



## 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- $\gamma$ .....	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- $\gamma$ -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- $\gamma$ -mRNA im Tumor.....	48
4.4.1	Nachweis von IRESp40-mRNA im Tumorgewebe .....	48
4.4.2	Nachweis von IFN- $\gamma$ -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- $\gamma$ -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- $\gamma$ -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- $\gamma$ -mRNA im Tumorgewebe .....	87
9.2.5	Konzentration von IRESp40-DNA im Tumorgewebe.....	87
9.2.6	Konzentration von p40-DNA im Tumorgewebe .....	88