

# Wissenschaftliche Reihe der Klinik für Pferde

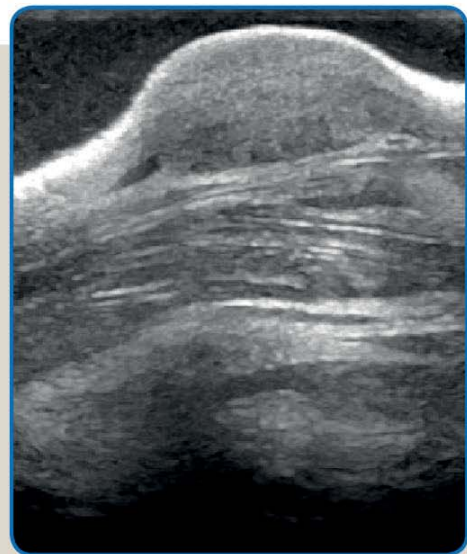
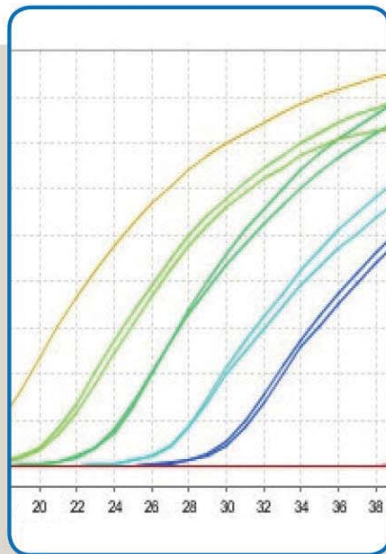
Herausgegeben von  
Karsten Feige, Peter Stadler,  
Harald Sieme, Bernhard Ohnesorge



Patrick Steinig

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

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



STIFTUNG TIERÄRZTLICHE HOCHSCHULE HANNOVER

27



Patrick Steinig

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

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



**Cuvillier Verlag Göttingen**  
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



## **Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

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

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2017

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

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2017

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

[www.cuvillier.de](http://www.cuvillier.de)

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

1. Auflage, 2017

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier aus nachhaltiger Forstwirtschaft.

ISBN 978-3-7369-9547-5

eISBN 978-3-7369-8547-6



# **Tierärztliche Hochschule Hannover**

Langzeiteffekte der Behandlung equiner Melanome und  
Charakterisierung des Zytokinexpressionsprofils gesunder Pferde

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

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

vorgelegt von  
**Patrick Steinig**  
Essen

Hannover 2017



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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Mai 2017



Für meine Eltern  
als Dank für ihre bedingungslose Unterstützung





**Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits veröffentlicht:**

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

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

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

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





## Inhaltsverzeichnis

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



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



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



## Abkürzungsverzeichnis

### Einheiten

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

### Fellfarben

|   |          |
|---|----------|
| B | Brauner  |
| F | Fuchs    |
| R | Rappe    |
| S | Schimmel |

### Sonstige Abkürzungen

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



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



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



## 1 Einleitung

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

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

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



## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Equine Melanome

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

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

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

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



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

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

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

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