

## **6 Diskussion**

### **6.1 Statistische Auswertung der Ergebnisse**

Die in den Diagrammen eingeführten Fehlerindikatoren veranschaulichen die Schwankungsbreiten innerhalb der durchgeführten Mehrfachbestimmungen in Form der Standardabweichung. Für die Betrachtung der Ergebnisse wurde Bezug auf die Mittelwerte genommen. Bei Vergleichen zwischen zwei Meßreihen wurde das Signifikanzniveau mit Hilfe des Whitney-Mann-Tests berechnet. Ein p-Wert  $< 0.05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet.

Es wurde immer eine Versuchsreihe komplett vorbereitet und an einem Tag durchgeführt. Dies entspricht den Bedingungen bei den von uns durchgeführten Gentherapiestudien mit Patientenzellen. Außerdem sollten dadurch externe auf die Versuchsergebnisse wirkende Faktoren so weit wie möglich eingeschränkt werden.

### **6.2 Auswertung der durchflußzytometrischen Messungen**

Zur Auswertung der durchflußzytometrischen Messungen wurden die im Kapitel 4.4.3 beschriebenen Regionen zur Definition der Zellpopulationen festgelegt. Der Vergleich der nichttransfizierten Kontrollzellen erlaubte eine verlässliche Detektion der eGFP und/oder CD40L exprimierenden Zellen. Ein brauchbares Transfektionsverfahren sollte die Vitalität der Zellen möglichst wenig beeinträchtigen. Daher wurde die Lebensfähigkeit der Zellpopulation mit Propidiumjodidfärbung (PI) beurteilt. Tote Zellen und Zelltrümmer wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Mit Hilfe der nichttransfizierten Kontrolle wurde die Grenze zwischen den nicht fluoreszierenden und den fluoreszierenden, den eGFP und/oder CD40L exprimierenden Zellen gezogen. Die Population der lebenden Zellen wurde durch Subtraktion der toten Zellen und subzellulärer Bestandteile (Zelltrümmer) definiert. Die subzellulären Bestandteile definieren sich über ihre geringe Größe. Der Anteil der transfizierten Zellen wurde auf die Population der lebenden Zellen bezogen. Dieser Bezug wurde gewählt, weil ein Teil der toten Zellen als Trümmer vorlagen und weil nicht genau bestimmt werden konnte, aus wie vielen Zellen sie hervorgegangen waren. Wäre der Anteil der transfizierten Zellen auf alle im Durchflußzytometer gemessenen Ereignisse bezogen worden, hätte dies eine nicht zutreffende Aussage über die

Transfektionsrate zur Folge gehabt, da die von Durchflußzytometer detektierten Ereignisse nicht nur ganze Zellen umfassen, sondern auch Zelltrümmer (eine Zelle kann in viele Trümmer zerfallen), Bestandteile aus dem Zellkulturmedium und dem fetalen Kälberserum. Um möglichst viele Zellen zu transfizieren, ist neben einer möglichst hohen Transfektionsrate auch ein geringer Anteil an toten Zellen von Bedeutung.

Eine potentielle Fehlerquelle bei der Multifarbenanalyse im Durchflußzytometer ist die Überlappung der Emissionsspektren der verwendeten Farbstoffe. Sie kann zu falsch positiven Populationen in der Dot-Plot Analyse führen, wenn Zellen, die mit einem bestimmten Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, nicht nur von dem für diesen Farbstoff bestimmten Detektor gemessen werden, sondern auch von einem zweiten Detektor, der nicht für diesen Farbstoff bestimmt ist.

Die spektrale Überlappung kann durch elektronische Subtraktion des unerwünschten Signals kompensiert werden. Die Einstellungen werden am Gerät mit Hilfe von einfach und doppelt gefärbten Kontrollproben durchgeführt. Hierdurch wird eine fehlerfreie Analyse der fluoreszenzmarkierten Zellen möglich.

Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe eGFP, PerCP und PI wurden so ausgewählt, daß sich ihre Emissionsspektren so wenig wie möglich überlappen (127). Die spektrale Überlappung von eGFP und PerCP positiven Proben ist nur minimal und konnte deshalb problemlos kompensiert werden. Hierdurch wurde eine fehlerfreie Quantifizierung der einfach und doppelt transfizierten Zellen möglich. Da das Fluoreszenzspektrum von PI, dem Marker für die toten Zellen, sowohl mit dem von eGFP und PerCP überlappt, mussten die drei Spektren durch elektronische Subtraktion entsprechend kompensiert werden, um die lebenden Zellen klar von den toten Zellen unterscheiden zu können.

### 6.3 MIP-Methode

Bisher konnte der ballistische Gentransfer nur mit adhären wachsenden Zellen durchgeführt werden. Hierzu mußten die Zellen in der richtigen Konzentration ausgesät werden und bis zur Bildung einer adhären Zellkultur im Brutschrank inkubiert werden. Dieser Prozess dauert abhängig vom Zelltyp meist mehrere Stunden. Die sich ergebenden Nachteile sind gravierend. Es können keine nichtadhären Zellen transfiziert werden. Aufgrund der Zeit, die die Zellen nach dem Aussäen auf den Petrischalen zum Adhären benötigen, ist es nur schwer möglich, die Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt im Zellzyklus zu transfizieren. Darüber hinaus ergeben sich zwei weitere Nachteile, die mit der Technik des ballistischen Gentransfers zusammenhängen. Zum einen bildet sich, wenn die Zellen adhären ein breiter Zytoplasmasaum um den Zellkern, so daß im Vergleich zur MIP-Methode nur etwa ein Zehntel des jeweiligen Zelltyps pro Petrischale eingesetzt werden kann. Zum anderen vermindert sich mit breiter werdendem Zytoplasmasaum drastisch die Wahrscheinlichkeit, daß beim Gentransfer direkt der Zellkern getroffen wird. Dies führt zu einer geringeren Transfektionsrate. Bei Anwendung der MIP-Methode kann auf Benutzung von Resuspensionsverfahren, wie dem Ablösen der Zellen mit einem Zellschaber oder mit Hilfe von Enzymen, verzichtet werden. Die Resuspension der Zellen nach dem Gentransfer ist nötig, um die transfizierten Zellen magnetisch anreichern zu können.

Die bisher einzige mit der MIP-Methode zu vergleichende Methode ist die von Burkholder et al. (128) beschriebene Methode.

Sowohl bei Verwendung der MIP-Methode als auch mit der Burkholder-Methode können adhären und nichtadhären Zellen transfiziert werden. Beide Methoden erfüllen also den wichtigsten Punkt der Zielsetzung, daß Zellen unabhängig von ihren Adhärenzeigenschaften transfiziert werden können. Es können also alle bei der Präparation der Tumorzellen gewonnenen Zellen zur Herstellung der Vakzine verwendet werden. Eine weitere für den klinischen Einsatz wichtige Voraussetzung, die beide Methoden erfüllen ist, daß keine zusätzlichen Substanzen außer den Zellen selbst und dem jeweiligen Zellkulturmedium zur Anwendung benötigt werden.

Bei beiden Methoden ist eine hohe Transfektionsrate möglich. Hierzu sollte das Verhältnis der Zellkernoberfläche zur Oberfläche der gesamten Zelle möglichst groß sein. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, daß der Zellkern beim Gentransfer direkt

getroffen wird und die DNA direkt in den Zellkern transferiert wird. Da bei beiden Methoden suspendierte Zellen eingesetzt und nur kurzzeitig kultiviert werden, kann eine lückenlose Packung auf der Petrischale bzw. der Polycarbonatmembran angestrebt werden.

## 6.4 Berechnung der auszusäenden Zellzahl

**Fehlerbetrachtung:** Bei Herleitung der Formel wurden folgende vereinfachende Annahmen gemacht:

1. Der Randbereich der Membran wird nicht berücksichtigt.
2. Die Zellen variieren nicht in ihrem Durchmesser.
3. Die Zellen sind optimal gepackt.

Diese Vereinfachungen stellen sinnvolle Vereinfachungen dar, da der Randbereich bezogen auf die Gesamtfläche klein ist, da alle Zellen etwa die gleiche Größe haben und die Zellen in den meisten Bereichen optimal gepackt sind.

**Fehlerbereinigung:** Um bei den Zellen vorkommende Größenunterschiede zu berücksichtigen, werden von der mit der Formel berechneten einzusetzenden Zellzahl 20% abgezogen.

Der so erhaltene Korrekturfaktor wurde empirisch ermittelt und an vielen Beispielen lichtmikroskopisch kontrolliert und bestätigt. Vielfach war es möglich zu beobachten, daß die Zellen bei dichter Packung eine Form zwischen der eines Sechsecks und der eines Kreises annehmen. Die Zellen nähern sich der Form eines Sechsecks an, weil sie sich an den Stellen, an denen sie sich berühren, zuerst verformen.

## 6.5 Vergleich der MIP-Methode mit der Burkholder-Methode

### 6.5.1 Aussäen der Zellen

Wurden Zellen mit der MIP-Methode ausgesät, so konnten nach erfolgtem ballistischem Gentransfer im Durchschnitt der verwendeten Zelllinien 89% der ausgesäten Zellen zurückgewonnen werden. Hierbei schwankten die Mittelwerte zwischen 85% (MMZ1 und NKZ1) und 92% (BM185). Dies entspricht einer

Schwankungsbreite von 7%. Wurden die Zellen dagegen mit der Burkholder-Methode ausgesät so konnten im Mittel nur 58% der ausgesäten Zellen zurückgewonnen werden. Die Mittelwerte für die getesteten Zelllinien schwankten um 26%. Die Extremwerte wurden durch NKZ1 mit 41% und K562 mit 87% markiert. Der Unterschied zwischen der MIP-Methode und der Burkholder-Methode war für die adhärenzte Zelllinie MMZ1 am größten und für die nichtadhärenzten Zelllinie K562 am geringsten. Für die nichtadhärenzten Zelllinien BM185 und Jurkat und die adhärenzte Zelllinie NKZ1 wurde ein signifikanter Unterschied zugunsten der MIP-Methode festgestellt, während für die Zelllinie U937 kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Methoden festgestellt werden konnte.

Die schlechteren Ergebnisse bei Verwendung der Burkholder-Methode kommen vermutlich durch das Zusammenwirken mehrerer Ursachen zustande.

Die Zellen werden bei dem bei der Burkholder-Methode erforderlichen Resuspendieren des Zellpellets mittels „hin- und her Pipettierens“ mechanisch stark belastet. Hierdurch kann die Vitalität der Zellen durch die an der Pipettenspitze auftretenden Scherkräfte beeinträchtigt werden. Darüber hinaus entsteht eine stark konzentrierte Zellsuspension, da die auszusäenden Zellen bei Anwendung der Burkholder-Methode in einem Volumen von lediglich 250 µl resuspendiert werden. Verbleibt nun nur ein kleines Volumen dieser Suspension im Zentrifugierrohrchen, in der Pipette oder am Zellschaber, mit dem die Zellen auf der Petrischale verteilt werden, so sind die Zellverluste aufgrund der hohen Zellkonzentration bereits erheblich. Bei der MIP Methode führen die genannten Ursachen dagegen kaum zu Zellverlusten, da immer mit Volumina im Milliliterbereich gearbeitet wird.

Weitere Zellverluste bei Anwendung der Burkholder-Methode kommen dann zustande, wenn die Zellen vor dem Gentransfer zu lange auf der Petrischale verbleiben und austrocknen. Wartet man jedoch nicht lange genug, so bleibt Medium über den Zellen, und die Transfektionsrate wird beeinträchtigt. In der Praxis ist es also recht schwierig, den optimalen Zeitpunkt zur Durchführung der Transfektion abzugewinnen. Dies wird dadurch verstärkt, daß die Bestimmung des „optimalen“ Zeitpunkts der subjektiven Einschätzung des Experimentators unterliegt. Da die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers auf der Petrischale verteilt werden, ist eine gleichmäßige, lückenlose und einlagige Beschichtung nur schwer realisierbar. Insbesondere die beiden letztgenannten Punkte erschweren eine Anwendung des Verfahrens unter standardisierten Bedingungen erheblich.

### **6.5.2 Effizienz der magnetischen Separation**

Mit diesem Experiment sollte untersucht werden, ob die Art des Aussäens einen Einfluß auf die Effizienz der magnetischen Anreicherung hat.

Für alle 6 untersuchten Zelllinien war die magnetische Anreicherung signifikant besser, wenn die Zellen vor dem Gentransfer mit der MIP-Methode ausgesät wurden. Das bessere Ergebnis läßt sich nicht nur darauf zurückführen, daß durch die schonendere Art des Aussäens mit der MIP-Methode im Durchschnitt 1,7 mal mehr Zellen für die Separation zur Verfügung standen (Extremwerte: K562: 1,0; BM185: 2,2). Auch isoliert betrachtet war die magnetische Separation bei Verwendung der MIP-Methode effizienter. Der Anreicherungsfaktor betrug, ausgehend von der ausgesäten Zellzahl im Durchschnitt 3,4. Die Extremwerte waren eine 7,3-fache Anreicherung für NKZ1 und eine 2,3-fache Anreicherung für MMZ1.

Bei Verwendung der Burkholder-Methode ergibt sich bei der magnetischen Separation eine geringere Ausbeute an Zellen, als bei Verwendung der MIP-Methode, da die auf Petrischalen ausgestrichenen Zellen bei der Transfektion nicht gleichmäßig auf der Petrischale verteilt sind und deshalb nicht überall in einer Monolayer angeordnet sind. Hierdurch können die DNA und die superparamagnetischen Partikel vom Gold abgelöst werden, bevor sie auf die Zellen treffen, die sich in der zweiten Zellschicht befinden. Dieser Effekt verstärkt sich noch, wenn sich zusätzlich Flüssigkeit über den Zellen befindet, durch welche DNA und superparamagnetische Partikel von den Goldpartikeln abgestreift werden. Die Goldpartikel selbst werden durch die auftretende Reibung beim Auftreffen auf überstehende Flüssigkeit abgebremst, bevor sie auf die Zellen treffen. Hierdurch kann die Zahl der Goldpartikel, die in die Zellen eindringen können, vermindert werden.

### **6.6 Ballistischer Gentransfer**

Der ballistische Gentransfer selbst übt einen Einfluß auf die Schwankungsbreite der im folgenden diskutierten Meßwerte aus. Die Reproduzierbarkeit und Effektivität des ballistischen Gentransfers ist unter anderem vom Material der Berstscheiben abhängig. Die Berstscheiben reißen nicht immer bei dem vom Hersteller angegebenen Sollbruchdruck. Es wurden auch Unterschiede des Berstdruckes

zwischen einzelnen Chargen von Berstscheiben festgestellt. Druckschwankungen können auch durch einen unterschiedlichen Anpreßdruck der Berstscheiben an der Verbindungsstelle zwischen dem Hydra-Adapter und der Biolistic PDS1000/He hervorgerufen werden.

### **6.6.1 Transfektionsrate mit einem Reporterogen**

In einer ersten Versuchsreihe wurden K562-Zellen mit einem Expressionskonstrukt für eGFP ballistomagnetisch transfiziert. Der Mittelwert der Transfektionsrate lag bei Anwendung der MIP-Methode bei 38% und bei der Anwendung der Burkholder-Methode bei 42%. Betrachtet man nur die Transfektionsrate, war die Effizienz beider Methoden gleich ( $p=0.15$ ). Bezieht man die absolute Zellzahl mit ein, erhält man bei Verwendung der MIP-Methode eine größere absolute Zahl an transfizierten Zellen.

### **6.6.2 Kotransfektion von CD40L und eGFP**

Zur Beurteilung, wie gut Expressionskonstrukte ballistisch kotransfiziert werden können, wurden CD40L und eGFP als Reporterogene gewählt. Wie bei den vorangehenden Experimenten wurde die MIP-Methode mit der Burkholder-Methode verglichen. Bei der Auswertung wurden die Ergebnisse mit Hilfe von vier Abbildungen dargestellt. In Abbildung 5-7 werden die tatsächlich kotransfizierten Zellen dargestellt. Im Vergleich der Transfektionsraten schnitten die beiden verwendeten Methoden für die drei verwendeten Zelllinien gleichwertig ab. Dies gilt auch, wenn man die nur CD40L exprimierenden Zellen betrachtet (Abbildung 5-8). Betrachtet man die nur eGFP exprimierenden Zellen, so waren mit der MIP-Methode ausgesäte U937-Zellen signifikant häufiger eGFP transfiziert, als wenn sie mit der Burkholder-Methode ausgesät wurden. Zwischen den Transfektionsraten für K562- und Jurkat-Zellen lag kein signifikanter Unterschied.

Betrachtet man die Gesamttransfektionsrate, d.h. eGFP und/ oder CD40L transfizierte Zellen, so ist die Burkholder-Methode für K562-Zellen und die MIP-Methode für U937-Zellen vorteilhafter. Für Jurkat-Zellen besteht kein signifikanter Unterschied in der Transfektionsrate.

Die Transfektionsraten sind deshalb in beiden Gruppen vergleichbar hoch, da nach magnetischer Anreicherung fast nur magnetisch markierte Zellen übrigbleiben. Durch Waschschriffe wird die Anzahl toter Zellen und Trümmer vor der Messung

vermindert. Es wird also vorwiegend die lebende magnetisch angereicherte Fraktion betrachtet. Der wirkliche Unterschied zwischen den Methoden liegt also vor allem in der absoluten Zellzahl, die nach dem Gentransfer und der magnetischen Anreicherung übrig bleibt. Hier ist der ballistische Gentransfer von Zellen, in Kombination mit der MIP-Methode, überlegen.

Es stellten sich nun die Fragen: Warum sind mehr Zellen positiv für eGFP als für CD40L, und warum sind nicht alle transfizierten Zellen kotransfiziert?

Den Gesetzen der Wahrscheinlichkeit folgend hätten alle Zellen, die Expressionskonstrukte für eGFP erhalten haben, auch Expressionskonstrukte für CD40L erhalten müssen, da auf den Goldpartikeln Platz für viele tausend Plasmide ist und beide Plasmide im gleichen Verhältnis auf das Gold aufgebracht wurden. Die Oberfläche der Goldpartikel wird durch das Aufbringen der superparamagnetischen Partikel vergrößert, so daß noch mehr Plasmid-DNA Platz hat. Ein wichtiger Unterschied zwischen eGFP und CD40L ist, das eGFP zytoplasmatisch lokalisiert ist und direkt nach Bildung des aktiven Proteins ohne Zugabe von Reagenzien durchflußzytometrisch detektierbar ist. CD40L dagegen ist zellmembranständig. Es muß also nach seiner Expression an die Zellmembran gelangen und wird dort, um es nachweisen zu können, erst mit einem primären und dann mit einem gegen diesen gerichteten sekundären, fluoreszierenden Antikörper markiert. Aufgrund dieser aufwendigeren Prozedur und in Abhängigkeit des verwendeten Antikörpers ist CD40L weniger sensitiv nachweisbar. Dadurch könnten Zellen, bei denen nur wenig CD40L exprimiert wird, oder bei denen nur eine geringe Menge an CD40L an die Zelloberfläche gelangt, einer Detektion im Durchflußzytometer entgehen.

### **6.6.3 Kotransfektion von Primärkulturen mit GM-CSF und IL-7**

In dieser Versuchsreihe wurden Primärkulturen von 22 Patienten mit metastasierten Karzinomen mit Expressionskonstrukten für GM-CSF und IL-7 Ko-transfiziert. Die Tumoren von insgesamt 16 Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom und von 6 Patienten mit metastasiertem malignem Melanom wurden direkt nach der Operation auf Eis und in Transportmedium ins Labor transportiert. Im Allgemeinen betrug die Zeitspanne von der Operation bis zum Beginn der Aufarbeitung des Tumormaterials zwei Stunden. In Einzelfällen konnte sie jedoch bis zu vier Stunden betragen. Alle Zellpräparationen produzierten nach dem Gentransfer beide Zytokine

in einer Menge, die ein Vielfaches über dem Referenzwert lag. Da in den vorangehenden Experimenten gezeigt werden konnte, daß der ballistomagnetische Gentransfer unter standardisierten Bedingungen gut reproduzierbare Ergebnisse liefert, muß die große Schwankungsbreite in der Menge der von den Zellen produzierten Zytokine andere Ursachen haben. Ein wichtiger Einflußfaktor war die Vitalität der Zellen, die von Tumor zu Tumor schwankte. Manche der verwendeten Tumoren hatten zum Teil ausgedehnte nekrotische Anteile. Da es jedoch eine der Zielsetzungen war, möglichst alle Tumorzellen ohne Kultivierung im Labor zu verwenden, wurde keine Rücksicht auf die Vitalität genommen. Dies war besonders wichtig, da dem Immunsystem des Patienten eine genterapeutische Vakzine mit immunologisch möglichst unveränderten Zellen präsentiert werden sollte. Ein weiterer Grund für die Schwankungsbreite neben der unterschiedlichen Vitalität der Zellen liegt darin, daß sich die Primärkulturen, obwohl sie alle von malignen Melanomen oder Nierenzellkarzinomen stammen, analog zu den in den vorangehenden Experimenten verwendeten etablierten Zelllinien stark voneinander unterscheiden und sich demzufolge unterschiedlich gut transfizieren lassen. Demzufolge werden auch die transfizierten Gene unterschiedlich stark exprimiert.

## **6.7 Computersimulation des ballistischen Gentransfers**

Die beiden in Kapitel 5.3.2 exemplarisch durchgeführten Experimente, bei denen zum einen ein Maximum an Einfachtreffern und zum anderen ein Maximum an Zweifachtreffern angestrebt wurde, verdeutlichen, daß bei einer Erhöhung der Gesamttrefferrate von 62% auf 78% die Zahl der Einfachtreffer lediglich um 3,5% abnimmt, während sich die Zahl der Zweifachtreffer um 6,3% und die der Dreifachtreffer sich um 7,2% erhöht, sich also mehr als verdoppelt. Würde man Ein- bis Dreifachtreffer zulassen, so läge die Gesamttrefferrate bei etwa 82%. Jedoch würden auch nur 72% der Zellen ein- bis dreimal getroffen werden. Das sind lediglich 4,4% mehr, als wenn nur Ein- bis Zweifachtreffer zugelassen werden. Die Zahl der „mehr- als- Einfachtreffer“ steigt jedoch stark an und beträgt nun 51% der Zellen, während man nur 25% Mehrfachtreffer erhält, wenn man als experimentelles Ziel das Maximum an Einfachtreffern wählt.

Weiter ist zu erkennen, daß sich trotz erhöhter Anzahl der Schüsse die Gesamttrefferrate immer langsamer erhöht, während die Zahl der Mehrfachtreffer stark steigt.

Diese Überlegungen legen nahe, daß bei unseren praktischen Versuchen eine Gesamttrefferrate zwischen 62% und 78% angestrebt werden sollte. Unberücksichtigt bleibt hierbei jedoch, daß sich in der Praxis die Goldpartikel nicht ideal verteilen, sondern in manchen Bereichen dichter sind als in anderen. Die berechnete maximale Trefferquote sollte sich also auf die Bereiche mit der größten Trefferdichte beziehen.

Aus Tabelle 5-6 ist abzulesen wieviele Goldpartikel bei einer bestimmten Zellgröße und der sich daraus nach Formel 5-1 berechneten Zellzahl bei Verwendung der MIP-Methode benötigt werden, um unter den gegebenen Voraussetzungen das Maximum an Einfach- oder Zweifachtreffern zu erhalten. Die Werte wurden mit den aus Tabelle 5-5 erhaltenen Daten berechnet.

In Tabelle 5-7 wird der Zusammenhang zwischen einer bestimmten Goldmenge und der korrespondierenden Partikelzahl in Abhängigkeit vom Partikeldurchmesser verdeutlicht. Aus der Tabelle kann abgelesen werden, welche Goldmenge pro Trägerscheibe eingesetzt werden muß. Diese Ergebnisse sind praktisch direkt umzusetzen. So konnte die im Rahmen einer Diplomarbeit (134) durchgeführte experimentelle Optimierung der Transfektionsbedingungen für die Zelllinie BM185 die durch die Computersimulation erhaltenen Parameter exemplarisch bestätigen. Die Berechnungen können zwar eine experimentelle Optimierung nicht völlig ersetzen, da biologische Einflußfaktoren im Modell nicht berücksichtigt werden, aber sie können helfen, Laborexperimente auf einen sinnvollen Bereich einzugrenzen und zukünftig den ballistischen Gentransfer noch effektiver zu machen.