

5. Diskussion

5.1. Manipulation des Genoms mit Hilfe der Elektroporation

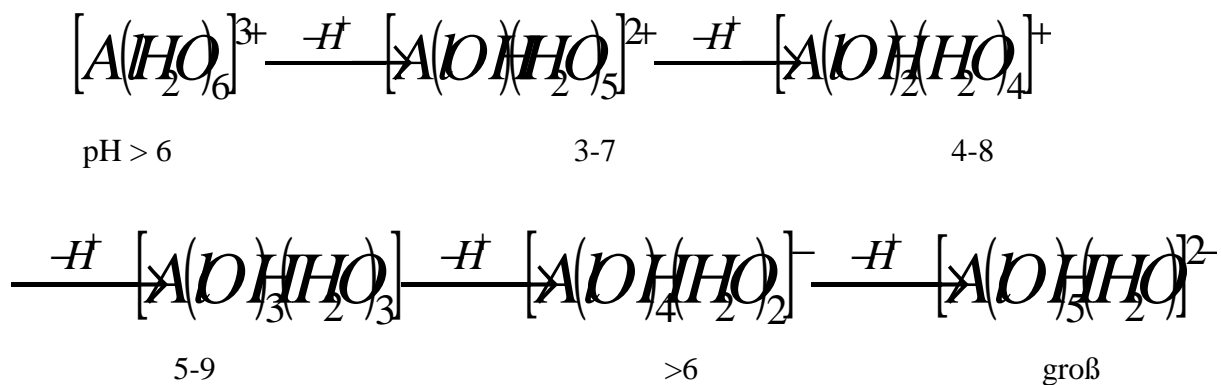
Einfluss von Aluminiumionen auf die Elektrotransfektion

Die Elektroporation ist eine sehr effiziente Technik bei der Manipulation des Genoms oder des Cytosols von Säugerzellen. Eine ihrer wichtigsten Anwendungen ist die Elektrotransfektion. Um dabei hohe Ausbeuten zu erzielen, ist das Überleben einer großen Anzahl von Zellen äußerst wichtig. Einer der Faktoren, die zum Absterben vieler Zellen nach der Elektroporation führen kann, ist die Aufnahme von toxischen Schwermetallionen durch die permeabilisierten Zellen. Selbst bei der Verwendung hochreiner Chemikalien für das Porationsmedium können Metallionen auftreten. Diese können durch Elektrolyse aufgrund der Applikation des Feldpulses aus der Elektrode gelöst werden. Für die Elektrotransfektion von Zellen werden üblicherweise Einwegküvetten mit Elektroden aus Aluminium verwendet. Es ist bekannt, dass in Verbindung mit einfachen Elektroporationsgeräten bei der Applikation des Spannungspulses mit einer Dauer im Bereich von Millisekunden Aluminiumionen freigesetzt werden, die auf die Zellen toxisch wirken können [7, 31].

Aus diesem Grunde wurden bei der Entwicklung des Multiporators zuerst eine Reihe von Elektrodenmaterialien getestet. Erste Transfektionsexperimente am BioJet-Gerät mit L929-Zellen haben gezeigt, dass durch Verwendung von Elektroden aus Edelstahl bei der Elektroporation die höchsten Ausbeuten erzielt werden (Abb. 6). Danach folgen Elektroden aus Aluminium und Glas-Kohlenstoff, während Elektroden aus Titan und Aluminium-Kupfer für die Elektrotransfektion ungeeignet sind. Entsprechend diesen Ergebnissen wurden für einen ersten Prototyp des Multiporators Küvetten mit Elektroden sowohl aus Edelstahl als auch aus Aluminium gefertigt.

Für die weitere Entwicklung des Multiporators in Bezug auf das Elektrodenmaterial wurde die μ -Puls Technik in gering leitenden Medien mit einem herkömmlichen Gerät (Gene Pulser II, Biorad) und dessen Technik von Pulsen mit einer Dauer im Millisekunden-Bereich verglichen.

Experimente am Gene Pulser II in leitenden Medien (PBS) in Küvetten mit Aluminiumelektroden haben gezeigt, dass es bei Verwendung von Standardprotokollen (0.55 kV/cm, 950 µF) nach Applikation des Spannungspulses zu pH-Änderungen im Bereich der Elektroden kommt. Durch die Verwendung von chemischen Indikatoren wurde eine pH-Änderung an der Anode von 7.2 auf ca. 3-4 nachgewiesen, an der Kathode von 7.2 auf ca. 8-10 [69]. Während des Spannungspulses werden durch die Elektrolyse von Wasser an der Anode H⁺-Ionen und an der Kathode OH⁻-Ionen freigesetzt. Aluminium geht sowohl im Sauren wie im Alkalischen in Lösung [Hollemann]. In einigen Fällen konnte der weiße, gallertartige Niederschlag des amphoteren Al(OH)₃ nachgewiesen werden. Bei kleinen Konzentrationen (wie sie hier nachgewiesen wurden, siehe 4.3.) liegt Al³⁺ in Form verschiedener Aluminate in Abhängigkeit vom pH-Wert vor [70]:



Bei Experimenten mit Küvetten mit Aluminiumelektroden am Multiporator (unter Verwendung der µ-Puls-Technik) und niedrigleitendem Porationsmedium konnten mit Hilfe chemischer Indikatoren keine pH-Änderungen nachgewiesen werden [69].

Für eine quantitative Bestimmung der Aluminiumkonzentration im Medium nach dem Puls wurden Proben entnommen und mittels Atomabsorptionsspektroskopie AAS (H. Pette Institut, Hamburg) und/oder Atomemissionsspektroskopie AES (Lehrstuhl für Botanik, Uni Würzburg) analysiert. Die Ergebnisse sind in Kapitel 4.3. dargestellt. Die großen Schwankungen (Standardfehler) erklären sich durch die Verwendung unterschiedlicher Methoden, aus deren Ergebnissen ein Mittelwert gebildet wurde.

Bei den Versuchen mit dem Multiporator der Firma Eppendorf als auch mit dem Gene Pulser II der Firma Biorad wurden Pulsparameter verwendet, die den jeweiligen Standardprotokollen entsprechen. Dabei wurden beim Multiporator Aluminiumkonzentrationen von 6 µM bis 47 µM gemessen und beim Gene Pulser II von 298 µM bis 977 µM.

Da es sich bei diesen Methoden um zwei unterschiedliche Techniken handelt (beim Multiporator werden Pulse mit hoher Amplitude und kurzer Dauer, beim Gene Pulser II Pulse kleinerer Amplitude und langer Dauer verwendet), fällt ein direkter Vergleich schwer. Deshalb wurde als Kriterium die effektiv freigesetzte Ladungsmenge Q während des Spannungspulses gewählt, die nach folgender Gleichung berechnet wurde:

$$Q(t) = \frac{U_0}{R} \int_0^{5\tau} e^{-\frac{t}{\tau}} dt \quad \text{Gleichung 5}$$

- | | |
|--------|--|
| $Q(t)$ | - Ladungsmenge in der Zeit t [C] |
| U_0 | - eingestellte Spannung am Gerät [V] |
| R | - Widerstand des Systems Elektroden mit Medium [W] |
| τ | - eingestellte Zeitdauer des Pulses [s] |

Die so berechneten Werte für die freigesetzte Ladungsmenge sind in folgendem Diagramm zusammengefasst:

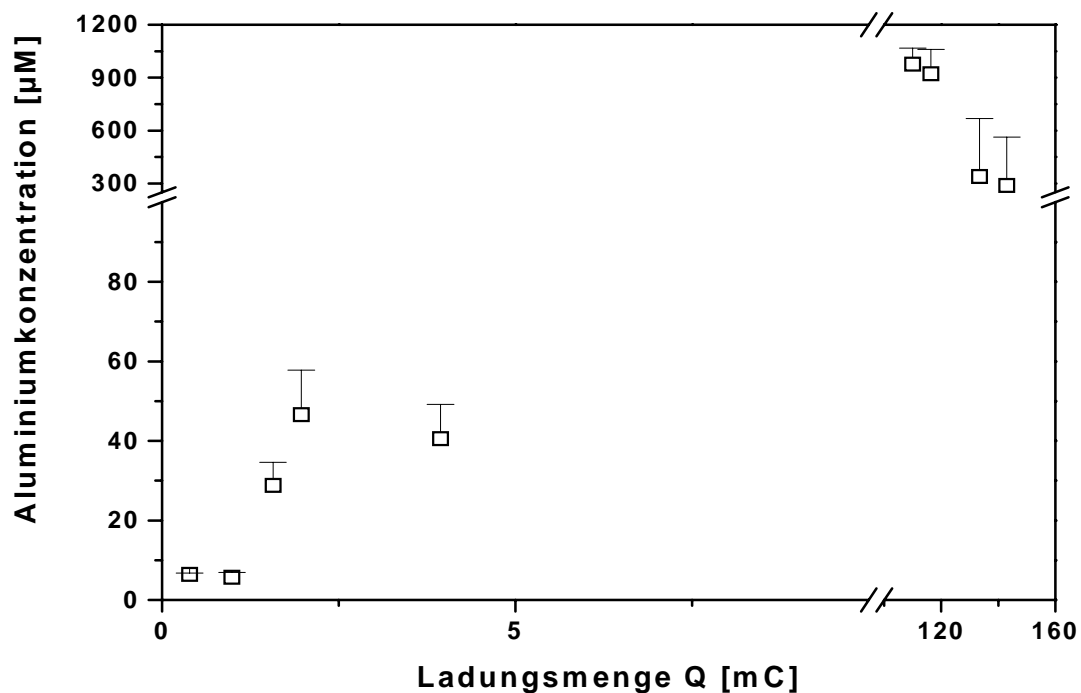


Abbildung 59: Abhängigkeit der Aluminiumkonzentration von der freigesetzten Ladungsmenge Q während der Applikation des Feldpulses am Multiporator und Gene Pulser II.

Das Diagramm in Abb. 59 zeigt, dass eine Proportionalität zwischen der im Medium bestimmten Aluminiumkonzentration nach dem Puls und der berechneten, durch den Puls freigesetzten Ladungsmenge besteht. Die Feldpulse mit dem Multiporator setzten Ladungen von unter 4 mC frei und es wurden Aluminiumkonzentrationen von unter 50 mM gemessen. Beim Gene Pulser II wurden Ladungsmengen von über 100 mC berechnet und Aluminiumkonzentrationen von fast 1 mM gemessen.

Die Berechnung der freigesetzten Ladungsmenge durch die Applikation des Feldpulses zeigen, dass beim Multiporator durch die Verwendung der μ -Puls Technik in Porationsmedien mit geringer Leitfähigkeit keine oder nur in sehr geringem Maß Elektrolyse auftritt. Dementsprechend konnte auch keine pH-Änderung in unmittelbarer Nähe der Elektroden festgestellt werden und somit auch nur eine geringe Konzentration von Al^{3+} -Ionen bestimmt werden.

Neben diesen, zum Teil nur theoretischen, Ergebnissen wurde für die Entwicklung des Multiporators eine Reihe von Experimenten durchgeführt, um den Einfluss der Elektroporation in Küvetten mit Elektroden aus Edelstahl und Aluminium in Bezug auf die Freisetzung von Aluminiumionen direkt auf die Zellen zu untersuchen. Die toxische Wirkung von Aluminiumionen auf biologische Systeme ist schon länger bekannt und dokumentiert [71]. Loomis-Husselbee [31] berichtet vom Einfluss von durch Elektroporation freigesetzten Al^{3+} -Ionen auf den Metabolismus von L1210-Zellen. Allerdings ist der ambivalente Charakter der Aluminiumionen auf Zellen hervorzuheben [72]. In kleinen Konzentrationen (10-50 μ M) kann Al^{3+} stimulierend auf die Zellteilung wirken, in höheren Konzentrationen verhindert es das Zellwachstum, wie an Mausosteoblasten bewiesen wurde [73]. Der kritische Grenzwert der Aluminiumkonzentration ist aber sicher spezifisch für jeden Zelltyp [69].

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Vielzahl von Versuchen zur Transfektionseffizienz bei der Elektroporation in Küvetten mit Aluminium- bzw. Edelstahlelektroden durchgeführt. Aus den Ergebnissen dieser Experimente lässt sich die Aussage treffen, dass unter optimalen Bedingungen bei der Elektrotransfektion mit dem Multiporator kein signifikanter Unterschied in der Ausbeute der Transfektion festzustellen ist (weder bei den 4 untersuchten Zelllinien, noch bei den primären Fibroblasten). Bei einer genauen Analyse, besonders bei nicht optimalen Bedingungen, sind Unterschiede zu beobachten, die mit der Wirkung der Al^{3+} -Ionen zu erklären sind.

Ein Unterschied ist in der Anzahl der lebenden Zellen 3 Stunden nach der Elektroporation zu finden. Erfolgte die Elektroporation in Küvetten mit Aluminiumelektroden, beträgt die Zahl der lebenden Zellen 45-70% der eingesetzten Zellen, bei Verwendung von Edelstahl-elektroden sind es jedoch 55-80%.

Wenn auch in der Ausbeute keine signifikanten Unterschiede zu vermerken sind, so ist doch zu beobachten, dass bei Raumtemperatur die Effizienz der Transfektion bei der Verwendung von Aluminiumelektroden leicht höher war. Eine Erklärung für diesen Trend kann der auf das Zellwachstum stimulierende Effekt von Al^{3+} sein. Dies wird deutlich, wenn man die Zellzahlen 48 Stunden nach der Elektroporation betrachtet. Bis auf Jurkat-Zellen zeigen fast alle mit Aluminiumelektroden durchgeführten Experimente eine höhere Zellzahl als die mit Edelstahlelektroden. Besonders bei L929-Zellen und den Porationsparametern von 2 kV/cm, 100 μs ist ein signifikanter Unterschied festzustellen. Erst bei diesen Parametern reicht die freigesetzte Ladungsmenge durch den Puls aus, um die nötige Aluminiumkonzentration für die Stimulation zu erreichen, da die Zellzahl sogar größer als die der nicht der Elektroporation ausgesetzten Zellen ist.

Die Sensibilität der L929-Zellen wird an zwei weiteren Beispielen deutlich. Bei der Elektrotransfektion dieser Zellen bei 4°C ist folgender Trend zu beobachten: mit steigender Amplitude des Feldpulses nimmt die Ausbeute bei der Verwendung von Aluminiumelektroden ab, während sie bei Edelstahlelektroden zunimmt. Durch das langsamere Ausheilen der Plasmamembran bei 4°C diffundieren mehr Al^{3+} -Ionen in die Zellen, der Grenzwert wird überschritten und die toxische Wirkung des Aluminiums kommt zum Tragen. Ein weiteres Beispiel ist bei dem Vergleich der verschiedenen Elektrodenmaterialien zu finden (Kapitel 4.1.). Bei diesen Experimenten wurde die Elektrotransfektion mit dem Bio-Jet-Gerät bei 6 kV/cm, 40 μs durchgeführt. Dabei wurden nach Gleichung 5 ca. 40 mC freigesetzt. Ein linearer Fit im Diagramm Abb. 59 ergibt eine Aluminiumkonzentration von ca. 300 μM , viel größer als bei den Versuchen mit dem Multiporator. Vergleicht man den Anteil der transfizierten Zellen 48 Stunden nach der Elektroporation (FACS-Auswertung), so ist zwischen Aluminium- und Edelstahlelektroden kein Unterschied festzustellen. Erst in der Auswertung nach input, die auf die eingesetzte Zellzahl bezogen wird, kann ein signifikanter Unterschied beobachtet werden, der auf die toxische Wirkung von Al^{3+} -Ionen in dieser Konzentration zurückzuführen ist.

Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass die Verwendung von Küvetten mit Aluminiumelektroden am Multiporator in Verbindung mit der μ -Puls Technik keinen nachteiligen Einfluss auf die Elektrotransfektion von Zellen hat. Durch die Verwendung kurzer, genau definierter Pulse im Mikrosekunden-Bereich in Porationsmedium mit geringer Leitfähigkeit werden die Zellen weder direkt durch die Applikation des Feldpulses noch durch freigesetzte Aluminiumionen geschädigt.

Die Konzentrationen von Al^{3+} -Ionen bleibt unterhalb der toxischen Grenze. Im Gegenteil, die Al^{3+} -Ionen können in diesen niedrigen Konzentrationen sogar stimulierend auf das Zellwachstum wirken. Zusätzlich wirkt sich die Hypoosmolalität des Porationsmediums positiv aus, da dadurch für den Membrandurchbruch kleinere Amplituden des Feldpulses notwendig sind. Durch dieses System der μ -Puls Technik kann die Elektrotransfektion von Säugerzellen mit hoher Effizienz durchgeführt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse (und aus Kostengründen) werden als Verbrauchsmaterial zum System des Multiporators sterile Einwegküvetten mit Elektroden aus Aluminium angeboten. Für die Elektroporation von Säugerzellen gibt es diese in 2 Varianten: mit 2 mm Elektrodenabstand (400 μ l Volumen) und 4 mm Elektrodenabstand (800 μ l Volumen). Dadurch können Feldstärken von bis zu 6 kV/cm erreicht werden.

Elektrotransfektion von Zelllinien

Die Ergebnisse der Elektrotransfektion von permanenten Zelllinien mit pEGFP haben gezeigt, dass diese Methode hohe Ausbeuten an transient transfizierten Zellen ermöglicht. So wurden bei Mausfibroblasten L929 (Abb. 15) und bei humanen T-Lymphocyten Jurkat (Abb. 17) Werte von über 50% (Auswertung nach input) erreicht. Der Vorteil dieser Methode liegt in der einfachen Handhabung, der Abstimmung der Porationspuffer und des Multiporators aufeinander.

Die Verwendung hypoosmolaler Porationspuffer bewirkt eine Wasseraufnahme der Zelle, wodurch diese anschwillt und eine sphärische Form erreicht. Unter diesen Bedingungen kann das für den Membrandurchbruch notwendige elektrische Feld E_{krit} mit Hilfe der integrierten Laplacegleichung (Gleichung 1) berechnet werden. Durch die Vergrößerung des Zellradiuses ist das für den Membrandurchbruch benötigte elektrische E-Feld E_{krit} kleiner als in isoosmolalen Medien. Weitere Vorteile der hypoosmolalen Medien ist einerseits das Ablösen der Plasmamembran vom Cytoskelett (je nach Zelltyp), andererseits die leichtere und effektivere Permeabilisierung der unter Stress stehenden Membran. Aufgrund der Größe der Plasmide kann das für die erfolgreiche Transfektion notwendige Feld E_{opt} um Faktor 1-5 höher sein.

Zelllinie	berechnetes E_{krit} [kV/cm]		E_{opt} für Transfektion [kV/cm] [kV/cm]	
	bei 22°C	bei 4°C	bei 22°C	bei 4°C
H73C11	0.8	1.6	0.8	1.8
Jurkat	0.7	1.4	1.2	1.5
L929	0.6	1.2	2.0	4.0
Sp2	0.8	1.6	0.8	1.6

Tabelle 5: Vergleich zwischen berechnetem E_{krit} und durch Experimente bestimmtes optimales E-Feld für die Transfektion mit pEGFP in Küvetten mit Aluminium- bzw. Edelstahlelektroden im jeweiligen Porationsmedium.

Wie die Ergebnisse aus Tabelle 6 zeigen, stimmen die experimentellen Daten mit den theoretischen Berechnungen überein. Dadurch ist eine schnelle Optimierung der Parameter für die Elektrotransfektion jeder Zelllinie möglich.

Nach der Elektroporation bei 4°C ist das Ausheilen der Membran langsamer als bei Raumtemperatur. Die Aufnahme der extrazellulären Stoffe bei 4°C beruht hauptsächlich auf Diffusion [7, 74, 75]. Nicht alle eukaryotischen Zellen überleben aber eine solche Behandlung bei tiefen Temperaturen über einen längeren Zeitraum, besonders nicht in hypoosmolalem Medien. Bei 22°C ist das Ausheilen der Membran viel schneller als bei tiefen Temperaturen, die Aufnahme von extrazellulären Stoffen über Vesikelbildung wurde aber bis zu 2 Stunden nach der Elektroporation beobachtet. Dieser Vorgang wird als Elektointernalisation bezeichnet [7, 76-79]. Durch das Überführen der Zellen aus dem hypoosmolalem Pulsmedium in CGM kann die vesikuläre Aufnahme verstärkt werden.

Die Experimente mit vier Zelllinien haben gezeigt, dass (mit Ausnahme der L929-Zelle bei der Elektrotransfektion in Küvetten mit Edelstahlelektroden) die Transfektion bei 22°C zu höheren Ausbeuten führt. Während bei Jurkat-Zellen die Ausbeute bei 4°C und 22°C noch ähnliche Werte (9.1 % bzw. 11.6%) erreicht, ist bei Sp2- und H73C11-Zellen der Unterschied deutlich größer. Bei diesen beiden Zelllinien wird bei 4°C eine Transfektionseffizienz erzielt, die weniger als 50% derer bei 22°C beträgt.

Allgemein ist die Ausbeute bei Sp2- und H73C11-Zellen geringer als bei Jurkat- oder L929-Zellen. Erstgenannte Zelllinien sind Fusionsprodukte und reagieren deshalb wahrscheinlich empfindlicher auf äußere Faktoren, wie z. B. Temperatur oder Osmolalität (die Elektrotransfektion erfolgte bei diesen Zelllinien in Porationspuffer mit einer Osmolalität von 150 mosmol/kg, im Gegensatz zu 100 mosmol/kg bei Jurkat- und L929-Zellen).

Auch ein Vergleich des empirisch bestimmten E_{opt} führt zu diesem Ergebnis: die Werte E_{opt} von Sp2-Zellen und H73C11-Zellen entsprechen den berechneten E_{krit} , während sie bei Jurkat-Zellen dem 1.7-fachen und bei L929-Zellen dem 3.3-fachen E_{krit} entsprechen.

Eine Erhöhung der Pulsdauer von 40 μ s auf 100 μ s hat bei SP2- und L929-Zellen zu einer Erhöhung der Transfektionseffizienz geführt. Dieser Effekt ist vermutlich auf das schnellere Ausheilen der Membran bei Raumtemperatur zurückzuführen, das für die Elektrotransfektion größere permeabilisierte Membranflächen notwendig macht. Eine Erhöhung der Pulsdauer führt bei den anderen Zelllinien allerdings wahrscheinlich zu Störungen im Metabolismus und somit zu einer verminderten Proliferation. Dies beweist ein Vergleich der Zellzahlen 48 Stunden nach der Elektroporation.

Die Zellzahl 3 Stunden nach der Elektroporation hat bei allen Zelllinien ähnliche Werte und liegt zwischen 45 und 80 % der eingesetzten Zellzahl. Deutliche Unterschiede in der Zellzahl können 48 Stunden nach der Elektroporation beobachtet werden. Während bei SP2- und L929-Zellen in etwa eine Vermehrung auf den doppelten Wert der eingesetzten Zellzahl zu beobachten ist, bleibt die Zellzahl bei Jurkat-Zellen nach 48 Stunden unterhalb der eingesetzten. Bei H73C11-Zellen wird 48 Stunden nach der Elektroporation der Einfluss der Feldparameter deutlich. Eine Verdopplung der Zellzahl findet nur bei den optimalen, "milden" Porationsparameter statt (siehe Abb. 12).

Die hohe Transfektionseffizienz bei L929-Zellen ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass eine Zelle mehrere Plasmide bei der Elektroporation aufnimmt und diese auf ihre "Tochterzellen" verteilt. Dies beweist die viel geringere Ausbeute (ca. 4%), wenn die Zellen zur Verhinderung der Proliferation unter Serumentzug nach der Transfektion kultiviert werden (siehe 4.2.4.)

Ein anderer Beweis für diese Hypothese ist die deutliche Steigerung der Transfektionseffizienz bei H73C11- und Jurkat-Zellen durch eine Erhöhung der Plasmidkonzentration (siehe 4.2.3.). Durch eine Erhöhung der Plasmidkonzentration von 5 μ g/ml auf 10 μ g/ml können Ausbeuten von 2-bis 5-fachem Betrag erzielt werden. Eine weitere Steigerung der Ausbeute ist aufgrund des begrenzten Wachstums der Zellen wahrscheinlich nicht möglich [69].

SP2-Zellen zeigen bei einer Erhöhung der Plasmidkonzentration dagegen einen Rückgang der Ausbeute zu beobachten. Das kann auf die zelltypischen Eigenschaften dieser polyploiden Zellen zurückzuführen sein. So kann es zu Änderungen im Cytoskelett oder in der Membranfluidität kommen, was die Elektropermeabilisierung und das Ausheilen der Membran beeinflusst [80].

Elektrotransfektion von primären Zellen

Die Ergebnisse der Elektrotransfektion von Zelllinien zeigen, dass die Optimierung der Elektroporationsparameter zu hoher Transfektionseffizienz führt. Die effektive Ausbeute ist allerdings spezifisch für jeden Zelltyp und abhängig von den charakteristischen Eigenschaften des jeweiligen Zelltyps. Faktoren wie Zellwachstum, Verträglichkeit der äußeren Parameter (Temperatur, Osmolalität, Feldparameter), Anzahl der aufgenommenen Plasmide sowie Expression des Proteins sind solche zelltypischen Eigenschaften, welche die Transfektionseffizienz beeinflussen und auch zu relativ großen Schwankungen in den Ergebnissen führen können.

Aus den oben genannten Gründen war die Transfektion von primären Zellen bisher relativ ineffizient. Erschwerend kommt bei primären Zellen ihre Empfindlichkeit gegenüber äußeren Faktoren, wie z. B. Kulturbedingungen, hinzu.

Die Experimente mit primären Zellen in dieser Arbeit haben bewiesen, dass die Transfektion dieser Zellen durch Elektroporation unter optimalen Bedingungen sogar mit hoher bis sehr hoher Effizienz möglich ist. So konnten in der Auswertung nach input bei embryonalen Stammzellen Werte von über 60% und bei primären Fibroblasten über 230% erzielt werden. Die Ausbeuten können durch eine Erhöhung der Plasmidkonzentration sogar noch leicht gesteigert werden.

Im Gegensatz zu den permanenten Zelllinien ist bei den primären Zellen neben den optimalen Elektroporationsparametern auch die Behandlung der Zellen vor und nach der Transfektion von sehr großer Bedeutung. Versuche haben gezeigt, dass nur Zellen mit einer geringen Anzahl von Passagen (siehe 4.5.) und gut proliferierende Zellen zu hohen Ausbeuten führen. Besonders deutlich wird dies im Diagramm in Abb. 27. Gut proliferierende Zellen besitzen ein mittleres Zellvolumen, während kleine Zellen noch nicht proliferieren und alte Zellen mit großem Volumen nicht mehr. Bei Zellen mit mittleren Volumina wurde auch die größte Ausbeute an transfizierten Zellen gemessen.

Die Effizienz der Transfektion hängt zu einem bedeutenden Teil von der Proliferation der Zellen nach der Elektroporation ab. Dies wurde eindeutig für L929- und CFB-Zellen gezeigt.

Besonders deutlich ist es bei den ES-Zellen zu beobachten, vergleicht man die Ausbeute 24 und 48 Stunden nach der Transfektion miteinander (Abb. 29 und 30). Das Diagramm in Abb. 30 (24 Stunden nach der Elektrotransfektion) zeigt je nach Porationsparameter, Ausbeuten von 15-30 %. Nur bei höheren Parametern (1.5 kV/cm, 40 μ s) ist der Anteil der GFP-positiven Zellen deutlich größer (60% in der FACS-Auswertung). Da die Zellzahl kleiner ist, zeigt die Effizienz in der input Auswertung einen deutlich geringeren Wert. Der Y-Wert, der die relative Fluoreszenz der einzelnen Zelle beschreibt, liegt im Mittel bei ca. 7. Weitere 24 Stunden später (Abb. 29) sind die Ausbeuten auf 40-60% gestiegen. Das Maximum der Effizienz bezüglich der Parameter hat sich zu kleineren Amplituden verschoben (von 1.5 kV/cm zu 1.0 kV/cm). Das beweist, dass nur die Zellen, die durch die Elektroporation nicht zu sehr beschädigt wurden, gut proliferieren und hohe Ausbeuten erreichen. Außerdem kann man im Mittel eine Halbierung des Y-Wertes beobachten, d.h. dass eine Zelle mehrere Plasmide bei der Elektroporation aufnimmt, die dann auf die "Tochterzellen" verteilt werden (siehe L929-Zellen).

Bei Experimenten mit primären Fibroblasten wurde festgestellt, dass eine Erhöhung der Serumkonzentration im Kulturmedium zu einer deutlichen Erhöhung der Transfektionseffizienz führt. So konnte selbst bei Zellen mit einer hohen Anzahl an Passagen die Ausbeute verdoppelt werden (vergleiche Abb. 34 und 35).

Des Weiteren ist auch die Vorbereitung, also das Ablösen der Zellen, für die Elektroporation äußerst wichtig. Wie Versuche mit embryonalen Stammzellen beweisen (Abb. 28) führt nur die Behandlung mit verdünntem Trypsin ohne EDTA zu einer Einzelzellsuspension, wobei die Zellen keine Membranstörung (wie bei der Behandlung mit konzentriertem Trypsin) zeigen.

Der Vergleich der beiden Techniken (Pulse kleiner Amplitude und langer Dauer in leitenden Medien beim Gene Pulser II und Pulse hoher Amplitude und kurzer Dauer in hypoosmolalen, niedrig leitenden Medien beim Multiporator) hat gezeigt, dass der Multiporator überlegen ist. Die Elektrotransfektion der Zellen nach dem in dieser Arbeit am Multiporator entwickelten Protokoll hat mehrere Vorteile. Grundlage ist das richtige Ablösen der Zellen mit verdünntem Trypsin ohne EDTA. Durch diese Methode wird die Integrität der Zellmembran bewahrt (siehe oben) und der Komplexbildner EDTA mit seiner toxischen Wirkung [7, 81, 82] vermieden.

Einfluss des Zellzykluses auf die Transfektionseffizienz

Trotz der verbesserten Verfahren (bez. dem Ablösen der Zellen, den Kulturbedingungen vor und nach der Transfektion) für die Elektrotransfektion von primären Zellen, wären die hohen Ausbeuten nicht ohne die Entwicklung einer neuen Methode möglich gewesen. Diese Methode steht in direktem Zusammenhang mit dem Zellzyklus der zu transfizierenden Zellen. Bisher war wenig bekannt über die Voraussetzungen und die Mechanismen, die für eine Elektrotransfektion mit hoher Ausbeute notwendig sind. Mögliche Parameter die bei der Elektrotransfektion primärer Zellen eine Rolle spielen, könnten physikalischer Art, wie z. B. Zellgröße, Membraneigenschaften, oder physiologischer Art sein, wie z. B. der Zellzyklus. Diese in dieser Arbeit entwickelte Methode steht in direktem Zusammenhang mit dem Zellzyklus der zu transfizierenden Zellen.

Sukhorukov et al. [83] konnten 1994 an mit Aphidicholin geblockten L929-Zellen zeigen, dass die elektrischen Eigenschaften der Plasmamembran vom Zellzyklus abhängig sind. Über die Rolle des Zellzykluses in der Elektrotransfektion von Zellen gibt es allerdings widersprüchliche Aussagen. So fanden Goldstein et al. eine Erhöhung der Transfektionseffizienz bei primären humanen Fibroblasten nach der Synchronisation der Zellen in der G2/M-Phase des Zellzykluses [84]. Dagegen zeigten mit Aphidicholin synchronisierte Protoplasten in der M-Phase die höchste Transfektionseffizienz [85]. Andere Wissenschaftler berichteten über die Rolle der S-Phase für die Erhöhung der Ausbeute bei der Elektroporation von hämatopoietischen Stammzellen [86].

Die ersten Versuche mit primären Fibroblasten haben je nach Zellpräparation sehr unterschiedliche Ergebnisse geliefert (siehe 4.5.1.). Deshalb wurde der Einfluss des Zellzykluses auf die Effizienz der Elektrotransfektion untersucht. Um den Einfluss von chemischen Reagenzien auf physikalische oder physiologische Eigenschaften der Zellen auszuschließen, erfolgte die Synchronisation der Zellen durch Wachstum bis zur Konfluenz. Der größte Anteil der Zellen befand sich dadurch in der G0/G1- Phase. Durch das Passagieren der Zellen wurde der Zellzyklus neu gestartet. Alle 12 Stunden wurde der Zellzyklus bestimmt und eine Elektrotransfektion durchgeführt.

Die Ergebnisse (in Abb. 34 bis 37) zeigen, dass die Werte für den Anteil der Zellen in S-Phase und die Ausbeute einen fast identischen Verlauf haben, während die Werte für den Anteil der Zellen in G2-Phase oft einen entgegengesetzten Verlauf haben.

Vergleicht man die Effizienz zusätzlich mit dem Volumen der Zellen (Abb. 38 und 39), so zeigen die Werte über viele Bereiche einen ähnlichen Verlauf. Dies beruht hauptsächlich auf dem großen Volumen der Zellen in G2/M-Phase, die aber wegen der relativ kurzen Zeitdauer dieser Phase in der Analyse des Volumens nicht getrennt zu erfassen sind. Theoretisch könnte die Erhöhung der Ausbeute auch einen rein physikalischen Grund haben. Durch die Volumenvergrößerung und somit durch den größeren Radius, wird entsprechend Gleichung 1 die permeabilisierte Membranfläche größer. Dadurch könnte die Plasmidaufnahme erleichtert werden. Der gleiche Effekt, eine größere permeabilisierte Membranfläche, bewirkt auch eine Erhöhung der Pulsamplitude. Die Ergebnisse (in Abb. 38 dargestellt) zeigen aber, dass eine Elektroporation mit 5 kV/cm eine geringere Effizienz hat als die Elektroporation der Zellen mit 4 kV/cm. Dementsprechend kann die Erhöhung der Ausbeute nicht allein auf eine Volumenvergrößerung zurückzuführen sein.

Ähnliche Versuche konnten mit primären Stammzellen nicht durchgeführt werden. Untersuchungen am Lehrstuhl für Pharmakologie (Würzburg) haben gezeigt, dass eine Synchronisation mit anschließender genauen Bestimmung des Zellzykluses weder durch chemische Reagenzien noch durch Serumentzug oder Wachsen bis zur Konfluenz, erreicht wird. Aus den vorhandenen Daten lässt sich allerdings auf eine ähnliche Proportionalität schließen, wie in Abb. 40 dargestellt. Extrem schlechte Ausbeuten bei oft passagierten Zellen lassen sich wahrscheinlich durch Veränderung der Zell- und Membraneigenschaften aufgrund von Differenzierungsprozessen bei primären Zellen erklären.

In Anlehnung an diese Experimente wurde die Transfektionseffizienz der L929-Zellen in Bezug auf den Zellzyklus untersucht. Unter Vermeidung von chemischen Reagenzien konnte eine Synchronisation durch Serumentzug bewirkt werden. Wie die Ergebnisse in Abb. 41 zeigen, besteht bei L929-Zellen eine Proportionalität zwischen dem Anteil an Zellen in der S-Phase und der Effizienz der Elektrotransfektion.

Aus den in dieser Arbeit dargestellten Experimenten und Ergebnissen kann ein direkter Zusammenhang zwischen der Transfektionseffizienz und dem Anteil der Zellen in S-Phase bewiesen werden. Erklären kann man diese Proportionalität durch physiologische Prozesse in der Zelle. Während der S-Phase, der Synthese der DNA, ist die Konzentration von Endonukleasen in der Zelle herabgesetzt oder es sind in größerem Ausmaß Inhibitoren vorhanden. Dadurch wird die in die Zelle eingeschleuste Fremd-DNA nicht abgebaut.

Kurz nach der S-Phase tritt die Zelle über die G2-Phase in die M-Phase ein, in der die Kernmembran verschwindet. Nach der Zellteilung, bei der die Fremd-DNA auf die "Tochterzellen" verteilt wird, kann sie bei der Bildung der neuen Kernmembran direkt in den Kern kommen. Außerdem sind Zellen in der S-Phase wesentlich deformierbarer als in der G2/M-Phase [87]. In dem verwendeten Pulsmedium mit geringer Leitfähigkeit bewirkt die Applikation des Feldpulses eine elektrisch induzierte Deformation der Zelle. Dadurch wird die permeabilisierte Membranfläche vergrößert, ohne die zum Teil zellschädigende Wirkung, die eine Erhöhung der Pulsamplitude bei der Elektroporation zur Folge hätte. Dieses Modell erklärt die Abhängigkeit der Transfektionseffizienz vom Zellzyklus und die deutliche Erhöhung der Ausbeute bei der Elektrotransfektion während der S-Phase.

Elektrointernalisation von künstlichen Chromosomen

Die hier entwickelte Methode zur Manipulation des Genoms von primären Säugerzellen kann eine wichtige Rolle in der Forschung, z. B. zur Herstellung transgener Tiere, sowie in der medizinischen Anwendung der Gentechnik spielen. Da in diesen Fällen nur eine begrenzte Anzahl von Zellen zur Verfügung steht, ist eine Transfektion mit sehr hoher Effizienz besonders wichtig. Gerade für eine therapeutische Anwendung der Gentechnik in der Medizin reicht oftmals eine relativ einfache Manipulation des Genoms, wie sie bei der Verwendung von Plasmiden als Vektoren vorliegt, nicht aus. Zum einen enthalten Plasmide nur eine geringe Anzahl an Genen, zum anderen wäre eine mehrmalige Transfektion sehr aufwendig [88]. Die Voraussetzung für die erfolgreiche Modifizierung der Erbinformation, also der Kern-DNA, ist der Einbau der eingeschleusten Fremd-DNA in die Chromosomen der Wirtszelle. Gene der Fremd-DNA, die nicht in Chromosomen eingebaut werden, gehen bei der Zellteilung oder durch nukleolytischen Abbau verloren. Integriert ein Gen durch genetische Rekombination in ein Chromosom, wird es mit diesem repliziert und an die Tochterzellen weitergegeben.

Die Menge an Fremd-DNA, die in Chromosomen eingebaut wird, ist bei den herkömmlichen Systemen des Gentransfers relativ gering [39]. Ein anderer Nachteil der heute gängigen Verfahren zum Einschleusen fremder DNA in Zellen ist deren geringe Kapazität, d. h. es können keine sehr großen und nur wenige Gene in die Wirtszellen eingeführt werden.

Neue Perspektiven und Möglichkeiten werden hier durch die Verwendung von künstlichen Chromosomen eröffnet. Die ersten künstlichen Chromosomen wurden von Szostak et al. in Hefen konstruiert, sogenannte YACs [89]. Burke et al. [90] konstruierte 1987 einen Vektor zum Klonieren großer humaner DNA als ein lineares YAC. Ein weiteres Klonierungssystem beruht auf der Verwendung von bakteriellen künstlichen Chromosomen BACs [91]. Obwohl diese Systeme gegenüber den herkömmlichen Vektoren bereits viele Vorteile bringen, ist bei diesen Systemen die Größe der Fremd-DNA doch auf 100-2000 kb beschränkt [92]. Erst mit der Entwicklung von künstlichen Säuger-Chromosomen MACs (mammalian artificial chromosomes), wie z. B. von Kereso et al. [61], steht ein Klonierungssystem zur Verfügung, welches eine Vielzahl von Genen in genügend hoher Anzahl für eine starke Expression enthält. Ein weiterer Vorteil der künstlichen Chromosomen ist, dass die Fremd-DNA nicht erst in die Chromosomen der Wirtszelle für die Expression integriert werden muss. Bei den künstlichen Chromosomen besteht die Möglichkeit, dass diese intakt in der Wirtszelle erhalten bleiben [93].

Der Gentransfer durch künstliche Chromosomen ist in den letzten Jahren Objekt intensiver Forschung, da diese Technik gegenüber dem Transfer mit herkömmlichen Vektoren viele Vorteile bietet. Die eingeschleusten Chromosomen bilden autonome Einheiten, die in der Wirtszelle ohne Probleme repliziert werden. Die darauf befindlichen Gene sind also nicht auf die Insertion in die Chromosomen der Wirtszelle angewiesen, so dass Fehler durch Mutagenese ausgeschlossen werden. Auf den künstlichen Chromosomen können sich, je nach Größe der Chromosomen, die Gene in einer hohen Anzahl an Kopien befinden, zusammen mit den dazu gehörenden regulierenden Elementen. Dadurch wird eine hohe Expression sicher gestellt. Außerdem bieten kondensierte Chromosomen einen Schutz für die DNA gegen den Abbau durch Endonukleasen nach dem Einschleusen in die Wirtszelle [92].

Das Einschleusen der künstlichen Chromosomen in die Wirtszelle stellte bisher etliche Probleme. Die am häufigsten benutzte Methode für z. B. YACs ist die Fusion von Hefesphäroplasten mit der Wirtszelle [94]. Diese Methode hat allerdings den Nachteil, dass zusammen mit den künstlichen Chromosomen das ganze Genom der Hefezellen in die Wirtszelle kommt. Eine andere Methode ist die Mikroinjektion. Das Problem dabei ist, dass nur hoch gereinigte DNA verwendet werden kann. Diese kann bei der Aufreinigung beschädigt werden. Bisher wurde deshalb nur von der Mikroinjektion kleiner YACs (bis 250 kb) berichtet [95].

Chromosomen wurden auch mit Hilfe der Lipofektion oder der Elektroporation in Zellen eingeschleust. Dabei wurden aber alle isolierten Chromosomen verwendet, da eine Auftrennung der künstlichen Chromosomen nur durch Pulsfeld-Gelelektrophorese möglich war, das auch zur Beschädigung der Chromosomen führen kann [94]. Bei dem Transfer mit Hilfe der Elektroporation handelte es sich bisher einerseits um kleine Chromosomen (z. B. YACs oder BACs) [96, 97], andererseits wurde die Technik der Feldpulse mit kleinen Amplituden und langer Dauer verwendet [98]. Bei diesen Experimenten wurde der Transfer in einer Frequenz von 10^{-7} bis 10^{-6} erreicht.

Die in dieser Arbeit verwendeten MACs haben eine Größe von bis zu 250 mb und enthalten Maussateliten-DNA mit einem hohen Anteil an AT-Basenpaaren, sowie eine Vielzahl von Kopien der Gene lacZ (für β -Galaktosidase), Hygromycinresistenz und 1-DNA. Die Experimente haben bewiesen, dass ein Einschleusen chromosomaler DNA in L929-Zellen möglich ist. Der eindeutige Beweis liefert Abb. 43, die Partikel aus DNA und Proteinen innerhalb einer intakten Zelle (wahrscheinlich innerhalb des Zellkerns) 48 Stunden nach der Poration zeigt. Zu diesem Zeitpunkt kann nur von chromosomaler DNA gesprochen werden, da der Nachweis nur das Vorhandensein eines DNA-Proteinkomplexes zeigt. Über die Funktion der Gene auf dem Chromosom kann keine Aussage gemacht werden.

Ein Einschleusen der Partikel analog zur Elektrotransfektion mit Plasmiden war, wie die Experimente gezeigt haben, nicht möglich. Nur eine Elektroporation der Zellen bei 4°C mit anschließender Zugabe der Chromosomen und Zentrifugation führte zum Erfolg. Durch die Elektroporation bei 4°C wird das Ausheilen der Zellmembran verlangsamt. Bei der Zentrifugation kommen die Chromosomen in engen Kontakt mit den Zellen. Wie U. Zimmermann [7] mit FITC-markiertem BSA zeigte, ist die Aufnahme extrazellulärer Stoffe nicht nur auf Diffusion zurückzuführen. Die Aufnahme läuft vesikulär über Endozytose noch 100 Minuten nach der Elektroporation weiter. Dies ist der Mechanismus, über den die Partikel während der Inkubationszeit bei 37°C in die Zellen eingeschleust werden. Der Vorgang wird als Elektointernalisation bezeichnet, also die durch Elektroporation induzierte vesikuläre Aufnahme von extrazellulären Stoffen durch die Zelle [99, 100].

Für einen Nachweis der Funktion der Gene ist die Elektointernalisation von künstlichen Chromosomen notwendig. Aufgrund des hohen AT-Anteils der künstlichen Chromosomen konnten diese von den natürlichen sehr schonend mit Hilfe eines FACS-Gerätes sortiert werden. Für dieses Verfahren wurde eine neue Farbstoffkombination entwickelt, (Hoechst 33258 mit 7-AAD), die ein Sortieren auch mit einfachen, nicht für das Sortieren von Chromosomen aufwendig ausgerüsteten Geräten ermöglicht.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine Lagerung der Chromosomen über mindestens 10 Wochen ohne Qualitätsverluste für das Sortieren möglich ist (Abb. 44). Die sortierten Chromosomen wurden am Lehrstuhl für Physiologische Chemie (Würzburg) mit Hilfe der PCR und am Lehrstuhl für Humangenetik (Würzburg) mit Hilfe einer in-situ-Hybridisierung mit einer λ -Sonde untersucht. So konnte gezeigt werden, dass es sich bei den sortierten Chromosomen tatsächlich um die MACs handelt.

Die sortierten Chromosomen konnten mit Hilfe der Elektroporation in L929-Zellen eingebracht werden. Der X-Gal-Test (Abb. 45) beweist eindeutig die Expression von β -Galaktosidase. Dabei wurde eine Frequenz von ca. $5 \cdot 10^{-5}$ festgestellt. Diese Ausbeute liegt um mindestens eine 10-er Potenz höher als bisher in der Literatur berichtet. Vergleicht man diese Ausbeute mit einer Transfektion mit dem Plasmid pEGFP (mit dem, wie in dieser Arbeit gezeigt, überdurchschnittlich hohe Effizienzen erreicht werden) und bezieht die Rechnung auf die Zahl der eingesetzten Partikel, so erhält man beim Gentransfer mit MACs eine Ausbeute die mindestens um Faktor 100 höher ist.

Die Kultur der manipulierten L929-Zellen in CGM mit Hygromycin B über 4 Monate beweist ihre Resistenz. Eine Untersuchung der Zellen auf λ -DNA mit Hilfe der PCR am Lehrstuhl für Physiologische Chemie (Würzburg) ergab ein positives Ergebnis. In einer FACS-Analyse der Chromosomen der manipulierten L929-Zellen konnten die künstlichen MACs in ihrer ursprünglichen Form nicht mehr nachgewiesen werden. Dies ist wahrscheinlich auf die Eigenschaft der Mausfibroblasten zurückzuführen, die keinen stabilen Chromosomensatz besitzen [88]. Eine in-situ-Hybridisierung mit einer λ -DNA-Sonde (am Lehrstuhl für Genetik durchgeführt) an den ganzen L929-Zellen, weist auch auf Spuren von λ -DNA hin.

Ein Gentransfer durch künstliche Chromosomen, sogar in der Größe der hier verwendet MACs, ist mit einer sehr hohen Ausbeute möglich, wie die Ergebnisse beweisen. Das künstliche Chromosom in seiner ganzen Größe konnte zwar nicht mehr nachgewiesen werden, aber die Funktion der darauf integrierten Gene. Bisher wurde in der Literatur von Gentransfer durch künstliche Chromosomen (YACs oder BACs) berichtet, die um Faktor 100-1000 kleiner waren als die in dieser Arbeit benutzten MACs mit 200-250 mb. Die Effizienz des Gentransfers mit diesen MACs ist um Faktor 10 größer als die bisher durch Chromosomen erreichte Effizienz und um Faktor 100 größer als die des Gentransfers durch Plasmid, bezogen auf die eingesetzte Zahl der Partikel.

Der Gentransfer durch künstliche Chromosomen stellt einen wichtigen Fortschritt in der Genterapie dar, da nicht nur eine hohe Effizienz des Transfers erzielt wird, sondern sich auf den Chromosomen auch eine Vielzahl von Genen befinden (im Unterschied zu den herkömmlichen Vektoren).

5.2. Einfluss des Porationsmediums auf die Elektrotransfektion

Die Rolle der Leitfähigkeit des Porationsmediums für die Aufnahme extrazellulärer Stoffe wurde schon eingehend untersucht. Es wurde eine Erhöhung der Aufnahme von Farbstoffen, wie z. B. Propidiumiodid, in Zellen bei einer Erniedrigung der Leitfähigkeit des Porationsmediums festgestellt [101]. Außerdem konnte bei Erythrocyten gezeigt werden, dass eine verstärkte Hämolyse bei einer Absenkung der Leitfähigkeit des Mediums stattfindet. Dies ist auf Effekte der elektrischen Deformation zurückzuführen [8, 13, 14].

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben bei der Elektrotransfektion von L929-Zellen einen umgekehrten Trend gezeigt (siehe 4.4.). So ist bei der Verwendung von Porationsmedien zwischen 5 und 20 mM KCl die Transfektionseffizienz proportional zur Leitfähigkeit, während zwischen 20 und 30 mM KCl kein Unterschied zu beobachten ist (Abb. 21). Dieser umgekehrte Trend ist damit zu erklären, dass die Elektropermeabilisierung nur ein Teilschritt der Transfektion ist, der die aufgenommene Menge der extrazellulären Stoffe bestimmt. Der Y-Wert (der proportional zur Konzentration von KCl steigt) beweist, dass die Aufnahme von Plasmiden nicht ein reiner Diffusionsprozess ist, sondern zu einem großen Teil auf Endocytose beruht, die durch die Verwendung hypoosmolaler Medien erhöht wird [7]. Die weiteren Schritte der Transfektion, die Expression der Gene, hängen hauptsächlich von physiologischen Eigenschaften der jeweiligen Zellen ab.

Die lebend/tot-Statistik der L929-Zellen 3 Stunden nach der Poration (Abb. 28) zeigt das Überleben der Zellen in Abhängigkeit von der KCl-Konzentration im Porationsmedium. Bei geringen Konzentrationen (5 mM KCl) bricht aufgrund der Permeabilisierung der Membran der K^+ -Gradient der Zellen zusammen. Von diesem Schock erholen sich weniger Zellen als bei der Verwendung von Porationsmedien mit einer optimalen Konzentration von 20 bis 30 mM KCl. Bei einer höheren Leitfähigkeit des Porationsmediums werden die Zellen durch die Erwärmung des Mediums bei Applikation des Feldpulses beschädigt.

Die lebend/tot-Statistik der L929-Zellen 48 Stunden nach der Poration zeigt einen interessanten Effekt. Hier ist die Zellzahl bei der Verwendung von Porationsmedium mit 10 mM KCl am größten. Dies ist wahrscheinlich auf die stimulierende Wirkung von Aluminiumionen auf das Zellwachstum zurückzuführen. Ähnlich wie Farbstoffe werden Al^{3+} -Ionen sehr schnell in die Zelle aufgenommen. Da die Permeabilisierung bei geringeren Leitfähigkeiten größer ist, werden hier auch mehr Aluminiumionen aufgenommen. Bei einer Konzentration von 5 mM KCl im Porationsmedium ist die geringe Zellzahl einerseits mit dem Zusammenbruch des K^+ -gradienten, andererseits mit der erhöhten und toxisch wirkenden Konzentration von Al^{3+} -Ionen zu erklären. Die höchste Effizienz der Transfektion wird aufgrund der aufgenommenen Plasmidmenge bei der Verwendung von Porationsmedium mit einer Konzentration von 20 bis 30 mM KCl erreicht. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass die Transfektion bei Raumtemperatur in Räumen mit einer Temperatur unter ca. $30^{\circ}C$ durchgeführt wird. Bei höheren Temperaturen steigt die Leitfähigkeit des Porationsmediums (auch bei Konzentrationen von nur ca. 25 mM KCl) über den kritischen Wert von ca. 4.3 mS/cm.

Die geringe Ionenkonzentration des Porationsmediums hat außerdem den Vorteil, dass nach der Elektroporation keine Apoptose der Zellen auftritt. Im Gegensatz dazu konnten bei HL-60 Zellen und Jurkat-T-Lymphoblasten die typischen Merkmale von Apoptose nach der Applikation von kurzen Feldpulsen (40 ms) hoher Intensität (4.5-8 kV/cm) nachgewiesen werden [30]. Die Apoptose trat nur bei der Elektroporation in leitenden, isoosmolalen Medien auf, mit mindestens 60 mM monovalenten oder 15-20 mM divalenten Salzen.

Neben der Leitfähigkeit spielt auch die chemische Zusammensetzung des Porationsmediums eine wichtige Rolle. Das Fehlen von Na^+ -Ionen und eine Konzentration von ca. 25 mM K^+ -Ionen erhält auch bei permeabilisierten Zellen den natürlichen Na^+/K^+ -Gradienten aufrecht.

Die Hypoosmolalität des Porationsmediums bewirkt das Anschwellen der Zellen. Dadurch wird die Amplitude des für den Membrandurchbruch notwendigen Feldpulses kleiner und der Bereich für eine optimale Permeabilisierung der Zellen entsprechend Gleichung 1 vorhersagbar. Zusätzlich kann die Zellmembran vom Cytoskelett abgelöst werden, was sowohl eine leichtere Deformierbarkeit und Permeabilisierung, als auch ein schnelleres Ausheilen der Membran bewirkt.

Aufgrund dieser am Lehrstuhl für Biotechnologie gewonnenen Erkenntnisse gehören zum Systems des Multiporators zwei Porationsmedien mit 25 mM KCl und eine Osmolalität von 90 mOsmol und 280 mOsmol. So kann durch Mischung die für die jeweiligen Zelltypen optimale Osmolalität eingestellt werden. Durch die synergetischen Effekte der μ -Puls-Technik und des Puffersystems können sehr hohe Transfektionsraten erzielt werden. Dazu befinden sich im Anhang die Standardprotokolle für die Elektrotransfektion einiger Zelltypen.

5.3. Abtrennung von Flüssigkeiten aus einer Zellsuspension

Der Trend der modernen Biotechnologie entwickelt sich heute immer mehr in ihrer Anwendung im Mikromaßstab. Wie die Ergebnisse mit primären Zellen und mit dem durch Elektroporation induzierten Gentransfer durch künstliche Chromosomen gezeigt haben, ist die geringe Zellzahl oft der beschränkende Faktor. Aber auch für analytische Zwecke stehen oft nur geringe Mengen an Ausgangsmaterial zur Verfügung. In beiden Fällen ist eine schonende Auftrennung der Zellsuspension in Medium und Zellen notwendig. Dabei muß darauf geachtet werden, dass durch die verschiedenen Arbeitsschritte der Verlust des Ausgangsmaterial in engen Grenzen bleibt.

Deshalb wurde in dieser Arbeit ein Verfahren entwickelt, das diese Voraussetzungen erfüllt. Als Modellsystem wurden Erythrocyten verwendet, da hier einerseits die Konzentrierung und andererseits die Vitalität der Zellen über den Hämoglobinverlust sehr einfach nachzuweisen ist.

Im Gegensatz zur positiven Dielektrophorese, die z.B. bei der Elektrofusion von Zellen verwendet wird, wurde die negative Dielektrophorese bisher relativ selten angewandt [7]. Durch negative Dielektrophorese können Teilchen in Medien mit gleicher oder größerer Leitfähigkeit als das Teilcheninnere bei Verwendung von inhomogenen, elektrischen Wechselfeldern aus Regionen hoher Felddichte abgestoßen werden [7]. Diesen Effekt zeigen Erythrocyten in den Experimenten aus 4.8., sowohl in der Zweidrahtkammer als auch bei den später entwickelten Konstruktionen. Bei Verwendung der Kanüle als Elektrode wird die Inhomogenität des elektrischen Wechselfeldes durch die Isolierung mit den 4 Bohrungen verstärkt und die Elektrodenfläche verkleinert. So wurde gezeigt, dass die Zellen durch negative Dielektrophorese in leitenden Medien aus der Region der Elektrode entfernt werden können.

Mit konventionellen Elektroden konnte bisher, aufgrund von Elektrolyse und Erwärmung der Medien, nur in Medien mit geringer Leitfähigkeit (bis ca. 1 mS/cm) gearbeitet werden [7]. Dies zeigen auch die Ergebnisse in 4.8..

Deshalb wurden in der Konstruktion Abb. 53 zum Absaugen des Mediums Platinelektroden verwendet. Bei Verwendung dieser Elektroden wurde weder Elektrolyse beobachtet (es wurde auch kein Spannungsabfall gemessen) noch konnte eine Beschädigung der Zellen festgestellt werden. Dieses Ergebnis wird durch die Vitalitätsmessungen und durch spektroskopische Bestimmungen des Hämoglobingehalts bestätigt.

Die Verwendung eines Zellkultureinsatzes mit 3 bzw. 8 μm Poren bietet mehrere Vorteile. Das elektrische Wechselfeld ist nur durch die Poren wirksam. Dadurch wird mit der unteren Elektrode ein inhomogenes Feld erzeugt. Außerdem ist die Felddichte im Bereich der Poren (in der Region, in der also abgesaugt wird) am größten. Des Weiteren stellt die Membran ein Sieb dar, das den Durchtritt größerer Zellen verhindert.

Die dielektrophoretische Kraft ist im Vergleich zum Volumenstrom relativ gering, wie Abb. 57 den Einfluss des elektrischen Feldes beschreibt. Da der Beitrag der dielektrophoretischen Kraft nur ca. 10-20% ausmacht, ist die Absauggeschwindigkeit von entscheidender Bedeutung. Bei zu hoher Geschwindigkeit ist die Dielektrophorese zu schwach für eine Auftrennung, während es bei zu geringen Geschwindigkeiten zu Slipstick-Effekten kommen kann (siehe Abb. 54).

In diesem Zusammenhang spielt die Viskosität der aufzutrennenden Zellsuspension eine entscheidende Rolle. Um sämtliche Störungen, wie z. B. undichte Stellen oder Kompressibilität der Schläuche auszuschließen, wurde die Apparatur aus Abb. 50 B verwendet, bei der der Unterdruck aus der Hamiltonspritze direkt an die Absaugkonstruktion aus Abb. 53 weitergegeben wird. Die Experimente mit Blut in unterschiedlichen PBS-Verdünnungen haben gezeigt, dass die Effizienz der Auftrennung von Zellen und Medium von der Zelldichte abhängt. Die Effizienz der Auftrennung nimmt mit steigender Teilchendichte in der Suspension ab. Blut (unverdünnt) hat aufgrund eines Hämatokritwertes von knapp unter 50% eine extrem hohe Viskosität. Unter diesen Bedingungen ist einerseits die Abstoßung der Zellen durch die negative Dielektrophorese äußerst gering, andererseits ist die Reaktion der Suspension auf die minimalen Unterdrücke (1 $\mu\text{l/s}$) stark verzögert, was zu Slipstick-Effekten führen kann.

Nach der Optimierung aller Parameter an dem Modellsystem der Erythrocyten wurde die entwickelte Apparatur auf Zellen in Kulturmedium angewendet. Die Ergebnisse der Versuche mit Jurkat-Zellen zeigen eine fast 100%-ige Auftrennung von Zellen und Medium.

Das Prinzip der Zellkonzentrierung verläuft entsprechend der erzielten Ergebnisse nach folgenden Schritten:

- in einem ersten Schritte werden die Zellen im Bereich der Poren durch das extrem inhomogene elektrische Feld durch negative Dielektrophorese abgestoßen. Dadurch ist unterhalb jeder Pore ein kleiner, zellfreier Volumenbereich mit Medium
- in einem zweiten Schritt wird dieses Volumen definiert abgesaugt.

Dies ist nur möglich bei einer kleinen Absauggeschwindigkeit. Das “gepulste Absaugen” bewirkt, dass die dielektrophoretische Kraft die Zellen aus dem Bereich der Poren immer wieder entfernen kann. Im Bereich der Poren liegen Bedingungen vor, wie sie in Kapitel 2.3. beschrieben wurden. Die experimentell erarbeiteten Ergebnisse für die optimale Frequenz des elektrischen Feldes stimmen mit einem Wert von 1.5 MHz mit den theoretischen Vorgaben (Abb. 3 A, B) überein. Bei diesem Wert hat die dielektrophoretische Kraft in leitenden Medien mit 0.45 noch fast ihr Maximum, während die über die Membran induzierte Spannung mit ca. 0.5 noch keine Durchbruch zur Folge hat. Dadurch ist eine effektive und sehr schonende dielektrophoretische Bewegung der Zelle möglich.

Die direkte Wirkung der dielektrophoretischen Kraft ist zwar relativ gering, sie verhindert jedoch ein Verstopfen der Poren und so eine Beschädigung der Zellen. Die Gravitation unterstützt die Auftrennung, ist aber in den 4 Minuten des Absaugvorgangs nur von untergeordneter Bedeutung. Die spektroskopische Messung der Absorption von Hämoglobin bei 415 nm ergab nach 4 Minuten praktisch keine Veränderung. Nach 20 Minuten sinkt die Intensität um ca. 10%. Dies liegt ca. in dem Bereich der Werte der klinischen Tests der Blutsenkungsgeschwindigkeit (15-20 mm in der Stunde).

5.4. Konzept eines neuen Elektroporationsgerätes für kleine Zellzahlen

Wie schon erwähnt gewinnt die Manipulation von Zellen kleiner Anzahl immer mehr an Bedeutung. Die vorgestellten Apparaturen können allgemein zur Auftrennung von Zellen und Medium verwendet werden. Das Prinzip der Auftrennung beruht auf einer Kombination von Filtration und negativer Dielektrophorese unter Ausnutzung der Gravitation.

Die Apparatur kann benutzt werden, um Zellen aus Kulturmedium ohne Zentrifugation schonend zu separieren. Da die Zellen in der unteren Kammer verbleiben, ist z. B. ein Mediumaustausch leicht und schnell, ohne Zellverlust möglich. Anschließend könnten die Zellen durch positive Dielektrophorese oder durch Anlegen eines Unterdrucks in den Bereich der Poren bewegt werden, um dort durch Applikation eines Spannungspulses könnte eine definierte Elektroporation unter Elektrodeformation durchzuführen. Besonders bei primären Zellen, wenn nur wenig Zellmaterial zur Verfügung steht, können diese Anwendungen sehr wichtig sein, da keine Zellverluste durch Zentrifugation oder Pipettieren entstehen.

Eine weitere Anwendung dieser Apparatur liegt in ihrer Verwendung bei dem Gentransfer durch Chromosomen. Werden in der Probekammer die Voraussetzungen (nach entsprechendem Mediumwechsel) für positive Dielektrophorese geschaffen, können dadurch die Chromosomen kontrolliert in Kontakt mit den Zellen gebracht werden. Durch anschließende Applikation eines Feldpulses könnte die Internalisation der Chromosomen in die Zellen induziert werden.