

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Die geläufigen Maßeinheiten und Chemikalien wurden als bekannt vorausgesetzt.

APC: antigen präsentierte Zelle (engl.: antigen presenting cell)

CD: engl.: cluster of differentiation

CD40L: CD40-Ligand

DC: dendritische Zelle (engl.: dendritic cell)

EBV: Epstein Barr Virus

EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein

ELISA: Enzyme linked Immunosorbance Assay

hGM-CSF: humaner Granulozyten-Macrophagen stimulierender Faktor

IgG_{2a}: Immunglobulin Typ 2a

IL-2: Interleukin 2

IL-7: Interleukin 7

NK: natürliche Killerzellen (engl.: natural killer cells)

Kb: Kilobasen

MHC: Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: major histocompatibility complex)

MIP-Methode: Mikroporöse-Polycarbonatmembran-Methode

PerCP: Peridinin-Chlorophyll

PI: Propidium iodide

Psi: Pascal per square inch

TIL: Tumor infiltrierende T-Lymphozyten (engl.: tumor infiltrating lymphocytes)

ZTL: Zytotoxische T-Lymphozyte (engl.: cytotoxic T-lymphocyte)

8.2 Protokoll: Ballistomagnetischer Gentransfer mit der MIP-Methode

Vorbereitung der Zellen

- Zellen ernten und zweimal mit PBS waschen (300 x g, 4°C, 7 Minuten).
- Zellzahl sowie Zelldurchmesser bestimmen.
- Zellsuspension abzentrifugieren (300 x g, 4°C, 7 Minuten).
- Zellkonzentration mit frischem Medium auf 5×10^6 Zellen/ml einstellen.
- 6 ml Zellkulturmedium mit 10% FCS auf einen Polycarbonateinsatz pipettieren und 3 Minuten inkubieren.
- Durch alle drei Einlässe des Inserts 0,5 ml Medium pipettieren.
- Warten, bis das gesamte Medium aus dem oberen Kompartiment abgelaufen ist, dann überschüssiges Medium aus dem unteren Kompartiment abpipettieren. Die Membran muß von der Unterseite vollständig benetzt sein.
- Berechnung der Zellzahl/ Polycarbonatinsert:

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

Formel 8-1

- X ml der Zellsuspension auf das Insert pipettieren.
- Durch die Einlässe des Inserts Medium aus dem unteren Kompartiment abnehmen, bis die Zellen in einer Monolayer auf der Polycarbonatmembran sedimentiert sind. Hierbei ist es hilfreich, die Pipette senkrecht zu halten.
- Vorgang solange wiederholen, bis sich kein Medium mehr über den Zellen befindet.

Vorbereitungen zum ballistomagnetischen Gentransfer

- Gold auswiegen, zweimal in 70% Ethanol und einmal in Aqua ad inieciablia waschen.
- Gold unter sterilen Bedingungen in Aqua ad inieciablia aufnehmen. Konzentration 60 mg/ml (Lagerung der Suspension bei 4 °C).
- DNA oder Oligonukleotide in Aqua ad inieciablia aufnehmen: 1-1,5 µg/µl Endkonzentration.

- 3 Volumenanteile DNA-Lösung mit 1 Volumenanteil superparamagnetischen Beads mischen.
- Volumen der DNA-Bead-Gebrauchslösung:

$\text{Volumen} = 230\mu\text{l} + A \times 30\mu\text{l} \quad A = \text{Anzahl der Schüsse}$
--

Formel 8-2

Ballistomagnetischer Gentransfer

- Siebenfachdruckverteiler (Hydra) in die Transferkammer montieren und Unterteil abschrauben.
- Berstscheibe einsetzen (z.B.1550 psi), Unterteil wieder montieren und die Auslässe über den Löchern des Macrocarrierholder ausrichten.
- Goldpartikel vortexen und erforderliches Volumen der Suspension auf 7 Macrocarrier pipettieren. Goldsuspension immer aus der Mitte des Gefäßes entnehmen. Zwischendurch vortexen.
- Goldpartikel sedimentieren lassen.
- Vorsichtig überstehendes Wasser vom Gold abpipettieren.
- Goldpartikel in 35 μl DNA-Bead-Gebrauchslösung resuspendieren.
- Goldpartikel sedimentieren lassen.
- Vorsichtig den Überstand abnehmen und zurück in die DNA-Bead-Gebrauchslösung pipettieren.
- Gold mit Hilfe des Luftstroms unter der Sterilbank trocknen.
- Macrocarrier in den Macrocarrierholder legen und andrücken.
- Macrocarrierholder in den Einschub direkt unter der Hydra einsetzen.
- Petrischale mit den Zellen in die Transfektionskammer stellen: Einschub 1 oder 2 unter dem Macrocarrierholder.
- Biolistic PDS 1000/He einschalten.
- Mit der Vakuumpumpe die Transfektionskammer auf 20 inches Hg evakuieren (Tastenposition „Vac“) und Unterdruck halten (Tastenposition „Hold“).
- Schuß auslösen (Tastenposition „Fire“).
- Transferkammer belüften (Tastenposition „Vent“).
- Petrischale aus der Transferkammer entnehmen.

Anreicherung der magnetisch markierten Zellen

- Zellen von der Membran abspülen, zweimal mit PBS waschen (300 x g, 4 °C, 7 Minuten) und in 1-2 ml PBS aufnehmen.
- Equilibrierte Trennsäule in den Magnetseparator einsetzen.
- Zellsuspension auf die Säule geben. Anschließend die Säule mit 3 ml PBS (4 °C) waschen.
- Eluat und Spülflüssigkeit in einem Zentrifugenröhrchen als nicht magnetisch markierte Fraktion vereinigen.
- Säule aus dem Magnetseparator entfernen und mit der Spritze Zellen aus der Säule zurück ins Reservoir spülen.
- Säule wieder in den Magnetseparator einsetzen.
- Zellsuspension aus dem Reservoir laufen lassen.
- Säule mit 3 ml PBS (4 °C) spülen.
- Eluat und Spülflüssigkeit in einem Zentrifugenröhrchen als Waschfraktion sammeln.
- Säule aus dem Magnetseparator herausnehmen und die Kanüle entfernen.
- Magnetisch markierte Fraktion mit 7 ml PBS eluieren.
- Zellen entsprechend dem Versuchsansatz weiterbehandeln.