

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	9
1.1	Das Neuroblastom	9
1.2	Die Rolle von ALK, NMYC und VEGF-A im Neuroblastom	13
1.2.1	Die Rolle von ALK im Neuroblastom	13
1.2.2	Die Rolle von NMYC im Neuroblastom	14
1.2.3	Die Rolle von VEGF-A im Neuroblastom	15
1.3	siRNA in der Therapie von Tumoren	17
1.4	Liposomen als Transportsystem für siRNA	20
1.5	GD ₂ und IGF1R als Zielstrukturen für Liposomen im Neuroblastom	25
1.5.1	GD ₂ als liposomale Zielstruktur im Neuroblastom	26
1.5.2	IGF1R als liposomale Zielstruktur im Neuroblastom	27
1.6	Fragestellung der Arbeit	29
2	Material und Methoden	30
2.1	Material	30
2.1.1	Zelllinien	30
2.1.2	Reagenzien und Ausstattung	30
2.1.2.1	Zellkultur	30
2.1.2.2	Gewinnung von RNA	32
2.1.2.3	cDNA-Synthese	32
2.1.2.4	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	33
2.1.2.5	Real-Time PCR	34
2.1.2.6	Fluoreszenzmikroskopie	35
2.1.2.7	Herstellung der Liposomen	35
2.1.2.8	Antikörper	36
2.1.2.9	Puffer	37
2.1.2.10	Apparate und Geräte	38
2.2	Methoden	39
2.2.1	Arbeiten mit Zellkulturen	39
2.2.2	Ernten von Zellen	40
2.2.3	Langfristige Lagerung von Zellen	40
2.2.4	Bestimmung der Zellzahl	40
2.2.5	Gewinnung von RNA	41
2.2.6	Messung der Konzentration und Reinheit von RNA	42
2.2.7	cDNA-Synthese	42
2.2.8	RT-PCR	43
2.2.9	Real-Time PCR	45
2.2.10	Fluoreszenzmikroskopische Analyse von Neuroblastom Zellen	46
2.2.11	Durchflusszytometrische Analysen der Expression von GD ₂ und IGF1R	46
2.2.12	Durchflusszytometrische Analysen der zellulären Aufnahme fluoreszierender Liposomen	47
2.2.13	Herstellung der GD ₂ - und der IGF1R-Liposomen	48
2.2.14	Lagerung, Größe und Stabilität der Liposomen	49
2.2.15	Transfektion der siRNA in Neuroblastomzellen mit dem Reagenz HiPerFect®	49
2.2.16	Statistische Auswertung	50

3	Ergebnisse	51
3.1	Expression von GD ₂ und IGF1R in Neuroblastom Zelllinien	51
3.1.1	Expression von GD ₂ in drei Neuroblastom Zelllinien	52
3.1.2	Expression von IGF1R in drei Neuroblastom Zelllinien	54
3.2	Zelluläre Aufnahme fluoreszierender Immunoliposomen	58
3.2.1	Zelluläre Aufnahme fluoreszierender Anti-GD ₂ Liposomen durch Neuroblastom Zelllinien	58
3.2.2	Zelluläre Aufnahme fluoreszierender Anti-IGF1R Liposomen durch Neuroblastom Zelllinien	59
3.2.3	Zelluläre Aufnahme fluoreszierender siRNA verkapselt in Anti-GD ₂ Liposomen durch Neuroblastomzellen	60
3.2.4	Zelluläre Aufnahme fluoreszierender siRNA verkapselt in Anti-IGF1R Liposomen durch Neuroblastomzellen	61
3.2.5	Konfokalmikroskopische Darstellung der zellulären Aufnahme fluoreszierender Anti-GD ₂ Liposomen	62
3.3	Größe und Stabilität der Immunoliposomen	65
3.4	Expression der drei siRNA Zielgene ALK, NMYC und VEGF-A in vier Neuroblastom Zelllinien	66
3.4.1	Untersuchung der ALK mRNA Expression in Neuroblastom Zelllinien Kelly, IMR-32, SK-N-AS und IGR-N91	66
3.4.2	Untersuchung der NMYC mRNA Expression in Neuroblastom Zelllinien Kelly, IMR-32, SK-N-AS und IGR-N91	68
3.4.3	Untersuchung der NB Zelllinien Kelly, IMR-32, SK-N-AS und IGR-N91 auf die Expression von VEGF-A mRNA	70
3.5	Transfektion spezifischer siRNA gegen ALK, NMYC und VEGF-A in Neuroblastom Zellen mit dem Transfektionsreagenz HiPerFect®	72
3.5.1	Hemmung von ALK in den Neuroblastom Zelllinien Kelly und IMR-32 nach Transfektion spezifischer siRNA mit HiPerFect®	73
3.5.2	Hemmung von NMYC in der Neuroblastom Zelllinie Kelly und IMR-32 nach Transfektion spezifischer siRNA mit HiPerFect®	74
3.5.3	Hemmung von VEGF-A in der Neuroblastom Zelllinie Kelly nach Transfektion spezifischer siRNA mit HiPerFect®	75
3.6	Transfektion spezifischer siRNA gegen ALK und NMYC verkapselt in GD ₂ -gerichteten Liposomen in Neuroblastomzellen	75
3.6.1	Regulation der ALK Gen Expression mittels spezifischer siRNA verkapselt in zielgerichteten Anti-GD ₂ Liposomen	76
3.6.2	Regulation der NMYC Gen Expression mittels spezifischer siRNA verkapselt in zielgerichteten Anti-GD ₂ Liposomen	78
3.6.3	Regulation der VEGF-A Gen Expression mittels spezifischer siRNA verkapselt in zielgerichteten Anti-GD ₂ Liposomen	80
4	Diskussion	81
4.1	Expression von GD ₂ und IGF1R in Neuroblastom Zelllinien	81
4.2	Größe und Stabilität der Immunoliposomen	82
4.3	Zelluläre Aufnahme fluoreszierender Immunoliposomen	83
4.4	ALK, NMYC und VEGF-A Expression in Neuroblastom Zelllinien	86
4.5	Transfektion spezifischer siRNA in Neuroblastom Zellen mit dem Transfektionsreagenz HiPerFect®	89
4.6	Transfektion spezifischer siRNA verkapselt in Anti-GD ₂ Liposomen in Neuroblastom Zellen	92

5	Zusammenfassung	95
6	Literaturverzeichnis	96
7	Danksagung	114
8	Lebenslauf	115