

## 5 Diskussion

In meiner Dissertation habe ich die Entwicklung und Anwendung eines Verfahrens beschrieben, mit dessen Hilfe Zellen effektiv und einfach transfiziert werden können.

Im ersten Teil der Arbeit konnte ich mit der Transfektion von ODN zeigen, dass es mit meinem Verfahren möglich ist, eine Population von Zellen zu isolieren, in der mehr als 90% der Zellen getroffen sind. Mit Hilfe des Verfahrens sollte durch Einbringen von „antisense“-ODN in die Zellen gezielt Gene ausgeschaltet werden. Dies wurde am Beispiel von zwei Modellsystemen getestet.

Im zweiten Teil der Arbeit habe ich Experimente mit Plasmid-basierten Genexpressionskonstrukten durchgeführt. Dabei stand die Frage im Vordergrund, wie viele Zellen tatsächlich nach der Transfektion das transfizierte Gen exprimieren. Besondere Gesichtspunkte dabei waren die quantitative Ermittlung der Anzahl der transferierten Plasmide und die Optimierung der Transfektionsmethode in Hinblick auf die Transfektionseffizienz. Dazu habe ich eine quantitative PCR-Methode entwickelt, die für diese Fragestellung geeignet war.

### 5.1 Allgemeines zur Auswertung mit dem Durchflusszytometer

Die Durchflusszytometrie ist ein geeignetes Hilfsmittel zur Charakterisierung von Zellen. In meiner Doktorarbeit war die Durchflusszytometrie eine zentrale Methode zur Bestimmung von Trefferraten und Transfektionseffizienzen. Die bei der Auswertung der aufgenommenen Daten erhaltenen Werte bedürfen einer näheren Betrachtung. Tote Zellen konnten leicht von lebenden diskriminiert werden, indem die gesamte Zellsuspension mit Propidiumjodid versetzt wurde. Zellen, deren Zellemembran stark geschädigt war, wurden durch das Propidiumjodid markiert, intakte Zellen dagegen nicht. Die toten Zellen waren bei der Auswertung leicht zu erkennen, weil das Propidiumjodid in Fluoreszenzkanal 2 und 3 stark fluoresziert. Trägt man die Propidiumjodid-Fluoreszenz der toten Zellen in einer Histogrammdarstellung auf, erkennt man zwei Populationen. Die Fluoreszenz der einen Population ist doppelt so hoch wie die der anderen. Man erkennt also deutlich die unterschiedlichen Phasen im Zellzyklus (Abbildung 5.1). Dieses Phänomen ist bekannt und wird bei Zellzyklus-Analysen häufig benutzt. Hier dient es nur als Nachweis, dass es sich bei den von mir als „tote Zellen“ interpretierten

Fluoreszenzereignissen tatsächlich um Signale handelt, die aus Zellen hervorgegangen sind. Betrachtet man das Vorwärtsstreulicht der toten Zellen im Vergleich zu den lebenden Zellen, erkennt man deutlich, dass die toten Zellen weniger stark streuen.

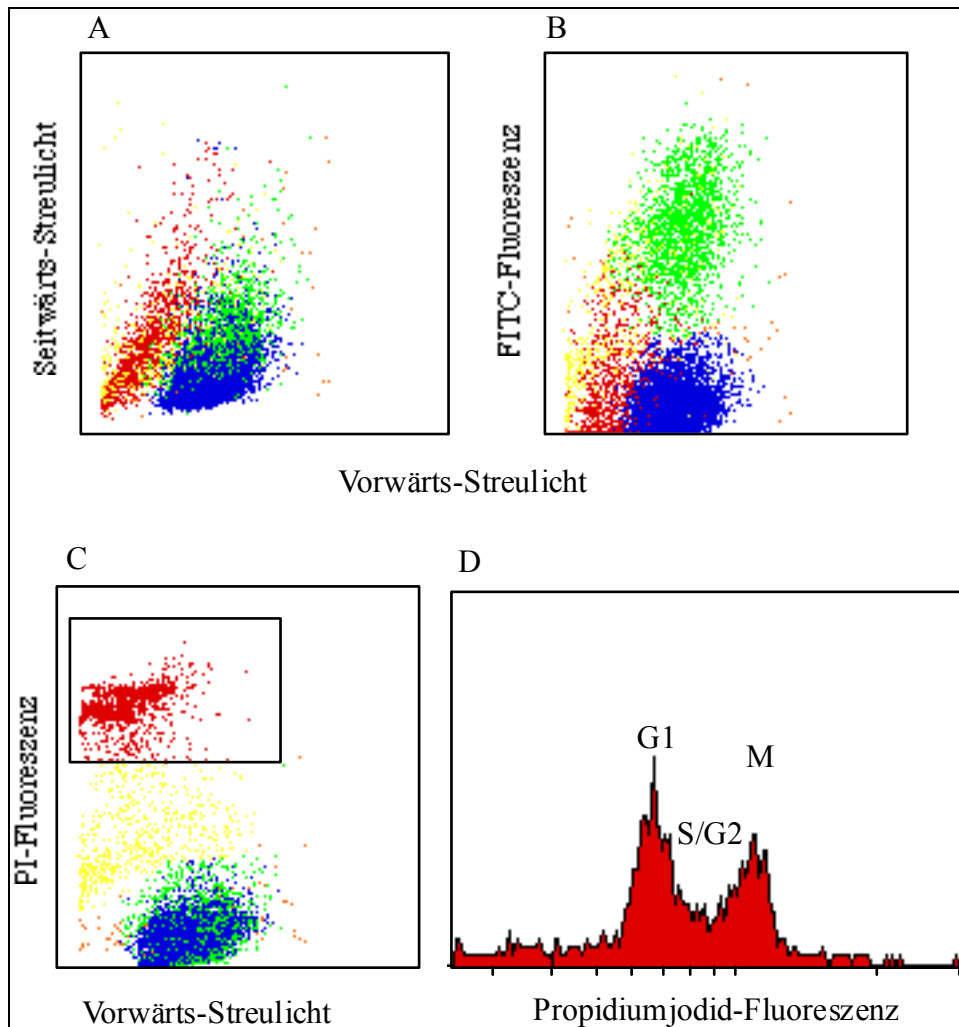


Abbildung 5.1 A-C Punkt-wolkendiagramm von Zellen nach ballistomagnetischem Transfer von FITC-markierten ODN. Rote Population: Tote Zellen. Man erkennt deutlich den Größenunterschied der toten Zellen zu den lebenden Zellen (grüne und blaue Population). Gelbe Population: Zelltrümmer. D Fluoreszenzhistogramm der toten Zellen (markierte Zellen in Darstellung C). Zellen in der M-Phase haben doppelt so hohe Fluoreszenz im Vergleich zu Zellen der G1-Phase. Zellen der S-Phase liegen in der Fluoreszenzintensität zwischen den beiden Populationen. Fluoreszenzachsen in logarithmischer Skalierung mit relativen Einheiten. Streulichtachsen mit linearer Skalierung mit relativen Einheiten.

Da das Streulicht als Maß für die Größe der Zellen dient, kann man daraus schließen, dass die toten Zellen kleiner sind als die lebenden Zellen. Daraus lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

- a. Die Zellmembran der Zellen ist so stark geschädigt, dass der gesamte Inhalt an Zytoplasma verlorengegangen ist oder

b. Die Zellmembran wurde beim Auftreffen der Goldpartikel weggerissen und die toten Zellen sind nur noch durch Kerne repräsentiert.

Da die Beantwortung dieser Frage für die Interpretation der Daten nicht wichtig war, wurden keine weiterführenden Experimente durchgeführt (z.B. Färbung mit spez. Antikörpern gegen Membranproteine der Zellmembran). Neben der eindeutig als tote Zellen zu betrachtenden Population gibt es eine weitere Population, deren Vorwärtsstreulicht geringer ist als das der lebenden Zellen (Abbildung 5.1). Die Propidiumjodid-Fluoreszenz dieser Population ist aber geringer als bei den toten Zellen. Die Population besteht also eindeutig nicht aus Zellen mit komplettem Chromosomensatz. Deshalb habe ich diese Population als Trümmer bezeichnet. Dabei ist es schwierig zu beurteilen, ob die Anzahl der gemessenen Trümmer wirklich der Anzahl ehemals intakter Zellen entspricht. Bei allen Auswertungen bin ich von dieser vereinfachenden Aussage ausgegangen und habe jedes einzelne Ereignis in der Trümmerpopulation als Zelläquivalent eingesetzt, um keine Beschönigung der Daten zu erhalten. Hätte ich die Population aus meiner Auswertung vollständig herausgenommen, wäre der Anteil der lebenden Zellen deutlich gestiegen.

## **5.2 Ballistomagnetischer Transfer von ODN**

### **5.2.1 Ballistomagnetischer Transfer von Fluoreszein-Isothiocyanat-markierten ODN (FITC-ODN)**

Der Transfer von FITC-ODN diente dazu, die Methode des ballistomagnetischen Transfers zu optimieren. In der Doktorarbeit von E. Engelhardt wurde die Transfektionseffizienz der nicht-modifizierten Transfektionsapparatur ermittelt. Der große Nachteil dieser nichtmodifizierten Apparatur besteht darin, dass nur eine sehr kleine Zellzahl transfiziert werden kann. Weiterhin können die transfizierten Zellen nicht von den nicht-transfizierten Zellen abgetrennt werden. Damit war die Apparatur nur für eine sehr beschränkte Zahl von Anwendungen praktikabel. Ihr Hauptanwendungsgebiet liegt vor allem in der Transfektion von Pflanzenzellen (Klein and Fitzpatrick-McElligott 1993). Erst mit der Modifikation der Apparatur war es möglich eine genügend große Zellzahl zu transfizieren, um weitergehende Experimente durchzuführen zu können und diese Transfektionsmethode in klinischen Studien zur Gentherapie von Krebs einzusetzen (Moller, Sun et al. 1998).

Der erste Schritt der Modifikation war die Veränderung der Apparatur selbst. Konnten in der unmodifizierten Apparatur nur ca.  $1 \times 10^6$  Zellen in einem Transfektionsschritt behandelt werden, waren es nach dem Umbau ca. 20 mal so viele Zellen. Wie im Methodenteil beschrieben, wurde dies erreicht, indem bei einem Transfektionsvorgang nicht mehr nur eine Trägerscheibe beschleunigt wurde, sondern sieben. Damit konnten nicht nur Zellen, die in der Mitte einer Petrischale mit einer Fläche von  $9,6 \text{ cm}^2$  angewachsen waren, transfiziert werden, sondern es war möglich, die gesamte Fläche Petrischalen mit einer Fläche von  $78,5 \text{ cm}^2$  abzudecken. Für diese Modifikation wurde die Abstände zwischen Trägerscheibe und Stopp-Gitter und zwischen Stopp-Gitter und den Zellen übernommen, die sich bei der ursprünglichen Apparatur als optimal herausgestellt hatte. Es zeigte sich, dass das Transfektionsergebnis vergleichbar war mit den Versuchen der Ausgangsapparatur. Die ermittelte Trefferrate liegt bei  $26\% \pm 4\%$ .

Durch gleichzeitigen Transfer von Magnetpartikeln und ODN kann nach Durchführung der Transfektion eine magnetische Sortierung angeschlossen werden. Dadurch kann der Anteil der getroffenen Zellen von 26% in der unsortierten Fraktion auf 99% in der magnetischen Fraktion erhöht werden. Der Anteil der lebenden Zellen direkt nach der Transfektion sinkt von 87% in der unsortierten Fraktion auf 79% in der magnetischen Fraktion. Die toten Zellen werden in der magnetischen Fraktion angereichert, da davon auszugehen ist, dass die toten Zellen getroffen und damit auch „magnetisch“ sind. Im Vergleich zu der Anreicherung der getroffenen Zellen in der magnetischen Fraktion um den Faktor 3.4 ist die Zunahme des Anteils der toten Zellen um den Faktor 1.6 in der magnetischen Fraktion jedoch tolerierbar.

Weiterhin wurde auch die Beschichtungsmethode der Goldpartikel mit DNA im Vergleich zu der von dem Hersteller der Apparatur (BioRad) vorgeschlagenen verändert. Die hier verwendete Methode habe ich zum ballistischen Transfer von Proteinen im Rahmen meiner Diplomarbeit entwickelt und sie wurde mit der von BioRad im Rahmen der Doktorarbeit von E. Engelhardt verglichen. Die von mir entwickelte Methode ist einfacher durchzuführen, benötigt weniger Vorbereitungszeit und kann vollständig auf Spermidin verzichten, mit dem die DNA bei der Methode von BioRad an das Gold gebunden wird.

Bei einem Einsatz von  $1 \times 10^7$  Zellen beträgt die Ausbeute in der magnetischen Fraktion  $1.1 \times 10^6$  Zellen. Dies entspricht 9.6% der eingesetzten Zellmenge. Für viele

Anwendungen reicht diese Zellmenge aus. Benötigt man mehr Zellen, muss der ballistomagnetische Transfer mehrfach durchgeführt werden. Bei einer Durchführungszeit von ca. 20 min pro Transfektion kann man  $1 \times 10^7$  transfizierte und magnetisch sortierte Zellen in ca. 3 h erhalten.

### 5.2.2 Ballistomagnetischer Transfer von „antisense“-ODN

Der Transfer mit FITC-ODN hat gezeigt, dass die Methode des ballistomagnetischen Transfers geeignet ist, getroffene Zellen durch eine magnetische Sortierung anzureichern. Eine mögliche Anwendung für den Transfer von Nukleinsäuren ist das gezielte Ausschalten der Expression eines zellulären Gens. Es gibt eine Reihe von Strategien dies zu erreichen:

- Blockierung von Transkriptionsfaktoren durch Bindung an DNA, die in die Zellen eingeschleust wird („decoy“-Strategie, (Helene 1991; Helene 1991))
- Bindung von einzelstängiger Nukleinsäuren an doppelsträngige DNA und Ausbildung einer Tripelhelix-Struktur (Helene 1991)
- Hybridisierung von RNA-Molekülen, die eine Endoribonuklease-Aktivität (Ribozyme) besitzen, an die Ziel-RNA. Dies führt zu einer sequenzspezifischen Restriktion von RNA (Haseloff and Gerlach 1988; Thompson, Macejak et al. 1995)
- Blockierung der Translation durch Bindung von „antisense“-ODN an die Boten-RNA (Calabretta 1991; Helene 1991; Helene 1991)

Zur Überprüfung der Tauglichkeit der hier vorgestellten Methode wurde das Ausschalten von Genen mit der „antisense“-Technik gewählt. In den Arbeitsgruppen von Prof. Wittig und Prof. Schultz gab es umfangreiche und vielfältige Erfahrungen in der Mikroinjektion von „antisense“-ODN zur Aufklärung der Zusammensetzung der Untereinheiten und der Funktion von G-Proteinen (Kleuss, Hescheler et al. 1991; Kleuss, Scherubl et al. 1992; Kleuss, Schultz et al. 1994; Dippel, Kalkbrenner et al. 1996; Kalkbrenner, Dippel et al. 1996; Degtiar, Wittig et al. 1998). So waren alle Methoden zum Nachweis der spezifischen Unterdrückung der Biosynthese von solchen G-Protein-Untereinheiten mit der Ca-FURA2-Methode bereits etabliert, die Signale transduzieren, die den intrazellulären Ca-Spiegel steuern.

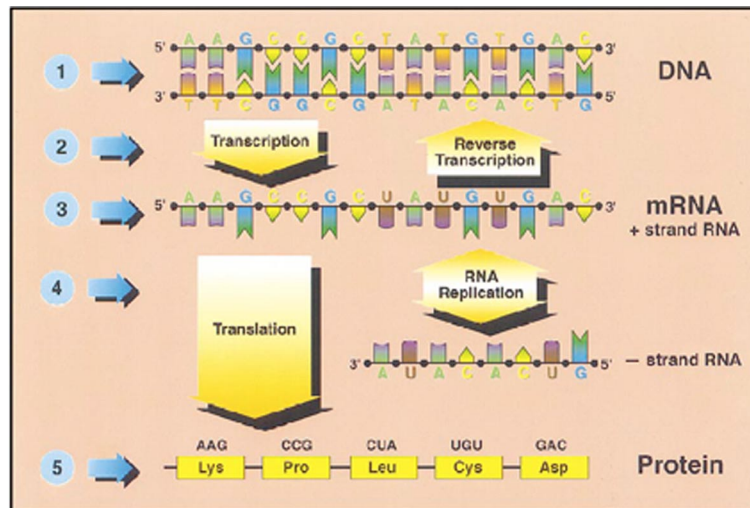


Abbildung 5.2 Strategien zur Blockierung der Genexpression oder Funktion (von Weizsacker, Wieland et al. 1997)

- 1: „decoy“-Strategie
- 2: „triple helix“-Strategie
- 3: Ribozyme
- 4: „antisense“-Strategie
- 5: beeinflussende Peptide oder Proteine

Im ersten Teil wurde mit diesem etablierten System gezeigt, dass es mit dem ballistomagnetischen Transfer von antisense ODN möglich ist, gezielt die Expression von G-Protein-Untereinheiten auszuschalten. Dabei wurde die „antisense“-Wirkung durch funktionale Tests nachgewiesen (siehe Abschnitt 4.2.1.2). Das Ergebnis zeigt eine eindeutige, spezifische Wirkung der „antisense“-ODN. Es wurde nur die Expression der G-Protein Untereinheit unterdrückt, gegen die die „antisense“-ODN gerichtet war. Die Expression anderer, ähnlicher Untereinheiten wurden nicht beeinflusst. Die Ergebnisse waren vergleichbar mit mikroinjizierten Zellen (Kalkbrenner, Dippel et al. 1997). Für dieses System ist der ballistomagnetische Transfer eine sinnvolle Alternative zur Mikroinjektion. Der Vorteil des ballistomagnetischen Transfer ist dabei die wesentlich schnellere Durchführung. Bei der Mikroinjektion ist eine Person mindestens einen Tag lang beschäftigt, um ca 1000 Zellen pro Datenpunkt zu injizieren. Diese Zeit wurde durch den Einsatz des ballistomagnetischen Transfers auf ca. 1 Stunde verkürzt. Dies hat den enormen Vorteil, dass die Zellen nicht lange unter schlechten Bedingungen gehalten werden müssen. Das Puffersystem des Zellkulturmediums erfordert eine Gasphase mit 5% CO<sub>2</sub>. Dies ist unter den technischen Bedingungen der Mikroinjektion nicht zu erreichen. Liegt der Wert darunter, verändert sich der pH-Wert stark ins basische, was sich sehr auf die Vitalität der Zellen auswirkt.

Nachdem mit den G-Proteinen gezeigt wurde, dass es möglich ist, gezielt die Expression von Genen zu inhibieren, sollte dies an einem weiteren System erprobt werden. Es sollte die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) unterdrückt werden. Dazu wurden Expressionsplasmide für das GFP und „antisense“-ODN gegen die mRNA des GFP ko-transfiziert. Dem Konzept der Ko-transfektion lag die Überlegung zugrunde, dass bereits zu Beginn des Experiments die Expression von GFP durch antisense-ODN unterdrückt werden sollte, um eine Inhibierung der Expression des GFP direkt erkennen zu können. Als Referenz für das Ausmaß der Hemmung sollten Ko-transfektionen mit „sense“- oder „non-sense“-ODN dienen. Unter diesen Bedingungen spielt die Halblebenszeit von GFP eine untergeordnete Rolle, und es muss nicht abgewartet werden, bis das noch vorhandene Protein abgebaut wird. Man kann so zeitabhängig die Expression des GFP innerhalb der Zellpopulation mit dem Durchflusszytometer messen. Leider sind die Ergebnisse dieses Experimentes nicht eindeutig. In der Zellpopulation, die mit „antisense“-ODN transfiziert wurden, exprimieren nur ca. 28% weniger Zellen das GFP als in den Kontrollen. Dies ist weitaus weniger als erwartet. Es ist auch nicht eindeutig erkennbar, ob die Expression des GFP in der „antisense“-Fraktion später einsetzt als bei den Kontrollexperimenten. Für diese Beobachtungen kann es folgende Gründe geben:

Nachweislich war die Expression des GFP bei Transfektionsexperimenten nicht in allen Zellen gleich hoch. Es gibt Zellen, die das GFP nur sehr schwach exprimieren, und andere, die das GFP so stark exprimieren, dass ihre Fluoreszenz-Intensität bei Messungen im Durchflusszytometer am oberen Ende der Mess-Skala liegt. Die Expression des GFP in den schwach exprimierenden Zellen könnte also effektiv unterdrückt worden sein, während die Expression des GFP in den sehr stark exprimierenden Zellen nicht vollständig supprimiert wurde. Durch die lange Halblebenszeit des GFP akkumuliert dann das GFP in den Zellen und war deshalb deutlich nachweisbar, obwohl die Biosynthese-Rate niedriger war.

Die Versuche wurden mit vollgeschützten ODN wiederholt, da die Stabilität der geschützten ODN deutlich höher ist (Abschnitt 4.1.2.3). Bei diesem Experiment war die antisense Wirkung der ODN deutlicher zu sehen. Die Gesamtzahl der exprimierenden Zellen war zwar nach 2 Tagen vergleichbar mit den ungeschützten ODN nicht deutlich reduziert (beide ca 28% weniger Expression als Kontrollexperimente), aber die Expression des GFP setzt deutlich später ein als bei

den Kontrollexperimenten. Dies ist ein weiterer Anhaltspunkt dafür, dass das GFP sehr stabil ist, und sich auch bei sehr schwacher Expression in der Zelle anreichert und so signifikante Fluoreszenz-Signale entstehen. Durch die erhöhte Stabilität der vollgeschützten ODN werden diese nicht so schnell abgebaut (Abschnitt 4.1.2.3) und es steht eine größere Anzahl von Molekülen in der Zelle zur Verfügung, um eine antisense Wirkung auszulösen. Somit verlangsamt sich die Anreicherung des GFP und die Expression kann erst später nachgewiesen werden.

In den Experimenten wurde deutlich, dass es Grenzen für den Einsatz von „antisense“-ODN gibt. Ist die Expression des auszuschaltenden Gens sehr hoch und besitzt das Genprodukt eine hohe Halblebenszeit, dann ist es nicht möglich, die Biosynthese und Akkumulation des Proteins vollständig zu unterdrücken. Für nur in geringer Menge oder vorübergehend exprimierte Gene, wie z.B. Rezeptor- und andere in Signaltransduktionswegen relevante Gene, mag hingegen die antisense-Wirkung zur funktionellen Suppression vollkommen ausreichen. Dies könnte die sehr unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener antisense-Ansätze im klinischen Bereich erklären.

In diesem Zusammenhang war es wichtig, genaue Aussagen über die Anzahl der in der Zelle befindlichen ODN zu erhalten. Zellen wurden deshalb mit FITC-markierten ODN transfiziert und anschließend anhand der Fluoreszenzintensität der Zellen auf die Zahl der transfizierten Moleküle geschlossen. Die Quantifizierung der Fluoreszenz erfolgte durch Fluoreszenzintensitätsbestimmung mit dem Durchflusszytometer. Den Zellen wurden FITC-markierte Referenzpartikel beigemischt, bei denen die Anzahl gebundener FITC-Moleküle bekannt war. So konnte anhand der Fluoreszenzintensität des Standards eine Kalibrierkurve erstellt werden und damit durch die Fluoreszenzintensität der Probe auf die Zahl der transfizierten ODN rückgeschlossen werden. Dabei ist zu beachten, dass sich bei den Referenzpartikeln die FITC-Moleküle auf der Oberfläche befinden, bei den Zellen die FITC-markierte ODN jedoch innerhalb der Zelle lokalisiert sind. Letzteres kann zu einem „Quenching“ der FITC-Fluoreszenz führen. Damit kann der ermittelte Wert für die durchschnittliche Anzahl der ODN eher niedriger liegen als der wirkliche Wert. Für die Berechnung der Anzahl der FITC-markierten ODN pro Zelle wurde der Median der Fluoreszenzintensität der Zellpopulation benutzt. Die Fluoreszenzintensität der Zellpopulation ist sehr inhomogen und umfasst bis zu einer Dekade. Dies liegt daran, dass es Zellen gibt, die von mehr als einem Goldpartikel



getroffen wurden. Man kann jedoch keine Gruppen unterschiedlich oft getroffener Zellen unterscheiden was darauf schliessen lässt, dass es noch weitere Faktoren gibt, die die breite Streuung der Fluoreszenzintensität der Zellen hervorrufen

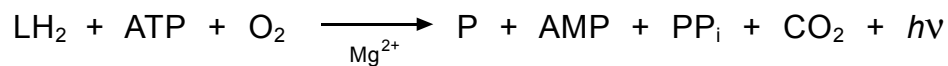
Signifikante Unterschiede können bereits in der Vorphase der eigentlichen Transfektion entstehen. Zur Vorbereitung der Transfektion wird das Zellkulturmedium abgesaugt und es verbleibt nur ein geringer Flüssigkeitsfilm oberhalb der Zellen. Ist die Schicht in einigen Bereichen der Petrischale dicker, so wird ein großer Teil der auf dem Gold befindlichen ODN abgespült, bevor die Goldkugel die Zelle trifft. Außerdem kann von Bedeutung sein, ob die Zelle nur am Rand oder in der Mitte getroffen wird. Wenn die Zelle nur am Rand getroffen wird, kann es sein, dass der Weg des Goldpartikels durch die Zelle zu kurz ist, um alle auf dem Gold befindlichen ODN in der Zelle abzuladen. In diesem Zusammenhang entstehen extreme Unterschiede dadurch, dass die Zellen teilweise von den Goldpartikeln durchschlagen werden, ein großer Teil der Goldpartikel jedoch in den Zellen steckenbleibt. Somit bleibt der DNA auf den intrazellulären Partikeln genug Zeit, um in Lösung zu gehen.

Die Anzahl der transferierten ODN steigt nahezu linear mit ihrer Konzentration in der Beschichtungslösung an. Auch bei Steigerung der Konzentration bis zu 400  $\mu\text{M}$  war keine Sättigung zu erkennen. Höhere Konzentrationen konnten nicht getestet werden, da die Viskosität der DNA-Lösung so groß wurde, dass damit die Beschichtungsmethode für die Goldpartikel nicht mehr durchführbar war. Durch die erhöhte Viskosität sedimentierten die Goldpartikel nicht mehr auf der Trägerscheibe und somit wurden die meisten Goldpartikel beim Absaugen der überstehenden Flüssigkeit wieder mit abgesaugt. Bei durchschnittlich  $3.5 \times 10^6$  transferierten ODN pro Zelle bei einer ODN-Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  in der Beschichtungslösung ist eine Steigerung der Konzentration aber auch nicht notwendig.

### **5.3 Ballistomagnetischer Transfer von Expressionsplasmiden**

Nachdem ich im ersten Teil meiner Arbeit gezeigt habe, dass mit Hilfe des von mir entwickelten Verfahrens bis zu 99 % der Zellen transfiziert werden und man mit dem Transfer von antisense ODN eine biologische Wirkung erzielen konnte, habe ich im zweiten Teil gezeigt, sich mein Verfahren auch für die Transfektion der Zellen mit Expressionsplasmiden eignet. Für diese Untersuchungen wurde ebenfalls mit dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) gearbeitet. Dieses Protein eignet sich

hervorragend als Reporter gen für Expressionsstudien bei Transfektionsexperimenten. Der Vorteil des GFP liegt daran, dass keine sekundären Nachweismethoden notwendig sind, sondern dass das Protein selbst fluoresziert, wenn man es mit Licht der Wellenlänge um 495 nm anregt. Damit kann die Expression des Proteins in Zellen einfach im Durchflußcytometer oder mit dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. Zusätzlich ist es möglich, Aussagen über die Zusammensetzung einer Population zu erhalten. Als weiteres Reportersystem wurde das Luciferasegen eingesetzt. Die Luciferase katalysiert die Oxidation des Substrates Luciferin (LH<sub>2</sub>) zum Produkt Oxyluciferin (P), (de Wet, Wood et al. 1986):



Bei dieser Reaktion wird Licht mit einer Wellenlänge von 500-600 nm emittiert. Mit Hilfe eines Luminometers kann die durchschnittliche Luciferaseaktivität einer Zellpopulation bestimmt werden. Sie lässt keine Aussage über die Aktivität einzelner Zellen zu, da die Zellen vor der Messung lysiert werden. Die Biolumineszenz im Test kann auf wenige Zellen zurückzuführen sein, die das Luciferasegen stark exprimieren, oder aber auf viele Zellen, die das Gen in der Höhe des gemessenen Wertes exprimieren.

Die Messung der Luciferaseaktivität im Luminometer eignet sich auch für den Nachweis der Anreicherung der transfizierten Zellen nach magnetischer Sortierung. In Abschnitt 4.3.4.2 ist deutlich zu erkennen, dass durch die magnetische Sortierung eine Erhöhung der Biolumineszenz um den Faktor 8 erreicht wird. Dies ist vergleichbar mit der Steigerung der Expressionsrate des GFP in der magnetischen Fraktion um den Faktor 9 im Vergleich zur unsortierten Fraktion (Abschnitt 4.3.1). Mit einem Anteil von bis zu 50 % an GFP exprimierenden Zellen in Bezug auf die lebenden Zellen ist mein Verfahren im Vergleich zu Elektroporation, retroviraler Transfektion oder CaCl<sub>2</sub>-Präzipitation gleich effizient oder überlegen. In der Literatur sind leider nur sehr wenig vergleichbare Versuche durchgeführt worden. So wurden Transfektionsexperimente mit Retroviren durchgeführt. Dabei wurde ebenfalls das GFP-Gen als Reportersystem verwendet. Die Expressionrate der Zellen (humane Tumorzelllinien) lag nach 72 h bei ca. 50% (Muldoon, Levy et al. 1997). Von Burkholder et al. wurden Experimente mit humanen Lymphozyten und Makrophagen durchgeführt. Dabei konnten mit dem ballistischen Transfer ca 6% der Zellen

transfiziert werden. Als Reporter-gen-System wurde das  $\beta$ -Galaktosidase-Gen verwendet (Burkholder, Decker et al. 1993).

Eine interessante Frage ist, warum bei einem Treffer-Anteil von 99% nur maximal 50% der Zellen die transfizierten Plasmide exprimieren. Die Plasmide werden durch ein physikalisches Verfahren in die Zellen eingebracht. Die Expression des Indikator-Gens erfordert, dass sich zumindest ein Plasmid im Kern der Zelle befindet. Offensichtlich liegt nicht bei jeder getroffenen Zelle der Treffer und damit das Plasmid-beschichtete Goldpartikel im Kern. Gelangt das Plasmid durch den ballistischen Transfer nur in das Cytosol, ist eine sofortige Expression des Proteins nicht möglich. Zur Expression des Gens muss das Plasmid vorher in den Kern gelangen.

Kernporen erlauben aber nur einen freien Durchtritt von Makromolekülen bis zu einem Durchmesser von 9 nm (Paine, Moore et al. 1975; Mattaj and Englmeier 1998). Dies entspricht globulären Proteinen mit einer Größe von ungefähr 60 kDa. Plasmid-DNA hat jedoch eine Größe im Bereich von 1-4 mDA und kann deshalb nicht frei in den Kern diffundieren. Es gibt eine Reihe von aktiven Transportmechanismen, die einen aktiven Transport von Makromolekülen bis zu einem Durchmesser von 39 nm möglich machen (Pante and Kann 2002). Für den aktiven Transport von Proteinen in den Kern sind jedoch Kernlokalisierungssequenzen (NLS) auf dem Protein notwendig, die von den Transportkomplexen erkannt werden. Für Nucleinsäuren gibt es keine bekannten Transportmechanismen in den Kern. Die DNA muss also auf andere Art und Weise in den Kern gelangen.

Eine Möglichkeit für diesen Übergang besteht theoretisch während der Zellteilung. Bei diesem Prozess wird die Kernmembran aufgelöst und erst in den Tochterzellen neu gebildet. Befinden sich zu der Zeit genügend Plasmid-Moleküle im Zytosol, ist es denkbar, dass sich bei der Neubildung der Kernmembran einige Plasmide im Kern befinden und dort exprimiert werden können. Die Tatsache, dass sich auch bei schnell teilenden Zellen, wie den im Rahmen meiner Arbeit verwendeten K562-Zellen, der Anteil der exprimierenden Zellen an der Gesamtpopulation sich nicht im Laufe mehrerer Zellteilungszyklen signifikant erhöht, spricht jedenfalls dafür, dass dieser Mechanismus keine wesentliche Bedeutung für den Transfektionsvorgang hat.

---

Es konnte also gezeigt werden, dass der ballistomagnetische Transfer auch auf Expressionskonstrukte anwendbar ist und im Falle der verwendeten Modellsysteme eine Erhöhung der Transfektionsrate um etwa eine Grössenordnung erzielt. Dabei führt auch die durch ODN-Transfektion gezeigte, mehr als 99%ige Transfektionseffizienz nicht zu einem entsprechenden Anteil an exprimierenden Zellen an der Gesamtpopulation. Die Quantifizierung der transfizierten Plasmide ergab, dass deren durchschnittliche Anzahl für die verwendeten Zellen in der Grössenordnung von mehreren tausend bis zehntausend pro Zelle liegt und der Hauptteil dieser Plasmide im Kern vorlagen, so dass über die reine Kompartimentlokalisierung hinausgehende Erklärungsmechanismen für die Expressionseffizienz nach dem ballistomagnetischen Transfer herangezogen werden müssen.