

Elektroporation von Säugerzellen: technische Entwicklungen und Applikationen

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Uwe Friedrich
aus
Arad

Würzburg 2000

1. EINLEITUNG	1
2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN UND STAND DER TECHNIK	5
2.1. GENTECHNISCHE MANIPULATION DES GENOMS	5
2.1.1. Virale Gentransfer-Systeme	5
2.1.2. Nichtvirale Gentransfer-Systeme	5
2.2. ELEKTROPORATION	6
2.2.1. Theorie	6
2.2.2. Applikation und Entwicklung	9
2.3. DIELEKTROPHORESE	11
3. MATERIAL UND METHODEN	15
3.1. ZELLEN	15
3.2. GERÄTE UND MEDIEN	16
3.3. ELEKTRODENMATERIALIEN	20
3.4. BESTIMMUNG DER ALUMINIUM-KONZENTRATION	20
3.5. AMPLIFIKATION UND ISOLATION DES PLASMIDS pEGFP	21
3.6. BESTIMMUNG DER ZELLZAHL	22
3.7. ELEKTROTRANSFEKTION	24
3.7.1. Vorbereitung der Zellen	24
3.7.2. Durchführung der Elektroporation	25
3.8. SYNCHRONISATION DER ZELLKULTUREN	25
3.9. DURCHFLOSSZYTOMETRIE	26
3.10. BESTIMMUNG DES ZELLZYKLUSES	28
3.11. AUSWERTUNG	29
3.11.1. Berechnung der Transfektionseffizienz	29
3.11.2. Signifikanztest	30
3.12. KÜNSTLICHE CHROMOSOMEN (MACs)	30
3.12.1. Isolierung und Lagerung der Chromosomen	30
3.12.2. Sortieren von künstlichen Chromosomen	31
3.12.3. Transfer von Chromosomen in Zellen	32
3.12.4. Nachweis des Gentransfers durch künstliche Chromosomen	34
3.13. ZELLKONZENTRIERUNG IN SUSPENSION	35
3.13.1. Negative Dielektrophorese in leitenden Medien	35
3.13.2. Konzentrierung von Zellen in leitendem Medium	35

4. ERGEBNISSE	37
4.1. VERGLEICH VON ELEKTRODEN-MATERIALIEN	37
4.2. TRANSFEKTION VON ZELLINIEN MIT PEGFP	38
4.2.1. <i>Bestimmung des optimalen Parameterbereiches</i>	38
4.2.2. <i>Elektrotransfektion von Zellen aus permanenten Linien</i>	40
4.2.3. <i>Einfluss der Plasmidkonzentration auf die Transfektionseffizienz</i>	49
4.2.4. <i>Kultur von L929 unter Serumentzug nach der Transfektion</i>	50
4.3. BESTIMMUNG DER ALUMINIUM-KONZENTRATIONEN	51
4.4. EINFLUSS DER LEITFÄHIGKEIT AUF DIE TRANSFEKTIONSEFFIZIENZ	53
4.5. ELEKTROTRANSFEKTION VON PRIMÄREN ZELLEN MIT PEGFP	56
4.5.1. <i>Elektrotransfektion von CFB (Cardiofibroblasten)</i>	56
4.5.2. <i>Elektrotransfektion von embryonalen Stammzellen (ES)</i>	61
4.6. ELEKTROTRANSFEKTION UND ZELLZYKLUS	67
4.6.1. <i>Primäre Fibroblasten (CFB)</i>	67
4.6.2. <i>Primäre Stammzellen</i>	74
4.6.3. <i>L929</i>	75
4.7. GENTRANSFER DURCH KÜNSTLICHE CHROMOSOMEN (MACs)	76
4.7.1. <i>Transfer von chromosomaler DNA in L929-Zellen</i>	76
4.7.2. <i>Sortieren von künstlichen Chromosomen (MACs)</i>	79
4.7.3. <i>Nachweis des Gentransfers durch künstliche Chromosomen</i>	80
4.8. ZELLKONZENTRIERUNG IN SUSPENSION	81
4.8.1. <i>Optimierung der elektrischen Parameter</i>	81
4.8.2. <i>Entwicklung einer Absaugkonstruktion zur Zellkonzentration</i>	84
4.8.3. <i>Einfluss der Teilchendichte auf die Effizienz der Auftrennung</i>	90
4.8.4. <i>Einfluss der Auftrennung auf die Vitalität der Zellen</i>	92
4.8.5. <i>Einfluss des elektrischen Feldes</i>	92
4.8.6. <i>Auftrennung von Zellen und Medium</i>	93
5. DISKUSSION	95
5.1. MANIPULATION DES GENOMS MIT HILFE DER ELEKTROPORATION	95
5.2. EINFLUSS DES PORATIONS-MEDIUMS AUF DIE ELEKTROTRANSFEKTION	111
5.3. ABTRENNUNG VON FLÜSSIGKEITEN AUS EINER ZELLSUSPENSION	113
5.4. KONZEPT EINES NEUEN ELEKTROPORATIONS-GERÄTES FÜR KLEINE ZELLZAHLEN	115
6. ZUSAMMENFASSUNG	117

7. SUMMARY	119
8. LITERATUR	121
9. ANHANG	131
TRANSFEKTIONSPROTOKOLL FÜR L929 MIT PEGFP-C1:	135
TRANSFEKTIONSPROTOKOLL FÜR H73C11 MIT PEGFP-C1:	136
TRANSFEKTIONSPROTOKOLL FÜR SP2/0-AG 14 MIT PEGFP-C1:	137
TRANSFEKTIONSPROTOKOLL FÜR JURKAT MIT PEGFP-C1:	138
TRANSFEKTIONSPROTOKOLL FÜR CFB (PRIMÄRE CARDIOFIBROBLASTEN AUS DEM RATTEN- HERZ) MIT PEGFP-C1:	139
TRANSFEKTIONSPROTOKOLL FÜR ES (EMBRYONALE STAMMZELLEN AUS DER MAUS) MIT PEGFP-C1:	140