

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Einleitung | 1 |
| 1 RNA, ein Molekül mit vielfältigen Aufgaben | 1 |
| 1.1 Die Evolution der RNA | 1 |
| 1.2 Regulatorische Aufgaben | 1 |
| 1.3 mRNA-Stabilität | 2 |
| 1.4 Poly A Schwanz/Cap-Struktur | 3 |
| 2 Das Immunsystem | 3 |
| 2.1 Antigen-präsentierende Zellen (APC) | 4 |
| 2.2 Cytotoxische T- Zellen (CTL) | 6 |
| 2.3 Tumorimmunologie | 7 |
| 3 Die somatische Gentherapie | 8 |
| 3.1 Definition | 8 |
| 3.2 Konstitutive Gentherapie | 9 |
| 3.2.1 Verfahren mit Viruspräparationen | 10 |
| 3.2.2 Verfahren ohne Viruspräparationen | 10 |
| 3.3 Die Vakzinierung | 11 |
| 3.3.1 Die Verwendung von Nukleinsäuren als Vakzine | 12 |
| 3.4 Lipofektion von Nukleinsäuren | 14 |
| 3.4.1 Unifectin und Unifectin-M | 16 |
| 4 Zielsetzung der Arbeit | 18 |
| Material und Methoden | 19 |
| 5 Material | 19 |
| 5.1 Geräte | 19 |
| 5.2 Chemikalien und Enzyme | 19 |
| 5.2.1 Chemikalien | 20 |
| 5.2.2 Enzyme | 21 |
| 5.2.3 Verwendete vorgefertigte Systeme | 22 |
| 5.2.4 Längenstandards für Agarosegele | 22 |

| | | |
|-------------------|---|-----------|
| 5.2.5 | Oligonucleotide | 22 |
| 5.3 | Plasmide | 23 |
| 5.4 | Bakterienstamm | 24 |
| 5.5 | Zelllinien | 24 |
| 6 | Methoden | 25 |
| 6.1 | Molekularbiologische Methoden | 25 |
| 6.1.1 | Puffer und Lösungen für Versuche mit β -Galactosidase | 25 |
| 6.1.2 | PCR | 27 |
| 6.1.3 | RT-PCR | 28 |
| 6.1.4 | Medien und Antibiotika für die Bakterienkultur | 29 |
| 6.1.5 | Aufzucht und Transformation von Bakterien | 30 |
| 6.1.6 | Lösungen und Puffer für die Molekularbiologie | 31 |
| 6.1.7 | Agarose-Gelektrophorese | 31 |
| 6.1.8 | Klonierung | 32 |
| 6.1.9 | Plasmidisolierung | 35 |
| 6.1.10 | Sequenzierung | 35 |
| 6.1.11 | Herstellung der Plasmide | 36 |
| 6.1.12 | Transkription <i>in vitro</i> | 38 |
| 6.1.13 | Herstellung einer cDNA Bibliothek | 38 |
| 6.1.14 | Herstellung viraler Partikel | 39 |
| 6.1.15 | ELISA-Verfahren | 40 |
| 6.2 | Arbeiten in der Zellkultur | 42 |
| 6.2.1 | Medien und Puffer für die Zellkultur | 42 |
| 6.2.2 | Kultivierung von Tumor-Zelllinien | 43 |
| 6.2.3 | Inaktivierung von Zellen durch Bestrahlung | 43 |
| 6.2.4 | Elektroporation | 44 |
| 6.2.5 | EinzelzellSuspensionen aus Milzen von Mäusen | 44 |
| 6.2.6 | Immunisierung von Mäusen und Kultivierung von CTL | 44 |
| 6.2.7 | Cytotoxizitätstest | 45 |
| Ergebnisse | | 47 |
| 7 | Gliederung der Ergebnisse | 47 |
| 8 | RNA Konstrukte für die RNA Transfektion | 47 |
| 8.1 | Stabilisierte RNA Konstrukte | 47 |
| 8.2 | Rekombinante Semliki-Forest RNA | 49 |
| 8.3 | RNA-Bibliothek | 51 |

| | |
|---|-----------|
| 9 RNA-Transfektion | 51 |
| 9.1 Elektroporation von RNA in eukaryontische Zellen | 51 |
| 9.1.1 Elektroporationsbedingungen | 51 |
| 9.1.2 Vergleich der Elektroporation verschiedener Zelllinien | 52 |
| 9.1.3 Cytomix | 55 |
| 9.1.4 Carrier RNA | 56 |
| 9.2 Optimierung der RNA-Lipofektion von Zelllinien | 57 |
| 9.2.1 Transfektionseffizienz von BHK-Zellen | 58 |
| 9.2.2 Enhancer | 60 |
| 9.2.3 Konzentration des Liposomenmixes | 61 |
| 9.2.4 Transfektionseffizienz verschiedener Zelllinien | 62 |
| 9.2.5 Lipofektion im Vergleich: <i>Unifectin-M</i> mit <i>Unifectin und DOTAP</i> | 64 |
| 9.2.6 Zusammenfassung der Optimierung der Lipofektion | 66 |
| 9.3 Vergleich der verschiedenen RNA-Konstrukte in der Zellkultur | 66 |
| 9.3.1 Vergleich von β ggfp β g α_n RNA und SFVgfp RNA in der Zellkultur | 67 |
| 9.3.2 Vergleich von β gECMVlacZ β g α_n RNA und β glacZ β g α_n RNA in der Zellkultur | 69 |
| 9.4 Infektion von Zellen mit viralen Partikeln | 70 |
| 9.4.1 Herstellung von rekombinannten Partikel ohne Replikasefunktion | 71 |
| 10 Immunisierung <i>in vivo</i> | 72 |
| 10.1 Einsatz der RNA-Vakzine <i>in vivo</i> | 74 |
| 10.2 Injektionsstellen für Nukleinsäuren | 75 |
| 10.2.1 Das Ohrgewebe als Injektionsort für RNA | 75 |
| 10.3 CTL-Antwort nach Immunisierung mit RNA-transfizierten Zellen oder mit infektiösen RNA-Partikel | 77 |
| 10.3.1 Transfer von RNA-transfizierten Zellen in den Organismus | 77 |
| 10.3.2 Transfer von viralen RNA-Partikel in den Organismus | 80 |
| 10.3.3 Transfer von rekombinannten Partikel ohne Replikasefunktion in den Organismus | 80 |
| 10.4 Geschützte RNA und der <i>in vivo</i>-Transfer | 81 |
| 10.4.1 Schutz der RNA | 81 |
| 10.4.2 RNase-Schutz-Experiment | 82 |
| 10.5 CTL-Antwort nach Immunisierung durch geschützte RNA und nackte RNA | 86 |
| 10.5.1 Immunisierung mit geschützter Liposomen-RNA | 86 |
| 10.5.2 Immunisierung mit geschützter Protamin-RNA | 87 |
| 10.5.3 Immunisierung mit einer geschützten Protamin-RNA-Bibliothek | 88 |
| 10.5.4 Transfer von nackter RNA in den Organismus | 90 |

| | |
|--|------------|
| 10.5.5 Der Einsatz von CpG-Motiven | 92 |
| 10.6 Humorale Antwort der RNA-Immunisierung | 93 |
| 10.6.1 Protamin als Schutzpeptid | 95 |
| 10.6.2 RNA-Liposomen | 95 |
| 10.6.3 P13.1-RNA-Bibliothek | 96 |
| 10.6.4 DNA- und RNA-Injektion | 97 |
| 10.6.5 Verschiedene Schutz-Peptide | 98 |
| 10.6.6 Vergleich der CpG-Motive | 100 |
| Diskussion | 103 |
| 11 RNA-Transfektion in Zellen | 103 |
| 11.1 Elektroporation und Lipofektion der RNA | 103 |
| 11.2 RNA-Konstrukte und die Transfektion | 105 |
| 11.3 RNA-Immunisierung <i>in vivo</i> | 107 |
| 12 Die Welt der RNA | 112 |
| 13 Vakzine: die Strategie der Zukunft | 113 |
| 13.1 Einsatz von Bibliotheken aus Vakzinen | 114 |
| 13.2 Vakzine der Zukunft: DNA oder RNA? | 114 |
| 13.2.1 Vorteile der Verwendung von RNA als Vakzine | 115 |
| 13.3 Gentherapie mit RNA | 116 |
| Zusammenfassung | 117 |
| Literatur | 118 |