

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1 Abbildungen

Abbildung 1.1 Schematische Darstellung von <i>in vivo</i> und <i>ex vivo</i> Gentherapie	3
Abbildung 2.1 Vektorkarte des pcDNA3-Vektors.....	14
Abbildung 2.2 Vektorkarte des pCEP4-Vektors.....	14
Abbildung 2.3 Plasmidkarte des pCR3-Vektors.....	15
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	22
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).....	23
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	24
Abbildung 3.4 Schematische Darstellung des ballistischen Transfers mit anschließender magnetischer Sortierung.....	25
Abbildung 3.5 Schematische Darstellung der Klonierung des Referenzplasmides aus dem Ausgangsplasmid. Der untere Teil zeigt ein Photo eines Agarosegels (2% w/v), auf dem die PCR-Produkte aus den PCR-Reaktionen mit dem Ausgangsplasmid (links) und dem Referenzplasmids (rechts) aufgetragen wurden.....	28
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 ϕ X/HaeIII), rechts: Grafische Darstellung der relativen Bandenintensität gegen die Plasmidanzahl.....	30
Abbildung 3.7 PCR mit konstanter Mengen an Ausgangs-plasmid und absteigender Menge an Referenzplasmid in einem Ansatz. links: PCR von Proben 1-10; M: Längenmarker ϕ X/HaeIII, rechts: Grafische Darstellung der relativen Bandenintensität gegen die Plasmidanzahl.....	30
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	31
Abbildung 3.9 PCR mit konstanter Mengen 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)	32
Abbildung 3.10 Quotient der Banden-intensitäten von Referenzplasmid und Ausgangsplasmid aus den Testquantifizierungen A und B (Abbildung 3.9).....	33
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.....	35
Abbildung 3.12 Punktwolkendiagramme von unbehandelten Zellen	36
Abbildung 3.13 Punktwolkendiagramme von Zellen nach ballistischen Transfer von unbeschichtetem Gold (0h-Wert)	36
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).....	38

Abbildung 4.2 Ausschnittvergrößerung aus einer fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme von K562-Zellen nach ballistomagnetischem Transfer von FITC-ODN.	38
Abbildung 4.3 Strukturformel von Propidium-Jodid	39
Abbildung 4.4 Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektrum von Propidium-Jodid (PI).....	40
Abbildung 4.5 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Zellen der magnetischen Zellfraktion nach ballistomagnetischem Transfer von FITC-ODN (c=400 µM 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	40
Abbildung 4.6 Histogrammdarstellung von lebenden Zellen der unsortierten (A) und magnetischen (B) Zellfraktion. Es ist die relative Fluoreszenz gegen die Zellzahl aufgetragen. Grüne Population: nicht-getroffene Zellen; Blaue Population: getroffene Zellen.	42
Abbildung 4.7 Vergleich der lebenden und der lebenden, transfizierten Zellen zwischen der unsortierten Zellfraktion (links), magnetischen Zellfraktion und unbehandelten Zellen.....	42
Abbildung 4.8 Anzahl transferierter ODN in Abhängigkeit von der Konzentration in der Auftragslösung	43
Abbildung 4.9 Stabilität der ODN.....	44
Abbildung 4.10 Signaltransduktionskaskade des endogenen Adenosin A3-Rezeptors und des transfizierten muscarinischen Rezeptors	45
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	47
Abbildung 4.12 Inhibition der Expression von GFP durch ungeschützte „antisense“-Oligonucleotide	49

Abbildung 4.13 Inhibition der Expression von GFP durch thioat-geschützte „antisense“-Oligonucleotide	49
Abbildung 4.14 Durchflußzytometrische Auswertung von Zellfraktionen nach ballistomagnetischem Transfer; links: Punktwolkendiagramm. Auftragung des Vorwärtsstreulichts 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.	51
Abbildung 4.15 Grafische Darstellung der Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von der Plasmidkonzentration in der Auftragslösung beim ballistomagnetischen Transfer	52
Abbildung 4.16 Grafische Darstellung der Abhängigkeit der Expressionsrate von der Größe des Plasmides	53
Abbildung 4.17 Grafische Darstellung der Abhängigkeit der Plasmidzahl pro Zelle von der Plasmidkonzentration in der Auftragslösung beim ballistomagnetischen Transfer	54
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).....	55
Abbildung 4.19 Quantitative PCR mit pcDNA3-GFP spezifischen Primern von Zell-Lysat (links), Kernfraktion (mitte) und cytosolischer Fraktion (rechts, jeweils dreifach Bestimmung)	55
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	57
Abbildung 4.21 Punktwolkendiagramme einer durchflusszytometrischen Auswertung von K562-Zellen, die mit 3 Expressions-konstrukten gleichzeitig mit dem ballistomagnetischen Transfer transfiziert wurden.	59
Abbildung 5.1 A-C Punktwolkendiagramm 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 Fluoreszenz-histogramm 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.	61
Abbildung 5.2 Strategien zur Blockierung der Genexpression oder Funktion (von Weizsacker, Wieland et al. 1997).....	65

7.2 Tabellen

Tabelle 1.1 Nicht-virale Gentransfermethoden.....	6
Tabelle 2.1 Materialienliste.....	13
Tabelle 2.2 Geräteliste	13
Tabelle 3.1 Verwendete Antikörper und deren Arbeitskonzentrationen	21
Tabelle 3.2 Verdünnungsreihe für Referenz- und Ausgangsplasmid	29
Tabelle 4.1.....	42
Tabelle 4.2 Anzahl transferierter ODN in Abhängigkeit von der Konzentration in der Auftragslösung	43
Tabelle 4.3.....	58
Tabelle 4.4.....	59