

4. Ergebnisse

4.1. Vergleich von Elektroden-Materialien

In folgenden Experimenten wurden verschiedene Elektroden-Materialien und ihr Einfluss auf die Transfektionseffizienz untersucht. Mausfibroblasten L929 wurden mit pEGFP im Biojet-Gerät mit den unterschiedlichen Elektroden transfiziert. Nach der Elektroporation unter den angegebenen Bedingungen wurden die Zellen für 48 h kultiviert und die GFP-Expression mittels FACS-Analyse bestimmt.

Die Ergebnisse aus 3 unabhängigen Reihen von Experimenten sind in Abbildung Nr. 6 zusammengefasst.

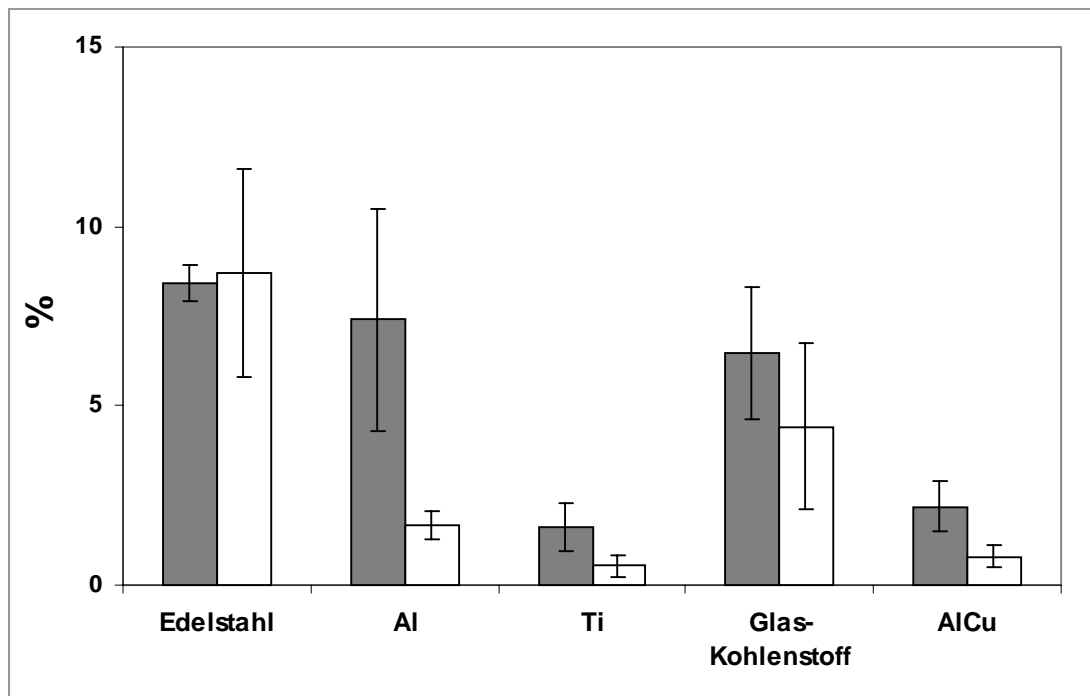


Abbildung 6: Transfektion von L929-Zellen im Biojet-Gerät mit Elektroden aus verschiedenen Materialien. Pulsbedingungen: Porationsmedium mit 10 mM KCl, 6 kV/cm, 40 μ s, Raumtemperatur. Das Diagramm zeigt den prozentuellen Anteil an GFP-positiven Zellen 48 h nach dem Puls: jeweils erster Balken (gepunktet) Prozente direkt am FACS, jeweils zweiter Balken (weiß) bezogen auf eingesetzte Zellzahl (Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler).

Die Daten in Abb. 6 zeigen, dass die Transfektionseffizienz bei der Elektroporation mit Elektroden aus Edelstahl, Aluminium und Glas-Kohlenstoff am höchsten ist, wenn man ausschließlich die Daten der FACS-Analyse betrachtet. Erst bei Bezug auf die eingesetzte Zellzahl (input) werden deutliche Unterschiede in der Transfektionseffizienz sichtbar. Bei der Elektroporation mit Elektroden aus Edelstahl erhält man ca. dreimal bzw. doppelt so viele GFP-positive Zellen wie bei der Elektroporation mit Elektroden aus Aluminium, bzw. Glas-Kohlenstoff.

4.2. Transfektion von Zelllinien mit pEGFP

4.2.1. Bestimmung des optimalen Parameterbereiches

In ersten Transfektionsexperimenten wurde zunächst der Parameterbereich bestimmt, in dem optimale Bedingungen bez. der Ausbeute zu erwarten sind. Dazu wurde im CASY-1-Gerät der Zellradius in Porationsmedium gemessen, mit der für die jeweilige Zelllinie als optimal gefundenen Osmolalität. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Zelllinie	Osmolalität des Mediums	Zellradius
H73C11	150 mOsmol	7.99 μm
	100 mOsmol	9.27 μm
Jurkat	100 mOsmol	10.35 μm
L929	150 mOsmol	7.93 μm
SP2		

Tabelle 1: Mittlerer Radius der Zellen in exponentiellen Wachstumsphase im entsprechenden hypoosmolalem Porationsmedium nach 10 Minuten.

Mit dem gemessenen Zellradius wurde entsprechend Gleichung 1 E_{krit} berechnet.

Die Werte für E_{krit} sind in folgender Tabelle wiedergegeben:

Zelllinie	E_{krit} bei 22°C	E_{krit} bei 4°C
H73C11	0.83 kV/cm	1.66 kV/cm
Jurkat	0.72 kV/cm	1.44 kV/cm
L929	0.64 kV/cm	1.28 kV/cm
SP2	0.84 kV/cm	1.68 kV/cm

Tabelle 2: Berechnetes kritisches Feld E_{krit} für den Membrandurchbruch bei verschiedenen Temperaturen

Erste Transfektionsexperimente wurden am Multiporator in Küvetten mit Aluminiumelektroden in einem Abstand von 2 mm und einem Volumen von 400 μl durchgeführt. Als Pulsamplitude wurde die Spannung am Gerät eingestellt, welche in etwa dem berechneten E_{krit} aus Tabelle 3 entspricht. In Schritten von 100 bis 200 V wurde die Amplitude des angelegten Feldes erhöht, bis der doppelte Wert von E_{krit} (bei L929 bis zum 4-fachen Wert) erreicht wurde. Die Dauer des Feldpulses betrug bei 22°C 40 und 100 μs , bei 4°C 15 und 40 μs .

Als Beispiel werden in folgender Grafik die Ergebnisse der Vorexperimente von L929-Zellen bei 22°C gezeigt.

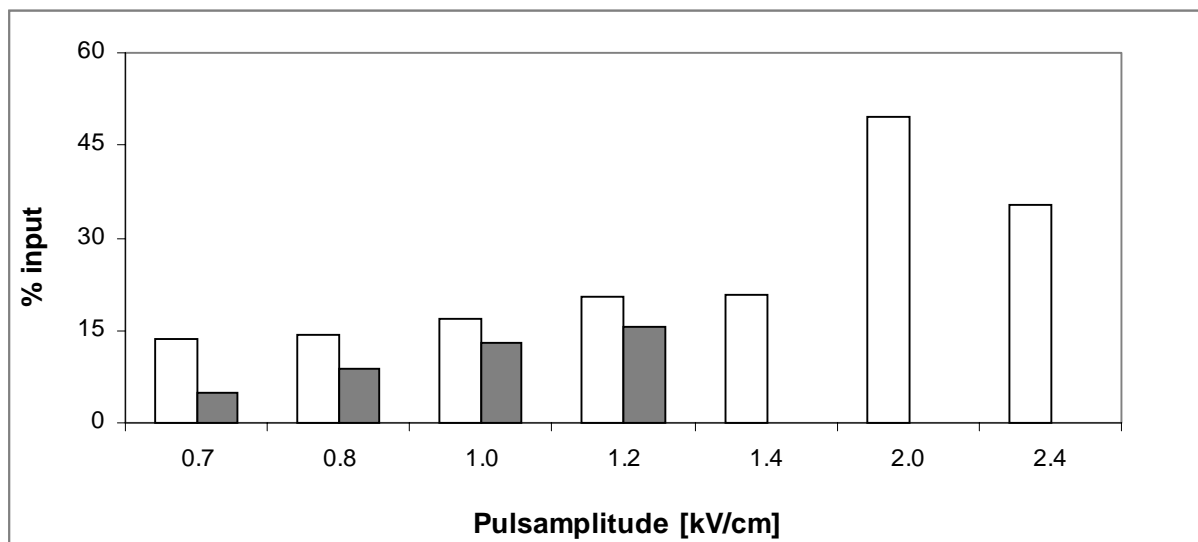


Abbildung 7: Darstellung der Transfektionseffizienz bei ersten Experimenten mit L929-Zellen. Die Elektroporation erfolgte in Küvetten mit Aluminiumelektroden (2 mm Elektrodenabstand, 400 μl Volumen), bei ca. 22°C mit der angegebenen Pulsamplitude, einer Pulsdauer von 100 μs (weiß) bzw. 40 μs (grau) und eine Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ Plasmid pEGFP.

Die Auswertung erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion mittels FACS-Analyse.

Die ersten Experimente mit L929-Zellen (siehe Abb. 7) haben gezeigt, dass eine Pulsdauer von 100 μ s zu einer deutlich höheren Transfektionseffizienz führt als eine Pulsdauer von 40 μ s. Außerdem wurde bei Anlegen eines Feldes von 2 kV/cm ein Maximum an Effizienz erreicht. Ein Beispiel für transfizierte L929-Zellen ist in folgender Abbildung zu sehen.

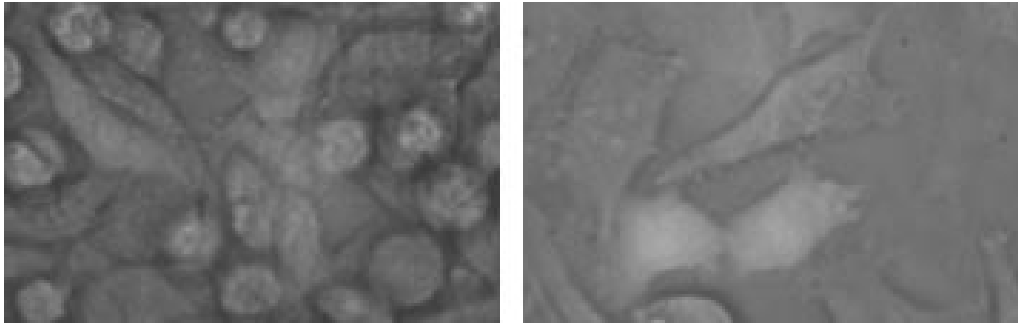


Abbildung 8: Mikroskopische Aufnahme von L929-Zelle 48 Stunden Nach der Transfektion mit 5 μ g/ml pEGFP, bei 22°C, 2 kV/cm, 100 μ s. Bilder digital bearbeitet.

Analoge Experimente wurden auch für die anderen Zelllinien durchgeführt, so wie für die Transfektion bei 4°C. Für die weiteren Experimente wurden drei Parameter mit guter Transfektionseffizienz bezüglich der eingesetzten Zellzahl (input) verwendet.

4.2.2. Elektrotransfektion von Zellen aus permanenten Linien

SP2

Bei ersten Experimenten mit SP2-Zellen erwiesen sich folgende Feldparameter für die Elektrotransfektion bei Raumtemperatur (ca. 22°C) als sinnvoll: 0.8 kV/cm und 1.0 kV/cm, 100 μ s sowie 1.0 kV/cm, 40 μ s, da diese Feldparameter Werten zwischen dem einfachen und doppeltem E_{krit} entsprechen. Zusätzlich zu den Experimenten in Küvetten mit Aluminiumelektroden wurden als Kontrolle analoge Experimente in Küvetten mit Edelstahlelektroden durchgeführt.

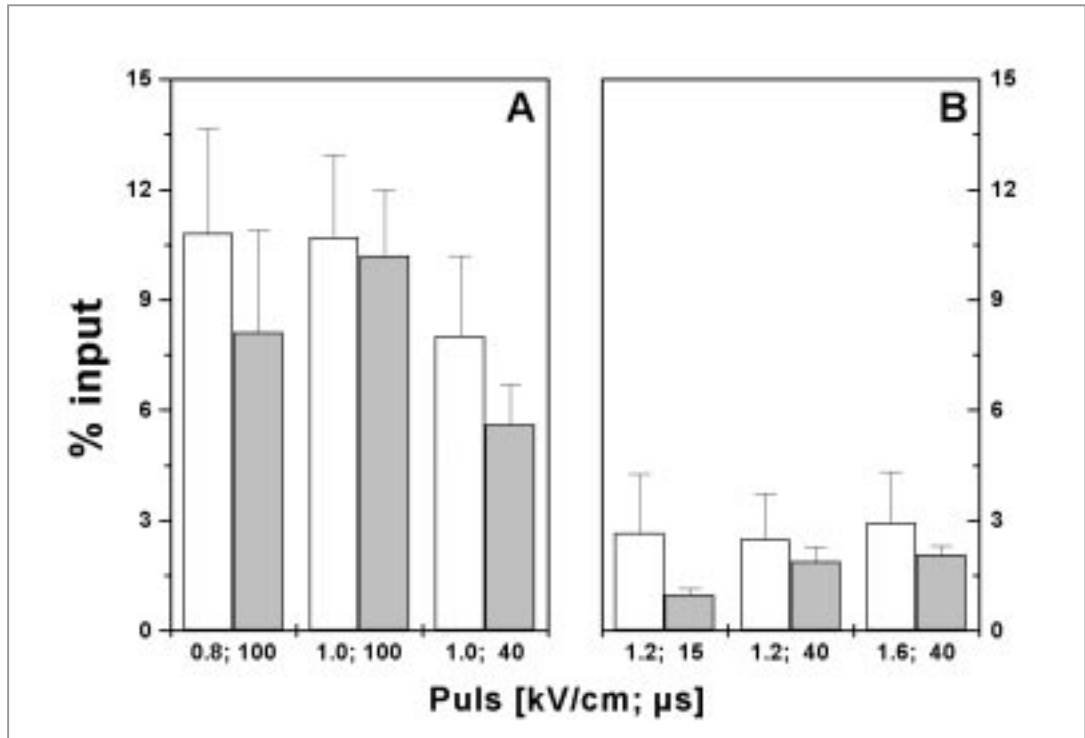


Abbildung 9: Vergleich der Transfektionseffizienz bei SP2-Zellen bei Verwendung von Küvetten mit Aluminium (weiß) bzw. Edelstahlelektroden (grau) bezogen auf die eingesetzte Zellzahl (input). Die Balken stellen Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Experimenten mit Balken als den entsprechenden Standardfehler dar. Die Elektroporation erfolgte bei 22°C (A) und 4°C (B) unter Einsatz von 5 µg/ml Plasmid pEGFP bei den angegebenen Feldparametern.

Das Diagramm in Abb. 9 A zeigt den Vergleich der Transfektionseffizienz bei der Elektroporation von SP2-Zellen in Küvetten mit Aluminium- oder Edelstahlelektroden. Bei Verwendung von höheren Parametern sank die Ausbeute auf deutlich unter 10%. Auch wenn bei diesen Pulsbedingungen keine signifikanten Unterschiede festzustellen sind, so ist ein Effizienzmaximum bei längeren Pulsen zu beobachten. In Anbetracht der Fehlerbalken besteht kein Unterschied zwischen der Verwendung von Aluminium- bzw. Edelstahlelektroden.

Diagramm Nr. 9 B vergleicht die Ausbeute an transient transfizierten SP2-Zellen bei Verwendung von Aluminium- bzw. Edelstahlelektroden bei der Elektroporation bei 4°C. Unter diesen Bedingungen ist die Ausbeute deutlich niedriger als bei der Elektroporation bei 22°C. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Elektroden-Materialien ist nicht festzustellen.

Zwei Tage nach der Elektrotransfektion wurde die Zahl an lebenden Zellen mittels CASY-1 bestimmt. Parallel dazu wurden Elektroporationsexperimente bei denselben Parametern wie bei der Transfektion durchgeführt, bei denen die Zahl an lebenden Zellen nach 3 Stunden bestimmt wurden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in folgendem Diagramm zusammengefasst.

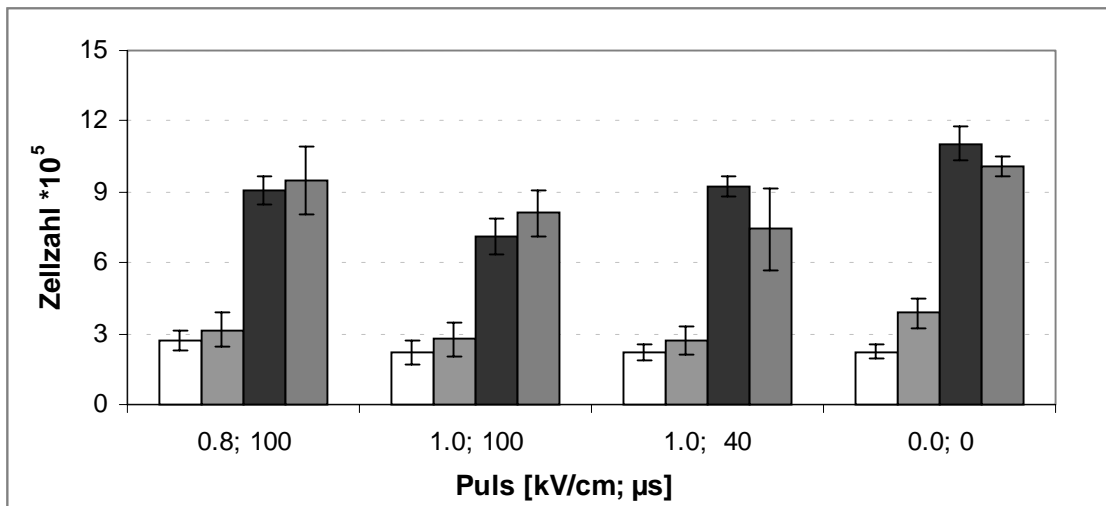


Abbildung 10: Zahl der lebenden SP2-Zellen 3 Stunden nach der Elektroporation bei 22°C in Küvetten mit Aluminium (weiß) bzw. Edelstahlelektroden (grau) und Zahl der lebenden Zellen 48 Stunden nach der Elektrotransfektion bei 22°C in Küvetten mit Aluminium (schwarz) bzw. Edelstahlelektroden (gestreift). Die Balken stellen Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Experimenten mit Balken als den entsprechenden Standardfehler dar. Kontroll-Zellen wurden mit Ausnahme der Applikation des Feldpulses gleich behandelt.

Aus Diagramm in Abb. 10 wird deutlich, dass die Zahl der lebenden Zellen nach 3 Stunden (gerade in Bezug auf die Kontrolle) unabhängig von den benutzten Feldparametern und von dem Elektroden-Material ist. Die Zahl der lebenden Zellen nach 3 Stunden liegt bei Aluminiumelektroden zwischen 55% und 68%, bei Edelstahlelektroden zwischen 68% und 79% bez. der eingesetzten Zellzahl. In Anbetracht der Fehlerbalken sind jedoch keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Nach 48 Stunden hat die Zellzahl den 1.75-fachen bis 2.75-fachen Wert der eingesetzten Zellzahl erreicht. Auch hier ist kein signifikanter Unterschied zwischen der Verwendung von Aluminium- bzw. Edelstahlelektroden zu beobachten. Als Trend kann man nach 48 Stunden jedoch den Einfluss der Feldparameter erkennen, da bei den höchsten Feldparametern (1.0 kV/cm, 100 µs) die wenigsten lebenden Zellen sind.

H73C11

Für die Elektrotransfektion der H73C11-Zellen bei Raumtemperatur bewährten sich folgende Parameter: 0.8 kV/cm und 1.0 kV/cm mit 40 μ s und 0.8 kV/cm mit 100 μ s (Feldparameter mit Werten, die zwischen dem einfachen und doppelten berechneten E_{krit} liegen).

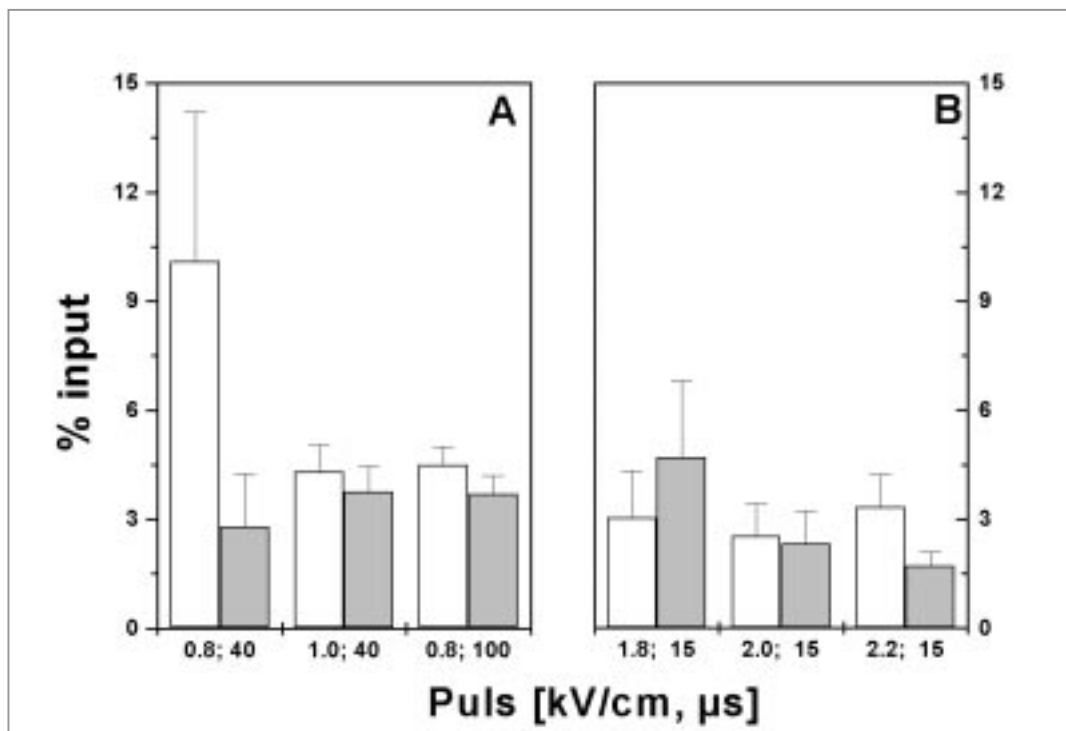


Abbildung 11: Vergleich der Transfektionseffizienz bei H73C11-Zellen bei Verwendung von Küvetten mit Aluminium (weiß) bzw. Edelstahlelektroden (grau) bezogen auf die eingesetzte Zellzahl (input). Die Balken stellen Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten mit Balken als den entsprechenden Standardfehler dar. Die Elektroporation erfolgte bei 22°C (A) und bei 4°C (B) unter Einsatz von 5 μ g/ml Plasmid pEGFP bei den angegebenen Feldparametern.

Wie das Diagramm in Abb. 11 A zeigt, liegt die Ausbeute an transient transfizierten H73C11-Zellen mit pEGFP relativ niedrig, im Durchschnitt unter 5% bez. der eingesetzten Zellzahl. Trotz des deutlichen Unterschiedes in der Effizienz bei 0.8 kV/cm mit 40 μ s zwischen der Elektroporation in Küvetten mit Aluminium- oder Edelstahlelektroden, ist letztlich kein signifikanter Unterschied zu beobachten. Bei Verwendung höherer oder niedrigerer Feldparameter nahm die Effizienz deutlich ab.

Mit H73C11-Zellen wurden auch Transfektionsexperimente bei 4°C bei folgenden Parametern durchgeführt: 1.8 kV/cm, 2.0 kV/cm und 2.2 kV/cm mit jeweils 15 µs. Die Ausbeute bei der Elektrottransfektion der H73C11-Zellen bei 4°C (Abb. 11 B) bleibt bei fast allen Parametern unter 3%, bezogen auf die eingesetzte Zellzahl. Damit liegt die Effizienz unterhalb der bei 22°C. Auch hier kein deutlicher Unterschied zwischen der Verwendung von Aluminium- und Edelstahlelektroden zu erkennen.

Die Zahl der lebenden Zellen wurde 48 Stunden nach der Elektroporation bestimmt. In zusätzlichen Experimenten wurde die Anzahl der lebenden Zellen 3 Stunden nach der Elektroporation (bei gleichen Parametern wie die Transfektion bei 22°C) gemessen. Die Werte sind in folgendem Diagramm zusammengefasst.

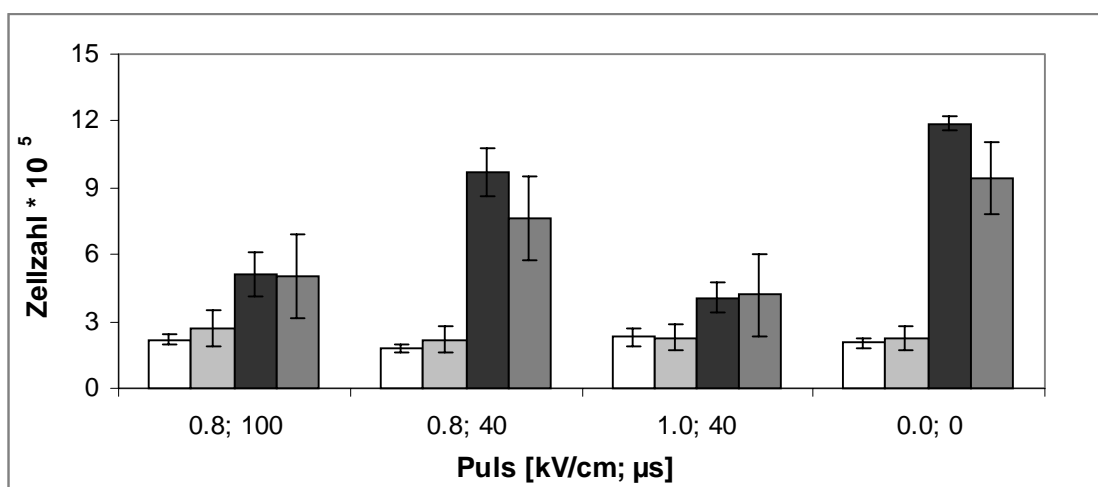


Abbildung 12: Zahl der lebenden H73C11-Zellen 3 Stunden nach der Elektroporation bei 22°C in Küvetten mit Aluminium (weiß) bzw. Edelstahlelektroden (grau) und Zahl der lebenden Zellen 48 Stunden nach der Elektrottransfektion bei 22°C in Küvetten mit Aluminium (schwarz) – bzw. Edelstahlelektroden (gestreift). Die Balken stellen Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten mit Balken als den entsprechenden Standardfehler dar. Kontrollzellen wurden mit Ausnahme der Applikation des Feldpulses gleich behandelt.

Die Zahl der lebenden Zellen 3 Stunden nach der Elektroporation ist unabhängig vom Elektroden-Material oder von den Feldparametern, wie in Abb. 12 zu erkennen. Bei der Verwendung von Aluminiumelektroden liegt die Zahl der lebenden Zellen nach 3 Stunden zwischen 45% und 58%, bei Edelstahlelektroden zwischen 55% und 68% bez. der eingesetzten Zellzahl. In Anbetracht der Fehlerbalken sind jedoch keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Die Zellzahl erreicht 48 Stunden nach der Elektrottransfektion Werte zwischen dem Ausgangswert und dem 2.75-fachen Wert der eingesetzten Zellzahl (bei Kontrolle). Auch hier ist kein signifikanter Unterschied zwischen der Verwendung von Aluminium- bzw. Edelstahlelektroden zu beobachten. Allerdings ist der Einfluss der Feldparameter deutlich zu erkennen: während man bei “milden” Bedingungen (0.8 kV/cm, 40 µs) eine Verdoppelung der Zellzahl erhält, führt eine Erhöhung der Pulsdauer (von 40 µs auf 100 µs) und noch deutlicher eine Erhöhung der Amplitude (von 0.8 kV/cm auf 1 kV/cm) zu einer langsameren Vermehrung der H73C11-Zellen innerhalb der ersten 48 Stunden nach der Elektrottransfektion.

Jurkat

Weitere Experimente wurden mit Jurkat-Zellen, einer humane T-Lymphocyten-Zelllinie, durchgeführt. Folgende Parameter wurden für die Elektrotransfektion der Jurkat-Zellen bei Raumtemperatur gewählt: 1.0 kV/cm und 1.2 kV/cm mit 40 μ s und 1.0 kV/cm mit 100 μ s. Diese Feldparameter liegen zwischen dem einfachen und doppelten Wert des berechneten E_{krit} .

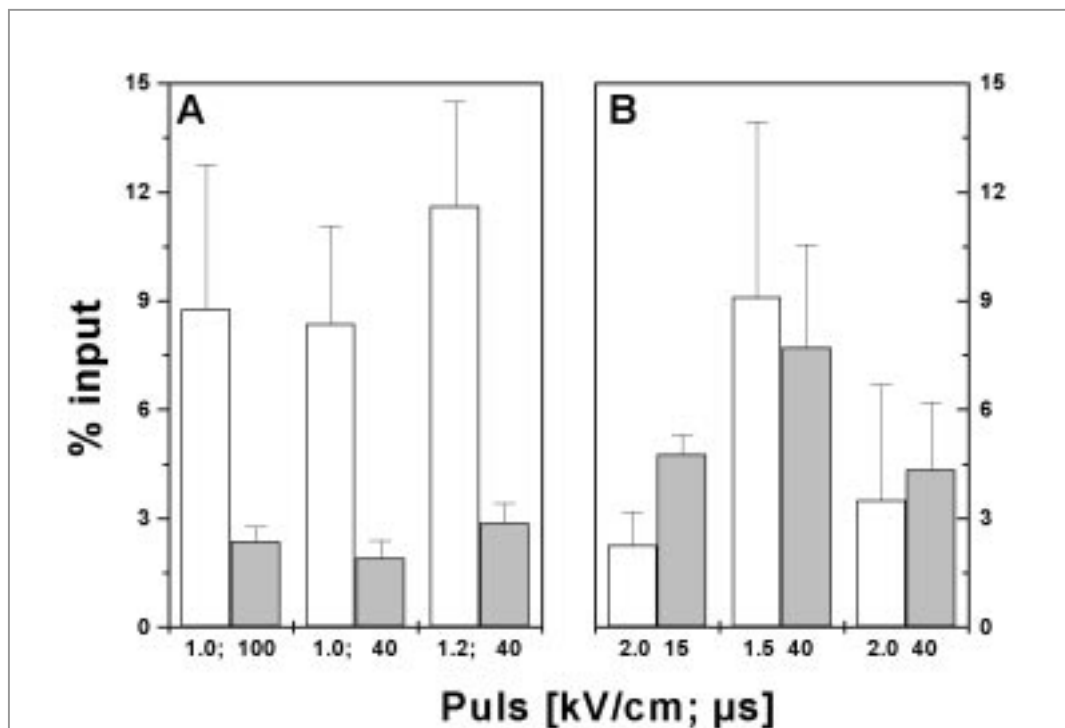


Abbildung 13: Vergleich der Transfektionseffizienz bei Jurkat-Zellen bei Verwendung von Küvetten mit Aluminium (weiß) bzw. Edelstahlelektroden (grau) bezogen auf die eingesetzte Zellzahl (input). Die Balken stellen Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten mit Balken als den entsprechenden Standardfehler dar. Die Elektroporation erfolgte bei 22°C (A) und 4°C (B) unter Einsatz von 5 μ g/ml Plasmid pEGFP bei den angegebenen Feldparametern.

Das Diagramm in Abb. 13 A zeigt, dass bei der Elektrotransfektion von Jurkat-Zellen mit pEGFP eine Ausbeute von über 10% bez. der eingesetzten Zellzahl mit Aluminiumelektroden erreicht werden kann. Bei der Verwendung von Edelstahlelektroden bleibt die Effizienz im Bereich von ca. 3%. Trotz dieser deutlichen Differenz in der Ausbeute zwischen der Elektroporation in Küvetten mit Aluminium- oder Edelstahlelektroden, ist kein signifikanter Unterschied zu beobachten. Bei Verwendung höherer oder niedrigerer Feldparameter nahm die Effizienz ab.

Für die Transfektionsexperimente bei 4°C bewährten sich folgende Feldparameter: 2.0 kV/cm mit 15 µs und 1.5 kV/cm oder 2.0 kV/cm mit 40 µs. Wie das Diagramm in Abb. 13 B zeigt, erreicht die Effizienz der Elektrotransfektion bei 4°C einen Bereich von ca. 10%. Anders als bei den Experimenten bei 22°C ist hier kein Unterschied zwischen der Verwendung von Aluminium- und Edelstahlelektroden festzustellen. Außerdem ist bei den Parametern 1.5 kV/cm und 40 µs ein Maximum in der Ausbeute zu beobachten. Eine Erhöhung der Pulsamplitude führt selbst bei kürzerer Pulsdauer zu einer Abnahme der Transfektionseffizienz.

Für Jurkat-Zellen wurde die Zellzahl sowohl 3 Stunden wie auch 48 Stunden nach der Elektroporation gemessen. Die Werte sind in folgender Grafik zusammengestellt.

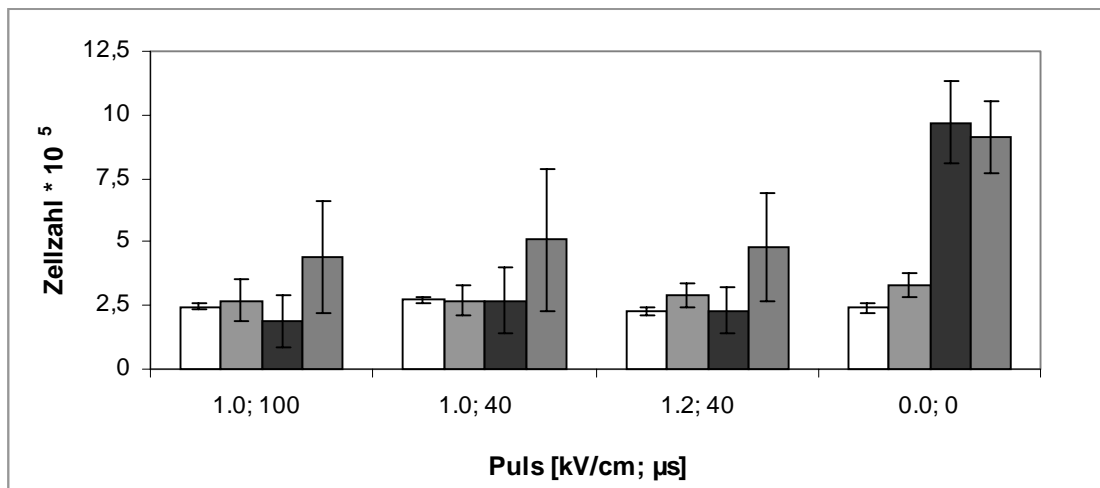


Abbildung 14: Zahl der lebenden Jurkat-Zellen 3 Stunden nach der Elektroporation bei 22°C in Küvetten mit Aluminium (weiß) bzw. Edelstahlelektroden (grau) und Zahl der lebenden Zellen 48 Stunden nach der Elektrotransfektion bei 22°C in Küvetten mit Aluminium (schwarz) bzw. Edelstahlelektroden (gestreift). Die Balken stellen Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten mit Balken als den entsprechenden Standardfehler dar. Kontrollzellen wurden mit Ausnahme der Applikation des Feldpulses gleich behandelt.

Aus Diagramm in Abb. 14 wird deutlich, dass die Zahl der lebenden Jurkat-Zellen 3 Stunden nach der Elektroporation unabhängig von den benutzten Feldparametern und von dem Elektrodenmaterial ist. Die Zahl der lebenden Zellen nach 3 Stunden liegt bei Aluminiumelektroden zwischen 58% und 68%, bei Edelstahlelektroden zwischen 68% und 73% bez. der eingesetzten Zellzahl. Nach 48 Stunden zeigen Jurkat-Zellen ein anderes Verhalten als die bisherigen Zelllinien: nur die Kontrollzellen haben sich mehr als verdoppelt.

Bei der Elektrotransfektion mit Aluminiumelektroden findet praktisch keine Vermehrung der Zellen statt. Bei der Verwendung von Edelstahlelektroden ist eine deutlich höhere Zahl an lebenden Zellen zu beobachten. Trotz dieses Trends sind, mit Ausnahme der Kontrollzellen, keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

L929

Bei Experimenten mit L929-Zellen wurden folgende Feldparameter für die Elektrotransfektion bei Raumtemperatur (ca. 22°C) verwendet: 2.0 kV/cm, 100 µs (da bei dem 3.1-fachen Wert des E_{krit} ein deutliches Maximum an Transfektionseffizienz zu beobachten war) sowie 1.0 und 1.2 kV/cm, 100 µs (da diese Feldparameter Werten zwischen dem einfachen und doppeltem E_{krit} entsprechen). Zu den Experimenten in Küvetten mit Aluminiumelektroden wurden analoge Experimente in Küvetten mit Edelstahlelektroden durchgeführt.

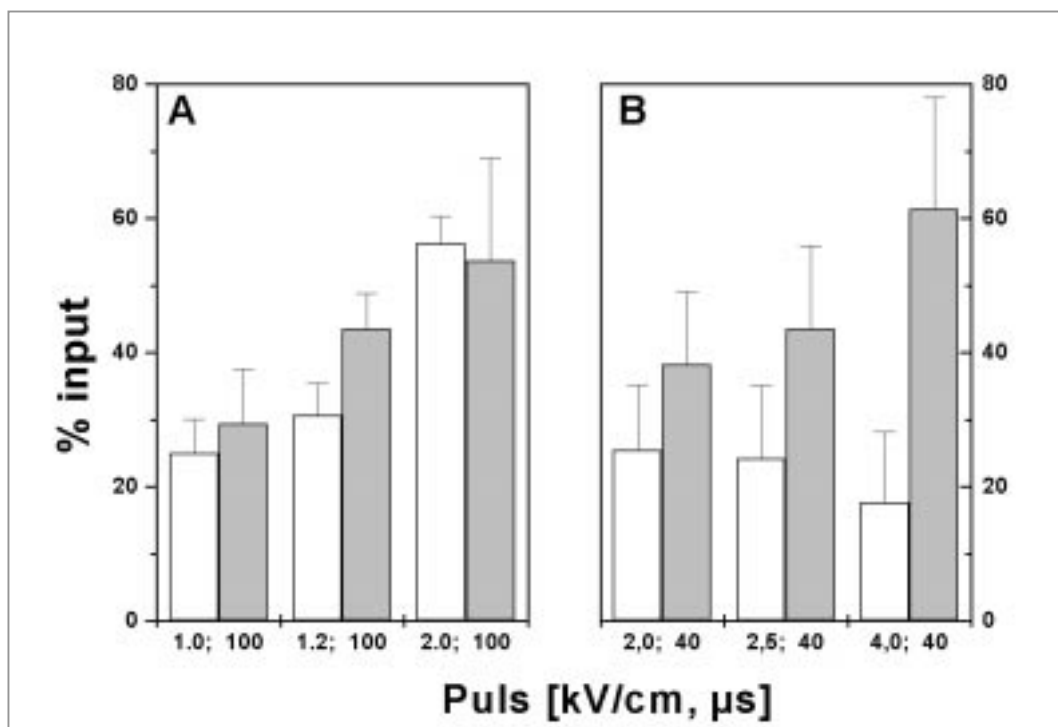


Abbildung 15: Vergleich der Transfektionseffizienz bei L929-Zellen bei Verwendung von Küvetten mit Aluminium (weiß) bzw. Edelstahlelektroden (grau) bezogen auf die eingesetzte Zellzahl (input). Die Balken stellen Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Experimenten mit Balken als den entsprechenden Standardfehler dar. Die Elektroporation erfolgte bei 22°C (A) und 4°C (B) unter Einsatz von 5 µg/ml Plasmid pEGFP bei den angegebenen Feldparametern.

Das Diagramm in Abb. 15 A zeigt den Vergleich der Transfektionseffizienz bei der Elektroporation von L929-Zellen in Küvetten mit Aluminium- und Edelstahlelektroden. Es ist zu beobachten, dass die Ausbeute an transient transfizierten Zellen mit pEGFP mit der Erhöhung der Amplitude des Feldpulses ansteigt. Bei gleichen Parametern ist kein signifikanter Unterschied zwischen der Verwendung der beiden Elektrodenmaterialien festzustellen. Bemerkenswert bei den L929-Zellen ist, dass schon bei relativ kleinen Plasmidkonzentrationen (hier 5 µg/ml) eine Ausbeute von über 50% erreicht wird.

Ähnliche Transfektionsexperimente wurden auch bei 4°C nach dem entsprechenden Protokoll durchgeführt. Folgende Feldparameter wurden verwendet: 4.0 kV/cm, 40 µs (der 3.1-fache Wert des E_{krit} , analog zur Transfektion bei Raumtemperatur) sowie 2.0 und 2.5 kV/cm, 40 µs (Parameter die zwischen dem einfachen und doppelten Wert des berechneten E_{krit} bei 4°C liegen).

Diagramm in Abb. 15 B vergleicht die Ausbeute an transient transfizierten L929-Zellen bei Verwendung von Aluminium- bzw. Edelstahlelektroden bei der Elektroporation bei 4°C. Hier werden deutliche, wenn auch nicht signifikante Unterschiede zwischen den Elektrodenmaterialien sichtbar. Bei der Verwendung von Edelstahlelektroden steigt die Ausbeute mit Erhöhung der Amplitude des Feldpulses, während sie unter gleichen Bedingungen bei der Verwendung von Aluminiumelektroden leicht sinkt.

Zwei Tage nach der Elektrotransfektion wurde die Zahl an lebenden Zellen bestimmt. Parallel dazu wurden Elektroporationsexperimente bei denselben Parametern wie bei der Transfektion durchgeführt, bei denen die Zahl an lebenden Zellen nach 3 Stunden bestimmt wurden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in folgendem Diagramm dargestellt.

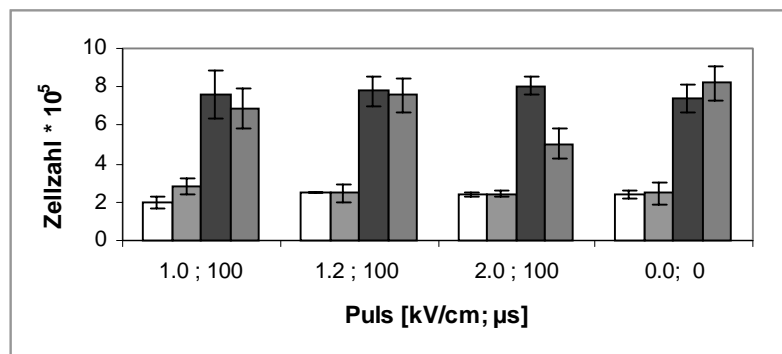


Abbildung 16: Zahl der lebenden L929-Zellen 3 Stunden nach der Elektroporation bei 22°C in Küvetten mit Aluminium (weiß) bzw. Edelstahlelektroden (grau) und Zahl der lebenden Zellen 48 Stunden nach der Elektrotransfektion bei 22°C in Küvetten mit Aluminium (schwarz) bzw. Edelstahlelektroden (gestreift). Die Balken stellen Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Experimenten mit Balken als den entsprechenden Standardfehler dar. Kontrollzellen wurden mit Ausnahme der Applikation des Feldpulses gleich behandelt.

Die Zahl der lebenden L929-Zellen 3 Stunden nach der Elektroporation ist unabhängig von den Feldparametern oder vom Elektrodenmaterial, wie in Diagramm in Abb. 16 zu erkennen. Bei der Verwendung von Aluminiumelektroden liegt die Zahl der lebenden Zellen nach 3 Stunden zwischen 50% und 63%, von Edelstahlelektroden zwischen 61% und 70% bez. der eingesetzten Zellzahl. In Anbetracht der Fehlerbalken sind jedoch keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Die Zellzahl erreichte 48 Stunden nach der Elektrotransfektion Werte zwischen dem 1.25-fachen und dem 2.0-fachen Wert der eingesetzten Zellzahl. Die Zellen, die dem Feldpuls ausgesetzt wurden, zeigen die gleiche Vermehrung wie Kontrollzellen. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen der Verwendung von Aluminium- bzw. Edelstahlelektroden zu beobachten. Einzige Ausnahme ist die Zahl der lebenden L929-Zellen bei der Elektrotransfektion mit Edelstahlelektroden bei einem Puls von 2.0 kV/cm mit 100 μ s. Bis auf diese Ausnahme ist kein Unterschied in den Zellzahlen bezüglich der Feldparameter zu erkennen.

4.2.3. Einfluss der Plasmidkonzentration auf die Transfektionseffizienz

In den bisher gezeigten Ergebnissen wurde eine Plasmidkonzentration von 5 μ g/ml verwendet. Die Ausbeute an transient transfizierten Zellen war je nach Zelltyp sehr unterschiedlich, von ca. 10% bei den Suspensions-Zelllinien bis über 50% bei L929. Durch die Erhöhung der Plasmidkonzentration kann die Effizienz erhöht werden (Abb. 17).

Die Erhöhung der Plasmidkonzentration von 5 auf 10 μ g/ml führte bei H73C11 und Jurkat-Zellen zu einer deutlich höheren Ausbeute: bei H73C11-Zellen wurde mehr als das Doppelte der bisher erzielten Ausbeute erreicht, während bei Jurkat-Zellen die Effizienz sogar über 50% stieg. Eine weitere Erhöhung der Plasmidkonzentration führte zu keiner Verbesserung der Ausbeute. Bei SP2-Zellen dagegen ist eine leichte Abnahme der Effizienz zu beobachten.

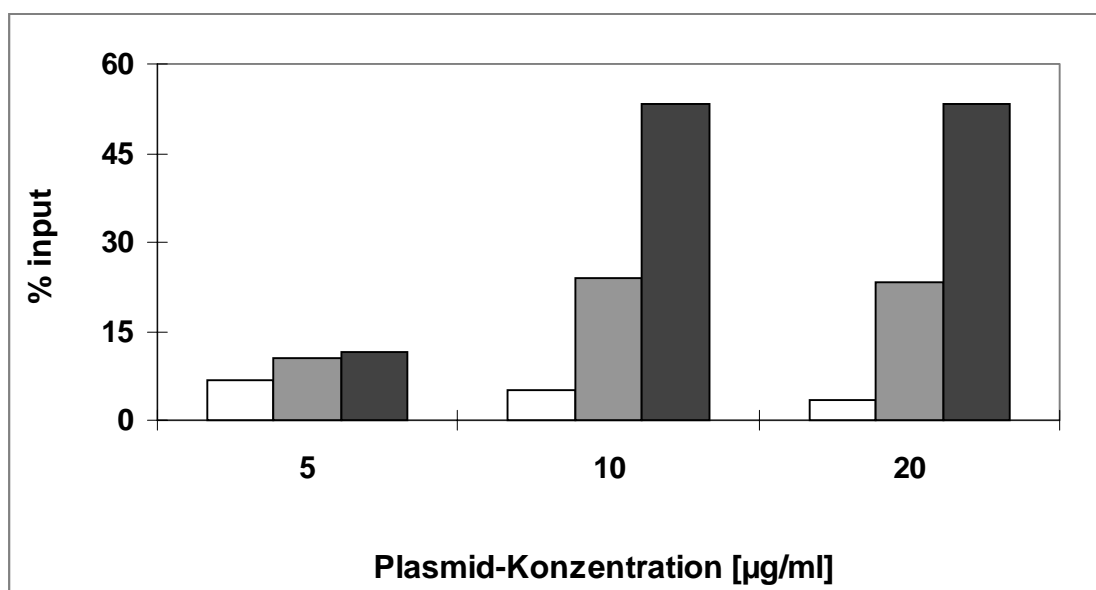


Abbildung 17: Transfektionseffizienz in Abhängigkeit von der eingesetzten Plasmidkonzentration bei SP2 (weiß), H73C11 (grau) und Jurkat (schwarz); Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Elektrotansfektion wurde bei 22°C in Küvetten mit Aluminiumelektroden mit folgenden Feldparametern durchgeführt: SP2: 0.8 kV/cm, 100 µs; H73C11: 0.8 kV/cm, 40 µs; Jurkat: 1.2 kV/cm, 40 µs.

4.2.4. Kultur von L929 unter Serumentzug nach der Transfektion

In weiteren Experimenten wurden L929-Zellen nach der Elektrotansfektion 48 Stunden in CGM mit nur 1% FCS kultiviert. Die Ergebnisse sind in folgendem Diagramm dargestellt.

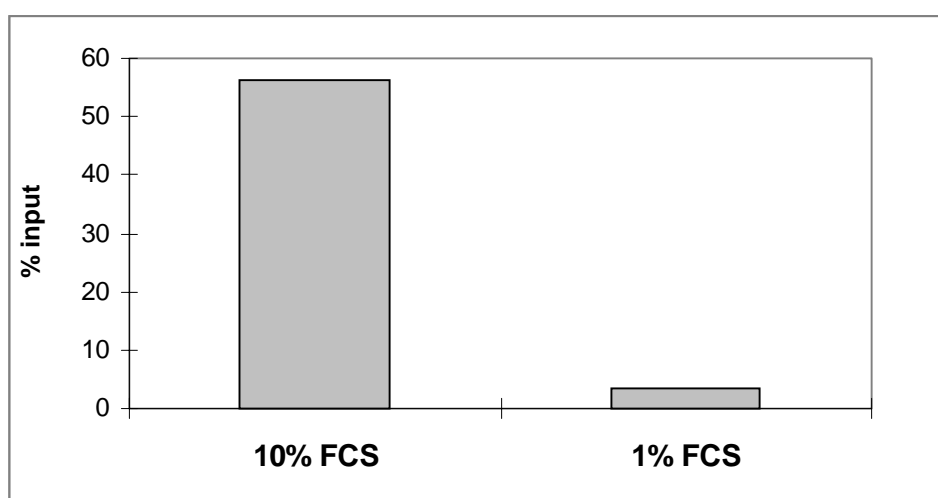


Abbildung 18: Transfektionseffizienz in Abhängigkeit von der eingesetzten FCS-Konzentration bei L929-Zellen in CGM nach der Transfektion. Die Elektrotansfektion wurde bei 22°C in Küvetten mit Aluminiumelektroden mit folgendem Feldparameter durchgeführt: 2.0 kV/cm, 100 µs (Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten).

Aus Diagramm in Abb. 18 wird deutlich, dass bei Serumentzug die Zellzahl innerhalb 48 Stunden drastisch abnimmt. Bei Kultivierung der L929-Zellen unter normalen Bedingungen (10% FCS) nach der Elektroporation findet eine Vermehrung der Zellen auf ca. den doppelten Wert der eingesetzten Zellzahl statt, während bei geringer Serumkonzentration (1% FCS) eine Verringerung der Zellzahl auf ca. 15% eintritt. Dementsprechend ist auch eine deutliche Abnahme der Transfektionseffizienz zu beobachten.

4.3. Bestimmung der Aluminium-Konzentrationen

Die Konzentration der Al^{3+} -Ionen im Medium nach dem Puls wurde mittels Atomabsorptions- und/oder Atomemissionsspektroskopie bestimmt. Es wurden zwei unterschiedliche Techniken miteinander verglichen: Applikation eines hohen, kurzen (im Mikrosekunden-Bereich) Feldpulses in niedrig leitenden Medien (Standard-Porationsmedium) am Multiporator von Eppendorf mit der Applikation eines niedrigeren, langen (im Millisekunden-Bereich) Feldpulses in hoch leitenden Medien (PBS) am Gene Pulser II von Bio-Rad.

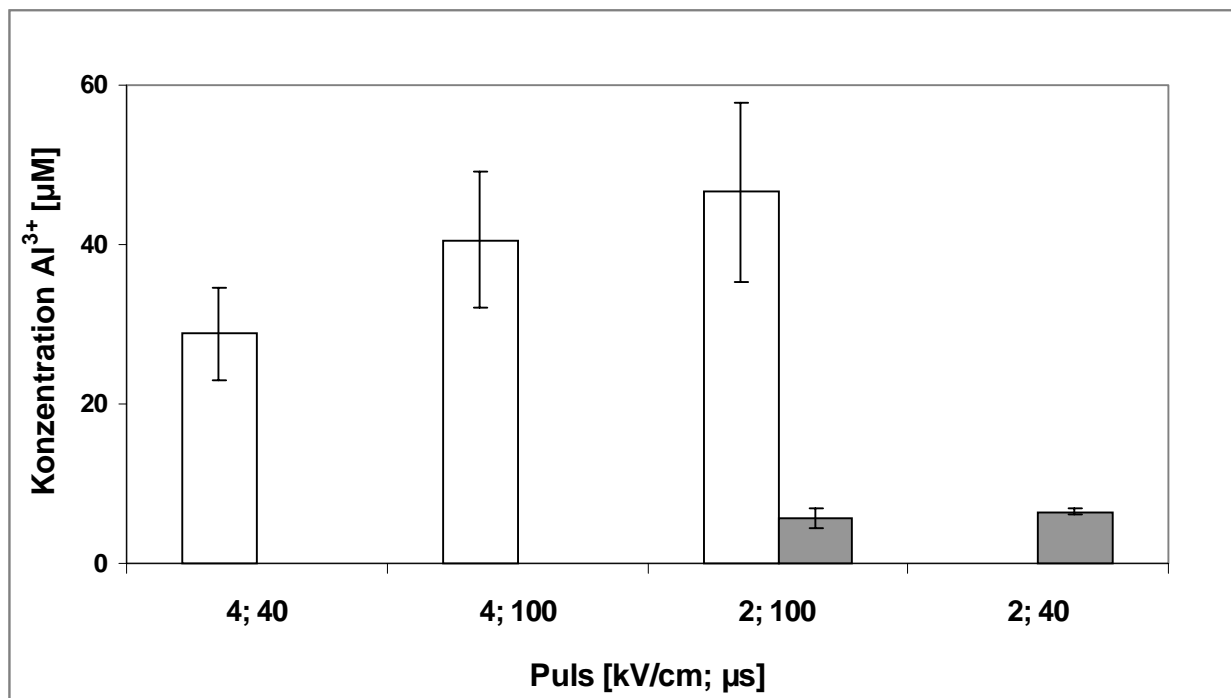


Abbildung 19: Konzentration von Al^{3+} -Ionen in Standard-Porationsmedium (Leitfähigkeit 3.8 mS/cm bei 24°C) nach Puls mit Multiporator in Küvetten mit einem Elektrodenabstand von 2 mm (weiß) und 4 mm (grau) bei den angegebenen Feldstärken und –dauer. Das Diagramm stellt die Mittelwerte aus 3-5 Experimenten mit den entsprechenden Fehlerbalken dar.

Für den Multiporator wurden Parameter gewählt, wie sie auch für die Transfektion von Zellen verwendet werden, z.B. 2 kV/cm mit 100 µs, bzw. doppelt so hohe Amplitude des Pulses bei Küvetten mit 2 mm und 4 mm Elektrodenabstand (Abb. 19)

Für die Experimente am Gene Pulser II wurden Parameter gewählt, wie sie von dem Hersteller des Gerätes für adhärenente Zellen bzw. Mausfibroblasten angegeben werden.

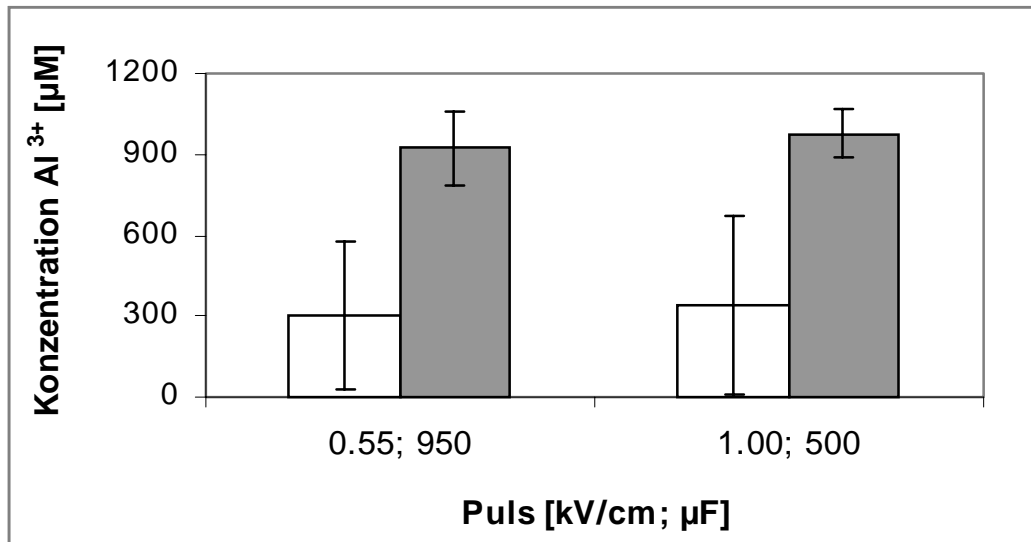


Abbildung 20: Konzentration von Al³⁺-Ionen in PBS (Leitfähigkeit 14.0 mS/cm bei 24°C) nach Puls mit Gene Pulser II in Küvetten mit einem Elektrodenabstand von 2 mm (weiß) und 4 mm (grau) bei den angegebenen Feldstärken und Kapazitäten. Das Diagramm stellt die Mittelwerte aus 3-5 Experimenten mit den entsprechenden Fehlerbalken dar.

Der Gene Pulser II zeigt nach der Applikation des Feldpulses dessen gemessene Amplitude und Dauer an. Diese Werte sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Elektrodenabstand	Einstellung am Gerät	gemessene Amplitude	gemessene Pulslänge
2 mm	1.00 kV/cm; 500 µF	0.957 kV/cm	6.6 ±0.2 ms
2 mm	0.55 kV/cm; 950 µF	0.520 kV/cm	13.0 ±0.2 ms
4 mm	1.00 kV/cm; 500 µF	0.958 kV/cm	4.0 ±0.1 ms
4 mm	0.55 kV/cm; 950 µF	0.529 kV/cm	12.7 ±0.2 ms

Tabelle 3: Tabelle mit gemessener Amplitude und Pulsdauer am Gene Pulser II bei Experimenten zur Bestimmung der Konzentration an freigesetzten Al³⁺-Ionen.

Die Werte aus der Tabelle zeigen, dass die Pulsdauer beim Gene Pulser II deutlich im Bereich von Millisekunden liegt.

4.4. Einfluss der Leitfähigkeit auf die Transfektionseffizienz

Mit L929-Zellen wurden Experimente durchgeführt, um den Einfluss der Leitfähigkeit des Porationsmediums auf die Effizienz der Elektrotransfektion zu untersuchen. Die Leitfähigkeit des Mediums wurde mit unterschiedlichen KCl-Konzentrationen eingestellt. Die Abhängigkeit der Leitfähigkeit von der KCl-Konzentration ist in folgender Tabelle dargestellt:

Konzentration KCl [mM]	Leitfähigkeit bei 24°C [$\mu\text{S}/\text{cm}$]
5	0,9
10	1,4
20	2,5
30	3,6
35	4,3

Tabelle 4: Zusammenhang zwischen der Konzentration von KCl und der Leitfähigkeit des Porationsmediums.

Die Elektrotransfektion der L929-Zellen erfolgte nach dem Standardprotokoll bei Raumtemperatur mit 2 kV/cm, 100 μs .

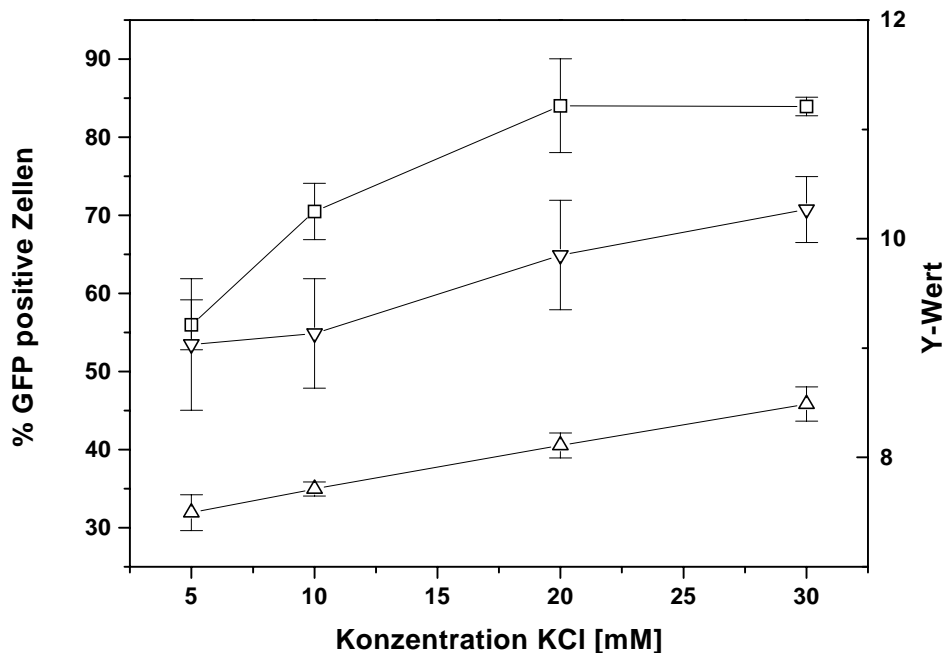


Abbildung 21: Abhängigkeit der Effizienz der Elektrotransfektion (48 Stunden nach der Elektroporation bei 2 kV/cm, 100 μs , Raumtemperatur, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pEGFP) von L929-Zellen von der KCl-Konzentration des Porationsmediums. Auf der linken Y-Achse ist die Effizienz dargestellt, berechnet nach input (Quadrat), FACS (Dreieck nach oben), auf der rechten Y-Achse der Y-Wert (Dreieck nach unten). Die Daten sind Mittelwerte aus 3 Experimenten mit Standardfehler.

Das Diagramm in Abb. 21 zeigt, dass die Effizienz der Elektrotransfektion zuerst mit einer Erhöhung der KCl-Konzentration ansteigt (von 5 mM KCl auf 20 mM KCl), unabhängig von der Methode der Auswertung. Zwischen der Ausbeute bei der Elektrotransfektion in Porationsmedium mit 20 mM KCl und 30 mM KCl ist kein Unterschied festzustellen. Zusammen mit der KCl-Konzentration steigt auch der Y-Wert, der die relative Fluoreszenzintensität der einzelnen Zelle angibt.

Um die unmittelbaren Auswirkungen der Leitfähigkeit des Porationsmediums zu untersuchen, wurde die Zellzahl 3 Stunden nach der Elektroporation von L929-Zellen bei 2 kV/cm, 100 μ s bestimmt.

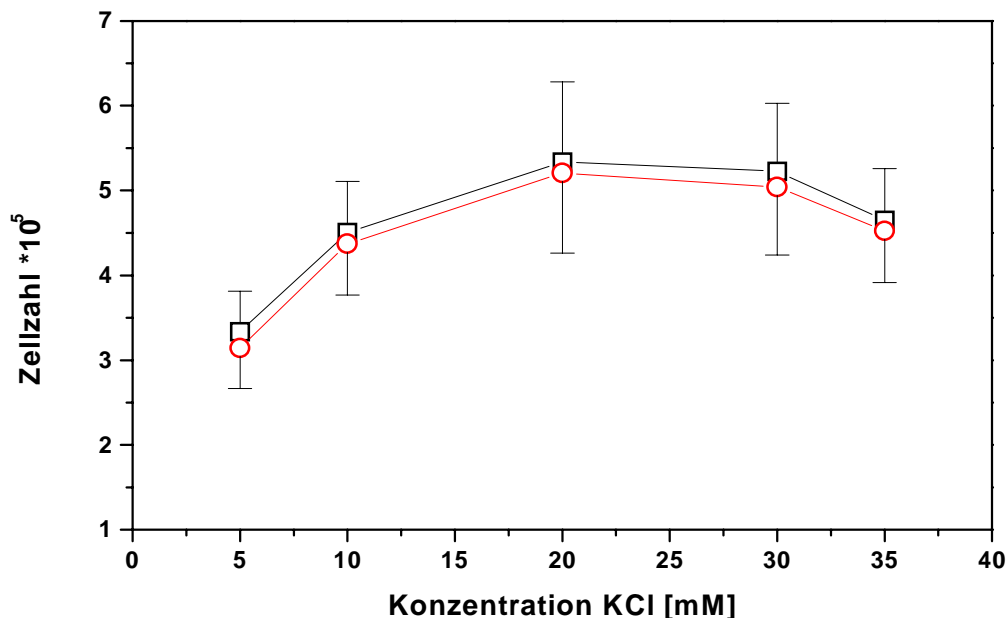


Abbildung 22: Gesamtzahl der L929-Zellen (Quadrate) und Zahl der lebenden L929-Zellen (Kreise) 3 Stunden nach der Elektroporation (2 kV/cm, 100 μ s) bei 22°C in Küvetten mit Aluminiumelektroden bei einer eingesetzten Zellzahl von $4 \cdot 10^5$ (Mittelwerte aus 3 Experimenten mit Standardfehler).

Das Diagramm in Abb. 22 zeigt, dass 3 Stunden nach der Elektroporation die höchste Zellanzahl bei der Verwendung von Porationsmedium von 20 bzw. 30 mM KCl zu finden ist. Hier ist sogar eine leichte Vermehrung der Zellen zu verzeichnen, aufgrund einer extrem guten Proliferation einer der drei Zellpräparationen. Die Differenzen in der Zellzahl bei den verschiedenen KCl-Konzentrationen sind (auch in Anbetracht der Standardfehler) allerdings nicht signifikant unterschiedlich.

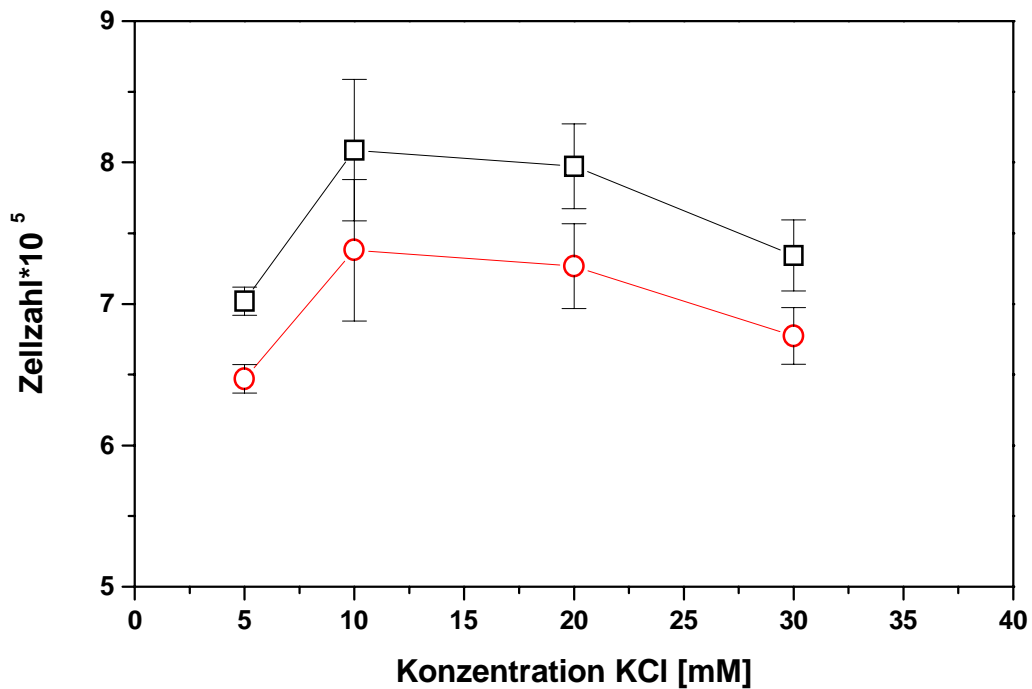


Abbildung 23: Gesamtzahl der L929-Zellen (Quadrate) und Zahl der lebenden L929-Zellen (Kreise) 48 Stunden nach der Elektroporation (2 kV/cm, 100 μ s) bei 22°C in Küvetten mit Aluminiumelektroden bei einer eingesetzten Zellzahl von 4×10^5 (Mittelwerte aus 3 Experimenten mit Standardfehler).

Die Zellzahl 48 Stunden nach der Elektrotransfektion der L929-Zellen zeigt ein Maximum bei der Verwendung von Porationsmedium mit 10 mM KCl. Die Differenzen in der Zellzahl bei den verschiedenen KCl-Konzentrationen sind (auch in Anbetracht der Standardfehler) allerdings nicht signifikant unterschiedlich.

4.5. Elektrotransfektion von primären Zellen mit pEGFP

4.5.1. Elektrotransfektion von CFB (Cardiofibroblasten)

Vorbereitung der Zellen

In ersten Experimenten wurde das Ablösen der Zellen aus den Kulturflaschen untersucht. Bei dem sonst üblichen Verfahren für adhärente Zellen, nämlich Inkubation mit 0.01% Dispase in CGM, lösten die Zellen sich zwar von der Oberfläche der Kulturflasche ab, blieben aber in Clustern zusammen. Auch nach mehrmaligem Resuspendieren lag keine Suspension von einzelnen Zellen vor, wie eine mikroskopische Kontrolle ergab.

Durch die enzymatische Behandlung mit Trypsin-EDTA in PBS konnte eine Suspension von einzelnen Zellen hergestellt werden. Bei den anschließenden Elektroporationsexperimenten konnten allerdings nach 24 Stunden keine lebenden Zellen festgestellt werden.

Als optimal für die Elektroporation erwies sich die Verwendung von Trypsin ohne EDTA in einer Konzentration von 0.01% in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} .

Bestimmung der optimalen Transfektionsparameter

Wie bei der Elektrotransfektion der Zelllinien, wurde hier auch für die primären Fibroblasten eine Reihe von Transfektionsexperimenten durchgeführt, um die optimalen Elektroporationsbedingungen zu finden. Die Feldparameter wurden zwischen 1 und 6 kV/cm in Schritten von 1 kV/cm variiert, bei Pulslängen von 40 μs und 100 μs . Die Ergebnisse sind in folgendem Diagramm zusammengefasst.

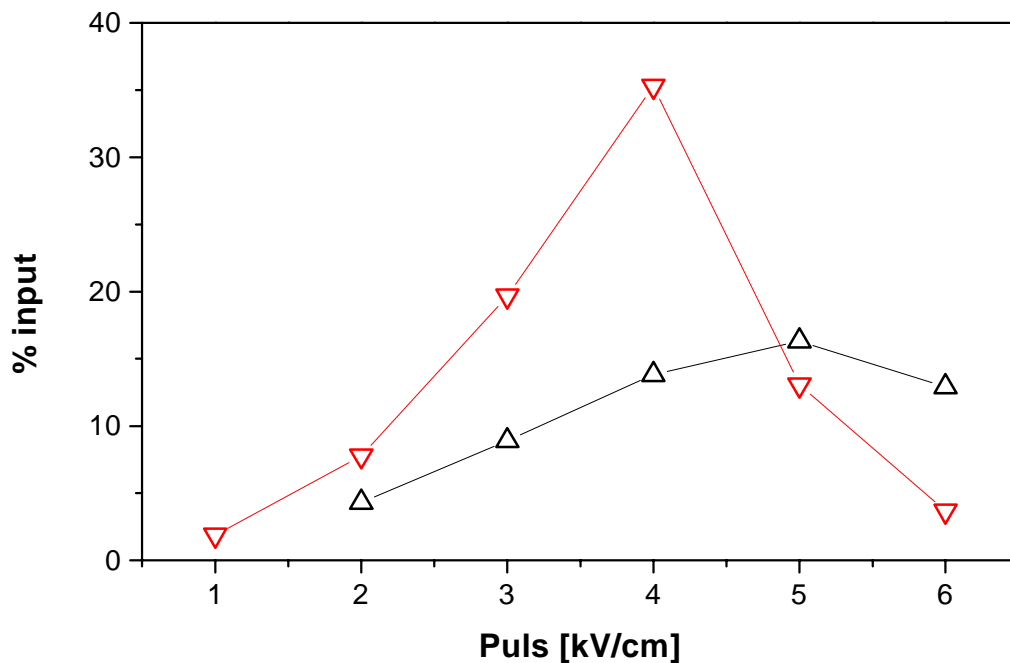


Abbildung 24: Darstellung der Transfektionseffizienz 48 Stunden nach der Poration von CFB. Die Elektroporation bei ca. 22°C mit der angegebenen Pulsamplitude, einer Pulsdauer von 40 µs (Dreieck nach oben) und 100 µs (Dreieck nach unten) und eine Konzentration von 10 µg/ml Plasmid pEGFP. Die Daten sind Mittelwerte aus 1-3 Experimenten.

Die ersten Elektrotransfektionsexerimente mit primären Fibroblasten haben gezeigt, dass eine optimale Effizienz bei Feldparametern von 4 kV/cm und 100 µs erreicht wird. Bei diesen Parametern ist ein eindeutiges Maximum in der Ausbeute an transfizierten Zellen zu beobachten.

Im Laufe dieser ersten Experimente wurde festgestellt, dass die Transfektionseffizienz große Schwankungen von einer Zellpräparation der primären Fibroblasten zur anderen zeigte. Innerhalb einer Experimentreihe mit derselben Zellpräparation wurde jedoch der gleiche Trend (wie in Abb. 24) bestätigt.

Deshalb liefen weitere Versuche und auch die Auswertung nur innerhalb derselben Zellpräparation, wobei die Ausbeute der Elektrotransfektion mit den Parametern 4 kV/cm, 100 µs, 10 µg/ml Plasmid pEGFP als 100% gesetzt wurde.

Die FACS-Analyse ergab jedoch auch, dass für das Sortieren der Zellen eine Elektrotransfektion bei Feldparametern von 5 kV/cm und 100 µs besser ist, da hier zwei definierte Zellpopulationen vorliegen.

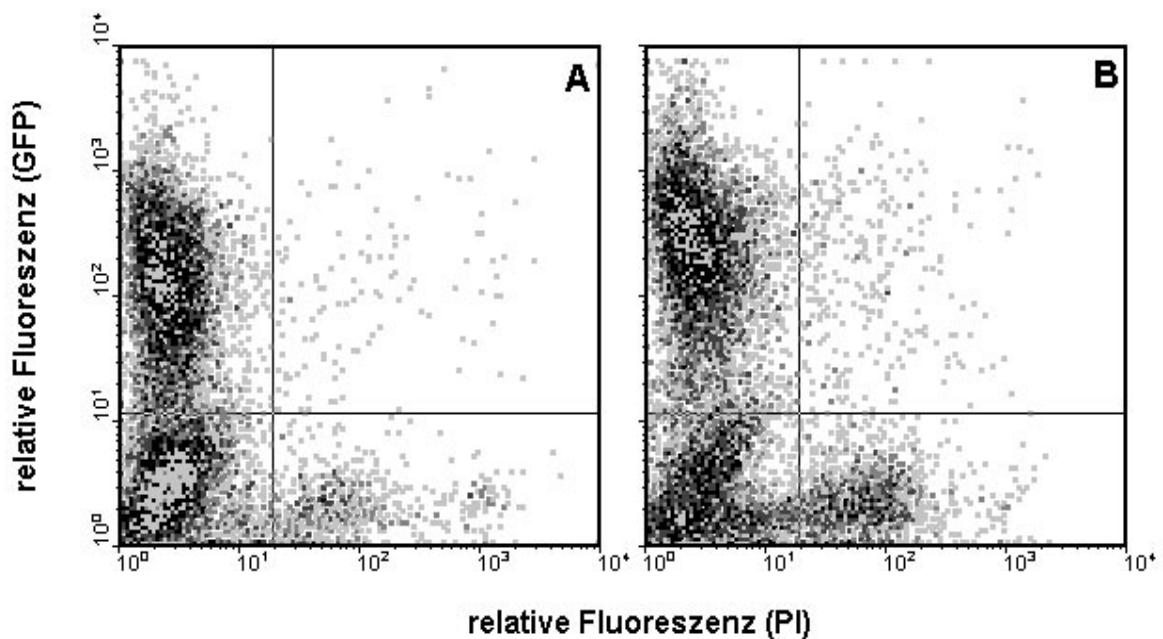


Abbildung 25: Darstellung der FACS-Analyse von primären CFB-Zellen 48 Stunden nach der Elektrotransfektion mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Plasmid pEGFP. Bei den Zellen in Abb. A wurde die Elektrotransfektion mit 4 kV/cm, 100 μs , bei den Zellen in Abb. B mit 5 kV/cm, 100 μs durchgeführt.

Die FACS-Analyse der primären CFB-Zellen zeigt, dass unter optimalen Bedingungen ca. 50% der Zellen transfiziert werden können (A: 49%, B: 53% FACS). Bezogen auf die eingesetzte Zellzahl haben sich die Parameter von 4 kV/cm, 100 μs bewährt, da hier mehr Zellen die Elektrotransfektion überleben und man somit ein besseres (input-) Ergebnis erhält. Für eine stabile Transfektion oder das Sortieren der Zellen sind jedoch die Parameter von 5 kV/cm, 100 μs zu empfehlen, da hier die Population der transfizierten Zellen deutlich von den GFP-negativen Zellen abgegrenzt auftritt. Außerdem ist in B die mittlere relative Fluoreszenzintensität der einzelnen Zelle fast doppelt so hoch (212 zu 120) wie in A.

Vergleich der Elektroden-Materialien

Parallel zu den Elektrotransfektionsexperimenten in Küvetten mit Edelstahlelektroden wurden auch Experimente in Küvetten mit Aluminiumelektroden durchgeführt. Um bei den primären CFB-Zellen einen direkten Vergleich zu haben, erfolgten die Experimente mit den unterschiedlichen Elektroden-Materialien jeweils mit Zellen aus derselben Präparation.

Der Vergleich der Ausbeute bei der Elektrotransfektion in Küvetten mit Edelstahl- bzw. Aluminiumelektroden zeigt, dass es auch bei primären Fibroblasten keinen Unterschied in der Verwendung dieser beiden Elektroden-Materialien gibt. Der Wert bei Edelstahlelektroden wurde innerhalb einer Experimentreihe mit derselben Zellpräparation gleich 100% gesetzt. In Bezug dazu liegt der Wert bei der Verwendung von Aluminiumelektroden mit $102\% \pm 6.5$ in dem selben Bereich, so dass kein signifikanter Unterschied festzustellen ist.

Einfluss der Plasmid-Konzentration auf die Transfektionseffizienz

In den bisher gezeigten Ergebnissen wurde eine Plasmid-Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ verwendet. In Anlehnung an die Ergebnisse mit den Zelllinien (siehe 4.2.) wurde in weiteren Experimenten die Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von der Konzentration des Plasmids untersucht.

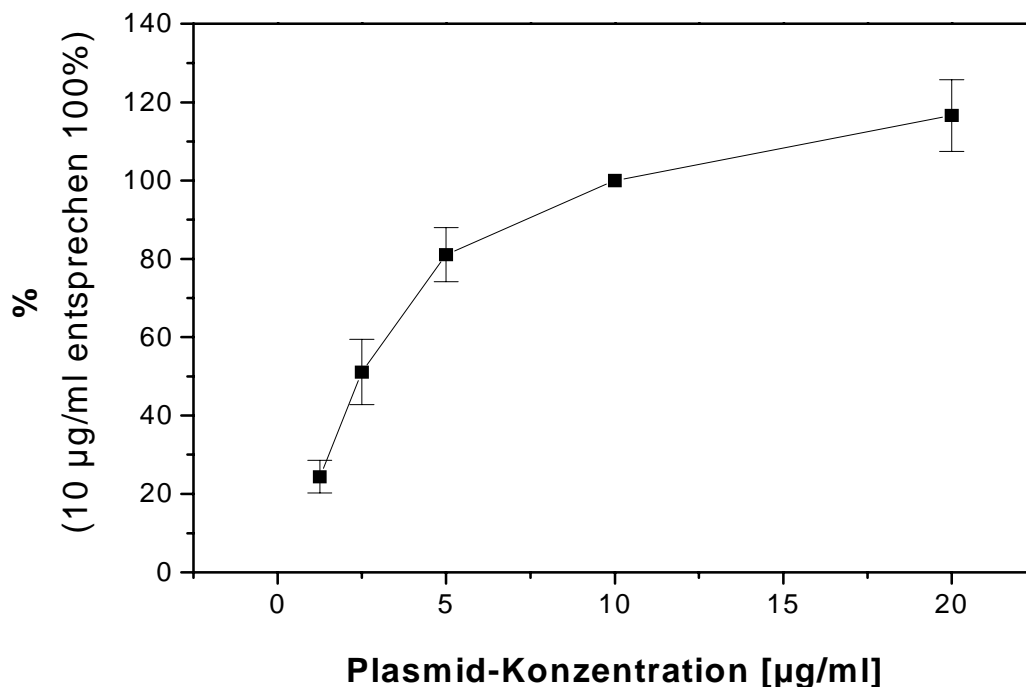


Abbildung 26: Transfektionseffizienz in Abhängigkeit von der eingesetzten Plasmid-Konzentration bei primären Fibroblasten. Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Ausbeute bei $10 \mu\text{g/ml}$ wurde gleich 100% gesetzt, innerhalb einer Versuchsreihe mit derselben Zellpräparation. Die Elektrotransfektion wurde bei 22°C in Küvetten mit Aluminiumelektroden mit folgenden Feldparameter durchgeführt: 4kV/cm , $100 \mu\text{s}$.

Um den Einfluss der Plasmid-Konzentration auf die Transfektionseffizienz genau zu untersuchen, wurde die Ausbeute an transfizierten Zellen innerhalb einer Zellpräparation verglichen. Eine Erhöhung der Konzentration von 1.25 µg/ml Plasmid auf 5 µg/ml führte zu einem drastischen Anstieg der Ausbeute. Bei einer weiteren Erhöhung der Plasmid-Konzentration flacht dieser Anstieg ab, so dass bei Einsatz von 20 µg/ml pEGFP nur noch 116% des Referenzwertes erreicht werden.

Einfluss des Zellvolumens auf die Transfektionseffizienz

Nach ersten Elektrotansfektionsexperimenten mit den primären Fibroblasten wurde deutlich, dass die Ausbeute von einer Zellpräparation zur anderen schwankt. Diese Beobachtung könnte unter anderem durch den Unterschied in den Zellradii zwischen den Zellpopulationen erklärt werden. Da das kritische Feld E_{krit} umgekehrt proportional zum Zellradius ist, wurde dieser Zusammenhang genauer untersucht. Für die Auswertung wurden die gemessenen Volumina der Zellen herangezogen, da hier wegen $V_{\text{Kugel}} = 4/3\pi r^3$ die größeren Unterschiede zu beobachten sind.

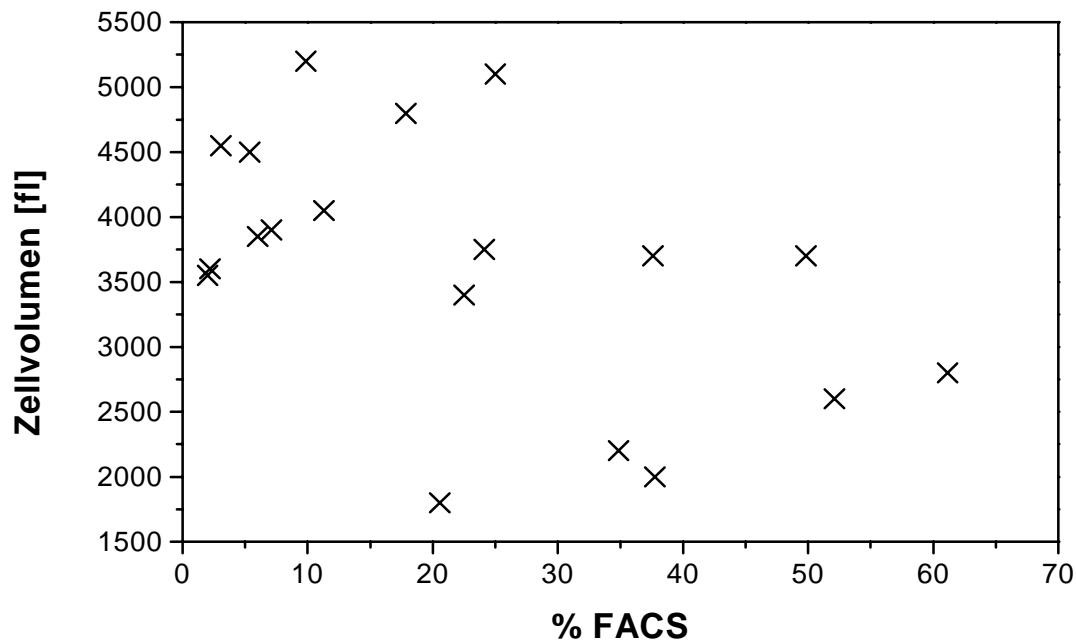


Abbildung 27: Zusammenhang zwischen dem gemessenen Volumen in PBS der primären Fibroblasten vor der Elektrotansfektion und der Transfektionseffizienz nach 48 Stunden bei Elektroporation bei 22°C, 4 kV/cm, 100 µs.

Aus dem Diagramm in Abb. 27 wird deutlich, dass kein direkter Zusammenhang zwischen dem Zellvolumen, und damit dem Radius der Zellen, und der Transfektionseffizienz vorliegt. Die größten Ausbeuten sind bei kleinen bis mittleren Volumina zu finden, während bei großen Volumina die Ausbeute zurück geht.

4.5.2. Elektrotransfektion von embryonalen Stammzellen (ES)

Ablösen der embryonalen Stammzellen

Die embryonalen Stammzellen sind adhärente Zellen, die in Cluster wachsen. Eine Behandlung mit Dispase löst die Cluster zwar ab, jedoch erhält man keine Suspension von einzelnen Zellen. Eine solche Suspension, wie sie für die Elektroporation notwendig ist, erhält man nur durch eine Behandlung mit 0.01% Trypsin.

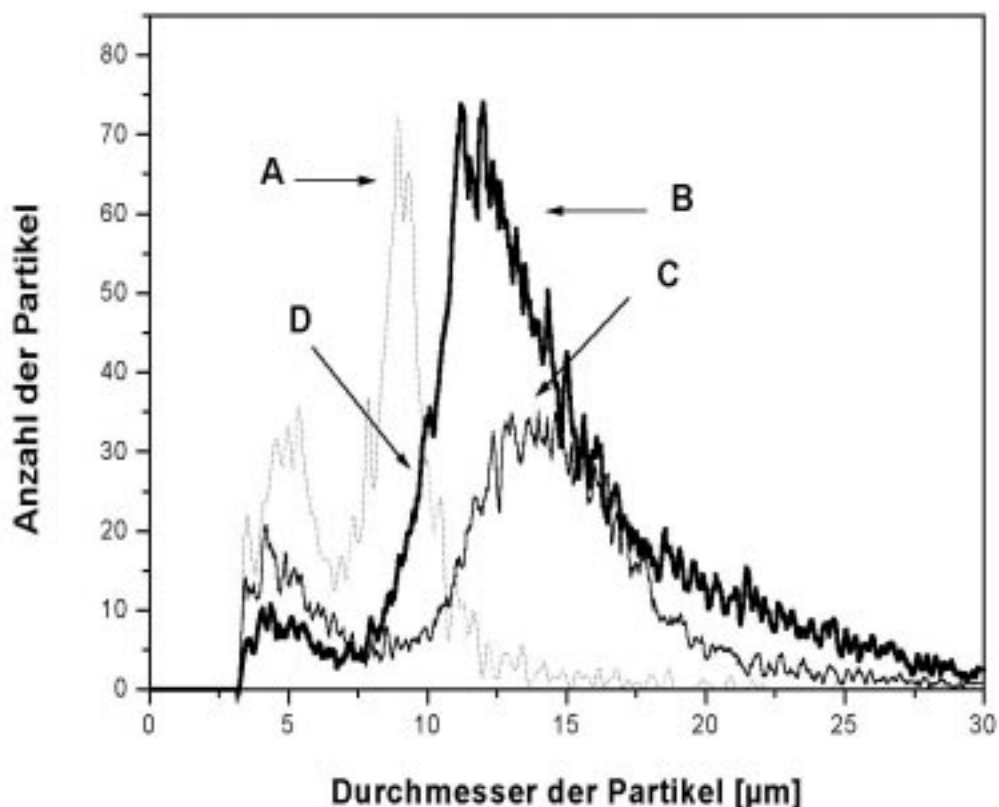


Abbildung 28: Darstellung einer Auswertung mit Hilfe des CASY-1 Systems. Gemessen wurden ES-Zellen in PBS nach Behandlung mit Trypsin-EDTA 0.2% (B), Trypsin ohne EDTA 0.01% (C), Zellen von (B) mit Saponin (A).

Wie aus Abb. 28 deutlich wird, zeigt nur die Zellpopulation C, welche mit verdünntem Trypsin (0.01%) ohne EDTA abgelöst wurde, eine normale Verteilung. Nach dem Ablösen mit anschließendem Waschen mit CGM sind kaum tote Zellen zu erkennen, die im Bereich der Kurve A (mit Saponin behandelte Zellen) liegen. Bei den Zellen, die mit konzentriertem Trypsin mit EDTA abgelöst wurden (B), ist trotz des Waschschrattes eine Population zu erkennen, die im Bereich der toten Zellen liegt (Schulter D).

Bestimmung der optimalen Transfektionsparameter

In ersten Experimenten zur Elektrotransfektion von embryonalen Stammzellen wurden zuerst die optimalen Elektroporationsparameter gesucht. Da es sich um sehr empfindliche Zellen handelt und der berechnete Wert von E_{krit} im Bereich von ca. 1 kV/cm (je nach Zellpräparation) liegt, wurden Feldpulse mit relativ kleinen Parametern gewählt.

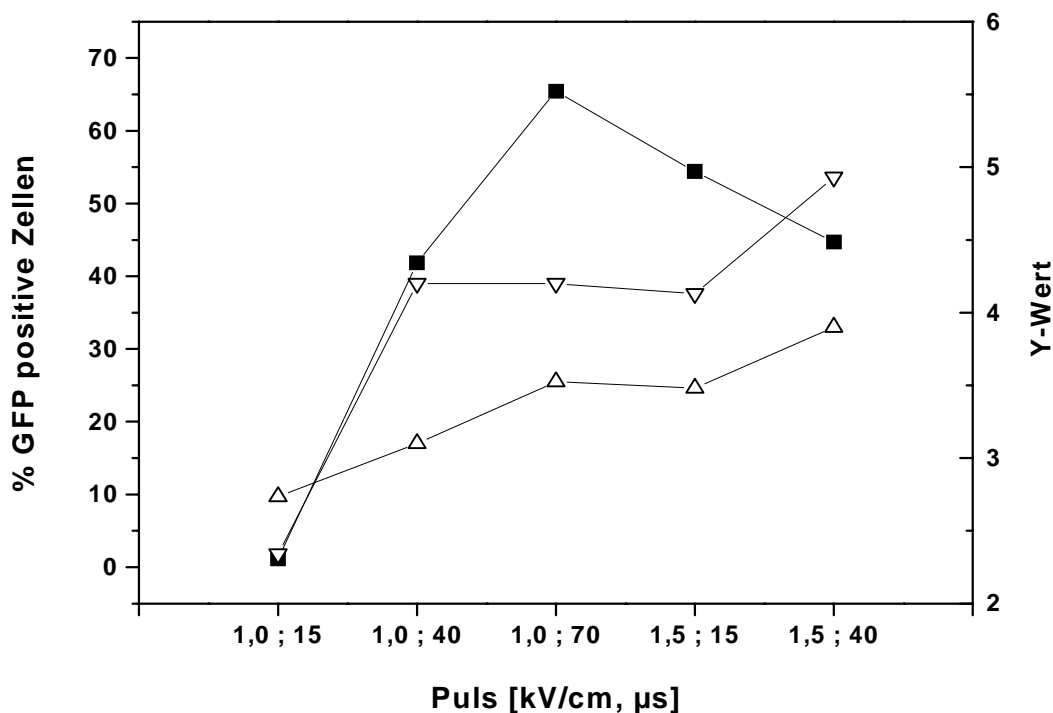


Abbildung 29: Darstellung der Transfektionseffizienz 48 Stunden nach der Poration bei Experimenten mit embryonalen Stammzellen. Die Elektroporation erfolgte in Küvetten mit Aluminiumelektroden (2mm Elektrodenabstand, 400 µl Volumen), bei ca. 22°C mit der angegebenen Pulsamplitude und einer Konzentration von 5 µg/ml Plasmid pEGFP. Auf der linken Y-Achse ist die Transfektionseffizienz in der Auswertung nach input (Quadrate) sowie FACS (Dreiecke nach oben), auf der rechten Y-Achse der Y-Wert (Dreieck nach unten) dargestellt.

Die Elektrotransfektionsexperimente mit ES-Zellen haben gezeigt, wie in Abb. 29 dargestellt, dass eine maximale Anzahl (mit einem Wert von 65% nach input ausgewertet) an transfizierten Zellen bei Feldparameter von 1 kV/cm und 70 μ s erzielt wird. Betrachtet man nur die Daten der FACS-Auswertung, so wird deutlich, dass der prozentuelle Anteil von GFP-positiven Zellen innerhalb einer Population mit steigender Pulsdauer bzw. steigender Pulsamplitude wächst, wobei keine nennenswerte Differenz zwischen den Feldparametern 1 kV/cm mit 70 μ s und 1.5 kV/cm mit 15 μ s zu beobachten ist.

Der Unterschied in der Transfektionseffizienz zwischen den beiden Auswertungen, FACS und input, ist auf die Vermehrung der Zellen zurückzuführen. Bei höheren Parametern (wie z. B. 1.5 kV/cm, 40 μ s) wird mehr GFP in der einzelnen Zelle exprimiert, also auch mehr Plasmid eingeschleust, wie die Y-Werte belegen. Andererseits überleben aber weniger Zellen diese Behandlung. Dies zeigt ein Vergleich der Zellzahlen nach 48 Stunden: bei $4 \cdot 10^5$ eingesetzten Zellen wurden nach der Elektroporation mit 1 kV/cm, 70 μ s $10.3 \cdot 10^5$ Zellen gezählt (mehr als eine Verdoppelung), während nach der Elektroporation mit 1.5 kV/cm, 40 μ s $5.4 \cdot 10^5$ Zellen gezählt wurden.

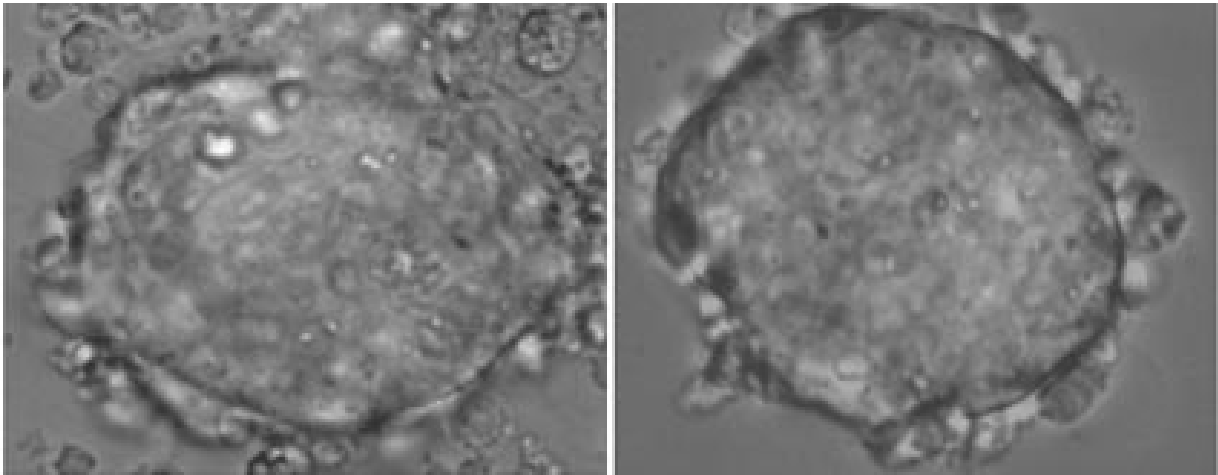


Abbildung 30: Mikroskopische Aufnahme von GFP-exprimierenden embryonalen Stammzellen, 48 Stunden nach der Elektrotransfektion bei 22°C, mit 1 kV/cm, 70 μ s. Bilder digital bearbeitet.

In Abb. 30 sind als Nachweis für die Expression von GFP grün fluoreszierende ES-Zellen zu beobachten. Die Aufnahmen wurden 48 Stunden nach der Elektrotransfektion der Zellen bei 22°C, mit 1 kV/cm, 70 μ s, gemacht. Deutlich zu sehen sind auch die Zellcluster, in denen die embryonalen Stammzellen wachsen.

Ein Teil der Zellpräparation, mit der die ersten Experimente durchgeführt wurden, wurde für weitere Versuche verwendet. Die Elektrotransfektion wurde bei den gleichen Parametern durchgeführt, die Auswertung erfolgte jedoch schon nach 24 Stunden.

Das Diagramm in Abb. 31 zeigt, dass 24 Stunden nach der Elektrotransfektion der ES-Zellen die beiden Auswertungen, FACS und input, einen fast parallelen Verlauf haben. Dies ist aufgrund der Zellzahlen, die kaum eine Vermehrung zeigen (Werte liegen zwischen $3.8 \cdot 10^5$ und $5.1 \cdot 10^5$), verständlich. Eine Ausnahme ist mit $2.4 \cdot 10^5$ Zellen bei den Feldparametern 1.5 kV/cm, 40 μ s festzustellen.

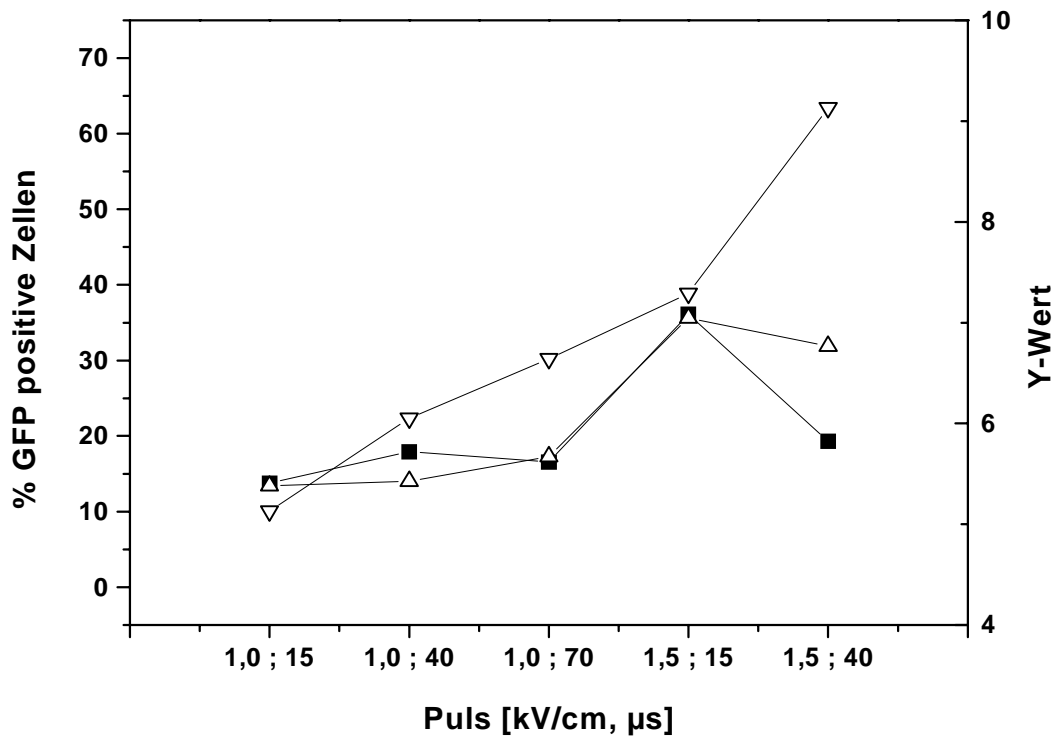


Abbildung 31: Darstellung der Transfektionseffizienz 24 Stunden nach der Poration bei Experimenten mit embryonalen Stammzellen. Die Elektroporation erfolgte in Küvetten mit Aluminiumelektroden (2mm Elektrodenabstand, 400 μ l Volumen), bei ca. 22°C mit der angegebenen Pulsamplitude und einer Konzentration von 5 μ g/ml Plasmid pEGFP. Auf der linken Y-Achse ist die Transfektionseffizienz in der Auswertung nach input (Quadrate) sowie FACS (Dreiecke nach oben), auf der rechten Y-Achse der Y-Wert (Dreieck nach unten) dargestellt.

Die Werte der Transfektionseffizienz sind ca. halb so hoch wie jene nach 48 Stunden gemessenen. Außerdem ist eine Verschiebung des Maximums zu den Parametern 1.5 kV/cm, 15 μ s zu beobachten. Dagegen sind die Y-Werte ca. doppelt so groß wie die nach 48 Stunden gemessenen.

Einfluss der Plasmidkonzentration auf die Transfektionseffizienz

Wie bei den primären Cardiofibroblasten (CFB-Zellen) erfolgte die Auswertung der Experimente nur innerhalb derselben Zellpräparation. Dabei wurde die Transfektionseffizienz der Elektrotransfektion bei 1 kV/cm, 70 μ s und 5 μ g/ml Plasmid gleich 100% gesetzt.

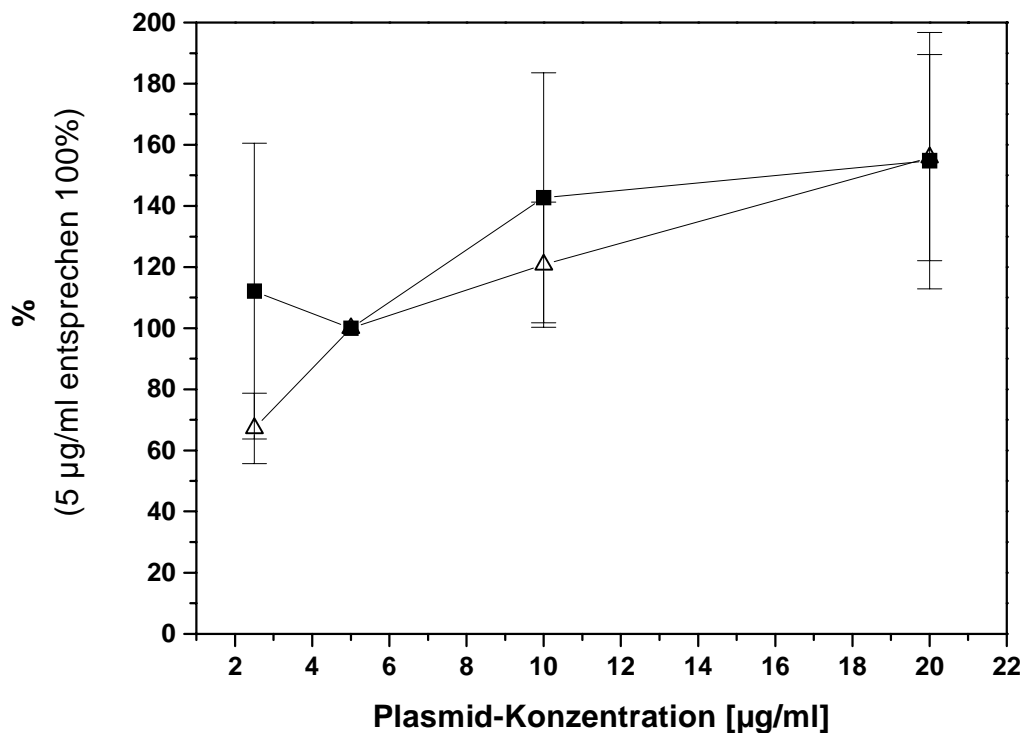


Abbildung 32: Transfektionseffizienz in Abhängigkeit von der eingesetzten Plasmid-Konzentration bei ES-Zellen. Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Ausbeute bei 5 μ g/ml wurde gleich 100% gesetzt, innerhalb einer Versuchsreihe mit der selben Zellpräparation. Die Elektrotransfektion wurde bei 22°C durchgeführt in Küvetten mit Aluminiumelektroden, mit folgenden Feldparametern: 1 kV/cm, 70 μ s. Die Auswertung erfolgte nach input (Quadrate) sowie FACS (Dreiecke nach unten).

Um den Einfluss der Plasmid-Konzentration auf die Transfektionseffizienz genau zu untersuchen, wurde die Ausbeute an transfizierten Zellen innerhalb einer Zellpräparation verglichen. Eine Erhöhung der Konzentration von 5 μ g/ml Plasmid auf 20 μ g/ml führt zu einem Anstieg der Ausbeute um 50%.

Vergleich von Porationstechniken

Die Transfektion von primären Stammzellen wurde nach einem Protokoll und von Mitarbeitern des Lehrstuhls für Pharmakologie durchgeführt. Die Zellen wurden mit konzentriertem Trypsin mit EDTA abgelöst. Die Poration erfolgte mit einem GENE Pulser II in PBS mit 0.625 kV/cm und 500 μ F (die Pulsdauer liegt im Bereich von 10 ms). Parallel dazu erfolgte die Transfektion mit Zellen der gleichen Charge mit dem Multiporator, nach dem Protokoll (siehe 3.7.) mit 1.0 kV/cm, 70 μ s. Die Ergebnisse dieses Vergleichs in einer Dreifachbestimmung sind in folgender Grafik zusammengefasst.

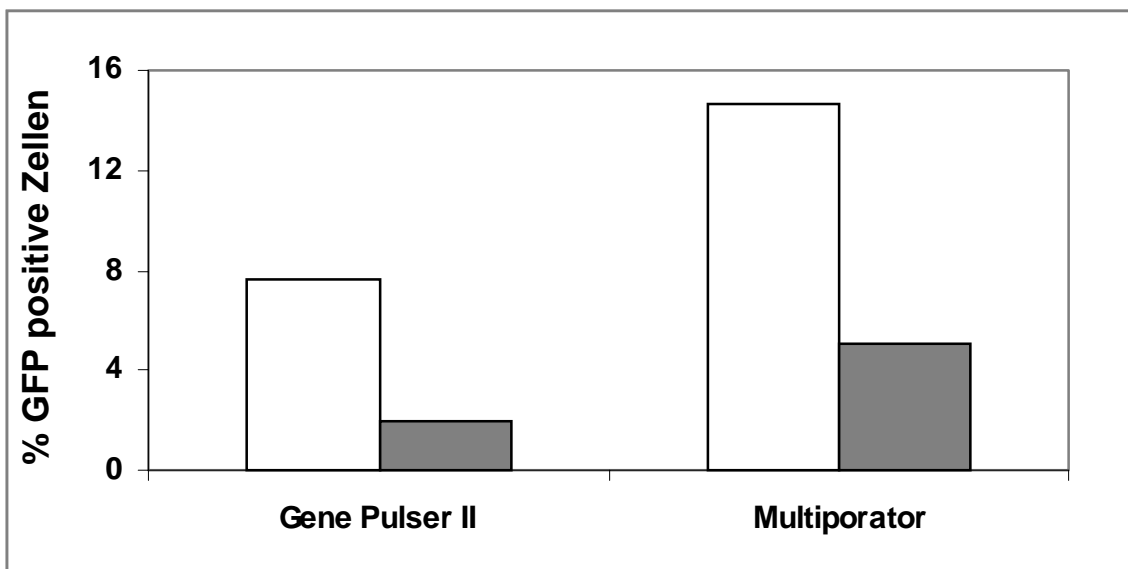


Abbildung 33: Darstellung der Transfektionseffizienz 48 Stunden nach dem Puls bei Experimenten mit embryonalen Stammzellen. Die Elektroporation erfolgte mit dem Gene Pulser II, bzw. Multiporator bei ca. 22°C mit der angegebenen Pulsamplitude und einer Konzentration von 5 μ g/ml Plasmid pEGFP. Weiße Säulen stellen Auswertung nach input, gestreifte nach FACS dar. Daten sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung.

Der Vergleich der beiden Techniken (Pulse kleiner Amplitude und langer Dauer in leitenden Medien beim Gene Pulser II und Pulse hoher Amplitude und kurzer Dauer in hypoosmolalen, niedrig leitenden Medien beim Multiporator) zeigt, dass mit dem Multiporator eine fast doppelt so hohe Effizienz erreicht wird. Diese doppelte Ausbeute ist unabhängig von der Art der Auswertung.

4.6. Elektrotransfektion und Zellzyklus

4.6.1. Primäre Fibroblasten (CFB)

In Kapitel 4.5. wurde erwähnt, dass große Unterschiede in der Ausbeute der Elektrotransfektion der primären Fibroblasten von einer Zellpräparation zur nächsten festgestellt wurden. Um diesen Sachverhalt genauer zu untersuchen, wurden folgende Experimente durchgeführt, in denen der Einfluss der Anzahl der Passagen vor der Elektrotransfektion, die Verteilung der Zellen innerhalb des Zellzykluses zum Zeitpunkt der Elektrotransfektion sowie die Serumkonzentration im Kulturmedium danach analysiert wurden.

Um die Zellen möglichst schonend zu synchronisieren und nicht mit Chemikalien in den Zellzyklus einzugreifen, wurden die Zellen bis zur Konfluenz in Kultur gehalten. Durch das anschließende Splitten wurde der Start der Proliferation und somit des Zellzykluses erreicht.

Für eine erste Reihe von Experimenten standen primäre Fibroblasten mit einer hohen Anzahl an Passagen zur Verfügung. Nach der Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen gesplittet und alle 12 Stunden eine Elektrotransfektion durchgeführt. Zusätzlich wurden zu jedem dieser Zeitpunkte Proben für eine Zellzyklus-Analyse entnommen. Die Ergebnisse sind in Abb. 34 dargestellt.

Aus dem Diagramm 34 dieser Abbildung ist deutlich zu erkennen, dass die Ausbeute an pEGFP-positiven Zellen fast linear mit dem Anteil der primären Fibroblasten in der S-Phase und G2-Phase verläuft.

Die Ausbeute an transfizierten Zellen ist mit Werten zwischen 2% und 11% relativ gering. Die Werte bezogen auf die eingesetzte Zellzahl - also input - liegen zwischen 0.6% und 7.4%.

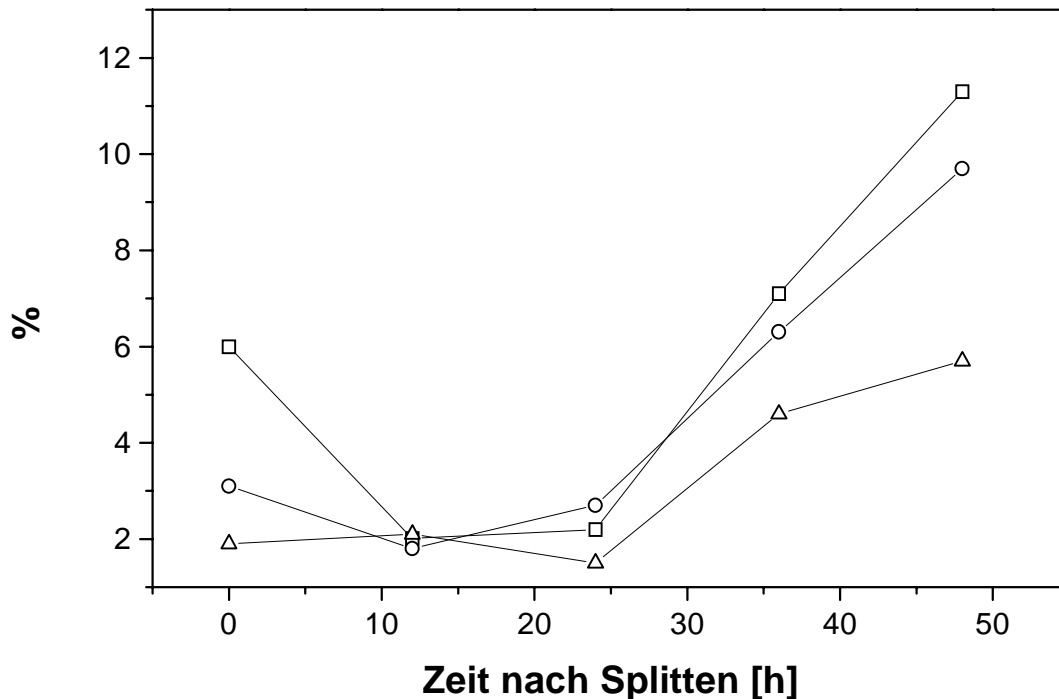


Abbildung 34: Zusammenhang zwischen der Effizienz (Quadrate) der Elektrotransfektion (im Abstand von 12 Stunden) primärer Fibroblasten von dem Anteil der Zellen in S-Phase (Kreise) und in G2-Phase (Dreiecke). Die Zellen haben eine hohe Anzahl von Passagen und wurden nach der Elektrotransfektion in McCoy's-Medium mit 10% FCS kultiviert. Die Angabe der Effizienz erfolgt in %, bestimmt durch FACS-Analyse. Die Elektrotransfektion wurde bei Raumtemperatur mit 4 kV/cm, 100 μ s und 10 μ g/ml Plasmid durchgeführt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde das Experiment wiederholt; die Zellen wurden nach der Elektrotransfektion jedoch in Kulturmedium mit 20% FCS kultiviert.

Auch bei den Ergebnissen aus Abb. 35 ist eine Proportionalität zwischen der Ausbeute und dem Anteil der primären Fibroblasten in der S-Phase und G2-Phase zu beobachten.

Allgemein wurden im Vergleich zu Abb. 34 mit Werten zwischen 3% und 25% höhere Ausbeuten erreicht. Ein ähnliches Verhalten ist auch im Vergleich mit der Effizienz der Elektrotransfektion in Bezug auf die eingesetzte Zellzahl festzustellen, die mit Werten von 2.2% bis 20% in der gleichen Größenordnung liegt.

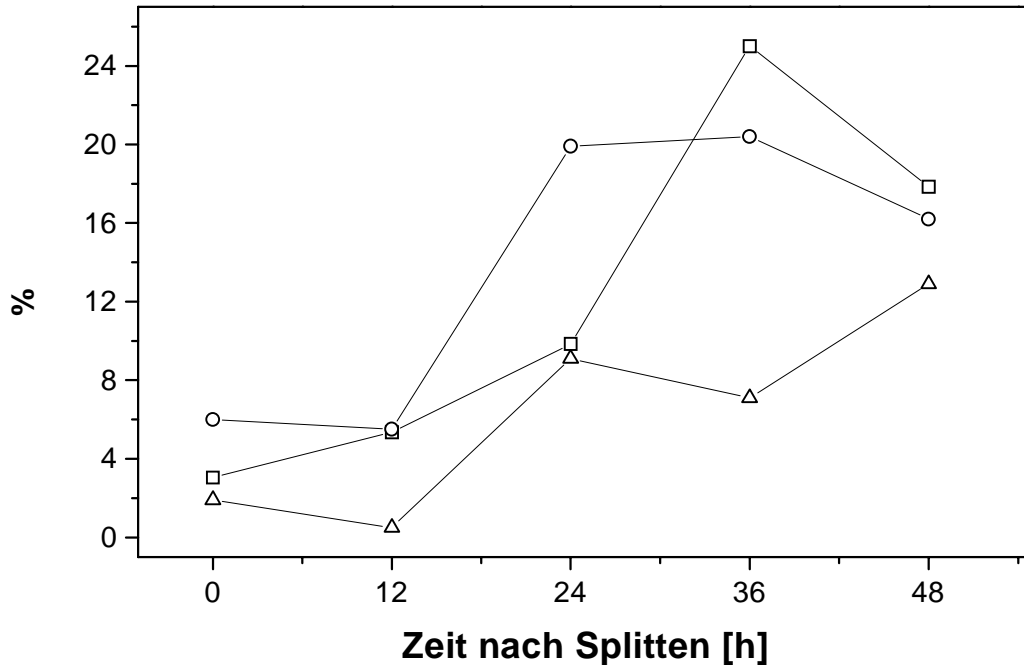


Abbildung 35: Zusammenhang zwischen der Effizienz (Quadrate) der Elektrotransfektion (im Abstand von 12 Stunden) primärer Fibroblasten von dem Anteil der Zellen in S-Phase (Kreise) und in G2-Phase (Dreiecke). Die Zellen haben eine hohe Anzahl von Passagen und wurden nach der Elektrotransfektion in McCoys-Medium mit 20% FCS kultiviert. Die Angabe der Effizienz erfolgt in %, bestimmt durch FACS-Analyse. Die Elektrotransfektion wurde bei Raumtemperatur mit 4 kV/cm, 100 μ s und 10 μ g/ml Plasmid durchgeführt.

Für die nächsten Experimente wurden relativ frisch isolierte primäre Fibroblasten (geringe Anzahl von Passagen) verwendet.

In dem Diagramm in Abb. 36 ist eine eindeutige Abhängigkeit der Effizienz der Elektrotransfektion von dem Anteil der Zellen in der S-Phase zu beobachten. Der Anteil der Zellen in G2-Phase scheint keine Rolle zu spielen.

Diese relativ "frischen" Zellen zeigen auch eine höhere Proliferation, wie am Anteil der Zellen in S-Phase festzustellen ist. Fast linear dazu ist die Ausbeute an GFP-positiven Zellen gestiegen.

Obwohl die Zellkultur in Medium mit 10% Serum erfolgte, ist die Transfektions-effizienz mit Werten von 22.5% bis 49.8% deutlich größer als bei den bis hierher beschriebenen Experimentreihen. Die Ausbeute, bezogen auf die eingesetzte Zellzahl, zeigt mit Werten zwischen 15% und 50% ein ähnliches Verhalten.

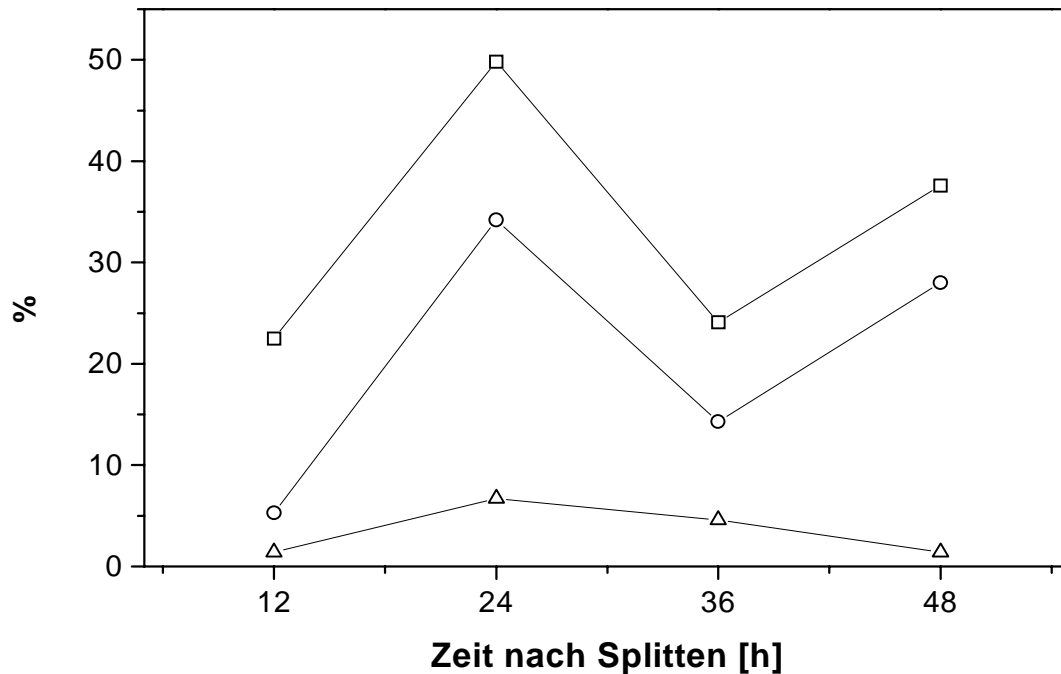


Abbildung 36: Zusammenhang zwischen der Effizienz (Quadrate) der Elektrotransfektion (im Abstand von 12 Stunden) primärer Fibroblasten von dem Anteil der Zellen in S-Phase (Kreise) und in G2-Phase (Dreiecke). Die Zellen haben eine geringe Anzahl von Passagen und wurden nach der Elektrotransfektion in McCoys-Medium mit 10% FCS kultiviert. Die Angabe der Effizienz erfolgt in %, bestimmt durch FACS-Analyse. Die Elektrotransfektion wurde bei Raumtemperatur mit 4 kV/cm, 100 μ s und 10 μ g/ml Plasmid durchgeführt.

In Anlehnung an die Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe und zur Vervollständigung der Experimente wurde eine weitere Reihe von Versuchen mit primären Fibroblasten mit einer geringen Anzahl von Passagen durchgeführt, die nach der Elektrotransfektion in Medium mit 20% Serum kultiviert wurden. Die Ergebnisse sind in folgendem Diagramm zusammengefasst.

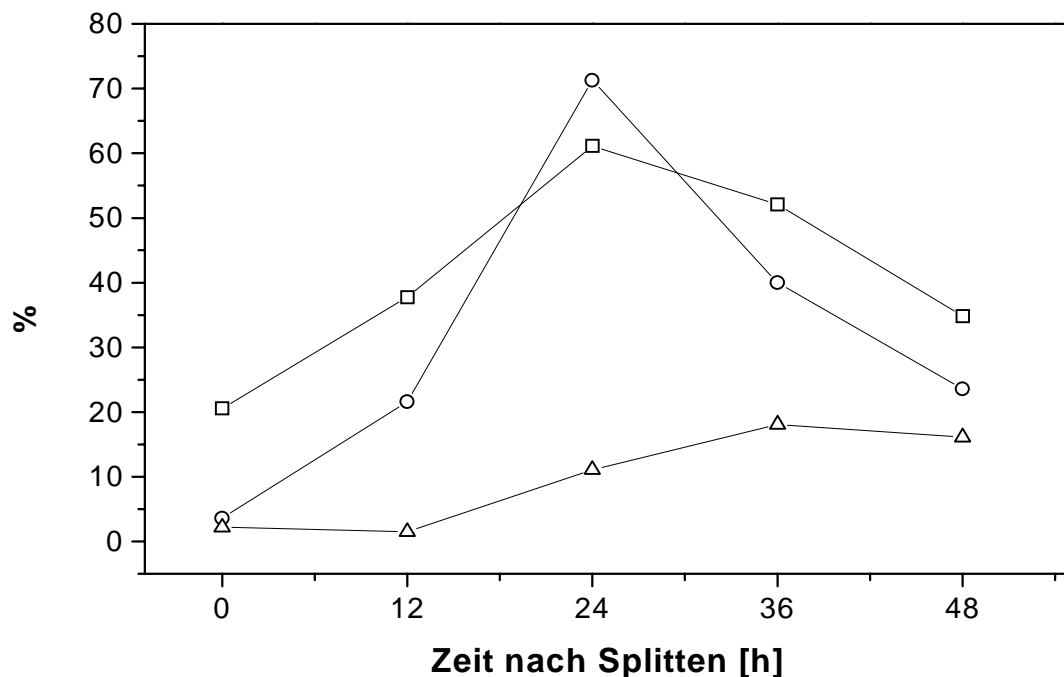


Abbildung 37: Zusammenhang zwischen der Effizienz (Quadrate) der Elektrotransfektion (im Abstand von 12 Stunden) primärer Fibroblasten von dem Anteil der Zellen in S-Phase (Kreise) und in G2-Phase (Dreiecke). Die Zellen haben eine geringe Anzahl von Passagen und wurden nach der Elektrotransfektion in McCoys-Medium mit 20% FCS kultiviert. Die Angabe der Effizienz erfolgt in %, bestimmt durch FACS-Analyse. Die Elektrotransfektion wurde bei Raumtemperatur mit 4 kV/cm, 100 μ s und 10 μ g/ml Plasmid durchgeführt.

Die Ergebnisse aus dieser 4. Versuchsreihe (Abb. 37) bestätigen die Abhängigkeit der Ausbeute an transfizierten Zellen von dem Anteil der Zellen in der S-Phase. Außerdem wird durch diese Ergebnisse bestätigt, dass die Verwendung von primären Fibroblasten mit einer geringen Anzahl von Passagen zu einer höheren Transfektionseffizienz führt. Des Weiteren ist festzustellen, dass die Ausbeute letztlich von der Proliferation der Zellen abhängig ist. Bei dem bisher höchsten Anteil der Zellen in S-Phase (bis 70%) wurde die höchste Ausbeute erzielt, mit Werten von 20.6% bis 61.2%.

Noch deutlicher wird die Rolle der Proliferation, wenn die Ausbeute auf die eingesetzte Zellzahl bezogen wird: hier wurden dann Werte bis 228% erzielt.

Zu den Versuchsreihen 1 und 3 wurden parallel analoge Experimente mit Elektroporationsparametern von 5 kV/cm, 100 μ s durchgeführt. Die Ergebnisse sind in folgendem Diagramm zusammengefasst.

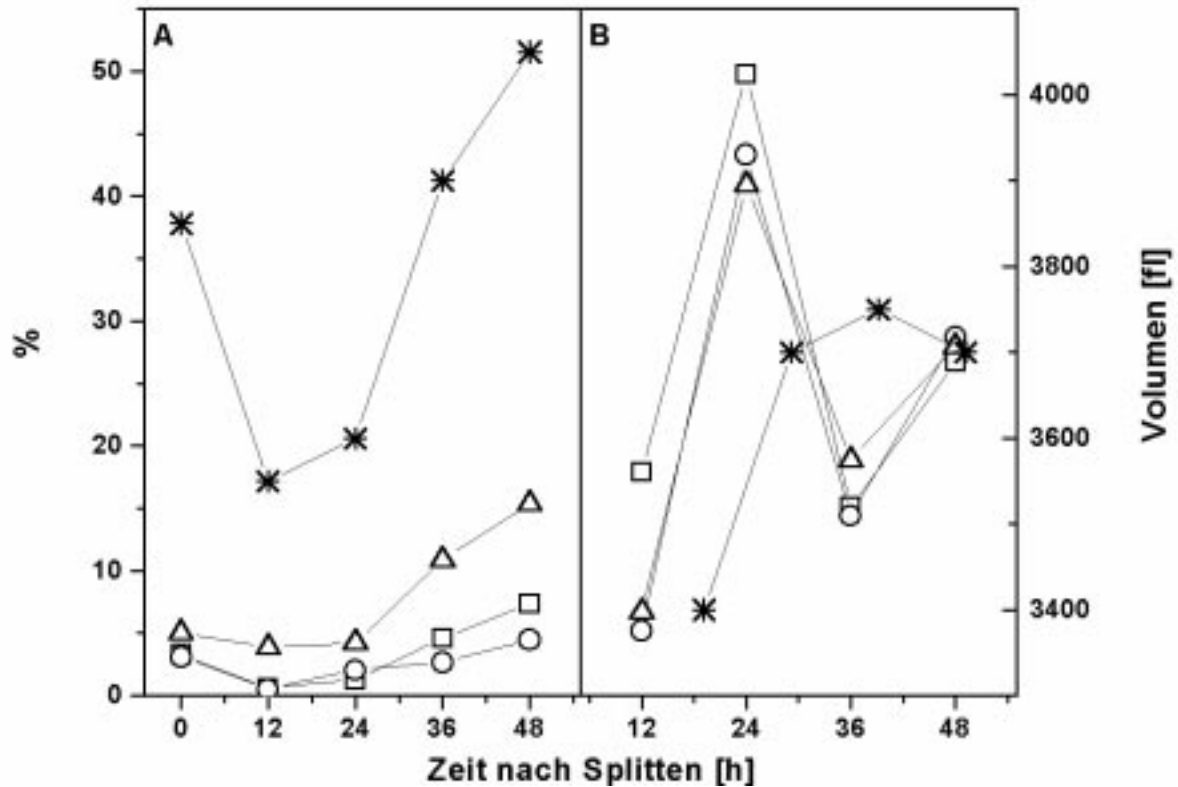


Abbildung 38: Effizienz der Elektrotransfektion (im Abstand von 12 Stunden) primärer Fibroblasten bei 4 kV/cm (Quadrat), 5 kV/cm (Kreis) je 100 μ s, Anteil der Zellen in S-Phase (Dreieck) sowie mittleres Zellvolumen (Stern). Die Zellen haben eine hohe (A) bzw. geringe (B) Anzahl von Passagen und wurden nach der Elektrotransfektion in McCoys-Medium mit 10% FCS kultiviert.

Entsprechend den Diagrammen 34 und 36 sind hier der Anteil der Zellen in S-Phase sowie die Ausbeute der Elektrotransfektion abgebildet, letztere bezogen auf die eingesetzte Zellzahl. Neben den schon erwähnten Daten werden hier die Effizienz der Transfektion auch bei einem anderen Parameter (5 kV/cm, 100 μ s) und das Volumen der Zellen nach dem Ablösen aus der Kulturflasche gezeigt.

Alle vier Kurven zeigen einen ähnlichen Verlauf. Das mittlere Zellvolumen einer Population ändert sich entsprechend dem Anteil der Zellen in S-Phase. Obwohl das Zellvolumen in A und B in einer vergleichbaren Größenordnung liegt, ist ein deutlicher Unterschied in der Ausbeute festzustellen.

Bei anderen Experimentreihen wurde auch das mittlere Zellvolumen nach der Entnahme aus der Kultur bestimmt. Die Ergebnisse sind in folgender Abbildung zusammengefasst.

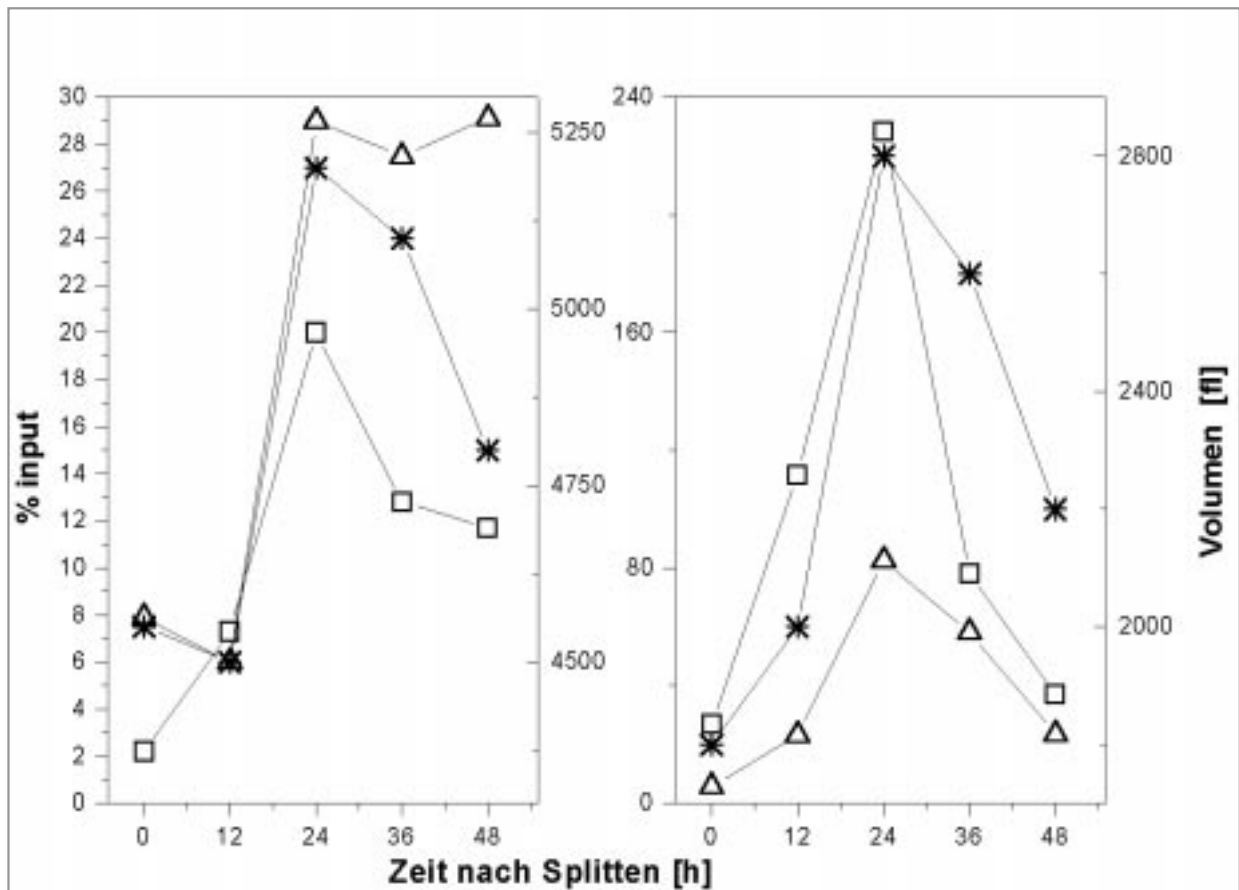


Abbildung 39: Effizienz der Elektrotransfektion (im Abstand von 12 Stunden) primärer Fibroblasten bei 4 kV/cm, 100 μ s (Quadrat), Anteil der Zellen in S-Phase (Dreiecke) sowie mittleres Zellvolumen (Stern). Die Zellen haben eine hohe (A) bzw. geringe (B) Anzahl von Passagen und wurden nach der Elektrotransfektion in McCoys-Medium mit 10% FCS kultiviert.

Auch in Abb. 39 ist ein ähnlicher Kurvenverlauf wie in Abb. 38 zu beobachten. Auffallend ist hier große Unterschied in der Effizienz der Elektrotransfektion. Außerdem ist das mittlere Zellvolumen der oft passagierten Zellen (A) fast doppelt so groß wie das jener, mit einer geringen Anzahl von Passagen.

4.6.2. Primäre Stammzellen

Bei den primären Stammzellen (ES) wurde analog zu den primären Fibroblasten der Zusammenhang zwischen Transfektionseffizienz und Zellzyklus untersucht. Die Ergebnisse einiger Experimente sind in folgendem Diagramm zusammengefasst.

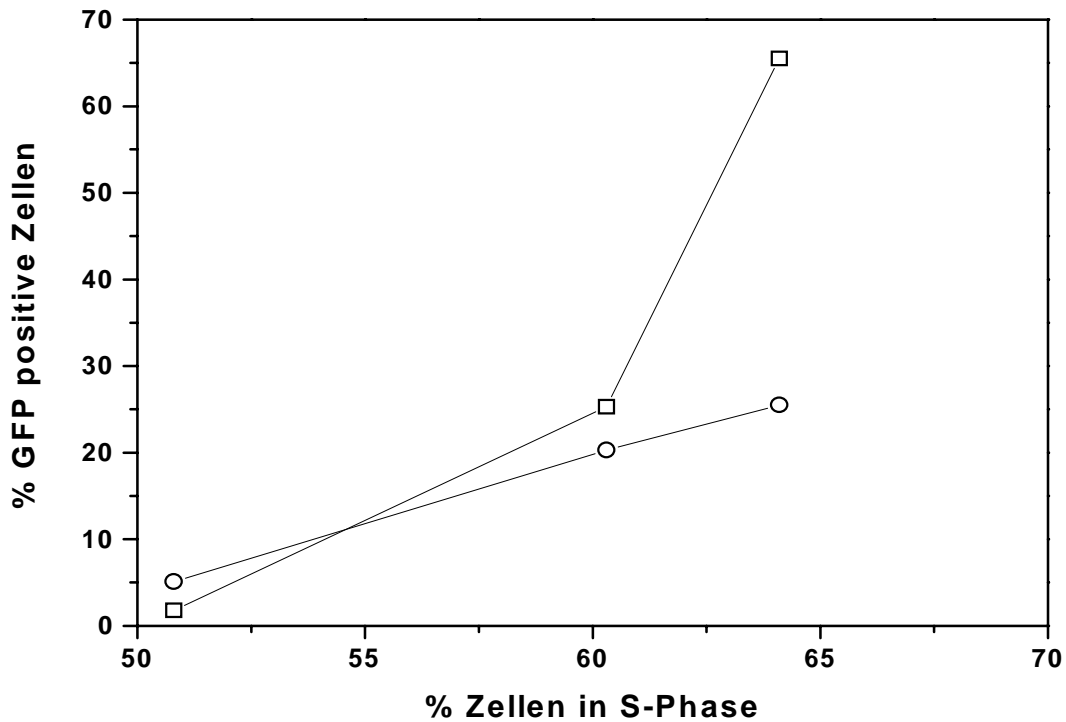


Abbildung 40: Abhängigkeit der Transfektionseffizienz vom Anteil der Zellen in S-Phase. Die Elektrotransfektion der ES-Zellen erfolgte bei 22°C, 1 kV/cm, 70 µs. Die Auswertung erfolgte nach input (Quadrate) und FACS (Dreiecke).

Aus Abb. 40 wird deutlich, dass auch bei den primären Stammzellen eine Proportionalität zwischen dem Anteil der Zellen in S-Phase und der Transfektionseffizienz besteht. Die Unterschiede in der Ausbeute sind allerdings extrem hoch, zwischen 2% und 65%, während der Anteil der Zellen in der S-Phase nur zwischen 51% und 64% variiert. Die Zellen mit nur 51% S-Phase stammen wahrscheinlich aus einer Präparation mit vielen Passagen.

4.6.3. L929

Um die Abhängigkeit der Elektrotansfektionseffizienz vom Zellzyklus zu untersuchen, wurden die L929-Zellen wie unter 3.7. beschrieben, vorbereitet. Nach dem Block der Zellen durch Serumentzug wurden sie wieder mit normaler Serumkonzentration kultiviert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Mediumwechsel entsprechend dem Standardprotokoll (2 kV/cm, 100 μ s, bei 22°C) transfiziert.

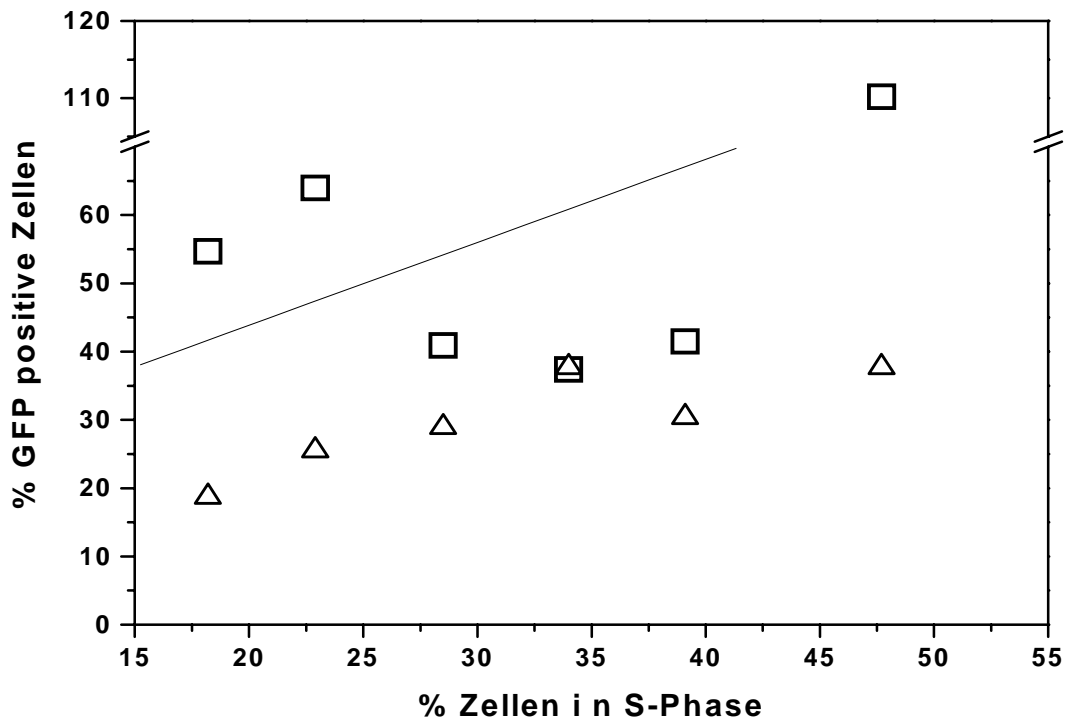


Abbildung 41: Abhängigkeit der Transfektionseffizienz vom Anteil der Zellen in S-Phase mit linearem Fit. Die Elektrotansfektion der L929-Zellen erfolgte bei 22°C, 2 kV/cm, 100 μ s. Die Auswertung erfolgte nach input (Quadrate) und FACS (Dreiecke).

Das Diagramm in Abb. 41 zeigt die Abhängigkeit der Transfektionseffizienz vom Anteil der Zellen in S-Phase. Dabei ist zu beobachten, dass die Ausbeute an GFP-positiven Zellen proportional zum Anteil der Zellen in der S-Phase steigt. Diese Proportionalität ist in der Auswertung nach FACS eindeutig. In der Auswertung nach input sind aufgrund der unterschiedlichen Vermehrung der Zellen die Schwankungen größer, wie jedoch ein linearer Fit (Gerade in Abb. 41) zeigt, ist der Trend derselbe.

4.7. Gentransfer durch künstliche Chromosomen (MACs)

4.7.1. Transfer von chromosomaler DNA in L929-Zellen

Für den Gentransfer mittels künstlicher Chromosomen (MACs) durch Elektroporation in L929-Zellen wurden Vorexperimente durchgeführt, um die optimalen Bedingungen zu bestimmen. Anders als bei der Transfektion der Zellen mit dem Plasmid pEGFP mit einer Größe von 4.7 kb, handelt es sich bei den künstlichen Chromosomen um Partikel in der Größe von 200-250 mb.

Um die optimalen Bedingungen für den Transfer zu finden, wurden die Experimente mit allen Chromosomen (künstliche und natürliche) einer Präparation durchgeführt. Dazu wurden die Chromosomen mit 2 μ M FITC angefärbt (wie in 3.12. beschrieben).

In ersten Versuchen wurden die Chromosomen in Porationspuffer resuspendiert, analog zu der Transfektion mit Plasmid, und vor der Elektroporation zu den vorbereiteten L929-Zellen (siehe 3.7.) pipettiert. Dabei wurde beobachtet, dass die Chromosomen in dem Porationspuffer zusammen kleben. Deshalb wurden die Chromosomen in den anschließenden Experimenten in Acetatpuffer resuspendiert und erst nach der Elektroporation der Zellen hinzugefügt.

Es wurden Elektroporationsexperimente in verschiedenen Medien, bei 22°C und bei 4°C und mit unterschiedlichen Pulsparametern (siehe 3.12.) durchgeführt. Anschließend wurde die Chromosomensuspension zupipettiert und die Proben wurden entweder bei 22°C, bzw. auf Eis inkubiert, oder abzentrifugiert und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen in CGM kultiviert. Die Auswertung erfolgte nach Zugabe von Propidiumiodid am Fluoreszenzmikroskop (siehe 3.12.).

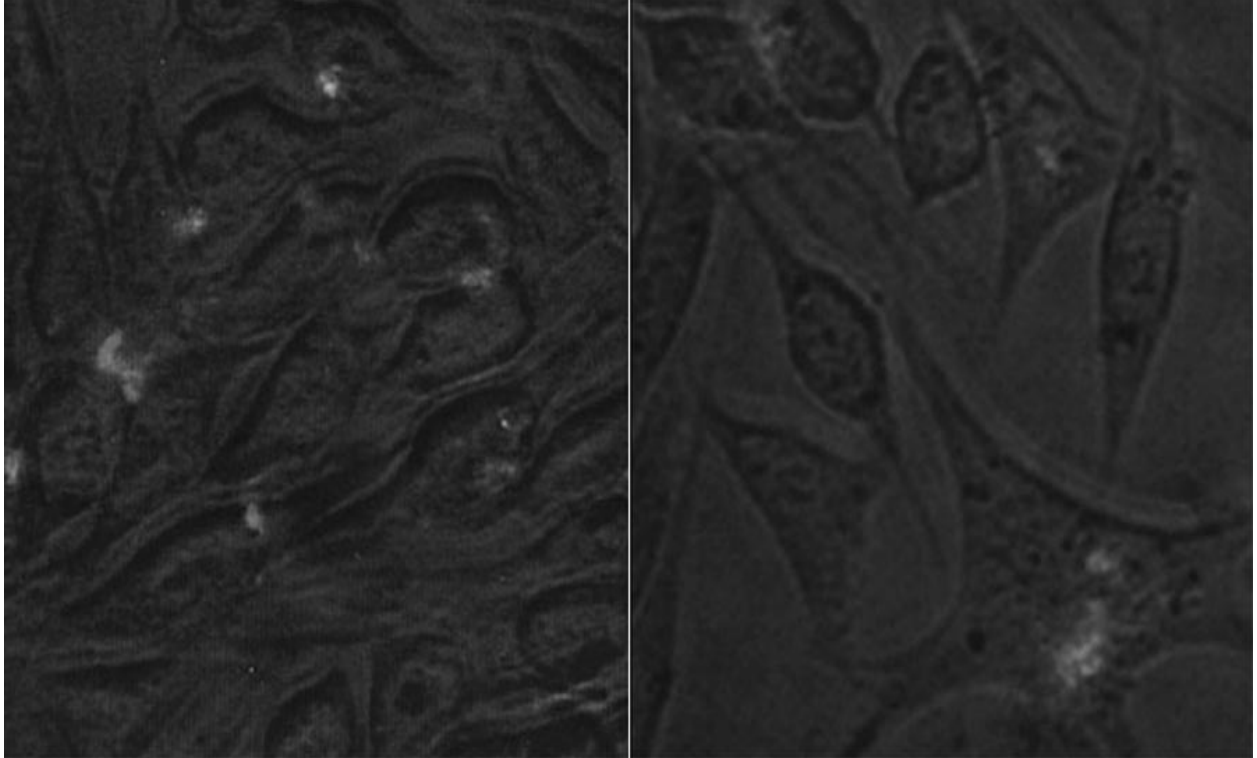


Abbildung 42: Mikroskopische Aufnahme von L929-Zellen, 48 Stunden nach der durch Elektroporation (2 kV/cm, 40 μ s, bei 4°C) induzierten Aufnahme von FITC-gefärbten Partikeln (grün) mit 25 μ g/ml PI im Außenmedium (genaue Behandlung der Zellen siehe Text). Bilder digital bearbeitet.

Entsprechend der Auswertungskriterien, Anzahl der Zellen mit intrazellulären, FITC-gefärbten Partikeln und Gesamtzahl an lebenden Zellen nach 48 Stunden in Kultur, erwies sich folgendes Protokoll als optimal:

1. Elektroporation der L929-Zellen ($1 \cdot 10^6$ Zellen/ml in Porationspuffer (isoosmolal, 30 mM KCl) bei 4°C, mit 2 kV/cm, 40 μ s
2. Zugabe von FITC-gefärbten Chromosomen in Acetatpuffer (Verhältnis Chromosomen : Zellen von 10 : 1)
3. Zentrifugieren bei 4°C, 3 Minuten, 250 g
4. Inkubation im Brutschrank bei 37°C für 30 Minuten
5. Waschen der Zellen und Aufnahme in CGM für weitere Kultur

Das Ergebnis dieses Verfahrens ist in Abb. 42 dargestellt. Man kann deutlich grün fluoreszierende, FITC-markierte Proteine und rot fluoreszierende, PI-markierte DNA erkennen. Da sich Propidiumiodid im Außenmedium befindet, ist die PI-markierte DNA extrazellulär. Sollte es sich bei den FITC-gefärbten Partikeln um Chromosomen handeln, so besitzen sie auch einen DNA-Anteil und müssen deshalb intrazellulär sein, da sie PI negativ sind.

Um diese Problematik genauer zu untersuchen, wurden weitere Experimente durchgeführt mit gleicher Behandlung der Zellen, aber zusätzlichem Anfärben der intrazellulären DNA.

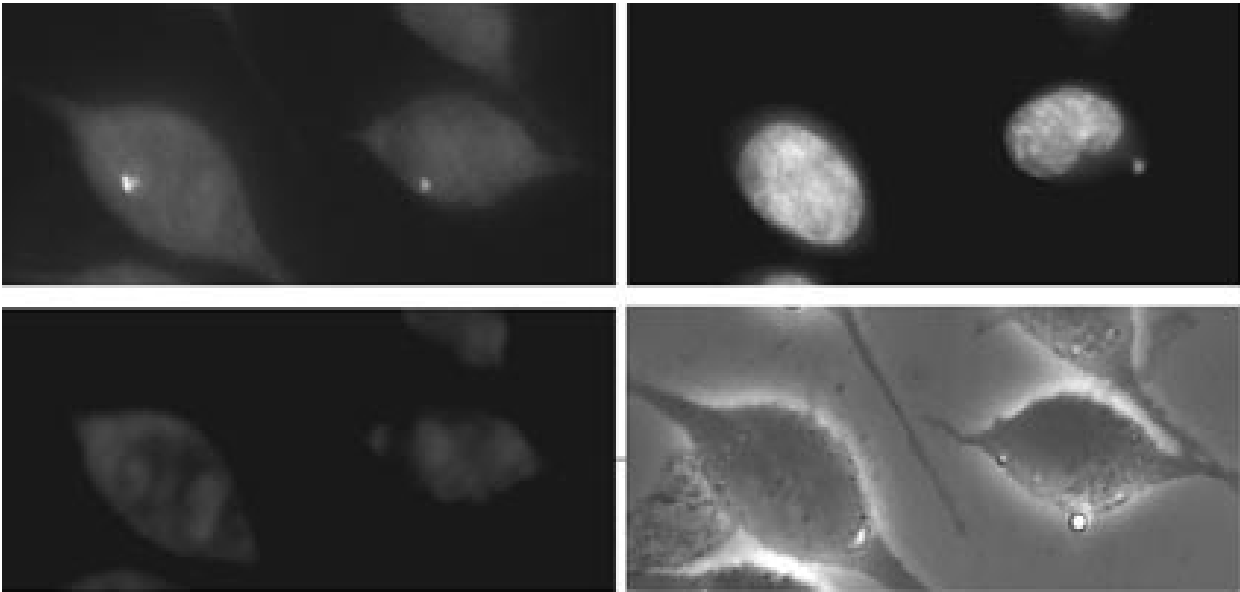


Abbildung 43: Mikroskopische Aufnahme von L929-Zellen, 48 Stunden nach der durch Elektroporation (2 kV/cm, 40 μ s, bei 4°C) induzierten Aufnahme von chromosomaler DNA (genaue Behandlung der Zellen siehe Text). A: Aufnahme mit Filter (340-380 nm) für FITC. B: Aufnahme mit Filter (450-490 nm) für Hoechst 33258. C: Aufnahme mit Filter (515-560 nm) für PI. D: Aufnahme mit Phasenkontrast. Bilder digital bearbeitet.

Die Zellen wurden entsprechend dem oben aufgeführten Protokoll behandelt und 24 Stunden später auf Objektträger umgesetzt. Weitere 24 Stunden später wurden sie gemäß 3.12. mit Propidiumiodid und Hoechst 33258 behandelt.

Die Aufnahme A in Abb. 43 zeigt FITC-markierte Proteine. Aufnahme B (Färbung der intrazellulären DNA mit Hoechst 33258) beweist, dass diese Partikel einen DNA-Anteil besitzen und sich wahrscheinlich im Bereich des Zellkerns befinden. Aus Aufnahme C wird deutlich, dass sich die gesamte DNA innerhalb der Zelle befindet, da sie PI-negativ ist. In der Phasenkontrastaufnahme D ist zu beobachten, dass es sich um “lebende, normale” Zellen handelt.

4.7.2. Sortieren von künstlichen Chromosomen (MACs)

Für den Gentransfer mittels künstlicher Chromosomen, mussten diese von den natürlichen isoliert werden. Das Sortieren der Chromosomen wurde nach Anfärben (siehe 3.12.) mit Hilfe eines FACS durchgeführt.

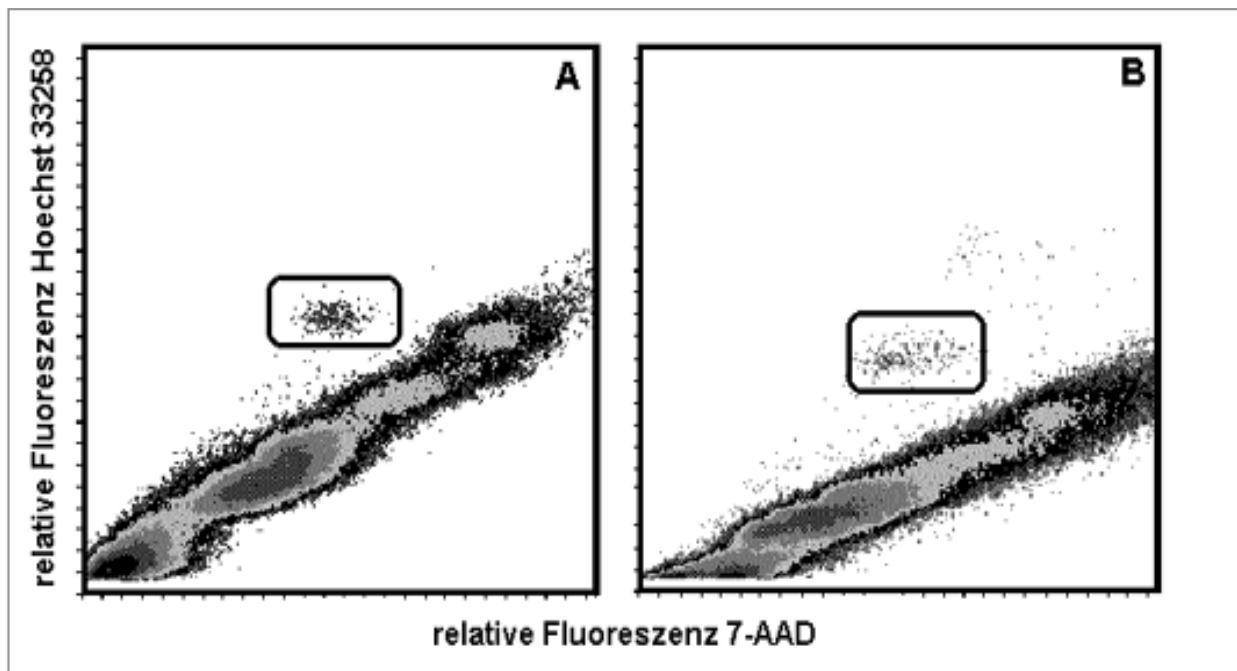


Abbildung 44: Darstellung der FACS-Analyse beim Sortieren von künstlichen Chromosomen (markierte Populationen) entsprechend ihrer Fluoreszenzintensität nach Färbung mit 7-AAD und Hoechst 33258. Abb. A: frisch isolierte Chromosomen. Abb. B: Chromosomen, die nach der Isolierung 10 Wochen bei -20°C gelagert wurden.

Vor dem Sortieren der Chromosomen wurden diese mit 7-AAD (für die GC-reichen Regionen) und Hoechst 33258 (für die AT-reichen Regionen) angefärbt. Da die künstlichen Chromosomen aufgrund ihres hohen Anteils an Maus-Satelliten-DNA einen hohen AT-Gehalt haben, können sie leicht von den natürlichen unterschieden werden, die einen annähernd gleichen AT- und GC-Gehalt haben. In Abb. 44 sind die künstlichen Chromosomen in den markierten Regionen dargestellt. In Abb. A ist das Sortieren von frisch isolierten Chromosomen dargestellt. Wie Abb. B zeigt, ist das Lagern von Chromosomen über 10 Wochen bei -20°C möglich, ohne Verluste in der Qualität beim Sortieren zu beobachten. Der Anteil der künstlichen Chromosomen beträgt ca. 0.5-1% der gesamten Chromosomenzahl.

4.7.3. Nachweis des Gentransfers durch künstliche Chromosomen

Die frisch sortierten künstlichen Chromosomen wurden entsprechend dem Protokoll von 4.7.1. in L929-Zellen eingebracht. Bei diesen Experimenten wurden die künstlichen Chromosomen in einem Verhältnis von 1 : 1 bezüglich der Zellen eingesetzt. Das Experiment wurde zwei mal durchgeführt. Zwei Tage nach der Elektroporation wurden die Zellen umgesetzt.

Als Kontrolle wurden die Experimente auch mit sortierten, natürlichen Chromosomen durchgeführt.

Ein Teil der Zellen wurde weiter in CGM kultiviert und mit Hygromycin B selektiert. Die Selektion wurde über 4 Monate fortgeführt. Die L929-Zellen, in welche die natürlichen Chromosomen eingeschleust wurden, starben nach 4-5 Tagen ab.

Mit dem anderen Teil, der Zellen wurde 48, 72, 96 Stunden nach der Elektroporation ein X-Gal-Test auf die Aktivität von β -Galaktosidase durchgeführt. Ein Maximum der Expression von β -Galaktosidase wurde 72 bzw. 96 Stunden nach der Elektroporation beobachtet. Pro Experiment wurden ca. 4-6 positive Zellen gezählt, was bei Einsatz von $1 \cdot 10^5$ Zellen eine Frequenz von ca. $5 \cdot 10^{-5}$ bedeutet.

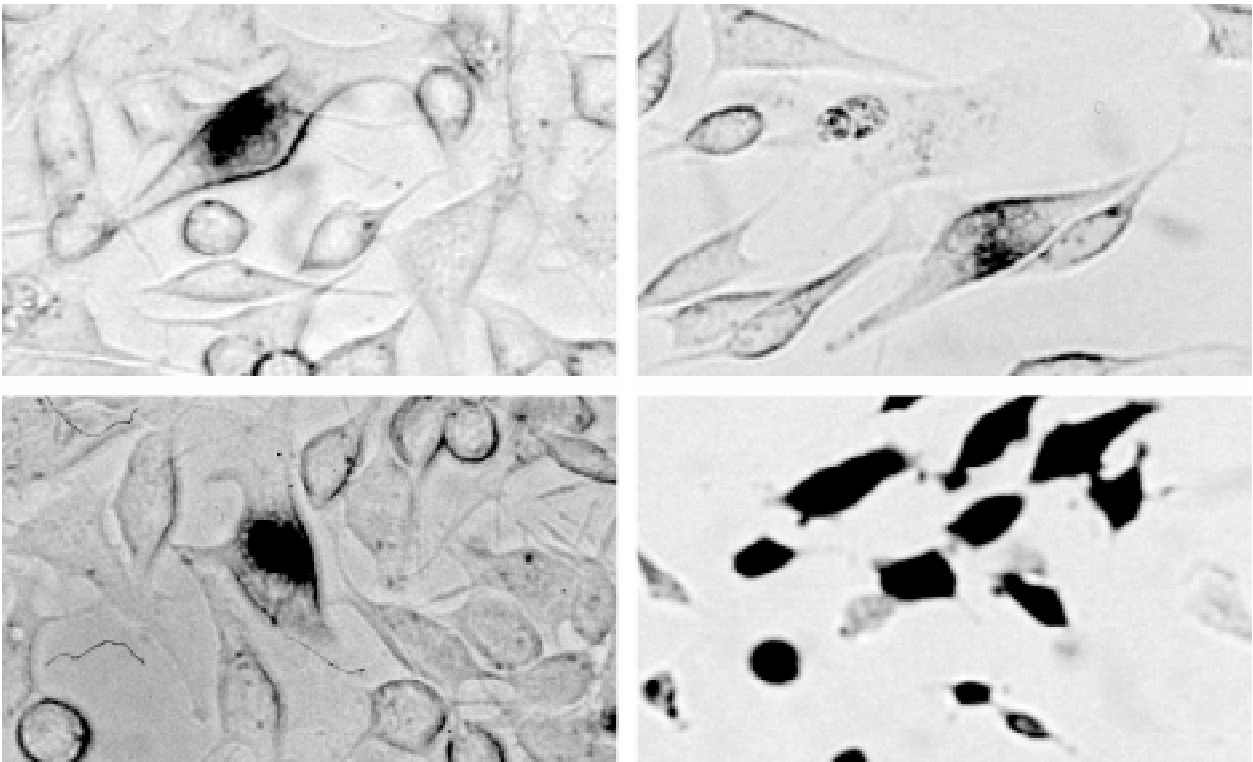


Abbildung 45: Mikroskopische Aufnahme von L929-Zellen (A, B, C) und 1B3-Zellen (D) nach X-Gal-Test, 72 Stunden nach der Elektroporation. Bilder digital bearbeitet.

In Abb. 45 ist das Ergebnis des X-Gal-Tests dargestellt. Als Positivkontrolle wurden 1D3-Zellen (aus denen die künstlichen Chromosomen stammen) und als Negativkontrolle wurden L929-Zelle verwendet, in welche die natürlichen Chromosomen eingeschleust wurden. Die Positivkontrolle (Abb. D) zeigt, dass fast alle Zellen (schwarz) β -Galaktosidase exprimieren. Bei der Negativkontrolle war keine Expression von β -Galaktosidase zu beobachten (deshalb nicht abgebildet). Die Zellen, in die künstliche Chromosomen eingeschleust wurden, exprimieren vereinzelt β -Galaktosidase, wie die schwarzen Zellen in Abb. A, B, C zeigen.

4.8. Zellkonzentrierung in Suspension

4.8.1. Optimierung der elektrischen Parameter

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass die schonende Vorbereitung der Zellen für die Elektroporation entscheidend für das Erzielen einer hohen Transfektionseffizienz ist. Um einerseits den Verlust von Zellen zu verhindern und andererseits die Transfektion kleiner Zellzahlen zu ermöglichen, wurde eine Apparatur entwickelt die diese Voraussetzungen erfüllen kann.

Erste Experimente, um das Verhalten von Zellen in leitenden Medien unter Wirkung eines elektrischen Wechselfeldes zu untersuchen, wurden mit Erythrocyten (ca. $1 \cdot 10^6$ pro Milliliter in PBS mit 1% FCS) in Zweidrahtkammern durchgeführt. Bei konstanter Amplitude von ca. 200 V/cm wurde die Frequenz von 0 bis 5 MHz variiert.

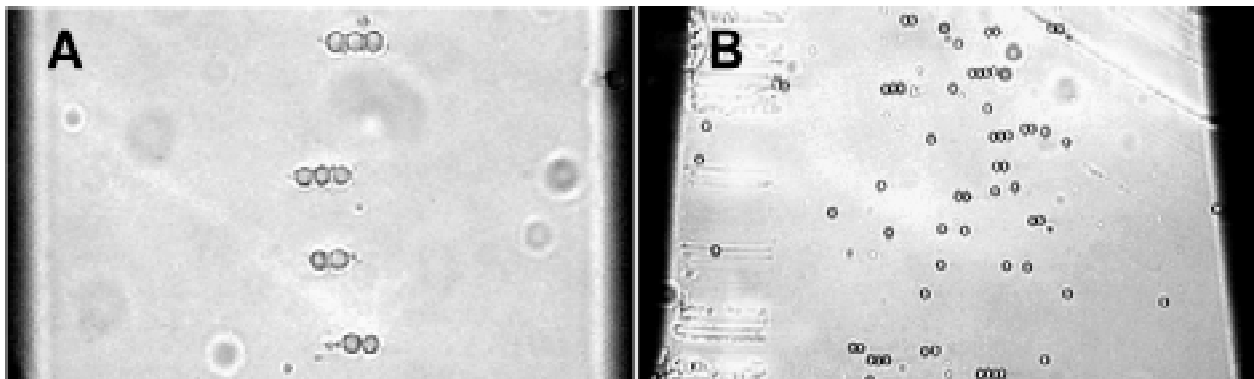


Abbildung 46: Mikroskopische Aufnahme von Erythrocyten in PBS (1% FCS) in der Zweidrahtkammer (Elektroden am linken und rechten Rand des Bildes) unter Einwirkung eines elektrischen Wechselfeldes von 1.5 MHz und ca. 200 V/cm. In Abb. A wurde eine Zweidrahtkammer mit parallelen Elektroden, in Abb. B eine Zweidrahtkammer mit Elektroden in Winkel von ca. 30° verwendet. (Aufnahme digital bearbeitet)

Das Verhalten der Zellen wurden unter dem Mikroskop untersucht. Wie Abb. 46 A zeigt, tritt (bei konstanter Amplitude) in leitenden Medien wie PBS im Bereich von 1.5-2 MHz negative Dielektrophorese auf. Die Zellen befinden sich in der Mitte zwischen den Elektroden (dem Bereich der kleinsten Felddichte) und bilden Perlenketten. Das gleiche Ergebnis ist in Abb. 46 B zu beobachten. Gleichzeitig wird deutlich, dass die dielektrophoretische Kraft (die aufgrund des Feldgradienten zwischen der Spitze und der offenen Seite des Winkels wirkt) nicht ausreicht, um die Zellen von der Winkelspitze zu entfernen. Es wurden Versuche durchgeführt mit Zweidrahtkammern mit Elektroden im Winkel zwischen 15° und 60° . Dabei wurde kein Unterschied beobachtet zu den Ergebnissen, die in Abb. 46 B dargestellt sind.

In weiteren Versuchen bei konstanter Frequenz wurde die Stärke des elektrischen Wechselfeldes variiert. Da die Experimente auf das Absaugen des Mediums hinzielen, wurde dazu die in Abbildung 47 beschriebene Konstruktion benutzt. Zum einen besitzt sie andere geometrische Eigenschaften als die Zweidrahtkammer, zum anderen ermöglicht sie ein manuelles Absaugen durch die Kanüle.

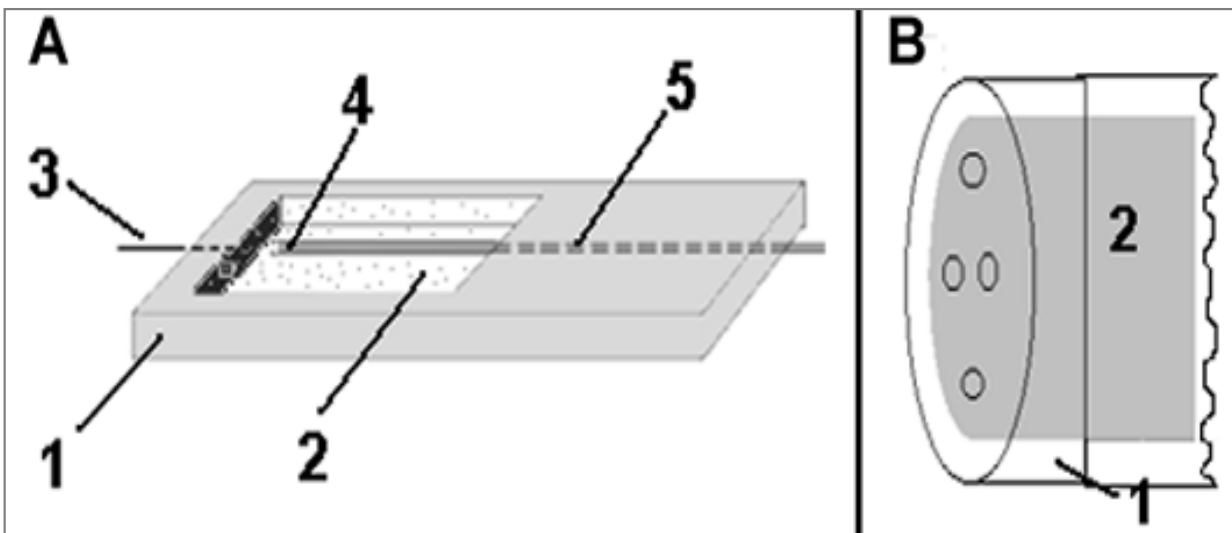


Abbildung 47: Schematische Darstellung (kein Maßstab) der Konstruktionen zur mikroskopischen Beobachtung der negativen Dielektrophorese in leitenden Medien.

A:

- 1 - Objektträger mit Gehäuse aus PE
- 2 - Probenraum
- 3 - ebene Elektrode, Edelstahlplatte mit Kontaktierung
- 4 - Kanülenspitze mit Isolierung
- 5 Kanüle

B: Vergrößerung von A4

- 1 - Isolierung mit 4 Bohrungen a 200 μm
- 2 Kanüle

Die in Abb. 47 beschriebene Konstruktion wurde entwickelt um den Absaugvorgang unter dem Mikroskop zu beobachten. Die Kanüle (4) dient gleichzeitig zum Absaugen und als Elektrode. Um ein stark inhomogenes elektrisches Feld zu erzeugen, wurde als Gegen-elektrode eine Edelstahlplatte verwendet. Erste Versuche zeigten, dass durch die Kanüle (mit einem Innendurchmesser von ca. 1mm) die ganze Zellsuspension abgesaugt wird, also keine Abtrennung des Mediums möglich ist. Außerdem wurden entlang der Kanüle starke, chaotische Strömungen beobachtet. Diese sind auf das elektrische Feld entlang der Kanüle und die dadurch erzeugte Erwärmung des Mediums zurückzuführen. Deshalb wurden für die weiteren Experimente zwei Veränderungen vorgenommen: die Kanüle wurde mit einem Teflonschlauch isoliert und auf die Spitze der Kanüle wurde eine Isolierung mit 4 Bohrungen a 200 μm befestigt. Dadurch wurde gleichzeitig ein elektrisches Feld höherer Inhomogenität erzeugt.

Die Versuche wurden am Mikroskop beobachtet und auf Video aufgezeichnet. Momentaufnahmen aus einer solchen Videosequenz sind in folgender Abbildung dargestellt.

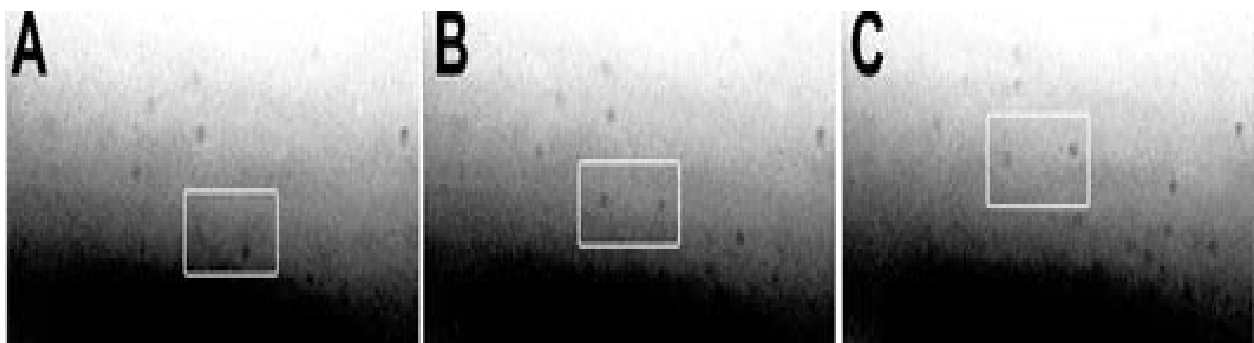


Abbildung 48: Mikroskopische Aufnahme von Erythrocyten in PBS (1% FCS) in einer Absaugkonstruktion (Abb. 47 B) unter Einwirkung eines elektrischen Wechselfeldes von 1.5 MHz und ca. 400 V/cm. Die Elektroden befinden sich am unteren Rand (Kanüle aus Abb. 47 B) und die Gegenelektrode oberhalb (Edelstahlplatte aus Abb. 47 A, nicht im Bild). Bilder A bis C sind in chronologischer Reihenfolge. (Aufnahme digital bearbeitet)

Die Experimente haben gezeigt, dass auch in dieser Konstruktion negative Dielektrophorese bei ca. 1.5 MHz und 200 V/cm auftritt. Die Zellen werden von der Kanüle, genauer im Bereich der Bohrungen, abgestoßen. Bei einer Amplitude von 400 V/cm (obere Leistungsgrenze des Generators) bewegen sich die Zellen am schnellsten aus dem Bereich der Bohrungen. Die Aufnahmen in Abb. 48 zeigen, wie sich die Zellen im markierten Bereich von der Kanüle entfernen. Unter diesen Bedingungen war ein manuelles Absaugen des Mediums möglich, in dem deutlich weniger Zellen unter dem Mikroskop zu finden waren.

4.8.2. Entwicklung einer Absaugkonstruktion zur Zellkonzentration

Die mikroskopischen Experimente haben gezeigt, dass neben den Feldparametern die Absauggeschwindigkeit von entscheidender Bedeutung ist. In Anlehnung an diese Ergebnisse wurden für die weiteren Experimente folgende Konstruktionen verwendet:

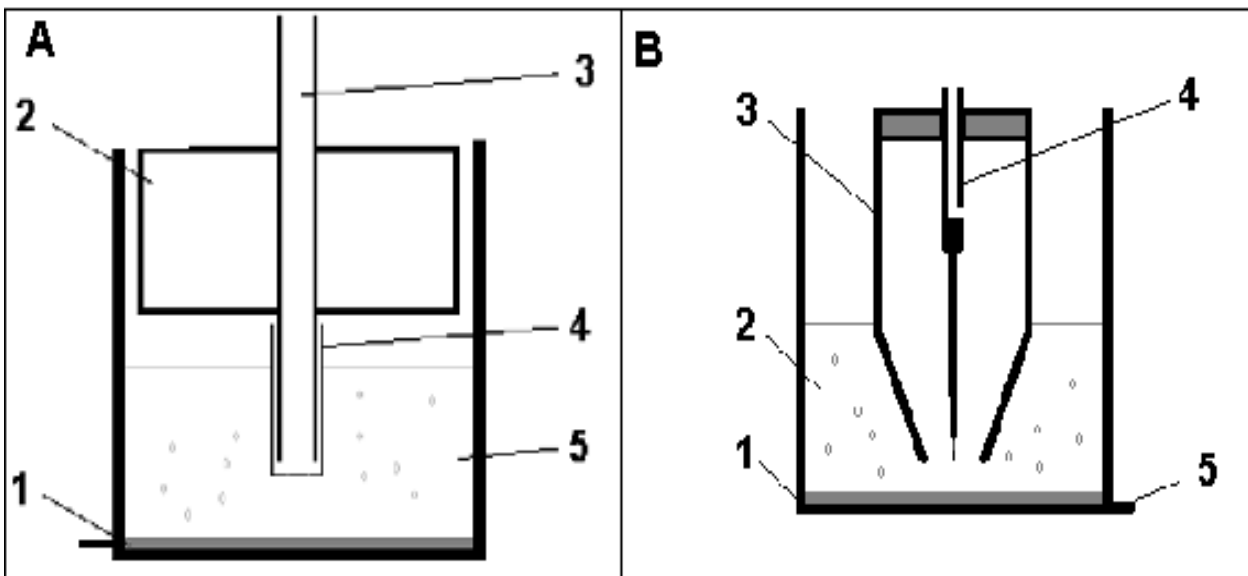


Abbildung 49: Schematische Darstellung (kein Maßstab) der Konstruktionen zur Zellkonzentrierung in leitenden Medien.

A:

- 1 - Behälter für Zellsuspension mit Edelstahlelektrode und Kontaktierung
- 2 - Halterung für Kanüle
- 3 - Kanüle
- 4 - Isolierung aus Abb. 47
- 5 Zellsuspension

B:

- 1 - Behälter für Zellsuspension mit Edelstahlelektrode
- 2 - Zellsuspension
- 3 - Pipettenspitze
- 4 - Elektrode mit Bohrung zum Absaugen
- 5 Kontaktierung der Gegenelektrode

Die in Abb. 49 A dargestellte Konstruktion ist analog zu jener in Abb. 47. Das Absaugen des Mediums erfolgt hier in vertikaler Richtung, so dass die Schwerkraft ausgenutzt werden kann.

Um bei allen Experimenten gleiche Bedingungen zu erreichen, erfolgte das Absaugen des Mediums über computergesteuerte Schrittmotoren. Die Steuerungsprogramme wurden am Lehrstuhl für Biotechnologie geschrieben. Die vollständige Apparaturen sind in folgender Abbildung dargestellt:

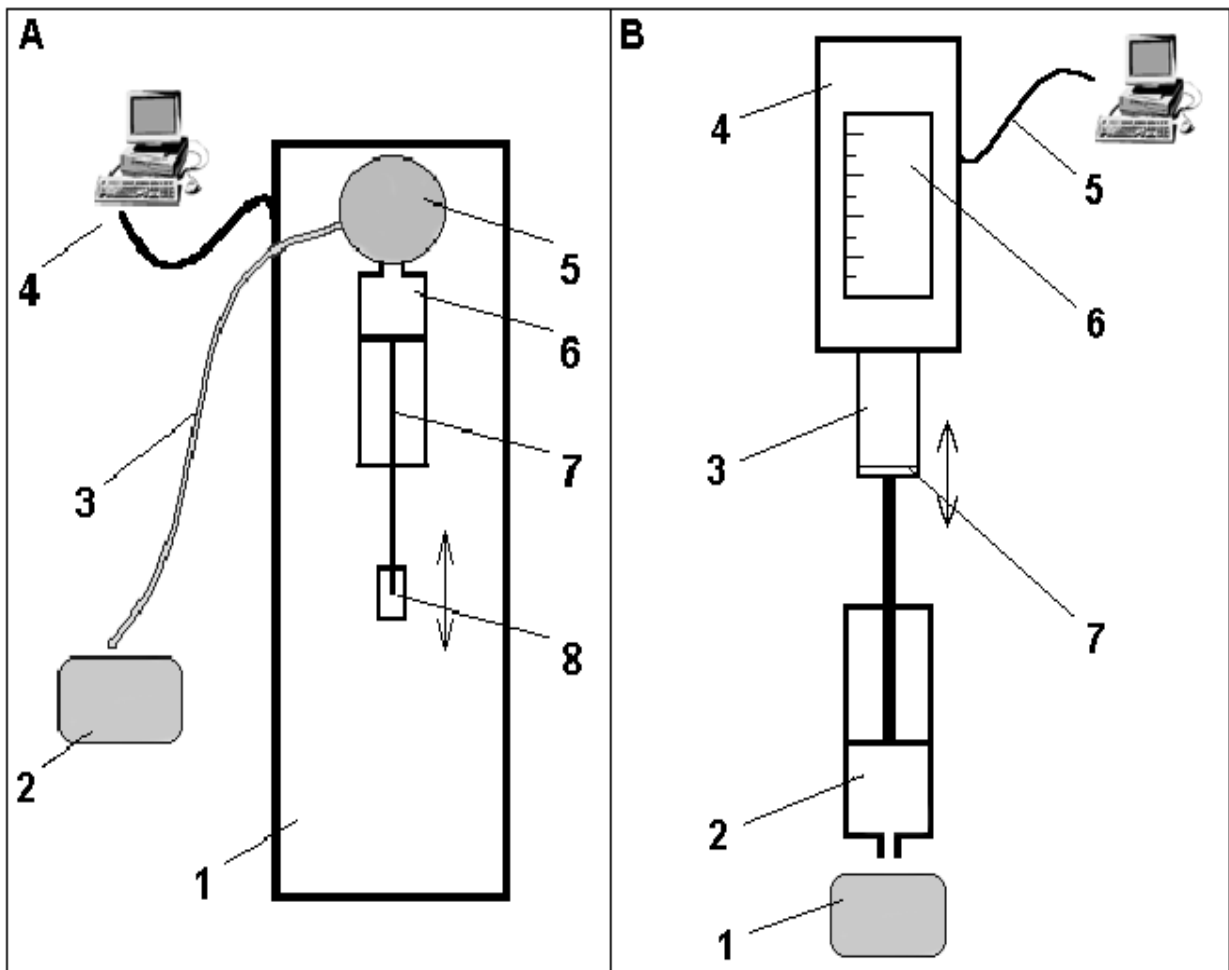


Abbildung 50: Schema der Absaugapparaturen zur Zellkonzentrierung (kein Maßstab).

A:

1. Dosierer Eppendorf
2. Absaugkonstruktion
3. Schlauch
4. Anschluss für Steuerung über PC
5. Ventil
6. Hamiltonspritze, 250 μl
7. Kolben der Spritze
8. Halterung für Kolben, beweglich zum Pumpen und Absaugen

B:

1. Absaugkonstruktion
2. Hamiltonspritze, 500 μl
3. Vorschub verbunden mit Kolben der Spritze (7)
4. Schrittmotor
5. Anschluss für Steuerung über PC
6. Mikrometerschraube
7. Kolben der Spritze an Vorschub befestigt

Für die im Folgenden beschriebenen Experimente wurde die Konstruktion aus Abb. 49 A benutzt. Diese wurde an Apparatur aus Abb. 50 A angeschlossen (2). Der Schrittmotor des Dosierers (1) bewegt computergesteuert den Kolben einer Hamiltonspritze (6). Der dadurch erzeugte Unterdruck wird über einen Schlauch (3) an die Konstruktion (2) weitergegeben.

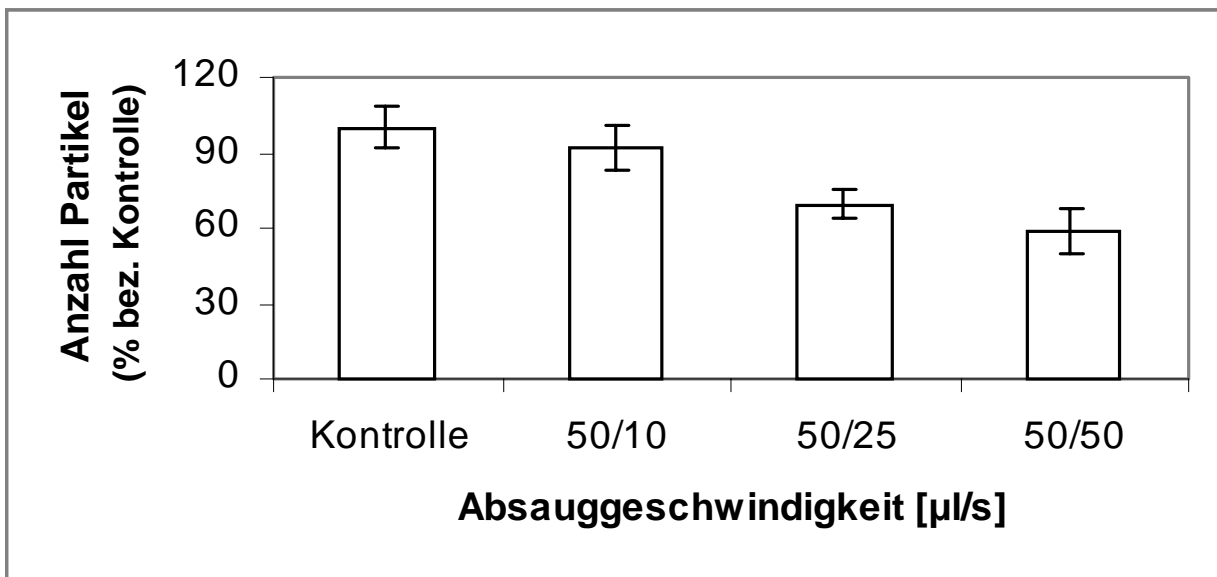


Abbildung 51: Einfluss der Absauggeschwindigkeit (Volumen [μl], abgesaugt in einem Schritt in der angegebenen Zeit [s]) auf die Effizienz der Auftrennung von verdünntem Blut (1:1000) bei einem angelegten Feld von 1.5 MHz und 400 V/cm.

Die Ergebnisse aus Abb. 51 zeigen, wie schon die mikroskopischen Beobachtungen, dass die Absauggeschwindigkeit eine große Rolle spielt. Die höchste Effizienz der Zellkonzentrierung werden bei dem kleinsten Volumenstrom gemessen, da hier die Anzahl der Partikel in der abgesaugten Suspension am kleinsten ist. Aus diesem Ergebnis wird deutlich, dass die Stömungsgeschwindigkeit zu groß ist und zu viele Partikel mit abgesaugt werden.

Deshalb wurde die Absaugkonstruktion aus Abb. 49 B entwickelt. Dazu wurde eine Pipettenspitze (3) verwendet mit einer Öffnung von ca. 400 μm im Durchmesser. Die gesamte Fläche der Öffnung durch die abgesaugt wird beträgt mit 0.1256 mm^2 genau so viel wie die Fläche der 4 Bohrungen zusammen. Die Stömungsgeschwindigkeit durch die einzelne Öffnung beträgt aber nur $\frac{1}{4}$ derer durch eine einzelne Bohrung mit 200 μm Durchmesser. Um trotz der größeren Öffnung die Zellen durch die dielektrophoretische Kraft zu entfernen, wurde die Elektrode in der Mitte der Öffnung gesetzt. Durch die Elektrodenform (4) (extrem spitz) wird eine hohe Inhomogenität des elektrischen Feldes erreicht.

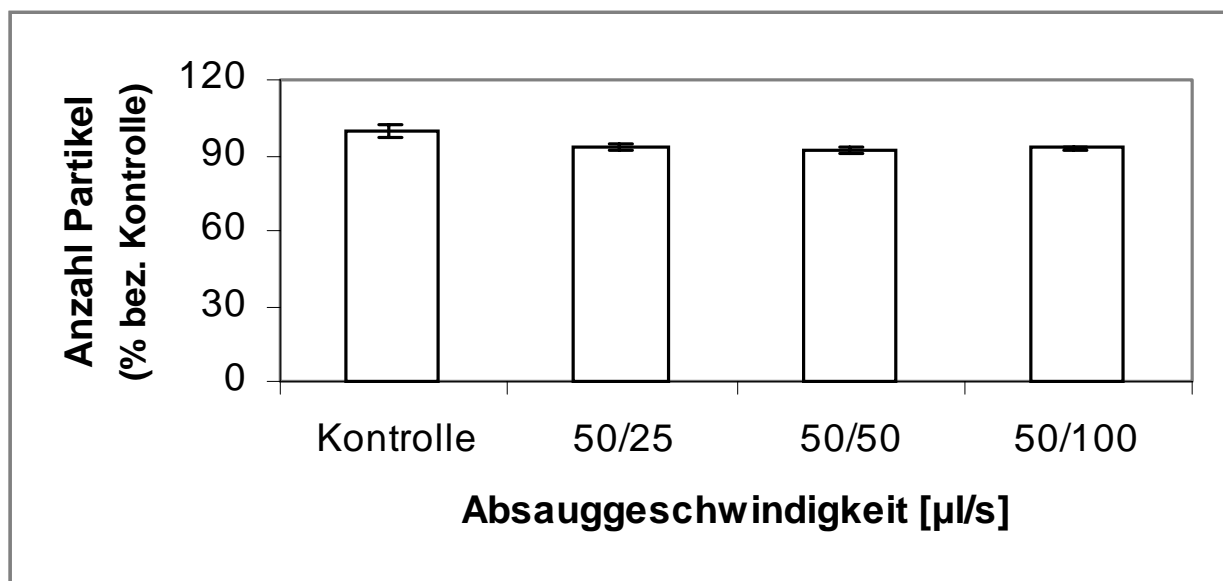


Abbildung 52: Einfluss der Absauggeschwindigkeit auf die Effizienz der Auftrennung von verdünntem Blut (1:1000) bei einem angelegten Feld von 1.5 MHz und 400 V/cm.

Die Ergebnisse aus Diagramm in Abb. 52 zeigen keine Abhängigkeit der Effizienz von der Absauggeschwindigkeit. Das bedeutet, dass zum einen die dielektrische Kraft nicht groß genug ist um die Partikel beim Absaugen abzustößen, zum anderen ist die Öffnung zu groß und es werden zu viele Partikel mitgerissen.

Deshalb wurde eine neue Konstruktion entwickelt die folgende Voraussetzungen erfüllt:
 kleine Öffnungen um ein sehr inhomogenes elektrische Feld zu erzeugen und gleichzeitig
 eine Vielzahl von Öffnungen um einen großen Volumenstrom mit kleiner Fließgeschwindigkeit
 zu ermöglichen. Diese Voraussetzungen wurden in folgender Konstruktion (Abb. 53) verwirklicht

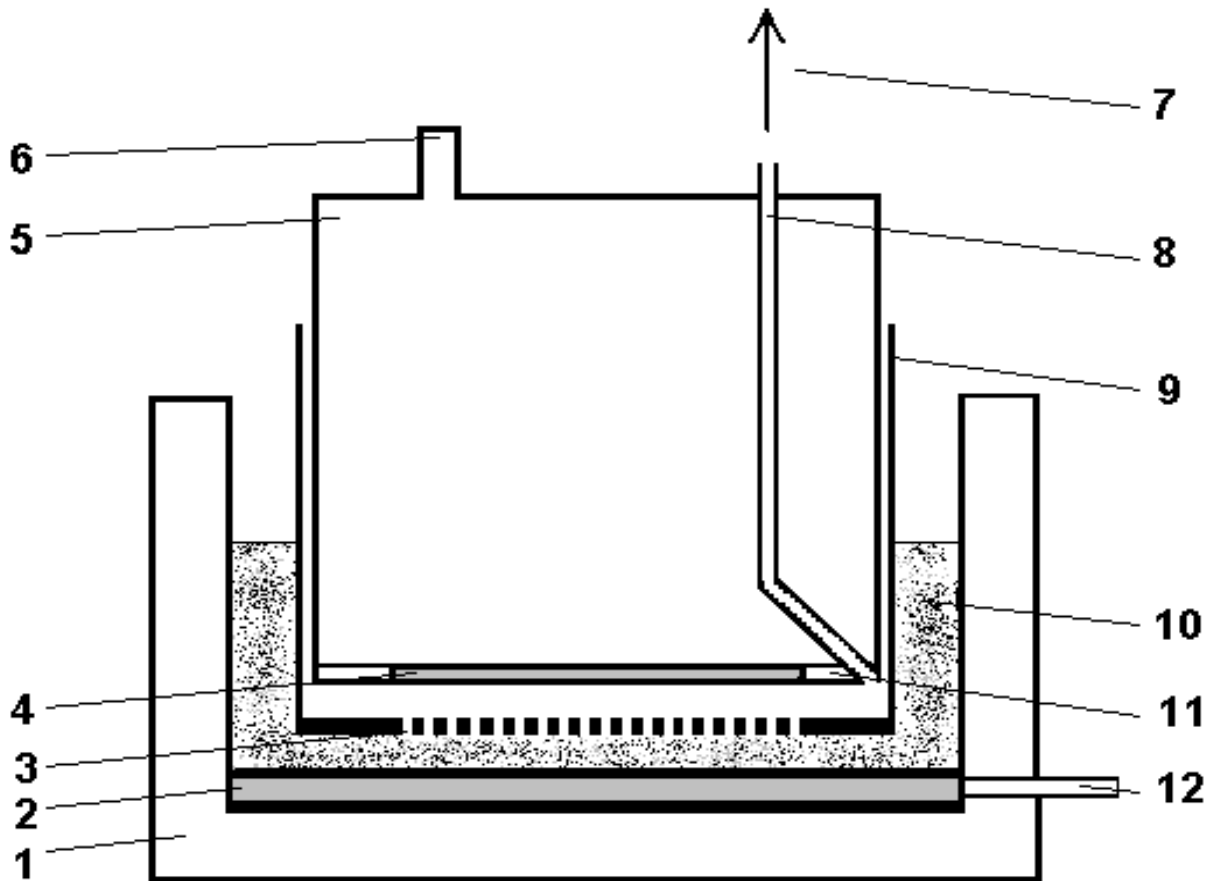


Abbildung 53: Absaugkonstruktion zur Auftrennung von Zellen und Medium (Schema, kein Maßstab)

- 1 - Behälter für Zellsuspension
- 2 - untere Platinelektrode
- 3 - Polycarbonatmembran mit 3 µm Poren, bzw. 8 µm Poren
- 4 - obere Platin-Elektrode, gelötet
- 5 - oberer Elektrodenblock aus Edelstahl
- 6 - Kontaktierung des oberen Elektrodenblocks (5)
- 7 - Ansaugen zum Dosierer mit Schrittmotor
- 8 - Ansaug-Bohrung durch oberen Elektrodenblock
- 9 - Zellkultureinsatz, Nunc, für 24 Well-Platte
- 10 - Zellsuspension
- 11 - Isolierung des oberen Edelstahlblocks, PE
- 12 - Kontaktierung der unteren Elektrode

In dieser Konstruktion wurde ein oberer Elektrodenblock (5) aus Edelstahl verwendet. Als Isolierung und zur Erzeugung eines inhomogenen elektrischen Feldes wurde ein Zellkultureinsatz (9) der Firma Nunc verwendet. Dieser besitzt eine Polycarbonatmembran mit ca $1 \cdot 10^6$ Poren mit einem Durchmesser von ca. $3 \mu\text{m}$. Dadurch wird das Medium durch eine Gesamtfläche von ca. 6.6mm^2 abgesaugt.

Erste Experimente haben jedoch gezeigt, dass aufgrund der großen Elektrodenflächen und der Leitfähigkeit des Mediums Elektrolyse auftritt. Diese führte zu extremer Erwärmung des Mediums und zur Zerstörung der Zellen. Außerdem wurden dadurch auch die Elektroden beschädigt. Deshalb wurden Platinscheiben auf die Elektroden gelötet. Dadurch konnte die Elektrolyse unterdrückt werden.

Außerdem wurde durch eine neue Computersteuerung ein Absaugen des Mediums in sehr kleinen Schritten ermöglicht.

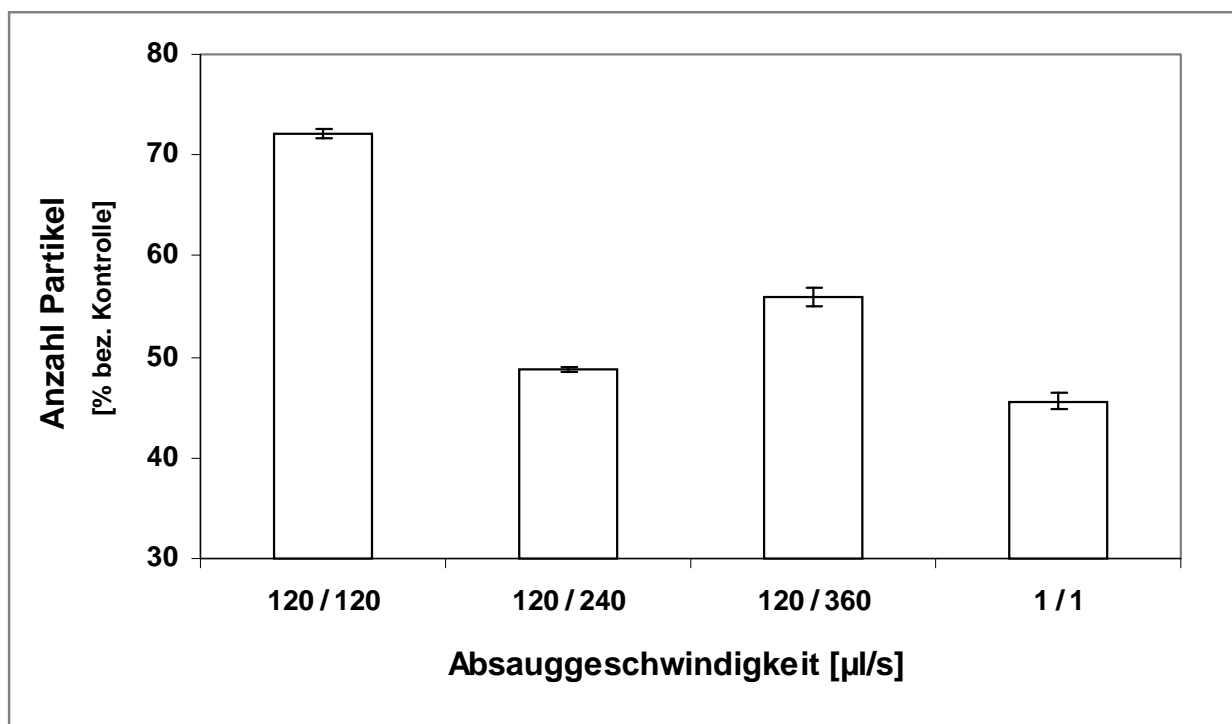


Abbildung 54: Einfluss der Absauggeschwindigkeit auf die Effizienz der Auftrennung von verdünntem Blut (1:1000) bei einem angelegten Feld von 1.5 MHz und 400 V/cm.

Die Experimente zeigen, dass mit dieser Konstruktion eine höhere Effizienz erreicht wird. Die optimale Absauggeschwindigkeit liegt bei $1 \mu\text{l}$ in 1 Sekunde mit einem Intervall von 1 s zwischen den einzelnen Schritten (im Diagramm mit 1 / 1 bezeichnet). Obwohl bei den Parametern $120 \mu\text{l} / 120 \text{s}$ und $120 \mu\text{l} / 240 \text{s}$ die Absauggeschwindigkeit gleich, bzw. doppelt so langsam ist, wird nicht die gleiche Effizienz erreicht. Bei dem Parameter von $120 \mu\text{l} / 360 \text{s}$ ist die Geschwindigkeit sogar noch kleiner, die Effizienz aber kleiner als bei dem "gepulsten Absaugen".

4.8.3. Einfluss der Teilchendichte auf die Effizienz der Auftrennung

In weiteren Experimenten wurde versucht, die Effizienz zu steigern. Deshalb wurde das abgesaugte Medium in einem zweiten Durchgang weiter aufgetrennt. Außerdem wurde der Einfluss der Teilchendichte auf die Auftrennung von Zellen und Medium untersucht. Für diese Experimente wurde verdünntes Blut 1:1000; 1:1 bzw. Vollblut mit der in Abb. 50 B beschriebenen Apparatur der Zellkonzentration unterzogen.

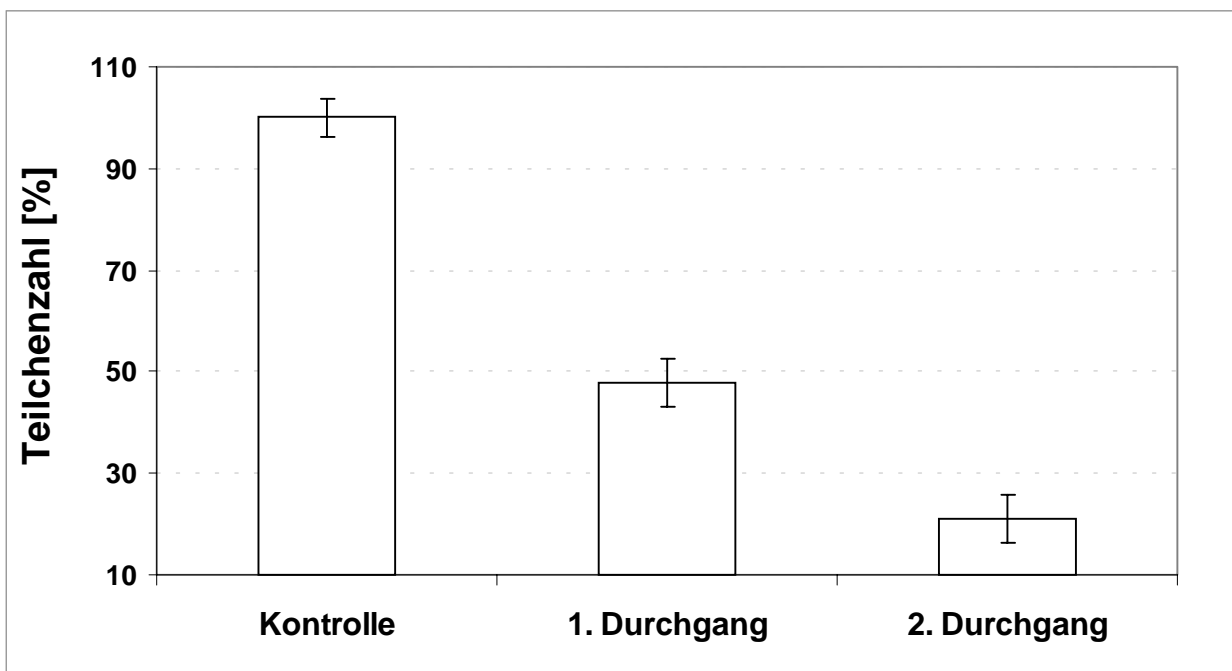


Abbildung 55: Darstellung der Zellzahl bei der Auftrennung von verdünntem Blut (ca. 1:1000) in Prozent bezüglich der Ausgangssuspension, die mit 100% gleich gesetzt wurde. Das Absaugen erfolgte in Schritten von $1\mu\text{l/s}$ mit einem Intervall von je 1 s bei einem Feld von 1.5 MHz und ca. 400 V/cm (Mittelwerte aus 9 Messungen mit Standardfehler).

Das Diagramm in Abb. 55 zeigt die Effizienz der Auftrennung (Teilchenkonzentration in der abgesaugten Lösung) von verdünntem Blut (ca. 1:1000) unter Einwirkung eines Wechselfeldes von 1.5 MHz, 400 V/cm, bei einer Absauggeschwindigkeit von $1\mu\text{l/s}$ mit Intervallen von je 1 s. Die Teilchendichte der Ausgangssuspension (Kontrolle) wurde gleich 100% gesetzt. Unter diesen Bedingungen konnte die Teilchenkonzentration in einem 1. Durchgang auf ca. 48% und in einem 2. Durchgang auf ca. 21% der Anfangskonzentration verringert werden.

In ähnlichen Experimenten mit verdünntem Blut 1:1000 wurden im 1. Durchgang ca. 51% und im 2. Durchgang ca. 37% der Teilchenkonzentration der Kontrolle erreicht. Bei Experimenten mit Vollblut wurden im 1. Durchgang nur noch ca. 56% und im 2. Durchgang ca. 45% der Teilchenkonzentration bzw. der Ausgangssuspension erreicht.

Diese Ergebnisse mit Blut in unterschiedlichen PBS-Verdünnungen haben gezeigt, dass die Effizienz der Auftrennung von Zellen und Medium von der Zelldichte abhängt

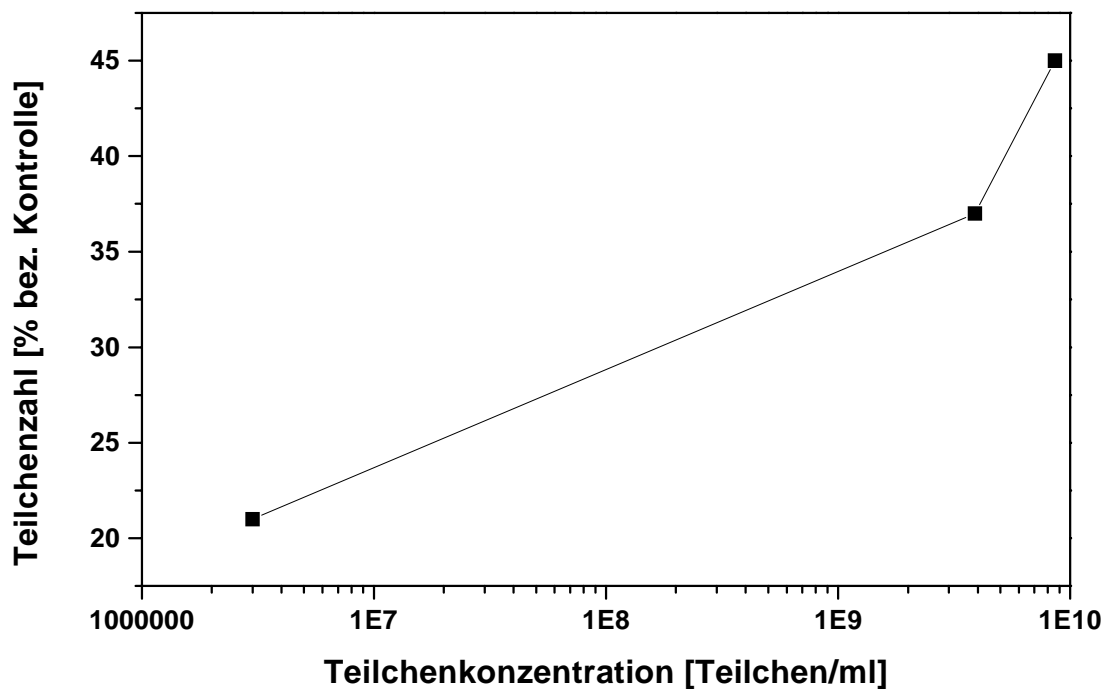


Abbildung 56: Zusammenhang der Teilchendichte in der Ausgangszellsuspension und der Effizienz der Auftrennung von Zellen und Medium in Prozent der Teilchen im abgesaugten Medium bez. der Kontrolle mit Blut unterschiedlicher Konzentration.

Abb. 56 zeigt, dass die Effizienz der Auftrennung mit steigender Teilchendichte abnimmt. Unverdünntes Blut hat aufgrund eines Hämatokritwertes von knapp unter 50% eine extrem hohe Viskosität. Hier ist auch die Auftrennung im Vergleich zu verdünntem Blut weniger effizient.

4.8.4. Einfluss der Auftrennung auf die Vitalität der Zellen

Die Zellen in der Suspension sind während der Auftrennung verschiedenen Stressfaktoren unterworfen: elektrisches Feld, Unterdruck beim Absaugen sowie mechanische Scherkräfte beim Passieren der Poren. Deshalb wurde die Vitalität der Erythrocyten vor und nach der Auftrennung untersucht.

Mit Hilfe des CASY-1 wurde die Anzahl der intakten Zellen bestimmt. Dazu wurde eine Analyse mit Saponin durchgeführt und der Anteil der Teilchen mit einem Durchmesser größer als $4.5\ \mu\text{m}$ auf alle Teilchen bezogen. Die Ergebnisse dieser Messungen haben gezeigt, dass die Auftrennung mit diesem Verfahren keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen. Bei allen Proben lag der Anteil intakter Zellen im Bereich von 95%, wie auch bei der Kontrolle.

Zusätzlich wurde der Überstand von abgesaugten Proben spektroskopisch auf Hämoglobin untersucht. Die Absorption war sowohl bei der Kontrolle als auch bei den abgesaugten Proben unterhalb der Nachweisgrenze.

4.8.5. Einfluss des elektrischen Feldes

Die dielektrophoretische Kraft ist im Vergleich zu anderen, bei dem Verfahren auftretenden Kräften, relativ klein. Dies zeigen die Ergebnisse in Abb. 57.

In verschiedenen Experimenten wurde das Absaugen ohne und mit E-Feld durchgeführt. Die Teilchenzahl in der Suspension, die ohne E-Feld abgesaugt wurde, ist gleich 100% gesetzt. Das Diagramm zeigt, dass beim Absaugen unter E-Feld nur noch ca. 80-90% der Teilchen gemessen wurden.

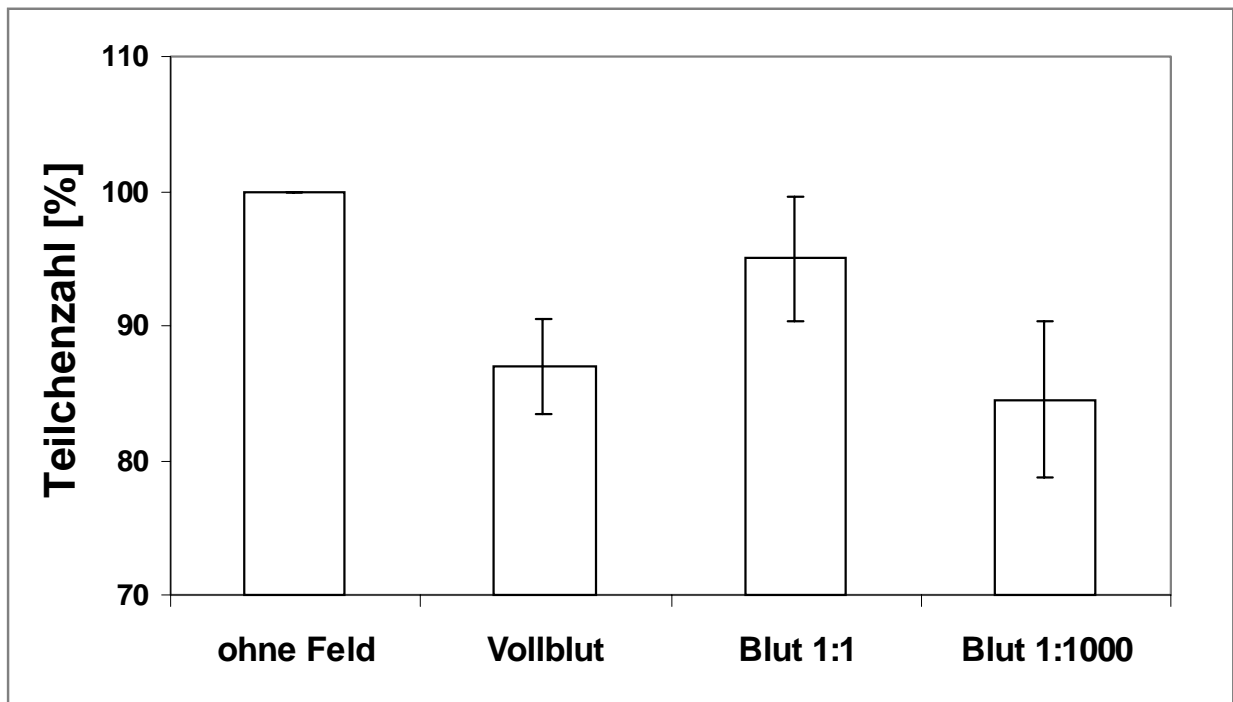


Abbildung 57: Einfluss des E-Feldes auf die Effizienz der Auftrennung. Die Teilchenzahl in der Suspension, die ohne E-Feld abgesaugt wurde, ist gleich 100% gesetzt.

4.8.6. Auftrennung von Zellen und Medium

Nach der Optimierung sämtlicher für die Auftrennung von Zellen und Medium wichtigen Parametern, wurden Experimente mit Jurkat-Zellen durchgeführt. Diese wurden direkt aus Kulturmedium (CGM) aufgetrennt.

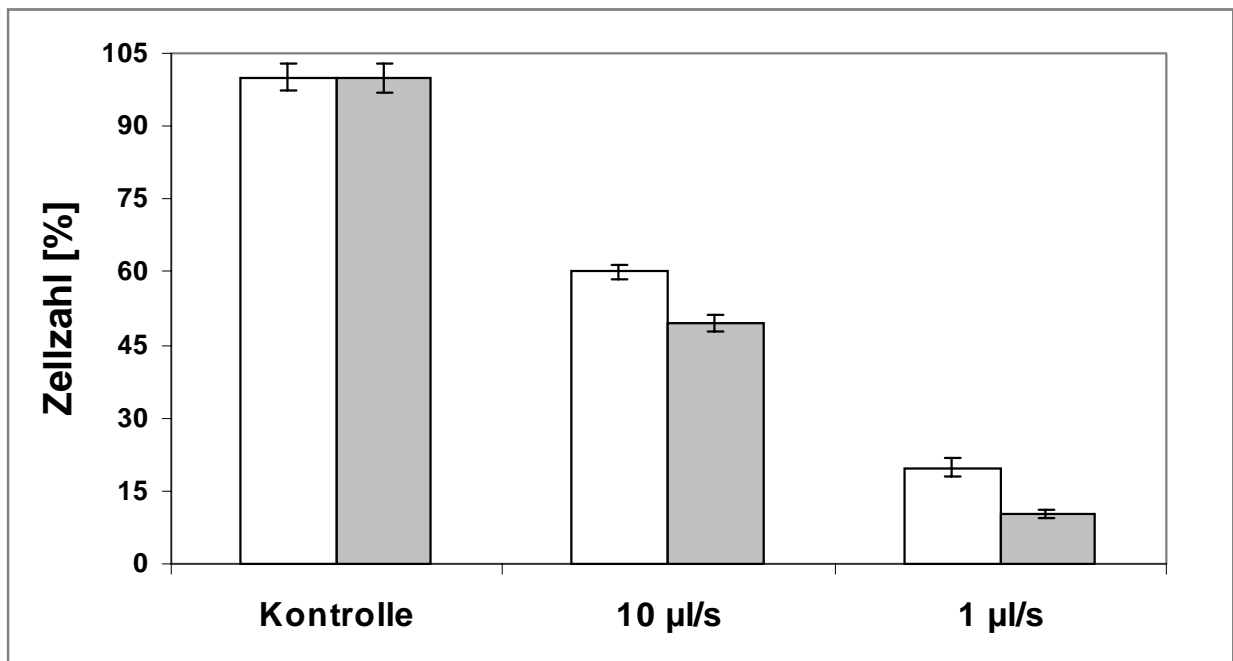


Abbildung 58: Auftrennung von Jurkat-Zellen aus Kulturmedium (CGM) mit PI-Apparatur, 8 µm Poren in der Membran, unter Einwirkung eines Wechselfeldes von 1.5 MHz, 400 V/cm bei folgenden Absauggeschwindigkeiten: 100 µl in 10 s, 1 µl/s mit Intervall von je 1 s. Weiße Säulen stehen für alle Teilchen in der Suspension, graue Säulen für lebende Zellen (Durchmesser größer als 9.38 µm), mit Standardfehlerbalken.

Die Ergebnisse aus Diagramm in Abb. 58 zeigen, dass beim Absaugen aus Kulturmedium unter den optimalen Bedingungen von 1 $\mu\text{l/s}$ mit Intervall von 1 s eine Effizienz von 10.5% schon im ersten Durchgang erreicht wird. Dabei ist zu beobachten, dass die Auftrennung von Zellen effektiver ist, als die von allen Teilchen zusammen, also Bruchstücke mit eingerechnet. Die Bestimmung der Vitalität der Jurkat-Zellen ist schwieriger, allerdings zeigt ein Vergleich der "Bruchstück-Konzentration" in der Kontrolle und der abgesaugten Probe keinen Unterschied.

In weiteren Experimente mit Membran mit einer Porengröße von 3 μm wurde eine Effizienz von ca. 6% erreicht.