

1. Einleitung

Der Einfluss elektrischer Felder auf Zellen und damit verwandter Phänomene ist schon seit langem Objekt wissenschaftlicher Untersuchungen. So wurde schon in den 20-er und 30-er Jahren dieses Jahrhunderts von dielektrischen Effekten [1] und vom Zusammenbruch der Zellmembran durch ein elektrisches Feld berichtet [2]. Erst in der zweiten Hälfte des Jahrhunderts fanden diese elektrisch induzierten Effekte eine biotechnologische Anwendung. So konnten Pohl und Hawk 1966 lebende von toten Zellen mittels Dielektrophorese trennen [3].

Sale und Hamilton zeigten ein Jahr später [4,5], dass Bakterien und Hefen durch elektrische Felder hoher Intensität und kurzer Dauer getötet werden können. Sie führten diesen Effekt auf den irreversiblen elektrischen Durchbruch der Zellmembran zurück. Im Jahre 1973 bewies Zimmermann, dass bei entsprechend gesetzten Feldparametern auch der reversible elektrische Durchbruch der Membran möglich ist [6].

Heute versteht man unter dem Begriff "Elektromanipulation von Zellen" in der Literatur folgende Phänomene und Anwendungen:

- Die reversible Permeabilisierung der Zellmembran in gepulsten Feldern hoher Intensität und kurzer Dauer [7,8].
- Elektrofusion von Zellen, die in hochfrequenten elektrischen Wechselfeldern in Kombination mit gepulsten Feldern induziert wird [8,9].
- Zellbewegung in sich zeitlich verändernden nieder- und hochfrequenten Wechsel-, Dreh- und Wanderwellen-Feldern. Die dabei auftretenden Phänomene sind unter den Begriffen Dielektrophorese, Elektrorotation, Elektrodeformation und Elektrolevitation bekannt [10-15].

Der reversible elektrische Durchbruch wurde zunächst von Zimmermann und seinen Mitarbeitern genutzt, um impermeable Stoffe mit unterschiedlichen Molekulargewichten, wie Farbstoffe oder Proteine, in Zellen einzubringen [16-18]. Kurze Zeit später konnten Auer et al [19] die Aufnahme von DNA und RNA in Zellen mit Hilfe des elektrischen Durchbruchs zeigen. Bei den oben aufgezählten Anwendungen wurde die Integrität und die Vitalität der Zellen aufgrund des reversiblen elektrischen Durchbruchs nicht beeinträchtigt

Die Entdeckung des reversiblen elektrischen Durchbruchs führte zu einer, wie sich im Laufe der Jahre zeigen sollte, der wichtigsten Methoden der genetischen Manipulation von Zellen und ist heute unter dem Namen Elektroporation (oder Elektropermeabilisierung) weit verbreitet. Es wurde damit eine Möglichkeit geschaffen, durch die Elektroinjektion von Fremd-DNA die genetischen Eigenschaften von Zellen gezielt zu verändern. Im Gegensatz zu anderen Gentransfertechniken, die z. B. Chemikalien oder inaktivierte Viren verwenden (siehe Kapitel 2), ist die Elektropermeabilisierung eine sehr effiziente und kontrollierbare Methode.

Laufe der Jahre zeigen sollte, der wichtigsten Methoden der genetischen Manipulation von Zellen und ist heute unter dem Namen Elektroporation (oder Elektropermeabilisierung) weit verbreitet. Es wurde damit eine Möglichkeit geschaffen, durch die Elektroinjektion von Fremd-DNA die genetischen Eigenschaften von Zellen gezielt zu verändern. Im Gegensatz zu anderen Gentransfertechniken, die z. B. Chemikalien oder inaktivierte Viren verwenden (siehe Kapitel 2), ist die Elektropermeabilisierung eine sehr effiziente und kontrollierbare Methode.

Eng verknüpft mit der Entdeckung des reversiblen elektrischen Durchbruchs ist die Entwicklung der Elektrofusion. Die elektrisch induzierte Fusion wurde 1978 von Zimmermann et al beschrieben [20] und eröffnete neue Perspektiven in Bio- und Gentechnologie, Agrikultur und Immunologie.

Diese Technik ermöglicht das Verschmelzen von zwei oder mehreren Zellen und so die Kombination ihrer Genome, wodurch sie eine große Rolle in der Pflanzenzucht [21] und in der Produktion von Hybridoma-Zellen [22, 23] spielt. Hybridoma-Zellen werden aus der Fusion von Antikörper produzierenden Lymphozyten und Myelomzellen gewonnen. Man erhält daraus Hybridzellen, die in Permanentkultur den gewünschten monoklonalen Antikörper produzieren.

Die elektrisch induzierte Fusion von Zellen läuft in zwei aufeinander folgenden Schritten ab. Im ersten Schritt werden die Zellen durch Dielektrophorese (siehe Kapitel 2) in einem inhomogenen Wechselfeld in engen Membrankontakt gebracht. In einem zweiten Schritt wird durch einen elektrischen Feldpuls hoher Intensität und kurzer Dauer ein reversibler elektrischer Durchbruch der Zellmembran in der Kontaktzone erzeugt. Während des Ausheilprozesses können sich Lipidbrücken zwischen den Membranen beider Zellen ausbilden, so dass die Membranen in der Kontaktzone nicht mehr separat ausheilen, sondern ein gemeinsames Fusionsprodukt bilden [24, 25].

Der erste Schritt der Elektrofusion, die Herstellung des Membrankontakts zwischen den Zellen mittels Dielektrophorese, bietet die Möglichkeit, Zellen schonend mit Hilfe von elektrischen Feldern zu bewegen. Obwohl dieses Phänomen schon seit langem bekannt ist [1], wurde es doch erst 1968 von Crane und Pohl auf lebende Zellen angewendet [10]. Bei der Dielektrophorese handelt es sich um die Bewegung von Teilchen (auch neutralen Teilchen) in einem inhomogenen elektrischen Feld, aufgrund der unterschiedlichen Feldstärke zu beiden Seiten des in dem Teilchen induzierten Dipols [11]. Diese Technik bietet die Möglichkeit, Zellen schonend und ohne mechanischen Stress kontrolliert zu bewegen (siehe Kapitel 2).

Die Anwendung der elektrischen Feldtechniken, insbesondere der Elektroporation, setzte erhebliche physikalische Kenntnisse und den Einsatz von Hochspannungspulsgeräten voraus, die einen hohen Sicherheitsstandard erforderten. Ziel dieser Arbeit war, die technischen und wissenschaftlichen Voraussetzungen zu schaffen, um eine effiziente Poration aller Zelltypen, in großer wie auch kleiner Zellzahl zu ermöglichen.

Die Elektroinjektion entwickelte sich in den letzten Jahren zu einer der wichtigsten Methoden für die Manipulation des Genoms und des Cytosols [7, 26, 27]. Der Vorteil dieser Methode liegt in ihrer hohen Effizienz und in der einfachen und schnellen Optimierung auf den jeweiligen Zelltyp [28, 29]. Die größte Schwierigkeit der Methode liegt in dem relativ hohen technischen Aufwand und den damit verbundenen Kosten für Gerät und Verbrauchsmaterial.

Die am weitesten verbreitete Technik benutzt elektrische Feldpulse mit relativ langer Dauer (im Bereich von Millisekunden) in hochleitenden Porationsmedien. Diese können aber zu einem irreversiblen Durchbruch der Zellmembran führen, so dass nur wenige Zellen die Applikation der Feldpulse überleben. Außerdem kann bei der Poration in hochleitenden Medien nach dem Durchbruch der Zellmembran Apoptose ausgelöst werden [30]. Ein weiteres Problem ist in der technischen Ausstattung der Hochspannungspulsgeräte zu finden. Bei vielen Geräten weicht die Pulslänge von dem eingestellten Wert ab, da die Kapazität vom Widerstand des Pulsmediums beeinflusst wird. Weitere Schwierigkeiten können besonders bei eukaryotischen Zellen durch Stoffe auftreten, die auf permeabilisierte Zellen toxisch wirken. Das können Enzyme, organische Bestandteile des Porationsmedium (wie z. B. EDTA, HEPES) oder Schwermetallionen sein. Diese können als Verunreinigungen in Chemikalien vorkommen, oder sich durch Elektrolyse aufgrund der Applikation des Feldpulses aus Elektroden lösen. Hier ist besonders Aluminium hervorzuheben, da die meisten Hersteller von Porationsgeräten aus Kostengründen Küvetten mit Aluminiumelektroden verwenden. Aluminiumionen wirken in den meisten Fällen toxisch auf Zellen, können aber unter bestimmten Umständen auch stimulierend wirken [31].

Aufgrund der oben angesprochenen Probleme kann es bei der Elektrotransfektion von Zellen zu widersprüchlichen und nicht reproduzierbaren Ergebnissen kommen. Deshalb wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Eppendorf ein neues Porationsgerät (mit entsprechendem Porationsmedium) entwickelt, das durch geeignete Techniken die oben erwähnten Probleme vermeidet.

Ein großer Teil dieser Arbeit ist ein Beitrag zur Entwicklung des Multiporators[®] in Zusammenarbeit mit der Firma Eppendorf. So wurden zum Beispiel verschiedene Elektrodenmaterialien in Bezug auf die Effizienz der Transfektion mit pEGFP getestet, ein Plasmid, das ein grün fluoreszierendes Protein exprimiert [32-36]. Dies ermöglicht eine einfache und schnelle Auswertung der Transfektion mit Hilfe der FACS-Analyse [37-39]. Außerdem wurde der Einfluss der Leitfähigkeit des Porationsmediums auf die Transfektionseffizienz untersucht. Neue Forschungsergebnisse am Lehrstuhl für Biotechnologie haben gezeigt, dass die durch die Applikation des Feldpulses induzierte elektrische Deformation der Zelle eine wichtige Rolle in der Permeabilisierung der Zellmembran spielt [13]. All diese Ergebnisse sind in die Entwicklung des Multiporators eingeflossen und führten zur schrittweisen Verbesserung des Systems. Mit Hilfe des so entwickelten Gerätes, das absolut reproduzierbare Bedingungen für die Elektroporation von Zellen bietet, wurden für eine Reihe von Zelltypen Standardprotokolle für die Transfektion erarbeitet, die hohe Transfektionsraten garantieren.

Des Weiteren konnte mit dieser Technik die Elektointernalisation von künstlichen Megachromosomen und die Expression der sich darauf befindenden Gene nachgewiesen werden.

Durch die für die Zellen sehr schonende Technik des Multiporators konnten auch primäre Zellen mit sehr hohen Ausbeuten transfiziert werden. In diesem Zusammenhang konnte eine Methode entwickelt werden, beruhend auf dem Zellzyklus, die eine weitere Steigerung der Transfektionseffizienz ermöglicht.

Der beschränkende Faktor für eine medizinisch, therapeutische Anwendung der genetischen Manipulation ist gerade bei primären Zellen ihre geringe Anzahl. Deshalb wurde eine Apparatur entwickelt, die es ermöglicht, Zellen sehr schonend ohne größere Verluste mit Hilfe der Dielektrophorese aufzukonzentrieren und für die Manipulation vorzubereiten.

Durch diese Techniken werden neue Perspektiven in der Gentechnik eröffnet, da bei den meisten Gentransfertechniken einerseits die Größe der Fremd-DNA, andererseits die Zellzahl die entscheidenden Faktoren sind.