

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die wissenschaftlichen und technischen Voraussetzungen zu schaffen, um eine effiziente Elektroporation von großen aber auch kleinen Zellzahlen zu erreichen. Ein großer Teil der Arbeit diente der Entwicklung eines neuen Elektroporationsgerätes, des Multiporators verwendet. Dazu wurden unterschiedlichste Zelltypen mit dem Plasmid pEGFP transfiziert. Dabei wurde der Einfluß verschiedener Elektrodenmaterialien, der Temperatur, unterschiedlicher Porationsmedien und der Plasmidkonzentration auf die Transfektionseffizienz untersucht. Die Ergebnisse sind schrittweise in die Entwicklung des Multiporators eingeflossen, so dass jetzt ein Gerät zur Verfügung steht, das durch ein optimales System aus Technik, Komponenten und Verfahren die Transfektion von Zellen mit sehr hohen Ausbeuten ermöglicht.

Anders als die bisherigen Geräte, wird hier eine Technik von μ -Pulsen, d.h. Feldpulse mit hoher Amplitude und einer Länge im Mikrosekunden-Bereich benutzt. Die synergetischen Effekte der Komponenten (Zusammensetzung, Hypoosmolalität, geringe Leitfähigkeit des Mediums, Elektrodenmaterial) der μ -Puls Technik tragen dazu bei, dass sehr hohe Ausbeuten bei der Elektrotransfektion von Zellen erzielt werden. Unter diesen Bedingungen ist der Bereich der optimalen Parameter für die Elektroporation aufgrund der integrierten Laplacegleichung vorhersagbar. Die in dieser Arbeit erarbeiteten Standardprotokolle sind im Anhang zu finden.

Mit Hilfe dieser Technik konnte zum ersten Mal der Gentransfer durch künstliche Säugerzell-Chromosomen (MACs) nachgewiesen werden. Die künstlichen Chromosomen konnten durch eine neue Kombination von Fluoreszenzfarbstoffen von den natürlichen Chromosomen getrennt werden. Dies ermöglicht die Verwendung von einfachen FACS-Geräten, die nicht speziell für das Sortieren von Chromosomen ausgerüstet sind. Der Mechanismus der Aufnahme der künstlichen Chromosomen in die Zelle beruht auf der Elektrointernalisation. Die ganzen künstlichen Chromosomen konnten in L929-Zellen in ihrer ursprünglichen Morphologie nicht mehr nachgewiesen werden. Die Expression der Gene, die sich auf den künstlichen Chromosomen befinden, wurde aber eindeutig bewiesen.

Eine weitere Anwendung der Elektroporation mit dem hier entwickelten Gerät liegt in der Transfektion von primären Zellen. Anders als bei permanenten Zelllinien steht bei primären Zellen nur eine begrenzte Anzahl von Zellen zur Verfügung. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Elektrotransfektion primärer Cardiofibroblasten und embryonaler Stammzellen bei optimalen Bedingungen mit sehr hohen Ausbeuten möglich ist. Der entscheidende Punkt für eine hohe Transfektionseffizienz ist der Zellzyklus. Die Ergebnisse beweisen, dass sowohl bei primären Zellen als auch bei Zellen aus permanenten Linien, der Anteil der Zellen in der S-Phase proportional zu Effizienz der Elektrotransfektion ist.

Für weitere biotechnologische Anwendungen der Elektroporation gewinnt die Manipulation des Genoms und Cytosols von kleinen Zellzahlen eine immer größere Bedeutung. Deshalb wurde in dieser Arbeit ein Konzept entwickelt, das als Basis für ein neues Elektroporationssystem benutzt werden kann. Die entwickelte Apparatur kann Zellen in leitenden Medien aufkonzentrieren. Dadurch könnten Arbeitsschritte wie Pipettieren und Zentrifugation eingespart werden und die Elektroporation unter Elektrodeformation durchgeführt werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse können einen wichtigen Beitrag in der Entwicklung der modernen Gentherapie leisten. Die μ -Puls Technik und die Mechanismen des Gentransfers (Gentransfer durch künstliche Megachromosomen und Einfluß der S-Phase auf die Transfektionseffizienz) eröffnen die Möglichkeit Zellen, die bisher noch nicht oder mit nur sehr geringen Ausbeuten transfiziert werden konnten, mit sehr hoher Effizienz genetisch zu manipulieren. Die vorgestellte Apparatur kann als Grundlage für eine neue Generation von Elektrotransfektionsgeräten dienen.