

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	9
2	Literaturübersicht.....	10
2.1	Melanome	10
2.1.1	Pathogenese	10
2.1.2	Klinisches Erscheinungsbild.....	10
2.2	Immunologie.....	12
2.3	Tumorimmunologie.....	13
2.3.1	Tumorantigene	13
2.3.2	Antitumorimmunität	13
2.3.3	Immun-„escape“-Mechanismen.....	14
2.4	Zytokine.....	14
2.4.1	Interleukin-12	15
2.4.2	Interferon- γ	16
2.5	„Biological response modifiers“	16
2.6	Interleukin-12 in der Tumorimmunotherapie.....	17
2.6.1	Interleukin-12 und seine Antitumorwirkungen	17
2.6.2	Interleukin-12-Plasmid-DNA in der Tumorgentherapie.....	18
2.7	Plasmid-DNA.....	19
2.7.1	Natürliche Plasmide	19
2.7.2	Plasmid-DNA-Vektoren	20
2.7.3	„Internal Ribosome Entry Site“	21
2.8	Pharmakokinetik und Genexpression nackter Plasmid-DNA.....	22
2.8.1	Übersicht.....	22
2.8.1.1	Anatomische und physiologische Eigenschaften des Körpers.....	22
2.8.1.2	Chemische und biologische Eigenschaften von Plasmid-DNA	23
2.8.2	Transfektion der Zelle mit Plasmid-DNA	24
2.8.2.1	Übersicht.....	24
2.8.2.2	Transfektion	24
2.8.3	Elimination von Plasmid-DNA	26
2.8.4	Elimination und Expression von Plasmid-DNA nach i.v. Injektion	27
2.8.5	Elimination und Expression von Plasmid-DNA in Tumoren.....	28
2.8.5.1	Übersicht.....	28
2.8.5.2	Anatomische und physiologische Eigenschaften von Tumoren	29
2.8.5.3	Elimination von Plasmid-DNA in Tumoren	30
2.8.5.4	Expression von Plasmid-DNA in Tumoren	31
3	Material und Methode.....	33
3.1	Pferde.....	33
3.2	Klinische Allgemeinuntersuchung.....	33
3.3	Hämatologische und blutbiochemische Untersuchung.....	33
3.4	Auswahl und Lokalisation der Tumoren	34
3.5	Plasmid-DNA kodierend für equines Interleukin-12.....	34
3.6	Injektion der Plasmid-DNA und die Entnahme der Proben.....	35
3.6.1	Intratumorale Injektion der Plasmid-DNA	35
3.6.2	Zeitpunkte der Probenentnahmen.....	36

3.6.3	Entnahme der Blutproben und der Tumormikrobiopsien.....	36
3.7	Molekularbiologische Untersuchungen.....	37
3.7.1	Isolation und Transkription	37
3.7.1.1	Isolation der DNA aus den Blutproben.....	37
3.7.1.2	Isolation der mRNA aus den Tumormikrobiopsien.....	38
3.7.1.3	Reverse Transkription der mRNA in cDNA	39
3.7.1.4	Isolation der DNA aus den Tumormikrobiopsien.....	39
3.7.2	Durchführung der Real-Time PCR	40
3.7.2.1	Absolute Quantifikation der IRESp40-DNA und der p40-DNA im Blut und im Tumorgewebe	41
3.7.2.2	Relative Quantifikation der cDNA kodierend für IRESp40-mRNA und IFN- γ -mRNA im Tumorgewebe	42
3.8	Statistik.....	43
4	Ergebnisse	44
4.1	Tumoren.....	44
4.2	Klinische, hämatologische und blutbiochemische Untersuchung	44
4.3	Eliminationskinetik von IL-12-Plasmid-DNA im Blut	44
4.3.1	Quantitativer Nachweis von IRESp40-DNA im Blut.....	44
4.3.2	Quantitativer Nachweis von p40-DNA im Blut.....	47
4.4	Expressionskinetik von IRESp40-mRNA und IFN- γ -mRNA im Tumor.....	48
4.4.1	Nachweis von IRESp40-mRNA im Tumorgewebe	48
4.4.2	Nachweis von IFN- γ -mRNA im Tumorgewebe	50
4.5	Eliminationskinetik von IL-12-Plasmid-DNA im Tumor	51
4.5.1	Quantitativer Nachweis von IRESp40-DNA im Tumorgewebe.....	51
4.5.2	Quantitativer Nachweis von p40-DNA im Tumorgewebe	52
5	Diskussion.....	54
5.1	Allgemein	54
5.2	Klinischer Verlauf des Allgemeinzustandes.....	54
5.3	Eliminationskinetik der IL-12-Plasmid-DNA im Blut.....	54
5.4	Expressionskinetik der IL-12-Plasmid-DNA im Tumorgewebe	56
5.5	Expressionskinetik der IFN- γ -mRNA im Tumorgewebe.....	60
5.6	Eliminationskinetik der IL-12-Plasmid-DNA im Tumor.....	61
5.7	Schlussfolgerungen.....	61
6	Zusammenfassung	63
7	Summary	65
8	Literaturverzeichnis	67
9	Anhang.....	84
9.1	Namen und Bezugsquellen der verwendeten Primer und Sonden sowie der Kits und des Mastermix.....	84
9.1.1	Primer und Sonden	84
9.1.1.1	Primer und Sonde zum Nachweis von IRESp40-DNA und IRESp40-cDNA.....	84
9.1.1.2	Primer und Sonde zum Nachweis von p40-DNA	84
9.1.1.3	Primer und Sonde zum Nachweis von Interferon- γ -cDNA.....	84
9.1.1.4	Primer und Sonde zum Nachweis von GAPDH-cDNA	84
9.1.2	Kits	85

9.1.3	Mastermix.....	85
9.2	Ergebnisse der Real-Time PCR	85
9.2.1	Konzentration von IRESp40-DNA im Blut	85
9.2.2	Konzentration von p40-DNA im Blut.....	86
9.2.3	Expressionswerte von IRESp40-mRNA im Tumorgewebe	86
9.2.4	Expressionswerte von IFN- γ -mRNA im Tumorgewebe	87
9.2.5	Konzentration von IRESp40-DNA im Tumorgewebe.....	87
9.2.6	Konzentration von p40-DNA im Tumorgewebe	88