

3. Material und Methoden

3.1. Zellen

Zelllinien

Für die Experimente wurden Suspensionszellen sowie adhärenente Zellen verwendet. Die Zelllinie SP2/0-Ag14 (im Text als SP2 bezeichnet) ist ein Fusionsprodukt aus einer Maus-Zelllinie und Maus-Lymphocyten [57]. Die Hybridoma-Zellen H73C11 (im Text als H7 bezeichnet) sind ein Maus-Human-Elektrofusionsprodukt [58]. Als weitere Suspensionszellen wurden humane Jurkat T-Lymphocyten verwendet (im Text als Jurkat bezeichnet) (von ATCC Rockville, MD, USA). Die L929-Zellen (im Text als L929 bezeichnet) sind adhärenent wachsende Mausfibroblasten [59]. Die Zellen wurden in CGM mit 10% FCS bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für die laufende Zellkultur wurden die Zellen alle 2-3 Tage umgesetzt, die adhärenenten Zellen wurden dazu vorher mit Trypsin oder mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst.

Primäre Zellen

Primäre Rattenherz-Fibroblasten (im Text als CFB bezeichnet) wurden von Dr. A. Simm (Lehrstuhl für physiologische Chemie II, Uni Würzburg) isoliert [60]. Die Zellen wurden 1-5 Passagen in McCoys-Medium mit 10% Serum bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für das Passagieren wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst.

Embryonale Maus-Stammzellen (im Text als ES bezeichnet) wurden für die jeweiligen Experimente von S. Freund (Pharmakologie, Uni Würzburg) zur Verfügung gestellt.

Zellen mit MACs

Die künstlichen Chromosomen MACs wurden aus zwei Zelllinien isoliert: H1D3 und 1B3 [61, 62]. Diese adhären Hybrid-Zelllinien sind Fusionsprodukte aus EC3/7 Mausezellen mit CHO (chinese ovary hamster)-Hybridzellen [63, 64]. Die Zellen wurden in F12 HAM-Medium mit 10% FCS und 175 µg/ml Hygromycin B bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage passagiert, nachdem sie eine Konfluenz von ca. 80% erreicht hatten. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin (1 mg/ml) 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Trypsin wurde abgenommen und die Zellen weitere 2 Minuten inkubiert. Anschließend wurden sie mit frischem Medium abgespült und in neue Platten umgesetzt.

3.2. Geräte und Medien

Alle Chemikalien, wenn nicht anders erwähnt, wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

Medien für die Zellkultur

- CGM:
 - RPMI 1640 (PAA, Linz)
 - 10% FCS (PAA, Linz)
 - 1 mM Na-pyruvat (PAA, Linz)
 - 2 mM L-Glutamin (PAA, Linz)
 - 100 U/ml Penicillin-Streptomycin (PAA, Linz)
 - 1% nichtessentielle Aminosäuren (PAA, Linz)
 - 50 µM Mercaptoethanol
 - mit und ohne Phenolrot

- McCoys
 - 100 U/ml Penicillin-Streptomycin
 - 10%, bzw. 20% FCS

- F12-HAM
 - 10% FCS (HyClone, Utah, USA)
 - 1 mM Na-pyruvat
 - 2 mM L-Glutamin
 - 100 U/ml Penicillin-Streptomycin
 - 1% nichtessentielle Aminosäuren

- PBS (PAA, Linz)

Porationsmedium

- 0.3 mM KH_2PO_4
- 0.85 mM K_2HPO_4
- Die Leitfähigkeit wurde mit KCl eingestellt (5-35 mM). Das Standard-Porationsmedium enthält 30 mM KCl
- Die gewünschte Osmolalität wurde mit myo-Inosit (Fluka) eingestellt

Medien für E.coli

- YT-Medium:
 - 1.6% Bacto-Trypton
 - 1% Hefe-Extrakt
 - 0.5% NaCl
 - auf pH 7.0 einstellen mit NaOH

- LB-Medium
 - 1% Bacto-Trypton
 - 0.5% Hefe-Extrakt
 - 1% NaCl
 - auf pH 7.0 einstellen mit NaOH

Chromosomen-Medien

- hypotoner Puffer (zum Lysieren der Zellen)
 - 75 mM KCl
 - 0.2 mM Spermine
 - 0.5 mM Spermidine
 - auf pH 7.5 mit HCl einstellen

- Chromosomen-Isolationspuffer
 - 15 mM Tris-HCl
 - 2 mM EDTA
 - 80 mM KCl
 - 20 mM NaCl
 - 0.5 mM EGTA
 - 0.2 mM Spermin
 - 0.5 mM Spermidin
 - 1 mg/ml Digitonin
 - auf pH 7.2 einstellen

- GH-Puffer (Lagerung von Chromosomen)
 - 200 mM Glycin
 - 2% Hexylen

- Natriumsulfit-Puffer
 - 100 mM Natriumcitrat
 - 250 mM Natriumsulfit

- Polyamin-Puffer (Sortieren von Chromosomen)
 - 1 mM EGTA
 - 800 mM KCl
 - 15 mM Tris-HCl
 - 20 mM NaCl
 - 2 mM EDTA
 - 1 μ M Spermine
 - 2.5 μ M Sperimidine
 - auf pH 7.2 mit HCl einstellen

- Acetat-Puffer
 - 0.1 mM Calciumacetat
 - 0.05 mM Magnesiumacetat
 - Osmolalität mit myo-Inosit auf 90 mosmol/kg einstellen

Alle Medien und Gefäße, die mit Zell- bzw. Bakterienkultur in Berührung kamen, waren steril.

Kits

- Quiagen Plasmid Kit (Quiagen, Hilden)
- Quiagen Plasmid Filter Kit (Quiagen, Hilden)
- Mycoplasmentest (Biochrom, Berlin)

Geräte

- Porationsgeräte
 - Biojet MI (B. Braun, Melsungen)
 - Multiporator (Eppendorf, Hamburg)
 - Gene Pulser II (Bio-Rad , München)
- Konduktometer: Typ 702 (Knick-GmbH, Berlin)
- Osmometer: Osmomat 030 (Gonotec, Berlin)
- CASY-1 (Schärfe, Reutlingen)
- FACS, Epics Elite ESP (Coulter, Krefeld)
- Frequenzgenerator: TE 7702 (Toellner, Herdecke)
- Spektrometer: Perkin-Elmer
- Speicheroszilloskop: Digitalscope SE 571, (BBC Goerz Metrawatt, Wien)
- Oszilloskop; Philips PM 3057 5 MHz
- Kamera: Panasonic WV-BP 310
- Mikroskop Leitz DMRM (Leica, Wetzlar)
- Mikroskop Labovert (Leica, Wetzlar)
- Mikro-Photoeinrichtung (Wild, Heerbrug, CH)

Software

- Digitalisierung von Bildern erfolgte von Videoband auf PC über eine Grafikkarte, bzw. durch Einscannen von Dias.
- Die Bearbeitung der digitalen Bilder wurde mit Photoshop 5.0 durchgeführt.
- Die Diagramme wurden mit Excel 97 bzw. Origin 5.0 erstellt.
- Auswertung der FACS Daten erfolgte mit WinMDI 2.4.

3.3. Elektrodenmaterialien

Für die Entwicklung des Multiporators wurden Elektroden aus unterschiedlichsten Materialien für die Elektroden der Elektroporationsküvetten untersucht.

Es wurden Elektroden aus folgenden Materialien getestet: Edelstahl, Aluminium, Titan, Sigradur (im Folgenden Glaskohlenstoff genannt) und Aluminium-Kupfer. Bei diesen Elektroden handelt es sich um 1 mm dicke Scheiben, welche in eine Biojet-Porationskammer eingelegt wurden.

Die Transfektion erfolgte mit dem Biojet-Gerät nach einem vorläufigen Protokoll von Ch. Djuzenova: $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml, 10 µg/ml Plasmid pEGFP, in isoosmolalem Porationsmedium mit 10 mM KCl, Pulsparameter 6 kV/cm, 40 µs, Raumtemperatur.

3.4. Bestimmung der Aluminium-Konzentration

Die Freisetzung von Al^{3+} -Ionen durch den Einfluss des Feldpulses aus Aluminiumelektroden der Porationsküvetten wurde an zwei Systemen untersucht: Multiporator und Gene Pulser II. Es wurde jeweils nur das angegebene Porationsmedium ohne Zellen verwendet.

Für die Experimente mit dem Multiporator wurden folgende Parameter gewählt: bei Küvetten mit einem Volumen von 400 µl und 2 mm Elektrodenabstand wurden Feldpulse von 4 kV/cm, 40 µs und 100 µs, 2 kV/cm und 100 µs, bei Küvetten mit einem Volumen von 800 µl und 4 mm Elektrodenabstand Feldpulse von 2 kV/cm 40 µs und 100 µs angelegt. Die Küvetten wurden mit Porationsmedium mit 30 mM KCl (Leitfähigkeit 3.8 mS/cm bei 24°C) und 100 mosmol/kg befüllt.

Für die Experimente mit dem Gene Pulser II wurden folgende Parameter gewählt: bei Küvetten mit einem Volumen von 400 µl und 2 mm Elektrodenabstand wurden Feldpulse von 0.55 kV/cm und 950 µF, und 1 kV/cm und 500 µF angelegt; bei Küvetten mit einem Volumen von 800 µl und 4 mm Elektrodenabstand wurden die gleichen Parameter verwendet. Die Küvetten wurden mit PBS (Leitfähigkeit 14.0 mS/cm bei 24°C) befüllt. Die Pulslänge bei den eingestellten Parameter wurde am Gene Pulser II abgelesen.

Die Proben wurden mittels Atomabsorptionsspektroskopie AAS (H. Pette Institut, Hamburg) und/oder Atomemissionsspektroskopie AES (Lehrstuhl für Botanik, Uni Würzburg) analysiert.

3.5. Amplifikation und Isolation des Plasmids pEGFP

Zur Vermehrung des pEGFP-C1-Plasmids (Clontech, Heidelberg) wurden *E. coli* verwendet. Die mit CaCl_2 hergestellten kompetenten *E. coli* wurden mit dem Plasmid transformiert. Zu 200 μl kompetenten Bakterien wurden ca. 10 μg Plasmid pipettiert. Nach 45 Minuten Inkubation bei 0°C wurden die Bakterien einem "Hitzeschritt" bei 43°C für 3 Minuten unterzogen. Anschließend wurden 900 μl YT-Medium dazu pipettiert. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C wurden die Bakterien auf Selektionsplatten (150 μl /Platte) ausplattiert. Diese wurden aus YT-Medium gegossen, nach Zugabe von 12 g/l Agar und 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin (nach Abkühlen). Die *E. coli* auf den Selektionsplatten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C , 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Kolonien von positiven Klonen wurden von den Selektionsplatten in 200 ml Erlenmeyer-Kolben mit LB-Medium mit 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin gegeben und 12-16 Stunden im Wasserbad unter leichtem Schütteln bei 37°C kultiviert. Aus diesen Kulturen wurden kleine Proben zum Einfrieren der *E. coli*-Klone entnommen: 800 μl *E. coli*-Suspension wurden mit 400 μl Glycerin gemischt und bei -80°C gelagert. Der Rest wurde zur Isolierung des pEGFP-Plasmids verwendet.

Zu folgenden Isolierungen des Plasmids pEGFP wurden die eingefrorenen *E. coli*-Kulturen verwendet. Je 100 ml LB-Medium mit 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin in einem Erlenmeyer-Kolben wurden mit ca. 10-20 μl *E. coli* angeimpft und 12-16 Stunden im Wasserbad unter leichtem Schütteln bei 37°C kultiviert [65]. Die weitere Isolierung des Plasmids erfolgte mit Quiagen Plasmid Midi Kit oder Quiagen Plasmid Filter Midi Kit nach dem dort angegebenen Protokoll. Einzige Abweichung vom Quiagen-Protokoll besteht in der Aufnahme der gereinigten DNA: nach der letzten Ethanol-Fällung wurde die DNA in sterilem Wasser (bidest) aufgenommen.

Die Konzentration und die Reinheit wurden spektrometrisch bestimmt: ein Absorptionswert von 1 bei 260 nm entspricht 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gereinigtes Plasmid [66].

3.6. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit dem CASY 1 System von der Firma Schärfe bestimmt. Das CASY 1 System (Cell Counter Analyser System) verbindet das bewährte Verfahren der Widerstandsmessung für Partikel (von "Coulter-Counter" bekannt) mit einer modernen Signalauswertung (Pulsflächenanalyse). Zur Messung werden die Zellen in einer Elektrolytlösung (PBS) resuspendiert und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Kapillare gesaugt. Während der Messung wird über zwei Elektroden eine Spannung an die Kapillarstrecke angelegt und der Widerstand gemessen. Die Widerstandsänderung beim Durchtritt von Zellen durch die Messkapillare ist ein Maß für das Volumen der Zellen. Dieses Messsignal wird mit einer Frequenz von 1 MHz abgetastet, so dass nicht nur die Amplitude, sondern der gesamte Verlauf des Signals erfasst wird. Aus diesen vielen Einzelmessungen pro Zelle berechnet CASY 1 das Integral der Messsignale (Pulsflächenanalyse) und ermittelt anhand dieser Werte das Volumen einer einzelnen Zelle. Durch die Messung vieler Zellen lassen sich auf diese Weise die Zelldichte und die Größenverteilung einer Zellkultur bestimmen.

Mit Hilfe dieses Systems kann auch der Anteil toter Zellen bestimmt werden. Tote Zellen besitzen ein scheinbar kleineres Volumen, da die Plasmamembran keine isolierenden Eigenschaften mehr besitzt. Die Kernmembran ist dagegen noch intakt und stellt einen elektrischen Widerstand dar, so dass der Zellkern ein elektrisches Signal bei Durchtritt durch die Kapillare erzeugt, das seinem Volumen entspricht und deshalb entsprechend kleiner als das Signal intakter Zellen ist.

Zur Bestimmung der Zellzahl und des Zellvolumens wurden die Zellen in der gewünschten Verdünnung (meist 1:100) in PBS (mindestens 5 ml) resuspendiert. Mit der so vorbereiteten Probe wurden 3 Messungen zu 200 µl durchgeführt. Das Ergebnis einer solchen Messung ist in Abb.4, Kurve B dargestellt.

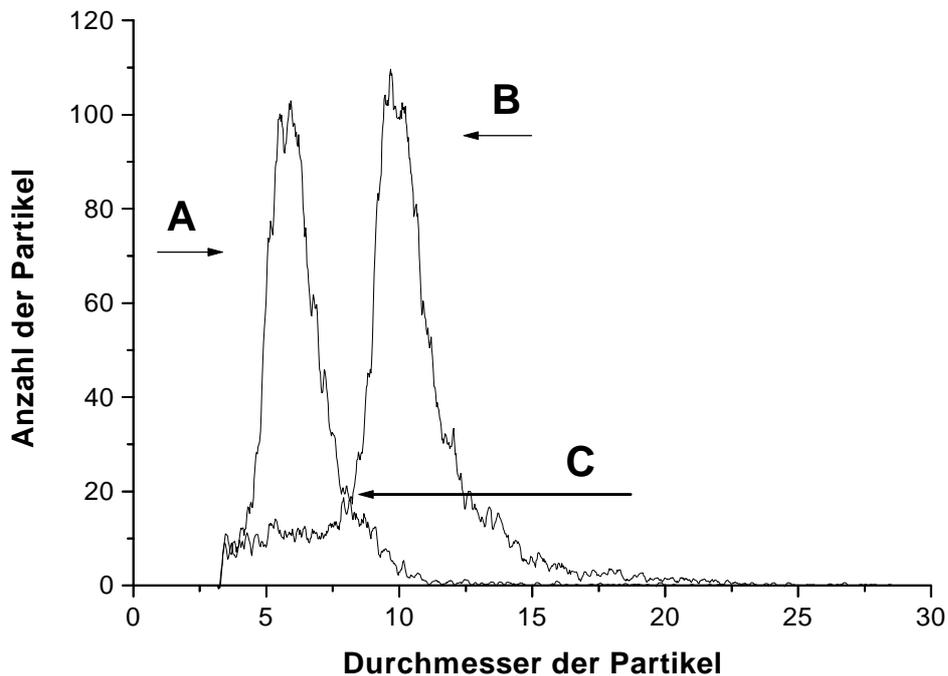


Abbildung 4: Darstellung einer Auswertung zur Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe des CASY1-Systems. Gemessen wurden Jurkat-Zellen in PBS aus der laufenden Kultur (Kurve B), und anschließend nach Behandlung mit 0.2% Saponin (Kurve A).

Zur Bestimmung des Anteils toter Zellen wurde die Größe der Zellkerne gemessen. Hierzu wurde Saponin (Stammlösung 5% in H₂O) zu einer Endkonzentration von 0.2% zupipettiert. Saponin lysiert die Plasmamembran, so dass die Zellkerne der Messung zugänglich werden. Nach ca. 2 Minuten Inkubationszeit wurde eine 2. Messung (3 x 200 μl) durchgeführt. Kurve A in Abb. 4 stellt eine Messung mit Saponin behandelten Zellen dar.

Durch die Software können beide Messungen übereinander gelegt werden, und so der Anteil an lebenden oder toten Zellen bestimmt werden. Als Grenze wurde der Schnittpunkt C der beiden Kurven angenommen, der in etwa der Grenze der beiden Normalverteilungen entspricht.

3.7. Elektrotransfektion

3.7.1. Vorbereitung der Zellen

Zelllinien

Zur Elektroporation wurden nur Zellen aus laufenden Kulturen, also keine frisch aufgetauten oder transportierten Zellen, verwendet. Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen auf Mycoplasmen getestet. Zur Elektroporation wurden sie so umgesetzt, dass sie sich zum Zeitpunkt der Transfektion in der exponentiellen Wachstumsphase befanden.

Die adhärenenten L929-Zellen wurden mit Dispase in einer Konzentration von 0.01% in CGM ohne Phenolrot 5-10 Minuten bei 37°C inkubiert, in CGM resuspendiert und einmal mit CGM gewaschen (200g, 10 Minuten).

Primäre Zellen

Primäre Zellen sind viel empfindlicher bezüglich ihrer Handhabung als Zellen aus permanenten Zelllinien. Außerdem sollten sie vor der Elektroporation nicht oft passagiert werden. Deshalb erfolgte die Elektroporation in den meisten Fällen wenige Passagen nach der Isolierung (CFB) bzw. nach dem Auftauen (ES). Ausnahmen werden in Ergebnisse 4.4. ausdrücklich erwähnt.

Die adhärenenten Zellen wurden vor dem Ablösen zweimal mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} vorsichtig gewaschen. Als Enzym wurde Trypsin ohne EDTA in einer Konzentration von 0.01% in PBS, verwendet, da man nur so eine Suspension von einzelnen Zellen erhält. Bei Behandlung mit Dispase bleiben die Zellen in Cluster zusammen. Die Zellen wurden 5 Minuten mit Trypsin bei 37°C inkubiert, in CGM resuspendiert und einmal mit CGM gewaschen (200g, 10 Minuten).

Einstellen der Osmolalität des Elektroporationsmediums

In ersten Vorexperimenten wurde die optimale Osmolalität des Porationsmediums für die jeweiligen Zellen bestimmt. Die Zellen wurden in Porationsmedium (30 mM KCl, soweit nicht anders angegeben) mit 100 mosmol/kg für ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Waren nach dieser Inkubation weniger als 80-90% der eingesetzten Zellen lebend, wurde die Inkubation in Medium mit 150 mosmol/kg durchgeführt.

3.7.2. Durchführung der Elektroporation

Die in die Zellen einzuschleusenden Stoffe (Plasmid, Farbstoff oder Proteine) wurden in der gewünschten Konzentration in die Küvetten vorgelegt.

Bei Elektroporation bei 4°C wurden die Küvetten vor dem Befüllen auf Eis gekühlt.

Die Zellen wurden einmal mit 10 ml Porationsmedium der entsprechenden Leitfähigkeit (KCl-Konzentration) und Osmolalität gewaschen (200 g, 10 Minuten) und in Porationsmedium der gewünschten Temperatur (22°C oder 4°C) in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro ml aufgenommen. Entsprechend der verwendeten Küvetten waren das folgende Volumina: 1100 µl für Biojet; 100 µl, 400 µl und 800 µl für Multiporator.

Nach der Applikation des Feldpulses bei 22°C wurde die Zellsuspension in den Küvetten 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Bei Elektroporation bei 4°C wurden die Küvetten mit der Zellsuspension für 2 Minuten auf Eis gestellt, gefolgt von einer Inkubation in einem Wasserbad bei 37°C für 8 Minuten.

Anschließend wurden die Zellen mit einer Pasteurpipette vorsichtig entnommen und in 5 ml CGM ohne Phenolrot gewaschen. Danach wurden die Zellen in das jeweilige Kulturmedium in der für die Zellen geeigneten Zelldichte überführt.

3.8. Synchronisation der Zellkulturen

Permanente Fibroblasten-Zelllinie L929

Für die Transfektionsexperimente in Abhängigkeit des Zellzykluses wurden die Zellen nach dem Umsetzen 24 Stunden in CGM mit 10% FCS kultiviert. Danach wurden sie für weitere 24 Stunden unter Serumentzug in Kultur gehalten, also in CGM mit 0.1% FCS. Anschließend wurden die Zellen entweder zu Elektrotransfektionsexperimenten verwendet oder, nach einem Mediumwechsel auf CGM mit 10% FCS, weiter in Kultur gehalten. Weitere Transfektionsexperimente wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Mediumwechsel durchgeführt.

Primäre Fibroblasten

Die primären Fibroblasten wurden bis zur Konfluenz in Kultur gehalten. Dieser Zeitpunkt wird im Weiteren als "0 Stunden nach dem Splitten" bezeichnet. Die Zellen wurden dann im Verhältnis 1:2 gesplittet und bis zu den Elektrotransfektionsexperimenten weiter in McCoy's Medium mit 10% FCS kultiviert.

3.9. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Das Prinzip ist die simultane Messung verschiedener physikalischer und chemischer Zelleigenschaften in einer Suspension auf Zellebene.

Die Lichtstreuung wird als physikalischer Prozess definiert, bei dem ein Partikel (hier Zelle) mit dem einfallenden Lichtstrahl in Wechselwirkung tritt. Dabei wird nur die Richtung, nicht die Wellenlänge des eingestrahnten Lichts verändert. Zelleigenschaften wie Zellgröße, Struktur der Zellmembran und intrazelluläre Bestandteile beeinflussen die Lichtstreuung. Das Licht wird nicht gleichmäßig in alle Richtungen gestreut; der größte Teil in die Vorwärtsrichtung, d.h. entlang des einfallenden Lichtstrahls, und wird als Vorwärtsstreulicht (forward scatter= FSC) bezeichnet. Da kleine Zellen Licht weniger streuen, stellt es in erster Reihe ein Maß für die Zellgröße dar. Das in rechtem Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreute Licht hängt hauptsächlich von der Granularität ab und wird als Seitwärtsstreulicht (side scatter=SSC) bezeichnet.

Unter Fluoreszenz wird das durch Strahlung angeregte Leuchten eines Stoffes verstanden. Fluoreszierende Verbindungen absorbieren in einem charakteristischen Wellenbereich Lichtenergie. Dadurch werden Elektronen auf höhere Energieniveaus gehoben. Beim Rücksprung auf das Grundniveau emittiert das Elektron ein Photon. Dieser Strahlungsübergang wird als Fluoreszenz bezeichnet.

In der Durchflusszytometrie werden zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe Laser verwendet: Argon-Laser, der Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm generiert. Beim Passieren des Analysepunktes sendet jedes Partikel aufgrund der Anregung durch das eingestrahlte Licht charakteristische Signale (Emission und Streulicht). Diese werden von Detektoren empfangen und über elektronische Schaltungen gemessen. Die digitalisierten Werte werden zur Auswertung an einen Computer übertragen.

In dieser Arbeit wurde für die Durchflußzytometrie ein FACS-Gerät verwendet. Eine typische FACS-Analyse mit GFP exprimierenden Zellen zeigt folgende Grafik. Dabei handelt es sich um eine Doppelanalyse von zwei Emissionen: mit einem Bandpassfilter 525 nm für die GFP-Fluoreszenz und ein Bandpassfilter 630 nm für die Propidiumiodid-Fluoreszenz (PI). Propidiumiodid wird allgemein verwendet, um lebende von toten Zellen zu unterscheiden.

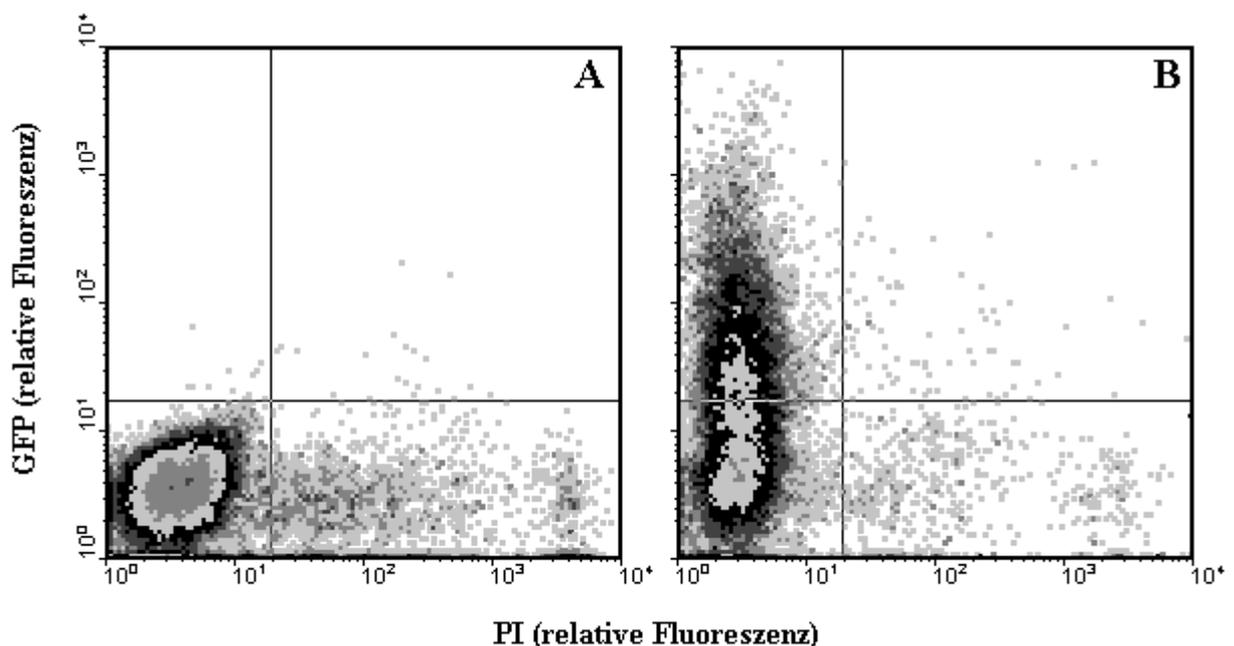


Abbildung 5: Darstellung einer FACS-Analyse von L929-Zellen, 48 Stunden nach der Elektrotransfektion (2 kV/cm, 100 μ s) mit 5 μ g/ml Plasmid pEGFP. Bild A: Kontrollzellen, mit gleicher Behandlung (Waschen, Plasmidzugabe, aber ohne Puls) wie transfizierte Zellen, Bild B.

Für die Messung der Transfektionseffizienz mit Hilfe der FACS-Analyse werden Kontrollzellen verwendet. Diese erfahren die gleiche Behandlung, einschließlich sämtlicher Medienwechsel, Waschvorgänge und Plasmidzugabe, aber ohne Applikation des elektrischen Feldpulses, wie transfizierte Zellen. Um lebende von toten Zellen zu unterscheiden, werden die Proben vor der Analyse mit 2 µg/ml Propidiumiodid (PI) bei Raumtemperatur eine Minute inkubiert.

Bei der Analyse der Messdaten werden bei den Kontrollzellen Grenzen gesetzt (Bild A), um zwischen lebenden und toten Zellen (PI negativen und positiven, X-Achse) und zwischen transfizierten und nicht-transfizierten (GFP positiv und negativ, Y-Achse) zu unterscheiden. Die Grenze für die Transfektion wird so gesetzt, dass sich bei den Kontrollzellen 0.1% aller Zellen in dem oberen linken Quadranten befinden. Entsprechend diesen Grenzen werden die anderen Proben analysiert (Bild B). Mit Hilfe eines Auswertungsprogramms (MDI) erhält man den prozentuellen Anteil der Zellen in jedem der vier Quadranten.

Eine weitere Messgröße der FACS-Analyse, die von Interesse sein kann, ist die mittlere Fluoreszenzintensität eines Teilchens. Im Folgenden wird diese Größe als Y-Wert bezeichnet. Bei der Transfektion mit pEGFP z. B. ist sie ein Maß für die Menge des exprimierten Proteins GFP.

Die FACS-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit A. Simm (Lehrstuhl für Physiologische Chemie, Uni Würzburg) durchgeführt.

3.10. Bestimmung des Zellzykluses

L929-Zellen

Für die Bestimmung des Zellzykluses wurden ca. 2×10^5 Zellen entnommen und in 70%-igem Ethanol (in PBS) mindestens 1 Stunde fixiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, in PBS aufgenommen und mit 3 µg/ml RNAase 30 Minuten bei 37°C inkubiert. 10 Minuten vor der Analyse wurden 25 µg/ml Propidiumiodid zupipettiert.

Die Analyse wurde mit einem FACS-Gerät durchgeführt. Die Auswertung und Quantifizierung erfolgte über die Software Multi2D und MultiCycle (Phoenix Flow Systems, San Diego, USA)

Primäre Zellen

Für eine Zellzyklus-Analyse wurden ca. 2×10^5 Zellen entnommen und 10 Minuten in PBS mit 2% Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden sie mit 0.1% Triton X-100 lysiert und zur Färbung der DNA für 15 Minuten mit 1.2 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33528 bei 4°C inkubiert.

Die Analyse wurde mit einem FACS-Gerät durchgeführt, bei Anregung bei 325 nm mit He-Cd- Laser. Die Auswertung und Quantifizierung erfolgte über die Software Multi2D und MultiCycle (Phoenix Flow Systems, San Diego, USA).

3.11. Auswertung

3.11.1. Berechnung der Transfektionseffizienz

Die Auswertung der Transfektion (oder des Einschleusens von fluoreszierenden Stoffen in Zellen allgemein) mit Hilfe der FACS-Analyse gibt nur den prozentuellen Anteil an positiven Zellen wieder. Diese Angabe erfolgt im Weiteren als “% FACS”.

Um aber das Überleben der Zellen nach dem Puls und während der weiteren Kultivierung in der Auswertung zu erfassen, wurden die Daten aus der FACS-Analyse auf die eingesetzte Zellzahl bezogen. Dazu wurde die Zellzahl am CASY1 vor der Analyse am FACS bestimmt. Diese Angabe erfolgt im Weiteren als “% input”. Vorteil dieses Verfahrens ist es, dass einerseits das Überleben der Zellen berücksichtigt wird, andererseits können Anwender der Elektrotransfektion, die weitere Experimente mit den Zellen planen, sofort berechnen wieviel Zellen einzusetzen sind. Der Nachteil ist, dass es bei hoher Transfektionseffizienz und stark proliferierenden Zellen zu Werten über 100% kommen kann.

3.11.2. Signifikanztest

Bei verschiedenen Messreihen wurde ein Signifikanztest durchgeführt, um festzustellen, ob sich zwei Messreihen auch in ihrer Grundgesamtheit unterscheiden, wenn sie verschiedene Mittelwerte besitzen [67]. Dazu wurde der Student-t-Test verwendet und mit Hilfe des Programms Origin 5.0 durchgeführt, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0.05. Die Prüfgröße des Tests wird mit t bezeichnet und lautet:

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{s} \cdot \sqrt{\frac{n_x \cdot n_y}{n_x + n_y}} \qquad s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2 + \sum (y_i - \bar{y})^2}{n_x + n_y - 2}} \qquad \text{Gleichung 4}$$

- \bar{x} - arithmetisches Mittel der ersten Reihe
- \bar{y} - arithmetisches Mittel der zweiten Reihe
- n_x - Umfang der ersten Reihe
- n_y - Umfang der zweiten Reihe

3.12. Künstliche Chromosomen (MACs)

3.12.1. Isolierung und Lagerung der Chromosomen

Die Isolierung von Chromosomen aus mitotischen Zellen wurde in Anlehnung an das von Cram et al. [68] erarbeitete Protokoll durchgeführt. Dieses wurde von G. Wang und A. A. Szalay (Center for Molecular Biology and Gene Therapy, Loma Linda University, Loma Linda, USA) verbessert und auf die künstlichen Megachromosomen abgestimmt. Die Isolierung erfolgte am Lehrstuhl für Biotechnologie (Uni Würzburg) in Zusammenarbeit mit G. Wang und A. A. Szalay.

Die Zellen (H1D3 und 1B3) wurden in F12-HAM-Medium in Petri-Schalen (10 cm Durchmesser) kultiviert, bis sie eine Konfluenz von ca. 75% erreichten. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen für 12-14 Stunden mit 10 µg/ml Colchicin inkubiert. Colchicin blockt mitotische Zellen in der Metaphase. Die mitotischen Zellen wurden vorsichtig ab gespült und bei 4°C mit 100 g für 10 Minuten abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in hypotonem Puffer aufgenommen (10 ml auf 10⁷ Zellen) und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert und abzentrifugiert. Je 1 ml Chromosomen-Isolationspuffer wurde zu 10⁷ Zellen dazugegeben. Indem die Zellsuspension mit einer Spritze durch eine 22G Kanüle gepresst wurden, lysierten die Zellen und die Chromosomen wurden freigesetzt. Dies wurde so oft wiederholt, bis über 90% Chromosomen und weniger als 10% Zellen in der Suspension vorlagen. Dazu wurde eine kleine Probe nach einer Doppelfärbung mit Propidiumiodid (25 µg/ml) und Hoechst 33342 (10 µg/ml) im Fluoreszenzmikroskop beobachtet.

Zur Lagerung wurden zu 1 ml dieser Chromosomen-Suspension je 1 ml dreifach konzentrierter GH-Puffer und je 1 ml Glycerol dazugegeben und vorsichtig gemischt. Die so präparierten Proben wurden bei -20°C gelagert.

3.12.2. Sortieren von künstlichen Chromosomen

Die Chromosomen wurden mit Hilfe eines FACS-Gerätes in Zusammenarbeit mit A. Simm (Lehrstuhl für Physiologische Chemie, Uni Würzburg) in künstliche und natürliche sortiert. Bei -20°C gelagerte Chromosomen wurden aufgetaut und 2-mal mit GH-Medium gewaschen (2000 g, 10 Minuten). Vor dem Sortieren wurden die Chromosomen in GH-Puffer über Nacht mit 10 µg/ml 7-AAD (für GC-reiche Regionen) und für 2-3 Stunden mit Hoechst 33258 (für AT-reiche Regionen) gefärbt. Anschließend wurde die Suspension durch ein 50 µm Polyester-Netz gefiltert. Zu je 1 ml dieser Suspension wurden 200 µl Natriumsulfit-Puffer gegeben. Als Sortierpuffer wurde ein Polyamin-Puffer verwendet. Der Hoechst-Farbstoff wurde mit der 325 nm UV-Linie eines Helium-Cadmium-Lasers und der 7-AAD-Farbstoff mit der 488 nm Linie eines Argon-Lasers angeregt. Die Emission wurde bei 450 nm bzw. bei 630 nm gemessen. Die Chromosomen wurden in Reaktionsgefäße mit doppelt konzentriertem GH-Puffer sortiert.

3.12.3. Transfer von Chromosomen in Zellen

Transfer chromosomaler DNA in Zellen

Chromosomale DNA, wie auch später die künstlichen Chromosomen, wurden in L929 Mausfibroblasten transferiert. Um die Bedingungen für den Transfer von MACs in Zellen zu finden, wurden zunächst Experimente mit allen isolierten (nicht sortierten) Chromosomen aus den H1D3- und 1B3-Zelllinien, bzw. mit den sortierten, natürlichen Chromosomen dieser Zellen durchgeführt.

Für die Experimente wurde der Proteinanteil der Chromosomen zunächst mit FITC gefärbt. Gelagerte Chromosomen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und 2-mal mit GH-Puffer gewaschen (2000 g, 10 Minuten). Anschließend wurden sie in 500 µl GH-Puffer aufgenommen und 2 Minuten mit FITC (2µM) inkubiert. Nicht gebundener Farbstoff wurde durch 2-maliges Waschen (2000 g, 10 Minuten) in GH-Puffer entfernt. Die Chromosomen wurden in einem Acetat-Puffer aufgenommen in einer Dichte von ca. 1×10^8 Chromosomen/ml.

L929-Zellen wurden entsprechend Kapitel 3.7. für die Elektroporation vorbereitet. Die Elektroporation wurde in Porationsmedium mit 10 mM KCl, isoosmolal (280 mosmol/kg), Porationsmedium mit 30 mM KCl, hypo- (100 mosmol/kg) und isoosmolal, bei 22°C und 4°C mit dem Multiporator oder Bio-Jet durchgeführt. In den Experimenten wurden folgende Parameter für den applizierten Feldpuls getestet: am Multiporator: 1, 2, 3, 4, 6 kV/cm mit 40 µs; am Bio-Jet: 2, 4, 8, 12 kV/cm mit 40 µs und 2, 4 kV/cm mit 1000 µs.

Nach der Elektroporation wurden die Zellen vorsichtig aus der Küvette entnommen und die Chromosomensuspension (ein Zehntel Volumen der Zellsuspension) zupipettiert.

Auch für die weitere Behandlung der Zellen wurden verschiedene Verfahren untersucht:

- die Chromosomen-Zell-Suspension wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur (22°C) oder auf Eis (4°C) inkubiert.
- die Chromosomen-Zell-Suspension wurde 3 Minuten bei 4°C bei 250 g zentrifugiert und anschließend 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Nach der jeweiligen Behandlung wurde die Chromosomen-Zell-Suspension bei Raumtemperatur einmal in 10 ml CGM gewaschen. Die Zellen wurden danach in CGM ohne Phenolrot (1×10^5 - 4×10^5 Zellen/ml) aufgenommen und kultiviert.

Auswertung

Die Auswertung des Transfers von chromosomaler, FITC-markierter DNA in L929-Zellen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Die elektroporierten Zellen wurden für 24 oder 48 Stunden kultiviert. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und Propidiumiodid (PI) wurde in einer Konzentration von 25 µg/ml dem Medium hinzugefügt. Am Fluoreszenzmikroskop konnte man so intrazelluläre chromosomale DNA an der grünen FITC-Fluoreszenz erkennen, während extrazelluläre chromosomale DNA an der roten Fluoreszenz von Propidiumiodid zu erkennen war.

Eine noch bessere Beurteilung des erfolgten Transfers von chromosomaler DNA war durch eine Dreifach-Färbung möglich. Dazu wurden die Zellen 24 Stunden nach der Elektroporation 1:2 umgesetzt und 48 Stunden nach der Poration auf Objektträger umgesetzt. Weitere 24 Stunden später wurden die Zellen 2-mal mit PBS gewaschen und mit 2% Formaldehyd in PBS für 9 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Die Objektträger mit den Zellen wurden in PBS mit 25 µg/ml Propidiumiodid überführt und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3-mal mit PBS gewaschen und 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 0.1% Triton X-100 in PBS inkubiert. Nach der Öffnung der Membran durch Triton wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in PBS mit 6 µg/ml Hoechst 33258 überführt. Nach dieser Behandlung wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Diese Dreifach-Färbung ermöglichte ein eindeutiges Urteil über den Transfer chromosomaler DNA in die Zellen, da intrazelluläre chromosomale DNA an den FITC markierten Proteinen und an der Hoechst 33258 markierten DNA – außerdem Propidiumiodid negativ- zu erkennen war.

Neben der Anzahl an Zellen mit intrazellulärer chromosomaler DNA, welche im Fluoreszenzmikroskop abgeschätzt wurde, war ein weiteres Kriterium für die Effizienz des Transfers die Anzahl lebender Zellen 24 bzw. 48 Stunden nach der Elektroporation.

Transfer von künstlichen Chromosomen (MACs) in Zellen

Die künstlichen Chromosomen (100 000 Chromosomen) wurden nach dem Sortieren einmal in GH-Puffer gewaschen (2000 g, 10 Minuten) und in 10 µl Acetat-Puffer aufgenommen. Die L929-Zellen wurden entsprechend dem Protokoll Kapitel 3.7. für die Elektroporation vorbereitet. Es wurden $1 \cdot 10^5$ Zellen verwendet. Die Elektroporation wurde am Multiporator in Porationsmedium mit 30 mM KCl, isoosmolal, bei 4°C in einer 100 µl Küvette bei folgenden Parametern durchgeführt: 2 kV/cm, 40 µs. Sofort nach der Elektroporation wurden die Zellen vorsichtig aus der Küvette entnommen, mit der Chromosomen-Suspension gemischt und 3 Minuten bei 4°C, 250g zentrifugiert. Anschließend wurden sie für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Waschen mit CGM ohne Phenolrot wurden die Zellen danach in CGM ohne Phenolrot ($1 \cdot 10^5$ Zellen/ml) aufgenommen und kultiviert.

3.12.4. Nachweis des Gentransfers durch künstliche Chromosomen

Selektion mit Hygromycin B

48 Stunden nach der Elektroporation der L929-Zellen wurde mit der Selektion begonnen. Die Zellen wurden in CGM mit 350 µg/ml Hygromycin B kultiviert. Parallel dazu wurden als Kontrolle unbehandelte L929-Zellen im gleichen Medium kultiviert, die nach 5-6 Tagen abstarben.

Nachweis von β -Galaktosidase

Die L929-Zellen wurden 48, 72 und 96 Stunden nach der Elektroporation auf Expression von β -Galaktosidase untersucht. Die Zellen wurden 2-mal mit je 1 ml PBS (1% FCS) gewaschen und mit folgender Lösung (1 ml) 5 Minuten bei Raumtemperatur fixiert: 0.2% Glutaraldehyd, 1% Formaldehyd in PBS mit 1% FCS. Anschließend wurden die Zellen 2-mal mit je 1 ml PBS (1% FCS) gewaschen und mit 1 ml X-Gal-Lösung (1 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid, 4 mM $K_4Fe(CN)_6$, 2 mM $MgCl_2$ in PBS mit 1% FCS) über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte am Mikroskop.

3.13. Zellkonzentrierung in Suspension

3.13.1. Negative Dielektrophorese in leitenden Medien

Das Verhalten von Zellen in leitenden Medien unter Einwirkung eines elektrischen Wechselfeldes wurde mit Hilfe von Erythrocyten in PBS untersucht. Dazu wurde ein Tropfen Blut in PBS mit 1% FCS resuspendiert. Um eine mikroskopische Beobachtung der Vorgänge zu ermöglichen, wurde eine geringe Zelldichte (ca. $1 \cdot 10^6$ Erythrocyten pro Milliliter) eingestellt. Die Experimente wurden mit Konstruktionen durchgeführt, die im Laufe dieser Arbeit entwickelt und am Lehrstuhl für Biotechnologie (Uni Würzburg) gebaut wurden. Eine genaue Beschreibung dieser Konstruktionen ist in Kapitel 4. zu finden.

3.13.2. Konzentrierung von Zellen in leitendem Medium

Für die Experimente wurde Vollblut, verdünntes Blut und Jurkat-Zellen in Kulturmedium verwendet. Für die Verdünnung wurde Vollblut im Verhältnis 1:1 mit PBS (1% FCS) gemischt, bzw. wurden einige Tropfen Blut in PBS suspendiert. Im letzten Fall wurde eine Verdünnung von ca. 1:1000 hergestellt. Hier betrug die Teilchendichte zwischen $1 \cdot 10^6$ und $3 \cdot 10^6$ pro ml (Blut enthält ca. $6 \cdot 10^9$ Erythrocyten pro ml). Die Leitfähigkeit der Lösung lag bei ca. 14 mS/cm bei 24°C.

Für die Zellkonzentrierung wurden Konstruktionen entwickelt, die am Lehrstuhl für Biotechnologie gebaut wurden und in Kapitel 4 beschrieben sind. Das Absaugen des Mediums erfolgte über eine Hamiltonspritze, die mit einem Dosierer der Firma Eppendorf oder einem Schrittmotor der Firma Physik Instrumente verbunden war.

Für die Experimente wurde die Zellsuspension auf Objektträger bzw. in den entsprechenden Behälter pipettiert. Um den Einfluss des elektrischen Wechselfeldes auf Zellen zu untersuchen, wurde ein E-Feld mit einer Frequenz von 0 bis 5 MHz und einer Amplitude von 0 bis 50 V angelegt. Die Absauggeschwindigkeit war im Bereich von Mikroliter in der Sekunde.

Es wurden bei den angegebenen Parametern ca. 100-120 μl abgesaugt.

Jedes Experiment wurde 3 mal durchgeführt. Die abgesaugte Suspension wurde gesammelt und die Teilchendichte wurde in je 3 Messungen mit Hilfe des CASY1 bestimmt. Die Anzahl der intakten Zellen wurde mittels einer lebend/tot-Bestimmung ebenfalls am CASY1 gemessen. Die Vitalität von Erythrocyten wurde zusätzlich bei einigen Experimenten spektroskopisch untersucht. Dazu wurde die Absorbtion von Hämoglobin bei 415 nm im Überstand der abgesaugten Proben gemessen.