

1 EINLEITUNG	4
2 LITERATUR.....	5
2.1 Das Equine Sarkoid	5
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
2.2 Papillomaviren	10
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
2.3 Methoden des Gentransfers	13
2.3.1 Transduktion.....	13
2.3.2 Transfektion	14
2.3.3 Magnetofektion	15
2.4 Das Luciferase-Assay	16
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
2.5 Immunologische Grundlagen	18
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- γ	19
2.6 Tumorummunologie	20
2.6.1 Tumorantigene	20
2.6.1.1 Tumorassoziierte Antigene (TAAs).....	21

2.6.1.2 Tumorspezifische Antigene (TSAs)	22
2.6.2 Tumor escape-Mechanismen	23
2.7 Gentherapie in der Veterinär-onkologie	25
2.8 Zusammenfassung der Literaturrecherche	26
3 MATERIAL UND METHODEN	28
3.1 Pferde und Tumormaterial	28
3.2 Methoden	28
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 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-Immunosorbant-Assay)	36
3.3 Hypothesen	37
3.3.1 Arbeitshypothese der vorliegenden Arbeit	37
3.3.2 Nullhypothese der vorliegenden Arbeit	37
3.4 Statistische Analyse und Darstellung der Ergebnisse	37
4 ERGEBNISSE	38
4.1 Pferde und Tumormaterial	38
4.2 Tumormaterial und pathologisch-histologische Untersuchung	39

4.2.1 Untersuchung auf Bovine Papillomaviren.....	39
4.3 Ergebnisse des nicht-viralen Gentransfers mittels Magnetofektion	40
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
4.4 Stimulation von Zelllinien Equiner Sarkoide mit feline Zytokin-Genen	49
4.4.1 Stimulation equiner Sarkoidzellen mit pBfeIFN- γ	49
4.4.2 Stimulation Equiner Sarkoidzellen mit pBfeGM-CSF	50
4.4.3 Stimulation Equiner Sarkoidzellen mit pBfeIFN- γ und pBfeGM-CSF	51
4.4.4 Ergebnisse der ELISAs	52
4.4.4.1 Transfektion mit pBfeIFN- γ	52
4.4.4.2 Transfektion mit pBfeGM-CSF	53
4.4.4.3 Transfektion mit pBfeIFN- γ und pBfeGM-CSF	54
4.4.5 Korrelation zwischen MHC-I-Expression und Zytokinen im Überstand	55
5 DISKUSSION	56
5.1 Diskussion der Methode	56
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
5.2 Diskussion der Ergebnisse	60
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 Zytokine	63
5.3 Beantwortung der Fragen aus der Einleitung.....	65
5.4 Schlussfolgerungen.....	66
5.5 Weiterführende Untersuchungen	66
6 ZUSAMMENFASSUNG	67
7 SUMMARY.....	69

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