

4 Ergebnisse

4.1 Ballistomagnetischer Transfer von Fluoreszein-Isothiocyanat FITC-markierten ODN (FITC-ODN)

Der ballistische Transfer von FITC-ODN diente dazu, die Trefferrate des Verfahrens zu bestimmen. Gelangen die FITC-ODN in die Zellen, fluoreszieren die Zellen, wenn sie mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm bestrahlt werden. Nach dem ballistischen Transfer von FITC-ODN und anschließender magnetischer Sortierung wurden die gewonnenen Zellfraktionen (unsortierte *us* und magnetische *m*) im Fluoreszenzmikroskop betrachtet und im Durchflußcytometer gemessen. Dabei gibt es grundlegende Unterschiede zwischen den beiden Auswertemethoden. Die Auswertung mit dem Mikroskop lässt detaillierte Aussagen über die Morphologie der Zellen zu. Es ist aber sehr schwierig die Zusammensetzung der einzelnen Zellfraktionen (unsortiert, magnetisch) quantitativ zu bestimmen. Messungen im Durchflußcytometer dagegen ermöglichen eine quantitative Aussage über die Anteile der einzelnen Populationen (lebend, nicht-getroffen; lebend, getroffen; tot) der Proben, lassen aber nur eine eingeschränkte Aussage über die Morphologie der Zellen anhand der Parameter Vorwärtsstreulicht/Seitwärtsstreulicht zu.

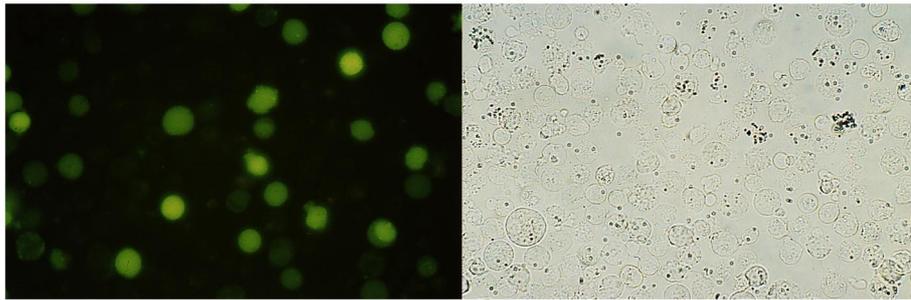
Die Versuche zur Optimierung des ballistomagnetischen Transfers wurden mit der Erythroleukämiezelllinie K562 durchgeführt. Alle Versuche wurden, wie in Abschnitt 3.5.2 beschrieben, durchgeführt.

4.1.1 Auswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop

4.1.1.1 Betrachtung ohne Färbung mit Propidiumjodid (PI)

Abbildung 4.1 zeigt Zellen nach dem ballistomagnetischen Transfer von FITC-ODN (FITC-ODN). Die Konzentration der ODN in der Suspensionslösung vor Auftrocknung auf die Trägerscheiben betrug 300 $\mu\text{mol/l}$. Die Konzentration der Zellsuspension wurde auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und 50 μl der Zellsuspension wurden auf einen Objektträger aufgetragen. So war gewährleistet, dass bei allen Proben die gleiche Anzahl an Zellen im Bildausschnitt zu sehen war.

A



B

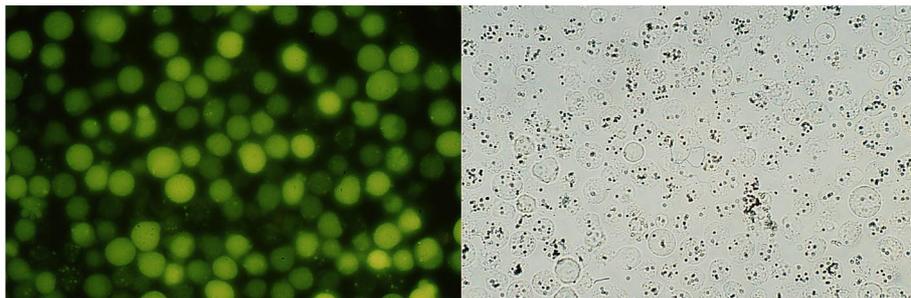


Abbildung 4.1 K562-Zellen nach ballistomagnetischem Transfer von FITC-ODN. A: unsortierte Zellfraktion (links: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme; rechts: Durchlichtaufnahme); B: magnetische Zellfraktion (links: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme; rechts: Durchlichtaufnahme)

Für die Aufnahmen wurde ein Eintauchobjektiv (40x) verwendet. Im oberen Teil der Abbildung sind Zellen direkt nach dem ballistomagnetischen Transfer (unsortierte Fraktion *us*), im unteren Teil Zellen, die nach der magnetischen Sortierung aus der Säule eluiert wurden (magnetische Fraktion *m*) zu sehen. Im linken Teil sind die Fluoreszenzaufnahmen der Zellen, im rechten die Durchlichtaufnahmen des gleichen Ausschnitts abgebildet. Der Anteil der fluoreszierenden Zellen ist in der magnetischen Fraktion (Abbildung 4.1; B) deutlich höher als in der unsortierten (Abbildung 4.1; A). Die Fluoreszenz ist im gesamten Bereich der Zelle lokalisiert. In den Durchlichtaufnahmen sind die Goldpartikel deutlich als kleine schwarze Punkte zu erkennen. In der magnetischen Fraktion sind mehr Goldpartikel zu erkennen als in der unsortierten.

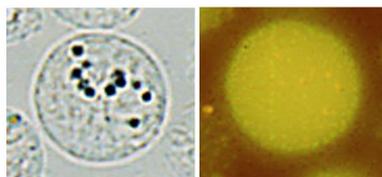


Abbildung 4.2 Ausschnittvergrößerung aus einer fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme von K562-Zellen nach ballistomagnetischem Transfer von FITC-ODN.

Sie befinden sich innerhalb und außerhalb der Zellen. Fast alle Zellen der magnetischen Fraktion enthalten Goldpartikel. Die Zellen enthalten ca 1 bis 10 Goldpartikel. Abbildung 4.2 zeigt eine Zelle, die stark fluoresziert und ca. 10 Goldpartikel enthält, in Vergrößerung.

4.1.1.2 Betrachtung nach Färbung mit PI

Betrachtet man Zellen nach dem ballistomagnetischen Transfer im Fluoreszenzmikroskop, kann man nur erkennen, ob Zellen getroffen wurden oder nicht. Es ist keine Aussage über die Vitalität der Zellen möglich. Es besteht jedoch die Möglichkeit, tote Zellen durch Zugabe von Propidiumjodid (PI) sichtbar zu machen. PI ist ein dem aus der Molekularbiologie bekannten Ethidiumbromid strukturell sehr ähnlicher Acridinumfarbstoff (Abbildung 4.3).

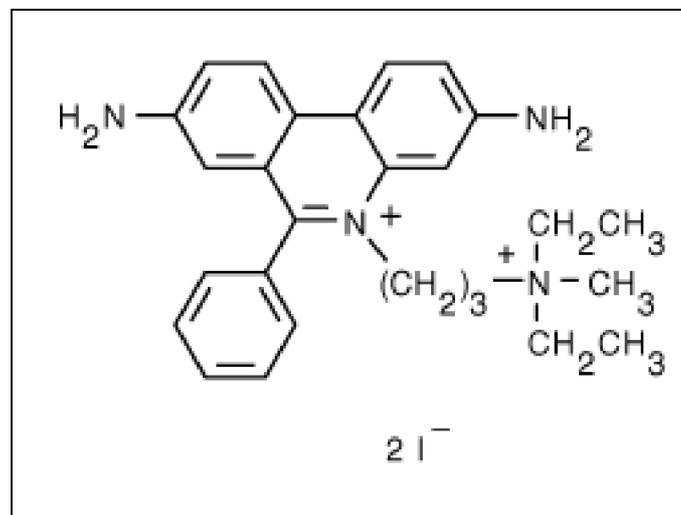


Abbildung 4.3 Strukturformel von Propidium-Jodid

PI interkaliert zwischen die π -Elektronensysteme nebeneinanderliegender Basenpaare. Interkaliertes PI zeigt eine ca. 35-fach erhöhte Fluoreszenz gegenüber freiem PI. Dadurch stört ein Rest an noch freiem PI nicht die Fluoreszenzaufnahmen. PI ist ein geladenes Molekül (Abbildung 4.3) und kann deshalb die Membran intakter Zellen nicht durch passive Diffusion passieren. Es gelangt nur in tote Zellen, deren Zellmembran geschädigt ist und Löcher aufweist und interkaliert dort in die im Nucleus enthaltene DNA. Dadurch ist eine Unterscheidung von toten und lebenden Zellen möglich. PI ist im gleichen Wellenlängenbereich wie FITC anregbar (Abbildung 4.4), emittiert aber längerwelliges Licht (rot-orange).

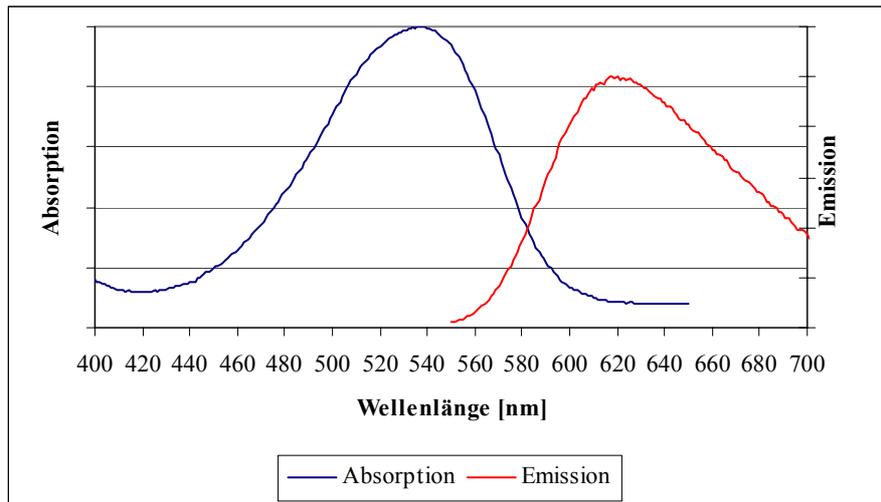


Abbildung 4.4 Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektrum von Propidium-Jodid (PI)

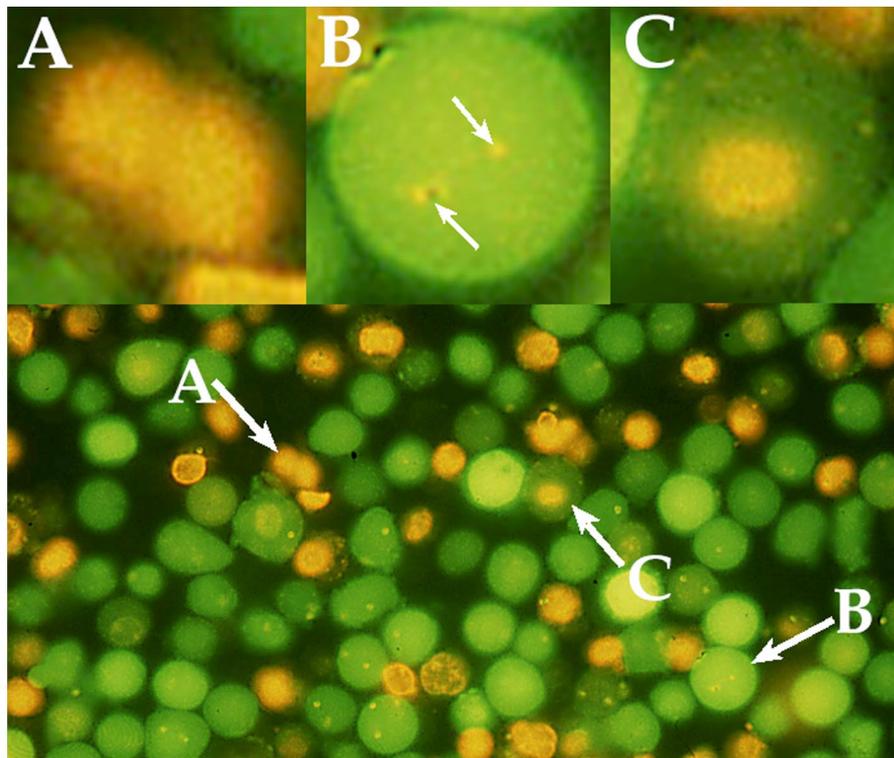


Abbildung 4.5 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Zellen der magnetischen Zellfraktion nach ballistomagnetischem Transfer von FITC-ODN ($c=400 \mu\text{M}$ in der Auftragslsg.) und anschließender Färbung mit PI; Obere Reihe: Vergrößerung von A: einer PI-gefärbten Zelle; B: einer FITC-ODN transfizierten Zelle; C: FITC-ODN transfizierten und PI-markierten Zelle

In Abbildung 4.5 sind Zellen der magnetischen Fraktion gezeigt, die unmittelbar nach Durchführung des ballistomagnetischen Transfers mit PI angefärbt wurden. Die Fluoreszenz des PI unterscheidet sich stark von der Fluoreszenz des FITC und ist hauptsächlich im Bereich des Kernes lokalisiert. Zellen, die eine PI-Fluoreszenz zeigen, zeigen gar keine oder nur eine sehr schwache FITC-Fluoreszenz. Die beiden

Hauptpopulationen sind FITC-positive/PI-negative (siehe B in Abbildung 4.5) und FITC-negative/PI-positive Zellen (siehe A in Abbildung 4.5). Das Verhältnis liegt bei ca. 2:1. Daneben gibt es noch FITC-positive Zellen, die auch eine Propidium-Fluoreszenz zeigen (siehe C in Abbildung 4.5). Deutlich sind auch bei dieser Aufnahme die Goldteilchen in den getroffenen Zellen zu erkennen (siehe Pfeile in der vergrößerten Aufnahme B in Abbildung 4.5).

4.1.2 Auswertung mit dem Durchflußzytometer

Die Auswertung der Experimente mit dem Durchflußzytometer sollte zu Aussagen über die Zusammensetzung der einzelnen Proben führen. Dabei interessierte der Anteil der getroffenen Zellen an den lebenden Zellen. Die Proben wurden mit einem Durchflußzytometer FacsCalibur der Firma Becton Dickinson gemessen. Die Fluoreszenz des FITC wurde im Fluoreszenzkanal 1 aufgenommen, die Fluoreszenz des Propidiumjodids in Fluoreszenzkanal 3. Die Datenaufnahme erfolgte mit einer logarithmischen Skalierung für die Fluoreszenzkanäle und einer linearen Skalierung für das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht. Die Photomultiplier-Spannung für die Fluoreszenzkanäle wurde so eingestellt, dass FITC- und PI-negative Zellen in der ersten Dekade der Skala lokalisiert waren. Die Auswertung der Meßdaten erfolgte mit dem Programm CellQuest (Becton Dickinson, Heidelberg).

4.1.2.1 Bestimmung der Trefferrate

Abbildung 4.6 zeigt die durchflußzytometrische Auswertung von Zellen nach ballistischem Transfer von FITC-ODN und anschließender magnetischer Sortierung. Es sind nur die lebenden Zellen dargestellt. In Teil A der Abbildung sind die Zellen der unsortierten Zellfraktion gezeigt. Teil B zeigt die magnetische Zellfraktion. Die blaue Kurve stellt die nicht getroffenen Zellen dar (niedrige Fluoreszenz), die grüne Kurve die getroffenen Zellen (hohe Fluoreszenz). Die Fläche unterhalb der Kurven entspricht der Zellzahl der Population. Bestimmt man den Anteil der getroffenen Zellen an der Gesamtzahl der lebenden Zellen, so ergibt sich ein durchschnittlicher Anteil von $26 \pm 4\%$ (Mittelwert aus 13 Einzelmessungen) in der unsortierten Fraktion und $99 \pm 0.4\%$ (Mittelwert aus 18 Einzelmessungen) in der magnetischen Fraktion (Tabelle 4.1). In der unsortierten Fraktion lag der Anteil der lebenden Zellen bei $87\% \pm 2\%$, in der magnetischen bei $79\% \pm 5\%$. Der Anteil der lebenden Zellen in

unbehandelten Zellen lag bei $93\% \pm 3\%$ ($n=9$). Abbildung 4.7 zeigt zusammenfassend die Ergebnisse in einem Diagramm.

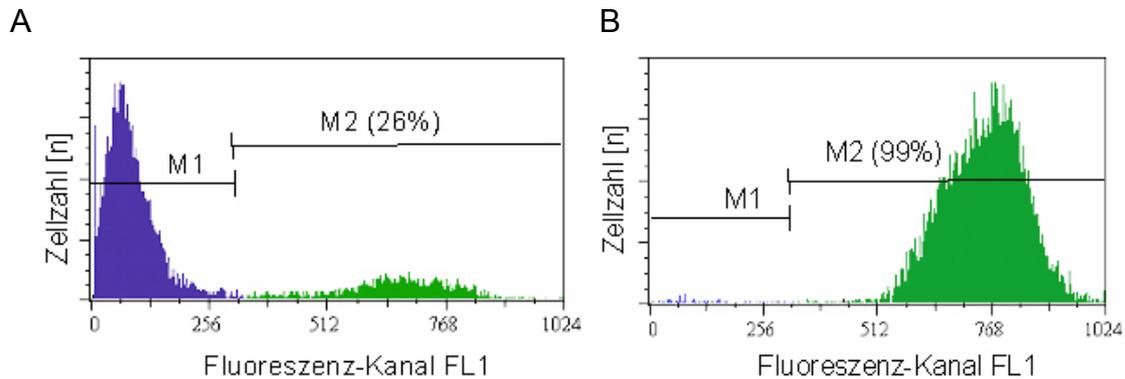


Abbildung 4.6 Histogrammdarstellung von lebenden Zellen der unsortierten (A) und magnetischen (B) Zellfraktion. Es ist die relative Fluoreszenz gegen die Zellzahl aufgetragen. Blaue Population: nicht-getroffene Zellen; Grüne Population: getroffene Zellen.

	Unsortierte Zellfraktion [%]	Magnetische Zellfraktion [%]	Unbehandelte Zellen [%]
Lebende Zellen von allen Events	87	79	93
Lebende, transfizierte Zellen von lebenden Zellen	26	99	0,6

Tabelle 4.1

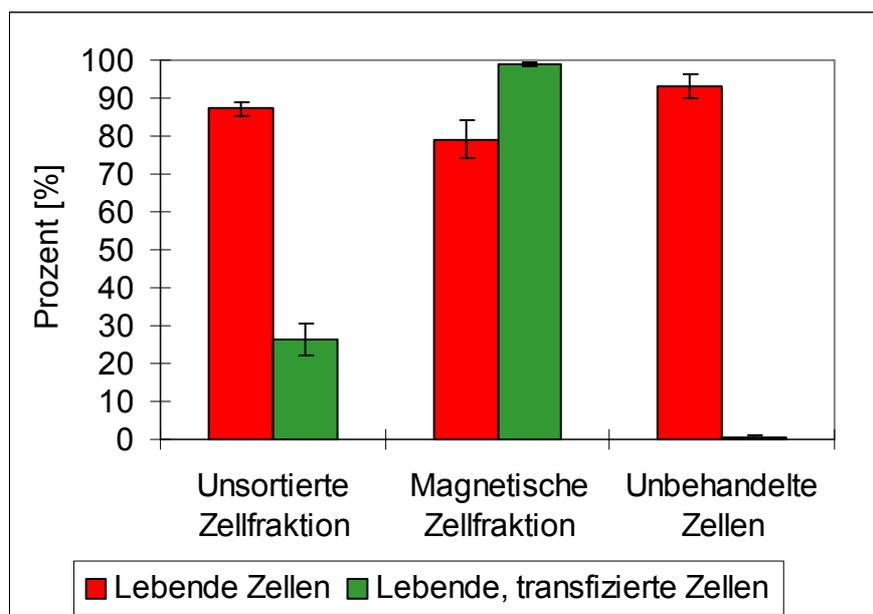


Abbildung 4.7 Vergleich der lebenden und der lebenden, transfizierten Zellen zwischen der unsortierten Zellfraktion (links), magnetischen Zellfraktion und unbehandelten Zellen.

4.1.2.2 Abhängigkeit der Anzahl der transferierten FITC-ODN von der Konzentration

Zur Bestimmung der Anzahl der pro Zelle transferierten ODN wurde mit FITC-gekoppelten Latexpartikeln als internem Standard gearbeitet.

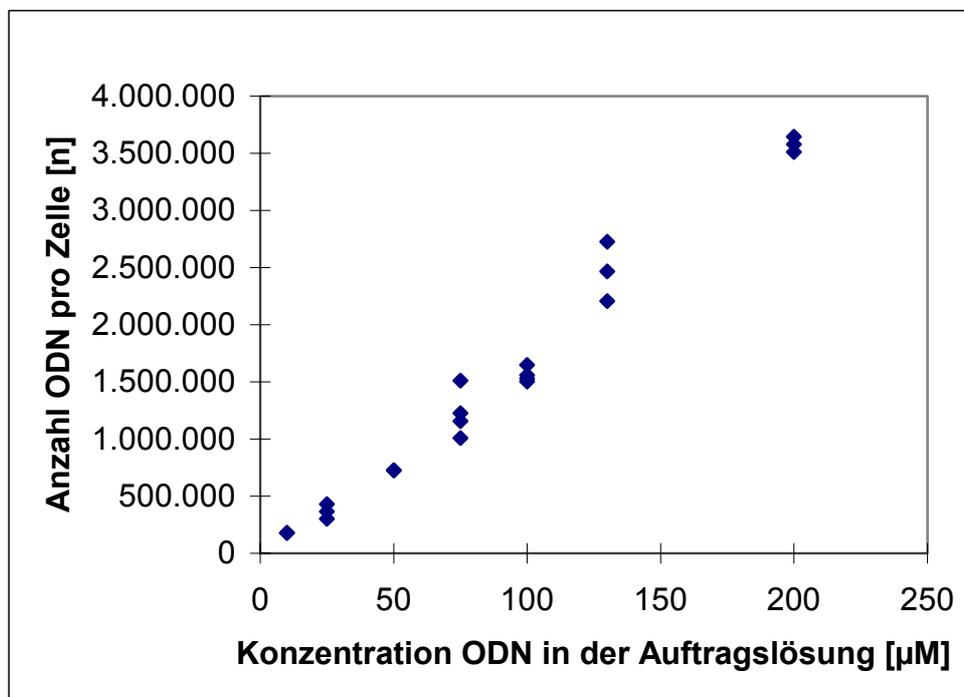


Abbildung 4.8 Anzahl transferierter ODN in Abhängigkeit von der Konzentration in der Auftragslösung

Aus den Fluoreszenzintensitäten der Partikel wurde durch logarithmische Regression eine Standardkurve ermittelt.

Konz. ODN [µM]	Anzahl Transferierter ODN	Konz. ODN [µM]	Anzahl Transferierter ODN
10	178000	100	1650000
25	430000	100	1503000
25	302000	100	1530000
50	728000	130	2726000
75	1511000	130	2206000
75	1157000	200	3510000
75	1010000	200	3645000

Tabelle 4.2 Anzahl transferierter ODN in Abhängigkeit von der Konzentration in der Auftragslösung

Mit Hilfe dieser Standardkurve und der Fluoreszenzintensität der Zellen konnte die Anzahl der in den Zellen befindlichen FITC-Moleküle berechnet werden. Die Fluoreszenzstandards wurden käuflich erworben und hatten einen Durchmesser von ca. 7 μm . Um die Zellen und die Fluoreszenzstandards gleichzeitig messen zu können, wurde das Vorwärtstrellicht mit einer logarithmischen Skalierung gemessen. Zur Bestimmung der Eigenfluoreszenz der Zellen wurden unkonjugierte ODN in die Zellen transferiert. Abbildung 4.8 zeigt die Abhängigkeit der Anzahl der transferierten FITC-ODN von der Konzentration der FITC-ODN in der Lösung, die für das ballistomagnetische Vektorsystem verwendet wurde. In Tabelle 4.2 sind die Ergebnisse tabellarisch zusammengefaßt.

4.1.2.3 Stabilität der FITC-ODN in der Zelle

Nach dem Transfer der FITC-ODN wurde die magnetische Fraktion nach 0, 2, 5, 9, 14, 24 und 48 Stunden durchflußzytometrisch analysiert und die Zahl der in der Zelle befindlichen ODN bestimmt. Zum Vergleich wurden FITC-markierte ODN verwendet, deren Phosphatgruppen durch Phosphothioate ersetzt waren.

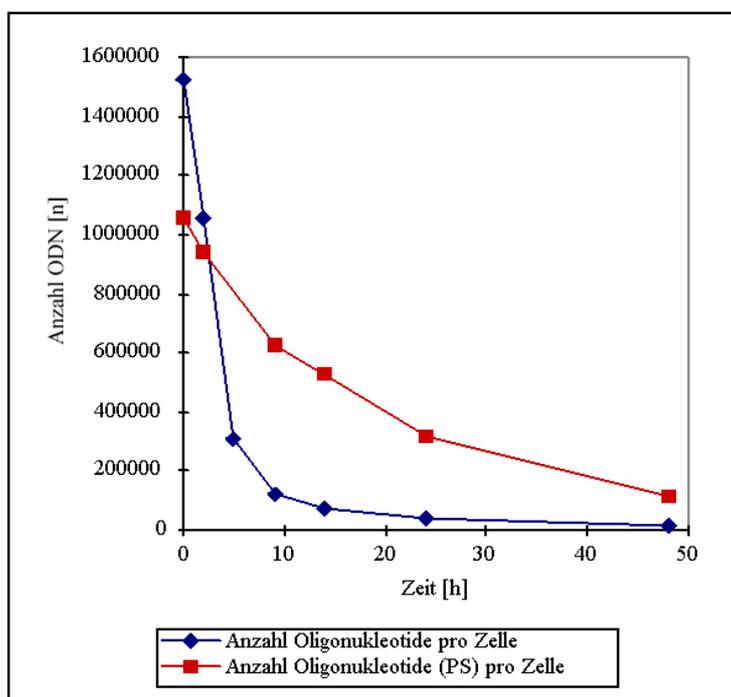


Abbildung 4.9 Stabilität der ODN

Die Konzentration der ODN vor Auftrocknung auf die Trägerscheiben betrug 100 μM . Abbildung 4.9 zeigt den zeitlichen Verlauf der Abnahme der Fluoreszenz der in den Zellen befindlichen ODN. Die rote Kurve entspricht dem zeitlichen Verlauf der Abnahme der unkonjugierten ODN, die blaue Kurve dem der Phosphothioat-

geschützten ODN. Nach 14 h sind nur noch 2.4 % der ursprünglich transferierten ODN in den Zellen vorhanden (27.5 % bei den vollgeschützten ODN).

4.2 Ballistomagnetischer Transfer von „antisense“- ODN

4.2.1 Ballistomagnetischer Transfer von „antisense“- ODN gegen mRNA für G-Protein-Untereinheiten

4.2.1.1 Allgemeines

Das Ausschalten der Genexpression von G-Protein-Untereinheiten durch Mikroinjektion von „antisense“- ODN ist eine etablierte Methode zur Aufklärung der Zusammensetzung von G-Proteinen und deren Rolle in der Signaltransduktion (Lafreniere and Rosenberg 1985; Kleuss, Hescheler et al. 1991; Kleuss, Scherubl et al. 1992; Kleuss, Schultz et al. 1994). In Zusammenarbeit mit E. Dippel und F. Kalkbrenner sollte am Beispiel eines schon mit Mikroinjektion getesteten Systems gezeigt werden, dass es mit dem ballistomagnetischen Vektorsystem möglich ist, die Expression von G-Protein-Untereinheiten selektiv zu hemmen. Mit Hilfe der Mikroinjektion wurde gezeigt, dass in RBL-2H3-hm1-Zellen der humane M1 muscarinerge Rezeptor über ein G-Protein-Komplex, bestehend aus $G\alpha_{q/11}\beta_{1/4}\gamma_4$, an die Phospholipase C β (PLC β) koppelt.

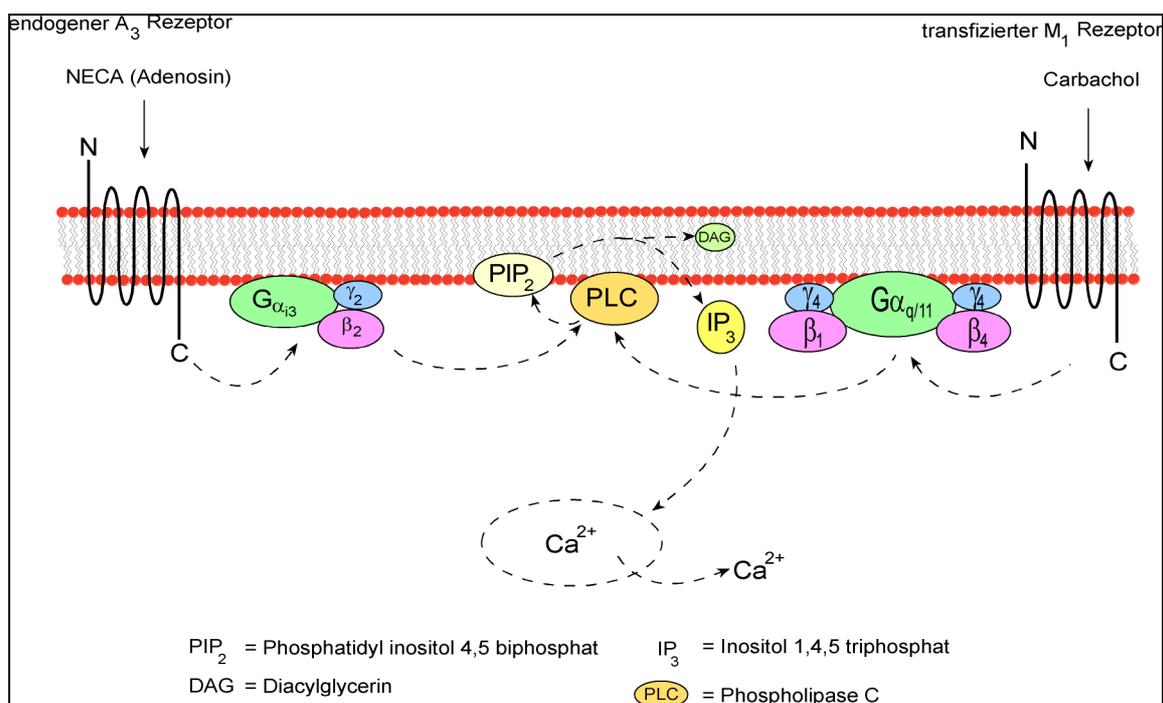


Abbildung 4.10 Signaltransduktionskaskade des endogenen Adenosin A₃-Rezeptors und des transfizierten muscarinischen Rezeptors

Der Adenosin A₃-Rezeptor koppelt selektiv über ein G-Protein Heterotrimer, bestehend aus G $\alpha_{i3}\beta_2\gamma_2$ (Dippel, Kalkbrenner et al. 1996; Kalkbrenner, Dippel et al. 1996; Kalkbrenner, Dippel et al. 1997). Als Maß der PLC β -Aktivität wurde der Anstieg der Ca²⁺-Konzentration mit Einzelzell-Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop nach Beladung der Zellen mit Fura-2 gemessen. Der Anstieg der Ca²⁺-Konzentration wurde als ein Anstieg der Fluoreszenz innerhalb der Zellen beobachtet. Wird die Expression der $\alpha_{q/11}$ -Untereinheit selektiv inhibiert, kann der Anstieg der Ca²⁺-Konzentration nur nach Zugabe des Agonisten NECA des Adenosin A₃-Rezeptors ausgelöst werden. Durch Zugabe des Agonisten des m1-muscarinischen Rezeptors, Carbachol, sollte kein Anstieg der Ca²⁺-Konzentration zu erkennen sein (Abbildung 4.10).

4.2.1.2 Ballistomagnetischer Transfer von „antisense“-ODN gegen gegen mRNA für die $\alpha_{q/11}$ -Untereinheit der G-Proteine

Nach Transfektion der RBL-2H3-hm1-Zellen mit einer Mischung von „antisense“-ODN, die gegen die G α_q und G α_{11} -Untereinheiten der G-Proteine gerichtet waren, wurde der Anstieg der Ca²⁺-Konzentration nach Zugabe von Carbachol und NECA gemessen. Abbildung 4.11 zeigt den Effekt nach Zugabe von Carbachol und NECA. Zellen der magnetischen Fraktion nach Transfektion mit dem ballistomagnetischen Vektorsystem von „antisense“-ODN, die gegen die mRNA von G α_q und G α_{11} gerichtet waren, zeigen einen stark reduzierten [Ca²⁺]_i Anstieg nach Zugabe von Carbachol (durchgezogene Linie). Die Kurve zeigt den mittleren zeitlichen Verlauf der Ca²⁺-Konzentration von 15-20 Zellen. Der Anstieg der [Ca²⁺]_i durch Zugabe von NECA wurde nicht beeinflusst. Zum Vergleich sind Zellen der nicht-magnetischen Fraktion aufgetragen (gestrichelte Linie). Die Zellen reagieren bei Zugabe von Carbachol und NECA mit einem Anstieg der Ca²⁺-Konzentration.

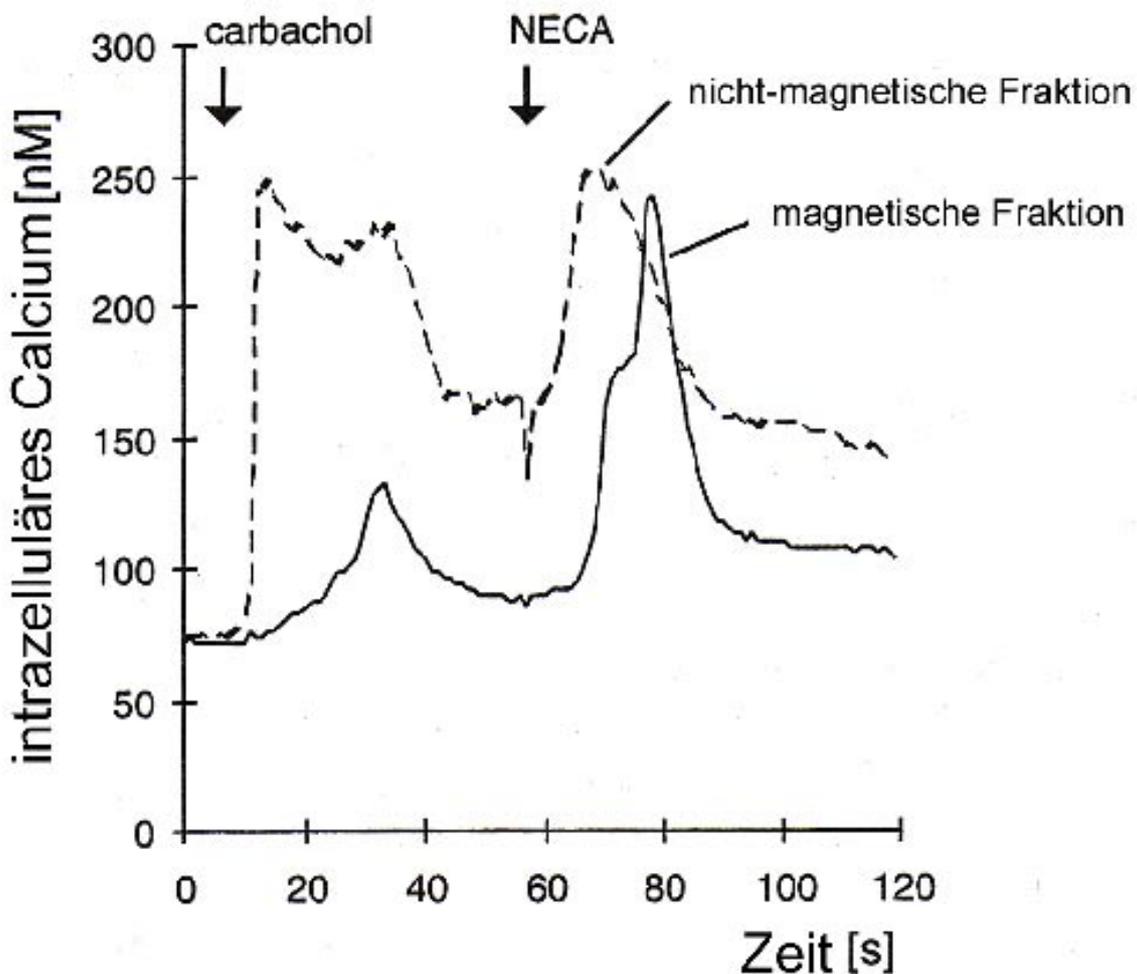


Abbildung 4.11 Calcium-Influx durch Induktion des muscarinischen Rezeptors durch Carbachol und des Adenosin A₃-Rezeptors durch NECA. Gestrichelte Linie: Zellen der nicht-magnetischen Fraktion nach ballistomagnetischen Transfer von antisense ODN gegen den muscarinischen Rezeptor. Durchgezogene Linie: Zellen der magnetischen Fraktion

4.2.2 Ballistomagnetischer Transfer von „antisense“- ODN gegen die mRNA für das grün-fluoreszierende Protein (GFP)

Das grün-fluoreszierende Protein ist ein 27 kDa Monomer (238 Aminosäuren) aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria* und eignet sich sehr gut als Reportermolekül für Genexpression und Proteinlokalisierung *in vivo* und *in situ* (Prasher, Eckenrode et al. 1992; Chalfie, Tu et al. 1994; Wang and Hazelrigg 1994; Chalfie 1995; Inouye, Ogawa et al. 1997). Hier sollte das Protein zum Nachweis für die Wirkung von antisense ODN verwendet werden. GFP emittiert hellgrünes Licht, wenn es mit UV oder hellblauem Licht bestrahlt wird. Anders als andere Reportersysteme benötigt

das GFP keine weiteren Proteine, Substrate oder Kofaktoren zur Emission von Licht. Das aktive Chromophor wird durch 3 Aminosäuren innerhalb des Proteins gebildet (Cody, Prasher et al. 1993). Die Bildung des Chromophors ist sauerstoffabhängig (Niwa, Inouye et al. 1996). Für die Experimente wurden zwei Mutanten des Wildtypproteins verwendet. Die eine Mutante wurde durch Punktmutation aus dem Wildtyp-Protein gebildet und hat an der 65. Aminosäure ein Threonin für ein Serin (GFP-S65T; (Heim and Tsien 1996). Die Fluoreszenz dieser Mutante ist ca 4-6 mal höher als die Fluoreszenz des Wildtyp-Proteins. Die zweite Mutante wurde für maximale Translationseffizienz in Säugerzellen optimiert und hat eine 35fach höhere Fluoreszenz als das Wildtyp-Protein (*enhanced GFP* (eGFP)). Die Proteinexpression kann im Fluoreszenzmikroskop mit dem FITC/PI-Filter und im Durchflusszytometer im Fluoreszenzkanal 1 nachgewiesen werden. Wird die Proteinexpression des GFP durch ballistomagnetischen Transfer von „antisense“-ODN gegen die mRNA des GFP inhibiert, kann keine oder nur eine verminderte Fluoreszenz in den Zellen nachgewiesen werden. Die Expressionsstudien wurden mit dem eGFP durchgeführt, die Experimente mit „antisense“-Oligonukleotiden mit dem GFP-S65T.

4.2.2.1 Gleichzeitiger ballistomagnetischer Transfer von „antisense“-Oligonukleotiden gegen mRNA für das GFP und Expressionsplasmiden für GFP

Durch gleichzeitigen ballistomagnetischen Transfer von antisense ODN gegen GFP und Expressionsplasmiden für GFP sollte erreicht werden, dass die Expression des GFP unterdrückt wird. Zur Kontrolle wurden Zellen mit nonsense- und sense-ODN transfiziert. Zur Bestimmung der Anzahl der transferierten ODN wurden die Zellen mit der gleichen Konzentration von FITC-ODN transfiziert. Die Zellen wurden nach 0, 2, 5, 9, 14, 24 und 48 Stunden durchflußzytometrisch analysiert. Abbildung 4.12 zeigt den zeitlichen Verlauf der Expressionsrate der einzelnen Proben und die durchschnittliche Anzahl der in den Zellen befindlichen ODN. Die Konzentration des Plasmides in der Auftragslösung betrug 0.04 µg/µl. Die Konzentration der „antisense“-ODN in der Auftragslösung betrug 100 µM. Der Versuch wurde mit vollgeschützten ODN wiederholt. Abbildung 4.13 zeigt die Ergebnisse mit den vollgeschützten ODN. Die Expressionsrate des GFP ist bei der Probe, die mit antisense ODN transfiziert wurde, deutlich im Verhältnis zu den Kontrollen reduziert.

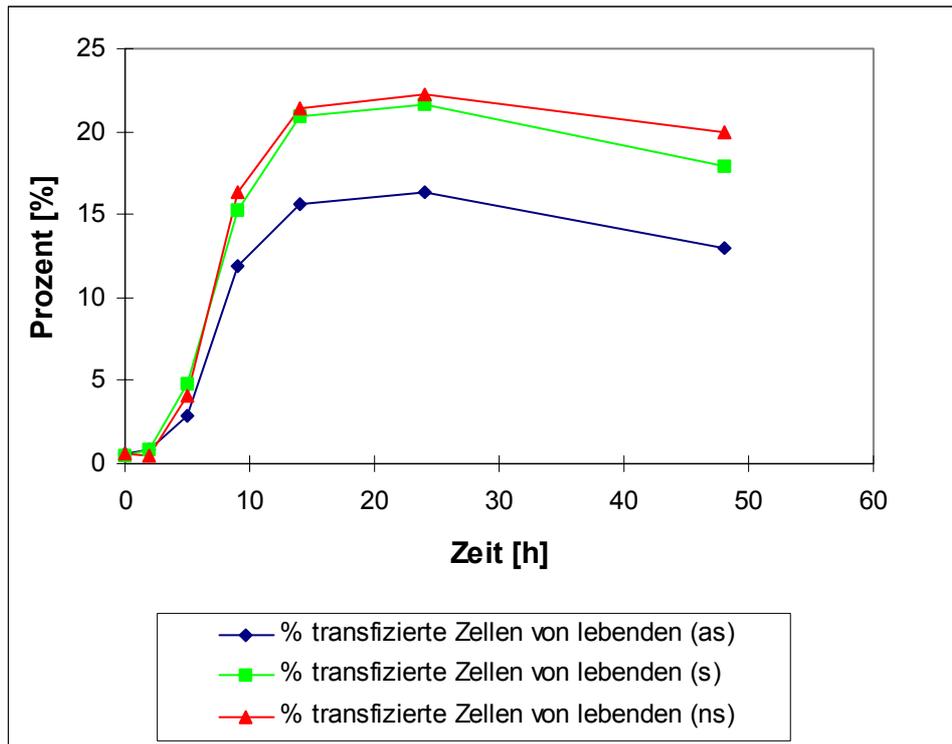


Abbildung 4.12 Inhibition der Expression von GFP durch ungeschützte „antisense“-Oligonucleotide

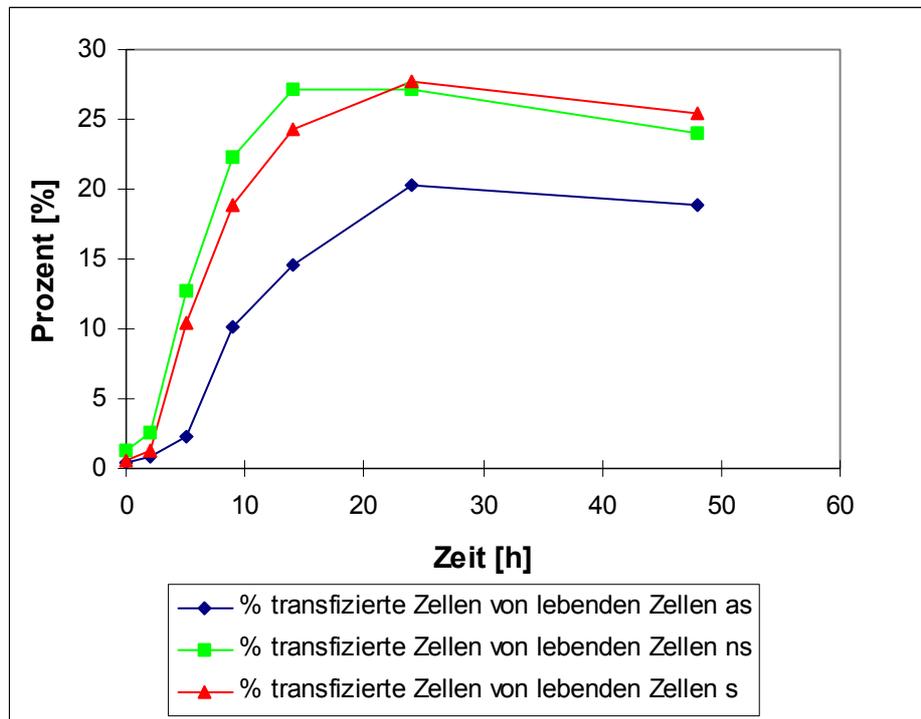


Abbildung 4.13 Inhibition der Expression von GFP durch thioat-geschützte „antisense“-Oligonucleotide

4.3 Ballistomagnetischer Transfer von Expressionsplasmiden

Durch ballistomagnetischen Transfer von Expressionsplasmiden sollte gezeigt werden, dass die DNA nicht nur in die Zelle gelangt, sondern dass das auf dem Plasmid kodierte Gen exprimiert wird. Weiterhin sollte bestimmt werden, wie hoch der Anteil der exprimierenden Zellen an der Gesamtzahl der Zellen ist und wieviel Plasmid in eine Zelle gelangt.

4.3.1 Transfektion mit Expressionsplasmiden für GFP

Das GFP eignet sich hervorragend als Reporterprotein für die Bestimmung der Transfektionseffizienz nach dem ballistomagnetischen Transfer. Wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben, benötigt das GFP keine Kofaktoren, Substrate oder Färbungen zur Emission von Licht. Die Expression von GFP in einzelnen Zellen kann einfach durch Messungen mit dem Durchflusszytometer ermittelt werden. Die Fluoreszenz des GFP kann im gleichen Fluoreszenzkanal wie FITC gemessen werden. Zur Diskriminierung der toten Zellen wurden die Zellsuspensionen vor der Messung mit PI versetzt. Alle Transfektionen wurden mit Plasmidkonzentrationen von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ durchgeführt. Nach der Transfektion von K562-Zellen mit dem ballistomagnetischen Vektorsystem wurden die Zellen magnetisch sortiert. Die unsortierte und die magnetische Fraktion wurden 24 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durchflußzytometrisch analysiert. Der Anteil der transfizierten Zellen war in der magnetischen Fraktion im Durchschnitt 9 ± 3 mal (12 Werte) höher als in der unsortierten Fraktion. Abbildung 4.14 zeigt die durchflußzytometrische Auswertung von Zellen nach ballistischem Transfer des Expressionsvektors pcDNA3-GFP und anschließender magnetischer Sortierung. Im linken Teil der Abbildung sind die Punktwolkendiagramme (Auftragung des Vorwärtsstreulichtes gegen die GFP-Fluoreszenz) und im rechten Teil die dazugehörigen Histogramme der GFP-Fluoreszenz zu sehen.

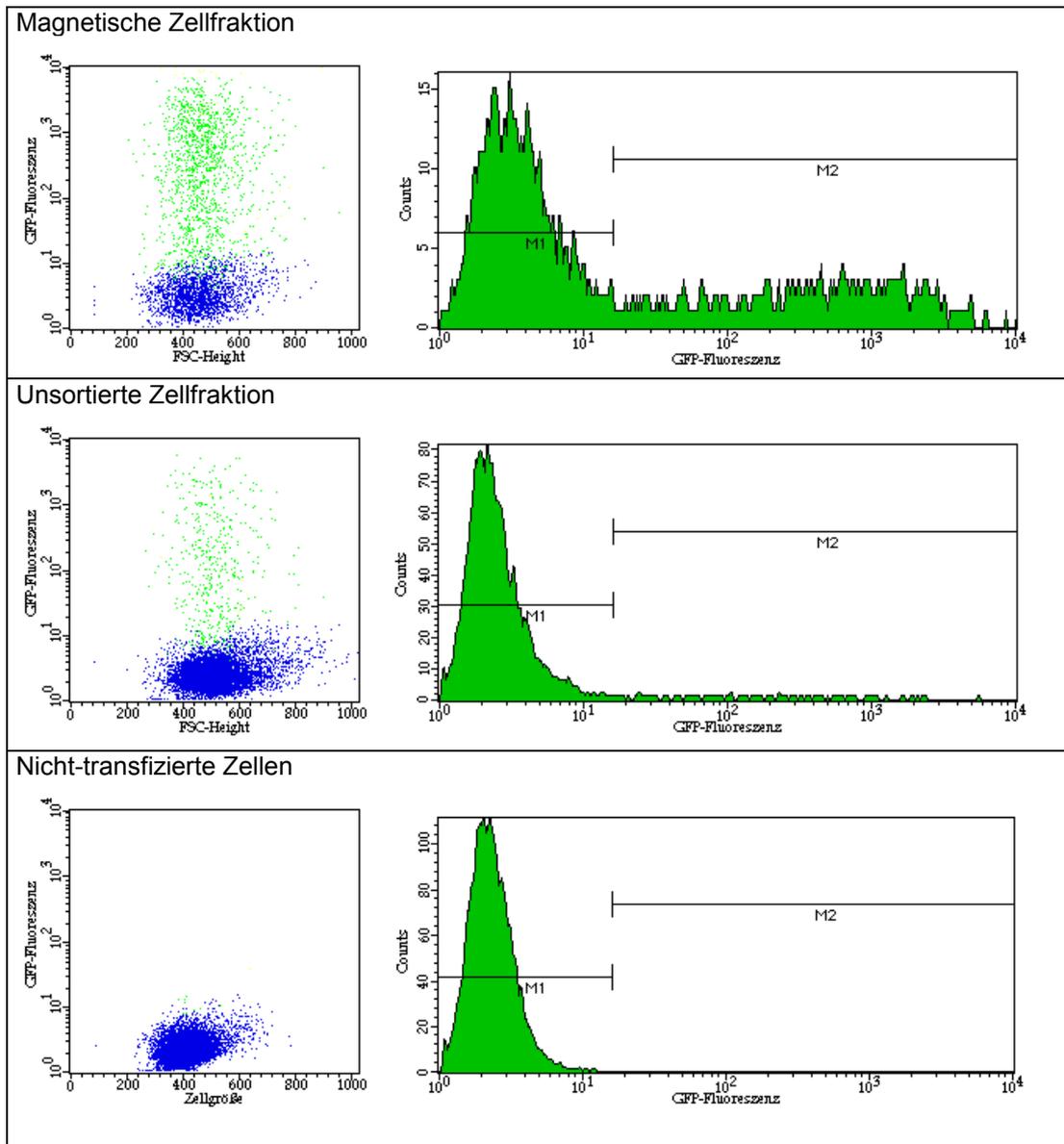


Abbildung 4.14 Durchflußzytometrische Auswertung von Zellfraktionen nach ballistomagnetischem Transfer; links: Punktwolkendiagramm. Auftragung des Vorwärtstreluchts gegen die relative Fluoreszenz im Fluoreszenzkanal 1 (es wurden nur die lebenden Zellen berücksichtigt), rechts: Histogrammdarstellung der relativen Fluoreszenz in Fluoreszenzkanal 1 von lebenden Zellen.

4.3.1.1 Abhängigkeit der Transfektionsrate von der Ausgangskonzentration des Plasmides

Der ballistomagnetische Transfer wurde mit Plasmidkonzentrationen in der Auftragslösung zwischen 0.02 und 2.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ durchgeführt. Es wurde der Vektor pcDNA3-GFP verwendet. Die Größe des Plasmides beträgt ca 6500 bp. Nach dem ballistomagnetischen Transfer wurden die Zellen magnetisch sortiert und die magnetische Fraktion wurde bei 37°C für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die

magnetischen Fraktionen im Durchflusszytometer gemessen und der Anteil der lebenden, exprimierenden Zellen ermittelt.

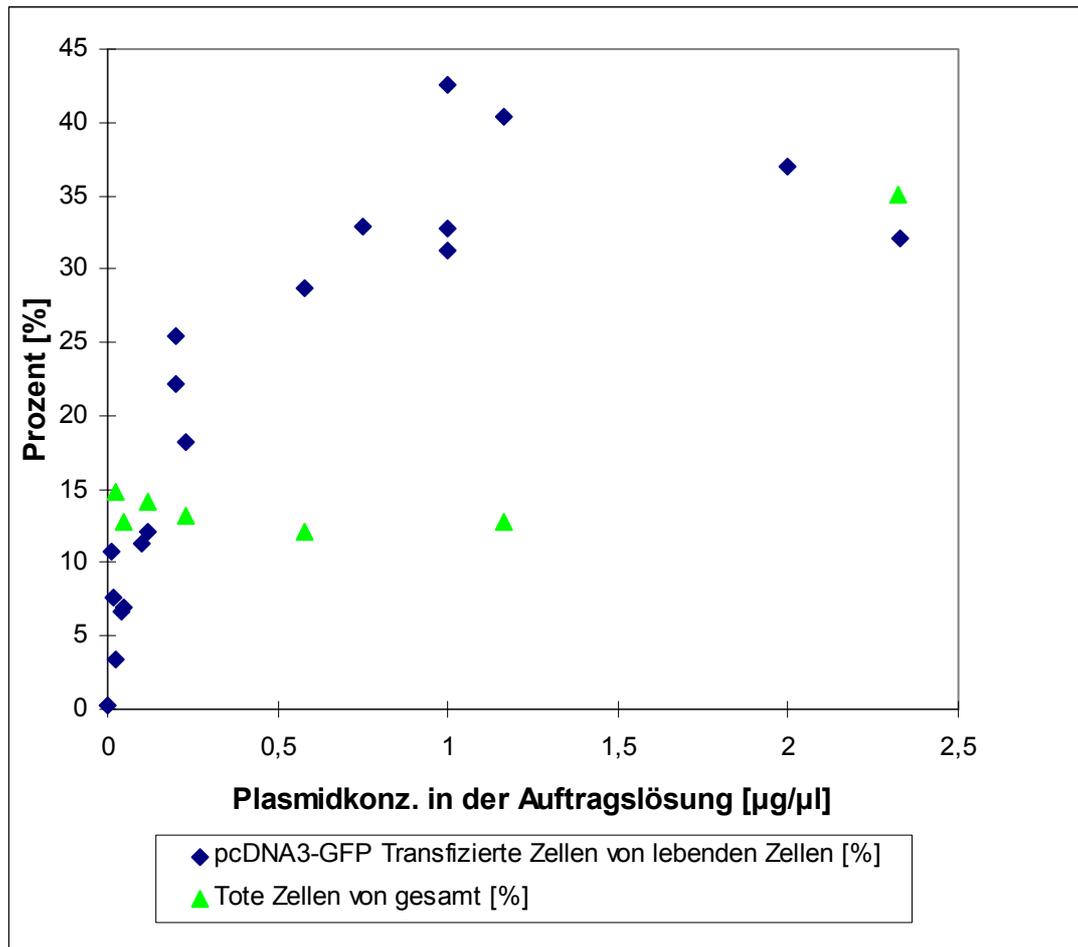


Abbildung 4.15 Grafische Darstellung der Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von der Plasmidkonzentration in der Auftragslösung beim ballistomagnetischen Transfer

Abbildung 4.15 zeigt grafisch die Transfektionseffizienz der lebenden Zellen aufgetragen gegen die Plasmidkonzentration in der Ausgangslösung. Die Kurve besitzt ein Maximum von ca. 40% exprimierender Zellen bei einer Plasmidkonzentration von ca. 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Bei höheren Konzentrationen nimmt die Expressionsrate wieder ab. Der Anteil der toten Zellen bleibt bei Plasmidkonzentrationen zwischen 0 und 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ konstant bei ca. 12 %. Bei höheren Plasmidkonzentrationen steigt der Anteil toter Zellen deutlich an.

4.3.1.2 Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von der Größe des Plasmides

Um die Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von der Größe des Plasmides zu untersuchen wurden Transfektionen mit dem Plasmid pCEP4-GFP durchgeführt. Das Plasmid hat eine Größe von ca. 11100 bp. Damit ist es fast doppelt so groß wie

das Plasmid pcDNA3-GFP. Es wurden K562-Zellen mit Plasmidkonzentrationen von 0.2, 0.5, 1.0 und 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mit dem ballistomagnetischen Vektorsystem transfiziert. Anschließend wurden die Zellen magnetisch sortiert und die magnetische Fraktion wurde im Brutschrank bei 37 °C für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Abbildung 4.16 zeigt grafisch die Transfektionseffizienz der lebenden Zellen aufgetragen gegen die Plasmidkonzentration (rote Kurve). Zum Vergleich wurden die Werte, die mit dem Plasmid pcDNA3-GFP ermittelt wurden, aufgetragen (blaue Kurve). Die Transfektionseffizienzen beider Plasmide liegen in der gleichen Größenordnung.

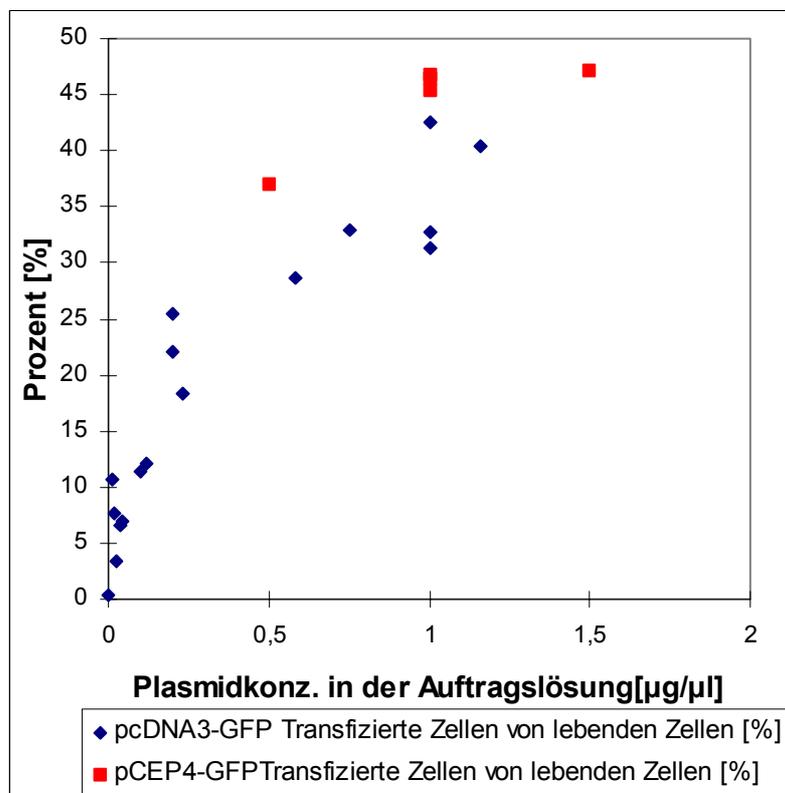


Abbildung 4.16 Grafische Darstellung der Abhängigkeit der Expressionsrate von der Größe des Plasmides

4.3.2 Anzahl der Plasmidmoleküle pro Zelle

Zur Ermittlung der Anzahl transferierter Plasmidmoleküle wurde eine für dieses spezielle Problem geeignete PCR entwickelt (siehe Abschnitt 3.6). Nach der Transfektion der Zellen mit dem ballistomagnetischem Transfer wurden die Zellen magnetisch sortiert und die magnetische Fraktion gesammelt. Mit den Zellen der magnetischen Fraktion wurde ein Proteaseverdau und anschließend eine PCR mit fluoreszenz-markierten Primern durchgeführt. Die Zyklenzahl betrug 11 Zyklen. Anschließend wurde mit den Proben eine Gelelektrophorese auf einem LI-COR-

Sequenzierautomaten durchgeführt, die Intensität der Produktbanden bestimmt und die durchschnittliche Anzahl der Plasmide pro Zelle bestimmt.

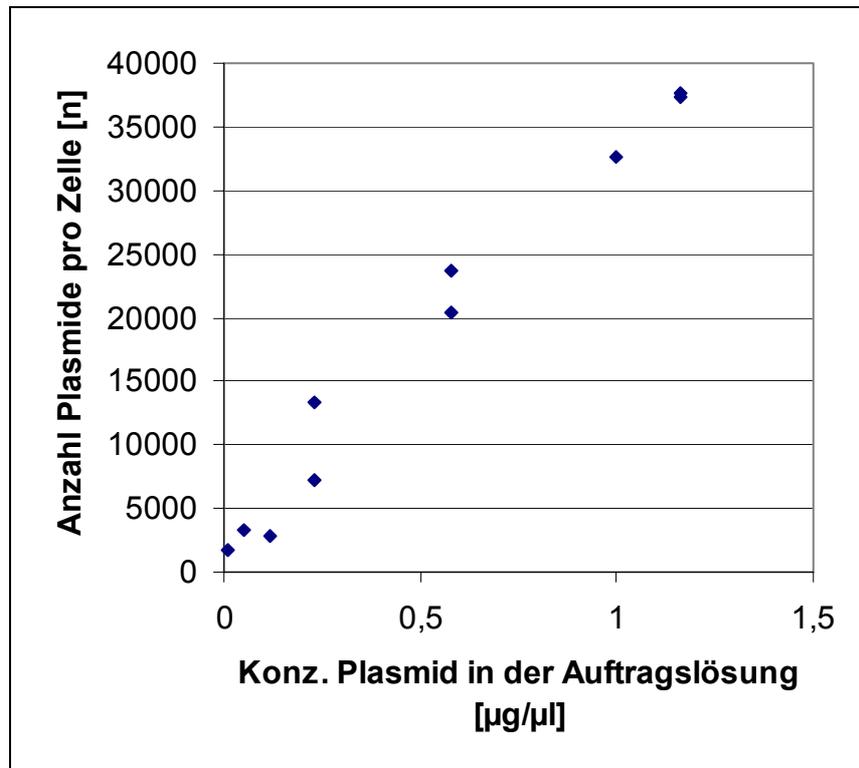


Abbildung 4.17 Grafische Darstellung der Abhängigkeit der Plasmidzahl pro Zelle von der Plasmidkonzentration in der Auftragslösung beim ballistomagnetischen Transfer

Abbildung 4.17 zeigt die Ergebnisse der PCR für unterschiedliche Plasmidkonzentration vor dem ballistomagnetischen Transfer. Die Anzahl transferierter Plasmide lag zwischen ca. 1700 Plasmiden bei einer Ausgangskonzentration von 0.01 µg/µl und über 35000 Plasmiden bei einer Konzentration des Plasmides von 1,25 µg/µl.

4.3.3 Nachweis von Plasmiden im Kern nach ballistomagnetischem Transfer

Nach ballistischem Transfer von pcDNA3-GFP (Konzentration in der Auftragslösung 1 µg/µl) und anschließender magnetischer Sortierung wurden von einem Teil der Zellen der magnetischen Fraktion die Kerne isoliert (siehe Abschnitt 3.2). Mit der DNA aus den Fraktionen der Kernisolierung (Cytosolische Fraktion 1, cytosolische Fraktion 2, Kernfraktion) und den restlichen Zellen der magnetischen Fraktion wurde eine PCR durchgeführt zum Nachweis von Plasmidmolekülen in den Kernen. Zur Qualitätskontrolle der Kernisolierung wurde mit den oben genannten Fraktionen eine PCR mit spezifischen Primern für das Cytochrom-c-Oxidase-Gen durchgeführt. Das Cytochrom-c-Oxidase-Gen ist ein mitochondriales Gen. Ist die Isolierung der Kerne

von den zytosolischen Anteilen vollständig erfolgt, darf in der PCR mit den Cytochrom-c-Oxidase-Gen spezifischen Primern kein Produkt in der Kernfraktion zu sehen sein. Abbildung 4.18 zeigt ein Agarosegel des PCR-Experimentes.

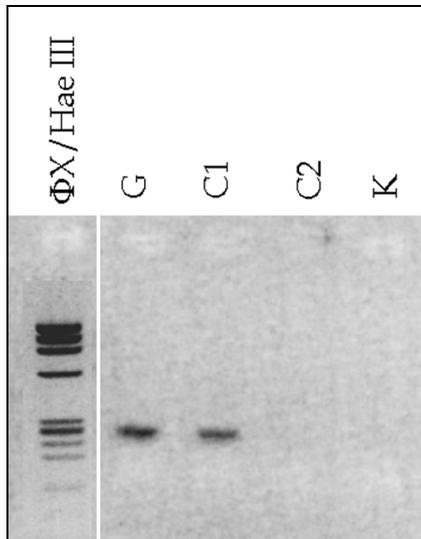


Abbildung 4.18 Agarose-Gel einer PCR mit spezifischen Primern für das Cytochrom-c-Oxidase-Gen mit Fraktionen nach einer Kernisolierung (G: Zellen vor der Kernisolierung, C1: cytosolische Fraktion 1, C2: cytosolische Fraktion 2, K: Kernfraktion)

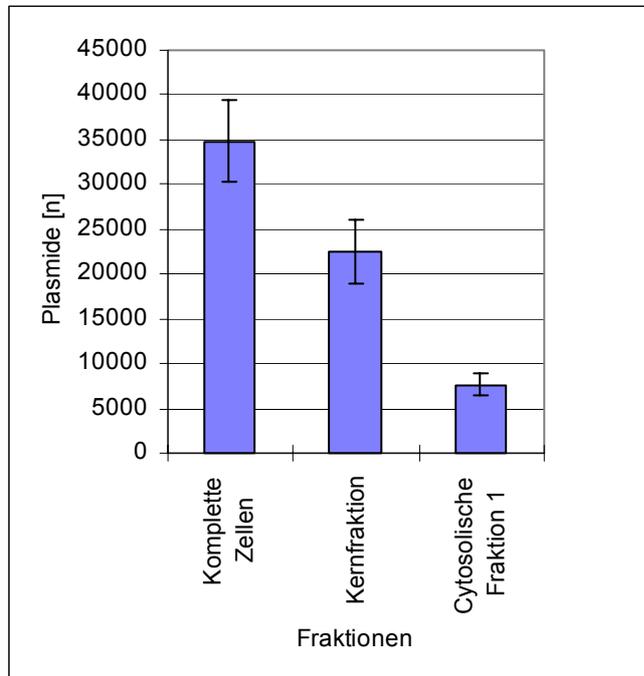


Abbildung 4.19 Quantitative PCR mit pcDNA3-GFP spezifischen Primern von Zell-Lysat (links), Kernfraktion (mitte) und cytosolischer Fraktion (rechts, jeweils dreifach Bestimmung)

Es ist deutlich zu sehen, dass das Signal nur bei den intakten Zellen und der cytosolischen Fraktion 1 zu sehen ist. Mit den gleichen Fraktionen wurde eine quantitative PCR mit den pcDNA3-GFP spezifischen Primern durchgeführt. Abbildung 4.19 zeigt die Ergebnisse dieser PCR als Säulendiagramm.

4.3.4 Transfektion mit anderen Expressionsplasmiden

Neben der Transfektion mit Expressionsplasmiden Für das GFP wurden der ballistomagnetische Transfer mit anderen Expressionsplasmiden getestet. Dabei handelte es sich um das Expressionsplasmid pCR3-Luciferase, einem Expressionsplasmid für das Luciferase-Gen unter der Kontrolle des CMV-Promotors, und einem Expressionsplasmid für das Membranprotein C-CAM. Dieses Expressionsplasmid und ein polyklonaler Antikörper gegen C-CAM wurden freundlicherweise von L. Lucka aus der AG Reutter (Biochemie, FB Humanmedizin der FUB) zur Verfügung gestellt. Mit dem Antikörper konnte eine Immunfluoreszenzfärbung gegen das C-CAM-Protein durchgeführt werden. Anschließend konnten Zellen, die das C-CAM-Protein exprimierten, im

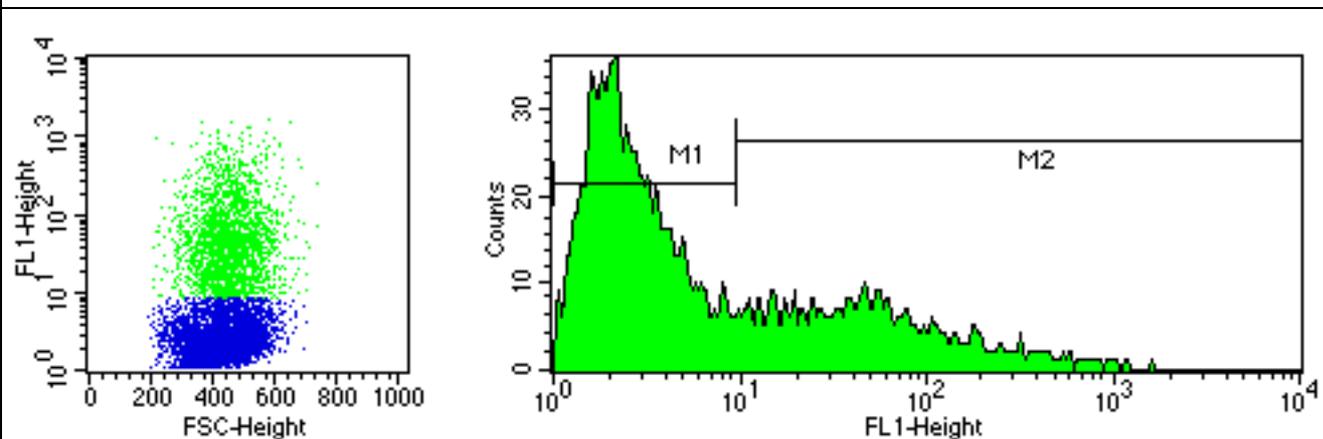
Durchflußcytometer analysiert werden. Weiterhin standen Expressionsplasmide für die Membranproteine CD40 (B7-1), CD80 (B7-2) und CD86 zur Verfügung. Auch für diese Proteine waren Antikörper verfügbar, die für die Analyse im Durchflußcytometer geeignet sind.

Mit pCR3-Luciferase transfizierten Zellen wurden Biolumineszenz-Messungen mit einem Luminometer (Fa. Beckmann) durchgeführt. Dabei wurde ein Durchschnittswert der Biolumineszenz für alle in der analysierten Probe befindlichen Zellen ermittelt. Die Menge an Biolumineszenz der Probe war ein Maß für die Transfektionseffizienz.

4.3.4.1 Transfektion mit Expressionsplasmiden für C-CAM, CD40, CD80 oder CD86

Der ballistomagnetische Transfer wurde mit einer Plasmidkonzentration von $1.0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ in der Auftragslösung durchgeführt. Die Transfektionseffizienz lag nach Durchführung des ballistomagnetischen Vektorsystems in der magnetischen Fraktion zwischen 33 und 53 % und damit im Bereich der Transfektionseffizienz des GFP. Abbildung 4.17 zeigt die durchflußcytometrischen Auswertungen von K562-Zellen nach Transfektion mit Expressionsplasmiden jeweils eines Proteins (A: B7-1, B: B7-2, C: CD40, D: C-CAM) und anschließender magnetischer Sortierung. In der Abbildung ist das Punktwolkendiagramm (Auftragung des Vorwärtsstreulichtes gegen die Antikörper-Fluoreszenz) und das dazugehörige Histogramm der Antikörper-Fluoreszenz gezeigt.

A CD80



B CD86

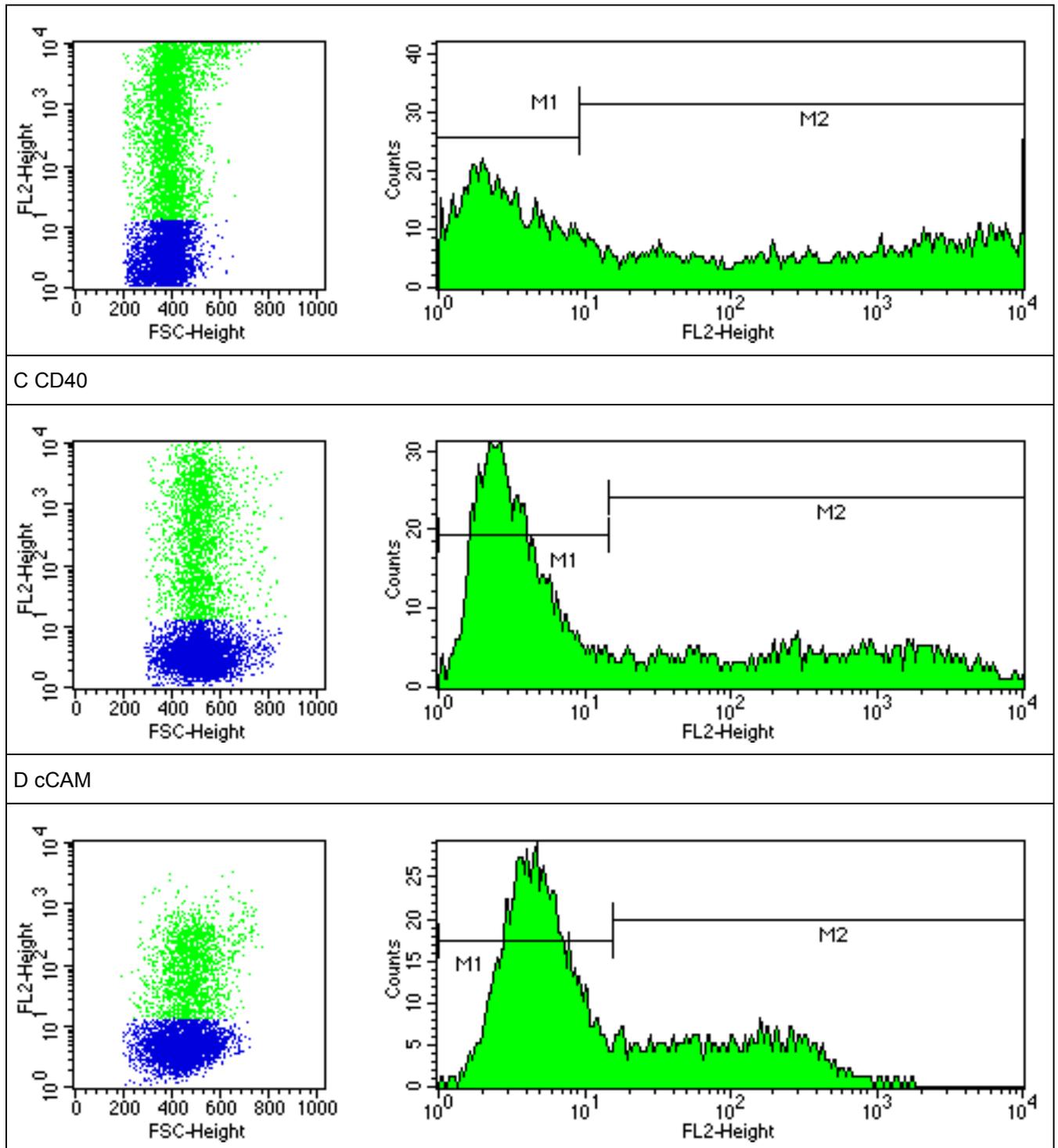


Abbildung 4.20 Histogrammdarstellung von lebenden Zellen der magnetischen Fraktion transfiziert mit Expressiononstrukten kodierend für A: B7-1, B: B7-2; C: CD40 und D: cCAM

4.3.4.2 Transfektion mit Luciferase

Nach Transfektion von K562-Zellen mit dem ballistomagnetischen Vektrosystem mit pCR3-Luciferase (Vektorkonz. in der Auftragslösung: 0.88 µg/µl) und anschließender magnetischer Sortierung wurden die Zellen der unsortierten und der magnetischen Fraktion 24 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Zellzahl der beiden Fraktionen bestimmt und 1×10^5 Zellen in den Luciferase-Test eingesetzt. Tabelle 4.3 zeigt die Ergebnisse der Luciferase-Tests. Der Anreicherungsfaktor liegt zwischen 8 und 9.

Test	relative Lichteinheiten/10 s		
	Magnetische Zellfraktion	Unsortierte Zellfraktion	Anreicherungsfaktor
1 (Mittelwert aus 4-fach-Bestimmung)	2013307	262417	7.7
2 (Mittelwert aus Doppelbestimmung)	1550931	172903	9.1

Tabelle 4.3

4.3.4.3 Gleichzeitige Transfektion von Zellen mit Expressionsplasmiden für CD40, CD80 und CD86

Gerade im Bereich der Gentherapie ist es häufig notwendig mehrere Gene gleichzeitig in einer Zelle zu exprimieren. Durch die Transfektion von 3 Oberflächenproteinen sollte gezeigt werden, dass der größte Teil der transfizierten Zellen alle 3 transfizierten Gene exprimiert. Abbildung 4.19 zeigt Punktwolkendiagramme einer Auswertung im Durchflusszytometer von K562 Zellen nach gleichzeitiger Transfektion von Expressionskonstrukten für CD40, CD80 und CD86. Die Zellen wurden mit einem Gemisch von Antikörpern spezifisch für jeweils ein Oberflächenantigen (anti-CD80 (FITC-markiert), anti-CD86 (PE-markiert) und anti-CD40 (PerCP-markiert) gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer gemessen. Zur Auswertung wurden die Zellen in drei Gruppen eingeteilt:

- nicht-transfizierte Zellen
- Zellen, die 1-2 der transfizierten Oberflächenantigene exprimieren
- Zellen, die alle 3 transfizierten Oberflächenproteine exprimieren.

In der Tabelle 4.4 sind die Ergebnisse zusammengefasst. 24 h nach der Transfektion waren 30 % der Zellen gestorben. Von den 70 % lebenden Zellen waren 43 % transfiziert. 70 % der transfizierten Zellen exprimierten alle 3 Oberflächenproteine, die transfiziert wurden.

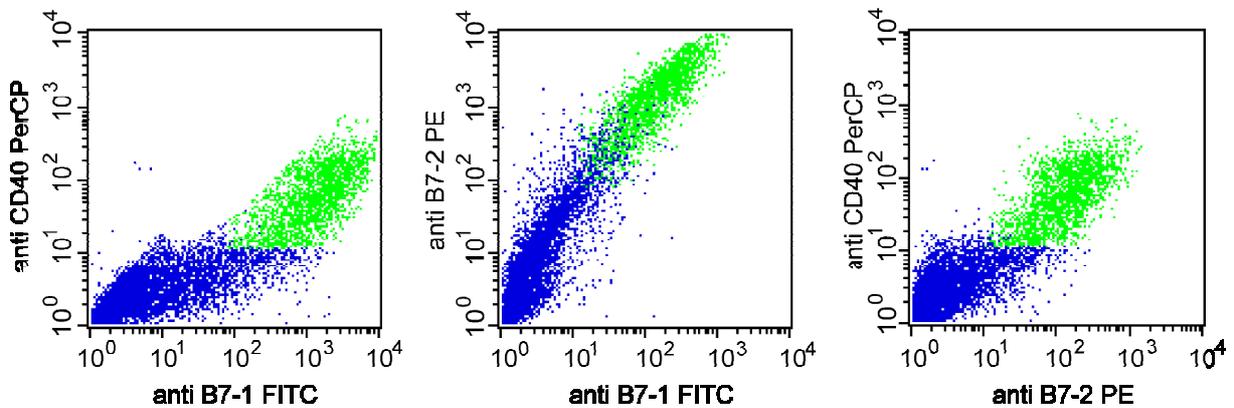


Abbildung 4.21 Punktwolkendiagramme einer durchflusszytometrischen Auswertung von K562-Zellen, die mit 3 Expressions-konstrukten gleichzeitig mit dem ballistomagnetischen Transfer transfiziert wurden.

Population	Anteil an lebenden Zellen [%]
Lebende nicht-transfizierte Zellen	55,5 %
Lebende Zellen, die mindestens ein Protein exprimieren	15,2 %
Lebende Zellen, die alle 3 Proteine exprimieren	29,3 %

Tabelle 4.4