

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
CCS Cell Culture Service Hamburg GmbH



Thema

Vergleich der Transfektionseffizienz und Anzahl von generierten stabilen Klonen durch Elektroporation zirkulärer und linearer DNA in eukaryotischen Zellen

Bachelorarbeit im Studiengang
Biotechnologie

vorgelegt von
Hagen Hentschel
1909742

Hamburg, März 2012

Betreuer / Gutachter:

Prof. Dr. Oliver Ullrich, HAW-Hamburg, Molekularbiologie und Zellkulturtechnik,
Lohbrügger Kirchstraße 65, 21033 Hamburg

Erstgutachter

Dr. Anne Schlüter, CCS GmbH, Abteilung Zelllinienentwicklung,
Falkenried 88, 20251 Hamburg

Zweitgutachter

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mir beim Schreiben dieser Arbeit geholfen haben. Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Anne Schlüter bedanken. Sie übernahm die umfangreiche Betreuung und unterstützte mich durch ihre hilfreichen Anregungen und Ratschläge. Zudem gilt mein Dank auch Herrn Prof. Dr. Oliver Ullrich für die Betreuung der Bachelorarbeit an der HAW-Hamburg.

Ein großer Dank gilt allen Leuten, die mir während dieser Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Vielen Dank für eure Unterstützung. Besonderer Dank dabei geht an Linh, Ray, Magnus, Felix, Homer und Fabian.

Ganz herzlich möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Firma CCS GmbH bedanken, die mich freundlich in ihrer Mitte aufgenommen haben.

Meiner Familie möchte ich besonders danken, die mich immer unterstütz hat und mich auf meinem Weg begleitet. Danke. Hab' euch lieb.

Abstract

In this thesis, Chinese hamster ovary cells (CHO) were transfected with the gene for the expression of GFP. Two vectors of different sizes, a small one with 4731 bp (pEGFP-C1) and a large vector of 8180 bp (pCMV-GFP_{long}) were used. The electroporation with the MaxCyte[®]-STX[™]-system was selected as transfection-method. GFP-expression was verified by fluorescence microscopy. The influence of the conformation and size of the vectors on the efficiency of the transient transfection as well as on the generation of stable clones was investigated. For transient transfections the viability of the cells as well as the efficiency was examined. For stable clones it was focused on the overall amount of clones and also on the number of positive clones and the homogeneity of GFP expression.

Results have shown, that the efficiency of the transient transfection was about 85 %, which is slightly below the value the company MaxCyte[®] claims in their product discription. The viability of the transfected cells was higher than the expected value of 90 %. Furthermore the data reveals, that the size of the vectors had a higher influence on the transfection-efficiency than the conformation of the vectors.

The investigation of the generated stable clones showed, that the transfection of both vectors in circular conformation resulted in 25 % homogenous clones. The linear conformation resulted in of 18 % homogenous clones. These data indicates that the conformation of the vectors has a higher influence on generating of stabile and homogenously expressing cells than the size of the vectors.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	V
1 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	1
2 EINLEITUNG	2
2.1 TRANSFEKTIONSMETHODEN	2
2.2 ELEKTROPORATION	5
2.3 MAXCYTE [®] -SYSTEM [™]	6
2.4 FLUORESZENZMIKROSKOPIE.....	8
2.5 FLUORESZENZFARBSTOFFE.....	9
2.5.1 GFP - Grün fluoreszierendes Protein	9
2.5.2 DAPI	10
2.6 SELEKTION	11
3 MATERIAL UND METHODEN	13
3.1 MATERIAL.....	13
3.1.1 Zelllinien	13
3.1.2 Vektoren.....	13
3.1.3 Restriktionsendonukleasen.....	14
3.1.4 Medien, Lösungen und Chemikalien.....	14
3.1.5 Geräte	14
3.1.5.1 Casy [®] -TT.....	15
3.1.5.2 MaxCyte [®] -STX [™] mit OC-100 Küvetten	16
3.2 METHODEN	17
3.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	17
3.2.1.1 Transformation von Bakterien.....	17
3.2.1.2 Maxi- und Gigaprep - DNA-Präparation mit alkalischer Lyse.....	17
3.2.1.3 DNA-Konzentrationsbestimmung	19
3.2.1.4 Restriktionsverdau	19
3.2.1.5 Gelelektrophorese.....	19
3.2.1.6 Linearisierung der Vektoren für die Transfektion	20
3.2.2 Arbeiten in der Zellkultur.....	20
3.2.2.1 Auftauen der CHO-Zellen	20
3.2.2.2 Kultivierung der CHO-Zellen.....	21
3.2.2.3 Zählen der Zellen mit dem Casy [®] -TT.....	22
3.2.2.4 Aussäen der Zellen für eine Erhaltungskultur.....	22
3.2.2.5 Transfektion.....	22
3.2.2.6 Zellkultur direkt nach der Elektroporation	23
3.2.2.7 Aussaat für die 24 h-Viabilität	23
3.2.2.8 Aussaat für die Messungen der Effizienz der transienten Transfektion.....	23
3.2.2.9 Bestimmung der 24 h-Viabilität	24
3.2.2.10 Färbung der Präparate für die Messung der transienten Transfektion	24
3.2.2.11 Auswertung der Präparate für die Messung der Effizienz der transienten Transfektion.....	25
3.2.2.12 Aussaat und Selektion der stabilen Transfektion.....	25
3.2.2.13 Isolierung von Einzelklonen.....	25
3.2.2.14 Ernte von Einzelklonen und Übertragung auf einen 12-Kammer-Objektträger.....	26
3.2.2.15 Färbung und Fixierung der Einzelklone	26
3.2.2.16 Beurteilung der Einzelklone	27
4 ERGEBNISSE	28
4.1 VERIFIZIERUNG DER VERWENDETEN VEKTOREN.....	28
4.2 TRANSFEKTIONSERGEBNISSE	31

4.2.1	24 h-Viabilität	31
4.2.2	Transiente Transfektion.....	32
4.2.3	Stabile Transfektion	34
5	DISKUSSION	40
5.1	EINFLUSS VON ELEKTROPORATION AUF DIE ZELLEN DIREKT NACH DER TRANSFEKTION	40
5.2	TRANSIENTE TRANSFEKTION.....	41
5.3	STABILE TRANSFEKTION	43
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	45
7	AUSBLICK	48
8	QUELLEN	49
9	ANHANG	52
9.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	54
9.2	TABELLENVERZEICHNIS	54
9.3	ANGABE DER VOLLSTÄNDIGEN WERTE IN TABELLEN	55
9.4	FORMELVERZEICHNIS	56
9.5	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	57
9.6	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	59

1 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, eine Aussage über die Transfektionseffizienz und die Anzahl von generierten stabilen Klonen durch Elektroporation mit zirkulärer und linearer DNA in CHO-Zellen zu treffen. Die Vermutung ist, dass die Effizienz bei der transienten Transfektion mit zirkulären Vektoren höher ist als bei der Transfektion mit linearen Vektoren. Dabei sollen CHO-K1-Zellen mit einem für GFP codierenden Gen transfiziert werden. Dazu werden zwei verschiedengroße Vektoren ausgewählt, ein kleiner Vektor mit 4731 bp (pEGFP-C1) und ein großer Vektor mit 8180 bp (pCMV-GFP_{long}). Als Transfektionsmethode wird die Elektroporation mit dem MaxCyte[®]-STX[™]-System gewählt. Aus den transfizierten Zellen sollen zusätzlich stabil-transfizierte Klone isoliert werden. Hier ist die Vermutung, dass die stabile Transfektion eine höhere Effizienz bei der Verwendung von linearen Vektoren hat als bei der Verwendung zirkulärer Vektoren [Oliveira et al., 2005]. Zur Verifizierung der Expression von GFP soll mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie das rekombinante GFP nachgewiesen werden. Die Zellkernfärbung mit DAPI soll als Gegenfärbung eingesetzt werden.

Es soll ermittelt werden, welchen Einfluss die Konformation und die Größe des zu transfizierenden Vektors auf die Effizienz der Transfektion hat. Eine weitere Aussage ist zu treffen, welchen Einfluss die verschiedenen Vektoren und deren Konformation auf die Viabilität der transient-transfizierten Zellen hat.

2 Einleitung

2.1 Transfektionsmethoden

Unter dem Begriff Transfektion versteht man einen Gen-Transfer durch Einbringen von Fremd-DNA in eine eukaryotische Wirtszelle. Bei Bakterien wird dieser Vorgang als Transformation bezeichnet. Zur Unterscheidung zwischen pro- und eukaryotischen Zielzellen wird diese Abgrenzung getroffen.

Man unterscheidet zwischen transienter und stabiler Transfektion. Bei der transienten Form wird die Fremd-DNA nur vorübergehend in die Wirtszelle gebracht und geht bei Zellteilungen verloren. Wird die DNA hingegen ins Wirtsgenom integriert, ist es eine stabile Transfektion [Gressner et al., 2007].

Es gibt eine Reihe verschiedener Methoden DNA in eine Zelle zu transfizieren. Unterschieden werden diese Methoden in chemische, biologische und physikalische Methoden. Die Effizienz der Methoden ist von einer Reihe von Faktoren wie der Reinheit und Größe der DNA, der Beschaffenheit der Wirtszellen oder der Toxizität der codierten Proteine abhängig und wird für die verwendete DNA und Zelllinie optimiert.

Zu den meist genutzten chemischen Methoden zählen die Lipofektion und die Calcium-Phosphat-Präzipitation. Neue chemische Methoden verwenden Nanopartikel und kationische Polymere. Bei der Lipofektion wird die zu transfizierende DNA von Liposomen oder Vesikeln umschlossen. Diese Transportvesikel lagern sich an die Zellmembran an und fusionieren mit der Phospholipiddoppelschicht. Dabei wird das genetische Material in das Innere der Wirtszelle abgegeben.

Bei der Calcium-Phosphat-Präzipitation bindet sich die DNA an ausfallendes Calcium-Phosphat. Der gebildete Niederschlag wird zu den Zielzellen gegeben. Er lagert sich ebenfalls an die Zellmembran an und wird von der Zelle durch Endozytose aufgenommen. Dadurch gelangt die DNA in das Innere der Zelle [Walker et al., 2002]. Diese Methode ist für die Zelle schonend, da die Zellmembran nicht geschwächt wird.

Bei der Verwendung von kationischen Polymeren und Nanopartikeln, werden Diethylaminoethyl-Dextran oder positiv-geladene Nanopartikel verwendet, um die DNA zu komplexieren [Dingermann et al., 2002]. Diese Komplexe haften sich an die Zellmembran an und werden ins Innere der Zelle aufgenommen.

Biologischen Methoden nutzen zelleigene Transportmechanismen, um DNA in die Wirtszelle zu bringen. Dabei wird die DNA an Transferrin gebunden und an die Zellmembran angelagert. Das Eisentransportprotein Transferrin wird von membranständigen Rezeptoren erkannt und ins Inneren der Zelle geschleust [Karlson et al., 2005]. Das Transferrin mit der angelagerten DNA wird ins Lysosom der Zelle gebracht und dort enzymatisch gespalten. Die DNA überwindet die Lysosomenmembran und gelangt ins Zytoplasma [Zatloukal et al., 1999].

Bei einer anderen Methode werden alternativ zum Transferrin spezielle Antikörper verwendet, um die DNA zu binden. Die Antikörper binden ausschließlich gegen spezielle Membranproteine, die nur von Tumorzellen gebildet werden. Diese Methode wird deshalb in der Krebstherapie eingesetzt [Cavazzana-Calvo et al., 2007].

Eine weitere Gruppe der Methoden bilden die physikalischen Verfahren. Dabei kommt es durch Ausnutzung physikalischer Prinzipien zu einer Schwächung der Zellmembran und einem Einbringen von DNA ins Innere der Zelle. Die Schwächung der Membran kann durch bloßes Durchstechen bewirkt werden, wie bei der Mikroinjektion. Dabei wird die DNA direkt über eine Mikrokapillare in die Zelle injiziert. Diese Methode erzwingt das sequenzielle Transfizieren der Zellen, was einen sehr hohen Zeit- und Präparationsaufwand zur Folge hat. Diese Methode wird z.B. für die Transfektion in Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) verwendet [Goldin, A., 1992]. Diese Methode ist geeignet, wenn nur wenige Zellen transfiziert werden sollen.

Eine weitere Methode ist die *Particle-Gun*. Dabei wird die DNA an Goldpartikel gebunden, die durch ein Magnetfeld stark beschleunigt und an einem engmaschigen Gitter abrupt abgebremst werden. Dadurch löst sich die DNA von den Partikeln, wird aber nicht abgebremst und schießt durch die Zellmembran hindurch ins Innere der Wirtszelle [Clark et al., 2009].

Ein weiteres physikalisches Verfahren ist die Magnetofektion, sie wird auch als *Magnet-Assisted-Transfection* bezeichnet. Dabei wird die DNA an magnetische Partikel gebunden, die dann durch ein Magnetfeld gesteuert in die Zellen eindringen [Bertram, J., 2006]. Dieses Verfahren ähnelt der Transferrin-Methode, nutzt aber nicht die zelleigenen Transportwege, sondern die magnetischen Eigenschaften des Eisens aus.

Bei der Sonoporation wird Ultraschall eingesetzt, um durch Kavitation die Zellmembran zu schwächen [Nakamura, H., 2009]. Durch die geschwächte Zellmembran diffundiert die DNA ins Innere der Zelle. Bei dieser Methode überleben nur wenige Zellen.

Die Methode der Elektroporation ist das letzte physikalische Verfahren auf das hier eingegangen werden soll. Dabei wird die Zellmembran durch kurze elektrische Entladungen geschwächt, sodass DNA die permeabilisierte Zellmembran überwinden kann und ins Innere der Zelle gelangt [Nickoloff, J. A., 1995].

Mit den meisten Methoden können Plasmid-DNA oder RNA in die Zellen transferiert werden. Die Wahl der Methode wird meist durch die Rahmenbedingungen festgelegt. So benötigt man beispielsweise für die Mikroinjektion einen Mikromanipulator und einen geschulten Bediener, während es für den Umgang mit den meisten viralen Systemen (Transduktion) einer S2-Genehmigung bedarf.

Ein weiteres Kriterium für die Methodenwahl ist die Effizienz, d.h. der Anteil an erfolgreich transfizierten Zellen. Diese ist sehr stark vom Zelltyp und den jeweiligen Bedingungen abhängig. Üblicherweise wird DNA verwendet, es können auch RNA oder Peptide für die Transfektion verwendet werden. Für die Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen existiert eine umfangreiche Auswahl an Expressionsvektoren.

Unabhängig von der Transfektionsmethode ist die Lebensdauer der aufgenommenen DNA auf wenige Tage beschränkt. In der Zelle wird sie vollständig abgebaut oder geht nach einigen Zellteilung verloren.

In seltenen Fällen wird die aufgenommene DNA in das Genom der Wirtszelle integriert und ist dort vor dem Abbau geschützt. Die Konformation der DNA beeinflusst den Vorgang. Für die transiente Transfektion ist es vorteilhaft zirkuläre (ringförmige) Plasmid-DNA zu verwenden. DNA in dieser Konformation wird mit höherer Effizienz von den Zellen aufgenommen [Mühlhardt, 2009].

Die stabile Transfektion dagegen funktioniert besser mit linearisierter DNA, da diese mit höherer Effizienz ins Genom integriert wird [Oliveira et al., 2005].

2.2 Elektroporation

Die Elektroporation von eukaryotischen Zellen funktioniert prinzipiell wie die von prokaryotischen Zellen und die Effizienz ist ähnlich wie bei der Calciumphosphattransfektion [Ravid et al., 1998]. Durch einen kurzen elektrischen Impuls wird die Zellmembran kurzfristig permeabilisiert und die DNA diffundiert in die Zelle. Wie die Modelle einer solchen Permeabilisierung aussehen könnten, ist in Abbildung 1 dargestellt.

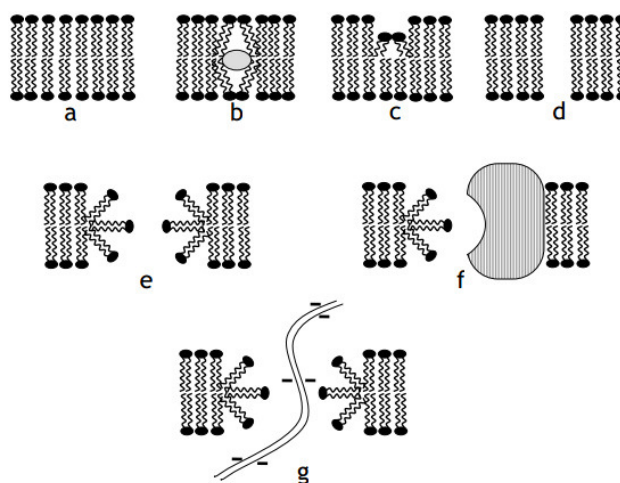


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Zellmembran mit hypothetischen Membranveränderungen durch das extern angelegte Feld und Bildung der hydrophilen Elektroporen. a) intakte Zellmembran vor dem elektrischen Impuls; b) Defekt durch Eintritt eines ungeladenen Moleküls in die Zellmembran; c) lokale Kompression der Lipiddoppelschicht; d) Bildung einer hydrophoben Pore durch laterale Fluktuation; e) Modell einer hydrophilen Elektropore; f) einseitige Begrenzung einer Elektropore durch einseitige Begrenzung der Elektropore durch ein Transmembranprotein; g) Modell eines langen geladenen Moleküls in der Elektropore. [Albermann, S., 2004]

Eukaryotische Zellen sind empfindlicher als Bakterien, man verwendet daher geringere Ströme. Die Bedingungen, wie Höhe der Feldstärke und Dauer des Impulses, müssen für jeden Zelltyp optimiert werden.

Das Verfahren basiert auf der vorübergehenden Erhöhung der Membranpermeabilität durch reversible elektrische Durchschläge der Zellmembran. Beim Anlegen hochintensiver Feldimpulse bewirken elektrische Kräfte eine Dehnung der Zelle in Richtung der Elektroden aber nur, wenn ein gering-leitendes Medium verwendet wird.

Die Effizienz des Verfahrens wird erhöht, wenn die angelegten Pulse so gering wie möglich gehalten werden ($< 100 \mu\text{s}$), das Medium hypoosmolar ist und eine geringe Leitfähigkeit hat. Solche Medien haben außerdem den Vorteil, dass die Feld-induzierte Apoptose nicht auftritt, was bei hoch-leitenden Medien auftreten kann. Sind diese Bedingungen erfüllt, stellt sich eine hohe Effizienz an Aufnahme der Fremd-DNA in die Zellen ein, ohne die Zellen stark zu

beschädigen. Einige Zellen werden aber trotz gewissenhafter Wahl der Parameter beschädigt und können sterben. Daher sollten mehr Zellen für den Ansatz eingesetzt werden, als wirklich benötigt werden [Zimmermann, U., 2000].

Die Aufladung der Zellmembran ist von verschiedenen Bedingungen abhängig: von der spezifischen Membrankapazität, von der inneren Leitfähigkeit und von der äußeren Leitfähigkeit. Die innere und die äußere Leitfähigkeit werden durch die Zusammensetzung der Zellen und des Mediums bestimmt.

2.3 MaxCyte[®]-System[™]

Zur Durchführung der Experimente in dieser Arbeit wurde das STX[™]-System (*Scalable Transfection System*) der Firma MaxCyte[®] verwendet (siehe Abbildung 2). Die Firma MaxCyte[®] ist spezialisiert auf Elektroporation und bietet mit ihren Geräten eine sehr große Bandbreite an Einsatzmöglichkeiten für verschiedene Zelllinien und Vektoren. Dabei kann das STX[™]-System z.B. im Bereich der Wirkstoffforschung, bei Screening-Methoden oder bei der Proteinproduktion zum Einsatz kommen. Das STX[™]-System ist in Deutschland noch relativ selten.

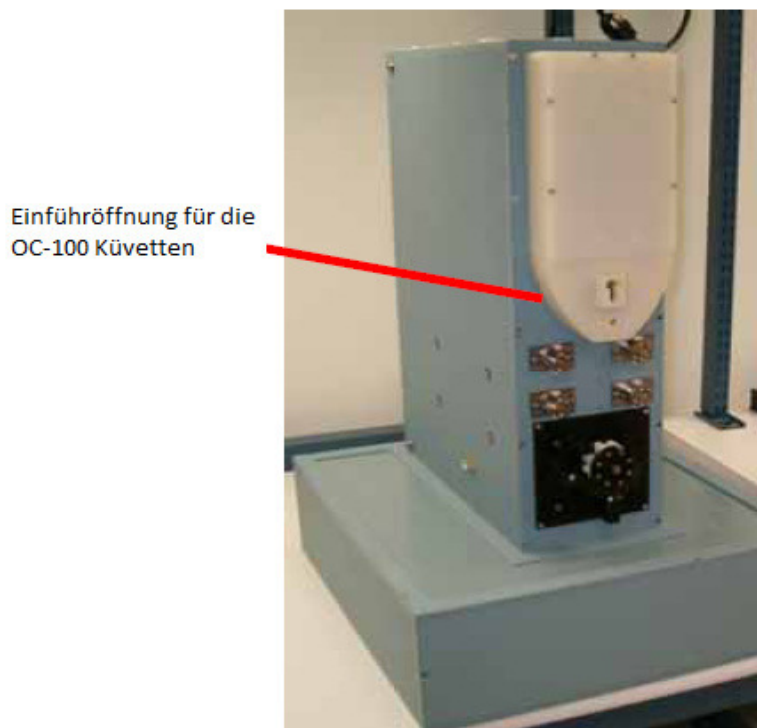


Abbildung 2. Bild des verwendeten MaxCyte[®] STX[™]-Systems mit offener Einführöffnung für OC-100 Küvetten.

Der Vorteil des STX™-Systems liegt in der großen Flexibilität des Versuchsansatzes. Es gibt andere Firmen, die sich auf die Elektroporation spezialisiert haben, z.B. die Firma Amaxa® mit ihrem Nucleofector®-System. Diese Systeme sind ebenfalls für Elektroporationen geeignet, jedoch nur auf statische Versuche ausgelegt. Daher ist die Kapazität sehr beschränkt. Es können maximal Ansätze mit einem Volumen von 100 µL und 1,5E4 Zellen mit 200 ng DNA eingesetzt werden.

Das minimal-verwendbare Volumen des STX™-Systems liegt bei 50 µL Ansatzvolumen, die obere Grenze liegt bei 100 mL. Das bedeutet die obere Grenze liegt 2000-fach über der unteren Grenze.

Mit diesem System ist es möglich von 5E05 Zellen in 30 s bis 2E11 Zellen in 30 min jedes gewünschte Arbeitsvolumen zu nutzen. Dabei kann eine Konzentration von DNA von bis zu 500 µg /mL genutzt werden. Das STX™-System nutzt dafür einen Durchflussansatz. Dadurch ist es möglich in gleicher Zeit ein Vielfaches an Zellen mit dem *Scalable High Throughput* Verfahren zu transfizieren, als es mit vergleichbaren statischen Elektroporatoren möglich ist. Die Effizienzen der Transfektionen liegen, laut Hersteller, über 90 % und die Viabilitäten um 90 % (siehe Tabelle 1). Die Zellviabilität ist der Anteil an lebenden Zellen in einer Zellpopulation. Je höher dieser Wert ist, desto mehr lebende Zellen befinden sich in der Population im Verhältnis zur Gesamtzellzahl. Für die Optimierung der Transfektionen wurden bereits, für die meistgenutzten Zelllinien, Parameter bestimmt.

Cell Type	Efficiency % GFP +	Viability
293T	95%	95%
CHO Cells	90%	90%
VERO	90%	90%
K562	90%	90%

Tabelle 1. Ausschnitt der vom Hersteller ausgegebenen Tabelle mit Angabe der Effizienz der Transfektion mit GFP-Vektoren und Überlebensraten der transfizierten Zellen. Bei den Experimenten in dieser Arbeit wurden CHO-K1-Zellen verwendet und in beiden Vektoren war die Information für die Expression von GFP enthalten. Eine Transfektionseffizienz von 90 % und eine Viabilität von 90 % ist zu erwarten. [MaxCyte® Beispielkatalog für etablierte Zellen und Zelllinien].

2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Um die Expression der transfizierten DNA darzustellen, kann mit Fluoreszenzmikroskopie gearbeitet werden. Dazu wird entweder GFP in den Ziel-Vektor eingebracht und transfiziert oder es werden Antikörper gegen das Zielprotein verwendet. Bei den Versuchen dieser Arbeit wird die GFP-Methode durchgeführt.

Die Leuchtquelle des Mikroskops emittiert Licht einer definierten Wellenlänge. Dieses monochromatische Licht trifft im Präparat auf Fluorochrome. Das sind Moleküle die durch monochromatisches Licht angeregt werden und dadurch ein höheres Energieniveau erreichen. Beim Zurückfallen des Energieniveaus auf den Grundzustand wird ebenfalls monochromatisches Licht emittiert. Anhand der Wellenlänge und der Intensität des emittierten Lichtes lässt sich, mit Hilfe von Filtern, auf die Art und die Menge des Fluorochroms schließen.

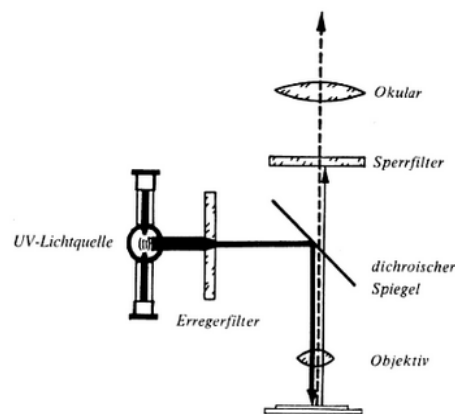


Abbildung 3. Prinzipdarstellung des Strahlengangs eines Fluoreszenzmikroskops. Die Lichtquelle ist entweder eine UV-Lampe oder eine Quecksilber-Hochdruck-Dampflampe.

Abbildung 3 zeigt den typischen Strahlenverlauf in einem Fluoreszenzmikroskop. Meist werden als Lichtquellen Quecksilber-Hochdruck-Dampflampen eingesetzt. Das Licht wird zunächst im Anregungsfilter auf monochromatisches Licht reduziert. Dieses trifft auf den dichroischen Spiegel, der den Strahlengang ablenkt und durch das Objektiv auf das Präparat und damit auf die Fluorochrome leitet. Die Fluorochrome im Präparat werden angeregt und emittieren ebenfalls monochromatisches Licht. Wegen der Stokes-Verschiebung ist die Wellenlänge des vom Präparat emittierten Lichts größer als die des anregenden Lichts der Lichtquelle. Durch diese Wellenlängenverschiebung kann das Licht erst jetzt den dichroischen Spiegel passieren und wird nicht abgelenkt. Nachdem das Emissionslicht einen weiteren Filter durchlaufen hat, trifft es auf den Detektor. Das ist entweder das Auge des

Betrachters oder eine Kamera [Wachtler, F., 2000]. Mit verschiedenen Anregungsfiltern können unterschiedliche Wellenlängen monochromatischen Lichts erzeugt werden, die wiederum spezifische Fluorochrome anregen. Die Fluorochrome in diesen Versuchen waren GFP und DAPI. Ein Beispiel für eine FITC- und DAPI-gefärbte Zelle ist in Abbildung 4 zu sehen.

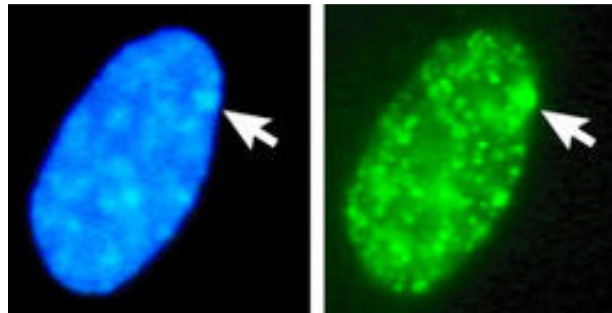


Abbildung 4. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines humanen Fibroblasten. Die Zelle wurde im linken Bild mit DAPI angefärbt, der Pfeil zeigt auf das Barr-Körperchen also auf eine Konzentration von DNA in der Zelle. Die gleiche Zelle wurde im rechten Bild mit FITC-gelabelten Antikörpern (gegen Makrohiston H2A1) gefärbt [Gartler et al., 2004].

2.5 Fluoreszenzfarbstoffe

2.5.1 GFP - Grün fluoreszierendes Protein

Das grün-fluoreszierende-Protein (GFP) wurde 1960 von Osamu Shimamura beschrieben [Shimamura, 2006]. Dieses Protein stammt aus der Quallenart *Aequorea victoria* und hat ein molekulares Gewicht von 26,5 kDa. Bei Anregung mit ultraviolettem oder blauem Licht emittiert es Licht einer Wellenlänge von 509 nm - es fluoresziert grün. Es wird daher zu den autofluoreszierenden Proteinen gezählt. Folglich kann bei den Versuchen auf das Anfärben der Proteine in der Zelle mit Hilfe von Antikörpern verzichtet werden. Das Fluorophor dieses Proteins setzt sich aus der Peptidsequenz Ser⁶⁵Tyr⁶⁶Gly⁶⁷ zusammen [Alberts et al., 2003]. Die Expression dieses Proteins in der Zelle kann bereits wenige Stunden nach der Transfektion nachgewiesen werden. Die Menge an exprimiertem Fremdprotein ist nicht konstant und nimmt mit der Anzahl an Zellteilungen ab, da sich die Konzentration der Plasmide durch Teilungen der Zelle verdünnt und sie abgebaut werden [Hentze et al., 2000]. Da GFP nicht toxisch ist, kann es in Zellen (Pro- und Eukaryoten) transformiert bzw. transfiziert werden und dort ohne negative Folgen exprimiert werden. Die Reifungszeit von GFP bei 37 °C ist relativ kurz. Neu synthetisiertes GFP braucht in der Säugerzelle nur wenige

Stunden, bis es die richtige Konformation eingenommen hat, sodass transfizierte Zellen bereits nach kurzer Zeit detektiert werden können. Andere Proteine, wie z.B. Ionenkanäle, brauchen wesentlich länger, um exprimiert und prozessiert zu werden.

Seit der Reinigung des GFP durch Shimamura [Shimamura, 2006] und der Isolierung der GFP-cDNA durch Prasher [Prasher et al., 1992], sowie der Einführung von GFP als leuchtendes Protein-Tag durch Chalfie [Chalfie et al., 1997] hat sich die Markierung von Proteinen mit GFP und GFP-Varianten zu einer Standardmethode entwickelt.

Nach der Entdeckung des GFP in *Aequorea victoria* wurde die Codon-Usage für die Expression in anderen eukaryotischen Zellen verbessert. Diese *enhanced-GFP* (EGFP)-Varianten werden heute am häufigsten verwendet. Durch Mutagenese wurden diverse Varianten erzeugt, die blau (*blue-FP* - BFP) oder gelb (*yellow-FP*-YFP) leuchten.

In der Natur wurden weitere leuchtende Proteine gesucht - sie wurden in Nesseltieren wie Korallen gefunden. Inzwischen decken diese Proteine das gesamte Spektrum des sichtbaren Lichtes ab. Bei der Auswahl spielen die Reifungszeit des Proteins von der Translation bis zum Leuchten, die Fotostabilität, die Helligkeit und die Detektierbarkeit eine Rolle. Zum Beispiel leuchtet das YFP sehr hell, ist aber weniger fotostabil [Hervey, G., 2010].

2.5.2 DAPI

Das 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff der verwendet wird, um DNA zu markieren. Dabei interkaliert es in adenosin- und thyminreichen Regionen der DNA und kann mit ultraviolettem Licht angeregt werden (siehe Abbildung 5). Dadurch wird Licht einer Wellenlänge von 461 nm emittiert - es fluoresziert blau. DAPI wird eingesetzt, um DNA darzustellen und damit Zellkerne anzufärben. Dies ist mit vielen anderen Nucleinsäurefarbstoffen nicht möglich, weil die Emissionsspektren der DNA- und der RNA-gebundenen Farbstoffmoleküle nahezu identisch sind. Die Emissionsmaxima von DNA- und RNA-gebundenem DAPI unterscheiden sich genügend, um sie mit Hilfe von optischen Filtern und Farbteilern trennen zu können. DAPI wird daher häufig als „DNA-spezifisch“ bezeichnet, das gilt aber nur für die Emission bei 461 nm.

DAPI emittiert am kurzwelligen (blauen) Ende des Spektrums des sichtbaren Lichtes. Daher können gleichzeitig weitere Fluoreszenzfarbstoffe mit langwelligeren Emissionsmaxima am selben Präparat eingesetzt werden, ohne dass es zu Signalüberschneidungen, dem *bleed through*, kommt.

Die ultraviolette Strahlung, die für die Anregung notwendig ist, erzeugt Radikale, die andere Fluorophore bleichen. DAPI wird deshalb bei manchen Anwendungen als letzter Farbstoff angeregt und sichtbar gemacht, um andere Marker zu schonen. Das Ausbleichen von DAPI kann durch den Einsatz von "Anti-Fading-Mitteln" verzögert und dadurch die Beobachtungsdauer am Mikroskop verlängert werden [Remmele, W., 1999].

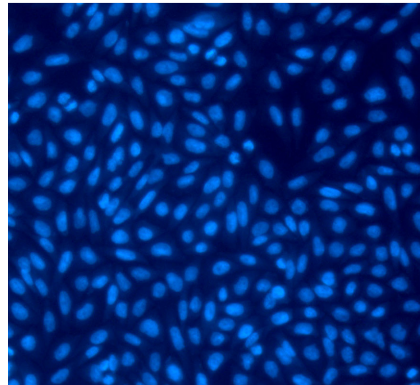


Abbildung 5. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von DAPI-gefärbten Zellkernen von CHO-K1-Zellen. Die Zellen wurden wie in der Methode im Kapitel 3.2.2.10 beschrieben, behandelt und gefärbt (Inkubation 37 °C, 5 %-CO₂; 4 % PFA-PBS fixiert, 4 % DAPI-PBS gefärbt).

2.6 Selektion

Die Selektion stabil-transfizierter Zellen erfolgt prinzipiell auf zwei Wegen: durch Komplementation oder durch Antibiotika [Raven et al., 2005]. Stabil-transfizierte Zellen können selektiert werden, wenn der Vektor ein Gen enthält, das das Wachsen in speziellen Mangelmedien möglich macht oder Resistenz gegenüber einem Antibiotikum vermittelt. Die selektiven Bedingungen werden bei der Antibiotikamethode durch Zugabe einer zytotoxischen Substanz in das Medium erzeugt, die durch das Resistenzgen entschärft wird. Die am weitesten verbreiteten Antikiotika sind die Aminoglykosid-Phosphotransferase (Neomycin/G418-Resistenz) und die Hygromycin-B-Phosphotransferase (HPH; Hygromycin-B-Resistenz). Nach der Transfektion werden die Zellen in dem antibiotika-haltigem Medium kultiviert, in dem sich nur jene Zellen vermehren, die DNA mit Resistenzgenen aufgenommen haben. Von diesen Zellen überleben nur diejenigen eine längere Kultivierung, welche die transfizierte DNA ins Genom integriert haben und deren Gene exprimieren. Transfizierte Zellen werden unter konstantem Selektionsdruck gehalten, um die transfizierte DNA im Genom zu erhalten [Lüdicke et al., 1999]. Nachdem die nicht-transfizierten Zellen abgestorben sind, beginnen einzelne stabil-transfizierte Zellen zu wachsen und sich zu teilen. Sind die Kolonien groß genug, kann damit begonnen werden einzelne Kolonien zu isolieren

und die Zellen weiter zu expandieren. Daraus werden die stabil-transfizierten Zelllinien entwickelt.

Die Selektion durch Komplementation wird mit Zellen durchgeführt, die einen spezifischen Defekt aufweisen. Dieser Defekt verhindert die Bildung bestimmter Enzyme wie Thymidinkinase, Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase oder Dihydrofolat-reduktase. Diese Enzyme sind verantwortlich für die Umwandlung essentieller Purine, die für die Bildung von DNA benötigt werden. Diese Zellen benötigen zum Wachsen ein Medium das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT) enthält [Ruddle et al., 1974]. Zusammen mit dem Zielgen transfiziert man ein Gen, dessen Produkt den Defekt behebt (komplementiert) – das Gen kann dabei entweder auf dem gleichen Plasmid liegen oder auf einem zweiten, unabhängigen. Die Zellen werden in ein Mangelmedium (HAT-Mangelmedium) überführt, in dem diese Stoffe fehlen. Nur diejenigen Zellen, die den Defekt durch Gentransfer kompensieren konnten, können die Purinbase Hypoxanthin für den Nucleinsäurestoffwechsel nutzen. Alle anderen Zellen können nicht ausreichend Nucleinsäuren für die DNA-Synthese bilden. Dadurch wird die Zellteilung dieser Zellen selektiv gehemmt und sie sterben [Chmiel, H., 2011].

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

Als Zelllinie wird CHO-K1 verwendet. Diese Zellen stammen aus den Ovarien chinesischer Hamster der Gattung *Cricetulus griseus* und werden in der Biotechnologie unter anderem zur Produktion und zur Untersuchung rekombinanter Proteine verwendet.

Von den CHO-Zellen sind verschiedene genetisch modifizierte Varianten gebräuchlich. In den Versuchen wird die K1 Variante verwendet, die die am weitesten verbreitet ist. Für die Transfektionen werden subkonfluente Zellen verwendet, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden.

3.1.2 Vektoren

In den Versuchen werden zwei verschiedenen Vektoren eingesetzt. Sie sind in der nachfolgenden Tabelle 2 aufgeführt. Sie unterscheiden sich in der Anzahl der Basenpaare (bp) und damit in ihrer Größe sowie in den vermittelten Antibiotikaresistenzen.

Vektor	Größe [bp]	Resistenzen	Herkunft
pEGFP-C1	4731	Kanamycin und Neomycin	CCS
pCMV-GFP _{long}	8180	Ampicillin und Neomycin	CCS

Tabelle 2. Die in den Versuchen verwendeten Vektoren.

3.1.3 Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind spezielle Enzyme, die DNA schneiden können. Sie erkennen spezifische palindromische Sequenzen der DNA und schneiden auf spezifische Art [Knippers, R., 2006]. In

Tabelle 3 sind die in den Versuchen verwendeten Restriktionsendonukleasen mit ihren spezifischen Erkennungs- und Schnittmustern aufgeführt. Bei ScaI entstehen beispielsweise glatte Enden an den Schnittkanten, man nennt sie auch stumpfe Enden (engl.: *blunt ends*). Bei PciI entstehen hingegen raue oder klebrige Enden (engl.: *sticky ends*).

Name	Hersteller	Erkennungs- und Schnittstelle
PciI	Fermentas / Thermo Fisher Scientific	5'...A↓C A T G T...3' 3'...T G T A C↑A...5'
ScaI	Fermentas / Thermo Fisher Scientific	5'...A G T↓A C T...3' 3'...T C A↑T G A...5'
NdeI (Fast-Digest)	Fermentas	5'...C A↓T A T G...3' 3'...G T A T↑A C...5'
MluI (Fast-Digest)	Fermentas	5'...A↓C G C G T...3' 3'...T G C G C↑A...5'

Tabelle 3. Die für die Versuche verwendeten Restriktionsendonukleasen, deren Hersteller und die Erkennungs- und Schnittstellen. [<http://www.thermoscientificbio.com/EktronTemplates/>]

3.1.4 Medien, Lösungen und Chemikalien

Eine vollständige Liste der verwendeten Chemikalien ist im Anhang (Kapitel 9) zu finden.

3.1.5 Geräte

Eine vollständige Liste der verwendeten Geräte ist Anhang (Kapitel 9) zu finden. Die beiden wichtigsten Geräte werden folgend, kurz vorgestellt.

3.1.5.1 Casy[®]-TT

Für die Bestimmung der Zellzahl wird ein Casy[®]-TT Cell Counter & Analyser System verwendet (siehe Abbildung 6). Abgebildet ist das Hauptgerät links mit Spülflaschen links und rechts sowie Säule in der Mitte. Rechts ist das Interface angeschlossen. Die Säule ist von einem Casy[®]-Cup umgeben, die auch für alle Messungen in den Versuchen verwendet werden.



Abbildung 6. Bild eines Casy[®]-TT Cell Counter & Analyser Systems.

Dieses Gerät kann von Zellkulturen folgende Parameter bestimmen: die Zellkonzentration, die Viabilität der Zellen, das Zellvolumen, die Zellaggregation und die Menge der Zelltrümmer (Debris). Der Aggregationsfaktor gibt an, wie viele Zellen sich durchschnittlich aneinander geheftet haben. Dafür wird die *Electrical-Current-Exclusion* (ECE)-Methode verwendet. Die kurze Analysezeit des Messgerätes ist vorteilhaft für die Versuche. Die Modellserie TT ist mit moderner digitaler Pulsverarbeitung (Pulsflächen Analyse) ausgestattet. Diese Technik wertet Signale aus, die von Zellen oder Teilchen erzeugt werden, wenn sie die Messpore in einem Niederspannungsfeld passieren. Diese Signale werden computergestützt in Informationen für den Anwender umgewandelt. Jedes Objekt, das die Messpore passiert, wird von einer Million Messimpulse pro Sekunde gescannt. Das ergibt hunderte Messungen pro Zelle. Der gesamte Messverlauf wird für die Auswertung der Messungen verwendet und bietet dadurch einen sehr guten dynamischen Messbereich für Probenvolumina von 5 bis 100 μL Zellsuspension. Für alle Messungen wird sterilfiltriertes Casy[®]-ton der Firma Schärfe verwendet. In Abbildung 7 ist eine Messung beispielhaft dargestellt.

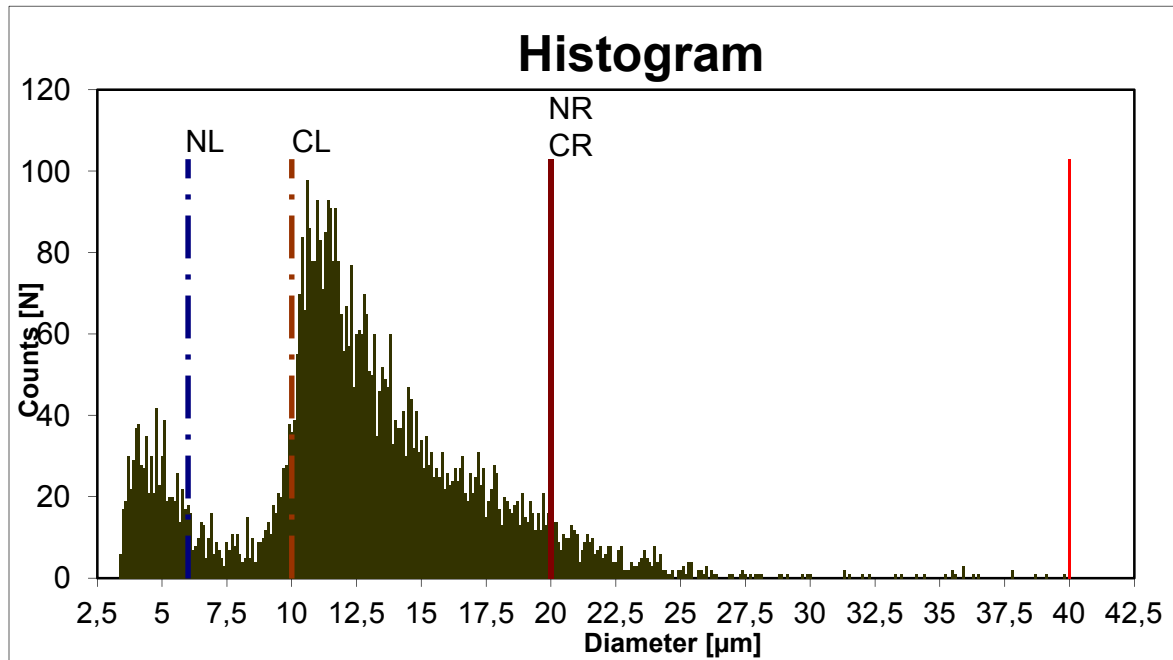


Abbildung 7. Grafische Ausgabe der Zellzählung des Casy®-TT für die Ernte der CHO-K1-Kultur. Die Einstellung für die Cursor waren NL 6 und CL 10. Die Messungen unterhalb des Durchmessers von 6 µm werden als Debris, zwischen 6 und 10 µm als tote Zellen und zwischen 10 µm und 20 µm als lebende Zellen gezählt. Für jeden Zelltyp werden dafür eigene Einstellungen programmiert.

3.1.5.2 MaxCyte®-STX™ mit OC-100 Küvetten

Für die Transfektion werden ein MaxCyte®-STX™-System (siehe Kapitel 2.3) und MaxCyte® OC-100 Küvetten verwendet (siehe Abbildung 8).



Abbildung 8. Bild der verwendeten OC-100 Küvetten und der Einführöffnung in das STX™-System.

Bei den Küvetten sind die metallischen Flächen die Kontakte, um den Stromkreis durch den Versuchsansatz zu leiten. Diese Flächen sind besonders fragil und dürfen nicht berührt werden. Die OC-100 Küvetten werden mit den vom Hersteller vorgegebenen Einstellungen für CHO-Zellen und OC-100 Küvetten verwendet. Als Puffer wird der vom Hersteller empfohlene Elektroporationspuffer B201-100 verwendet.

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Transformation von Bakterien

40 μL einer kompetenten Bakterienlinie (XL10-Gold Ultracompetent Cells von Stratagene Katalognummer #200314) wird aufgetaut und mit 1 μL Vektor-DNA gemischt. Dieser Ansatz wird für 30 min auf Eis inkubiert, danach für 2 min in ein Wasserbad bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt und anschließend erneut für zwei Minuten auf Eis inkubiert. Danach werden 500 μL des antibiotikumfreien SOC-Mediums (Super-Optimal-Broth-Medium mit 20 mM Glukose) zugegeben und die Kultur für eine Stunde bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wird die Kultur auf angewärmte, antibiotikumhaltige LB-Mediumplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.1.2 Maxi- und Gigaprep - DNA-Präparation mit alkalischer Lyse

Für die DNA-Präparation wird das Maxi- bzw. das Giga-Plasmid-Kit der Firma Qiagen verwendet. Die mitgelieferten Arbeitslösungen und Schritte werden nach den Angaben des Herstellers verwendet und durchgeführt.

Von je einer Agarplatte wird eine Einzelkolonie des Vektors mit einem Zahnstocher isoliert und eine Lösung aus 5 mL LB-Medium mit Antibiotikum (Ampicillin 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oder Kanamycin 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in einem 15 mL Gefäß angeimpft. Für den pEGFP-C1-Vektor wird Kanamycin verwendet, für pCMV-GFP long Ampicillin.

Die Kulturen wachsen für 6 - 10 Stunden in einem Schüttelinkubator bei 37 °C. Das Mediumvolumen wird bei der Maxiprep auf 250 mL erhöht. Bei der Gigaprep wird das Volumen auf 2500 mL erhöht. In jeder Kulturlösung beträgt die Konzentration von Ampicillin 150 µg/mL, Kanamycin 30 µg/mL. Diese Kulturen werden ebenfalls im Schüttelinkubator bei 37 °C über Nacht (maximal 16 h) inkubiert.

Die Kulturen werden in 500 mL Zentrifugenbecher überführt und für 10 min bei 3500 rpm abzentrifugiert. Anschließend werden die Überstände verworfen. Die Pellets stehen für die weitere Bearbeitung zu Verfügung oder können eingefroren werden.

Das Zellpellet der Vorkultur wird in 12 mL (Maxiprep) bzw. 125 mL (Gigaprep) Puffer P1 vollständig resuspendiert. Danach wird das jeweils gleiche Volumen Lysis-Puffer P2 zugegeben und die Lösung durch 4- bis 6-fache Invertierung homogen gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird nochmals das gleiche Volumen an Neutralisierungs-Puffer P3 zugegeben, homogen gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert.

Während dieser Inkubationsphase werden die Maxi-100- und die Giga-1000-Säulen mit 15 mL bzw. 75 mL Äquilibrierungspuffer (QBT-Puffer) äquilibriert. Nachdem das Gesamtvolumen an QBT-Puffer durch die Säule gelaufen ist, werden die Kulturlösungen durch einen Cellulose-Faltenfilter auf die Säulen gegeben. Alle Lösungen bewegen sich nur aufgrund der Schwerkraft durch die Säulen.

Nachdem die DNA an die Säulen gebunden hat, werden die Säulen mit 60 mL bzw. 600 mL Waschpuffer (QC-Puffer) gewaschen. Als nächster Schritt werden Zentrifugenröhrchen unter die Säule gestellt und die gebundene DNA mit 15 mL bzw. 100 mL Elutionspuffer (QF-Puffer) von den Säulen eluiert.

Die DNA im Eluat wird mit Isopropanol gefällt (jeweils 70 % des Volumens des Elutionspuffers). Anschließend werden die Lösungen für 30 min bei 15000xg und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation werden alle weiteren Schritte unter einer Sterilwerkbank durchgeführt.

Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und verworfen. Behutsames Arbeiten ist nötig, da sich die gefällte DNA nur sehr leicht an der Gefäßwand anhaftet. Danach werden 7 mL raumtemperiertes 70 %iges Ethanol zugegeben und erneut für 10 min bei 15000xg und 4 °C zentrifugiert.

Der Überstand wird erneut verworfen und das Zentrifugenröhrchen mit der Öffnung nach unten für eine Stunde unter die Werkbank zum Trocknen gestellt. Die gefällte und trockene DNA ist als weißlicher bis durchsichtiger Belag am Rand des Röhrchens zu erkennen und wird mit 250 µL sterilfiltriertem Wasser abgelöst und in ein Eppendorf-Tube überführt. Man

verwendet in diesem Fall nur Wasser und nicht TE-gepuffertes Wasser (mit EDTA und TRIS), weil die Puffer in den folgenden Schritten die Leitfähigkeit des Elektroporationsansatzes zu sehr erhöhen könnten.

3.2.1.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Am Photometer werden die Einstellung für die Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm vorgenommen und eine Nullwertmessung mit reinem Wasser in einer Quarzküvette (10 mm Pfadlänge) durchgeführt. Die DNA-Proben werden mit dem gleichen Wasser in einem Verhältnis von 1:50 verdünnt. Die Absorption bei 260 nm zeigt die DNA-Konzentration, die Absorption bei 280 nm zeigt die Konzentration von aromatischen Proteinen. Das Verhältnis der Absorptionen von 260 nm zu 280 nm ergibt die Reinheit der DNA in der Lösung. Die Reinheit der Probe sollte zwischen einem Wert von 1,7 und 1,9 liegen. Bei einer zu geringen Reinheit kann die Transfektion behindert werden.

3.2.1.4 Restriktionsverdau

Ein Restriktionsverdau ist der Vorgang, bei dem DNA von speziellen Enzymen (Restriktions-Endonucleasen) an definierten Stellen geschnitten wird. Welche Sequenz die einzelnen Enzyme erkennen und wie das Schnittmuster aussieht, ist in Tabelle 3 (siehe Kapitel 3.1.3) aufgeführt.

Die analytischen Verdauungen werden in einem Volumen von 10 µL durchgeführt. Dafür wird jeweils 1 µg DNA mit der vom Hersteller angegebenen Menge an Enzym, Puffer und Wasser gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert.

3.2.1.5 Gelelektrophorese

Für die Elektrophorese wird ein 1 %iges Agarosegel gegossen, dazu wird 1 g Agarose mit 100 ml TAE-Puffer aufgekocht, bis es sich vollständig gelöst hat, und in einer Form mit einem Kamm erkalten gelassen. Das feste Gel wird mit TAE-Puffer bedeckt. Alle Taschen des Gels werden mit TAE-Puffer gespült. Als Marker wird der Gene-Ruler 1 kb (Fermentas) verwendet, der mit 1:5000 verdünntem Sybr-Gold (Life Technologies™) gemischt wird. Die DNA-Verdauungen enthalten jeweils 1 µg DNA und werden mit 6xLadepuffer, Sybr-Gold (4 µL)

und Wasser auf das Endvolumen von 16 μL gebracht. Der gesamte Ansatz wird vorsichtig in die Taschen des Gels pipettiert. Eine Spannung von 110 V bei einer Stromstärke von 400 mA wird solange an das Gel angelegt, bis sich die Banden ausreichend voneinander getrennt haben. Anschließend wird das Gel zur Dokumentationskammer gebracht und unter UV-Licht-Anregung das Bandenmuster fotografisch dokumentiert.

3.2.1.6 Linearisierung der Vektoren für die Transfektion

Für die späteren Versuche wird eine größere Menge an linearisierter DNA benötigt. Dazu werden 50 μg DNA mit der berechneten Anzahl units (u) Enzym und Puffer in Wasser gemischt. Das Endvolumen dieses Ansatzes ist größer als das Volumen analytischen Verdauens (siehe Kapitel 3.2.1.4). Um sicherzustellen, dass die DNA vollständig linearisiert ist, wird die Inkubationszeit erhöht. Es wird über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die Linearisierung wird bei pEGFP-C1 die Restriktionsendonuklease PciI und bei pCMV-GFP_{long} die Restriktionsendonuklease ScaI verwendet.

3.2.2 Arbeiten in der Zellkultur

Die speziellen Vorgehensweisen und Medien beim Arbeiten mit CHO-Zellen werden in diesem Kapitel beschrieben.

3.2.2.1 Auftauen der CHO-Zellen

Für die Versuche wird 1 vial CHO-K1 mit 5E06 c/vial und einer Passagenzahl von 38 verwendet. Das Cryovial wird aus dem Stickstofflagertank entnommen und in einem Wasserbad bei 37 °C für ein bis zwei Minuten schnell erwärmt. Das schnelle Erwärmen ist schonender für die Zellen als langsames Auftauen. Anschließend werden unter der Sterilwerkbank 10 mL Kulturmedium zugegeben und mit den Zellen gemischt. Die Lösung wird für 4 min bei 180xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. In diesem Überstand befindet sich das toxische DMSO, was beim Einfrieren als Frostschutzmittel zu der Kultur zugegeben wurde. Das Pellet wird in Kulturmedium resuspendiert und die Zellen am Casy[®]-TT gezählt (siehe Kapitel 3.2.2.3).

3.2.2.2 Kultivierung der CHO-Zellen

Für eine effiziente Zellkultivierung ist es vorteilhaft die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten. Dazu werden die Kulturen immer vor Erreichen der vollständigen Konfluenz geerntet und verdünnt.

Die adhärent wachsenden CHO-K1-Zellen werden in Ham's-F12 Medium mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 2 mM L-Glutamin kultiviert. Bei Erreichen einer Konfluenz von 85 bis 90 % werden die Zellen passagiert.

Nach Herausnehmen der Kulturflasche aus dem Brutschrank wird die Kultur unter dem Mikroskop auf Kontaminationen (Verpilzung, Bakterienbefall) untersucht. Unter der Sterilwerkbank wird der Überstand vollständig abgenommen und verworfen. Anschließend werden die Zellen, je nach Kulturfläche, mit den in

Tabelle 4 vorgegebenen Mengen an Lösungen behandelt. Zuerst werden die Zellen mit PBS gewaschen, um restliches Medium zu entfernen. Hierbei wird das restliche FCS entfernt, was die Aktivität des TrypLE™-Express behindern würde. Das PBS wird abgenommen und entsorgt. Anschließend wird TrypLE™-Express zugegeben und für 5 bis 15 min bei 37 °C inkubiert. Das Ablösen der Zellen wird unter dem Mikroskop kontrolliert. Es ist abgeschlossen, wenn die Zellen eine kugelige Form angenommen haben und sich frei im Medium bewegen. Das Ablösen kann durch sanftes Klopfen unterstützt werden. Danach wird 37 °C warmes Kulturmedium zugegeben, um das TrypLE™-Express zu inhibieren. Die Zellen werden mit der Pipette durch mehrmaliges Einsaugen und Ausstoßen der Lösung vereinzelt. Anschließend werden die Zellen gezählt.

Kulturgefäß	Waschen mit PBSx1 [mL]	Trypsinieren mit TrypLE™-Express [mL]	Zellen Aufnehmen in Medium [mL]
T-75	10	2	3
T-150	15	3	7
S-500	50	15	15

Tabelle 4. Übersicht der Volumen an Lösungen für das Passagieren der Kulturen der CHO-K1-Zellen in Abhängigkeit der Kulturfläche des Gefäßes. Angegeben ist das Volumen an PBS mit der zu waschen ist, das Volumen an TrypLE™-Express, um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen und das Volumen an Medium, um das TrypLE™-Express zu inhibieren und die Kultur aufzunehmen.

3.2.2.3 Zählen der Zellen mit dem Casy[®]-TT

Zur Bestimmung der Zellzahl werden 70 µL der Zelllösung mit Casy[®]-Ton auf 7 mL aufgefüllt, homogen gemischt und am Casy[®]-TT ausgezählt. Ein Beispiel für eine Auszählung ist in Kapitel 3.1.5.1, Abbildung 7 dargestellt.

Das Gerät gibt einen Konzentrationswert in Zellen pro Volumen an (c/mL). Damit kann berechnet werden, wie viel mL Zellsuspension zum Aussäen mit einer gewünschten Zellzahl pro Fläche nötig ist. Zusätzlich werden die Werte für die Zellviabilität, Zellaggregation und der mittlere Durchmesser angegeben (siehe Kapitel 3.1.5.1). Mit diesen Werten kann man den Zustand der Kultur abschätzen.

3.2.2.4 Aussäen der Zellen für eine Erhaltungskultur

Um eine Erhaltungskultur anzulegen, werden die Zellen mit einer bestimmten Aussaatdichte auf eine geeignete Fläche mit 37 °C warmen Medium ausgesät. Die Menge an Medium kann aus

Tabelle 5 entnommen werden.

Kulturgefäß	Kulturmedium zum Aussäen [mL]
T-75	15 - 20
T-150	25 - 30
S-500	100

Tabelle 5. Übersicht über das Volumen an Kulturmedium bei der Aussaat einer Erhaltungskultur, bezogen auf die Fläche des Kulturgefäßes.

Die Aussaatdichte der Zellen sollte zwischen 2E04 und 5E04 c/cm² liegen.

3.2.2.5 Transfektion

Für die Transfektion werden Zellen verwendet, die sich subkonfluent in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Dazu werden die CHO-K1-Zellen in der Vorbereitungsphase der Versuche passagiert und expandiert, wie in den Kapiteln 3.2.2.2, 3.2.2.3 und 3.2.2.4 beschrieben.

Für die Transfektion werden 10 % der Zellzahl als Reserve im Ansatz eingesetzt. Die 1,1E07 Zellen pro Transfektionsansatz werden bei 180xg für 10 min zentrifugiert. Der Überstand

wird verworfen, das Pellet in 1,5 mL HyClone (Elektroporationspuffer von MaxCyte[®]) resuspendiert und erneut bei 300xg für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird wieder entfernt, um negative Einflüsse des Mediums auf die Elektroporation zu vermeiden. Das Pellet wird mit Elektroporationspuffer resuspendiert. Durch Zugabe von Puffer und DNA-Vektor wird jeder Ansatz auf 1,1E07 Zellen mit 15 µg /100 µL DNA auf 100 µL Volumen gebracht. Die Ansätze werden in die OC-100 Küvette pipettiert. Am MaxCyte[®]-Elektroporator werden alle Parameter nach Angaben des Herstellers für die Küvettengröße und die Zelllinie geladen und die Elektroporation durchgeführt.

Bei jedem Durchgang wird der jeweils erste Ansatz nur mit CHO-Zellen, also ohne Fremd-DNA durchgeführt, um eine Negativkontrolle zu erhalten.

3.2.2.6 Zellkultur direkt nach der Elektroporation

Die elektroporierten Zellen werden unter sterilen Bedingungen aus der OC-100 Küvette in jeweils ein Well einer 6-Well-Suspensionsplatte überführt und für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt im Brutschrank inkubiert. Danach werden sie mit 3 mL warmen Medium aus der 6-Well-Suspensionsplatte in ein Falcon-Röhrchen überführt und wie in der Methode in Kapitel 3.2.2.3 mit dem Casy[®]-TT gezählt.

3.2.2.7 Aussaat für die 24 h-Viabilität

Für die Untersuchung der 24 h-Viabilität werden die Zellen mit einer Gesamtzellzahl von 1E06 auf eine 6-Well-Platten mit 1,5 mL warmen Medium ausgesät. Über 24 h wird bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt im Brutschrank inkubiert.

3.2.2.8 Aussaat für die Messungen der Effizienz der transienten Transfektion

Für die Messung der Effizienz der transienten Transfektion werden die Zellen jeweils 24 bis 96 h inkubiert. Dazu werden je vier Deckgläschen in eine Kavität einer 6-Well-Platte gelegt. Die elektroporierten Zellen werden mit 1,5 mL warmen Medium mit einer Konzentration von

1E05 c /mL auf die Deckgläschen in der 6-Well-Platte ausgesät und bei 37 °C und 5 %CO₂-Gehalt inkubiert.

3.2.2.9 Bestimmung der 24 h-Viabilität

Nach 24 h Inkubationszeit werden die Zellen aus dem Brutschrank entnommen und auf Kontamination untersucht. Danach wird die 6-Well-Platte unter das Durchlichtmikroskop gelegt und Bilder von den Zellen gemacht. Die Morphologie der Zellen gibt einen ersten Hinweis über den Zustand der Zellen.

Danach werden die Zellen von der 6-Well-Platte abgelöst. Diese Ernte unterscheidet sich von der Methode wie in Kapitel 3.2.2.2 beschrieben. Bei dieser Ernte wird der Überstand nicht verworfen, sondern gesammelt. Die Zellen werden mit 500 µL PBS gewaschen, das ebenfalls gesammelt wird. Anschließend werden die Zellen mit 500 µL TrypLE™-Express von der Kulturfläche abgelöst und zu den bereits gesammelten Überständen gegeben. Die Kavität wird zusätzlich mit einem Teil der Lösung nochmals ausgespült. Die gewonnene Zelllösung wird danach mit dem Casy®-TT ausgewertet. Der Wert der 24 h-Viabilität gibt Aufschluss darüber, wie gut die Zellen den Stress der Transfektion in ersten 24 h nach der Elektroporation verkraftet haben.

3.2.2.10 Färbung der Präparate für die Messung der transienten Transfektion

Nach der Transfektion wird im Abstand von 24 h jeweils eins der Deckgläschen aus den 6-Well-Platten entfernt. Danach wird das Deckgläschen für 5 min in PBS gewaschen, um Medienreste zu entfernen. Anschließend werden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd-PBS für 30 min bei Dunkelheit im Kühlschrank fixiert. Danach wird das Deckgläschen erneut für 5 min in PBS gewaschen. Zum Färben der Zellkerne werden die Zellen mit einer Lösung aus 12,5 nM DAPI-PBS (4 %) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Färben wird noch einmal mit PBS gewaschen. Restliches PBS wird mit destilliertem Wasser entfernt.

Die Deckgläschen mit den gefärbten Zellen werden mit der Zellseite nach unten auf einem Objektträger mit einem kleinen Tropfen Mowiol befestigt. Am nächsten Tag können damit die verschiedenen Fluoreszenzbilder und Auszählungen gemacht werden.

3.2.2.11 Auswertung der Präparate für die Messung der Effizienz der transienten Transfektion

Um das Verhältnis der erfolgreich transfizierten Zellen (C_{positiv}) zu bestimmen, werden jeweils drei verschiedene, zufällige Stellen aus den Kulturen gezählt. Beim Auszählen der Zellen werden jeweils alle DAPI-gefärbten Zellen (C_{DAPI}) gezählt. Danach werden alle GFP-positiven Zellen (C_{GFP}) gezählt und beide Zahlen in ein Verhältnis gesetzt (Formel 1). Das Ergebnis gibt Aussage über die Effizienz der transienten Transfektion.

$$C_{\text{positiv}} = \left(\frac{C_{\text{GFP}}}{C_{\text{DAPI}}} \right) \cdot 100\%$$

Formel 1. Formel zur Berechnung von C_{positiv} . Dieser Wert gibt den Anteil an erfolgreich transfizierten Zellen an. Um eine bessere Aussage machen zu können, wird das Verhältnis noch mit dem Faktor 100 % multipliziert, dadurch wird C_{positiv} zu einem Prozentwert.

3.2.2.12 Aussaat und Selektion der stabilen Transfektion

Die transfizierten Zellen werden mit drei verschiedenen Gesamtzellzahlen (5E03, 1E04 und 5E04) auf je drei 10 cm Kulturschalen ausgebracht und mit Selektionsmedium (Kulturmedium mit 1 % G418 100 mg/mL) inkubiert. Dadurch sterben alle Zellen ab, die nicht erfolgreich transfiziert wurden. Das Medium wird regelmäßig kontrolliert und alle 5 Tage ein Medienwechsel durchgeführt.

3.2.2.13 Isolierung von Einzelklonen

Nach acht bis neun Tagen sind einzelne Kolonien mit bloßem Auge sichtbar. Nach zehn Tagen Inkubationszeit werden sie markiert und ausgezählt. Das Medium wird abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Kleine Glaszylinder werden über die Kolonien gestellt und mit Hilfe von Silikonfett befestigt. In diese Zylinder wird TrypLE™-Express gegeben, um die Zellen abzulösen. Nach ca. 5 min Inkubationszeit, wird das TrypLE™-Express mit Medium inhibiert und die Zellen auf 96-Well-Platten übertragen. Für jeden Vektor werden 100 Kolonien isoliert. Die Zellkulturen auf den 96-Well-Platten werden täglich kontrolliert und bei ausreichender Dichte geerntet und auf 48-Well-Platten expandiert. Aufgrund der

geringen Zellzahl wird an dieser Stelle auf die Zählung der Zellen mit dem Casy[®]-TT verzichtet, eine Verdünnung von 1:2 bis 1:10 der Zellen wird eingehalten.

3.2.2.14 Ernte von Einzelklonen und Übertragung auf einen 12-Kammer-Objektträger

Wenn die Einzelklone in den Kavitäten der 48-Well-Platten dicht genug gewachsen sind, werden die Zellen abgelöst. Die Zellen werden wie in Kapitel 3.2.2.2 beschrieben, abgelöst. Bei dem Ablösen ist es wichtig, die Zellen mit möglichst wenig TrypLE[™]-Express und Medium aufzunehmen, damit die Zelldichten auf den 12-Kammer-Objektträgern möglichst hoch sind. Deswegen unterscheidet sich bei diesem Ablösen das Volumen an TrypLE[™]-Express und Medium. Bei einer Kavität einer 48-Well-Platte werden 40 µL TrypLe-Express und 80 µL Medium verwendet, bei einer 24-Well-Platte 80 µL TrypLE[™]-Express und 160 µL Medium.

Auf die einzelnen Kammern der 12-Kammer-Objektträger wird je ein Klon mit Medium gegeben, sodass ein Tropfen Lösung über der Kammer steht. Die restliche Lösung wird zurück in die Kavität gegeben, aus der sie entnommen wurde. Zusätzlich werden 80 µL bzw. 160 µL Medium zugegeben. Die 12-Kammer-Objektträger werden in einer Feuchtkammer bei 37 °C und 5 %-CO₂-Gehalt für 24 h inkubiert.

3.2.2.15 Färbung und Fixierung der Einzelklone

Nach der Inkubation werden die Zellkerne der Zellen auf den 12-Kammer-Objektträgern, wie in Kapitel 3.2.2.10 beschrieben, mit DAPI gefärbt.

Bei diesen Objektträgern wird anschließend auf jede Kammer ein 5 µL Tropfen Mowiol gegeben. Zusätzlich werden noch dünne Linien Mowiol unter, zwischen und oberhalb der Kammern aufgetragen. Die Kammern werden anschließend mit einem großen Deckglas versiegelt und für mindestens 5 h trocknen gelassen.

3.2.2.16 Beurteilung der Einzelklone

Die GFP-Expression der Einzelklone wird mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops beurteilt. Durch Betrachten der 12-Kammer-Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop werden die Klone hinsichtlich der GFP-Expression beurteilt. Wird von den Klonen GFP exprimiert, werden sie als positiv gezählt. Unterschieden wird bei den positiven Klonen zwischen homogen- und inhomogen-exprimierenden Klonen. Die homogen-exprimierenden Zellen bilden alle das rekombinante GFP aus. Bei inhomogen-exprimierenden Zellen, liegen negativ- (oder sehr schwach positive) und positiv-exprimierende Zellen nebeneinander.

4 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen dargestellt. In Kapitel 4.1 werden die Ergebnisse der Untersuchung der verwendeten Vektoren gezeigt. In Kapitel 4.2 werden die Ergebnisse der transienten und der stabilen Transfektionen dargestellt.

4.1 Verifizierung der verwendeten Vektoren

Um zu überprüfen, ob es sich um die richtigen Vektoren handelte, wurden Restriktionverdaue durchgeführt. Anschließend wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt (siehe Abbildung 11). Die Größe der zu erwartenden Vektor-Fragmente wurde mit dem Programm "SeqBuilder" ermittelt. In Abbildung 9 und Abbildung 10 sind die verwendeten Vektoren als Plasmidkarte zu sehen.

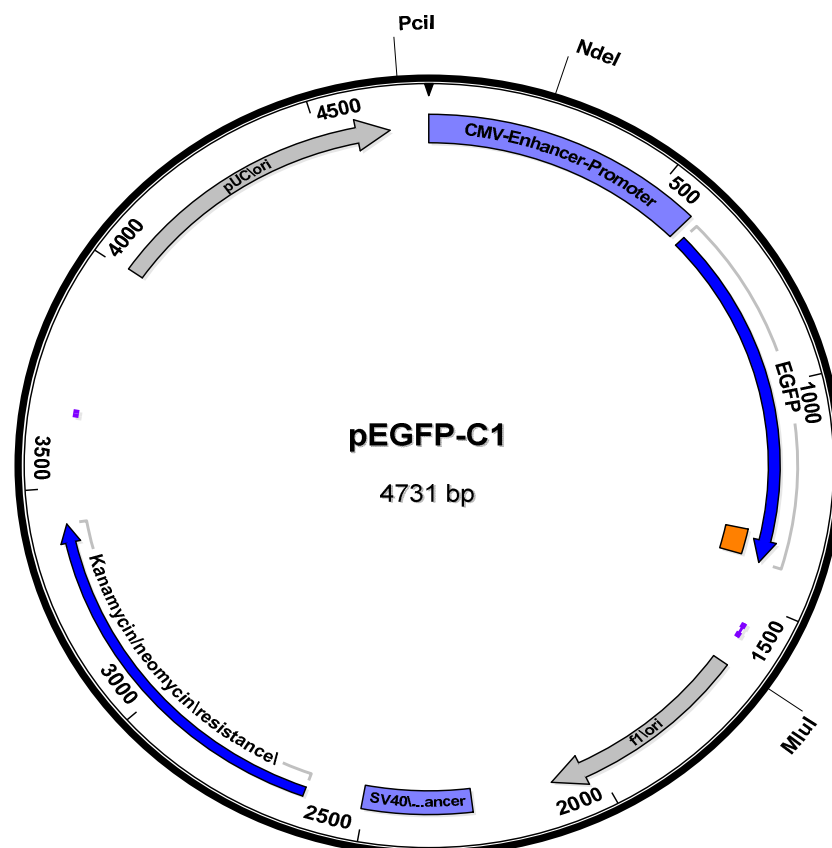


Abbildung 9. Bild des Vektors pEGFP-C1 als zirkuläre Plasmidkarte. Zu sehen sind die Stellen, an denen die Restriktionsendonukleasen schneiden.

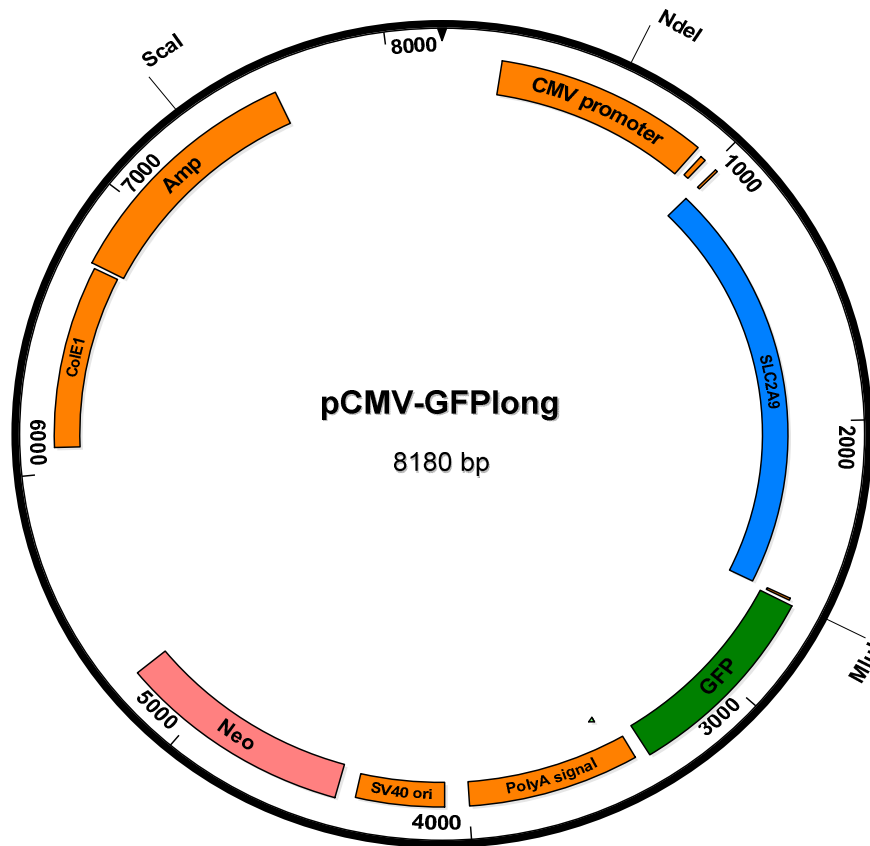


Abbildung 10. Bild des Vektors pCMV-GFP long als Plasmidkarte. Auch hier sind die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen sichtbar. Hier ist außerdem noch zu sehen, dass das GFP als Protein-Tag an einem anderen Protein liegt.

Um die Qualität der zirkulären DNA zu überprüfen (siehe Spuren 2 und 5 in Abbildung 11) und um die aufgetrennten Fragmente auf ihre Größe zu untersuchen (siehe Spuren 3, 4, 6 und 7 in Abbildung 11) wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt.

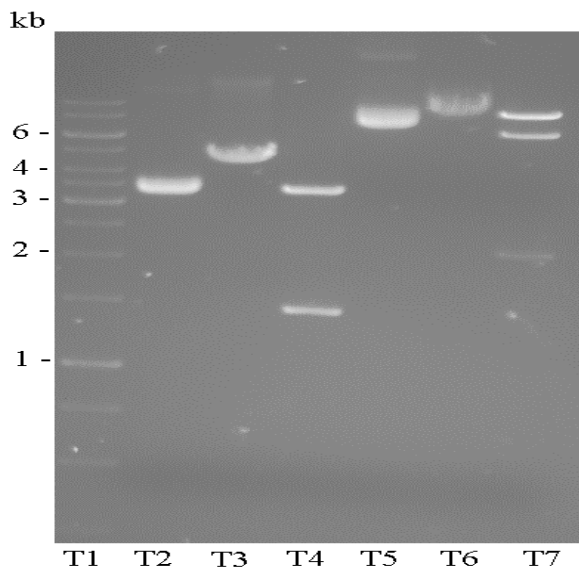


Abbildung 11. Bild des 1%igen Agarosegels nach der Auftrennung in der Elektrophoresekammer. Die Taschen des Gels wurden beladen mit: Tasche 1 Marker Gene Ruler 1 kb, Tasche 2 pEGFP-C1 zirkulär, Tasche 3 pEGFP-C1 linearisiert mit PciI, Tasche 4 pEGFP-C1 verdaut mit NdeI und MluI, Tasche 5 pCMV-GFPlong zirkulär, Tasche 6 pCMV-GFPlong linearisiert mit ScaI, Tasche 7 pCMV-GFPlong verdaut mit NdeI und MluI.

Die Vektoren hatten eine Größe von 4731 bp (pEGFP-C1) und 8180 bp (pCMV-GFPlong) (siehe Abbildung 9 und Abbildung 10). Taschen 2 und 5 (siehe Abbildung 11) wurden mit den zirkulären Vektoren beladen. Die Spuren dieser Taschen zeigen, dass die unverdaute DNA rein und nicht degradiert war. Zirkuläre DNA ist stark spiralisiert (engl.: *coiled* oder *supercoiled*), dadurch nahm die DNA weniger Raum ein und wurde weniger stark durch das Gel behindert, dadurch wanderten die Banden schneller durch das Gel als die lineare DNA (siehe Spur 3 und 6).

Von den Vektoren wurde je 1 µg mit 1 u PciI und 1 u ScaI, wie in der Methode in Kapitel 3.2.1.4 beschrieben, verdaut. Die Spuren der Taschen 3 und 6 zeigen deutlich, dass die linearen Vektoren die erwarteten Größen aufwiesen. Der Vektor pEGFP-C1 hat eine Größe von 4731 bp; pCMV-GFPlong hat die Größe 8180 bp.

In einem weiteren Verdau wurden je 1 µg DNA von beiden Vektoren mit NdeI und MluI (1 u /µg) doppelt geschnitten (siehe Kapitel 3.2.1.4). Wie die Plasmidkarte in Abbildung 9 zeigt, entsteht beim Verdau von pEGFP-C1 mit NdeI und MluI DNA-Stücke von 1407 bp und 3324 bp. Die Spur der Tasche 4 zeigt, dass der Vektor pEGFP-C1 vollständig in diese Stücke geschnitten wurde. Bei pCMV-GFPlong werden Stücke von 2057 bp und 6123 bp bei Verwendung von NdeI und MluI erzeugt. Die Spur der Tasche 7 in

Abbildung 11 zeigt, dass der Vektor pCMV-GFPlong in diese Stücke geschnitten wurde. Die zusätzliche Bande zeigt an, dass sich in der Probe, die auf das Gel gegeben wurde, noch

linearisierte DNA befand, die also noch nicht vollständig von beiden Enzymen geschnitten worden war.

4.2 Transfektionsergebnisse

Um bessere Vergleichswerte zu erhalten, wurden drei Transfektionsdurchgänge durchgeführt (in den Tabellen als "1", "2" und "3" aufgeführt). Es wurden jeweils $1,1 \times 10^7$ c mit $15 \mu\text{g}$ DNA in $100 \mu\text{L}$ Volumen verwendet.

Als Negativkontrolle wurde die selbe Anzahl von CHO-Zellen ohne DNA elektroporiert und wie transfizierte Zellen weiter behandelt.

4.2.1 24 h-Viabilität

Die Ansätze wurden wie in den Methoden in den Kapiteln 3.2.2.5, 3.2.2.6, 3.2.2.7 und 3.2.2.9 beschrieben, behandelt.

Die nachfolgende Tabelle 6 stellt die Ergebnisse der 24 h-Viabilitätstests dar. Die CHO-K1-Zellen, die für die 3. Transfektion kultiviert wurden, waren am Tag der Transfektion nicht dicht genug gewachsen, so musste abweichend von der normalen Zellzahl mit weniger Zellen transfiziert werden. Das Verhältnis von Zellen zu DNA wurde trotzdem auf 1×10^7 Zellen pro $15 \mu\text{g}$ DNA eingestellt.

	1 h nach der Elektroporation		24 h nach der Elektroporation
		Zellviabilität	Zellviabilität
Kontrolle	1	92,02 %	93,70%
	2	93,46 %	92,89%
	3	94,96 %	95,30%
pEGFP-C1 zirkulär	1	91,58 %	93,54%
	2	90,46 %	95,21%
	3	94,45 %	94,80%
pEGFP-C1 linear	1	89,83 %	92,08%
	2	88,64 %	96,17%
	3	94,35 %	93,78%
pCMV-GFP long zirkulär	1	90,46 %	92,74%
	2	92,18 %	96,02%
	3	95,09 %	94,00%
pCMV-GFP long linear	1	94,88 %	93,48%
	2	90,43 %	96,46%
	3	95,35 %	95,90%

Tabelle 6. Angabe der Zellviabilitäten 1 h nach den Elektroporationen 1, 2 und 3 und 24 h nach den Elektroporationen (Inkubationsbedingungen bei 37°C und 5%- CO_2 -Gehalt, fixiert mit 4 % PFA-PBS, gefärbt mit 4 % DAPI-PBS). Die Werte wurden wie in Methode 3.2.2.3 beschrieben, ermittelt.

Zur besseren Anschauung, sind die Daten aus

Tabelle 6 in

Diagramm 1 dargestellt.

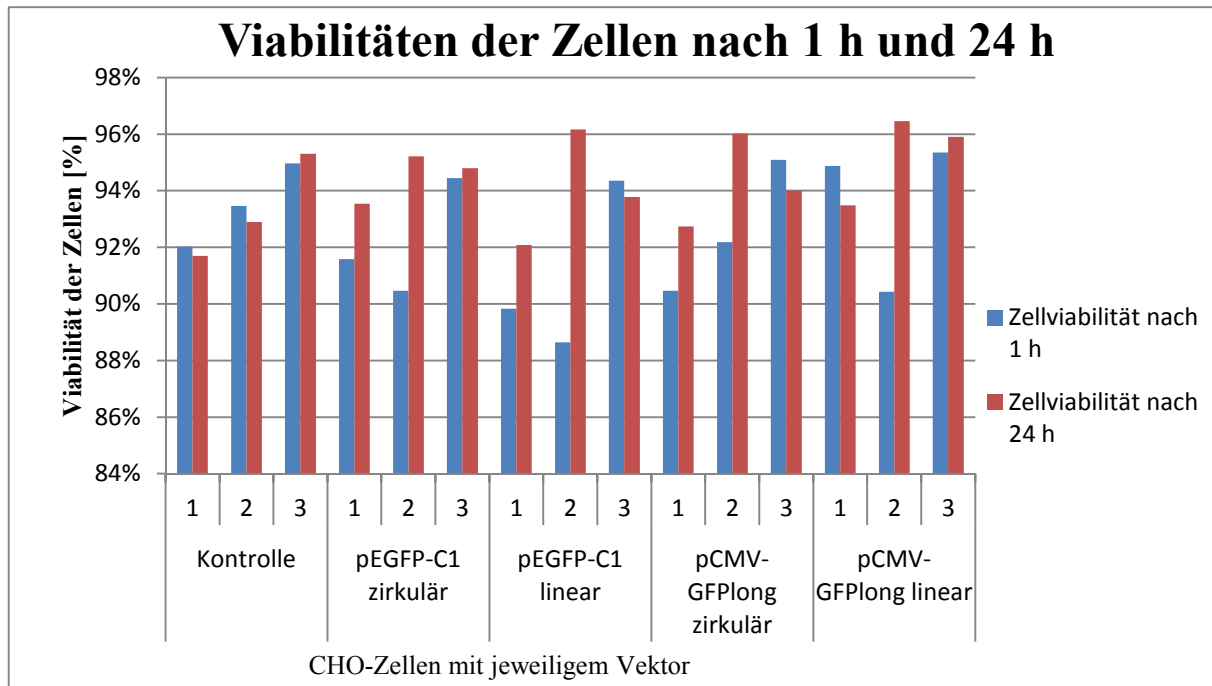


Diagramm 1. Graphische Darstellung der Viabilitäten der elektroporierten Zellen nach 1 h und nach 24 h Inkubationszeit (37 °C und 5% CO₂-Gehalt) nach den Elektroporationen 1, 2 und 3. Die Werte wurde wie in Methode 3.2.2.3 beschrieben, ermittelt.

Die Viabilitätsraten der Zellen nach der Elektroporation liegen alle in dem Bereich, den der Hersteller für diese Zellen mit 90 % angibt (siehe Tabelle 1 und

Diagramm 1). Der niedrigste Wert einer Viabilität liegt bei 88,6 %. Der höchste Wert liegt bei 96,2 %. Das ergibt eine Differenz von 7,6 %. Bei 2/3 der Messungen liegt die Viabilität der Zellen nach 24 h über dem Wert von 1 h.

4.2.2 Transiente Transfektion

Um eine Aussage über die Effizienz der transienten Transfektion machen zu können, wurden die Zellen wie in den Methoden in den Kapiteln 3.2.2.8 und 3.2.2.10 beschrieben, behandelt. Und wie in der Methode in Kapitel 3.2.2.11 beschrieben, gezählt. In der nachfolgenden Tabelle 7 sind die Werte dieser Zählung aufgeführt. Eine vollständige Liste der Werte ist im Anhang zu finden (siehe Anhang Tabelle 15).

	24 h		48 h		72 h		96 h	
pEGFP-C1 zirkulär	1	84,8%	83,3%	85,2%	87,1%			
	2	83,4%	84,2%	84,9%	84,4%			
	3	83,7%	83,5%	86,9%	86,9%			
	MW	83,9%	83,7%	85,7%	86,2%			
pEGFP-C1 linear	1	85,9%	86,8%	87,3%	89,1%			
	2	86,1%	88,6%	86,9%	89,2%			
	3	87,0%	87,1%	89,3%	88,2%			
	MW	86,4%	87,5%	87,8%	88,8%			
pCMV-GFP long zirkulär	1	83,8%	84,8%	86,1%	86,8%			
	2	81,5%	84,4%	86,1%	85,4%			
	3	84,2%	85,9%	86,0%	84,4%			
	MW	83,2%	85,0%	86,0%	85,5%			
pCMV-GFP long linear	1	82,1%	83,3%	82,1%	83,9%			
	2	83,9%	82,6%	87,1%	84,9%			
	3	81,6%	83,3%	87,0%	84,6%			
	MW	82,5%	83,1%	85,4%	84,4%			

Tabelle 7. Darstellung der transienten Transfektionseffizienzen. Die einzelnen Transfektionen (15 µg DNA /1E07 c in 100 µL) wurden zu Gruppen mit dem jeweiligen Vektor zusammengefasst und wie in der Methode in Kapitel 3.2.2.11 beschrieben, ausgezählt (fixiert in 4 % PFA-PBS, gefärbt mit 4 % DAPI-PBS) und mit

Formel 1 berechnet. Aus diesen Werten wurde der Mittelwert (MW) gebildet, der angegeben wurde. Die Kontrollgruppe war negativ und ist hier nicht aufgeführt.

Zur besseren Übersicht, wurden die Daten aus Tabelle 7 in Diagramm 2 grafisch dargestellt.

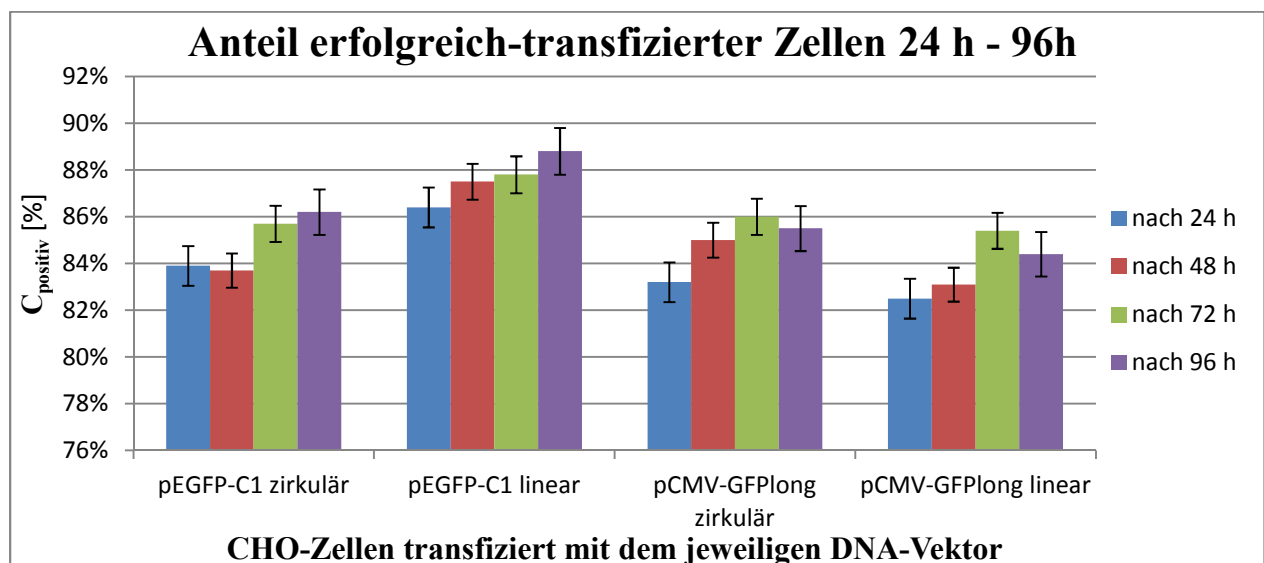


Diagramm 2. Grafische Darstellung der Anteile erfolgreich-transfizierter Zellen nach 24 bis 96 h mit Standardabweichung.

Aus den Daten in

Diagramm 2 ist zu erkennen, dass die Rate der erfolgreich transfizierten Zellen bei jedem Versuch über 82 % liegt. Der Hersteller des Elektroporators, MaxCyte[®], gibt einen Wert von 90 % für diese Zellen und ein GFP-Vektor an (siehe Tabelle 1). Dieser Wert wurde bei keinem Versuch erreicht, dennoch liegen die Werte nahe an den Angaben des Herstellers.

Es ist zu erkennen, dass alle Transfektionen in den Versuchen ein ähnliches Ergebnis erzielt haben. Die Transfektion mit pEGFP-C1 in linearer Form lieferte die besten Transfektionsergebnisse. Der niedrigste Wert bei der Transfektion mit diesem Vektor und in dieser Form, ist höher als die maximalen Werte der anderen Vektoren und Konformationen. Die niedrigsten Werte liefert der pCMV-GFP_{long}-Vektor in linearer Form. Sie unterscheiden sich aber nur minimal von den entsprechenden Werten von pEGFP-C1-zirkulär und pCMV-GFP_{long}-zirkulär.

Aus den Daten in

Diagramm 2 ist zu erkennen, dass im Fall von pEGFP-C1 die lineare Konformation eine höhere Transfektionseffizienz zeigt als die zirkuläre Form. Hingegen ist es bei pCMV-GFP_{long} umgekehrt. Hier hat die zirkuläre Konformation eine höhere Effizienz als die lineare Form. Das bedeutet, dass die Größe des Vektors keinen erkennbaren Einfluss auf die Effizienz hat, ebenso kann keine Aussage über den Einfluss der Konformation des Vektors gemacht werden.

Es ist ebenfalls ersichtlich, dass die Expression von GFP bei allen Kulturen in den ersten 72 h steigt. Bei dem pEGFP-C1-Vektor in beiden Konformationen hält diese Entwicklung auch bis 96 h nach Transfektion an. Bei pCMV-GFP_{long} ist in beiden Fällen eine Abnahme der Werte zu erkennen.

Wenn der Mittelwert der transienten Transfektion ermittelt wird, ergibt sich ein Wert von 85,3 %. Das liegt 4,7 % unterhalb des Wertes, den der Hersteller angibt.

Die Standardabweichungen der Werte sind angegeben. Es ist zu erkennen, dass die Standardabweichung gering ist. Aus den geringen Standardabweichungen kann abgeleitet werden, dass die Ergebnisse der drei Versuche ähnlich sind.

4.2.3 Stabile Transfektion

Die Zellen, die stabil transfiziert werden sollten, wurden wie in der Methode in Kapitel 3.2.2.12 beschrieben, ausgesät und für 10 Tage mit Selektionsmedium inkubiert. Danach wurden sie wie in der Methode in Kapitel 3.2.2.13 beschrieben, markiert und gezählt. In der folgenden

Tabelle 8. Tabelle mit den Anzahlen der Klone, die aus **der** erfolgreichen stabilen

Transfektion hervorgegangen sind. Die transfizierten Zellen mit dem jeweiligen Vektor wurden wie in der Methode in Kapitel 3.2.2.12 beschrieben, in den angegebenen Zellzahlen ausgesät und wie in der Methode in Kapitel 3.2.2.14 beschrieben, markiert (fixiert mit 4 % PFA-PBS, gefärbt mit 4 % DAPI-PBS) und gezählt. Die Werte für die Anzahl der Klone wurden addiert und hier nur als Summe angegeben, eine vollständige Liste der einzelnen Werte ist im Anhang

Tabelle 16 zu finden. Da die Schalen der 5E04 Aussaat zu dicht bewachsen waren, konnten sie nicht ausgezählt werden und wurden hier nicht ausgewertet.

	5E03	1E04
pEGFP-C1 zirkulär	135	192
pEGFP-C1 linear	173	186
pCMV-GFP long zirkulär	66	75
pCMV-GFP long linear	45	70

Tabelle 8. Tabelle mit den Anzahlen der Klone, die aus der erfolgreichen stabilen Transfektion hervorgegangen sind. Die transfizierten Zellen mit dem jeweiligen Vektor wurden wie in der Methode in Kapitel 3.2.2.12 beschrieben, in den angegebenen Zellzahlen ausgesät und wie in der Methode in Kapitel 3.2.2.14 beschrieben, markiert (fixiert mit 4 % PFA-PBS, gefärbt mit 4 % DAPI-PBS) und gezählt. Die Werte für die Anzahl der Klone wurden addiert und hier nur als Summe angegeben, eine vollständige Liste der einzelnen Werte ist im Anhang

Tabelle 16 zu finden. Da die Schalen der 5E04 Aussaat zu dicht bewachsen waren, konnten sie nicht ausgezählt werden und wurden hier nicht ausgewertet.

Aus den Zahlen der

Tabelle 8 lässt sich erkennen, dass der Vektor pEGFP-C1 mehr Klone generierte (676) und der Vektor pCMV-GFP long weniger (256). Das bedeutet, dass der kleinere Vektor eine um den Faktor 2,6 größere Anzahl an Klonen generiert als der große Vektor. Dieser Zusammenhang zeigt, dass die Größe des Vektors Einfluss auf die Insertionsfrequenz des Vektors ins Genom hat. In

Diagramm 3 sind die Werte aus

Tabelle 8 grafisch dargestellt.

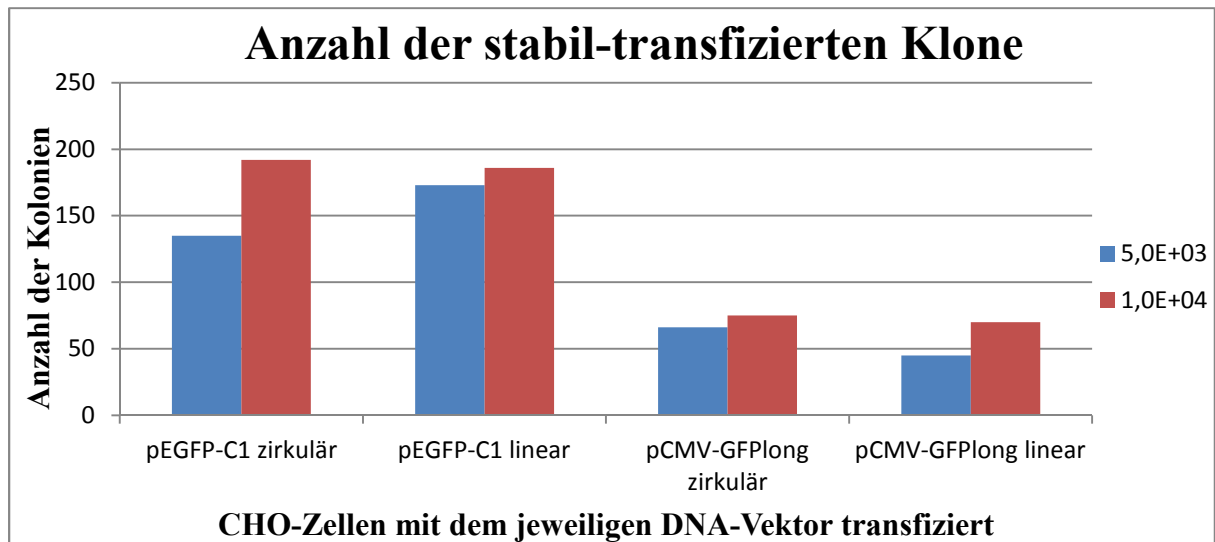


Diagramm 3. Graphische Darstellung der Verteilung stabil-transfizierter Klone auf den Kulturschalen nach 10 Tagen Inkubationszeit (bei 37 °C und 5 %-CO₂-Gehalt) mit Selektionsmedium.

Die Klone wurden nach ihrem Expressionsverhalten eingestuft. In Abbildung 12 ist je ein Beispiel einer Kategorie dargestellt.

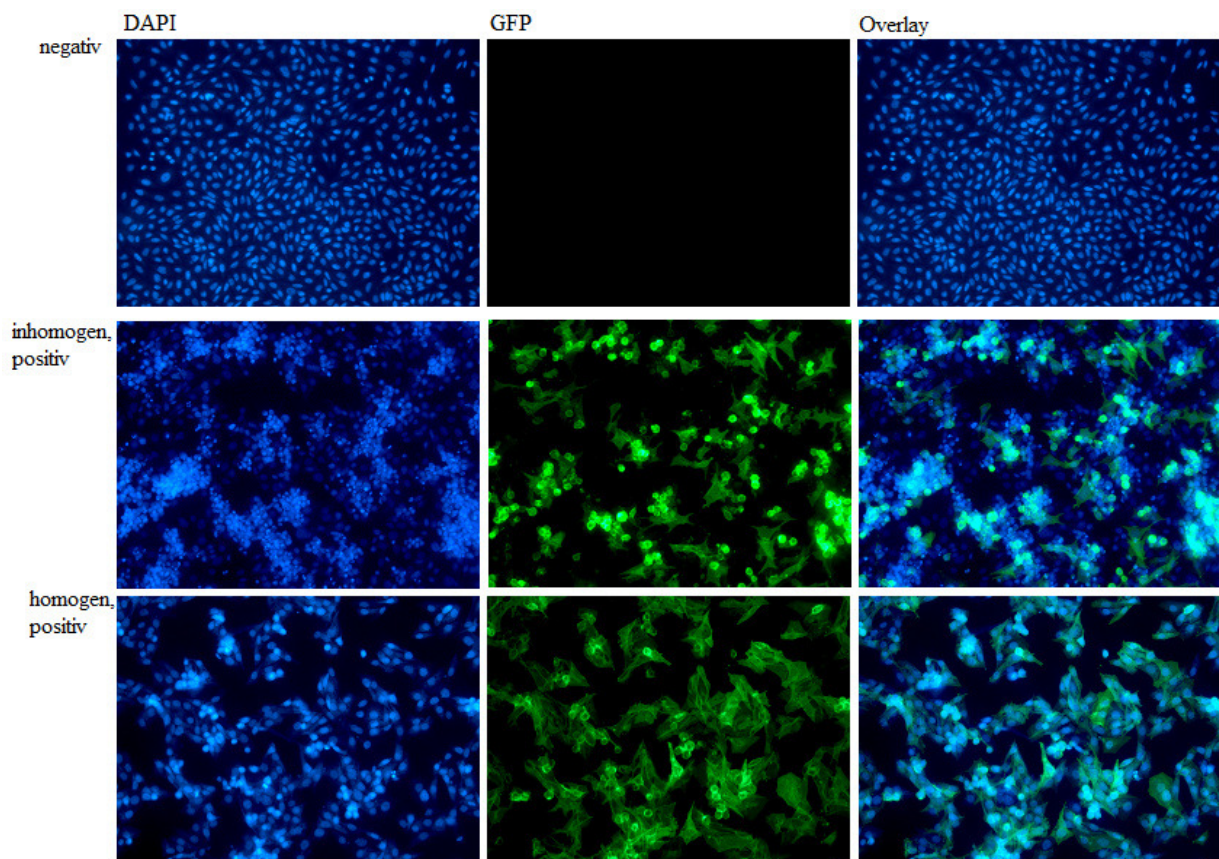


Abbildung 12. Fluoreszenzmikroskopaufnahmen der stabil-transfizierten Klone (37 °C und 5 %-CO₂-Gehalt inkubiert, 4 % PFA-PBS fixiert). Die Spalte 1 zeigt die Bilder der DAPI Färbung (4 % DAPI-PBS für 30 min) nach 99,6 ms Belichtungszeit, Spalte 2 zeigt die Bilder der GFP-Fluoreszenz nach 276,6 ms Belichtungszeit, Spalte 3 zeigt jeweils die beiden Bilder übereinandergelegt (Overlay). Zeile 1 zeigt einen stabilen, negativen Klon, Zeile 2 zeigt einen stabilen, positiv-inhomogenen Klon, Zeile 3 zeigt einen stabilen, positiv-homogenen Klon.

In Abbildung 10 ist gut zu sehen wie sich das unterschiedliche Expressionsverhalten ausdrückt. Der negative stabile Klon zeigt keine Fluoreszenz bei der GFP Anregung, das

bedeutet, die Zellen exprimieren kein GFP. Hingegen ist die Expression von GFP bei den inhomogenen stabilen Klonen unregelmäßig. Viele Zellen exprimieren kein GFP, andere hingegen schon. Sehr gut ist das am Overlay Bild zu erkennen, dort wo die blaue DAPI-Färbung zu sehen ist und keine grüne GFP-Färbung, ist eine negative oder sehr schwach positiv Zelle. Bei dem homogenen positiven Klon ist DAPI- und GFP-Färbung bei jeder Zelle vorhanden.

Von den, wie in der Methode in Kapitel 3.2.2.13 beschrieben, Kulturschalen wurden jeweils 100 Kolonien isoliert und weiter bearbeitet. Für die Auswertung der stabilen Transfektion wurden die Zellen wie in den Methoden in den Kapiteln 3.2.2.14 und 3.2.2.15 beschrieben, vorbereitet und wie in der Methode in Kapitel 3.2.2.16 beschrieben beurteilt (siehe Abbildung 12). In der nachfolgenden Tabelle 10 ist aufgeführt, wie viele der 100 isolierten Klone die weitere Kultivierung in den 96-Well-Platten mit Selektionsmedium überlebt hatten.

	Anzahl isolierter Klone	Überlebende Klone	Abgestorbene Klone	%-Anteil überlebender Klone
pEGFP-C1 zirkulär	100	76	24	76,0 %
pEGFP-C1 linear	100	94	6	94,0 %
pCMV-GFP long zirkulär	100	81	19	81,0 %
pCMV-GFP long linear	100	78	22	78,0 %

Tabelle 9. Anzahl der isolierten Klone der transfizierten Zellen nach 10 Tagen Inkubation (37 °C und 5%-CO₂-Gehalt) mit Selektionsmedium, mit Angabe wie viele der Klone die weitere Kultivierung überlebt haben und wie viele abgestorben sind.

Von den stabil-transfizierten Klonen wurden je 100 Stück isoliert und vermehrt. Bei diesem Vorgang überlebten bei alle Kulturen mindestens 76 %. Die überlebenden Klone wurden, wie in der Methode in Kapitel 3.2.2.16 beschrieben, nach ihrem Expressionsmuster beurteilt. In Tabelle 10 ist das Ergebnis aufgeführt.

	homogen	inhomogen	negativ
pEGFP-C1 zirkulär	15	59	2
pEGFP-C1 linear	23	70	1
pCMV-GFP long zirkulär	14	60	7
pCMV-GFP long linear	19	52	7

Tabelle 10. Angabe der Verteilung von homogenen, inhomogenen und negativen Kulturen der isolierten Klone.

Zur besseren Anschauung wurden die Daten aus

Tabelle 10 in

Diagramm 4 dargestellt.

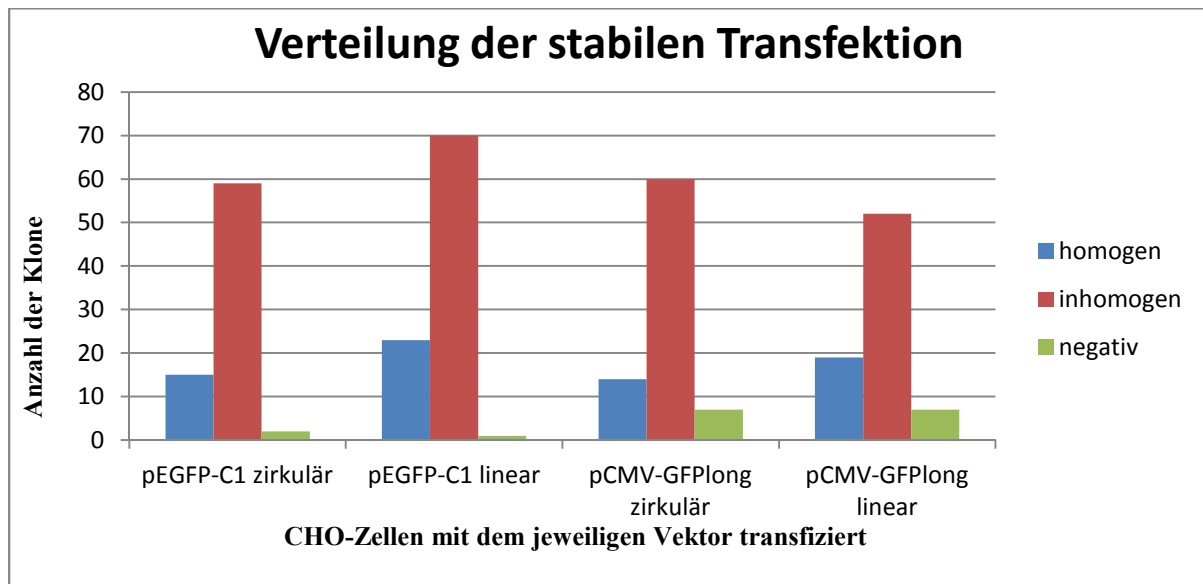


Diagramm 4. Graphische Darstellung der Verteilung der Expressionsmuster. Die Klone wurden 10 Tage unter Selektionsdruck inkubiert (37 °C und 5 %-CO₂-Gehalt) und danach isoliert.

Aus den Daten in

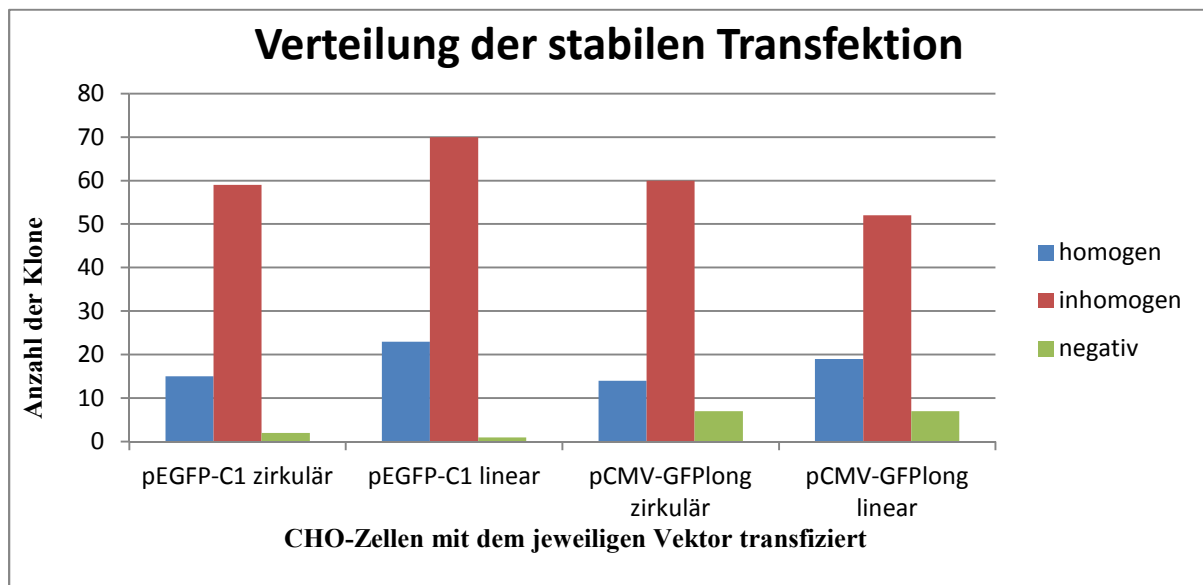


Diagramm 4 und

Tabelle 10 lässt sich erkennen, dass alle stabil-transfizierten Vektoren homogene Klone erzeugen (siehe

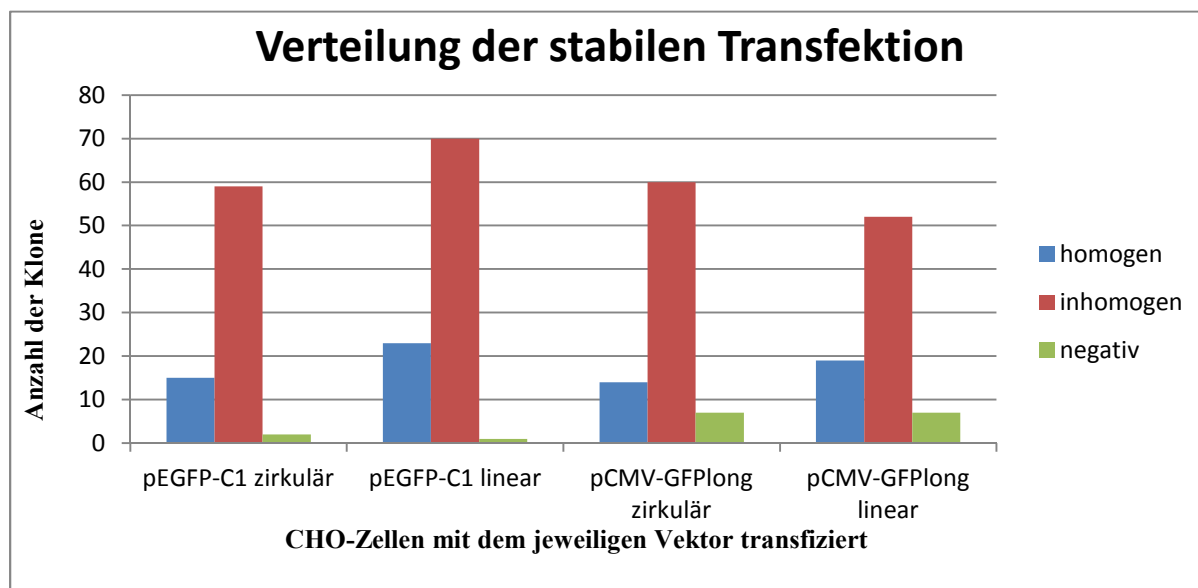


Diagramm 4 und

Tabelle 10). Dabei ist deutlich zu erkennen, dass die meisten homogen-exprimierenden Klone bei der Transfektion mit dem kleineren pEGFP-C1-Vektor gebildet wurden. Bei diesem Vektor wurden auch am meisten inhomogen-exprimierende Klone gebildet und am wenigsten negative Klone. Aus diesen Fakten lassen sich die besten Aufnahmebedingungen der Fremd-DNA ins Wirtsgenom erkennen. Beste Bedingungen sind ein kleiner Vektor in linearer Konformation.

Die beiden zirkulären Vektoren, pEGFP-C1 zirkulär und pCMV-GFP long zirkulär, bildeten Klone mit einem sehr ähnlich verteilten Expressionsmuster. Beide Vektoren bildeten um den Faktor vier vermehrt inhomogen-exprimierende Klone. Die beiden linearen Vektoren ähneln sich bei der Verteilung des Expressionsmusters ebenfalls deutlich. Beide Vektoren bildeten um den Faktor drei vermehrt inhomogen-exprimierende Klone als homogen-exprimierende Klone.

Beide Vektoren in linearer Form haben eine hohe Effizienz bei der Bildung homogen-exprimierender Klone. Die Wahrscheinlichkeit der Bildung homogen-exprimierender, stabiler Klone liegt um 5 % höher als bei den Vektoren in zirkulärer Form. Das zeigt eindeutig und sehr deutlich, dass die Konformation den größten Einfluss auf das Transfektionsergebnis hat. Einen kleineren Einfluss hat die Größe des Vektors, da sich nur die Anzahl der inhomogen-

exprimierenden Klone bei beiden Transfektionsansätzen der linearen Vektoren unterscheidet. Außerdem unterscheiden sich beide Transfektionsansätze in der Anzahl der negativen Klone voneinander. Der Transfektionsansatz bei dem die Zellen die mit dem Vektor pEGFP-C1 linear transfiziert wurden, bildet fast keine negativen Klone. Dieser Vektor in zirkulärer Form bildet die nächstkleinere Anzahl an negativen Klonen aus. Es zeigte sich, dass der kleinere Vektor deutlich weniger negative Klone bildet als der große Vektor.

Wenn man die gebildeten Klone in die Expressionsmuster einteilt und sie auf die Gesamtzahl der Klone bezieht, ergibt sich die Verteilung wie in Tabelle 11 angegeben.

	homogen	inhomogen	negativ
pEGFP-C1 zirkulär	19,7 %	77,6 %	2,6 %
pEGFP-C1 linear	24,5%	74,5 %	1,1 %
pCMV-GFP _{long} zirkulär	17,3 %	74,1 %	8,7 %
pCMV-GFP _{long} linear	24,4 %	66,7 %	9 %

Tabelle 11. Angabe der Verhältnisse bei der Bildung von homogenen, inhomogenen und negativen Klonen bei der stabilen Transfektion.

Die grafische Auswertung der Daten aus Tabelle 11 ist in Diagramm 5 zu sehen.

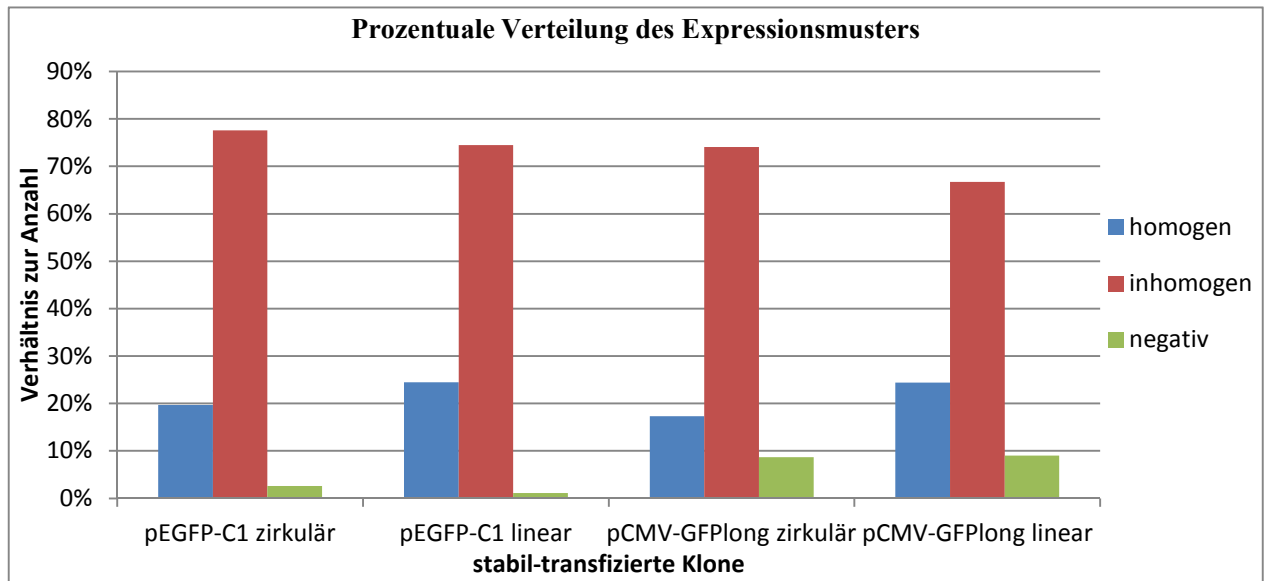


Diagramm 5. Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung des Expressionsmusters im Verhältnis zur Gesamtanzahl an gebildeten stabilen Klonen.

5 Diskussion

5.1 Einfluss von Elektroporation auf die Zellen direkt nach der Transfektion

Die Elektroporation ermöglicht das Einbringen von Fremd-DNA in die Wirtszelle durch Nutzung elektrischer Impulse. Die Schwächung stellt für die Zelle einen erheblichen Stress dar. Ein Aspekt, der in dieser Arbeit untersucht werden sollte ist der Einfluss der Größe der DNA auf die Viabilität der eukaryotischen Zelle nach der Transfektion.

Die Auswertung der Daten aus Tabelle 6, zeigt, dass die beiden in den Versuchen verwendeten Vektoren keinen deutlichen Einfluss auf die Viabilität der Zellen haben. Die Viabilitätsraten der Zellen nach der Elektroporation ohne DNA liegen im Bereich von 92 % bis 95 %. Diese Werte sind höher als der Wert, den der Hersteller MaxCyte[®] für diese Zelllinie mit 90 % angibt (siehe Tabelle 1). Ein Grund warum die Viabilitätsraten über dem Herstellerwert liegen, kann sein, dass diese Zellen ohne den störenden Einfluss von Fremd-DNA elektroporiert wurden. Die Werte der Kulturen, die mit DNA elektroporiert wurden, liegen zwischen 88,5 % und 95 %. Diese Werte liegen im Bereich der Angaben des Herstellers. Das zeigt, dass die DNA, die verwendet wurde, ohne gravierende Schäden an den Zellen zu verursachen, in die Zelle diffundiert.

Oft sterben beschädigte Zellen nicht direkt nach der Transfektion, sondern innerhalb der ersten 24 h. Daher wurde der Viabilitätswert nach 24 h gemessen. Bei zwei von drei Kontrollen stieg der Viabilitätswert an. Im Durchschnitt stiegen die Werte der Kontrollen um 0,5 %. Das ist nur eine kleine Verbesserung, aber da die Werte bereits nach 1 h über den Herstellerangaben lagen, ist die weitere Steigerung in den 24 h ein Zeichen dafür, dass der Stress für die Zellen sehr gering war und sie sich vollständig davon erholt haben.

Bei den mit DNA elektroporierten Zellen zeigt sich eine Verbesserung der Viabilitätswerte in neun von zwölf Transfektionen (75 %) in den ersten 24 h. Die Zellen zeigen eine Verbesserung der Viabilitätswerte, der maximale Wert der Steigerung beträgt 7,5 %. Die durchschnittliche Steigerung beträgt 3,3 %. Die Werte zeigen, dass die verwendete DNA sehr gut von den Zellen aufgenommen werden konnte und es, wenn überhaupt, nur geringe negative Einflüsse gab. Das bedeutet, dass die Konzentration der DNA mit 15 µg/100 µL sehr gute Resultate bei der Zellviabilität erzielt.

Bei den Zellen, bei denen sich eine Verschlechterung der Werte zeigt, fällt die Differenz gering aus. Im Durchschnitt sinkt sie um 1 %. Dabei bleiben alle Werte über den Angaben des Herstellers. Diese Schwankungen können auch durch normale Fluktuationen in den Messungen erklärt werden und müssen nicht zwangsläufig durch die Elektroporation verursacht worden sein.

Der dritte Elektroporationsansatz wurde mit weniger Zellen durchgeführt als die ersten beiden. Die Zellanzahl war nur halb so groß ($5,5E06$), dabei wurde aber darauf geachtet, das Verhältnis von Zellen zu DNA konstant zu halten. Das führte dazu, dass das Volumen dieser Ansätze nur $50 \mu\text{L}$ betrug. Die Angaben von MaxCyte[®] zur korrekten Anwendung der OC-100 Küvetten besagt, dass ein Volumen von $50 \mu\text{L}$ ohne Probleme mit der OC-100 Küvette verwendet werden kann.

In weiteren Versuchen könnte die Wiederfindungsrate der Zellen nach den Transfektionen bestimmt werden. Da die Zellzahlen der Transfektionsansätze bekannt sind und die Zellzahlen der 24 h Viabilitätsbestimmung gemessen werden können, könnte daraus ein Verhältnis gebildet werden. Mit diese Wiederfindungsrate könnten weitere Aussagen über den Stress der Elektroporation gemacht werden.

5.2 Transiente Transfektion

Ein weiterer Aspekt, der in dieser Arbeit untersucht werden sollte, war die Effizienz der transienten Transfektion. Dazu wurden insgesamt drei Durchgänge der Transfektion durchgeführt. Die Auswertung der Daten zeigt, dass die durchschnittliche Effizienz mit 85,3 % nahe des vom Hersteller ausgegebenen Wertes von 90 % liegt. Der geringste Wert der transienten Transfektion ist 82,5 %, der höchste 88,8 %. Das bedeutet alle Werte liegen in einem Bereich von 3 % um den Durchschnittswert.

Generell ist aus den Werten abzulesen, dass mehr Zellen mit dem kleineren Vektor transfiziert wurden. Die Anzahl der Zellen, die positiv identifiziert werden konnten, stieg bei allen Durchgängen mit der Zeit an. Dieser Anstieg wird dadurch verursacht, dass manche Zellen erst nach einiger Zeit damit beginnen GFP zu exprimieren und dass erst nach einiger Zeit die Konzentration von rekombinantem GFP in der Zelle ausreicht, um sie als positiv identifizieren zu können. Darüber hinaus reichert sich das GFP in der Zelle an. Dieser Anstieg ist bei allen Versuchen zu erkennen, er setzt sich bis 72 h nach Transfektion fort. Die beiden

zirkulären Vektoren haben sehr ähnliche Transfektionsergebnisse. Die höchsten Werte der Transfektionseffizienz liefert der kleine Vektor in linearer Form.

Die Zellen, die mit pCMV-GFP_{long} transfiziert wurden, erreichen nach 72 h ihre maximale Anzahl. Danach nimmt die Anzahl an positiven Zellen bei pCMV-GFP_{long} ab. Während das Verhältnis der exprimierenden Zellen, die mit pEGFP-C1 transfiziert wurden, weiter steigt und diese Reihen ihr Maximum nach 96 h erreichen. Dieses unterschiedliche Verhalten, kann auf zwei Ursachen zurückgeführt werden. Erstens kommt es dazu, dass aufgrund des geringeren Molekulargewichtes mehr Moleküle des kleinen Vektors in den Elektroporationsansätzen vorliegen als bei den Ansätzen des großen Vektors, da bei beiden Vektoren jeweils die Konzentration 15 µg / 100µL DNA eingestellt wurde. Daher stehen ca. um den Faktor 1,7 mehr Einheiten des kleineren Vektors bei der Transfektion zur Verfügung als bei dem großen Vektor. Daher ist zu erwarten, dass die Effizienz des kleineren Vektors über der des großen liegt. Zusammengefasst bedeutet das, dass der erste Grund für unterschiedliche Transfektionseffizienzen die Quantität der Vektoren bei der Transfektion ist. Der andere Grund, warum die Zahl der positiven Zellen bei pCMV-GFP_{long} nach 72 h abnimmt, könnte sein, dass dieser Vektor das GFP-Gen als zusätzliches Protein-Tag beinhaltet. Das rekombinante Protein könnte eine andere Halbwertszeit als reines GFP haben. Dadurch könnte sich die Menge an GFP in diesen Zellen schneller reduzieren, was dazu führt, dass nach 72 h mehr Zellen negativ gezählt werden würden, weil die Konzentration an GFP zu gering geworden ist. Also könnte die Halbwertszeit des exprimierten Proteins der andere Grund für unterschiedliche Transfektionseffizienzen sein.

Die Literatur sagt aus, dass zirkuläre DNA besser in die Zelle aufgenommen wird und damit eine höhere transiente Transfektionseffizienz erzielt wird als bei linearer DNA. Dieses Ergebnis konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Denn die Effizienz bei transienten Transfektion ist auf der einen Seite bei dem kleineren Vektor in linearer Form größer und auf der anderen Seite beim größeren Vektor in zirkulärer Form. Dabei weisen die beiden Vektoren in zirkulärer Form eine sehr ähnliche Transfektionseffizienz auf, das weist darauf hin, dass es bei der Transfektion dieser Vektoren nicht auf die Größe des Vektors ankommt, sondern vorrangig auf dessen Konformation. Beide haben nach 24 h einen Wert von 83 % und steigen in 48 h um 2 %. Diese Effizienz wird nur von pEGFP-C1 linear übertroffen. Dieser Vektor hat generell eine um 2 % bessere Effizienz bei der Transfektion als die zirkuläre Form beider Vektoren. Dieses Ergebnis ist an dieser Stelle schwierig zu erklären und wurde eventuell durch zufällige Schwankungen verursacht. Für eine genauere Analyse wäre es nötig,

die Daten zunächst in einer Wiederholung der Versuche zu reproduzieren und vielleicht durch den Einsatz weiterer Vektoren zu erweitern. Es sollte geklärt werden, ob es sich um ein zufälliges Ergebnis handelt oder um einen Trend.

Die schlechteste Effizienz hat pCMV-GFP_{long} linear. Das ist dadurch zu erklären, dass einerseits die lineare DNA nicht so gut in die Zelle aufgenommen wird und andererseits durch die Größe des Vektors, wodurch im Versuchsansatz weniger Einheiten des Vektors verfügbar waren als bei dem kleinen Vektor (Faktor 1,7 mehr Einheiten).

Bei allen Zellen ist es so, dass sich die Konzentration der Vektoren in den Zellen verringert, denn durch Zellteilung verdünnt sich die Dichte der Vektoren. Das führt dazu, dass die Menge an gebildetem GFP nach einigen Tagen wieder abnimmt.

5.3 Stabile Transfektion

Basierend auf den Daten aus Tabelle 10 wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die lineare Form der Vektoren mehr homogene, stabil-transfizierte Klone produziert als die zirkuläre Konformation. Die lineare Konformation erzeugt durchschnittlich 24,5 % homogene, stabil-transfizierte Klone. Hingegen sind es bei der zirkulären Form nur 18,5 %. Das bedeutet, dass etwa jeder vierte Klon bei der Transfektion mit linearer DNA homogenes Expressionsverhalten zeigt, hingegen bei zirkulärer Konformation nur jeder fünfte bis sechste Klon.

Die zirkulären Vektoren bilden eine größere Anzahl stabil-transfizierten Klone aus (siehe Tabelle 8). Auf den Kulturschalen, die mit der Konzentration von 1E04 Zellen ausgesät wurden, wuchsen 192 (cPEGFP-C1) bzw. 75 (pCMV-GFP_{long}) Klone. Hingegen bei den linearen Vektoren nur 148 (cPEGFP-C1) und 70 (pCMV-GFP_{long}).

Bezogen auf die 1E04 transfizierten und ausgesäten Zellen, ergibt sich auf die eingesetzte Zellzahl von 1E07 eine theoretische Anzahl an stabilen, homogen-exprimierenden Klonen wie in Tabelle 12 aufgeführt.

Theoretische Anzahl an stabil-transfizierten, homogenen Klonen bei verschiedenen Aussaatzahlen pro Kulturschale				
	1E04		1E07 Zellen	
	Klone	stabil, homogenes Expressionsmuster	Klone	stabil, homogenes Expressionsmuster
pEGFP-C1 zirkulär	192	38	192.000	38.000
pEGFP-C1 linear	186	46	186.000	46.000
pCMV-GFP _{long} zirkulär	75	13	75.000	13.000
pCMV-GFP _{long} linear	70	17	70.000	17.000

Tabelle 12. Theoretische Anzahl homogener stabil-transfizierter Klone, gebildet von allen transfizierten Zellen.

Im Effizienzvergleich der beiden DNA-Konformationen zeigt sich deutlich dass die lineare Form eine höhere Effizienz bei der Bildung homogener stabil-transfizierter Klone zeigt als die zirkuläre Form. Das bedeutet, es ist von Vorteil für die Bildung von homogen-exprimierenden Klonen, Zellen mit linearer DNA zu transfizieren. Wird mit zirkulärer DNA transfiziert, werden um 5 % weniger homogen-exprimierende Klone generiert. Daher sollte vor jeder Transfektion überlegt werden, ob sich der zusätzliche Aufwand lohnt mit linearer DNA zu arbeiten. Das könnte im Fall sehr toxischer Zielproteine, bei denen nur wenige Klone erwartet werden, der Fall sein.

Abschließend zeigen die in dieser Arbeit vorgestellten Daten, dass auf bei der Transfektion mit dem MaxCyte[®] bestätigt werden konnte, dass kleine Vektoren leichter zu transfizieren sind und das lineare DNA leichter in das Genom integriert. Die Verbesserung der Insertionsfrequenz beträgt allerdings nur 5 %.

6 Zusammenfassung

Die hier vorliegende Arbeit ist ein Vergleich der Transfektion von rekombinanter DNA am Beispiel eines großen Vektors mit 8180 bp (pCMV-GFP_{long}) und eines kleinen Vektors mit 4731 bp (pEGFP-C1). Als Transfektionsmethode wurde die physikalische Methode der Elektroporation gewählt. Zielzellen waren eukaryotische Zellen vom Typ CHO-K1. Zur Überprüfung der Effizienz der Transfektion wurden die Anzahl der transient-transfizierten und der stabil-transfizierten Zellen ermittelt und ausgewertet.

Die Ausgangsvermutung war, dass der kleinere Vektor eine höhere Aufnahme­rate in die Zelle aufweist als der große Vektor. Über die Bildung des GFP, nach erfolgreicher Transfektion wurde dies überprüft. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurde diese Grünfärbung nachgewiesen. Als Kontrolle wurden die Zellen mit DAPI gegengefärbt und ausgezählt.

Zusätzlich wurde vermutet, dass DNA in zirkulärer Konformation eine besser transiente Transfektionseffizienz aufweist als in linearer Form. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die transiente Transfektionseffizienz größer ist, wenn kleine Vektoren eingesetzt werden.

Wie in der Literatur [Oliveira et al., 2005] bestätigt, wurde festgestellt, dass die lineare Konformation eine um 5 % höhere Insertionseffizienz aufweist oder häufiger ins Genom integriert wird als die zirkuläre Konformation.

Wenn es für die Versuche nur erforderlich ist mit transient-transfizierte Zelle zu arbeiten, dann ist der Einsatz von kleineren Vektoren besser geeignet. Der kleinere Vektoren hat eine höhere Effizienz bei der Bildung transient-transfizierter Zellen als der große Vektor. Das bedeutet, wenn aus den Zellen keine Zelllinie entwickelt werden soll, ist es von Vorteil einen kleinen Vektor zu verwenden.

Sollte das Zielgen an sich schon groß sein, kann man den Einsatz eines noch größeren Vektors umgehen, indem man das Zielgen in einen kleineren Vektor bringt. Und wenn das Ziel der Versuche nur die transient-transfizierten Zellen sind, kann man bei den eingesetzten Vektoren auch auf die Antibiotikumsresistenz gegenüber den eukaryotischen Antibiotika verzichten. Denn die Zellen werden nicht unter Selektionsdruck gehalten. Dadurch wird der verwendete Vektor noch ein wenig kleiner und das hat zur Folge, dass die Effizienz noch weiter gesteigert wird.

Im Gegensatz zur Größe zeigt die Konformation einen deutlich kleineren Einfluss auf die Effizienz bei der Bildung homogen-exprimierender Klone. Obwohl der Einfluss der

Konformation geringer ist als der Einfluss der Größe kann dennoch die DNA für den Einsatz linearisiert werden. Dabei ist ein hoher Aufwand nötig und die prozentuale Effizienz bei der Bildung homogen-exprimierender Klone ist dafür nur gering höher.

Im Langzeittest wurden die Vektoren hinsichtlich der Bildungsrate von stabil-transfizierten Zellen in Abhängigkeit der Konformation untersucht. Dazu wurden die transfizierten Zellen einem Selektionsdruck ausgesetzt, den nur stabil-transfizierte Zellen überleben konnten. Die Ergebnisse der Versuche zeigen, dass der kleinere Vektor in linearer Form die meisten stabil-transfizierten Klone mit homogenem Expressionsmuster hervorbringt. Dieses Ergebnis bestätigt die Ausgangsvermutungen und stimmt mit der Literatur überein.

Auf Basis der Daten wird weiterhin die Aussage getroffen, dass die zirkuläre Form der Vektoren nahezu die gleiche Anzahl an stabil-transfizierten, homogen-exprimierten Zellen hervorbringt, dadurch wurde bestätigt, dass die Größe der Vektoren, die eingesetzt wurden, nur einen sehr kleinen Einfluss auf die Effizienz bei der stabilen Transfektion hat. Die wenigsten stabil-transfizierten, homogen-exprimierenden Zellen werden bei dem großen Vektor in linearer Form gebildet. Das lässt darauf schließen, dass die Zellen die geringste Aufnahmerate mit dieser DNA haben.

Für die Entwicklung einer Zelllinie ist es extrem wichtig Klone mit homogen Expressionsmuster zu generieren. Klone mit inhomogenem Muster sind nicht von Nutzen. Wie die Ergebnisse zeigen, ist die Größe des Vektors dabei nicht ausschlaggebend, denn die von beiden Vektoren gebildeten Klone zeigen ein sehr ähnliches Expressionsmuster, was deutlicher von der Konformation bestimmt wird. Dabei zeigen die Ergebnisse sehr deutlich, dass die lineare Konformation eine viel höhere Effizienz bei der Bildung stabiler homogener Klone hat als die zirkuläre Form. Daher ist der Einsatz der linearen Vektoren bei der Zelllinienentwicklung ratsam. Allerdings muss aber der Mehraufwand bei der Linearisierung berücksichtigt werden. Denn die gleiche Anzahl an stabilen homogenen Klonen kann auch durch den Einsatz zirkulärer DNA erzeugt werden. Dabei entsteht aber mehr Aufwand in der Zelllinienentwicklung, da mehr transfizierte Zellen passagiert, expandiert und kontrolliert werden müssten. Es ist also eine Frage wann sich ein größerer Aufwand rechtfertigt. Entweder beim Linearisieren der DNA um mit linearen Vektoren eine höhere Effizienz bei der Bildung stabiler homogen-exprimierender Klone zu haben und damit Aufwand in der Zelllinienentwicklung einspart. Oder, wenn man mit zirkulären Vektoren arbeitet und auf den

Aufwand der Linearisierung verzichtet, dafür aber mehr Aufwand in der Zelllinienentwicklung hat.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es sich in den meisten Fällen nicht lohnt mit linearer DNA zu arbeiten, dieses jedoch im Einzelfall (z.B. Arbeiten mit toxischen Targetproteinen) sinnvoll sein könnte. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass es für eine optimale Transfektion sinnvoll ist die DNA-Vektoren so klein wie möglich zu halten und gegebenenfalls das Targetgen in einen kleinen Zielvektor umzuklonieren.

Als Ergebnis dieser Arbeit werden Möglichkeiten aufgezeigt, welche Parameter bei der Arbeit mit transfizierten Zellen in der Produktion verbessert werden können.

7 **Ausblick**

Die Ergebnisse der Versuche zeigen eindeutig, dass die Effizienz bei der transienten Transfektion höher ist, wenn kleine Vektoren in zirkulärer Konformation eingesetzt werden. Der Hersteller gibt eine Effizienz von 90 % an. Dieser Wert wurde in den Versuchen nicht erreicht. Daraus ergibt sich die Möglichkeit einer Untersuchung, welche Parameter geändert werden können, um die transiente Transfektion zu optimieren.

Wenn große Vektoren transfiziert werden sollen, kann es von Vorteil sein, die Zielgene in einen kleineren Vektor umzuklonieren. Wenn die Zellen nicht selektiert werden sollen kann auf die Gene der Antibiotikumresistenz für Eukaryoten verzichtet werden. Es ist daher noch zu untersuchen, wie diese Methode optimiert werden kann und ab welcher Vektorengröße sich der Mehraufwand einer Umklonierung lohnt.

Die Ergebnisse der Versuche zeigen weiterhin, dass die stabile Transfektion mit linearisierter DNA eine höhere Effizienz bei der Bildung stabiler, homogen-exprimierender Klone erzielt. Dabei wurden nur zwei verschiedene Vektoren untersucht. Es könnte daher in einer weiteren wissenschaftlichen Arbeit untersucht werden, welchen Einfluss die Größe des Vektors bei Verwendung von mehreren, unterschiedlich großen Vektoren hat.

8 Quellen

- **Albermann**, S., (2004) *In situ* Elektroporation adhärenter Säugerzellen, Dissertation am Institut für Biochemie der WWU Münster, Deutschland.
- **Alberts**, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2003) *Molekularbiology of the Cell* - 5. Auflage, Taylor & Francis, New York, USA.
- **Arbeitsblätter** von MaxCyte[®]: STX[™] Protocol Handouts-1; IMFG 60020 STX[™] Operation Manual.
- **Bertram**, J., (2006) Magnet Assisted Transfection: combining nanotechnology and magnetic forces to improve intracellular delivery of nucleic acids, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, USA, 277 - 285.
- **Cavazzana-Calvo**, M., Fischer, A., (2007) *The Journal of Clinical Investigation* Volume 117, American Society for Clinical Investigation, USA.
- **Chalfie**, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., Prasher, D. C., (1997) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, USA, 802 - 805.
- **Chmiel**, H. (2011) *Bioprozesstechnik* 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 377 - 383.
- **Clark**, P., D., Pazdernik, N., J., (2009) *Biotechnology: Applying the Genetic Revolution*, Elsevier Academic Press Inc. USA.
- **Dingermann**, T., Hänsel, R., Zündorf, I., (2002) *Pharmazeutische Biologie: Molekulare Grundlagen und Klinische Anwendung*, Springer-Verlag, Deutschland.
- **Gartler**, S., M., Varadarajan, K., R., Lou, P., Canfield, T., K., Traynor, J., Francke, U., Hansen R., S. (2004) Normal histone modifications on the inactive X chromosome in ICF and Rett syndrome cells: implications for methyl-CpG binding proteins, *BioMed Central Ltd.*, USA.
- **Goldin**, A. (1992) *Maintenance of Xenopus laevis and oocyte injection*, Academic Press Inc., USA, 487- 509.
- **Gressner**, A. M., Arndt, T., (2007) *Lexikon der medizinischen Labordiagnostik, Band 1 Klinische Chemie*, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1277.
- **Hermey**, G., Mahlke, C., Schwake, M., Sommer, T., (2010) *Der Experimentator - Neurowissenschaften*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland.
- **Karlson**, P., Doenecke, D., Koolman, J., Fuchs, G., Gerok, W., (2005) *Biochemie und Pathologie* - 15. Auflage, Thieme Verlag, Deutschland, 600 - 605.

- **Knippers**, R., (2006) Molekulare Genetik 9. Auflage, Thieme Verlag, Deutschland.
- **Kulozik**, A. E., Hentze, M. W., Hagemeier, C., Bartra, C. R. (2000) Molekulare Medizin. Grundlagen Pathomechanismen Klinik, Walter de Gruyter, Berlin, Deutschland, 207-208.
- **MaxCyte**[®], (?), manual 20100209 Transfected Cell Examples, USA.
- **Mühlhardt**, C. (2009) Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics 6. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 14-20, 264-272.
- **Nakamura**, H., (2009) Electroporation and Sonoporation in Developmental Biology, Springer Verlag, Deutschland, 317 - 326.
- **Nickoloff**, J., A., (1995) Animal Cell Electroporation and Electrofusion Protocols, Humana Press Inc., New York, USA, 115 - 120.
- **Oliveira**, R., R., Carvalho, D., M., Lisauskas, S., Mello, E., (2005) Effectiveness of Liposomes to transfect livestock fibroblasts, Genetics and Molecular Research Journal, Brasilien, 189 - 192.
- **Prasher**, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., Cormier, M. J., (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein, Gene 111, Woods Hole Oceanographic Institution, USA, 229 - 233.
- **Raven**, P. H., Evert, R. F., Eichhorn S. E., (2005) Biologie der Pflanzen 4. Auflage, W.H. Freeman and Company, New York, USA, 209.
- **Ravid**, K., Freshney, R., I., (1998) DNA Transfer to Cultured Cells, Wiley-Liss, Kanada.
- **Remmele**, W., (1999) Pathologie, SpringerVerlag Berlin Heidelberg, Deutschland, 738 - 742.
- **Ruddle**, H., Kucherlapati, R. S., (1974) Hybrid Cells and Human Genes, Scientific American 231, USA, 36 - 44.
- **Shimamura**, O., (2006). Bioluminescence. Chemical Principles and Methods. World Scientific, New Jersey, USA.
- **thermoscientificbio**, http://www.thermoscientificbio.com/EktronTemplates/*.
- **Wachtler**, F., (2000) Histologie: Lehrbuch der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie 7. Auflage, facultas wuv universitätsverlag, Österreich.
- **Walker**, J., M., Rapley, R., (2002) Molecular Biology and Biotechnology, The Royal Society of Chemistry, UK.
- **Zatloukal**, K., Wagner, E., Cotton, M., Phillips, P., Plank, C., Steinlein, P., Curiel, D., Birnstiel, M., (1999) Transferrinfection: A Highly Efficient Way to Express Gene Constructs in Eukaryotic Cells, Research Institute of Molecular Pathology, North Carolina, USA.

- **Zimmermann**, U., (2000) Plasma Science 28, US Civilian Research & Development Foundation, USA.

9 Anhang

Hier sind die vollständige Chemikalienliste und Geräteliste aufgeführt.

Chemikalienliste

Name	Hersteller
Accutase	PAA
Agarose	Lonza
Ampicillin	PAA
CaCl ₂ (1 M)	Merck
Casy [®] -Ton [™]	Innovatis
DAPI 100 µM, DMF	AppliChem
Ethanol 70 %	Roth
FCS - Fetal Calf Serum	PAA
G-418	Gibco
Gene Ruler 1 kb (DNA Ladder)	Fermentas
Giga/MAXi Prep Kit	Qiagen
Ham's F12 - Nutrient Mixture F-12 Ham	PAA
HyClone (Elektroporationspuffer)	Thermo Scientific
Isopropanol	Roth
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Ladepuffer	Fermentas
LB-Medium	Laboransatz 10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl
L-Glutamine 200 mM	PAA
Mowiol	Laboransatz 6 g Glycerin; 2,4 g Polyvinyl-Alkohol 4-88; 6 mL Milli-Q Wasser; 0,2 M Tris (pH 8,5)
Paraformaldehyd (16 %)	Aldrich
PBS x1 - Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	PAA
Penicillin - Streptomycin 100x	PAA
SOC-Medium	Laboransatz 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 2 % (w/v) Trypton; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCL; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glukose
Sybr-Gold	life technologies [™]
TrypLE [™] -Express	PAA
Zellkulturwasser	PAA

Tabelle 13. Die für die Versuche verwendeten Medien, Chemikalien und Lösungen mit ihren Herstellern.

Geräteliste

Name / Bezeichnung	Hersteller
48 Well Mikrotiterplatte	Cellstar
6 Well Mikrotiterplatte	Cellstar
6 Well Suspensions Mikrotiterplatte	Cellstar
96 Well Mikrotiterplatte	Cellstar
Absaugpumpe	Vakuubrand
Beckman Avanti J-52 Ultrazentrifuge	Beckman
Brutschrank	Binder
CASY [®] Röhrchen (CASY [®] Cup)	Innovatis
Casy [®] TT	Schärfe-Systems
Cellstack	Cellstar
Deckgläschen	Roth
Digital Colour camera (Leica DFC 480)	Leica
Falcon-Röhrchen 15 mL/ 50 mL	Roche
Fluoreszenzmikroskop	Leica DM 2000
Gel Dokumentationssystem CN-1000	Peqlab
Gelkammer	Biometra
Inkubator HeraCell	Heraeus
kleiner Heiz-Schüttelblock	Eppendorf
Labor-PC	Acer
Laborwaage BP 3100 P	Sartorius
MaxCyte [®] -STX [™]	MaxCyte [®]
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Multifuge 3SR	Heraeus
Objektträger	Roth#
OC100Küvette	MaxCyte [®]
Photometer BioMate 3	Thermo Fisher
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	MBP
Pipettierhilfe Pipetus	Thermo Scientific
Quarzküvette	Spectrosil
S500 Kulturschale	TPP
Schüttelinkubator	Infors AG
Sicherheitswerkbank Herasafe	Heraeus
Stripetten	Costar
T150 Kulturflasche	TPP
T25 Kulturflasche	TPP
T75 Kulturflasche	TPP
Wasserbad 37 °C	GFL
Zentrifuge Biofuge Primo	Heraeus
Zentrifuge Multifuge 3 L-R	Heraeus
Zentrifugenröhrchen 15 und 50ml	Corning/ Beckman

Tabelle 14. Die für die Versuche verwendeten Geräte und deren Hersteller.

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Darstellung der Zellmembran mit hypothetischen Membranveränderungen	5
Abbildung 2. Bild des verwendeten MaxCyte® STX™-Systems	6
Abbildung 3. Prinzipdarstellung des Strahlengangs eines Fluoreszenzmikroskops	8
Abbildung 4. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines humanen Fibroblasten	9
Abbildung 5. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von DAPI-gefärbten Zellkernen	11
Abbildung 6. Bild eines Casy®-TT Cell Counter & Analyser Systems.	15
Abbildung 7. Grafische Ausgabe einer Zellzählung des Casy®-TT	16
Abbildung 8. Bild der verwendeten OC-100 Küvetten	16
Abbildung 9. Bild des Vektors pEGFP-C1 als zirkuläre Plasmidkarte	28
Abbildung 10. Bild des Vektors pCMV-GFP long als Plasmidkarte	29
Abbildung 11. Bild des 1%igen Agarosegels nach der Auftrennung	30
Abbildung 12. Fluoreszenzmikroskopaufnahmen der stabil-transfizierten Klone	36

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Vom Hersteller ausgegebene Tabelle mit Effizienz der Transfektion	7
Tabelle 2. Die in den Versuchen verwendeten Vektoren.	13
Tabelle 3. Die für die Versuche verwendeten Restriktionsendonukleasen	14
Tabelle 4. Übersicht der Volumen an Lösungen für das Passagieren der Kulturen	21
Tabelle 5. Übersicht über das Volumen an Kulturmedium bei der Aussaat einer Erhaltungskultur	22
Tabelle 6. Angabe der Zellviabilitäten 1 h nach den Elektroporationen	31
Tabelle 7. Darstellung der transienten Transfektionseffizienzen	33
Tabelle 8. Tabelle mit den Anzahlen der Klone, die aus der erfolgreichen stabilen Transfektion hervorgegangen sind	34
Tabelle 9. Anzahl der isolierten Klone der transfizierten Zellen nach 10 Tagen Inkubation	37
Tabelle 10. Angabe der Verteilung von homogenen, inhomogenen und negativen Klone.	37
Tabelle 11. Verhältnisse bei der Bildung von homogenen, inhomogenen und negativen Klonen	39
Tabelle 12. Theoretische Anzahl homogener stabil-transfizierter Klone	44
Tabelle 13. Die für die Versuche verwendeten Medien, Chemikalien und Lösungen	52
Tabelle 14. Die für die Versuche verwendeten Geräte	53
Tabelle 15. Vollständige Tabelle mit den Werten der transienten Transfektion	55
Tabelle 16. Vollständige Tabelle mit den Werten der stabilen Transfektion	56

9.3 Angabe der vollständigen Werte in Tabellen

		24h			48h			72h			96h		
		+	Σ	%	+	Σ	%	+	Σ	%	+	Σ	%
Kontrollgruppe	1, 2, 3	0	> 50	0	> 50	0	> 50	0	> 50	0	> 50	0	> 50
pEGFP-C1 zirkulär	1	89	105	84,8	70	84	83,3	121	142	85,2	149	171	87,1
	2	131	157	83,4	64	76	84,2	118	139	84,9	92	109	84,4
	3	103	123	83,7	66	79	83,5	218	251	86,9	113	130	86,9
	MW	83,9			83,7			85,7			86,2		
	σ	0,7			0,5			1,1			1,5		
pEGFP-C1 linear	1	92	107	85,9	99	114	86,8	96	110	87,3	57	64	89,1
	2	99	115	86,1	78	88	88,6	119	137	86,9	74	83	89,2
	3	87	100	87,0	122	140	87,1	92	103	89,3	82	93	88,2
	MW	86,4			87,5			87,8			88,8		
	σ	0,6			1,0			1,3			0,6		
pCMV- GFPlong zirkulär	1	155	185	83,8	95	112	84,8	74	86	86,1	59	68	86,8
	2	66	81	81,5	168	199	84,4	136	158	86,1	88	103	85,4
	3	96	114	84,2	85	99	85,9	129	150	86,0	81	96	84,4
	MW	83,2			85,0			86,0			85,5		
	σ	1,5			0,8			0,1			1,2		
pCMV- GFPlong linear	1	160	195	82,1	120	144	83,3	188	229	82,1	78	93	83,9
	2	141	168	83,9	57	69	82,6	242	278	87,0	56	66	84,8
	3	102	125	81,6	90	108	83,3	247	284	86,9	66	78	84,6
	MW	82,5			83,1			85,4			84,4		
	σ	1,2			0,4			2,8			0,5		

Tabelle 15. Vollständige Tabelle mit den Werten der transienten Transfektion. Die einzelnen Gruppen mit dem jeweiligen Vektor wurden wie in Kapitel 3.2.2.11 beschrieben, ausgezählt und mit

Formel 1 berechnet. Die erfolgreich transfizierten Zellen C_{positiv} produzierten GFP und wurden positiv gezählt, in dieser Tabelle werden sie als + bezeichnet, die sichtbaren Zellen, die bei der DAPI-Zählung erfasst wurden C_{DAPI} werden hier als Σ aufgeführt, zusätzlich wurde die Standardabweichung angegeben. Die Kontrollgruppe war vollständig negativ, es wurden immer mehr als 50 Zellen gezählt, zur besseren Übersicht wurde eine vereinfachte Angabe gewählt.

	5E03	1E04	5E04
pEGFP-C1 zirkulär	43	64	118*
	40	71	106*
	52	57	128*
pEGFP-C1 linear	64	63	68
	39	61	58
	70	24#	96*
pCMV-GFP long zirkulär	23	10	42
	22	40	30
	21	25	25
pCMV-GFP long linear	16	27	101*
	14	30	64
	15	13	59

Tabelle 16. Vollständige Tabelle mit den Werten der stabilen Transfektion. Die einzelnen Gruppen mit dem jeweiligen Vektor wurden wie in Kapitel 3.2.2.12 beschrieben, ausgesät und wie in Kapitel 3.2.2.13 beschrieben, markiert und gezählt. Es wurden nur isoliert wachsende Kolonien gezählt. Auf einigen Kulturschalen wuchsen die Kolonien zu dicht und konnten nicht isoliert voneinander gezählt werden, deshalb wurden auf diesen Schalen nur die vereinzelt Kolonien gezählt. Zur besseren Unterscheidung wurden diese Zahlen mit einem * gekennzeichnet. Auf diesen Schalen wuchsen viel mehr Kolonien als gezählt werden konnten. Die mit einer # gekennzeichneten Felder wurden für die Berechnung nicht berücksichtigt.

9.4 Formelverzeichnis

Formel 1. Formel zur Berechnung von C_{positiv}	25
--	----

9.5 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
+	positiv
°C	Grad Celsius
µg	mikro Gramm
µL	mikro Liter
bp	Basenpaare
c	Zellen
ca.	circa
CHO	Chinese Hamster Ovary
CL	Evaluationscursor links
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalie Virus Promoter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CR	Evaluationscursor rechts
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetal Calf Serum
G-418	Geneticin
h	Stunde
IF	Immunfluoreszenz
kb	Kilo Basenpaare
kDa	kilo Dalton
L	Liter
LB	Luria Bertani Medium
M	Molar
min	Minuten
mL	Mililiter
mM	Millimolar
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NL	Normalisierungscursor links
nm	Nanometer

nM	Nanomolar
NR	Normalisierungscursor rechts
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
s	Sekunde
SOC	Salz-optimiertes Medium mit Glukose
T	Tasche
TAE	Tris-Acetat-EDTA
u / unit	Einheit der Enzyme 1 u ist die Menge an Enzym die benötigt wird um 1 μ g DNA in 1 h zu verdauen
UV	Ultraviolettstrahlung
z.B.	zum Beispiel
σ	Standardabweichung
Σ	Summe

9.6 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel habe ich nicht benutzt und die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Hamburg, den 05.03.2013

Unterschrift