGER und V. SIMANEK (1981).  
"Antiinflammatory Activity of Quaternary Benzophenanthridine Alkaloids from *Chelidonium majus*\*,\*\*."  
Planta Med **43**(10): 161-165.

- LEONG, S. R., G. M. FLAGGS, M. J. LAWMAN und P. W. GRAY (1989).  
"Cloning and expression of the cDNA for bovine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor."  
Vet Immunol Immunopathol **21**(3-4): 261-278.
- LEVITSKAYA, J., M. CORAM, V. LEVITSKY, S. IMREH, P. M. STEIGERWALD-MULLEN, G. KLEIN, M. G. KURILLA und M. G. MASUCCI (1995).  
"Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1."  
Nature **375**(6533): 685-688.
- LINDROOS, B., K.L. AHO, H. KUOKKANEN, S. RÄTY, H. HUHTALA, R. LEMPONEN, O. YLI-HARJA, R. SUURONEN und S. MIETTINEN (2010).  
"Differential gene expression in adipose stem cells cultured in allogenic human serum versus fetal bovine serum."  
Tissue Eng Part A **16** (7): 2281-94
- LOA, C. C., M. K. HSIEH, C. C. WU und T. L. LIN (2001).  
"Molecular identification and characterization of turkey IFN-gamma gene."  
Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **130**(4): 579-584.
- LOEHR, B. I., P. WILLSON, L. A. BABIUK und S. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK (2000).  
"Gene gun-mediated DNA immunization primes development of mucosal immunity against bovine herpesvirus 1 in cattle."  
J Virol **74**(13): 6077-6086.
- LORENZ, H. und W. RICHTER (2006).  
"Osteoarthritis: cellular and molecular changes in degenerating cartilage."  
Prog Histochem Cytochem **40**(3): 135-163.
- MAAS, M., I. VAN RHIJN, M. T. ALLSOPP und V. P. RUTTEN (2010).  
"Lion (*Panthera leo*) and cheetah (*Acinonyx jubatus*) IFN-gamma sequences."  
Immunol et Immunopathol **134**(3-4): 296-298.
- MALISZEWSKI, C. R., M. A. SCHOENBORN, D. P. CERRETTI, J. M. WIGNALL, K. S. PICHA, D. COSMAN, R. J. TUSHINSKI, S. GILLIS und P. E. BAKER (1988).  
"Bovine GM-CSF: molecular cloning and biological activity of the recombinant protein."  
Mol Immunol **25**(9): 843-850.
- MARAIS, H.J., P. NEL, H.J. BERTSCHINGER, J.P. SCHOEMAN und D. ZIMMERMAN (2007).  
Prevalence and body distribution of sarcoids in South African Cape mountain zebra (*Equus zebra zebra*).  
J S Afr Vet Assoc **78**, 145-148.

MARCHETTI, B., G. H. ASHRAFI, E. TSIRIMONAKI, P. M. O'BRIEN und M. S. CAMPO, (2002).

"The bovine papillomavirus oncoprotein E5 retains MHC class I molecules in the Golgi apparatus and prevents their transport to the cell surface."

Oncogene **21**(51): 7808-7816.

MARCHETTI, B., E. A. GAULT, M. S. CORTESE, Z. YUAN, S. A. ELLIS, L. NASIR und M. S. Campo (2009).

"Bovine papillomavirus type 1 oncoprotein E5 inhibits equine MHC class I and interacts with equine MHC I heavy chain."

J Gen Virol **90**(Pt 12): 2865-2870.

MARKOVA, O., M. MUKHTAROV, E. REAL, Y. JACOB und P. BREGESTOVSKI (2008).

"Genetically encoded chloride indicator with improved sensitivity."

J Neurosci Methods **170**(1): 67-76.

MARTENS, A., A. DE MOOR, J. DEMEULEMEESTER und R. DUCATELLE (2000).

"Histopathological characteristics of five clinical types of equine sarcoid."

Res Vet Sci **69**(3): 295-300.

MARTI, E., LAZARY, S., ANTCZAK, D.F. und GERBER, H., (1993).

Report of the first international workshop on equine sarcoid.

Equine Vet J **25**, 397-407.

MASSON, C., V. ESCRIOU, M. BESSODES und D. SCHERMAN (2003) in

"Chapter 5: Lipid reagents for DNA transfer into mammalian cells"

Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells. (Hrsg: S. C. Makrides).

ELSEVIER Sciences. pp.279-287.

MAUEL S (2002):

„Klonierung und Expression von eq.IFN $\gamma$ , eq.GM-CSF und eq.IL-4 und deren Einfluß auf die monozytären Zellen des Pferdes.“

Vet Med Diss, Berlin

MC INNES, C. J. und D. M. HAIG (1991).

"Cloning and expression of a cDNA encoding ovine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor."

Gene **105**(2): 275-279.

MC INNES, C. J., M. LOGAN, J. REDMOND, G. ENTRICAN und G.D. BAIRD (1990).

"The molecular cloning of the ovine gamma-interferon cDNA using the polymerase chain reaction."

Nucleic Acids Res **18**(13): 4012.

MELE, M., V. GERBER, R. STRAUB, C. GAILLARD, L. JALLON, und D. BURGER (2007).

"[Prevalence of hereditary diseases in three-year-old horses of the Freiberger breed]."

Schweiz Arch Tierheilkd **149**(4): 151-159.

METCALF, D. (1986).

"The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors."

Blood **67**(2): 257-267.

MILLER, D. L., S. V. PISLARU und J. F. GREANLEAF, (2002).

"Sonoporation: mechanical DNA delivery by ultrasonic cavitation."

Somat Cell Mol Genet **27**(1-6): 115-134.

MOHAMMED, H.O., REBHUN, W.C., ANTCZAK, D.F., (1992).

Factors associated with the risk of developing sarcoid tumours in horses.

Equine Vet J **24**, 165-168.

MORAR, D., E. TIJHAAR, A. NEGREA, J. HENDRIKS, D. VAN HAARLEM, J.

GODFROID, A.L. MICHEL, und V.P.M.G. RUTTEN (2007).

"Cloning, sequencing and expression of white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) interferon-gamma (IFN-gamma) and the production of rhinoceros IFN-gamma specific antibodies."

Vet Immunol Immunopathol **115**(1-2): 146-154.

MÜLLER, J., K. FEIG, P. WUNDERLIN, A. HÖDL, M. L. MELI, M. SELTENHAMMER, P. GREST, L. NICOLSON, C. SCHELLING und 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**(1): 58-64.

NASH, R. A., F. SCHUENING, F. APPELBAUM, W. P. HAMMOND, T. BOONE, C. F. MORRIS, S. J. SLICHTER und R. STORB (1991).

"Molecular cloning and in vivo evaluation of canine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor."

Blood **78**(4): 930-937.

NASIR, L. und M. S. CAMPO (2008).

"Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids."

Vet Dermatol **19**, 243-254.

NASIR, L. und S. W. REID (1999).

"Bovine papillomaviral gene expression in equine sarcoid tumours."

Virus Res **61**(2): 171-175.

NEWMAN, C. M. und T. BETTINGER (2007).

"Gene therapy progress and prospects: ultrasound for gene transfer."

Gene Ther **14**(6): 465-475.

NIIDOME, T. und L. HUANG (2002).

"Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors."

Gene Ther **9**(24): 1647-52.

- NOGUEIRA, S. A. F., S. M. F. TORRES, E. D. MALONE, S. F. DIAZ, C. JESSEN und S. GILBERT (2006).  
 "Efficacy of imiquimod 5 % cream in the treatment of equine sarcoids: a pilot study."  
European Society of Veterinary Dermatology **17**: 259-265.
- O'BRIEN, P. M., J. S. ROTHEL, H.F. SEOW und P. R. WOOD (1991).  
 "Cloning and sequencing of the cDNA for ovine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)."  
Immunol Cell Biol **69 ( Pt 1)**: 51-55.
- OGAWA, T., Y. TOMITA, M. OKADA und H. SHIRASAWA, (2007).  
 Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7.  
J Gen Virol **88**, 1934-1938.
- OTTEN, N., C. VON TSCHARNER, S. LAZARY, D.F. ANTCZAK und H. GERBER (1993).  
 "DNA of bovine papillomavirus type 1 and 2 in equine sarcoids: PCR detection and direct sequencing."  
Arch Virol **132**(1-2): 121-131.
- OWEN, R. A. und D. W. JAGGER (1987).  
 "Clinical observations on the use of BCG cell wall fraction for treatment of periocular and other equine sarcoids."  
Vet Rec **120**(23): 548-552.
- PASCOE, R.R. und D.C. KNOTTENBELT (1999) in  
 "*Neoplastic conditions*"  
Manual of Equine Dermatology, W.B. Saunders, pp. 241-272.
- PATERSON, S. (1997).  
 "Treatment of superficial ulcerative squamous cell carcinoma in three horses with topical 5-fluorouracil."  
Vet Rec **141**(24): 626-8.
- PERTMER, T. M., M. D. EISENBRAUN, D. MC CABE, S. K. PRAYAGA, D. H. FULLER und J. R HAYNES (1995).  
 "Gene gun-based nucleic acid immunization: elicitation of humoral and cytotoxic T lymphocyte responses following epidermal delivery of nanogram quantities of DNA."  
Vaccine **13**(15): 1427-30.
- PERZ, J. F., G. L. ARMSTRONG, L. A. FARRINGTON, Y. J. HUTIN und B. P. BELL (2006).  
 "The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide."  
J Hepatol **45**(4): 529-538.
- PIGNATELLI, M., H. DURBIN und W. F. BODMER (1990).  
 "Carcinoembryonic antigen functions as an accessory adhesion molecule mediating colon epithelial cell-collagen interactions."  
Proc Natl Acad Sci U S A **87**(4): 1541-1545.

PLANK, C., U. SCHILLINGER, F. SCHERER, C. BERGEMANN, J. S. RÉMY, F. KRÖTZ, M. ANTON, J. LAUSIER und J. ROSENECKER (2003).

"The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery."

Biol Chem **384**(5): 737-747.

POLACK, A., K. HORTNAGEL, A. PAJIC, B. CHRISTOPH, B. BAIER, M. FALK, J. MAUTNER, C. GELTINGER, G. W. BORNKAMM und B. KEMPES (1996).

"c-myc activation renders proliferation of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed cells independent of EBV nuclear antigen 2 and latent membrane protein 1."

Proc Natl Acad Sci U S A **93**(19): 10411-10416.

RADFORD, A. J., A. L. HODGSON, J. S. ROTHEL und P. R. WOOD (1991).

"Cloning and sequencing of the ovine gamma-interferon gene."

Aust Vet J **68**(3): 82-84.

RAGLAND, W. L., G. H. KEOWN und J.R. GORHAM (1966).

"An epizootic of equine sarcoid."

Nature **210**(5043): 1399.

RAGLAND, W. L. und G. R. SPENCER (1969).

"Attempts to relate bovine papilloma virus to the cause of equine sarcoid: equidae inoculated intradermally with bovine papilloma virus."

Am J Vet Res **30**(5): 743-752.

REEDMAN, B. M. und G. KLEIN (1973).

"Cellular localization of an Epstein-Barr virus (EBV)-associated complement-fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines."

Int J Cancer **11**(3): 499-520.

REES Christine A., (2004) in

"*Chapter 11 Disorders of the skin*"

Equine Internal Medicine; Stephen M Reed, Warwick M. Bayly, Debra C Sellon (Hrsg.),

Elsevier Health Sciences, pp. 710 - 712

REICH, Z., J.D. ALTMAN, J. J. BONIFACE, D. S. LYONS, H. KOZONO, G. OGG, C. MORGAN und M. M. DAVIS (1997).

Stability of empty and peptide-loaded class II major histocompatibility complex molecules at neutral and endosomal pH: comparison to class I proteins.

Proc Natl Acad Sci U S A **94**, 2495-2500.

REID, S. W., G. GETTINBY, J. N. FOWLER und P. IKIN (1994).

"Epidemiological observations on sarcoids in a population of donkeys (*Equus asinus*)."

Vet Rec **134**(9): 207-211.

REID, S.W. und H. O. MOHAMMED (1997).

Longitudinal and cross-sectional studies to evaluate the risk of sarcoid associated with castration.

Can J Vet Res **61**, 89-93.

RIBAS, A., L.H. BUTTERFIELD und J.S. ECONOMOU (2000).  
Genetic immunotherapy for cancer.  
Oncologist **5**, 87-98.

RODEN, R. und T. C. WU (2006).  
"How will HPV vaccines affect cervical cancer?"  
Nat Rev Cancer **6**(10): 753-763

ROMANI, N., S. GRUNER, D. BRANG, E. KÄMPGEN, A. LENZ, B.  
TROCKENBACHER, G. KONWALINKA, P. O. FRITSCH, R. M. STEINMAN und G.  
SCHULER (1994).  
"Proliferating dendritic cell progenitors in human blood."  
J Exp Med **180**(1): 83-93.

RUFFINI, P. A., S. S. NEELAPU, L. W. KWAK und A. BIRAGYN (2002).  
"Idiotypic vaccination for B-cell malignancies as a model for therapeutic cancer vaccines:  
from prototype protein to second generation vaccines."  
Haematologica **87**(9): 989-1001.

RUSH, B. R. und M. J. FLAMINIO (2000).  
"Immunomodulation in horses."  
Vet Clin North Am Equine Pract **16**(1): 183-197, viii.

SAVILLE (1990).  
"Multiple Comparison Procedures: The Practical Solution."  
The American Statistician, Vol. 44. No. 2, pp. 174-180

SCHEERLINCK, J. P. (1999).  
"Functional and structural comparison of cytokines in different species."  
Vet Immunol Immunopathol **72**(1-2): 39-44.

SCHERER, F., M. ANTON, U. SCHILLINGER, J. HENKE, C. BERGEMANN, A. KÜGER, B.  
GÄNSBACHER und C. PLANK (2002).  
"Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo."  
Gene Ther **9**(2): 102-109.

SCHILLER, J. T. und P. DAVIES (2004).  
"Delivering on the promise: HPV vaccines and cervical cancer."  
Nat Rev Microbiol **2**(4): 343-347.

SCHWARZ, B., (2005)  
„Klonieren der feline Zytokin-Gene IL-2, GM-CSF und IFN $\gamma$  zum adjuvanten, nonviralen  
gentherapeutischen Einsatz beim Fibrosarkom der Katze“  
Dissertation med. vet.; München, 2005

SELIGER, H.H. und W. MC ELROY, (1960).  
"Spectral emission and quantum yield of firefly bioluminescence."  
Arch Biochem Biophys **88**, 136-141.

- SEOW, H. F., J. S. ROTHEL, L. A. CORNER und P. R. WOOD (1993).  
"Cloning of cervine interferon-gamma cDNA by polymerase chain reaction."  
N Z Vet J **41**(2): 91-95.
- SHAO, M., L. CAO, C. SHEN, M. SATPATHY, B. CHELLADURAI, R. M. BIGSBY, H. NAKSHATRI und D. MATEI (2009).  
"Epithelial-to-mesenchymal transition and ovarian tumor progression induced by tissue transglutaminase."  
Cancer Res **69**(24): 9192-9201.
- SHIMOMURA, O., (1986).  
Isolation and properties of various molecular forms of Aequorin.  
Biochem. J. 234, 271-277
- SHIN I. S., M. J. NAM, S. J. PARK, H. YOUN und H. HAN (2001).  
"Cloning of canine GM-CSF and SCF genes."  
J Vet Sci **2**(3): 159-166.
- SILVESTRE, O., G. BORZACCHIELLO, D. NAVA, G. IOVANE, V. RUSSO, D. VECCHIO, F. D'AUSILIO, E.A. GAULT, M. S. CAMPO und O. PACIELLO (2009).  
"Bovine papillomavirus type 1 DNA and E5 oncoprotein expression in water buffalo fibropapillomas."  
Vet Pathol **46**, 636-641.
- SMITH, K. T., K. R. PATEL und M. S. CAMPO (1984).  
"Papillomavirus research: a growth area."  
Microbiol Sci **1**(1): 5-8.
- SPOORMAKERS T. J., W. R. KLEIN, J. J. JACOBS, T. S. VAN DEN INGH, J. W. KOTEN und W. DEN OTTER (2003).  
"Comparison of the efficacy of local treatment of equine sarcoids with IL-2 or cisplatin/IL-2."  
Cancer Immunol Immunother **52**(3): 179-184.
- STARK, G. R., I. M. KERR, B. R. G. WILLIAMS, R. H. SILVERMAN und R. D. SCHREIBER (1998).  
"How cells respond to interferons."  
Annu Rev Biochem **67**: 227-264.
- STEINBACH, F., S. MAUEL und I. BEIER (2002).  
"Recombinant equine interferons: expression cloning and biological activity."  
Vet Immunol Immunopathol **84**(1-2): 83-95.
- STEVENSON, F. K., D. ZHU, C. KING, L.J. ASHWORTH, S. KUMAR und R.E. HAWKINS (1995).  
"Idiotypic DNA vaccines against B-cell lymphoma."  
Immunol Rev **145**: 211-228.
- STEWART, A. A., B. RUSH und E. DAVIS (2006).  
"The efficacy of intratumoural 5-fluorouracil for the treatment of equine sarcoids."  
Aust Vet J **84**(3): 101-6

- STEWART, R. J., A. MASZTALERZ, J.J. JACOBS und W. DEN OTTER (2005).  
"Local interleukin-2 and interleukin-12 therapy of bovine ocular squamous cell carcinomas."  
Vet Immunol Immunopathol **106**(3-4): 277-284.
- STUDER, U., E. MARTI, D. STORNETTA, S. LAZARY und H. GERBER, (1997).  
"[The therapy of equine sarcoid with a non-specific immunostimulator--the epidemiology and spontaneous regression of sarcoids]."  
Schweiz Arch Tierheilkd **139**(9): 385-391.
- STUDER, S., V. GERBER, R. STRAUB, W. BREHM, C. GAILLARD, A. LÜTH, und D. BURGER, (2007).  
"[Prevalence of hereditary diseases in three-year-old Swiss Warmblood horses]."  
Schweiz Arch Tierheilkd **149**(4): 161-171
- SULLINS, K., S. ROBERTS, J. LAVACH und G. SEVERIN (1986).  
Equine Sarcoid.  
Equine Practice **8**, 21-27.
- SUNDBERG, J. P., T. BURNSTEIN, E. H. PAGE, W. W. KIRKHAM und F. R.ROBINSON (1977).  
"Neoplasms of Equidae."  
J Am Vet Med Assoc **170**(2): 150-152.
- SWEENEY, S. J., C. EMERSON und I. S. ERIKS (2001).  
"Cloning, sequencing, and expression of interferon-gamma from elk in North America."  
J Wildl Dis **37**(1): 164-171.
- TAO, Y., B. ZENG, L. XU, B. YUE, D. YANG und F. ZOU, (2010).  
"Interferon-gamma of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*): complementary DNA cloning, expression, and phylogenetic analysis."  
DNA Cell Biol **29**(1): 41-45.
- TIGHE, H., M. CORR, M. ROMAN und E. RAZ (1998).  
"Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint."  
Immunol Today **19**(2): 89-97.
- THEON, A. P., W. D. WILSON, K. G. MAGDESIAN, N. PUSTERLA, J.R. SNYDER und 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**(10): 1506-1513.
- TONTI, G. A. und F. MANNELLO (2008).  
"From bone marrow to therapeutic applications: different behaviour and genetic/epigenetic stability during mesenchymal stem cell expansion in autologous and foetal bovine sera?"  
Int J Dev Biol **52**(8.): 1023-1032

TRAUTH, B. C., C. KLAS, A. M. PETERS, S. MATZKU, P. MOLLER, W. FALK, K. M. DEBATIN und P.H. KRAMMER (1989).

"Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis."  
Science **245**(4915): 301-305.

TRENFIELD, K., P. B. SPRADBROW und B. VANSELOW (1985).

Sequences of papillomavirus DNA in equine sarcoids.  
Equine Vet J **17**, 449-452.

TZANNES, S., P. IBAROROLA, D. J. BATCHELOR, R. D. BURROW und L. BLACKWOOD, (2008)

"Use of Recombinant Human Interferon Alpha-2a in the Management of a Dog With Epitheliotropic Lymphoma"  
Journal of the American Animal Hospital Association **44**:276-282

United States Department of Agriculture , (2010).

"USDA licenses DNA vaccine for treatment of melanoma in dogs."  
J Am Vet Med Assoc **236**(5): 495.

VANDEPAPELIERE, P., G. K. LAU, G. LEROUX-ROELS, Y. HORSMANS, E. GANE, T. TAWANDEE, M. I. MERICAN, K. M. WIN, C. TREPO, G. COOKSLEY, M. WETTENDORFF und C. FERRARI (2007).

"Therapeutic vaccination of chronic hepatitis B patients with virus suppression by antiviral therapy: a randomized, controlled study of co-administration of HBsAg/AS02 candidate vaccine and lamivudine."  
Vaccine **25**(51): 8585-8597.

VANSELOW, B. A., I. ABETZ und A. R. JACKSON (1988).

"BCG emulsion immunotherapy of equine sarcoid."  
Equine Vet J **20**(6): 444-447.

VARGO-GORGOLA, T. und J. M. ROSEN (2007).

"Modelling breast cancer: one size does not fit all."  
Nat Rev Cancer **7**(9): 659-672.

VECCHIONE, A., B. CATCHPOLE, F. D'MELLO, T. KANELLOS, und A. HAMBLIN, (2002).

"Modulating immune responses with dendritic cells: an attainable goal in veterinary medicine?"  
Vet Immunol Immunopathol **87**(3-4): 215-221.

WADLER, S. und E. L. SCHWARTZ (1990).

"Antineoplastic activity of the combination of interferon and cytotoxic agents against experimental and human malignancies: a review."  
Cancer Res **50**(12): 3473-3486.

WALCZAK, H. und P. H. KRAMMER (2000).

"The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems."  
Exp Cell Res **256**(1): 58-66.

- WATINE, J., M. MIEDOUGE und B. FRIEDBERG (2001).  
"Carcinoembryonic antigen as an independent prognostic factor of recurrence and survival in patients resected for colorectal liver metastases: a systematic review."  
Dis Colon Rectum **44**(12): 1791-1799.
- WATTRANG, E., M. BERG und M. MAGNUSON (2005).  
"Immunostimulatory DNA activates production of type I interferons and interleukin-6 in equine peripheral blood mononuclear cells in vitro."  
Vet Immunol Immunopathol **107**(3-4): 265-279.
- WEINBERG R. A. (2007)  
"The biology of cancer" Seventh Edition  
Garland Science, Taylor & Francis Group; New York USA
- WELLS, D. J. (2010).  
"Electroporation and ultrasound enhanced non-viral gene delivery in vitro and in vivo."  
Cell Biol Toxicol **26**(1): 21-28.
- WHITE, E.H., E. RAPAPORT, H. H. SELIGER und T. A. HOPKINS (1971).  
"The chemi- and bioluminescence of firefly luciferin: an efficient chemical production of electronically excited states."  
Bioorg. Chem. 1, 92–122.
- WILSON, T. und J.W. HASTINGS (1998).  
"Bioluminescence."  
Annu Rev Cell Dev Biol 14, 197-230.
- WING, E. J., D. M. MAGEE, T. L. WHITESIDE, S. S. KAPLAN und R. K. SHADDUCK (1989).  
"Recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor enhances monocyte cytotoxicity and secretion of tumor necrosis factor alpha and interferon in cancer patients."  
Blood **73**(3): 643-646.
- WINSTON, T., M. RINGS und M. WYMAN (1979).  
"Treatment of equine sarcoids."  
J Am Vet Med Assoc **175**(8): 775.
- WOODMAN, C. B., S. I. COLLINS und L. S. YOUNG (2007).  
"The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues."  
Nat Rev Cancer **7**(1): 11-22.
- WU H. L., P. J. CHEN, H. K. LIN, R. S. LEE, H. L. LIN, C. J. LIU, P. J. LEE, J. J. LEE und D. S CHEN (2001).  
"Molecular cloning and expression of woodchuck granulocyte-macrophage colony stimulating factor."  
J Med Virol **65**(3): 567-575

YAMAMOTO A., A. IWATA, K. TUCHIYA, A. KATSUMATA, K. OISHI, T. SAITO, H. TSUJIMOTO, A. HASEGAWA und S. UEDA, (2001).

"Molecular cloning and expression of the cDNA encoding feline granulocyte colony-stimulating factor."

Gene **274**(1-2): 263-269.

YONEHARA, S., A. ISHII und M. YONEHARA, (1989).

"A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor."

J Exp Med **169**(5): 1747-1756.

YOUNG, H. A. und K. J. HARDY (1995).

"Role of interferon-gamma in immune cell regulation."

J Leukoc Biol **58**(4): 373-381.

YUAN, Z., A. W. PHILBEY, E. A. GAULT, M. S. CAMPO und L. NASIR (2007).

"Detection of bovine papillomavirus type 1 genomes and viral gene expression in equine inflammatory skin conditions."

Virus Res **124**, 245-249.

ZHOU, C., G. PENG, X. JIN, J. TANG und Z. CHEN (2010).

"Vaccination with a fusion DNA vaccine encoding hepatitis B surface antigen fused to the extracellular domain of CTLA4 enhances HBV-specific immune responses in mice: Implication of its potential use as a therapeutic vaccine."

Clin Immunol **137**(2):190-8

ZHOU, F. (2009).

"Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation."

Int Rev Immunol **28**(3-4): 239-260.

ZHOU, X. F., B. LIU, X. H. YU, X. ZHA, X. Z. ZHANG, X. Y. WANG, Y. H. JIN, Y. G. WU, C. L. JIANG, Y. CHEN, Y. M. SHAN, J. Q. LIU, W. KONG und J. C. SHEN, (2007).

"Using magnetic force to enhance immune response to DNA vaccine."

Small **3**(10): 1707-1713.

ZIELINSKA, K., K. KOZLOWSKY, M. CICHOREK und M. WACHULSKA, (2008).

"Fas and FasL expression on cells of two transplantable melanoma lines according to their different biological properties."

Folia Histochem Cytobiol **46**(3): 337-343.

ZUCKER, K., P. LU, V. ESQUENAZI und J. MILLER, (1992).

"Cloning of the cDNA for canine interferon-gamma."

J Interferon Res **12**(3): 191-194.

ZUR HAUSEN, H. und E. M. DE VILLIERS, (1994).

"Human papillomaviruses."

Annu Rev Microbiol **48**: 427-447.

ZUR HAUSEN, H. (2001).  
"Oncogenic DNA viruses."  
Oncogene **20**(54): 7820-7823.

ZUR HAUSEN (2002).  
"Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application."  
Nat Rev Cancer **2**(5): 342-350.

## 9 ANHANG

### 9.1 Materialnachweis

#### 9.1.1 Zelllinien

Equine Sarkoidzellen: Primäre Sarkoidzellkultur, Institutszellbank, Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung & Klinik für Pferde der Ludwig-Maximilians-Universität München; B. Wärther

#### 9.1.2 Plasmide

pBluc Fa. Plasmid Factory, Bielefeld, D  
 pBfeIFN- $\gamma$  Fa. Plasmid Factory, Bielefeld, D  
 pBfeGM-CSF Fa. Plasmid Factory, Bielefeld, D

#### 9.1.3 Antikörper

ANTI-eq MHC Class I Fa. AbD Serotec, Düsseldorf, D  
 IgG2a Isotypkontrolle Fa. AbD Serotec, Düsseldorf, D  
 GOAT-ANTI-MOUSE IgG: Dylight<sup>®</sup>488 Fa. AbD Serotec, Düsseldorf, D

#### 9.1.4 ELISAs

feline Interferon- $\gamma$  Duo Set Kit Fa. R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, D  
 feline GM-CSF Duo Set Kit Fa. R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, D

#### 9.1.5 Zellkulturmedien und Zusätze

PBS Dulbecco Fa. Biochrom AG, Berlin, D  
 w/o Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>  
 Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) Fa. Biochrom AG, Berlin, D  
 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>,  
 4,5 g/l D-Glucose,  
 1,028 g/l N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamine  
 PENICILLIN-STREPTOMYCIN Fa. Biochrom AG, Berlin, D  
 10 000 U / ml Penicillin;  
 10 000  $\mu$ g / ml Streptomycin  
 Fetales Kälberserum (FCS): SERA Plus Fa. Biotech GmbH, Aidenbach  
 Dimethyl-Sulphoxide (DMSO) HYBRI-MAX<sup>®</sup> Fa. Sigma-Aldrich, München, D

#### 9.1.6 Verbrauchsmaterialien

Zellkulturflaschen 75 cm<sup>2</sup> Fa. Techno Plastic Products, Trasadingen, CH  
 Zellkulturflaschen 25 cm<sup>2</sup> Fa. Techno Plastic Products, Trasadingen, CH  
 Zellkulturtestplatte Fa. Techno Plastic Products, Trasadingen, CH  
 (96F; 96U)  
 Zellkulturschale Ø 60 x 15 mm Fa. Techno Plastic Products, Trasadingen, CH  
 Zentrifugenröhrchen Fa. Techno Plastic Products

(50 ml; 15 ml)	Trasadingen, CH
Falcon <sup>®</sup> Serologische Pipette	Fa. Becton Dickinson,
(2 ml; 5 ml; 10 ml; 25 ml; 50 ml)	Heidelberg, D
Mikrozentrifugenröhrchen	Fa. Eppendorf, Hamburg, D
(1,5 ml; 2ml)	
Pipettenspitzen	Fa. Eppendorf, Hamburg, D
Cryovial <sup>®</sup> Kryoröhrchen:	Fa. Simport, Beloeil, CAN
Einsätze für Kryoröhrchen	Fa. Simport, Beloeil, CAN
(gelb; weiß)	
nunc <sup>™</sup> cryo Tube <sup>™</sup> vials (1,8ml) Einfrierröhrchen	Fa. Thermo Fisher Scientific.
	Roskilde Site, DEN
nunc <sup>™</sup> -immuno plate	Fa. Thermo Fisher Scientific,
	Roskilde Site, DEN
Parafilm "M"	Fa. Pechiney Plastic Packaging,
	Chicago, USA

### 9.1.7 Reagenzien

Albumin aus bovinem Serum (min. 96 %)	Fa. Sigma-Aldrich, München, D
BioRad Protein Assay	Fa. BioRad Laboratories,
	München, D
Bovines Serum Albumin (BSA)	Fa. Biochrom AG, Berlin
Adenosine-5-triphosphate (ATP)	Fa. Böhringer, Mannheim
DreamfectGold <sup>®</sup> Transfektionsreagent	Fa. Oz Biosciences, Marseille, F
Lipofectamine <sup>™</sup> 2000 Transfektionsreagent	Fa. Invitrogen, Karlsruhe, D
DMRIE <sup>™</sup> Transfektionsreagent	Fa. Invitrogen, Karlsruhe, D
PEI Transfektionsreagent	Institut f. Experimentelle
	Onkologie und Therapieforschung,
	TU München, D
CombiMAG <sup>®</sup> Transfektionsreagent	Fa. Oz Biosciences, Marseille, F
D(-) Luciferin	Fa. Roche, Mannheim, D
Luciferase	Fa. Roche, Mannheim, D
DTT (Dithiothreitol)	Fa. Sigma-Aldrich, München, D
Glycyl-Glycin	Fa. Sigma-Aldrich, München, D
Magnesiumsulphate (MgSO <sub>4</sub> )	Fa. Sigma-Aldrich, München, D
Propidium Iodide (PI)	Fa. Sigma-Aldrich, München, D
Trypan-Blue Solution (0,4 %)	Fa. Sigma-Aldrich, München, D
Trypsin-EDTA Solution:	Fa. Biochrom AG, Berlin, D
0,25 % Trypsin,	
0,02 % EDTA in PBS	
Triton <sup>™</sup> X-100	Fa. Dow, Schwalbach, D
Tris	Fa. Sigma-Aldrich, München, D
TWEEN <sup>®</sup> 20	Fa. Sigma-Aldrich, München, D

### 9.1.8 Puffer

FACS Puffer:
1 % FCS in PBS
Lyse-Puffer (pH 7,8)
0,1 % Triton
250 mM Tris
in dH <sub>2</sub> O

Luciferin-Puffer

920 mg DTT  
 1 ml 1M MgSO<sub>4</sub>  
 2 ml 50 mM ATP  
 233 µM D (-) Luciferin  
 ad 100 ml 250 mM Glycyl-Glycin

Waschpuffer

0,05 % Tween 20  
 in PBS

TBS (Tris-buffered saline)

20 mM Trizma base  
 150 mM NaCl

**9.1.9 Geräte**

Neodymium-Eisen-Bor-Magnetplatte

Fa. Chemicell, Berlin, D

Hera cell 150 Brutschrank

Fa. Heraeus, Hanau, D

Hera safe, Sicherheitswerkbank

Fa. Heraeus, Hanau, D

Megafuge 2.0R, Zentrifuge

Fa. Heraeus, Hanau, D

Hera freeze, Gefrierschrank

Fa. Heraeus, Hanau, D

Qualifreeze Cryo-Einfriergerät

Fa. Nunc International, Hamburg, D

ImmunoWash Model 1575

Fa. Bio-Rad Laboratories  
 München, D

Pipetman®

Fa. Gilson International B.V.,  
 Limburg-Offheim, D

(P20, P200, P1000)

Accu-jet® Pipettierhelfer

Fa. Brand Wertheim, D

Transferpette®-12

Fa. Brand Wertheim, D

IKA® MS2 *Minishaker*

Fa. IKA® Werke, Staufen, D

inoLab, pH-Sonde

Fa. Wissenschaftlich-Technische  
 Werkstätten, Weilheim, D

IKA® RET Magnetrührer

Fa. IKA® Werke, Staufen, D

Neubauer-Zählkammer

Fa. Roth, Karlsruhe, D

Microplate Scintillation and Luminiscence Counter

Fa. Canberra Packard GmbH,  
 Dreiech, D

(TopCount)

Victor<sup>2</sup>™ 1420 Multilabel Counter

Fa. Perkin Elmer, Fremont, USA

costar® Assay Plate, 96 well, black

Fa. Corning Incorporated,  
 Corning, USA

Axiovert 25

Fa. Zeiss, Jena, D

Axiovert 135

Fa. Zeiss, Jena, D

(Fotodokumentation in der Zellkultur mittels Nikon Cool Pix 990 Digitalkamera, welche an das Mikroskop Axiovert 135 angeschlossen ist)

FACS Canto II

Fa. Becton-Dickinson, San Jose,  
 USA

**9.1.10 Software**

Axio Vision 4.5.5

Fa. Zeiss, Jena, D

FlowJo® Version 8.8.6 für Macintosh

Fa. Tree Star Inc, Ashland, USA

Außerdem wurden Geräte der Standardlaborausstattung verwendet.

## 9.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 9.2.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung/Titel	Seite
<b>Abb. 4.1</b> Altersverteilung der Patienten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an	38
<b>Abb. 4.2</b> Schnittpräparat der Umfangsvermehrung von Pferd #4, Hämatoxylin-Eosin Färbung; a) Vergrößerung 4x b) Vergrößerung 40x	39
<b>Abb. 4.3</b> Darstellung des Transfektionserfolges bei Verwendung von vier verschiedenen Transfektionsregenten. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Die Angabe der eingesetzten Menge an Luciferase-DNA ist aus Gründen der Übersichtlichkeit auf zwei Dezimalstellen gerundet.	40
<b>Abb. 4.4</b> Transfektion mit dem Transfektionsreagenz <i>Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000</i> bei primären Zellen die in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) mit Zusatz von fetalem Kälberserum (FKS) kultiviert wurden. Logarithmische Darstellung der <u>relativen Unterschiede in der Luciferase-Menge</u> . Die Fehlerbalken zeigen das 95 %-Konfidenzintervall des Mittelwertes. Die Angabe der eingesetzten Menge an Luciferase-DNA ist aus Gründen der Übersichtlichkeit auf zwei Dezimalstellen gerundet. **p < 0,01	42
<b>Abb. 4.5</b> Transfektion mit dem Transfektionsreagenz <i>DreamfectGold<sup>®</sup></i> bei primären Zellen die in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) mit Zusatz von fetalem Kälberserum (FKS) kultiviert wurden. Die Fehlerbalken zeigen das 95 %-Konfidenzintervall des Mittelwertes. Logarithmische Darstellung zur Abbildung der <u>relativen Unterschiede in der Luciferase-Menge</u> . Die Angabe der eingesetzten Menge an Luciferase-DNA ist aus Gründen der Übersichtlichkeit auf zwei Dezimalstellen gerundet. **p < 0,01; ***p < 0,001	43
<b>Abb. 4.6</b> Direkter Vergleich der Anstiege in der gebildeten Luciferase-Menge pro Dosisstufe bei Einsatz der Magnetofektion. Die Angabe der eingesetzten Menge an Luciferase-DNA ist aus Gründen der Übersichtlichkeit auf zwei Dezimalstellen gerundet.	44
<b>Abb. 4.7</b> Transfektion mit dem Transfektionsreagenz <i>Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000</i> bei primären Zellen, die in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) mit Zusatz von autologem Pferdeserum (DMEM+Pfd) kultiviert wurden. Die Fehlerbalken zeigen das 95 %-Konfidenzintervall des Mittelwertes. Logarithmische Darstellung zur Abbildung der relativen Unterschiede in der Luciferase-Menge. Die Angabe der eingesetzten Menge an Luciferase-DNA ist aus Gründen der Übersichtlichkeit auf zwei Dezimalstellen gerundet.	46
<b>Abb. 4.8</b> Transfektion mit dem Transfektionsreagenz <i>DreamfectGold<sup>®</sup></i> bei primären Zellen die in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) mit Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS) kultiviert wurden. Die Fehlerbalken zeigen das 95 %-Konfidenzintervall des Mittelwertes. Logarithmische Darstellung zur Abbildung der relativen Unterschiede in der Luciferase-Menge. Die Angabe der eingesetzten Menge an Luciferase-DNA ist aus Gründen der Übersichtlichkeit auf zwei Dezimalstellen gerundet.	47
<b>Abb. 4.9</b> Direkter Vergleich der Anstiege in der gebildeten Luciferase-Menge pro Dosisstufe bei Einsatz der Magnetofektion. Die Angabe der eingesetzten Menge an Luciferase-DNA ist aus Gründen der Übersichtlichkeit auf zwei Dezimalstellen gerundet.	48

<b>Abb. 4.10</b>	Auswirkung der Transfektion (TF) mit pBfeIFN $\gamma$ und pBluc auf die MHC-I-Expression bei Zelllinien aus Equinen Sarkoiden. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (ssm) an. Die rote Linie gibt das Niveau der MHC-I-Expression nicht-transfizierter Zellen (Nativ: 34,88 %) an.	49
<b>Abb. 4.11</b>	Auswirkung der Transfektion (TF) mit pBfeGM-CSF und pBluc auf die MHC-I-Expression bei Zelllinien aus Equinen Sarkoiden. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (ssm) an. Die rote Linie gibt das Niveau der MHC-I-Expression nicht-transfizierter Zellen (Nativ: 34,88 %) an.	50
<b>Abb. 4.12</b>	Auswirkung der kombinierten Transfektion (TF) mit pBfeIFN $\gamma$ /pBfeGM-CSF und der Transfektion mit pBluc auf die MHC-I-Expression bei Zelllinien aus Equinen Sarkoiden. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (ssm) an. Die rote Linie gibt das Niveau der MHC-I-Expression nicht-transfizierter Zellen (Nativ: 34,88 %) an.	51
<b>Abb. 4.13</b>	<u>Felines Interferon <math>\gamma</math></u> im Überstand kultivierter equiner Sarkoidzellen nach Transfektion (TF) mit pBfeIFN $\gamma$ . Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (ssm) an. Die Rote Linie gibt das Ergebniss des ELISAs bei nicht transfizierten Zellen (Nativ) an.	52
<b>Abb. 4.14</b>	<u>Felines GM-CSF</u> im Überstand kultivierter equiner Sarkoidzellen nach Transfektion (TF) mit pBfeGM-CSF. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (ssm) an. Die Rote Linie gibt das Ergebniss des ELISAs bei nicht transfizierten Zellen (Nativ) an.	53
<b>Abb. 4.15</b>	<u>Felines Interferon <math>\gamma</math> und felines GM-CSF</u> im Überstand kultivierter Equiner Sarkoidzellen nach Transfektion (TF) mit pBfeIFN $\gamma$ und pBfeGM-CSF. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (ssm) an.	54

## 9.2.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle/Titel	Seite
<b>Tab. 3.1:</b> Übersicht über die Konzentrationen der einzelnen Bestandteile der Transfektionslösung.	31
<b>Tab. 4.1:</b> Klinische Formen des gewonnenen Tumormaterials.	39
<b>Tab. 4.2:</b> Ergebnisse der Untersuchung auf das Onkoprotein BPV E5.	40
<b>Tab. 4.3:</b> Einfluss der Magnetofektion auf die gebildete Luciferase-Menge. Darstellung der durchschnittlichen Steigerung gemittelt über alle Dosisstufen.	41
<b>Tab. 4.4:</b> Darstellung der Signifikanzwerte für die jeweiligen Dosisstufen. Adjustierung der p-Werte innerhalb des Mediums DMEM+FKS.	44
<b>Tab. 4.5:</b> Einfluss der Magnetofektion auf die gebildete Luciferase. Darstellung der durchschnittlichen Steigerung gemittelt über alle Dosisstufen.	45
<b>Tab. 4.6:</b> Darstellung der Signifikanzwerte für die jeweiligen Dosisstufen. Adjustierung der p-Werte innerhalb des Mediums DMEM+Pfd.	48
<b>Tab. 4.7:</b> Korrelationskoeffizienten bei Transfektion mit pBfeIFN $\gamma$ .	55
<b>Tab. 4.8:</b> Korrelationskoeffizienten bei Transfektion mit pBfeGM-CSF.	55
<b>Tab. 4.9:</b> Korrelationskoeffizienten bei Transfektion mit pBIFN $\gamma$ und pBfeGM-CSF.	55

### 9.3 Zelllinien aus Equinen Sarkoiden

<b>Zelllinie</b> (Name d. Pferdes)	<b>Rasse</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Lokalisationd. Tumor(e)</b>	<b>Typ/ Bemerkungen</b>	<b>Diagnose</b>
<b>Eq_1</b> (Picasso)	Warmblut	12	Wallach	Präputium	Fibroblastisch/ gestielt	Equines Sarkoid
<b>Eq_2</b> (Strolch)	Süddeutsches Kaltblut	4	Wallach	Präputium/ Innenschenkel	Fibroblastisch	Equines Sarkoid
<b>Eq_3</b> (Rocky)	Süddeutsches Kaltblut	7	Wallach	Vorderbrust	Verrukös	Equines Sarkoid
<b>Eq_4</b> (Latina)	Warmblut	20	Stute	Innenschenkel	Gemischt (nodulär + fibroblastisch)	Equines Sarkoid
<b>Eq_5</b> (Dann-Laurie)	Warmblut	7	Wallach	Gurtlage	Fibroblastisch	Equines Sarkoid
<b>Eq_6</b> (Galina)	Warmblut	14	Stute	Innenschenkel	Nodulär	Equines Sarkoid
<b>Eq_7</b> (Astor)	Haflinger	11	Wallach	Oberlid	Nodulär	Schwannom
<b>Eq_8</b> (Doro Billy)	Quarter Horse	4	Hengst	Linea alba	Fibroblastisch	Equines Sarkoid
<b>Eq_9</b> (Konfetti)	Warmblut	9	Wallach	Linea alba	Fibroblastisch	Equines Sarkoid
<b>Eq_10</b> (Calimero)	Warmblut	10	Wallach	Linea alba	Fibroblastisch	Equines Sarkoid
<b>Eq_11</b> (Patton)	Warmblut	6	Wallach	Linea alba	Fibroblastisch	Equines Sarkoid
<b>Eq_12</b> (Lancelot)	Warmblut	9	Wallach	Präputium	Fibroblastisch / gestielt oberflächlich ulzeriert	Equines Sarkoid

## 9.4 Multiple Testproblematik

(mit freundlicher Unterstützung von Dr. rer. nat. Dipl.-Stat. T. Schuster, Institut für medizinische Statistik und Epidemiologie, Klinikum rechts der Isar der TU München)

Wird ein statistischer Test durchgeführt, erhält man einen sogenannten p-Wert, welcher mit dem vorher festgesetzten Signifikanzniveau (in der Regel 5%) verglichen wird.

Ist der p-Wert kleiner als das festgesetzte Signifikanzniveau von 5%, bedeutet dies, dass mit max. 5% Wahrscheinlichkeit der festgestellte Unterschied<sup>1</sup> nur zufällig aufgetreten ist, d.h. also, dass in der Grundgesamtheit gar kein Unterschied vorliegt, obwohl die Stichprobe einen solchen plausibel macht (ungünstige zufällige Auswahl der Stichprobe).

Werden nun mehrere Tests bezüglich einer oder mehrerer Fragestellungen an einem Kollektiv (Stichprobe) durchgeführt, so steigt die Wahrscheinlichkeit *zufällig signifikante* Ergebnisse zu erhalten – also Ergebnisse, die eine Abweichung von der Nullhypothese deklarieren – obwohl keine vorhanden ist.

Formal gilt für multiple Tests folgende Beziehung:

Die Wahrscheinlichkeit, dass von k Tests mindestens ein Testergebnis *zufällig signifikant* ist, beträgt:

$$1 - (1 - \alpha)^k$$

Wobei  $\alpha$  dem Signifikanzniveau entspricht, also  $\alpha = 0.05$  (5%)

Beispiel: Werden  $k=3$  Tests bzgl. einer Fragestellung durchgeführt so folgt daraus:

$$1 - 0.95^3 = 0.1426 = 14.26 \%$$

D.h. mit 14,26%iger Wahrscheinlichkeit erhält man mindestens ein Ergebnis, das zufällig bedingt ist, welches also nur auf die zufällig ungünstige Ziehung der Stichprobe zurückzuführen ist.

Um diese Misere zu umgehen, kann z.B. eine sogenannte **Bonferroni\*-Adjustierung** des Signifikanzniveaus vorgenommen werden:

Dazu wird das Signifikanzniveau von  $\alpha = 0.05$  auf  $\alpha^* = 0.05 / k$  adjustiert. Somit wird der *Fehler erster Art* – mit maximal 5% auch für alle k Tests eingehalten.

Demnach betrachten wir nur noch die Merkmalsunterschiede als signifikant, für die der Test einen p-Wert von kleiner als  $0.05 / 3 = 0.01667$  aufweist.

Zur Kontrolle: Die Wahrscheinlichkeit bei  $k=3$  Tests zum Niveau  $\alpha^*$  mindestens ein falsche Signifikanzaussage zu erhalten, beträgt nun  $1 - (1 - 0.016667)^3 = 0.04917$  und damit weniger als 5%.

---

<sup>1</sup> ein beliebiger Unterschied zur Nullhypothese

Bei einer sehr großen Anzahl von Tests wird das adjustierte Niveau sehr klein, so dass zwar der Fehler 1. Art von max. 5% eingehalten wird, dadurch aber auch die Entdeckungswahrscheinlichkeit (Power) von tatsächlich zugrundeliegenden Zusammenhängen/Unterschieden sehr gering wird.

Bonferroni, C. E. (1936) Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilit `a. Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze 8, 3--62.

---

## **Publikationsverzeichnis**

Auszüge dieser Arbeit wurden auf der 21. Arbeitstagung der DVG-Fachgruppe Pferdekrankheiten vom 11.-13. März 2010 vorgetragen:

- Barbara Wärther et al., Hannover: “Therapie Equiner Sarkoide durch non-viralen Gentransfer von Tumorzellen mittels Magnetofektion.”

---

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. Heidrun Gehlen sowohl für die Überlassung des interessanten und aktuellen Themas als auch für die ausgezeichnete Betreuung während des praktischen Versuchsteils und der Zeit der schriftlichen Verfassung dieser Arbeit. Ganz besonders möchte ich mich für die stets zügigen und kritischen Korrekturvorschläge der Arbeit bedanken!

Herrn Prof. Dr. Hartmut Gerhards danke ich für die Möglichkeit, ausreichend Tumormaterial von Pferden, die in der Pferdeklinik der tierärztlichen Fakultät der LMU München behandelt wurden, gewinnen zu können.

Den Assistenten und Famulanten der Pferdeklinik danke ich für die Hilfe bei Blutentnahmen der einzelnen Pferde und für den reibungslosen Ablauf im OP. Mein besonderer Dank gilt hier Dr. Anna May, die darüber hinaus als meine Betreuerin die Organisation des Arbeitsplatzes übernommen hat und immer für Fragen sowohl zur praktischen Durchführung als auch der Auswertung der Daten zur Verfügung stand.

Ohne die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für experimentelle Onkologie im Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München und die Überlassung der Materialien für die Zellkultur, wäre der praktische Teil dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Deshalb möchte ich besonders Dr. Christian Plank für die Integration in seine Arbeitsgruppe danken. Dr. Ulrike Schillinger danke ich besonders für geduldige und ausführliche Einweisung in die Zellkultur und konstruktive Kritik an den Versuchen.

Ein herzlicher Dank gilt der gesamten AG Plank: Veronika Benda und Mehrije Ferizi für die Einarbeitung bei der Versorgung der Zellen und Christian Koch für Hilfe beim Mischen diverser Puffer und Reaktionslösungen.

Edelburga Hammerschmitt danke ich für die Hilfe bei zeitintensiven Messungen zu frühmorgendlichen Stunden am FACS-Gerät und viele positive Anregungen zu Antikörpern und Farbstoffen!

Herrn Dr. Tibor Schuster danke ich für die zuverlässige und professionelle Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse, ohne die die Menge an Rohdaten schwer zu bewältigen gewesen wäre.

Der Tierpathologie Dr. v. Bomhard danke ich für die pathologisch-histologische Untersuchung der gewonnenen Tumorproben und die Anfertigung des qualitativ hochwertigen Bildmaterials zu den Ergebnissen.

Besonderen Dank haben meine Eltern und meine Schwester verdient. Sie haben mich als anstrengende Promotionsstudentin nicht nur ertragen, sondern auch in jeder erdenklichen Weise unterstützt.

---

## **Selbstverständlichkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Karlsruhe, den 10. Oktober 2013

Barbara Wärther