

# **Ballistomagnetischer Transfer von Nukleinsäuren in eukaryote Zellen**

Dissertation zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften  
eingereicht am Fachbereich Chemie der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von Matthias Schroff  
aus Hannover

Berlin 2003

Referent: Prof. Dr. Burghardt Wittig

Koreferent: Prof. Dr. Volker A. Erdmann

Disputation am: 28.5.2003

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Burghardt Wittig für seine Geduld mit mir und seine ständige Bereitschaft, mich während der Doktorarbeit zu unterstützen.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir mein Studium überhaupt erst ermöglicht haben. Ohne sie wäre dies alles nicht möglich gewesen.

Weiterhin möchte ich mich bei Claas Junghans bedanken. Claas hat mich immer wieder motiviert und tatkräftig bei der Vollendung der Arbeit an meiner Seite gestanden.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name:	Schroff
Vorname:	Matthias
Geburtsdatum/-ort:	18.01.1968 in Hannover
Anschrift:	Friedbergstr. 5, 14057 Berlin
Familienstand:	ledig

### Schul- und Hochschulbildung

1974 – 1978	Grundschule Alemannschule Hannover
1978 – 1980	Orientierungsstufe Langenhagen
1980 – 1987	Gymnasium Langenhagen Abschluss: Abitur
1988 – 1993	Technische Universität Hannover Studiengang: Biochemie Abschluss: Diplom mit Note „Sehr Gut“

### Berufliche Tätigkeiten

1994 – April 1997	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Freien Universität im Fachbereich Grundlagenmedizin im Institut für Molekularbiologie und Biochemie
Mai 1997 – Dezember 2001	Leitender Angestellter bei der Mologen Forschungs- und Entwicklungs GmbH mit dem Aufgabenbereich Produktentwicklung und Qualitätskontrolle
seit Januar 2002	Geschäftsführer der Mologen Forschungs- und Entwicklungs GmbH

### Sonstige Tätigkeiten

1.7.1987 – 30.9.1988	Wehrdienst
Mai 1993 – April 1994	Tutor im Praktikum Biochemie für Mediziner, Fachbereich Grundlagenmedizin der Freien Universität Berlin

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Gentherapie	1
1.1.1	Gentransfer als zentrales Problem der Gentherapie	3
1.1.2	Immunotherapie onkologischer Erkrankungen als Beispiel	4
1.1.3	Methoden des Gentransfers	5
1.2	Zielsetzung der Arbeit	11
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>12</b>
2.1	Bezugsquellen verwendeter Materialien und Chemikalien	12
2.2	Herkunft der Geräte	13
2.3	Herkunft der Plasmide	13
2.3.1	pCDNA3	14
2.3.2	pCEP4	14
2.3.3	pCR3	15
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>16</b>
3.1	Standardmethoden	16
3.1.1	Agarose-Gelelektrophorese	16
3.1.2	Extraktionen von DNA-Lösungen mit Phenol und/oder Chloroform	16
3.1.3	Ethanol-fällung von DNA	16
3.1.4	Fotografie von Agarosegelen	17
3.1.5	DNA-Fragmentisolierung nach Restriktionsverdau aus Agarosegelen	17
3.1.6	Ligation von DNA-Fragmenten	17
3.1.7	Präparation elektrokompetenter Bakterien	18
3.1.8	Transformation	18
3.1.9	Plasmidisolierung	19
3.2	Herstellung von Zellkernen	19
3.3	Proteinaseverdau mit thermophiler Proteinase	19
3.4	Zellkultur	19
3.4.1	Kultivierung der Zellen	20
3.4.2	Zellzählung	20

## Inhaltsverzeichnis

---

3.4.3	Vorbereitung der Zellen für den ballistomagnetischen Transfer .....	20
3.4.4	Immunfluoreszenzfärbungen von Zellen .....	21
3.4.5	Fotographieren mit dem Fluoreszenzmikroskop .....	21
3.5	Ballistomagnetisches Vektorsystem.....	22
3.5.1	Aufbau des Gerätes .....	22
3.5.2	Ballistischer Transfer von Nukleinsäuren und super-paramagnetischen Partikeln in eukaryonte Zellen. ....	26
3.5.3	Magnetische Zellseparation .....	26
3.6	Plasmidquantifizierung direkt aus Zell-Lysat nach Proteaseverdau mit thermophiler Proteinase mittels quantitativer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	27
3.6.1	Klonierung des Referenzplasmides .....	27
3.6.2	Entwurf der PCR .....	28
3.6.3	Auswertung mit Agarosegelen .....	29
3.6.4	Auswertung mit Polyacrylamidgelen und Fluoreszenz-markierten Primern.....	31
3.6.5	Plasmid-Quantifizierung in Zellen nach ballistomagnetischem Transfer	33
3.7	Durchflusszytometrie.....	34
3.7.1	Fluoreszenzkomensation .....	35
3.7.2	Analyse von unbehandelten Zellen .....	35
3.7.3	Analyse von Zellen nach ballistomagnetischem Transfer von unbeschichtetem Gold.....	36
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
4.1	Ballistomagnetischer Transfer von Fluoreszein-Isothiocyanat FITC-markierten ODN (FITC-ODN) .....	37
4.1.1	Auswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop.....	37
4.1.2	Auswertung mit dem Durchflusszytometer.....	41
4.2	Ballistomagnetischer Transfer von „antisense“- ODN .....	45
4.2.1	Ballistomagnetischer Transfer von „antisense“- ODN gegen mRNA für G- Protein-Untereinheiten .....	45
4.2.2	Ballistomagnetischer Transfer von „antisense“- ODN gegen die mRNA für das grün-fluoreszierende Protein (GFP).....	47

4.3	Ballistomagnetischer Transfer von Expressionsplasmiden .....	50
4.3.1	Transfektion mit Expressionsplasmiden für GFP .....	50
4.3.2	Anzahl der Plasmidmoleküle pro Zelle .....	53
4.3.3	Nachweis von Plasmiden im Kern nach ballistomagnetischem Transfer	54
4.3.4	Transfektion mit anderen Expressionsplasmiden .....	55
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>60</b>
5.1	Allgemeines zur Auswertung mit dem Durchflusszytometer .....	60
5.2	Ballistomagnetischer Transfer von ODN .....	62
5.2.1	Ballistomagnetischer Transfer von Fluoreszein-Isothiocyanat-markierten ODN (FITC-ODN) .....	62
5.2.2	Ballistomagnetischer Transfer von „antisense“-ODN .....	64
5.3	Ballistomagnetischer Transfer von Expressionsplasmiden .....	68
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>73</b>
7.1	Abbildungen .....	73
7.2	Tabellen .....	77
<b>8</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>78</b>
<b>9</b>	<b>Eigene Veröffentlichungen .....</b>	<b>79</b>
9.1	Publikationen in Journalen .....	79
9.2	Patente.....	81
<b>10</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>84</b>