

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 Tumorummunologie	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-Gelelektrophorese	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</i> und <i>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 gfp 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 rekombinanten Partikel ohne Replikasefunktion	71
10	Immunisierung in vivo	72
10.1	Einsatz der RNA-Vakzine in vivo	74
10.2	Injektionsstellen für Nukleinsäuren	75
10.2.1	Das Ohr Gewebe 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 rekombinanten Partikel ohne Replikasefunktion in den Organismus	80
10.4	Geschützte RNA und der in vivo-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	PI3.1-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