

2. Theoretische Grundlagen und Stand der Technik

2.1. Gentechnische Manipulation des Genoms

Die moderne Gentechnologie umfasst alle Methoden zur Identifizierung, Isolierung, Vermehrung, Analyse und Expression von Genen. Voraussetzung dafür ist der Gentransfer, also das Einbringen des Gens in eine Wirtszelle [40].

Ziel der Gentherapie ist es, genetische Erkrankungen durch geeignete Veränderungen des Genoms zu behandeln, praktisch ein intaktes Gen in genetisch defekte Zellen einzuschleusen und dort zur Expression zu bringen, um so die Fehlfunktion des defekten Gens zu kompensieren [41].

Verschiedene Techniken zur Einführung von DNA in Zellen sind in den letzten vier Jahrzehnten entwickelt worden. Dabei wird in erster Linie zwischen viralen und nichtviralen Gentransfer-Systemen unterschieden [42].

2.1.1. Virale Gentransfer-Systeme

Der Gentransfer in Zellen gehört zur natürlichen Vermehrungsstrategie der Viren. Deshalb können Viren benutzt werden, um Fremd-DNA in Wirtszellen und auch in deren Genom einzuschleusen, so dass die Fremd-DNA in der Wirtszelle amplifiziert wird. Für die Transfektion von Säugerzellen werden DNA-Viren, wie z. B. Simian Virus 40, Polyomavirus oder Adenoviren, aber auch Retroviren, deren Erbinformation aus RNA besteht, verwendet [42, 43].

2.1.2. Nichtvirale Gentransfer-Systeme

Bei den nichtviralen Gentransfer-Systemen kann man in biochemische und biophysikalische Methoden unterscheiden.

Bei den biochemischen Methoden wird die Fremd-DNA über Endocytose in die Wirtszelle aufgenommen. Dazu wird die DNA vorher mit verschiedenen Substanzen komplexiert.

Die älteste Methode ist die Calciumphosphat-Transfektion, die 1973 von Graham und van der Eb etabliert wurde [44]. Andere Methoden benutzen Polykationen, wie z. B. Diethylaminoethyl-(DEAE)-Dextran, oder Transferrin-Polykation-Konjugate, bei denen es zu einer rezeptorvermittelten Endocytose kommt. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von kationischen Lipidmolekülen, z. B. DOTMA (N[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N, N, N-trimethyl-ammoniumchlorid), auch Lipofektin genannt. Durch Ultraschallbehandlung werden hier Lipidvesikel gebildet, welche die DNA komplexieren, an die negativ geladene Zelloberfläche absorbieren und mit der Plasmamembran fusionieren. In Anlehnung daran sei auch die Liposomenfusion erwähnt, bei der die DNA jedoch in Liposomen “verpackt” wird, die anschließend mit den Zellen fusioniert werden [45, 46].

Bei den biophysikalischen Methoden wird die Fremd-DNA mit Hilfe von physikalischen Verfahren in die Wirtszelle eingebracht. Hierzu zählt die Mikroinjektion der DNA direkt in den Zellkern [47] oder der DNA-Transfer mittels beschleunigter Festpartikel, bei der die DNA mit Mikroprojektilen in die Zelle geschossen wird [48]. Eine immer weiter verbreitete Methode ist die Elektroporation, da hier einerseits die Transfektion von Zellen möglich ist, die anderen Methoden nicht zugänglich sind, und andererseits eine hohe Effizienz erreichbar ist.

2.2. Elektroporation

2.2.1. Theorie

Sowohl die Zellmembran als auch künstliche Lipidmembranen besitzen, aufgrund der amphiphilen Struktur der Membranlipide, Eigenschaften eines elektrischen Kondensators [49]. Deshalb wird der elektrische Durchbruch einer Zellmembran am besten am Modell eines Plattenkondensators mit parallel dazu geschaltetem Widerstand veranschaulicht. Das Membraninnere (die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten der Lipide) stellt das Dielektrikum zwischen den “Platten” dar, die von dem wässrigen Außenmedium und den polaren Köpfen

der Lipide gebildet werden. Die Poren und Kanäle der Zellmembran stellen den parallel geschalteten Widerstand dar. Der Widerstand des Außenmedium liegt in Serie zur Membran.

Ein Plattenkondensator kann nur bis zu einem bestimmten Potential, das vom Plattenabstand und von der Dielektrizitätskonstante abhängig ist, aufgeladen werden. Oberhalb dieses Grenzwertes kommt es zu einem elektrischen Durchbruch und damit verbunden zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit. Dieser elektrische Durchbruch ist bei technischen Kondensatoren normalerweise irreversibel.

Unter bestimmten Voraussetzungen (wie z. B. das Erreichen des für den Durchbruch notwendigen Membranpotentials innerhalb weniger Mikrosekunden) ist die elektrisch induzierte Membranstörung bei Zellen reversibel, und die Zellmembran besitzt nach kurzer Zeit wieder ihre ursprüngliche Eigenschaften. Die Zellmembran wird bis zu einer Spannung U_c aufgeladen, die durch folgende Gleichung ("integrierte Laplacegleichung", in vereinfachter Form) gegeben ist [45]:

$$U_c = f \cdot a \cdot E \cdot \cos a$$

Gleichung 1

U_c	-	Durchbruchspannung [V]
f	-	Formfaktor
a	-	Zellradius [cm]
E	-	äußeres angelegtes Feld [kV/cm]
a	-	Winkel zwischen Polen der Zelle und Feldrichtung

Die Spannung U_c bezeichnet das Potential über die Zellmembran an einem beliebigen Punkt der Membran, der sich im Winkel a zum elektrischen Feld befindet. Die Durchbruchspannung U_c ist außerdem abhängig von einem Formfaktor f , dem Radius a der Zelle und der Feldstärke E des angelegten Feldes. Der Formfaktor f berücksichtigt entsprechend der geometrischen Form der Zelle die Feldverzerrung [11]. Für sphärische Zellen beträgt er 1.5, für einen unendlich langen Zylinder ist $f=1$ [11]. Für Erythrocyten liegt f zwischen 1.2 und 3, je nach Orientierung der Zellen zum Feld [51, 52].

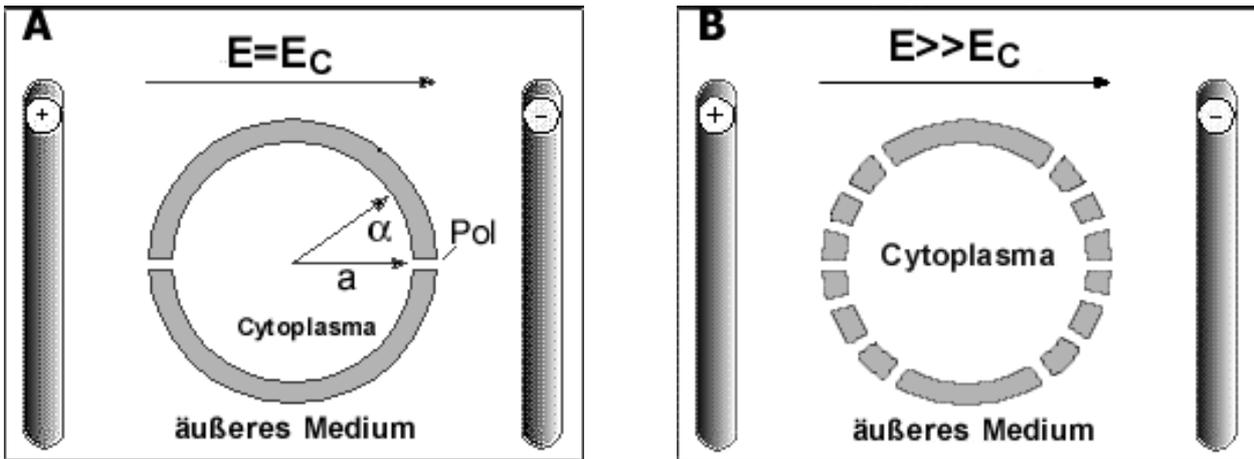


Abbildung 1: Schematische Darstellung des elektrisch induzierten Durchbruchs einer sphärischen Zelle bei unterschiedlicher Feldstärke des angelegten Feldes.

Der Grenzwert des für den Durchbruch notwendigen Potentials über die Membran U_C beträgt bei Raumtemperatur 1 V, bei 4°C 2 V [9]. Die entsprechende Feldstärke des angelegten Feldes, bei welcher der Durchbruch erzielt wird, bezeichnet man als E_C oder E_{krit} .

Wird ein elektrisch homogenes Feld der Feldstärke $E = E_C$ (Abb. 1 A) angelegt, so induziert man entsprechend Gleichung 1 aufgrund der Abhängigkeit vom Winkel a einen Membrandurchbruch an den Polen der Zelle, also an den Stellen, die den Elektroden am nächsten sind (an diesen Stellen wird das höchste Potential U_C erreicht, da wegen $a=0$ $\cos a=1$ ist). Beim Anlegen eines Feldes höherer Feldstärke wird aufgrund der Winkelabhängigkeit die permeabilisierte Membranfläche größer (Abb. 1 B).

Die Anwendung der integrierten Laplacegleichung ist nur unter der Voraussetzung möglich, dass das Feld solange angelegt wird, bis das stationäre Potential erreicht wird. Die Aufladungszeit τ der Membran wird unter der Voraussetzung, dass die Leitfähigkeiten des äußeren Mediums und des Zellinneren sehr viel größer sind als die spezifische Membranleitfähigkeit, durch folgende Formel in guter Näherung beschrieben [9]:

$$\tau = a \cdot C_m \cdot (r_i + 0.5r_a)$$

Gleichung 2

τ	- Aufladungszeit [μ s]
a	- Zellradius [cm]
C_m	- spezifische Membrankapazität [F/m^2]
r_i	- innerer spezifischer Widerstand der Zelle [$\Omega \cdot m$]
r_a	- äußerer spezifischer Widerstand [$\Omega \cdot m$]

Die Aufladezeit τ beschreibt den exponentiell verlaufenden Spannungsaufbau über die Membran. Das stationäre Potential über die Membran in Gleichung 1 ist nach ca. 5τ erreicht.

Die Verwendung von hypoosmolalen Porationsmedien gewährleistet eine sphärische Form der Zellen und somit eine einfache Anwendung der integrierten Laplace-Gleichung. Zusätzlich wird durch das Schwellen der Zellen die für den Membrandurchbruch notwendige Feldstärke E_{krit} herabgesetzt. Je nach Zelltyp kann sich die Zellmembran vom Cytoskelett ablösen, was sowohl die Permeabilisierung erleichtert als auch das Ausheilen (aufgrund der höheren Fluidität der Membranbestandteile) der Membran nach dem Puls [53].

Neben der Osmolalität kommt auch der Leitfähigkeit des Porationsmediums eine wichtige Rolle zu. Bei gegebenem Zellradius hängt die Relaxationszeit der exponentiellen Aufladung der Membran umgekehrt von der spezifischen Leitfähigkeit des Mediums ab [7, 13]. Neuere Forschungsergebnisse am Lehrstuhl für Biotechnologie haben gezeigt, dass entgegen den gängigen theoretischen Vorstellungen der Stoffaustausch zwischen Zelle und Medium nach der Poration mit abnehmender Leitfähigkeit des Mediums zunimmt [8, 14]. Diese Befunde sind auf transiente elektrische Deformationskräfte zurückzuführen, die aus der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen dem angelegten externen elektrischen Feld und dem induzierten Dipol im Cytosol resultieren. Diese Prozesse treten im Nanosekundenbereich in schwach leitenden Medien vor der Aufladung der Membran auf, sind aber bis in den Mikrosekunden-Bereich der Membranaufladung wirksam und beeinflussen entscheidend die Permeabilisierung der Membran.

Der oben erläuterte elektrisch induzierte Durchbruch der Zellmembran bewirkt eine Störung in der Membranstruktur, die einen Stoffaustausch zwischen Zellinnerem und äußerem Medium ermöglicht.

2.2.2. Applikation und Entwicklung

Die Elektroporation bietet durch den reversiblen, elektrisch induzierten Durchbruch die Möglichkeit, extrazelluläre Stoffe in Zellen einzuschleusen. Vorteil dieser Technik ist einerseits

dass es keine Begrenzung bezüglich der einzuschleusenden Stoffe gibt (weder Größe noch chemische Struktur) und andererseits ist sie bei den unterschiedlichsten Zelltypen anwendbar. So können Farbstoffe, Proteine, Plasmide und sogar ganze Chromosomen in Zellen eingebracht werden. Dadurch kann z. B. die enzymatische Aktivität der exprimierten Proteine oder die Effektivität von Promotorkonstrukten analysiert werden. Eine weitere wichtige Anwendung besteht in der Transfektion von embryonalen Stammzellen zur Herstellung transgener Tiere.

Bei den konventionellen Geräten, die mit der herkömmlichen Porationstechnik arbeiten, können verschiedene Probleme auftreten. Die Applikation langer Feldpulse in leitenden Porationsmedien kann durch hohe Stromflüsse oder durch drastische pH-Änderungen in Elektrodennähe und dadurch Freisetzung von Ionen (vor allem Aluminium) aus den Elektroden zu irreversiblen Schädigung der Zellen führen. Angesichts dieser Schwierigkeiten bei der Elektroporation von Zellen wollte die Firma Eppendorf in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Biotechnologie, Würzburg, ein modernes Porationsgerät entwickeln.

Als Voraussetzung für die erfolgreiche Anwendung der Porationstechnik in der Manipulation des Genoms und des Cytosols von Säugerzellen mussten mehrere Faktoren berücksichtigt werden. Ein wichtiger Faktor ist die Verwendung kurzer, definierter (in Amplitude und Länge) Spannungspulse in Bereich von Mikrosekunden (15-100 μ s). Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, muss die Pulsdauer genau definiert und unabhängig von der Leitfähigkeit des Mediums sein. Denn bei längeren Pulsen kann es nach erfolgtem Durchbruch zu Stromfluss in der Zelle kommen, und durch die damit verbundene Temperaturerhöhung zur irreversiblen Zellschädigung.

Ein weiterer Faktor ist die Verwendung von hypoosmolalem Porationsmedium, dessen Zusammensetzung auf die natürlichen Na- und K-Gradienten der Zelle abgestimmt ist. Vorteil dieses hypoosmolalen Puffers ist, dass die Zelle durch Wasseraufnahme ihren Radius vergrößert. Dadurch sind, entsprechend der integrierten Form der Laplacegleichung, kleinere Amplituden der Feldstärke für die Elektroporation notwendig. Außerdem kann sich je nach Zelltyp, die Zellmembran vom Cytoskelett ablösen, was die Permeabilisierung erleichtert und das Ausheilen der Membran nach dem Puls beschleunigt [7].

Die geringe Leitfähigkeit des Porationsmediums kann zu elektrisch induzierten Deformationskräften auf die Zellen vor dem Membrandurchbruch führen. Dadurch wird die Permeabilisierung der Membran und der Stoffaustausch der Zelle mit dem Medium begünstigt [13].

Entsprechend dieser Faktoren wurde ein Porationsgerät entwickelt, das alle Voraussetzungen erfüllt und die μ -Puls-Technik in Porationsmedium mit geringer Leitfähigkeit nutzt: der Multiporator[®] der Firma Eppendorf in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Biotechnologie, Würzburg.

2.3. Dielektrophorese

Bei dem heutigen Stand der Technik hat die biotechnologische Anwendung der Elektroporation, trotz der Vielzahl an Vorteilen noch den Nachteil, dass die Anwender, wie auch bei den meisten anderen Methoden des Gentransfers, auf eine relativ hohe Anzahl von Zellen angewiesen sind. Eine Lösung dieses Problems kann die bei der Elektrofusion verwendete Dielektrophorese zur Aufkonzentrierung der Zellen in unmittelbarer Nähe der Elektroden bieten.

Bei der Elektrophorese in einem homogenen elektrischen Feld erfahren die Zellen eine Kraft aufgrund ihrer Oberflächenladung und wandern in Richtung der entgegengesetzt geladenen Elektrode. Dieser Effekt ermöglicht es, Zellen mit unterschiedlicher Oberflächenladung voneinander zu trennen, wie z. B. mit Hilfe der Free-Flow-Elektrophorese [54]. Da die Oberfläche der meisten Zellen negativ geladen ist, findet eine Bewegung in Richtung der Anode statt. Durch das elektrische Feld wird über Ladungstrennung oder Orientierung von Dipolen in der Membran zusätzlich ein Dipolmoment in der Zelle induziert. Da die Feldstärke in diesem homogenen elektrischen Feld aber auf beiden Seiten der Zelle gleich ist, trägt das induzierte Dipolmoment nicht zur Bewegung bei.

In einem inhomogenen elektrischen Feld tritt neben der schon beschriebenen Elektrophorese geladener Teilchen auch eine Bewegung neutraler Teilchen auf. Diese wird durch die unterschiedliche Feldstärke zu beiden Seiten des in der Zelle induzierten Dipols hervorgerufen. Dieser Effekt der Bewegung von Teilchen (geladene und ungeladene) in einem inhomogenen elektrischen Feld aufgrund eines Feldstärkegradienten wird allgemein als Dielektrophorese bezeichnet.

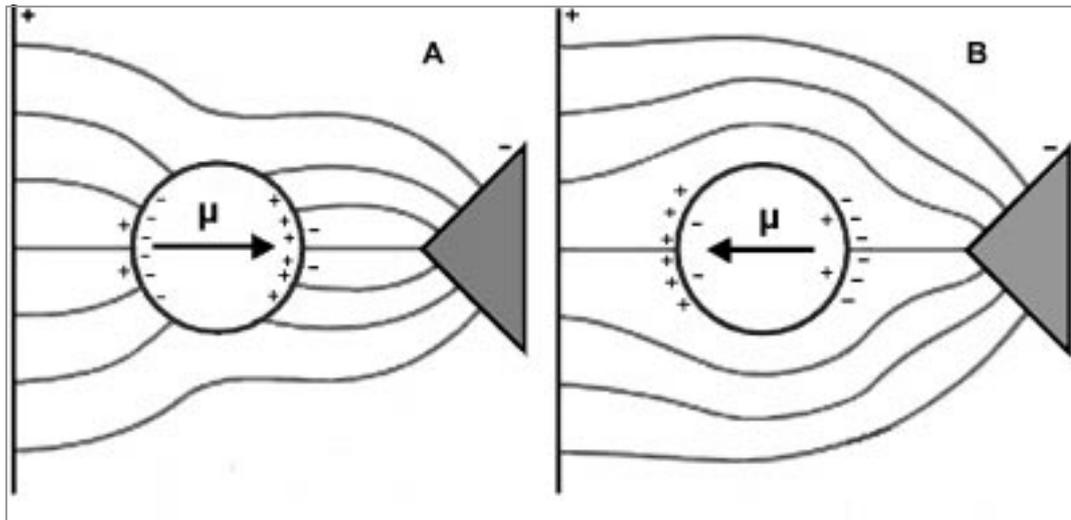


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Dielektrophorese in einem inhomogenen Wechselfeld mit dem in der Zelle induzierten Dipol μ

In einem inhomogenen elektrischen Wechselfeld findet wegen der Trägheit der Zellen keine elektrophoretisch bedingte Bewegung statt, sondern nur eine dielektrophoretische Wanderung der Zellen, bei der diese sich entlang der Feldlinien bewegen. Bei Umpolung des externen Feldes (Abb. 2, A, B) ändert sich im Gegensatz zur Elektrophorese die Wanderungsrichtung des Teilchens nicht, da der Feldgradient im inhomogenen Wechselfeld konstant bleibt. Aufgrund dieses Effektes können Feldlinien z. B. mit suspendierten Grieskörnern sichtbar gemacht werden.

Betrachtet man die Zelle in erster, grober Näherung als dielektrische Kugel, kann die dielektrophoretische Kraft, die auf die Zelle wirkt, in guter Näherung mit folgender Gleichung beschrieben werden [55]:

$$F = 2 \cdot \pi \cdot a^3 \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_1 \cdot \frac{(\epsilon_2^* - \epsilon_1^*)}{(\epsilon_2^* + 2\epsilon_1^*)} \cdot \nabla |E|^2 \quad \text{Gleichung 3}$$

- F - dielektrophoretische Kraft [N]
- a - Radius der Zelle [cm]
- ϵ_0 - absolute Dielektrizitätskonstante ($8.85 \cdot 10^{-12} \text{ Fm}^{-1}$)
- ϵ_1^* - komplexe Dielektrizitätskonstante des Mediums
- ϵ_2^* - komplexe Dielektrizitätskonstante der Zelle
- ∇ - Nabla-Operator
- E - elektrische Feldstärke [kV/cm]

Gleichung 3 zeigt, dass die Kraft, die auf ein Teilchen im inhomogenen elektrische Wechsel-
feld wirkt, abhängig vom Radius (a^3), den Dielektrizitätskonstanten und vom Gradienten der Feld-
stärke ($\propto E^{1/2}$) abhängig ist. Die Bewegungsrichtung der Teilchen wird von der Differenz der ef-
fektiven Dielektrizitätskonstanten des Mediums (ϵ_1^*) und des Teilcheninneren (ϵ_2^*) bestimmt. Die
komplexe Dielektrizitätskonstante ϵ^* ist durch folgende Gleichung definiert [56]:

$$\epsilon^* = \epsilon \epsilon_0 - i \sigma / \omega \quad \text{Gleichung 4}$$

- | | | | | | | |
|---|---|---|---|--------------|---|---|
| e | i | s | w | ϵ^* | - | komplexe Dielektrizität |
| | | | | ϵ | - | relative Dielektrizitätskonstante |
| | | | | i | - | $(-1)^{1/2}$ |
| | | | | σ | - | spezifische Leitfähigkeit [mS/cm] |
| | | | | ω | - | Kreisfrequenz des Feldes [Hz] ($=2\pi f$) |

Die Gleichung zeigt die Abhängigkeit der komplexen Dielektrizität von der Leitfähigkeit
des Mediums und der Frequenz des elektrischen Feldes. Während bei hohen Frequenzen haupt-
sächlich der Realteil entscheidend ist, hängt bei niedrigen Frequenzen die komplexe Dielektrizi-
tätskonstante stark von der spezifischen Leitfähigkeit des Mediums ab. Theoretische Berechnun-
gen dazu am Einschalen-Modell der Zelle sind in folgendem Diagramm dargestellt [13, 14]:

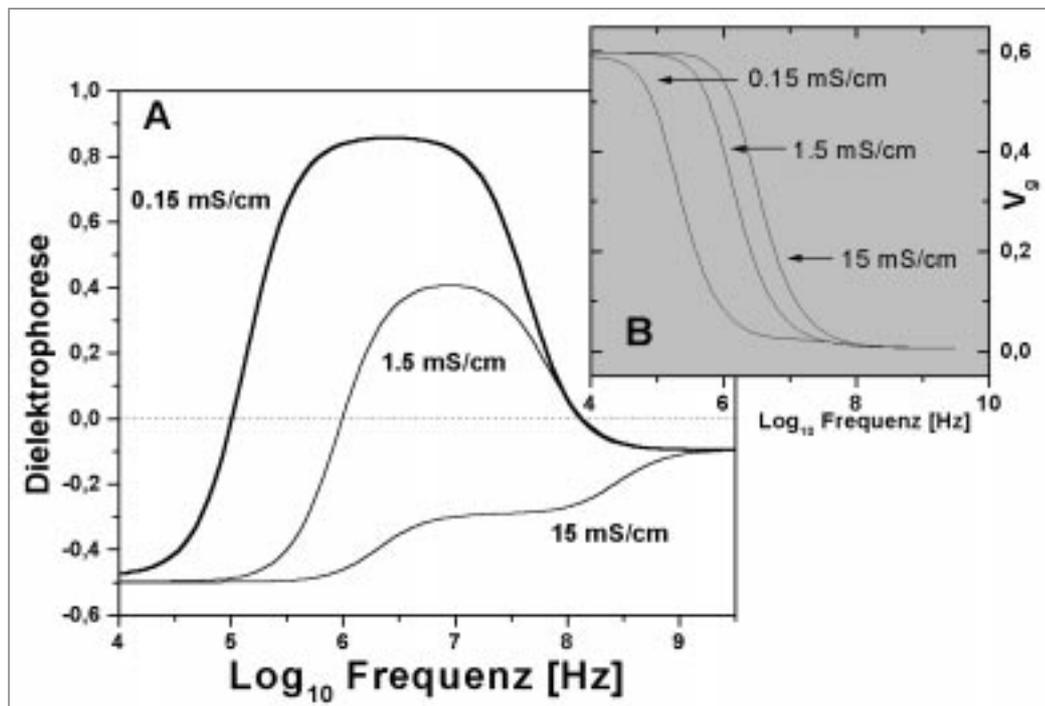


Abbildung 3: Abhängigkeit der Dielektrophorese (A) und der induzierten Spannung (B) von der
Frequenz des elektrischen Feldes bei einer Leitfähigkeit des Mediums von 0,15, 1,5, 15 mS/
cm.

Das Vorzeichen der dielektrophoretischen Kraft, die auf ein Teilchen im inhomogenen Wechsel-
feld wirkt, wird von der Differenz der Dielektrizitätskonstanten und der Frequenz des elektrischen
Feldes bestimmt. Entsprechend des Vorzeichens, und damit auch der Wanderungsrichtung des Teil-
chens, wird in positive (Abb. 3 A) und negative (Abb.3 B) Dielektrophorese unterschieden. (Die
Berechnung wurde für Erythrocyten mit einem Radius von 4 μm , inneren Leitfähigkeit von 5 mS/
cm, Membrankapazität von 0.008 F/m² und einer Membrandicke von 10 nm durchgeführt)

Bei einer hohen Frequenz des elektrischen Feldes (MHz-Bereich von 10⁶-10⁸) und kleinen
Leitfähigkeiten des Außenmediums (0.15-1.5 mS/cm) tritt positive Dielektrophorese auf. Die Di-
elektrizitätskonstante des Teilcheninneren ist größer als die Dielektrizitätskonstante des umgeben-
den Mediums: $\epsilon_2^* > \epsilon_1^*$, d.h. das Innere des Teilchens ist polarisierbarer als das umgebende Medium.
Dadurch ist der induzierte Dipol im Inneren des Teilchens entscheidend für die Wanderungsrichtung
und das Teilchen bewegt sich in Richtung der höheren Felddichte. Bei einer Leitfähigkeit des Me-
diums, die gleich oder größer der inneren Leitfähigkeit der Zelle (ca. 5 mS/cm) ist, tritt immer
negative Dielektrophorese auf. Bei der negativen Dielektrophorese ist $\epsilon_2^* < \epsilon_1^*$, das Medium ist
polarisierbarer als das Innere des Teilchens. Entscheidend für die Wanderungsrichtung ist der Di-
pol, gebildet durch die Ladungen außen am Teilchen, und dementsprechend bewegt sich das Teil-
chen in Richtung der geringeren Felddichte.

Die über die Membran induzierte Spannung V_g ist bei einer hohen Frequenz des elektrischen
Feldes (MHz-Bereich von 10⁶-10⁸) exponentiell abfallend (Abb. 3 B). Sie liegt deutlich unterhalb
der Durchbruchspannung von 1 V (siehe Gleichung 1). Dadurch ist eine für die Zellen sehr scho-
nende Behandlung möglich.

Dieser Effekt der negativen Dielektrophorese in leitenden Medien kann also für die
Zellkonzentrierung in Suspensionen genutzt werden.