

## **3 Methoden**

### **3.1 Standardmethoden**

#### **3.1.1 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Elektrophorese von DNA in Agarosegelen erfolgte horizontal in TAE-Puffer (20 mM Tris (pH 7.8), 2.5 mM Natriumacetat, 1mM EDTA). Die aufzutragenden Proben wurden mit 1/10 Volumen Gelbeladungspuffer (Ficoll 400 25% (v/v), Bromphenolblau 0.05% (w/v), 0.5facher TAE) versetzt. Die verwendeten Agarosekonzentration lagen zwischen 0.7% (w/v) und 1% (w/v) für Fragmente zwischen etwa 10000 bp und 500 bp und bei 3% (w/v) für Fragmente bis etwa 150 bp. Standardgele liefen mit 5-10 V/cm für 25 - 35 min. Als Längenstandard wurden etwa 250 ng HindIII geschnittene Lambda- DNA für Fragmente zwischen 10000 bp und 600 bp oder 250 ng HaeIII geschnittene  $\phi$ X174 RF DNA für Fragmente zwischen 1000 bp und 100 bp mit auf das Gel aufgetragen. Die Anfärbung der DNA erfolgte mit Ethidiumbromid, das in einer Konzentration von 0.125  $\mu$ g/ml mit in die Gele eingegossen wurde.

#### **3.1.2 Extraktionen von DNA-Lösungen mit Phenol und/oder Chloroform**

Die wässrige Nukleinsäurelösung wurde zur Entfernung von Proteinen zunächst mit einem Volumen Phenol-Mix (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 (v/v/v) extrahiert. Nach einer Zentrifugation mit 15000 x g bei RT für 5 min folgte stets eine weitere Extraktion der oberen, wässrigen Phase mit Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 24/1 (v/v). Dieser Schritt dient der Entfernung von Phenol aus der wässrigen Phase. Es muß bei Extraktionen mit Phenol darauf geachtet werden, dass der pH-Wert über 7.8 liegt, da DNA bei einem niedrigeren pH-Wert in der organischen Phase löslich ist.

#### **3.1.3 Ethanolfällung von DNA**

Die DNA in wässriger Lösung wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.5) und zwei Volumina  $-20^{\circ}\text{C}$  kaltem Ethanol (96% v/v) zur Fällung gebracht. Nach gründlichem Mischen wurden die Proben im Tiefkühlschrank bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für mindestens eine Stunde inkubiert. Anschließend

erfolgte eine Zentrifugation mit 15000xg bei 4 °C für 30 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit -20°C kaltem Ethanol (70% v/v) gewaschen und bei RT für 15 min getrocknet. Die DNA wurde anschließend im gewünschten Volumen H<sub>2</sub>O oder TE (pH 8) aufgenommen.

#### **3.1.4 Fotografie von Agarosegelen**

Die Photographie Ethidiumbromid-gefärbter Agarose-Gele erfolgte unter UV-Licht der Wellenlänge 256 nm oder 312 nm mit einer CCD-Schwarz-Weiß-Videokamera von Polaroid. Die Belichtung wurde auf dem Bildschirm kontrolliert. Die Bilder konnten sofort auf einem Thermodrucker ausgedruckt werden oder als digitalisierte Bilder im TIFF-Format gespeichert werden.

#### **3.1.5 DNA-Fragmentisolierung nach Restriktionsverdau aus Agarosegelen**

Nach dem Restriktionsverdau wurden pro 10 µl Restriktionsansatz 2 µl Gelbeladungspuffer (25% v/v Ficoll 400, 0.05% Bromphenolblau, 0.5facher TAE)) zugegeben. Die Lösung wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und die Fragmente gelelektrophoretisch getrennt. Nach der Elektrophorese wurden die gewünschten Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten (bei Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm). Anschließend wurden die Fragmente mit einem Kit der Firma Qiagen (Qiaex-Kit) extrahiert. Ein Aliquot der isolierten Fragmente wurde zur Reinheitskontrolle in einem Agarosegel gelelektrophoretisch analysiert.

#### **3.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten**

Zur Ligation wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Die Ligase verbindet sowohl glattendige als auch überhängende komplementäre Enden miteinander. Die Reaktion erfolgt sowohl intramolekular als auch intermolekular. Die Ligrationsreaktion wurde dazu benutzt, geschnittenen Vektor zu religieren (siehe Abschnitt 3.6) und die cDNA des Gens für eGFP in den Vektor pCEP4 zu ligieren.

Die Ligrationsreaktion erfolgte in einem Volumen von 20 µl bei 12 °C für 16 h. Der Ansatz enthielt für die Religation des Vektors 100 ng (100 fmol freie Enden

bei einer Vektorlänge von ca. 6300 bp) geschnittenen Vektor, 10 U T4-DNA-Ligase und 1 mM ATP in dem von dem Hersteller gelieferten Reaktionspuffer. Für die Ligation von zwei Fragmenten, wurde die geschnittene cDNA im 3-5fachen molaren Überschuss zum geschnittenen Vektor eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen waren wie oben beschrieben. Im Anschluss an die Ligrationsreaktion wurde der Reaktionsansatz phenolextrahiert und die DNA anschließend mit Ethanol gefällt.

### **3.1.7 Präparation elektrokompetenter Bakterien**

Aus einer Einzelkolonie werden 50 ml LB-Medium angeimpft und ü. N. im Brutschrank inkubiert. 800 ml LB-Medium werden 1:100 mit der Standkultur angeimpft und im Schüttler bei 170 rpm und 37 °C inkubiert, bis die Suspension eine optische Dichte bei 600 nm von 0,5 - 0,6 hat. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis werden die Bakterien und in der Zentrifuge bei 4000xg und 0 °C für 15 min abzentrifugiert und in 800 ml eiskaltem Wasser resuspendiert. Die Bakterien werden erneut wie oben abzentrifugiert und in 400 ml eiskaltem Wasser resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wird das Bakterienpellet in 64 ml Glycerin (10% v/v) resuspendiert. Die Bakterien werden wie oben abzentrifugiert, in 1,2 ml Glycerin (10% v/v) resuspendiert, aliquotiert und bei -70°C gelagert.

### **3.1.8 Transformation**

Zur Transformation wurde der Bakterienstamm XL1-Blue verwendet. 40 µl einer Suspension elektrokompetenter Zellen wurden mit der DNA aus dem Ligrationsansatz (ca. 100-200 ng) versetzt, gut gemischt und in einer 2 mm Elektroporationsküvette (Firma Eurogentec) mit einem Elektroporationsgerät der Firma BioRad elektroporiert (Einstellungen: Kapazität: 25 µF, Widerstand: 400 Ω, Spannung: 2,5 KV). Direkt nach der Elektroporation wurde die Bakteriensuspension in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und 1 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden Aliquots von 20 µl und 200 µl auf Selektions-Agarplatten ausplattiert.

### **3.1.9 Plasmidisolierung**

Die Isolierung von Plasmiden erfolgte nach der „alkaline Lysis“ Methode (Birnboim and Doly 1979). Dazu wurden die von der Firma Qiagen angebotenen Plasmid Maxi Kit und Plasmid Mini Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

### **3.2 Herstellung von Zellkernen**

$1 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  Zellen wurden in 500  $\mu$ l RSB-Triton-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 10 x in einer 0,45 mm x 12 mm Spritze und einer 1 ml Kanüle homogenisiert. Nach 5 min auf Eis wurde die Homogenisation 5 x wiederholt. Die erfolgreiche Isolierung wurde durch Zugabe von Propidiumjodid zu einem Aliquot des Homogenats unter dem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert (Nur intakte Zellen fluoreszieren nicht mehr). Das Homogenat wurde 5 min bei 2000 rpm in einer Eppendorfszentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Das Kernpellet wurde mit 500  $\mu$ l PBS gewaschen und erneut 5 min bei 2000 rpm in einer Eppendorfszentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen und die Kerne in 500  $\mu$ l PBS resuspendiert. Von den einzelnen Fraktionen wurde ein 50  $\mu$ l Aliquot in einen Proteinaseverdau eingesetzt.

### **3.3 Proteinaseverdau mit thermophiler Proteinase**

Die Zell- oder Kersuspension wurde in der Weise mit Reaktionspuffer, Wasser und Protease versetzt, dass sie 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0,1 mM EDTA und 3 Einheiten von PreTaq<sup>TM</sup> enthielt. Die Suspension wurde für 1.5 h bei 94 °C inkubiert. Anschließend wurde das Zell-Lysat so mit Wasser verdünnt, dass das Zell-Lysat zwischen 600 und 1300 lysierte Zellen/ $\mu$ l enthielt. Das Lysat kann direkt in die PCR-Reaktion eingesetzt werden und ist bei -20 °C stabil.

### **3.4 Zellkultur**

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde mit zwei Zelllinien gearbeitet. Dabei handelt es sich die menschliche Erythroleukämiezelllinie K562 und die Rattenbasophile Leukozytenzelllinie RBL-2H3-hm1. Die Linie K562 wurde von der American Type Culture Collection erworben (CCL243). Bei der Linie RBL-

---

2H3-hm1 handelt sich um die Zelllinie RBL-2H3, die stabil mit dem humanen m1-muscarinischen Rezeptor transfiziert wurde. Die Zelllinie wurde von der AG Schultz (Pharmakologie der Freien Universität Berlin) zur Verfügung gestellt.

### **3.4.1 Kultivierung der Zellen**

Die Zellkulturbedingungen entsprachen den Empfehlungen der American Type Culture Collection:

K562: 90%(v/v) RPMI 1640, 10% (v/v) fötales Kälberserum, in der Regel wurden noch 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt. Die Zugabe von frischem Medium oder ein Mediumwechsel erfolgte dreimal die Woche.

RBL-2H3-hm1: 82% (v/v) MEM-Eagle mit Earlsalzen, 18% (v/v) fötales Kälberserum, zusätzlich wurden noch 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mmol/l Glutamin zugesetzt. Mediumwechsel erfolgte zweimal in der Woche. Zum Umsetzen der Zellen wurden die Zellen zweimal mit PBS gespült und mit HBSS-Puffer (20 min Inkubation bei 37 °C) abgelöst. Das Umsetzungsverhältnis betrug 1:20.

### **3.4.2 Zellzählung**

Die Zellzählung erfolgte mit dem Coulter-Counter Z1. Die Zellsuspension wurde in einer Verdünnung von 1:100 in die Zellzählung eingesetzt. Für K562 betrug die untere Ausschlußgrenze 10 µm. Für die RBL-2H3-hm1-Zellen wurde eine Ausschlußgrenze von 8 µm verwendet.

### **3.4.3 Vorbereitung der Zellen für den ballistomagnetischen Transfer**

Für den ballistischen Transfer wurden die Zellen auf Petrischalen mit einer Fläche von 78,5 cm<sup>2</sup> ausgesät. Die Vorbereitung für den ballistomagnetischen Transfer waren für die einzelnen Zelllinien unterschiedlich

K562-Zellen: Die Petrischalen wurden vorher mit 10 ml poly-L-Lysin-Lösung bei RT für 20 min inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen. Pro Petrischale wurden  $2 \times 10^7$  K562-Zellen in 10-20 ml Medium ausgesät. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C für 3 h inkubiert.

RBL-2H3-hm1-Zellen: Die RBL-2H3-hm1-Zellen wurden wie oben beschrieben (siehe Abschnitt 3.4.1) in Suspension gebracht und pro Petrischale  $3 \times 10^7$  Zellen in 10-20 ml Medium ausgesät. Die Zellen wurden bei RT für 20-30 min inkubiert.

Direkt vor dem ballistomagnetischen Transfer wurde das überstehende Medium abgesaugt. Die auf der Petrischale anhaftenden Zellen wurden dann dem ballistomagnetischen Transfer unterzogen.

#### 3.4.4 Immunfluoreszenzfärbungen von Zellen

Zur Immunfluoreszenzfärbung können lebende Zellen verwendet werden. Es ist keine Fixierung notwendig. Ca.  $5 \times 10^5$  Zellen werden entnommen, abzentrifugiert (1 min, 200xg) und in 50  $\mu$ l primärer Antikörperlösung aufgenommen. Nach Inkubation bei RT für 30 min werden die Zellen mit 500  $\mu$ l PBS gewaschen und anschließend in 20  $\mu$ l sekundärer Antikörperlösung aufgenommen und für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert und anschließend erneut mit 500  $\mu$ l PBS gewaschen. Anschließend können die Zellen im Durchflußcytometer gemessen oder im Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

Protein	Konz. primärer Antikörper [ $\mu$ g/ml]
MDR	10
C-CAM	10
CD40	200
B7-1	200
B7-2	200

Tabelle 3.1 Verwendete Antikörper und deren Arbeitskonzentrationen

#### 3.4.5 Fotografieren mit dem Fluoreszenzmikroskop

Die Aufnahmen der Zellen wurden mit einem Axiophot Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) und einem Kunstlicht-Diafilm der Firma Kodak mit 360 ASA gemacht. Für die Fluoreszenzaufnahmen wurde die Belichtungszeit manuell auf 20 sec eingestellt. Der Raum wurde vollständig abgedunkelt. Die Durchlichtaufnahmen

wurden im Anschluss an die Fluoreszenzaufnahmen gemacht, da das Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) bei Bestrahlung mit Licht instabil ist und deshalb schnell ausbleicht. Die Belichtungszeit für die Durchlichtaufnahmen wurde automatisch von dem Mikroskop eingestellt.

### 3.5 Ballistomagnetisches Vektorsystem

#### 3.5.1 Aufbau des Gerätes

Alle Versuche wurden mit einem modifizierten PDS1000/He-System durchgeführt. Die Modifikationen betreffen nicht das Gerät direkt, sondern die im Gerät montierbaren Einschübe. Im folgenden soll zunächst die ursprüngliche Apparatur beschrieben werden. Danach soll näher auf die Modifikationen eingegangen werden. Abbildung 3.1 zeigt ein Foto des PDS1000/He-Systems (BioRad) ohne die ursprünglichen oder modifizierten Einschübe. Das System



Abbildung 3.1 Foto des PDS1000/He-Systems ohne Einbauteile. 1: Flansch für die Halterung der Berstscheibe. 2: Aussparungen für die Einschübe (insgesamt 6), 3: Halterung für die Petrischalen

besteht aus einer Kammer, die mit einer Kunststofftür luftdicht verschlossen werden kann. Die Kammer ist von oben mit einer Helium-Druckgasflasche über ein Ventil verbunden. Die Verbindung der Heliumflasche mit der Kammer ist durch eine Berstscheibe unterbrochen. Die Einschübe können in die Kammer hineingesteckt werden. In Abbildung 3.1 ist der Einschub zu sehen, auf dem die Petrischale mit den vorbereiteten Zellen befestigt wird. Desweiteren gibt es einen Einschub, der als Halterung für eine Trägerscheibe und ein Stopp-Gitter dient. In Abbildung 3.2/A ist ein Foto des PDS1000/He-Systems mit dem eingebauten, unmodifizierten Einschub zu sehen und der schon montierten Berstscheibe zu sehen. Zur Transfektion wird an die Kammer ein Unterdruck angelegt. Anschließend wird durch Öffnen eines Ventils Heliumdruck von außen an die Berstscheibe angelegt. Bei Erreichen einer definierten Druckdifferenz reißt die Berstscheibe und das Heliumgas strömt explosionsartig in die Kammer ein. Das einströmende Gas beschleunigt eine Trägerscheibe in Richtung des Stoppgitters. Beim Auftreffen auf das Stoppgitter wird das auf der

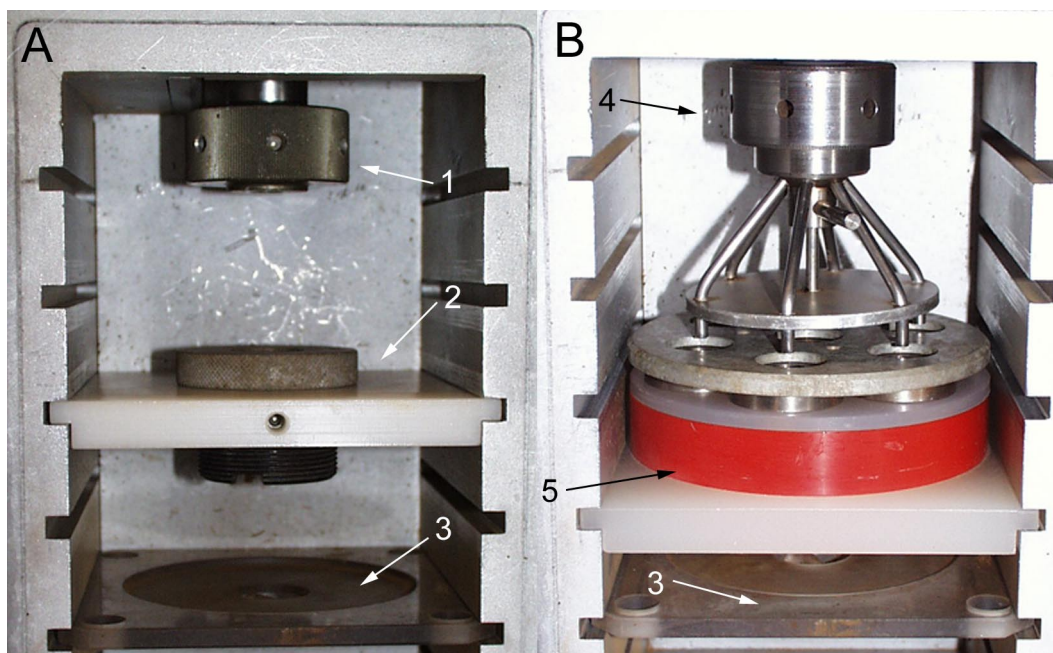


Abbildung 3.2 Kammer des PDS1000/He Systems mit den original Einbauteilen (A, 1: Halterung für die Berstscheibe, 2: Halterung für das Stoppgitter und die Trägerscheibe) und den modifizierten Einbauteilen (B, 4: modifizierte Halterung der Berstscheibe mit 7 Kanälen zur Druckverteilung, 5: Halterung für sieben Stoppgitter und Trägerscheiben). Die Halterung für die Petrischale blieb unverändert (3).

Trägerscheibe haftende Gold abgelöst und fliegt aufgrund der trägen Masse in die Richtung der darunterliegenden Zellen. Dort treffen die Goldteilchen auf die Zellen und dringen in sie ein. Dabei lösen sich die auf dem Gold haftenden



DNA-Moleküle und die Magnetpartikel ab und sind so im Inneren der Zelle. Dieser Vorgang ist in Abb. 3.4 schematisch dargestellt.

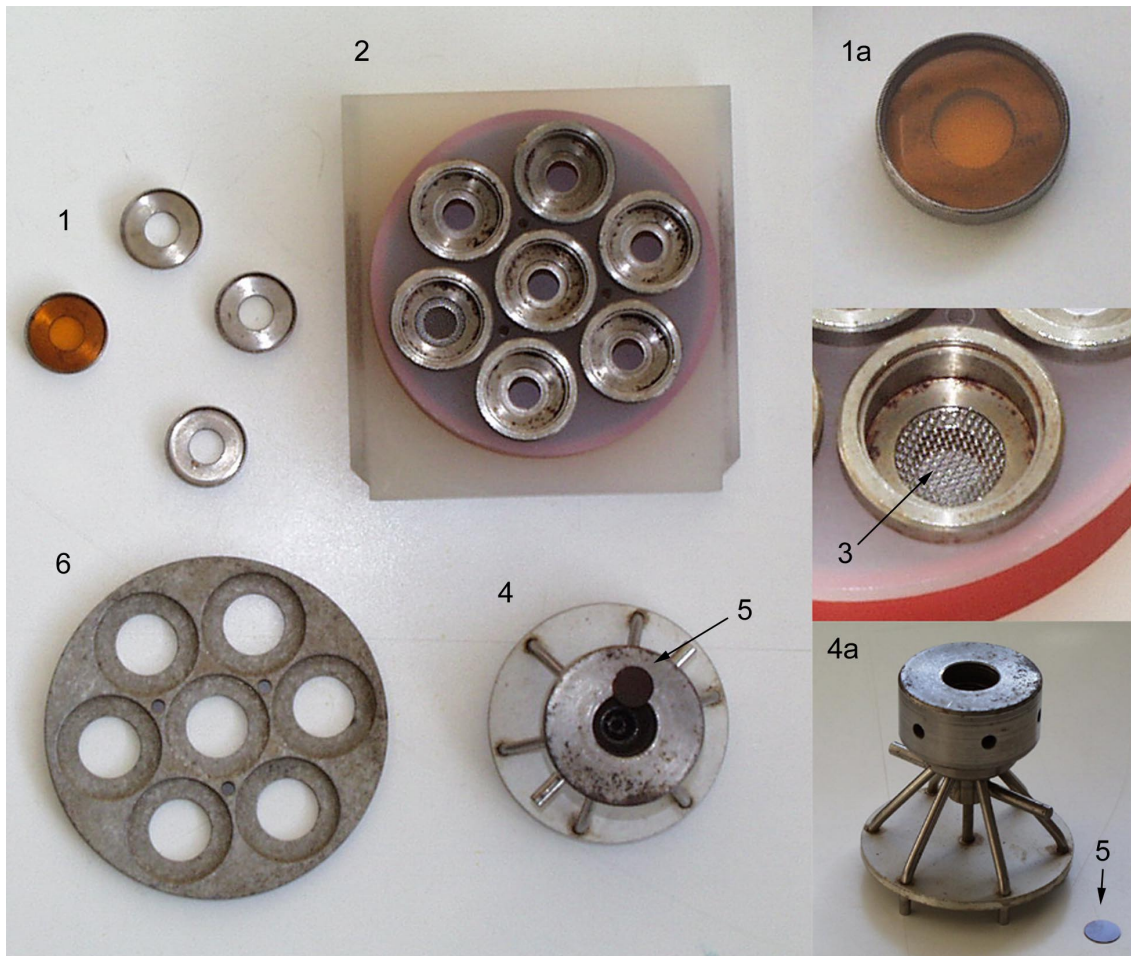


Abbildung 3.3 Teile der modifizierten Einbauteile für das PDS1000/He Systems. 1: Aufnahme der Trägerscheiben, eine mit eingesetzter Trägerscheibe (1 und 1a (in Vergrößerung)); 2: Aufnahmen der Stoppgitter; 3: eingesetztes Stoppgitter in Vergrößerung; 4: Verteilerkopf mit Berstscheibe (5) von oben und von der Seite (4a); 6: Abdeckung

Im Unterschied zu der ursprünglichen Apparatur befinden sich auf dem modifizierten Einschub sieben statt einer Trägerscheibe (Abbildung 3.2). Jede dieser Trägerscheiben wird von dem ausströmenden Heliumgas beschleunigt, das von der modifizierten Halterung für die Berstscheibe über separate Ausströmkanäle genau über die einzelnen Trägerschieben geleitet wird. Jede Trägerscheibe trifft auf ein Stopp-Gitter und löst ebenfalls beim Auftreffen auf ihr Stoppgitter das an der Scheibe haftende Gold ab, auf dem die DNA-Moleküle und die Magnetpartikel haften. Der weitere Transfektionsvorgang erfolgt genauso wie bei der unmodifizierten Apparatur. Die Fläche, die mit der unmodifizierten Apparatur getroffen werden kann, entspricht einer Petrischale mit einer Fläche von  $9,6 \text{ cm}^2$ . Bei der modifizierten Apparatur entspricht dies einer Petrischale mit einer Fläche von  $78,5 \text{ cm}^2$ . Abbildung 3.3 zeigt die

zerlegten Einzelteile der modifizierten Apparatur im Detail. Die Halterungen der Trägerscheibe entsprechen denen der ursprünglichen Apparatur (Abbildung 3.3, 1 und 1a). Sechs Trägerscheiben sind ringförmig in der Halterung angeordnet und eine Trägerscheibe in der Mitte. Die Stopp-Gitter kommen in die für sie vorgesehene Vertiefung in den Halterungen für die Trägerscheiben (Abbildung 3.3). Ein Deckel wird über den Halterungen befestigt damit sie beim Transfektionsvorgang an ihrem Platz bleiben. Die Berstscheibe kommt in die vorgesehene Vertiefung in dem Verteilerkopf. Abbildung 3.3D zeigt den Verteilerkopf mit den sieben Ausströmkanälen. Durch das gleichzeitige Einbringen der Magnetpartikel mit den DNA-Molekülen in die Zelle ist es durch eine anschließende magnetische Separation möglich, die getroffenen von den nicht getroffenen Zellen zu separieren.

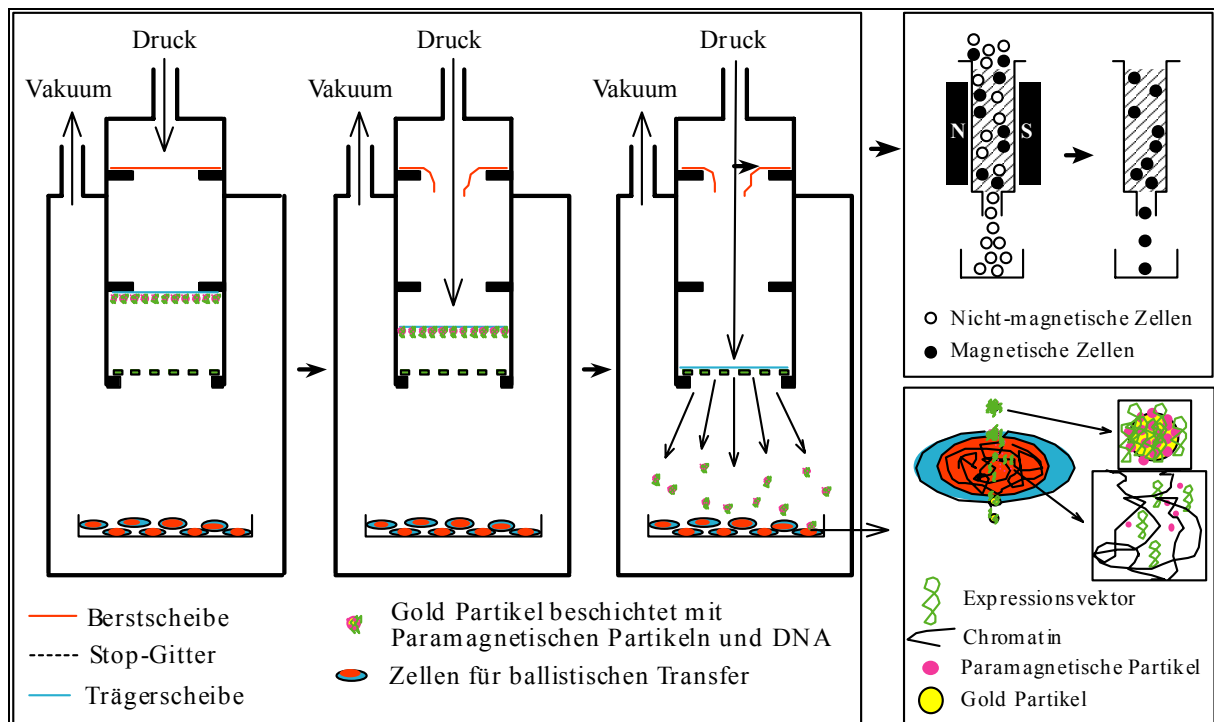


Abbildung 3.4 Schematische Darstellung des ballistischen Transfers mit anschließender magnetischer Sortierung

Im folgenden werden die beiden Schritte des ballistomagnetischen Vektorsystems im einzelnen näher beschrieben:

1. Der Transfer der Nukleinsäuren zusammen mit superparamagnetischen Partikeln in die Zellen.

---

2. Magnetische Separation der getroffenen Zellen von den nicht getroffenen Zellen.

### **3.5.2 Ballistischer Transfer von Nukleinsäuren und superparamagnetischen Partikeln in eukaryonte Zellen.**

Im ersten Schritt wurden auf sieben Trägerscheiben je 15 µl einer Goldsuspension (60 mg/ml, 1,6 µm Durchmesser, BioRad, Deutschland) pipettiert. Nachdem sich das Gold abgesetzt hatte, wurde der Überstand abgezogen. Die Goldpartikel wurden anschließend in 30 µl DNA-Lösung (3 Teile DNA-Lösung, 1 Teil kolloidale Magnetpartikelsuspension) resuspendiert. Nach dem Absetzen der Goldpartikel wurde die überstehende Lösung abgezogen und das Gold auf der Trägerscheibe an der Luft getrocknet. Die Transfektion der Zellen, die in einer 10 cm Petrischale angewachsen waren, erfolgte bei einer Unterdruckanzeige von 20 Inch Hg mit einer Berstscheibe vom Typ „1550 psi“. Unmittelbar vor dem ballistischen Transfer wurde das überstehende Zellkultur-Medium aus der Petrischale abgezogen. Nach dem ballistischen Transfer wurden die Zellen in 2 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Die Petrischale wurde mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen magnetisch sortiert.

### **3.5.3 Magnetische Zellseparation**

Nach dem ballistischen Transfer wurde die Zellsuspension auf eine nach Herstellerangaben vorbereitete Magnetsäule (Typ AS) aufgetragen. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde zurückbehalten (unsortierte Fraktion, *us*). Nach dem Durchlaufen der Zellsuspension durch die Säule wurde mit 3 ml eiskaltem PBS gewaschen. Die durch die Säule gelaufene Flüssigkeit wurde gesammelt (nicht-magnetische Fraktion, *nm*). Anschließend wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und durch Heraufdrücken von eiskaltem PBS wurden die in der Säule verbliebenen Zellen aufgewirbelt. Die Säule wurde erneut mit 3 ml eiskaltem PBS gewaschen, und die durchgelaufene Flüssigkeit gesammelt (Waschfraktion, *w*). Anschließend wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die zurückgehaltenen Zellen wurden mit 5 ml eiskaltem PBS aus der Säule eluiert (magnetische Fraktion, *m*). Die einzelnen Zellfraktionen wurden für 3 min mit 300 x g bei RT abzentrifugiert und je nach

---

Weiterverwendung in 1 ml PBS oder Zellkulturmedium resuspendiert und gezählt.

### **3.6 Plasmidquantifizierung direkt aus Zell-Lysat nach Proteaseverdau mit thermophiler Proteinase mittels quantitativer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Es war im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen von großem Interesse, die Anzahl der durch ballistomagnetischen Transfer in die Zellen und speziell in den Zellkern transportierten Plasmide zu bestimmen. Dazu habe ich einen für diese Fragestellung geeigneten quantitativen PCR Titrationsnachweis entwickelt. Dieser Nachweis orientierte sich vom Prinzip an schon veröffentlichten Protokollen (Lanzillo, Kong et al. 1994) und wurde an dieses spezielle Problem angepasst. Es sollte möglich sein, die Kopienzahl jedes Plasmids, das auf dem pcDNA3-Plasmid basierte, zu ermitteln. Weiterhin sollten während der Aufarbeitung der DNA keine Schritte erfolgen, bei denen DNA verlorengehen konnte. Dazu bot sich die PCR direkt aus Zell-Lysat an. Fung beschreiben eine Methode, mit der man eine PCR direkt aus Zell-Lysat nach Behandlung mit thermophiler Protease durchführen kann (Fung and Fung 1991). Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 50 µl in einem Thermozykler der Firma Biometra durchgeführt. Für die Reaktionen wurden Reaktionsgefäße (0.6 ml) der Firma Eppendorf verwendet.

#### **3.6.1 Klonierung des Referenzplasmides**

Die Amplifizierungseffizienz der Taq-Polymerase in der PCR ist abhängig von den PCR-Bedingungen und von der Sequenz und der Länge des Templates. Um eine Normierung mit einem internen Standard zu garantieren, sollte ein möglichst in der Sequenz ähnliches (um Konkurrenz zu vermeiden) aber in der Fragmentlänge des Amplifikats unterscheidbares Plasmid als Referenz eingesetzt werden (Willhauck, Vogel et al. 1998). Es wurde ein Referenzplasmid kloniert, das sich nur gering von dem Plasmid unterschied, das in die Zellen transferiert wurde. Durch die Wahl zweier geeigneter Restriktionsenzyme, die glatte Enden produzieren, wurde ein 24 bp großes DNA-Stück aus dem Ausgangsplasmid geschnitten. Das Plasmid wurde durch Gelelektrophorese von dem 24 bp Fragment getrennt und aus dem Gel isoliert.

Nach Religation der glatten Enden und Transformation wurden Plasmidpräparationen im Kleinmaßstab von einigen Kolonien durchgeführt.

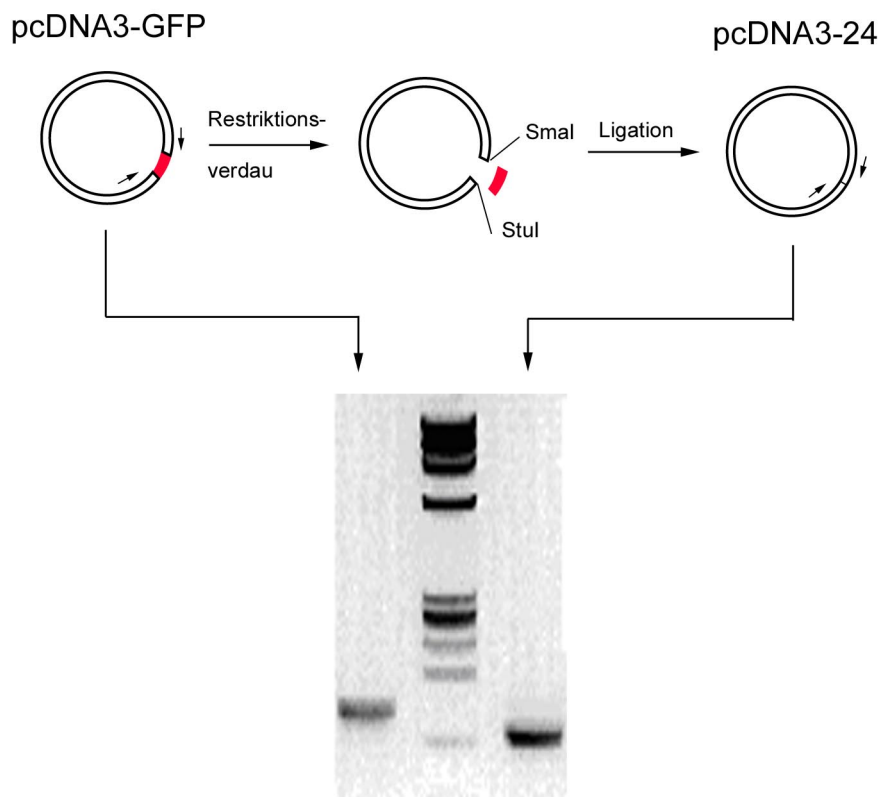


Abbildung 3.5 Schematische Darstellung der Klonierung des Referenzplasmids aus dem Ausgangsplasmid. Der untere Teil zeigt ein Foto eines Agarosegels (2% w/v), auf dem die PCR-Produkte aus den PCR-Reaktionen mit dem Ausgangsplasmid (links) und dem Referenzplasmid (rechts) aufgetragen wurden.

Durch Wahl geeigneter Primer, die um die Klonierungsstelle lagen, konnte in einer PCR-Reaktion und anschließender Gelelektrophorese das erfolgreich religierte Plasmid von dem Ausgangsplasmid unterschieden werden. Das PCR-Produkt des religierten Plasmids unterschied sich in der Länge um 24 bp von dem Ausgangsplasmid. Die Gesamtlänge des PCR-Produktes war 124 bp beim religierten Plasmid und 148 bp beim Ausgangsplasmid. Von einem positiven Klon wurden Plasmidpräparationen im Großmaßstab durchgeführt. Abbildung 3.5 zeigt schematisch die Herstellung des Referenzplasmids aus dem Ausgangsplasmid.

### 3.6.2 Entwurf der PCR

Es sollte gezeigt werden, dass bei bekannter Menge eines der beiden Plasmide im PCR-Ansatz das andere Plasmid quantifiziert werden konnte. Mit dem

Ausgangsplasmid und dem Referenzplasmid wurde je eine Verdünnungsreihe hergestellt, die einen Konzentrationsbereich von 4 Dekaden abdeckte (Tabelle 3.2).

	Verdünnung									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Anzahl Referenzplasmid	$4.3 \cdot 10^8$	$2.1 \cdot 10^8$	$8.6 \cdot 10^7$	$4.3 \cdot 10^7$	$3.6 \cdot 10^7$	$1.8 \cdot 10^7$	$9.0 \cdot 10^6$	$4.5 \cdot 10^6$	$2.2 \cdot 10^6$	$4.5 \cdot 10^5$
Anzahl Ausgangs-plasmid	$4.2 \cdot 10^8$	$2.1 \cdot 10^8$	$8.3 \cdot 10^7$	$4.2 \cdot 10^7$	$3.5 \cdot 10^7$	$1.7 \cdot 10^7$	$8.7 \cdot 10^6$	$4.3 \cdot 10^6$	$2.2 \cdot 10^6$	$4.3 \cdot 10^5$

Tabelle 3.2 Verdünnungsreihe für Referenz- und Ausgangsplasmid

Es wurden PCR-Versuche durchgeführt, in denen in den PCR-Ansätzen

1. Ausgangsplasmid und Referenzplasmid in gleicher Konzentration vorlagen.
2. das Ausgangsplasmid in konstanter Konzentration und das Referenzplasmid in absteigender Konzentration vorlagen.

Die eingesetzte Konzentration des Ausgangsplasmides in Versuch 2 war bekannt. Es sollte gezeigt werden, dass durch densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten die Konzentration berechnet werden konnte.

### 3.6.3 Auswertung mit Agarosegelen

Die Produkte der einzelnen PCR-Ansätze wurden in einem Agarosegel (3% w/v) gelelektrophoretisch aufgetrennt, das mit Ethidiumbromid gefärbte Gel mit einer digitalen Kamera fotografiert und die Bandenintensität der Produktbanden mit dem Programm IPLabGel bestimmt. Es wurden mit dem Programm gleichgroße Segmente generiert, die jeweils eine Bande auf dem Foto des Gels einschlossen. Ein weiteres Segment wurde zur Hintergrundbestimmung auf einem Teil des Fotos gelegt, auf dem sich keine Bande befand.

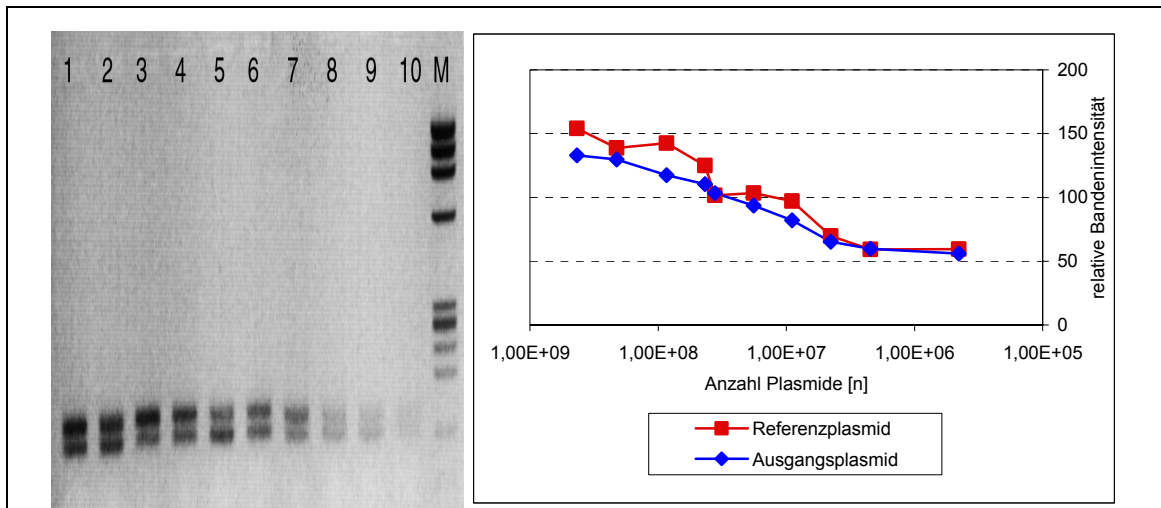


Abbildung 3.6 PCR mit gleichen Mengen an Referenzplasmid und Ausgangsplasmid in einem Ansatz. links: PCR von Proben 1-10; Probemenge siehe Tabelle 3.2; M: Längenmarker  $\phi$ X/HaeIII), rechts: Grafische Darstellung der relativen Bandenintensität gegen die Plasmidanzahl

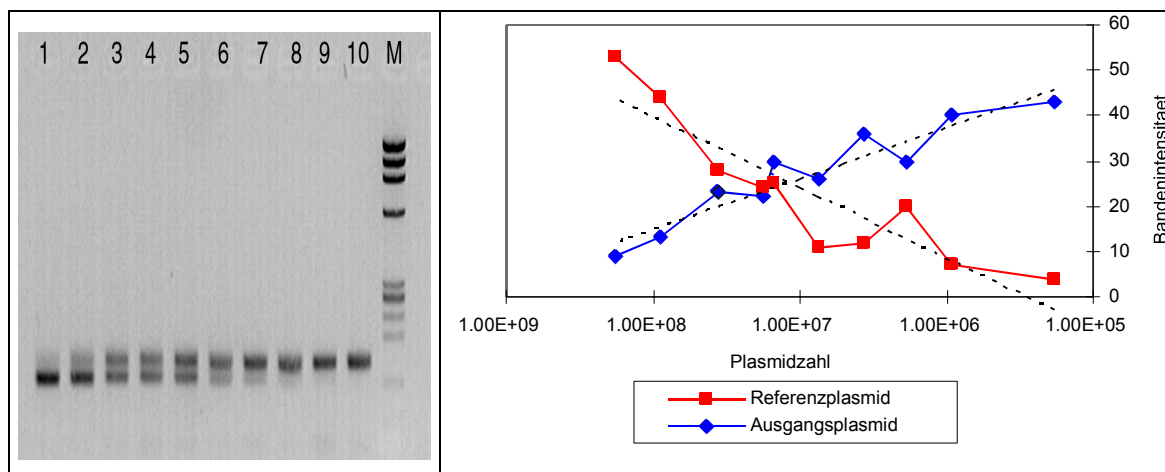


Abbildung 3.7 PCR mit konstanter Menge an Ausgangsplasmid und absteigender Menge an Referenzplasmid in einem Ansatz. links: PCR von Proben 1-10; M: Längenmarker  $\phi$ X/HaeIII), rechts: Grafische Darstellung der relativen Bandenintensität gegen die Plasmidanzahl

Die Bandenintensität jeder Bande wurde berechnet. Tabelle 3.1 zeigt die Anzahl der in den einzelnen Reaktionsansätzen eingesetzten Plasmide. Die PCR-Experimente wurden mit 21 Zyklen (55 °C, 1 min; 72 °C, 1 min; 92 °C, 1 min) durchgeführt. Auf dem Foto in Abbildung 3.6 ist ein Agarosegel zu sehen, auf dem jeweils 8  $\mu$ l Probe aus den PCR-Ansätzen aus Versuch 1 aufgetrennt wurden. Das Gelbild wurde digitalisiert und die Intensitäten der einzelnen Banden mit dem Programm IPLabgel bestimmt. Unter dem Gelfoto ist die Abhängigkeit der Bandenintensität von der Ausgangsmenge an Plasmid in dem PCR-Ansatz grafisch dargestellt. Abbildung 3.7 zeigt die Auswertung des Versuches 2. Auf dem Foto in Abbildung 3.7 ist deutlich zu erkennen, dass eine Konkurrenz zwischen Ausgangs- und Referenzplasmid stattfindet. Trotz konstant gehaltener Konzentration des Ausgangsplasmids ist die

Bandenintensität des PCR-Produktes nicht in jedem Ansatz konstant. Bei hoher Konzentration des Referenzplasmides ist die Produktbande des Ausgangsplasmides kaum zu sehen. Erst bei sinkender Konzentration des Ausgangsplasmides entsteht eine erkennbare Produktbande. Auch bei Durchführung der PCR mit weniger Zyklen war der Effekt deutlich zu erkennen.

### 3.6.4 Auswertung mit Polyacrylamidgelen und Fluoreszenz-markierten Primern

Verwendet man in der PCR Fluoreszenz-markierte Primer, kann durch die höhere Empfindlichkeit des Nachweises der Fluoreszenz der eingebauten Primer die Zyklenzahl der PCR-Reaktion so weit gesenkt werden, dass keine Konkurrenz zwischen den Matrizen-DNA stattfindet. Die Auftrennung der Produkte erfolgte durch ein Polyacrylamid-Gel und die Bestimmung der Bandenintensität in einem Sequenzierautomaten mit einem Infrarotlaser. Es wurden wieder PCR-Versuche durchgeführt, in denen in den PCR-Ansätzen

1. Ausgangsplasmid und Referenzplasmid in gleicher Konzentration vorlagen.
2. das Ausgangsplasmid in konstanter Konzentration und das Referenzplasmid in absteigender Konzentration vorlagen (Dieser Ansatz wurde doppelt durchgeführt).

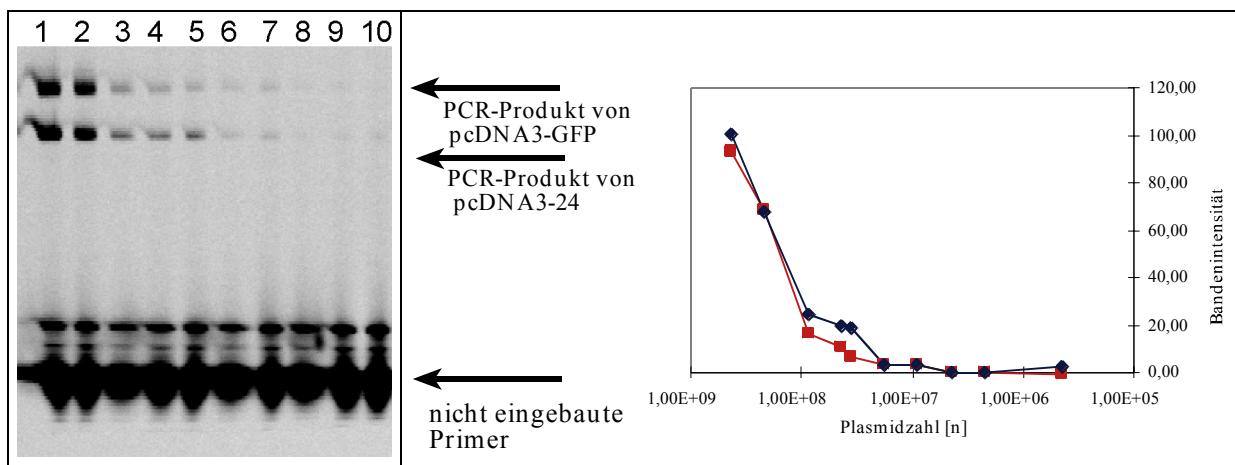


Abbildung 3.8 PCR mit gleichen Mengen an Referenzplasmid und Ausgangsplasmid in einem Ansatz. links: PCR von Proben 1-10: Probemenge siehe Tabelle 3.2, rechts: Grafische Darstellung der relativen Bandenintensität gegen die Plasmidanzahl

In Abbildung 3.8 ist ein Polyacrylamidgel zu sehen, auf dem jeweils 0,6 µl aus den PCR-Ansätzen des Versuchansatzes 1 aufgetragen wurde. Neben dem Gelbild ist die grafische Darstellung der Bandenintensität aufgetragen gegen



die Plasmidmenge dargestellt. In Versuch 1 wurde gezeigt, dass bei gleicher Menge an Ausgangsplasmid die Bandenintensität beider Produktbanden gleich ist (siehe Abbildung 3.8).

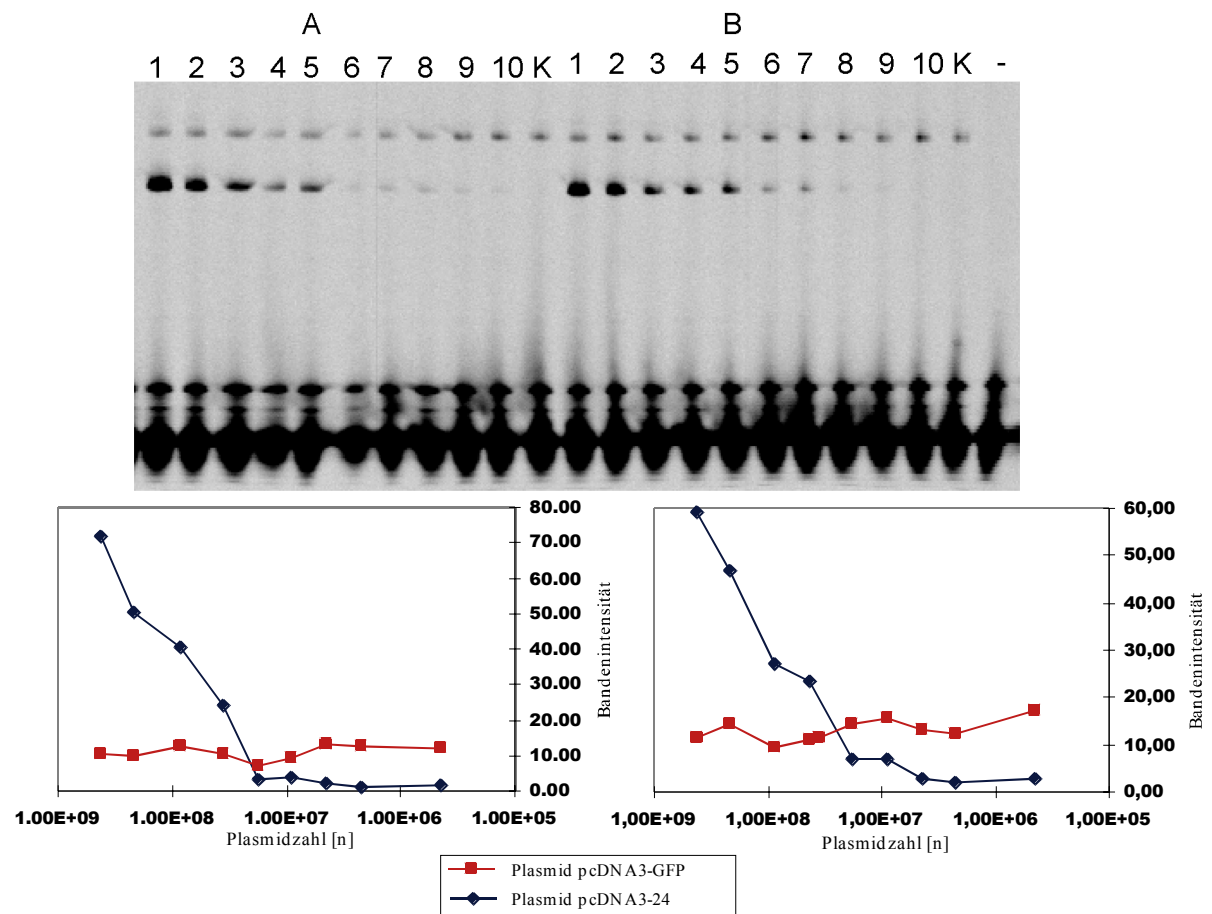


Abbildung 3.9 PCR mit konstanter Menge an Ausgangsplasmid und absteigender Menge an Referenzplasmid in einem Ansatz. oben: Polyacrylamidgel von 2 identischen PCR-Ansätzen mit jeweils 10 Proben (K: Kontroll PCR nur mit Ausgangsplasmid, -: PCR-Ansatz ohne Template), unten: Grafische Darstellung der relativen Bandenintensität gegen die Plasmidanzahl (links: Ansatz 1, rechts: Ansatz 2)

In Versuch 2 wurde die Konzentration des Ausgangsplasmides konstant gehalten und die Konzentration des Referenzplasmides (pcDNA3-24) in absteigender Konzentration in Verdünnungsschritten laut Tabelle 3.2 zugegeben (Abbildung 3.9). Es ist deutlich zu erkennen, dass die PCR-Reaktion über den gesamten Konzentrationsbereich nicht kompetitiv abläuft. Die Bandenintensität des Ausgangsplasmides ist konstant, unabhängig von der Menge des Referenzplasmides in dem jeweiligen Ansatz. Die Menge an zugegebenen Plasmid pcDNA3-GFP wurde durch Vergleich der Bandenintensitäten der Produktbanden beider Plasmide bestimmt. Es wurde der Quotient der Bandenintensität des Referenzplasmides und des Ausgangsplasmides gebildet. (Abbildung 3.10, unten). Bei einem Quotienten

von 1 waren die Bandenintensitäten gleich und damit die Menge beider Plasmide im Ansatz identisch. Dieser Wert wurde mit dem erwarteten Wert verglichen. Der erwartete Wert lag bei  $3.5 \times 10^7$ , dies entsprach der Verdünnung 5 aus Tabelle 3.2. Wie in Abbildung 3.10 zu sehen ist, lag der ermittelte Wert (zwischen  $1.7 \times 10^7$  und  $3.5 \times 10^7$ ) etwas unter dem erwarteten Wert. Diese Genauigkeit reichte vollkommen aus, um Aussagen über die Anzahl der in die Zellen transferierten Plasmide zu erhalten. Für die PCR-Reaktion wurde ein 50  $\mu$ l Standard-Ansatz verwendet. 5% der linken Primer waren mit einem Infrarot-Fluoreszenz-Farbstoff markiert. Die PCR-Reaktion wurde mit 11 Zyklen (92 °C, 1 min; 55 °C, 1 min; 72 °C, 1 min) durchgeführt.

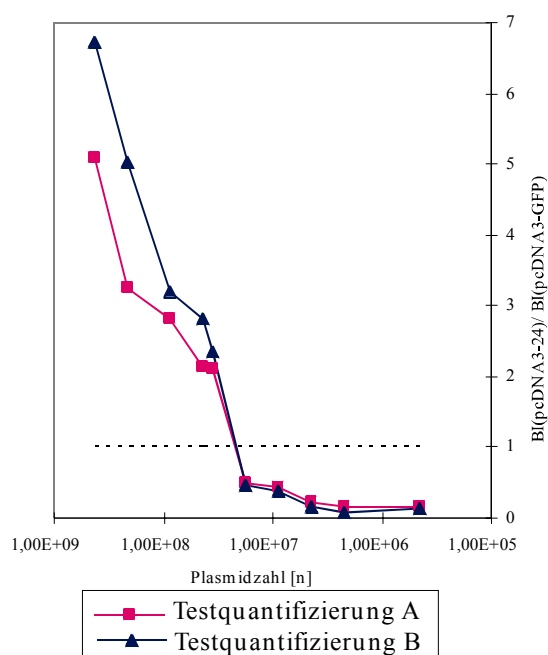


Abbildung 3.10 Quotient der Bandenintensitäten von Referenzplasmid und Ausgangsplasmid aus den Testquantifizierungen A und B (Abbildung 3.9)

### 3.6.5 Plasmid-Quantifizierung in Zellen nach ballistomagnetischem Transfer

Vor der PCR-Reaktion wurden die Zellen mit thermophiler Protease verdaut (Abschnitt 3.3). Dieses Zell-Lysat wurde direkt in die PCR eingesetzt.

Es wurde ein PCR-Mix hergestellt, der alle Komponenten außer dem Referenzplasmid enthielt. Das Referenzplasmid wurde anschließend zum Reaktionsansatz pipettiert. Weiterhin wurde ein weiterer Reaktionsansatz pipettiert, der kein Zell-Lysat und kein Referenzplasmid enthielt. Falls in diesem

Reaktionsansatz ein Produkt nachzuweisen war, wurden alle verwendeten Reagenzien verworfen und durch neue ersetzt.

Das Referenzplasmid wurde in unterschiedlichen, bekannten Konzentrationen zu dem Reaktionsansatz zugegeben und dadurch eine interne Standardkurve erstellt. Pro Zell-Lysat wurden 9 PCR-Ansätze mit einer absteigenden Konzentration des Referenzplasmides pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde auf einem Sequenzierautomaten mit automatischer Bestimmung der Fluoreszenzintensität der einzelnen Banden (Li-Cor, Firma MWG-Biotech) durchgeführt. Durch Vergleich der Bandenintensität des zu quantifizierenden Plasmids mit der internen Standardkurve konnte die Anzahl der Plasmide bestimmt werden.

### **3.7 Durchflusszytometrie**

Die Durchflußzytometrie diente dazu, quantitative Aussagen über die Zusammensetzung einer Zellsuspension machen zu können. Nach Färbung der Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, Transfer von fluoreszenzmarkierten ODN oder Transfektion mit Expressionskonstrukten für das grün-fluoreszierende Protein können im Durchflusszytometer fluoreszierende von nicht-fluoreszierenden Zellen unterschieden und quantitativ bestimmt werden. Vor jeder Messung wurde der Zellsuspension Propidiumjodid (PI) zugegeben (f.c. 1 µg/ml). PI ist ein Interkalator in die DNA. Durch die Interkalation in die DNA erhöht sich die Quantenausbeute von PI um das ca. 35fache gegenüber freiem PI. PI ist schwer membrangängig und gelangt nur in die Zellen, wenn die Zellmembran geschädigt ist und Löcher aufweist. Dadurch ist eine Unterscheidung von toten und lebenden Zellen möglich. PI ist im gleichen Wellenlängenbereich wie FITC anregbar, emittiert aber Licht höherer Wellenlänge. Das Emissionsspektrum von PI ist so breit, dass es in Fluoreszenzkanal 2 und 3 gemessen werden kann. Somit ist eine gleichzeitige Messung von PI (Kanal 2 und 3), FITC/GFP (Kanal 1) und Phycoerythrin (PE, nur Kanal 2) möglich.

### 3.7.1 Fluoreszenzkomensation

FITC und PE haben so breite Emissionsbanden, dass sie in die benachbarten Kanäle überstrahlen. Durch eine elektronische Kompensation ist es möglich, diese spektrale Überstrahlung auszugleichen. Um die Kompensation einzustellen, ist es notwendig, dass man Zellen oder Fluoreszenzpartikel misst, die nur mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Abbildung 3.11 (links) zeigt ein Punktwolkendiagramm der GFP-Fluoreszenz gegen die PI-Fluoreszenz einer nicht-kompensierten Messung von Zellen nach ballistomagnetischem Transfer. Die grüne Population zeigt nur eine scheinbare Propidiumjodid-Fluoreszenz. Durch Einstellung der Kompensation kann die Lage der Population in Bezug auf die Propidiumjodid-Fluoreszenz verändert werden (in Abbildung 3.11 (links) als Pfeil dargestellt). Die Lage der Population in Bezug auf die GFP-Fluoreszenz ändert sich durch die Kompensation nicht. Durch Überkompensation (Abbildung 3.11 (Mitte)) kann die Population an den unteren Rand des Diagrammes verschoben werden.

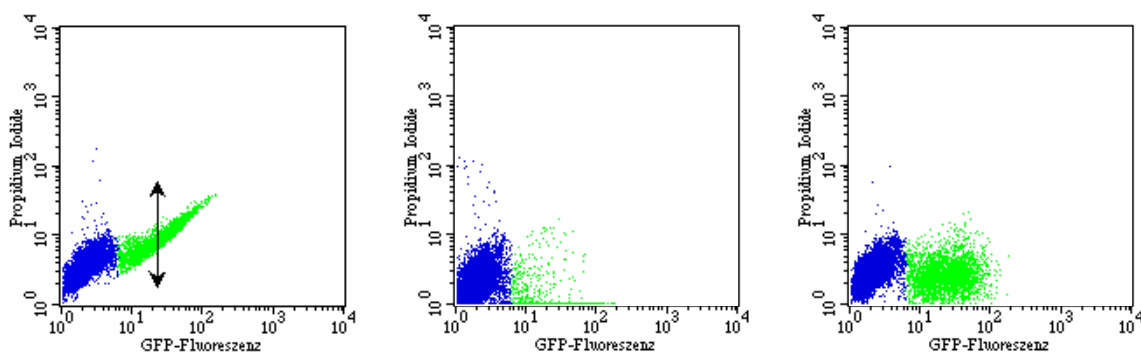


Abbildung 3.11 Fluoreszenzkomensation. Punktwolkendiagramm von Zellen ohne Kompensation (links), Überkompensation (mitte) und richtiger Kompensation (rechts). Blaue Population: nicht-fluoreszierende Zellen, grüne Population: fluoreszierende Zellen.

Ist die Kompensation richtig eingestellt (Abbildung 3.11 (rechts)) zeigt die Population die gleiche PI-Fluoreszenz wie die GFP-negativen Zellen. Hätte die Population tatsächlich eine PI-Fluoreszenz, würde die Kompensation keine Änderung in der Lage der Population bewirken.

### 3.7.2 Analyse von unbehandelten Zellen

Zur Kontrolle, dass alle gemessenen Effekte durch die Experimente bewirkt wurden, wurden unbehandelte Zellen nach Zugabe von PI gemessen. Der Anteil der toten Zellen lag bei unbehandelten Zellen bei 2-8%. Alle Zellen

zeigten eine geringe Eigenfluoreszenz. Das Durchflusszytometer wurde so eingestellt, dass über 99% der lebenden Zellpopulation in den Fluoreszenzkanälen innerhalb der ersten Dekade lokalisiert waren (Abbildung 3.12). Die rote Population entspricht der Population der toten Zellen, die orange Population der Population der Trümmer und die blaue Population entspricht den lebenden Zellen.

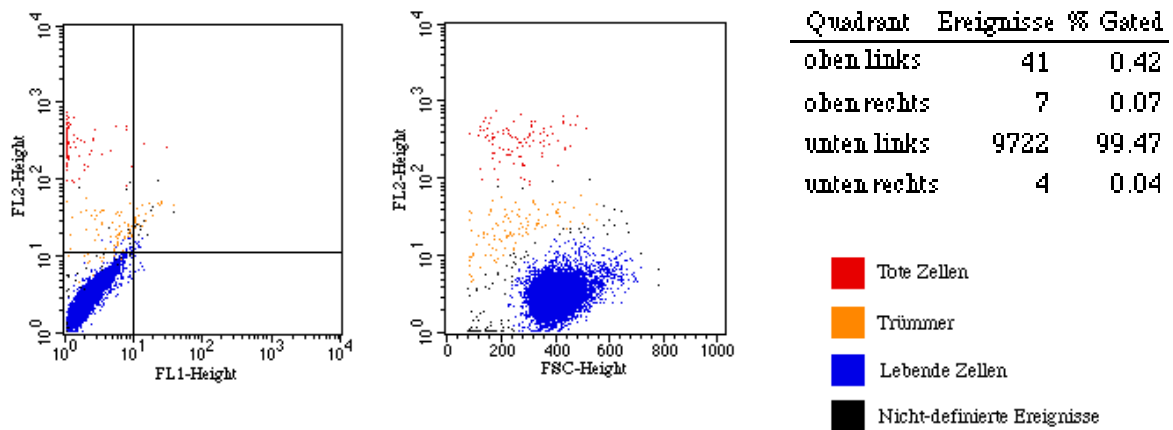


Abbildung 3.12 Punktwolkendiagramme von unbehandelten Zellen

### 3.7.3 Analyse von Zellen nach ballistomagnetischem Transfer von unbeschichtetem Gold

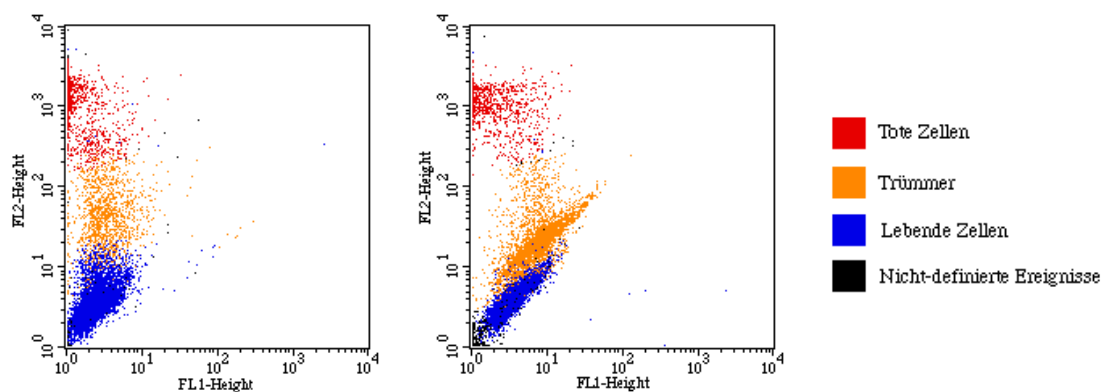


Abbildung 3.13 Punktwolkendiagramme von Zellen nach ballistischem Transfer von unbeschichtetem Gold (0h-Wert)

Zellen wurden direkt nach Transfektion mittels ballistomagnetischen Transfers mit unbeschichtetem Gold und nach 24h Inkubation bei 37°C im Brutschrank mit PI markiert und im Durchflusszytometer gemessen. Der Effekt des ballistomagnetischen Transfer sollte gezeigt werden. Der Anteil der lebenden Zellen lag nach 0h bei ca. 70%, nach 24h bei ca. 60%. Die Fluoreszenz der lebenden Zellen entsprach der Eigenfluoreszenz unbehandelter Zellen (Abbildung 3.13).