

6 Zusammenfassung

Meine Arbeit beschreibt ein Verfahren, mit dessen Hilfe Nukleinsäuren effektiv und einfach in Zellen eingebracht werden können. Dieses Verfahren beruht auf der Kombination von partikelvermittelter Transfektion mit magnetischer Zellsortierung.

Im ersten Teil der Arbeit konnte ich mit der Transfektion von kurzen fluoreszenzmarkierten Oligodesoxynukleotiden zeigen, dass es mit meinem Verfahren möglich ist, eine Population von Zellen zu isolieren, in der mehr als 90% der Zellen transfiziert sind. Durch Einbringen von „antisense“-ODN in die Zellen konnte gezielt eine G-Protein-Untereinheit ausgeschaltet werden. Am Modellsystem der eGFP-transfizierten Zelle konnte demonstriert werden, dass auch bei nachgewiesener antisense-Wirkung bei stark exprimierten Proteinen mit langer Halblebenszeit in der Zelle keine vollständige Unterdrückung der Proteinexpression erreichbar war.

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.

Anhand der Expression der Reportergene Luciferase und eGFP konnte nachgewiesen werden, dass mit meinem Verfahren eine etwa zehnfache Erhöhung der Gesamtmenge an Proteinaktivität in der angereicherten transfizierten Zellpopulation bzw. des Anteils der exprimierenden Zellen an der Gesamtpopulation erreicht wurde.

Mein Verfahren stellt eine Erweiterung des Methodenspektrums der experimentellen und klinisch angewandten Molekularbiologie dar und wurde in einer klinischen Studie zur immuntherapeutischen Therapie des Nierenzellkarzinoms mit genmodifizierten Tumorzellen zur Anwendung gebracht (Wittig, Marten et al. 2001).