



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