

5 Ergebnisse

5.1 Begriffsdefinitionen

Im Ergebnisteil werden die Begriffe „Transfektionsrate“ und „Expression von Genen“ verwendet, die im folgenden definiert werden sollen:

Die Transfektionsrate wird als der prozentuale Anteil der lebenden Zellen verstanden, der nach dem Transfer des Reportergens eGFP und/ oder CD40L das zugehörige Genprodukt exprimiert. Die Einteilung in transfizierte und nicht transfizierte Zellen erfolgt nach durchflußzytometrischer Messung.

Aussagen über die Expression liefern im Vergleich zur Transfektionsrate keine Information über die Anzahl an Reporterprotein exprimierenden Zellen. Es wird vielmehr eine quantitative Aussage über die absolute Menge der Genprodukte IL-7 und GM-CSF gemacht. Die quantitative Bestimmung der Genprodukte wurde mit Hilfe von ELISA nachgewiesen.

5.2 Die MIP-Methode ermöglicht ballistischen Gentransfer in Zellen unabhängig von ihrer Fähigkeit zu adhären

Basierend auf den von der Firma Costar hergestellten Transwell[®]-Petrischalen wurde eine Methode entwickelt, die im folgenden MIP-Methode genannt wird und mit deren Hilfe Zellen unabhängig von ihrer Fähigkeit zu adhären ballistisch transfiziert werden können. Die Transwell[®]-Petrischalen haben einen mit einer mikroporösen Polycarbonatmembran bespannten Einsatz, auf den die Zellen in Form einer Monolayer aufgebracht werden können (Abbildung 5-1). Voraussetzung für ballistischen Gentransfer ist, daß keine Flüssigkeit über den Zellen verbleibt. Dies wird durch die MIP-Methode erreicht. Überstehende Flüssigkeit bremst die Goldpartikel stark ab, bevor sie auf die Zellen treffen. Hierdurch wird die Zahl der Goldpartikel, die in Zellen eindringen können, vermindert.

Adhärenz Zellen und Suspensionszellen können bei Anwendung der MIP-Methode unter den gleichen Bedingungen auf die Transwell[®]-Petrischalen aufgebracht und transfiziert werden. Aufgrund der kurzzeitigen Verweildauer der Zellen auf der Membran und der engen Packung können sich adhärenz Zellen nicht ausbreiten.

Für die Zeit auf der Polycarbonatmembran verbleiben sie abgerundet. Auf diese Weise wird erreicht, daß die von oben betrachtete Oberfläche des Zellkerns im Vergleich zum Zytoplasma eine möglichst große Fläche einnimmt. Eine große Zellkernoberfläche erhöht die Wahrscheinlichkeit, das der Zellkern direkt von einer mit DNA beladenen Goldkugel getroffen wird. Deshalb können mehr adhärenente Zellen ausgesät werden als auf Petrischalen, auf denen Zellen adhärenent nach konventioneller Art kultiviert werden. Wegen des permanenten Flüssigkeitskontaktes über die Membranporen trockenen die Zellen nicht aus.

Aufgrund der gleichartigen, kugelähnlichen Form von Suspensionszellen und suspendierten adhärenenten Zellen ist für beide Zelltypen eine Berechnung der Zellzahl für eine optimale Packung basierend auf dem Zelldurchmesser, gemessen in Suspension, möglich. Ein lückenloser Zellrasen ist wichtig, damit die Zellen nicht einen breiten Zytoplasmasaum ausbilden, der die Wahrscheinlichkeit, den Zellkern direkt zu treffen, vermindert.

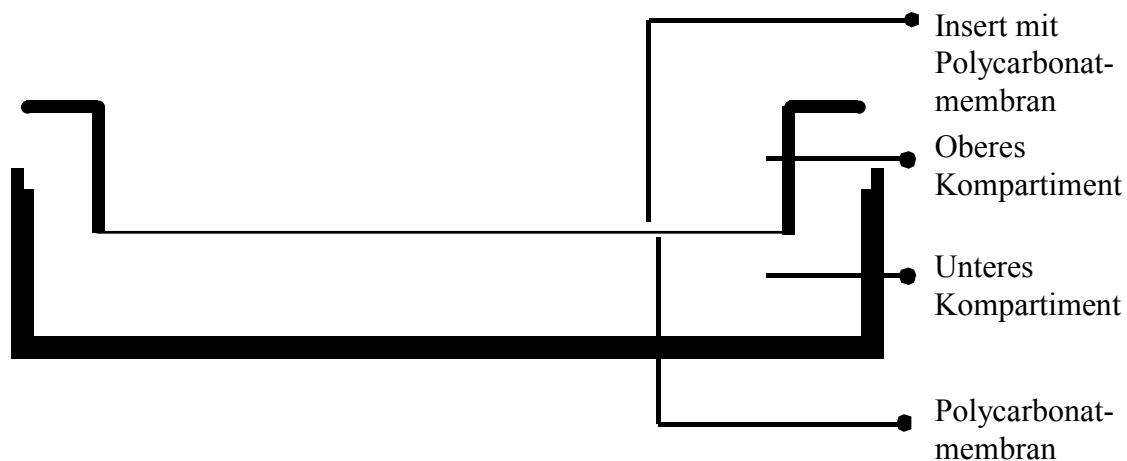


Abbildung 5-1: Schematische Zeichnung einer Transwell®-Petrischale. Die Porengröße beträgt 3 µm und der Innendurchmesser der Schale 75 mm.

5.2.1 Die MIP-Methode

Durch die Entwicklung der MIP-Methode wurde es möglich den Arbeitsablauf zur Transfektion klinischer Proben zeitlich zu optimieren und in seiner Effektivität zu steigern. Erst durch die Erarbeitung eines für klinische Proben standardisierten Arbeitsablaufes, kann der ballistomagnetische Gentransfer nun sinnvoll bei der Herstellung der genterapeutischen Vakzine in klinischen Studien eingesetzt werden. Die Beschreibung MIP-Methode stellt zwar unter formalen Aspekten ein Methodenprotokoll dar, gleichzeitig ist sie jedoch auch ein wichtiges inhaltliches Ergebnis, auf dem alle folgenden Ergebnisse aufbauen. Aus diesem Grund soll auf die MIP-Methode hier im Ergebnisteil eingegangen werden.

5.2.1.1 Vorbereitung der Zellen

Suspensionszellen: Die Zellen werden aus Zellkulturflaschen geerntet oder aus Blutprodukten über Dichtegradientenzentrifugation isoliert, in PBS gewaschen, abzentrifugiert und in Medium oder Pufferlösung resuspendiert.

Adhärenente Zellen: Die Zellen werden von ihrer Unterlage abgelöst und in isotoner Pufferlösung gewaschen. Eine vollständige Vereinzelnung der Zellen ist entscheidend für eine hohe Transfektionsrate und eine effiziente Anreicherung der magnetisch markierten Zellen. Es sollte deshalb mikroskopisch überprüft werden, ob tatsächlich eine Einzelzellsuspension vorliegt.

Gelingt die Zellvereinzelnung nicht vollständig oder nur mit unter großen Zellverlusten, die sich meist auf lange Einwirkdauer der zum Ablösen der Zellen verwendeten Enzyme zurückführen lassen, ist es hilfreich, die Zellen nur bis zu einer Dichte von ca. 70% der Fläche einer Zellkulturflasche wachsen zu lassen.

Gewebe: Aus Geweben, z.B. Tumorgewebe, wird eine Einzelzellsuspension wie in Kapitel 4.2.1.3 beschrieben hergestellt.

5.2.1.2 Equilibrieren der Polycarbonat-Membraneinsätze:

1. Es werden zunächst 6 ml Medium bzw. PBS mit 10% FCS Anteil in das Insert der Transwell[®]-Petrischalen auf die Polycarbonatmembran pipettiert. Es ist wichtig, daß die Membran vollständig benetzt ist.
2. Inkubationszeit von mindestens 3 Minuten.

3. Es werden durch jeden der drei Einlässe zwischen Insert und Petrischale je 0,5 ml Medium so unter die Polycarbonatmembran pipettiert, daß die Flüssigkeit zu ihrer Unterseite Kontakt bekommt. Durch aus dem Kompartiment über der Membran nach unten strömende Flüssigkeit füllt sich das Kompartiment unterhalb der Membran innerhalb einer Minute.
4. Aus dem unteren Kompartiment wird Medium durch einen Einlass zwischen Membran und Petrischale so lange mit einer Pipettierhilfe abgesaugt, bis keine Flüssigkeit mehr im oberen Kompartiment der Petrischale vorhanden ist, jedoch die Polycarbonatmembran vollständig von der Unterseite benetzt ist.

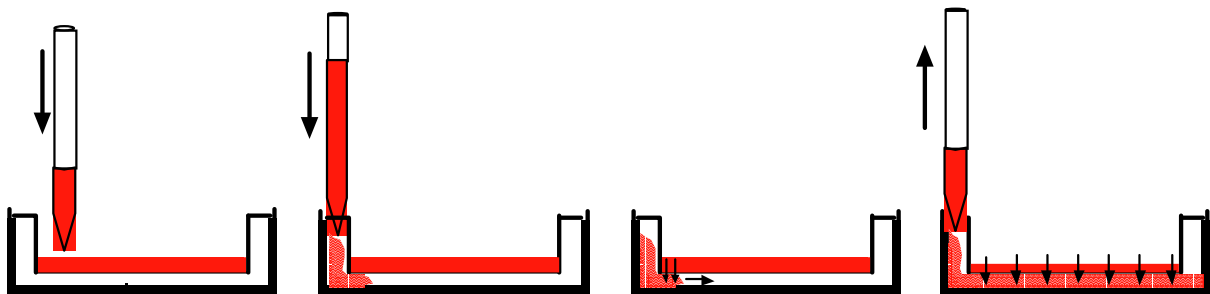


Abbildung 5-2: 4 Arbeitsschritte zum Equilibrieren der Polycarbonatmembran

5.2.1.3 Berechnung der auszusäenden Zellzahl

Abhängig von dem mittleren Zelldurchmesser (d), kann pro Transwell[®] eine unterschiedlich große maximale Zellzahl eingesetzt werden (Tabelle 5-1). Ziel der folgenden Berechnung ist eine optimale Packung der Zellen auf der Polycarbonatmembran. Neben der guten Ausnutzung der Membranfläche durch eine möglichst große Anzahl von Zellen wird durch die dichte Anordnung bei adhärenenten Zellen verhindert, daß sich ein breiter Zytoplasmasaum um den Zellkern bildet. Zuerst wird der mittlere Zelldurchmesser mit einem Coulter[®] Multisizer II bestimmt. Durch Einsetzen des Betrags für den mittleren Zelldurchmesser in Mikrometern in Formel 5-1 erhält man die Zellzahl, mit der die zur Verfügung stehende Fläche am besten mit Zellen ausgefüllt wird.

$$N = \frac{5,10 \cdot 10^9}{d_{Zelle}^2} \cdot 0,8 \quad (N = \text{Zellzahl}; d_{Zelle} = \text{Betrag des Zelldurchmesser in } (\mu\text{m}))$$

Formel 5-1: Formel zur Berechnung der Zellzahl, die bei Verwendung der MIP-Methode eingesetzt werden kann. Zur Herleitung der Formel siehe Kapitel 4.7.1.

Größe der Zellen in Suspension in (μm)	Berechnete Zellzahl
6	$1,13 \times 10^8$
8	$6,38 \times 10^7$
10	$4,08 \times 10^7$
12	$2,83 \times 10^7$
14	$2,08 \times 10^7$
16	$1,59 \times 10^7$
18	$1,26 \times 10^7$
20	$1,02 \times 10^7$
22	$8,43 \times 10^6$
24	$7,08 \times 10^6$
26	$6,04 \times 10^6$

Tabelle 5-1: Die Tabelle listet in der ersten Spalte den Zelldurchmesser in Mikrometern auf und in der zweiten Spalte die mit Hilfe der Formel 5-1 ermittelte einsetzbare Zellzahl, die auf einer Transwellmembran noch eine Monolayer ergibt.

Nach Berechnung der einzusetzenden Zellzahl wird die Zellkonzentration so eingestellt, daß das Volumen, in dem die gewünschte Zellzahl enthalten ist, 10 ml nicht über- und 4 ml nicht unterschreitet.

5.2.1.4 Aussäen der Zellen

1. Unabhängig vom Zelltyp wird die gewünschte Zellzahl in dem entsprechenden Volumen in das Insert der Petrischale pipettiert. Um eine möglichst homogene Verteilung der Zellen auf der Membran zu erreichen ist es hilfreich, die Zellkulturschale auf eine waagrecht ausgerichtete Platte unter der Sterilbank zu stellen.
2. Durch einen der drei Einlässe zwischen Membraninsert und Petrischale wird nun nach unten abfließende Flüssigkeit entfernt. Durch senkrecht einführen der Pasteurpipette stellt man sicher, daß nicht zuviel Flüssigkeit abgesaugt wird.
3. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis alle Flüssigkeit in das Kompartiment unter der Membran abgefließen ist und die Zellen direkt auf ihr liegen. Wichtig ist

hierbei, daß die Membran von unten stets vollständig mit Flüssigkeit benetzt bleibt, jedoch kein Medium mehr über den Zellen steht.

4. Ballistischer Gentransfer.

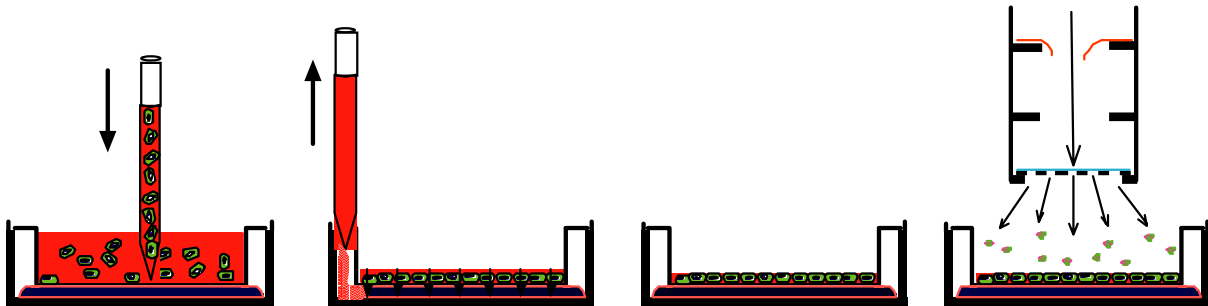


Abbildung 5-3: 4 Arbeitsschritte zum Aussäen der Zellen

Die während des Gentransfers unter der Membran verbleibende Flüssigkeit erfüllt drei Aufgaben:

1. Physikalisch gesehen dient sie als Widerlager, welches verhindert, daß Zellen durch die beim Transfektionsprozess erzeugte Heliumdruckwelle durch die Poren gedrückt werden. Gleichzeitig wird so ein Zerreißen der Polycarbonatmembran verhindert. Eine mehrfache Verwendung der Membran wird dadurch möglich.
2. Erhaltung der Vitalität der Zellen durch Kontakt mit dem Medium im unteren Kompartiment über die Membranporen. Es ist bei enger Packung der Zellen zu beobachten, daß auch zwischen den Zellen Medium verbleibt. Dies ist vermutlich auf Kapillarkräfte zurückzuführen.
3. Durch temperiertes Medium kann die Temperatur auch während des Gentransfers bestimmt werden.

5.2.1.5 Ablösen der Zellen von der Polycarbonatmembran

Sofort nach erfolgtem ballistischen Gentransfer werden die Zellen mit Zellkulturmedium oder Pufferlösung durch einfaches Pipettieren gründlich von der Membran abgelöst. Dazu werden die Zellen mit einer 1 ml Pipette von oben nach unten von der schräg gehaltenen Membran abgespült. Die abgelösten Zellen werden in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt.

Alternativ kann das Polycarbonatmembraninsert steril in den Deckel einer 10cm Zellkulturschale transferiert werden. Die Polycarbonatmembran liegt auf dem Deckel auf und kann so beim Ablösen der Zellen nicht so leicht durchstoßen werden.

Bei beiden Methoden beträgt das zum vollständigen Ablösen der Zellen benötigte Volumen erfahrungsgemäß 10 ml. Mit einem Lichtmikroskop sollte überprüft werden, ob alle Zellen von der Membran abgelöst wurden.

5.2.2 Vergleich der MIP-Methode mit der Burkholder-Methode

Mit dieser Versuchsreihe sollte untersucht werden, wie viele Zellen bei Verwendung der MIP-Methode nach ballistischem Gentransfer zurückgewonnen werden können. Als Vergleich diene die Burkholder-Methode (128, Kapitel 4.2.2), bei der Zellen in einem Volumen von 250 µl Pufferlösung mit Hilfe eines Zellschabers auf einer Petrischale ausgestrichen werden.

Zellen sechs verschiedener Zelllinien wurden entweder auf Polycarbonatmembranen ausgesät oder auf Petrischalen ausgestrichen und nachfolgend ballistisch transfiziert. Hierzu wurden die von Sack et al. etablierten Bedingungen für den ballistomagnetischen Gentransfer verwendet (siehe Kapitel 4.3 und 134).

Verglichen wurde jeweils die Anzahl der von Polycarbonatmembranen abgelösten, mit den von Petrischalen abgelösten Zellen nach erfolgtem ballistomagnetischem Gentransfer. Dabei wurden die drei nichtadhärenten Zelllinien BM185, U937 und Jurkat, die semi-adhärente Zelllinie K562 und zwei adhärente, aus Primärkulturen etablierte Zelllinien verwendet. Davon wurde eine aus einem Nierenzellkarzinom (NKZ1), die andere aus einem malignen Melanom (MMZ1) gewonnen.

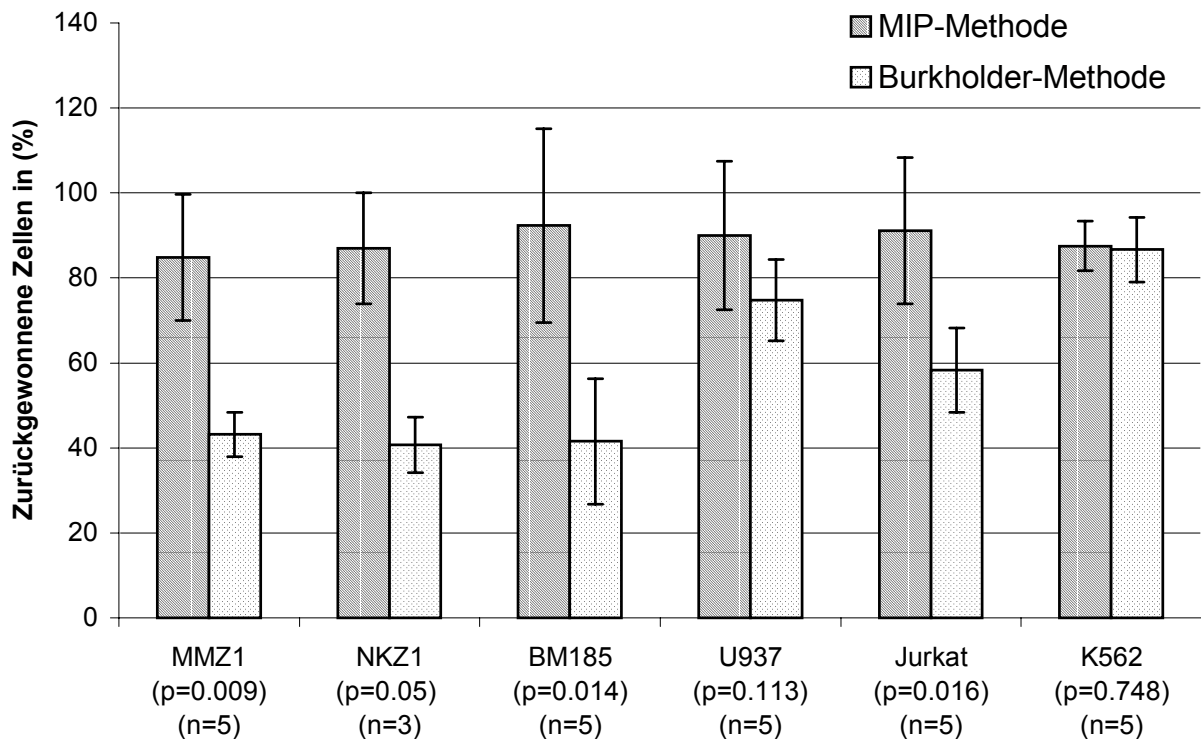


Abbildung 5-4: Vergleich der Zellzahlen nach ballistomagnetischem Gentransfer bei Verwendung der MIP-Methode oder der Burkholder-Methode (p: Signifikanzniveau, n: Anzahl der durchgeführten Experimente)

Zellen wurden entweder nach der MIP-Methode oder nach der Burkholder-Methode ausgesät und ballistomagnetisch transfiziert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und gezählt. Die erhaltenen Zellzahlen wurden in Bezug zu der ausgesäten Zellzahl gesetzt. Im Diagramm wird die Anzahl zurückgewonnener Zellen als prozentualer Anteil der ausgesäten Zellen dargestellt.

Bei beiden adhärenen Zelllinien konnten jeweils rund 85% der mit der MIP-Methode ausgesäten Zellen zurückgewonnen werden. Bei den Suspensionszelllinien wurden 92% bei BM185, 90% bei U937 und 91% bei Jurkat zurückgewonnen, während es bei der semi-adhärenen Zelllinie K562 88% waren. Im Mittel wurden bei Verwendung der MIP-Methode 89% der ausgesäten Zellen zurückgewonnen.

Im Vergleich dazu konnten im Mittel 58% der mit der Burkholder-Methode ausgesäten Zellen zurückgewonnen werden. Dies waren im einzelnen: MMZ1: 43%, NKZ1: 41%, BM185: 43%, U937: 75%, Jurkat: 58% und K562 87%.

5.2.3 Vergleich der Zellausbeute nach ballistischem Gentransfer mit der MIP-Methode oder der Burkholder-Methode nach magnetischer Anreicherung der Zellen

Mit diesem Experiment wurde überprüft, ob die Methode des Ausäens der Zellen einen Einfluß auf die magnetische Anreicherung der Zellen nach dem ballistomagnetischen Gentransfer hat. Hierzu wurden die aus dem vorangehenden Experiment gewonnenen Zellen auf magnetische Trennsäulen gegeben.

Gemäß dieser Methode wird die Anreicherung der die Fremdgene exprimierenden Zellen durch zusätzliche Beladung der DNA tragenden Goldpartikel mit superparamagnetischen Partikeln erreicht. Eine sich dem ballistischen Gentransfer anschließende Reinigung über eine Trennsäule, die als Matrix Eisenwolle enthält und sich in einem Permanentmagneten befindet, führt zum Zurückhalten der magnetisch markierten Zellen. Diese können nach Entfernung des Permanentmagneten aus der Säule eluiert werden.

Vor dem Gentransfer wurden die Zellen entweder mit der MIP-Methode oder mit der Burkholder-Methode ausgesät. Es wurden wieder die schon in den vorangegangenen Versuchen verwendeten Zelllinien verwendet. Es wurden die Zellzahlen der aus den Säulen eluierten magnetisch angereicherten Zellfraktionen verglichen.

Die im Diagramm dargestellten Daten stammen für die Zelllinien BM185, U937, Jurkat, K562 und MMZ1 aus je 5 und für die Zelllinie NKZ1 aus 2 unabhängigen Experimenten, deren Mittelwerte und der sich ergebende Fehlerindikator im Diagramm dargestellt sind. Für die Suspensionszellen ergeben sich folgende Zellzahlen: BM185: $1,78 \times 10^5$, U937: $3,36 \times 10^5$, Jurkat: $7,32 \times 10^5$; für die adhärenen Zelllinien: MMZ1 $4,92 \times 10^5$ und NKZ1: $2,25 \times 10^5$; und für die semi-adhärenente Zelllinie K562: $3,02 \times 10^5$. Dagegen war die Ausbeute für die ausgestrichenen Zellen folgendermaßen: BM185: $7,50 \times 10^4$, U937: $1,10 \times 10^5$, Jurkat: $2,54 \times 10^5$; für die adhärenen Zelllinien: MMZ1 $1,12 \times 10^6$ und NKZ1: $1,65 \times 10^6$ und für die semi-adhärenente Zelllinie K562: $1,18 \times 10^5$.

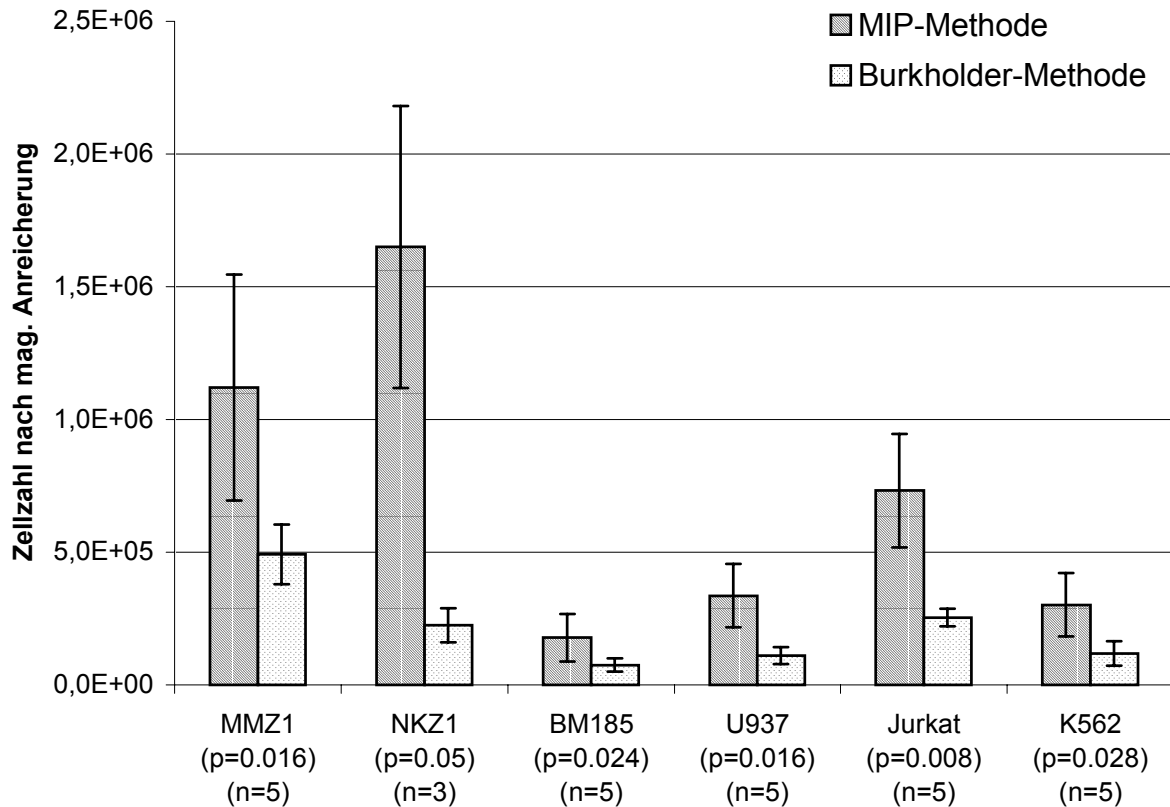


Abbildung 5-5: Vergleich von auf Polycarbonatmembranen oder auf Petrischalen transfizierten Zellen nach Anreicherung der magnetisch markierten Fraktion (p: Signifikanzniveau, n: Anzahl der durchgeführten Experimente)

Bei auf Polycarbonatmembranen transfizierten Zellen ist die Ausbeute nach magnetischer Anreicherung größer als wenn die Zellen auf Petrischalen ausgestrichen wurden. Dieser Effekt ergibt sich nicht nur aus der Zahl der nach dem Gentransfer zurückgewonnenen Zellen. Vergleicht man die in der Tabelle aufgeführten Anreicherungsfaktoren, ist auch die Separation effizienter. Im Mittel beträgt die Anreicherung nach ballistischem Gentransfer das 1,7-fache, wenn die Zellen auf Polycarbonatmembranen ausgesät wurden. Der höchste Anreicherungsfaktor wurde für BM185 mit den 2,2-fachen und der niedrigste für K562 mit dem 1-fachen erreicht.

Nach Isolierung der magnetisch markierten Zellen betrug die Anreicherung im Mittel das 3,4-fache und erreichte mit dem 7,3-fachen für NKZ1 den höchsten und dem 2,3-fachen für MMZ1 den niedrigsten Wert.

Zelllinie	Anreicherungsfaktor ohne Sortierung: n₁ MIP-Methode / n₂ Burkholder-Methode	Anreicherungsfaktor nach mag. Separation: n₁ MIP-Methode / n₂ Burkholder-Methode
MMZ1	1,9	2,3
NZK1	2,1	7,3
BM185	2,2	2,4
U937	1,2	3,1
Jurkat	1,6	2,9
K562	1,0	2,6
Mittelwert	1,7	3,4

Tabelle 5-2: Vergleich der Anreicherungsfaktoren nach ballistischem Gentransfer und nach Anreicherung der magnetischen Fraktion über Trennsäulen. Die Zellen wurden entweder auf Polycarbonatmembranen ausgesät oder auf Petrischalen ausgestrichen. n: Zellzahl

5.2.4 Vergleich der Transfektionsraten mit Reporter genen

Im ersten Experiment wurde untersucht, wie effizient K562-Zellen mit dem Reporter gen eGFP (enhanced green fluorescent protein) transfiziert werden können. Das zytoplasmatisch lokalisierte Reporter genprodukt eGFP ist die in ihren Fluoreszenzeigenschaften für die Durchflußzytometrie optimierte Variante des aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria* isolierten grün fluoreszierenden Proteins (132,133). EGFP ist besonders gut zur Bestimmung von Transfektionsraten geeignet, da GFP-exprimierende Zellen direkt im Durchflußzytometer ohne Zusatz von Reagenzien oder Antikörpern detektiert werden können. Die durchflußzytometrische Bestimmung der Transfektionsrate mit eGFP ermöglicht einen Nachweis der Transfektion auf Einzelzellebene.

Bei der Auswertung dieses Versuchs wurden die prozentualen Anteile der transfizierten lebenden Zellen verglichen, die nach ballistomagnetischem Gentransfer entweder nach Anwendung der MIP-Methode oder der Burkholder-Methode erhalten wurden. Bei dieser Betrachtungsweise, bei der nicht absolute Zellzahlen berücksichtigt werden, beträgt die Transfektionsrate bei Anwendung der MIP-Methode 38% und bei Anwendung der Burkholder-Methode 42%.

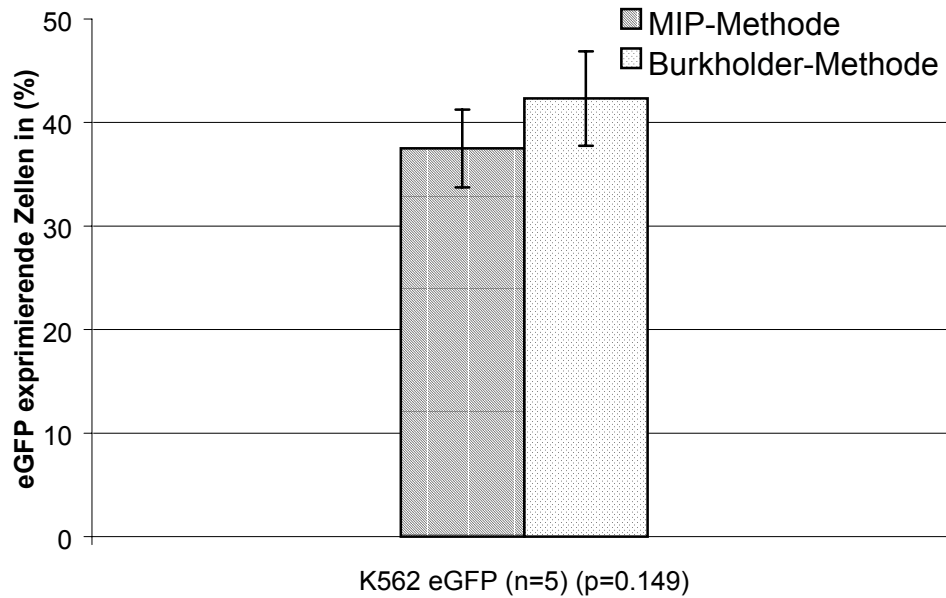


Abbildung 5-6: eGFP-Expression nach Transfektion von K562-Zellen mit einem Expressionskonstrukt für eGFP

5.2.4.1 Vergleich der Koftransfektion von CD40L und eGFP

Neben dem Nachweis der erfolgreichen Co-Expression zweier Reportergene wurde gezeigt, daß die transfizierten Zellen noch zu komplexen Funktionen, wie der Expression des CD40-Liganden auf der Zellmembran, in der Lage sind. Als Marker für die Effizienz des ballistomagnetischen Gentransfers wurden zwei Gene transferiert: das Gen für das zytoplasmatisch lokalisierte eGFP und das Gen für den auf der Zellmembran lokalisierten CD40-Liganden.

Zellen ohne endogene CD40L Expression wurden entweder mit der MIP-Methode oder der Burkholder-Methode ausgesät, ballistisch transfiziert und nachfolgend magnetisch angereichert. Die Ergebnisse der Transfektionsexperimente sind in den folgenden vier Diagrammen dargestellt.

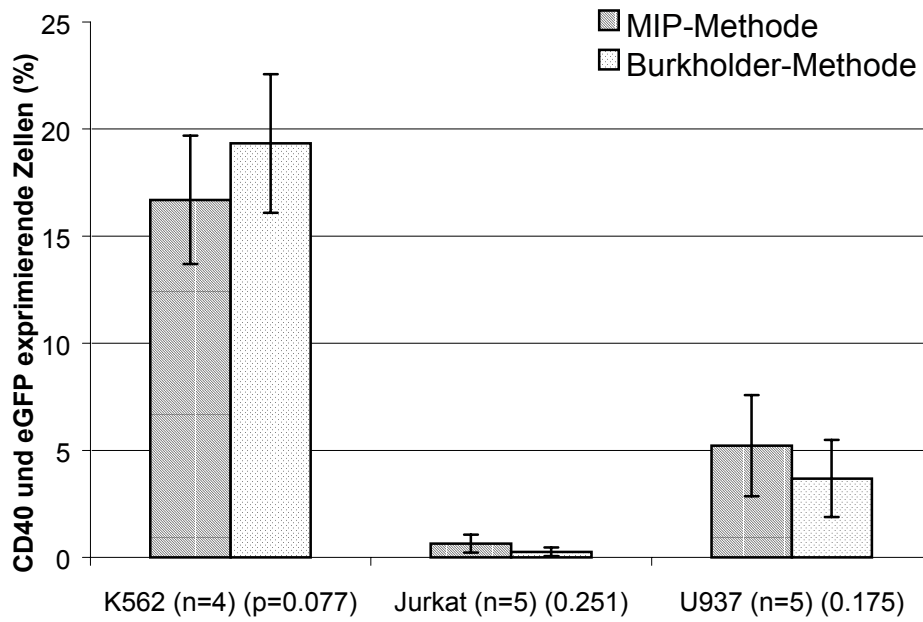


Abbildung 5-7: CD40L und eGFP exprimierende Zellen nach Kotransfektion beider Gene

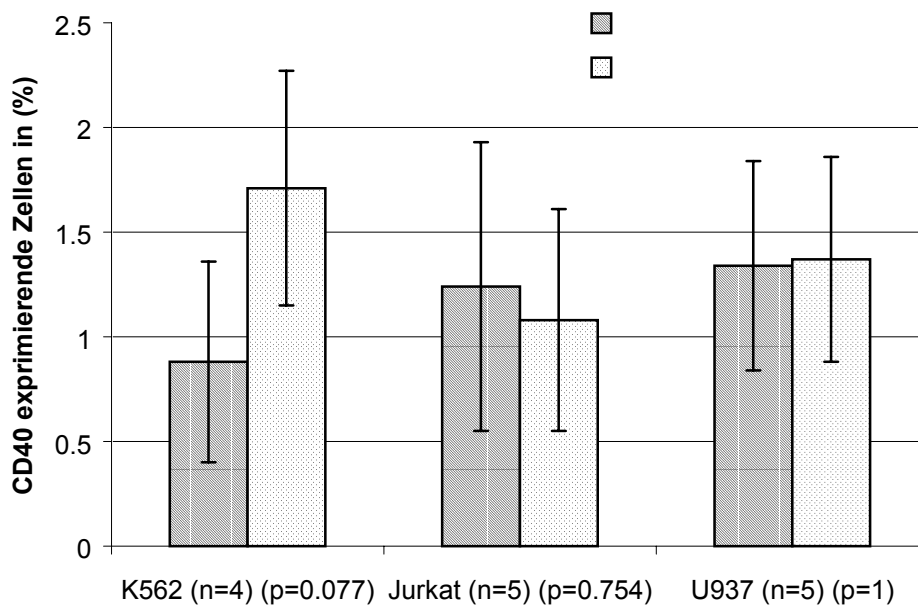


Abbildung 5-8: Nur CD40L exprimierende Zellen nach Kotransfektion von eGFP und CD40L

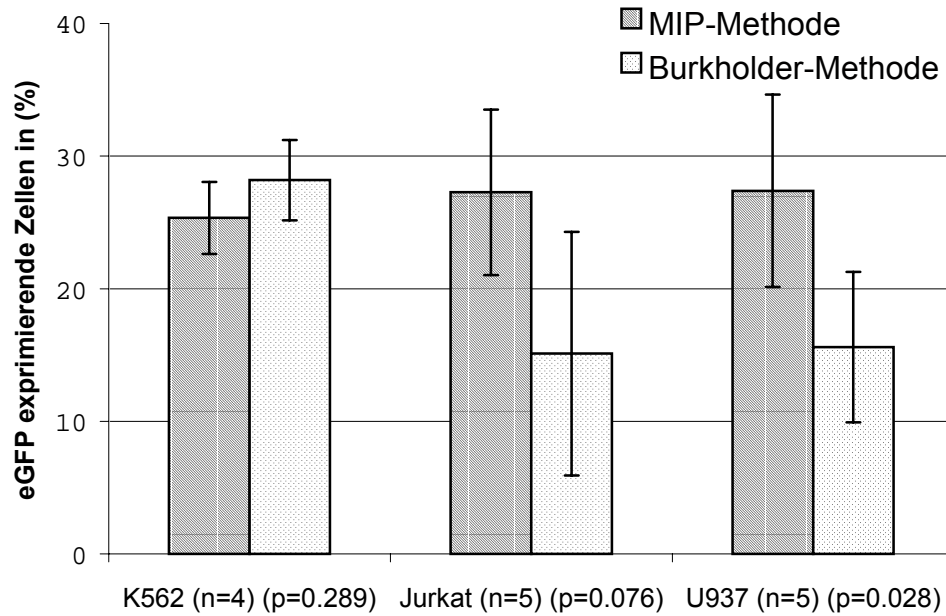


Abbildung 5-9: Nur eGFP exprimierende Zellen nach Kotransfektion von eGFP und CD40L

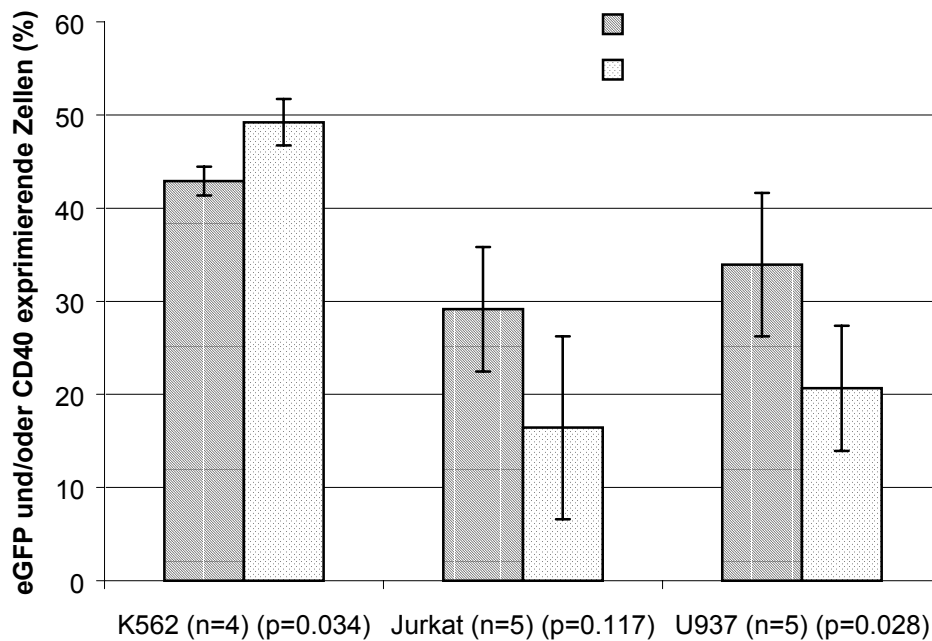


Abbildung 5-10: eGFP und/oder CD40L exprimierende Zellen. Die Werte entsprechen der Gesamttransfektionsrate.

K562-Zellen ließen sich von den drei getesteten Zelllinien am effizientesten mit eGFP und CD40L kotransfizieren. Bei Kotransfektion von K562-Zellen mit CD40L und eGFP war der Gentransfer auf Petrischalen tendenziell effizienter, jedoch nicht signifikant besser als mit der MIP-Methode. So waren auf Petrischalen gegenüber Polycarbonatmembranen 1,7% versus 0,9% nur CD40L positiv, 19,3% versus 16,7% eGFP und CD40L positiv und 42,9% versus 49,2% eGFP und/ oder CD40L positiv. Für die Zelllinie Jurkat und U937 war es vorteilhafter, wenn sie unter Verwendung der MIP-Methode ballistisch transfiziert wurde. Der Unterschied beim Vergleich der Mittelwerte betrug für die CD40L und/oder eGFP positiven Zellen für beide Zelllinien etwa 13%. Die Transfektionsrate für Jurkat-Zellen auf Polycarbonatmembranen gegenüber Petrischalen betrug für CD40L 1,24% versus 1,08%, für eGFP und CD40L 0,64% versus 0,26%, für eGFP 27,3% versus 15,1% und für eGFP und/oder CD40L 29,2% versus 16,4%. Bei dieser Zelllinie fällt auf, dass im Gegensatz zu den beiden anderen die CD40L und eGFP positive Fraktion kleiner ist als die nur CD40L positive. Die Transfektionsrate für U937-Zellen auf Polycarbonatmembranen gegenüber Petrischalen betrug für CD40L 1,3% versus 1,4%, für eGFP und CD40L positive 5,2% versus 3,7%, für eGFP positive 27,4% versus 15,6% und für eGFP und oder CD40L positive 34% versus 21%.

5.3 Kotransfektion von Primärkulturen mit GM-CSF und IL-7

Zur Messung der Transfektionseffizienz wurde die Expression von IL-7 und GM-CSF nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mittels ELISA bestimmt. Als Kontrolle wurde die IL-7 und GM-CSF Expression von nichttransfizierten Zellen der gleichen Präparation bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5-3 und 5-4 dargestellt. Die Werte sind auf 10^6 Zellen bezogen und werden in Pikogramm angegeben. Es wurden die Zellen von 16 verschiedenen Nierenzellkarzinom-Patienten und von 6 Patienten mit malignem Melanom transfiziert. Eine magnetische Separation der transfizierten Zellen wurde bei diesem Experiment nicht durchgeführt, um die Vitalität der Zellen nicht weiter einzuschränken.

Patient	pg IL-7 /10 ⁶ Zellen		pg GM-CSF /10 ⁶ Zellen	
	Kontrolle	transfiziert	Kontrolle	transfiziert
1. Patient	18,2	947	- ¹	26.395
2. Patient	- ¹	1.319	- ¹	67.540
3. Patient	39,0	722	- ¹	11.783
4. Patient	7,5	5.194	- ¹	40.254
5. Patient	- ¹	1.999	- ¹	17.668
6. Patient	- ¹	87	144,	234.785
7. Patient	- ¹	60	144,	385.740
8. Patient	- ¹	1.081	1.060	29.633
9. Patient	61,9	3.484	6,7	136.903
10. Patient	44,5	126	510	9.765
11. Patient	44,5	391	932	2.210
12. Patient	2,1	252	- ¹	15.580
13. Patient	3,5	245	- ¹	6.505
14. Patient	- ¹	317	- ¹	33.465
15. Patient	2,5	244	- ¹	55.400
16. Patient	1,9	240	- ¹	59.285

(-¹) Der Wert liegt unter der Nachweisgrenze des verwendeten ELISA-Kit.

Tabelle 5-3: Zytokinproduktion der Nierenzellkarzinomzellen von 16 Patienten

Patient MMZ	pg IL-7 /10 ⁶ Zellen		pg GM-CSF /10 ⁶ Zellen	
	Kontrolle	transfiziert	Kontrolle	transfiziert
1. Patient	2,3	222	- ¹	58.306
2. Patient	1,0	672	- ¹	55.023
3. Patient	2,0	227	- ¹	54.408
4. Patient	1,7	322	15,9	88.208
5. Patient	- ¹	253	- ¹	25.893
6. Patient	- ¹	146	5,4	7.160

(-¹) Der Wert liegt unter der Nachweisgrenze des verwendeten ELISA-Kit.

Tabelle 5-4: Zytokinproduktion der Melanomzellen von 6 Patienten

5.4 Computersimulation des ballistischen Gentransfers

Ziel des Experiments: Die bisher verwendeten Einstellungen beim ballistomagnetischen Gentransfer beruhen auf den von Sack et al. vorgestellten Ergebnissen (134). Um die Effizienz des ballistischen Gentransfers zu erhöhen, sollten mit diesem Experiment zunächst die optimalen Bedingungen für den ballistomagnetischen Gentransfer gefunden werden. Von diesen Bedingungen ausgehend, sollten Schwachstellen des Verfahrens aufgedeckt und Kriterien für eine Optimierung erarbeitet werden, die in späteren Studien zur Anwendung kommen könnten.

Zunächst wurde die Trefferrate bestimmt, bei der möglichst viele Eintreffere und möglichst wenig Mehrfachtreffer erzielt werden, da bei diesen Einstellungen die beste Transfektionsrate in Verbindung mit der größten Vitalität zu erwarten ist. Da abhängig vom Zelltyp auch Zweifachtreffer oder Mehrfachtreffer möglich sind, wurden auch diese Werte berechnet und dargestellt (siehe Abbildung 5-11 und Tabelle 5-5).

Nachfolgend wurde ermittelt, wieviele Goldpartikel bei einer bestimmten Zellgröße und der sich daraus nach Formel 5-1 berechneten Zellzahl unter Verwendung der MIP-Methode benötigt werden, um unter den gegebenen Voraussetzungen das Maximum an Einfach- oder Zweifachtreffern zu erhalten (Tabelle 5-6). Die Werte wurden mit den aus Tabelle 5-5 erhaltenen Daten berechnet. Dann sollte, um eine Umsetzung der Ergebnisse in die Praxis zu ermöglichen, der Zusammenhang zwischen einer bestimmten Goldmenge und der korrespondierenden Partikelzahl in Abhängigkeit vom Partikeldurchmesser verdeutlicht werden. Aus der Tabelle 5-7 kann abgelesen werden, welche Goldmenge pro Trägerscheibe eingesetzt werden muß.

5.4.1 Darstellung der Treffer pro Zelle bei unterschiedlichen Trefferraten

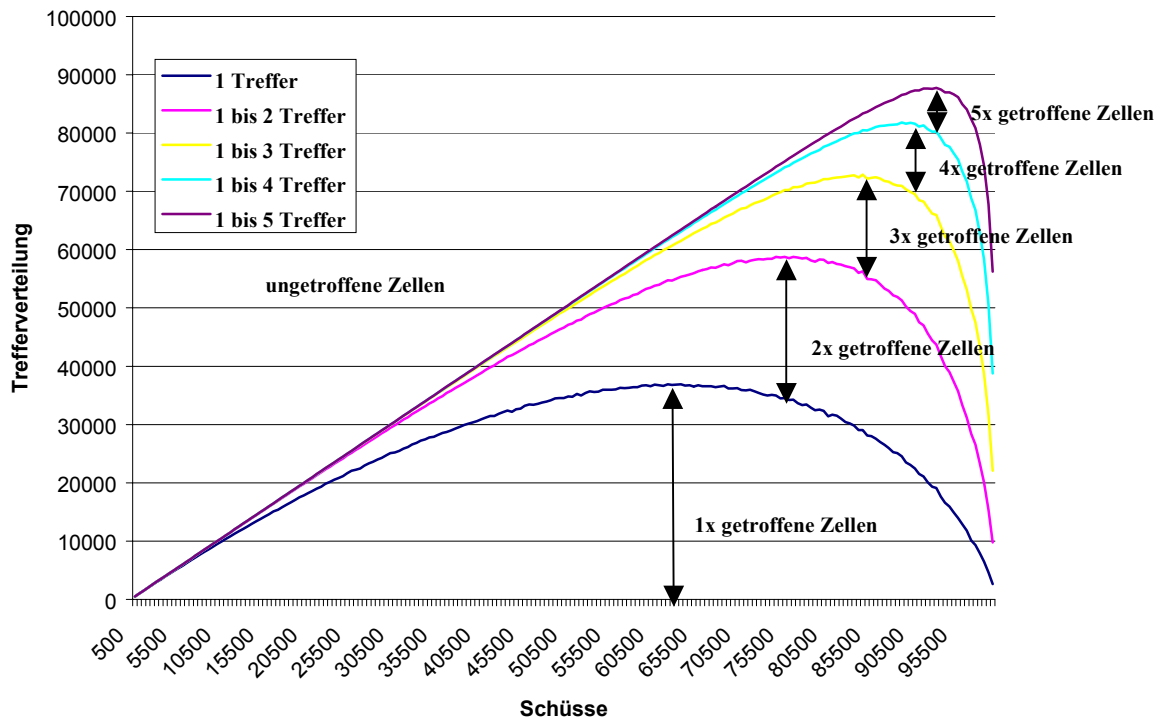


Abbildung 5-11: Darstellung der Treffer pro Zelle bei unterschiedlichen Trefferraten

Aus dem Diagramm läßt sich ablesen, daß das Maximum der Einfachtreffer bei 36,9% liegt. Die Gesamttrefferrate beträgt hierbei 62% und setzt sich zusammen aus:

- 36,9% Einfachtreffern,
- 17,9% Zweifachtreffern,
- 5,5% Dreifachtreffern,
- 1,4% Vierfachtreffern und
- 0,26% Fünfachtreffern.

Im idealen Fall wäre also davon auszugehen, daß 37% der einfachgetroffenen Zellen den Gentransfer überleben und transfiziert sind. 25% der Zellen wären zwei- oder mehrfach getroffen. Hier ist davon auszugehen, dass viele dieser Zellen den Beschuss nicht überleben werden. Es ist also mit einer maximalen Todesrate von 25% zu rechnen.

Ungetroffen und lebend sollten 38% der Zellen verbleiben.

Läßt man bei einem „robusten“ Zelltyp Einfach- und Zweifachtreffer zu, erhält man bei einer Gesamttrefferrate von 78% folgende Ergebnisse:

33,4% Eintreffere,
 25,2% Zweifachtreffer,
 12,7% Dreifachtreffer,
 4,8% Vierfachtreffer und
 0,47% Fünfachtreffern.

Unter diesen Voraussetzungen wäre im idealen Fall davon auszugehen, daß 58,6% der ein- und zweifachgetroffenen Zellen den Gentransfer überleben und transfiziert sind. 19,4% der Zellen wären zwei- oder mehrfach getroffen. Hier ist davon auszugehen, dass viele dieser Zellen den Beschuss nicht überleben werden. Es ist also mit einer maximalen Todesrate von 19,4% zu rechnen.

Nicht getroffen und lebend sollten 22% der Zellen verbleiben.

5.4.2 Trefferverteilung bei unterschiedlichen Gesamttrefferraten

Nimmt man z.B. die erste Zeile der Tabelle 5-5, so wurde solange der Beschuß von Zellen im Computer simuliert, bis 2000 (=2%) Zellen getroffen bzw. 98000 (=98%) nicht getroffen wurden.

1980 Zellen wurden einfach getroffen und 20 Zellen zweifach. Es gab keine Zelle in dieser Spalte, die mehr als zweimal getroffen wurde.

Möchte man die Zahl der Zweifachtreffer ermitteln, so zieht man die Zahl der einfach getroffenen von der bis zweifach getroffenen ab.

Die Zahl der überhaupt getroffenen Zellen wird in der Tabelle um 2000 pro Zeile erhöht.

In den Spalten wurden die zugehörigen Trefferraten dargestellt: Spalte 1 gibt die Gesamttreffer in Prozent an, Spalte 2 die einfach getroffenen Zellen usw.

In Tabelle 5-5 wurden die Mittelwerte aus 10 Experimenten dargestellt.

Treffer (%)	1 Treffer	1 bis 2 Treffer	1 bis 3 Treffer	1 bis 4 Treffer	1 bis 5 Treffer	Gesamttreffer
2	1980	2000	2000	2000	2000	2000
4	3930	3997	4000	4000	4000	4000
6	5792	5998	6000	6000	6000	6000
8	7662	7992	8000	8000	8000	8000
10	9489	9975	10000	10000	10000	10000
12	11276	11972	12000	12000	12000	12000
14	12965	13940	13997	14000	14000	14000
16	14595	15924	15998	16000	16000	16000
18	16271	17885	17993	18000	18000	18000
20	17848	19846	19995	19999	20000	20000
22	19348	21791	21992	22000	22000	22000
24	20813	23710	23976	23998	23998	24000
26	22242	25665	25973	25998	26000	26000
28	23622	27530	27960	27999	28000	28000
30	25110	29444	29938	29993	29999	30000
32	26126	31248	31932	31996	32000	32000
34	27455	33127	33908	33992	33998	34000
36	28537	34896	35883	35988	36000	36000
38	29625	36666	37830	37982	37999	38000
40	30596	38445	39814	39978	39999	40000
42	31484	40167	41777	41969	41999	42000
44	32205	41909	43697	43969	43995	44000
46	33430	43593	45622	45958	45996	46000
48	33936	45084	47535	47954	47994	48000
50	34520	46596	49411	49923	49991	50000
52	34956	48016	51316	51903	51992	52000
54	35618	49565	53214	53870	53983	54000
56	36012	50866	54959	55837	55975	56000
58	36420	52228	56813	57789	57964	58000
60	36554	53466	58598	59743	59958	60000
62	36909	54768	60286	61690	61948	62000
64	36705	55515	61971	63593	63937	64000
66	36566	56512	63615	65527	65917	66000
68	36496	57165	65041	67349	67874	68000
70	36266	58036	66669	69188	69848	70000
72	35696	58267	67963	70991	71803	72000
74	35088	58439	69265	72782	73720	74000
76	34187	58541	70239	74413	75650	76000
78	33439	58588	71332	76083	77532	78000
80	32340	58285	72110	77639	79384	80000
82	31050	57414	72440	78993	81125	82000
84	29033	56029	72384	80012	82845	84000
86	27579	54724	72427	81080	84469	86000

88	25254	52149	71205	81446	85741	88000
90	23084	49462	69883	81751	87070	90000
92	20087	45640	67241	80691	87650	92000
94	16582	40031	62293	77990	86995	94000
96	12894	33311	55470	73425	84976	96000
98	7912	23264	43333	62754	78014	98000

Tabelle 5-5

5.4.3 Zusammenhang zwischen Zellgröße, Zellzahl und Partikelzahl

Zellgröße (µm)	Zellzahl bei Verwendung der MIP-Methode	Benötigte Partikelzahl (Treffermaximum bei 1x Treffern) ⁽¹⁾	Benötigte Partikelzahl (Treffermaximum bei 2x Treffern) ⁽¹⁾
8	6.4E+07	6.3E+09	7.1E+09
10	4.1E+07	4.0E+09	4.5E+09
12	2.8E+07	2.8E+09	3.1E+09
14	2.1E+07	2.1E+09	2.3E+09
16	1.6E+07	1.6E+09	1.8E+09
18	1.3E+07	1.2E+09	1.4E+09
20	1.0E+07	1.0E+09	1.1E+09
22	8.4E+06	8.3E+08	9.3E+08
24	7.1E+06	6.9E+08	7.8E+08
26	6.1E+06	5.9E+08	6.6E+08

⁽¹⁾= Partikelzahl, die bei Verwendung der Hydra benötigt wird.

Tabelle 5-6: Bei einer bestimmten Zellgröße kann bei Verwendung der MIP-Methode eine bestimmte Zellzahl eingesetzt werden. Um zu ermitteln, wieviele Partikel benötigt werden, damit das Treffermaximum bei den Einfachtreffern oder Zweifachtreffern liegt, wurden die aus Tabelle 5-5 ermittelten Prozentwerte der Einfach-, bis Fünffachtreffer mit der einzusetzenden Zellzahl multipliziert und die erhaltenen Werte addiert. Hierzu wurden die Zeilen mit dem Treffermaximum bei Einfach- und Zweifachtreffern verwendet.

5.4.4 Zusammenhang zwischen Goldmenge und Partikelzahl- und größe

Goldmenge/ Trägerscheibe (mg)	Partikelzahl pro Trägerscheibe			Partikelzahl bei Einsatz der Hydra ⁽¹⁾ (7 Trägerscheiben)		
	0,6µm	1,0µm	1,6µm	0,6µm	1,0µm	1,6µm
0,7	5.7E+08	1.2E+08	3.0E+07	4.0E+09	8.6E+08	2.1E+08
0,9	7.3E+08	1.6E+08	3.9E+07	5.1E+09	1.1E+09	2.7E+08
1,1	8.9E+08	1.9E+08	4.7E+07	6.2E+09	1.4E+09	3.3E+08
1,3	1.1E+09	2.3E+08	5.6E+07	7.4E+09	1.6E+09	3.9E+08
1,5	1.2E+09	2.6E+08	6.4E+07	8.5E+09	1.8E+09	4.5E+08
1,7	1.4E+09	2.9E+08	7.3E+07	9.7E+09	2.1E+09	5.1E+08
1,9	1.5E+09	3.3E+08	8.1E+07	1.1E+10	2.3E+09	5.7E+08
2,1	1.7E+09	3.7E+08	8.9E+07	1.2E+10	2.6E+09	6.3E+08
2,3	1.9E+09	4.0E+08	9.8E+07	1.3E+10	2.8E+09	6.9E+08
2,5	2.0E+09	4.4E+08	1.1E+08	1.4E+10	3.1E+09	7.5E+08
2,7	2.2E+09	4.7E+08	1.2E+08	1.5E+10	3.3E+09	8.1E+08
2,9	2.4E+09	5.1E+08	1.2E+08	1.6E+10	3.6E+09	8.7E+08
3,0	2.4E+09	5.3E+08	1.3E+08	1.7E+10	3.7E+09	8.9E+08
3,5	2.8E+09	6.1E+08	1.5E+08	2.0E+10	4.3E+09	1.1E+09
4,0	3.2E+09	7.0E+08	1.7E+08	2.3E+10	4.9E+09	1.2E+09
4,5	3.7E+09	7.9E+08	1.9E+08	2.6E+10	5.5E+09	1.4E+09
5,0	4.1E+09	8.8E+08	2.1E+08	2.8E+10	6.1E+09	1.5E+09
5,5	4.5E+09	9.6E+08	2.4E+08	3.1E+10	6.8E+09	1.7E+09
6,0	4.9E+09	1.1E+09	2.6E+08	3.4E+10	7.4E+09	1.8E+09
6,5	5.3E+09	1.1E+09	2.8E+08	3.7E+10	7.9E+09	1.9E+09
7,0	5.7E+09	1.2E+09	3.0E+08	4.0E+10	8.6E+09	2.1E+09
7,5	6.1E+09	1.3E+09	3.2E+08	4.3E+10	9.2E+09	2.3E+09
8,0	6.5E+09	1.4E+09	3.4E+08	4.5E+10	9.8E+09	2.4E+09
9,0	7.3E+09	1.6E+09	3.9E+08	5.1E+10	1.1E+10	2.7E+09
10,0	8.1E+09	1.7E+09	4.3E+08	5.7E+10	1.2E+10	3.0E+09
12,0	9.7E+09	2.1E+09	5.1E+08	6.8E+10	1.5E+10	3.6E+09
14,0	1.1E+10	2.5E+09	5.9E+08	8.0E+10	1.7E+10	4.2E+09
16,0	1.3E+10	2.8E+09	6.9E+08	9.1E+10	1.9E+10	4.8E+09
18,0	1.5E+10	1.8E+09	7.7E+08	1.0E+11	1.3E+10	5.4E+09

⁽¹⁾= Beschreibung des Hydra-Druckverteilers siehe Kapitel 4.3.2

Tabelle 5-7: Zusammenhang zwischen Goldmenge und Partikeldurchmesser. Aus der Tabelle kann abgelesen werden, welche Goldmenge bei einer gegebenen Partikelzahl und -größe erforderlich ist.