

Luzia Kilwing, *1994

Schule:
König-Karlmann-Gymnasium,
Altötting

Eingang der Arbeit:
September 2012

Zur Veröffentlichung angenommen:
März 2013

Per Nanotaxi in die Zelle

Gentransport mittels magnetischer Nanopartikel

Die Magnetofektion - ein neuartiges, gentherapeutisches Verfahren, bei dem magnetische Nanopartikel mit Nukleinsäuren assoziiert werden - ermöglicht den steuerbaren Medikamententransport und weist ein hohes Potential zur Lösung heutiger, medizinischer Zentralprobleme auf.

1 Einführung

1.1 Synthesis der Molekularbiologie und Nanotechnologie

Erkenntnisse über den Ursprung und den Aufbau des Lebens zu erlangen, liegt in der Natur des Menschen und gilt als Ansporn für dessen Erforschung. Auch das Phänomen der Vererbung war schon immer Mittelpunkt wissenschaftlicher Interessen. Was verantwortet die Einzigartigkeit und begründet die differente Vielzahl der lebenden Individuen? Die Entdeckung der Gene im Jahr 1869 beantwortete nicht nur Fragen über den detaillierten Aufbau des Menschen, sondern führte auch zu der Erkenntnis, dass viele Krankheiten durch genetische Beeinflussung entstehen und sich auf Veränderungen im Erbgut zurückführen lassen [14].

Mit der Entdeckung von Restriktionsenzymen im Jahr 1970 durch Werner Arber, Daniel Nathans und Hamilton Othanel Smith war der erste Schritt auf dem Weg zu einer neuartigen Wissen-

schaft gegangen [6]. Der Wettlauf um neue Erkenntnisse in der Molekularbiologie hat begonnen. Wissenschaftler der ganzen Welt bemühen sich bis heute um die ständige Verbesserung gentechnischer Vorgänge und Methoden. Aber nicht nur die Molekularbiologie ist auf dem Weg eine Schlüsseltechnologie des 21. Jahrhunderts zu werden. Aus der Sicht vieler Spezialisten wird das als sehr groß einzuschätzende Potenzial der Nanotechnologie Deutschland zu einem weltweiten Schlüsselmarkt machen. Das bereits gewonnene Wissen aus den Bereichen der Molekularbiologie und der Nanowissenschaften zu verbinden, führt zu Antworten auf bis vor kurzem noch unlösbare Problemstellungen. Hierin ist die Chance zu sehen, durch aktive Forschungsarbeit das Problemfeld „Krankheit“ zu lindern und den Lebensstandard des Menschen zu erhöhen. Wie kann das molekularbiologische Wissen auf kleinste Strukturen angewandt für die Onkologie und Therapieforschung von Nutzen sein? Ergibt sich hierbei etwa die Möglichkeit, krebserkrankte Kinder und

Erwachsene in ein normales Leben zurückzuführen? Ermöglicht die Synthesis von Molekularbiologie und Nanotechnologie Unfallgeschädigten, sich wieder zu bewegen oder eine Sepsis schneller und effizienter zu behandeln? Kleine Teilchen mit besonders großer Wirkung, eine Art „Nanotaxi“, das Medikamente gezielt zu erkrankten Zellen oder Organen transportiert, sollen die Lösung dieser Konfliktfelder darstellen. Durch neue nanotechnologische Methoden werden Krankheiten schneller und präziser diagnostiziert und behandelt.

Welche Methoden sich jedoch am besten eignen und wie diese fortwährend optimiert werden können, wird unter Fachleuten fieberhaft diskutiert. Im Zentrum dieser Diskussion steht auch die Gentherapie, ein relativ junges therapeutisches Konzept.

1.2 Viraler und Non-Viraler Gentransfer

Unter Gentherapie versteht man das Einfügen von genetischem Material in

die Körperzellen eines Individuums, um therapeutischen Nutzen für das Individuum zu erzielen. Ursprünglich war dieses Konzept vor allem auf die Behandlung von Erbkrankheiten und Gendefekten ausgerichtet. Mittlerweile sind derartige Nukleinsäuretherapien für eine Vielzahl von Erkrankungen denkbar. Das Einschleusen von Genen wird durch die Verwendung eines Vektors, eines Transportvehikels, ermöglicht. Heutzutage gibt es zwei bekannte Möglichkeiten der Genthherapie bzw. des Gentransfers. Unterschieden wird allgemein zwischen viralem und nichtviralem Gentransfer. Beim nichtviralen Gentransfer nutzt man einerseits synthetische und/oder biologische Substanzen, um Nukleinsäuren zu kompaktieren und um zelluläre Barrieren zu überwinden, andererseits physikalische Methoden. Zu den verwendeten synthetischen Substanzen zählen zum Beispiel kationische Lipide und Polymere. Den Vorgang des Gentransfers nennt man entsprechend Lipofektion bzw. Polyfektion. Eine früh verwendete und einfache chemische Methode ist die Kalziumphosphat-Copräzipitation von DNA. Zwar sind nichtvirale Transportvehikel in Bezug auf Sicherheit besser als virale Transportsysteme, jedoch ist deren Transfektionseffizienz geringer. Zu den physikalischen Methoden zählen die Mikroinjektion, die Elektroporation, die Sonoporation, die Verwendung der Gene Gun und die Magnetofektion. Letztere wird im Rahmen dieses Projektes angewandt, um die Transfektion in ihrer Effizienz zu steigern. Bei der Magnetofektion werden magnetische Nanopartikel, die bezüglich ihrer Größe im Bereich mehrerer Milliardstel Meter liegen, mit Nukleinsäuren assoziiert.

Anschließend soll dieser Komplex gezielt in der Blutbahn eines Organismus gesteuert werden. Die Steuerung erfolgt über den Magnetismus, den die Teilchen aufgrund ihres eisenhaltigen Kerns aufweisen.

1.3 Ziel der Arbeit

Die Arbeit soll zeigen und beweisen, dass der Gentransfer mittels magnetischer Nanopartikel eine wesentlich höhere Transfektionseffizienz aufweist als alternative Formen der chemischen Transfektion, die auf kationischen Lipiden als Transportsysteme basieren.

Um den Funktionsmechanismus der durchgeführten Transfektion zu überprüfen, wurde durch eine vorausgehende Klonierung ein Kontrollplasmid erzeugt.

Durch eine abschließende Dosis-Abhängigkeitsstudie wurde das beste Verhältnis von Nukleinsäuremenge zu magnetischen Nanopartikeln ermittelt. In den Versuchen wurde nicht mit DNA, sondern mit messengerRNA gearbeitet. mRNA stellt gegenüber anderen Nukleinsäuren einen gewissen Vorteil beim molekularbiologischen Arbeiten dar. mRNA wird lediglich transient exprimiert, d. h. es findet nur eine vorübergehende Expression des in der mRNA codierten Proteins statt [10]. Die geringe Lebensdauer der mRNA, die durchaus zum Erschweren des Versuches führt, kann durch chemische Modifikation der mRNA und mit Hilfe stabilisierender Vektoren behoben werden [17], [18]. Resultierend wird die mRNA nicht sofort vom Organismus abgebaut. Ein weiterer Vorteil ist, dass die mRNA nicht in den Zellkern eingeschleust werden muss, um eine Expression der Gene zu erhalten. Außerdem kann mRNA nicht

in das Genom der Zelle integrieren, was einen wesentlichen Sicherheitsvorteil mit sich bringt.

2 Theoretische Grundlagen beim Arbeiten mit magnetischen Nanopartikeln

2.1 Die Transfektion

Als Transfektion wird der Vorgang des Einschleusens von Fremd-DNA in eine eukaryotische Zelle bezeichnet. Trotz der Gemeinsamkeiten mit der bakteriellen Transformation stellt die Transfektion eine wesentlich komplexere Methode der Molekularbiologie dar, da hier die Unterschiede zwischen eukaryotischen und prokaryotischen Zellen berücksichtigt werden. Allgemein wird zwischen der transienten Transfektion und der stabilen Transfektion unterschieden. Bei der transienten Transfektion handelt es sich um eine zeitweilige Einbringung des Plasmids in die Wirtszelle. Im Gegensatz dazu kommt es bei der stabilen Transfektion zum dauerhaften Einbau des Plasmids in das Genom [6].

2.2 Gentransport mittels Magnetofektion

Um die Effizienz und Geschwindigkeit der Transfektion fortschreitend zu erhöhen und zu verbessern, werden verschiedene Methoden angewandt. Zu ihnen zählt das physikalische Verfahren der Magnetofektion (siehe Abb. 1). Die Magnetofektion ermöglicht es, unter Einfluss eines inhomogenen Magnetfeldes Nucleinsäuren, wie DNA, mRNA, PCR Produkte oder auch Antisense-Oligonukleotide [2], gezielt zu der zu therapierenden Zelle zu transportieren. Die wichtigste Voraussetzung für die Entwicklung dieser Methode war die im Jahr 1965 bewiesene Existenz von Ferrofluiden. Dies sind magnetische Flüssigkeiten, die aus speziell beschichteten superparamagnetischen Nanopartikeln bestehen. Der Vorteil an diesen Flüssigkeiten ist, dass sie ohne sich zu verfestigen auf Magnetfelder reagieren können. Selbst bei Einwirkung extrem starker, magnetischer Kräfte aggregieren die Nanopartikel nicht und setzen sich in der Flüssigkeit nicht ab [13]. Demnach bilden Ferrofluide und ihre physikalischen Eigenschaften die Grundlage für eine funktionierende Magnetofektion.

2.3 Magnetische Nanopartikel (MNP) und MNP/DNA-Komplexe

Die physikalischen Eigenschaften der magnetischen Nanopartikel wie die

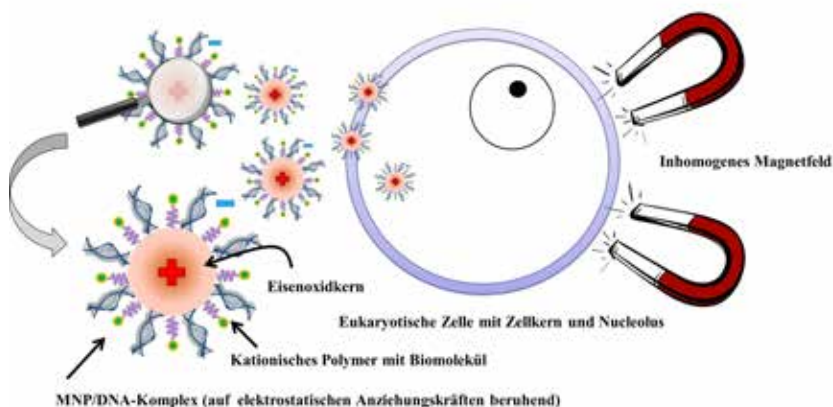


Abb. 1: Mechanismus der Magnetofektion.

Beschaffenheit des Kerns, die Beschichtung, das elektrokinetische Potential in Wasser, aber auch die Struktur und Funktion der Zielzelle sind im Wesentlichen für die Aufnahme der Partikel in die Zelle verantwortlich [1]. Magnetische Nanopartikel können kommerziell erworben oder aber auch im Labor selbst hergestellt werden. Bei der Herstellung der beschichteten Eisenoxidpartikel müssen wichtige Kriterien berücksichtigt werden. Zum einen ist die Biokompatibilität zu beachten. Hierbei wird darauf geachtet, dass die Partikel von lebenden Zellen biologisch abgebaut werden können. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Assoziation der Nukleinsäuren mit den magnetischen Nanopartikeln. Um solch eine Verbindung zu ermöglichen, sind die Eisenoxidpartikel mit Polymeren oder aber auch mit kationischen Lipiden beschichtet, die die Nukleinsäuren binden können. Überdies muss die physikalische und chemische Stabilität der Nanopartikel auch über längere Zeitabschnitte erhalten bleiben. Am gebräuchlichsten sind Nanopartikel, die einen magnetischen Kern aus Eisenoxid besitzen und deren Oberfläche mit einem kationischen Polymer beschichtet ist. Kommt es zu einer Komplexbildung mit Nukleinsäuren, so entstehen durch Selbstassemblierung Partikel, die eine Größe von 10 nm bis 100 nm haben, und die durch Endozytose von der Zielzelle aufgenommen werden. Auf Grund der positiven Ladung, die durch die spezielle Oberflächenbeschichtung entsteht, kann eine negativ geladene Nukleinsäure wie die DNA oder die mRNA an das magnetische Nanopartikel binden. Ein Nanopartikel/DNA-Komplex beruht demnach auf elektrostatischen Anziehungskräften und kann aufgrund seines Magnetismus auf ein Magnetfeld reagieren. Die Funktionsweise der Magnetofektion und der Aufbau der MNPs wird in der Abb. 1 verdeutlicht.

3 Material

3.1 Plasmide

Das aus 6367 Basenpaaren bestehende pEGFPLuc stellt das Ausgangsplasmid, das das sogenannte Insert für die nachfolgenden Versuche beinhaltet, dar. Wesentliche Bestandteile des Plasmides sind die Restriktionsschnittstellen für die Restriktionsenzyme NheI und XbaI, ein hCMV Promotor und der Replikationsursprung

pUC-ori. Es enthält zwei Reportergene (EGFP und Luc), die für die Produktion des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) und des Enzyms Luciferase codieren und das Antibiotika-Resistenzgen KanR, aufgrund dessen das Plasmid in Bakterien eine Resistenz gegen Kanamycin vermittelt.

pVAXA120 stellt im Versuch das sog. Backbone (Grundgerüst) dar, in das die Reportergene des pEGFPLuc eingebaut werden sollen. Es besteht aus 3104 Basenpaaren und besitzt ebenfalls die Restriktionsschnittstelle für NheI und einen Replikationsursprung. Außerdem weist dieses Plasmid ebenfalls das Kanamycin-Resistenzgen auf. pVAXA120 und pEGFPLuc sollen durch eine Klonierung kombiniert und als Kontrollplasmid in der Transfektion weiter verwendet werden.

pVAVA120MetLuc kodiert für Metridia-Luciferase als Reporter. Metridia-Luziferase wird anders als die Glühwürmchen- (Firefly)Luciferase aus eukaryotischen Zellen ausgeschleust, die dieses Protein bilden. Dadurch ist eine einfache Messung der Luziferaseaktivität im Zellkulturüberstand zu mehreren Zeitpunkten möglich. Aus pVAVA120MetLuc wird durch In-Vitro-Transkription mRNA hergestellt, die in den nachfolgenden Transfektionsversuchen zum Einsatz kommt.

3.2 Kationisches Lipid

Die kationische Lipidformulierung SM4-31, freundlicherweise von OZ Biosciences, Marseille, Frankreich, zur Verfügung gestellt, fungiert während der Transfektion als Transfektionsmittel ("enhancer"). Mit dem Einsatz von SM4-31 wird überprüft, ob es die Aufnahme des MNP/mRNA-Komplexes in die eukaryotischen Zelle verstärkt.

3.3 Restriktionsenzyme

Die Restriktionsenzyme XbaI und NheI wurden kommerziell erworben. Sie arbeiten kompaktibel d. h. die Restriktionsenzyme weisen beide 100 % Aktivität unter denselben Pufferbedingungen, die unter Verwendung des TAE-Puffers hergestellt werden, auf. Dies stellt eine große Zeit- und Aufwandsersparnis dar.

3.4 Zellen

Bei dem Zelltyp NIH3T3 handelt es sich um eine murine Fibroblasten-Zelllinie. Diese Zellen sind adhärent und unter-

scheiden sich von Suspensionszellen lediglich darin, dass sie sich nur am Boden des Kulturgefäßes anheften und nicht in einer Lösung frei schwimmend wachsen können. I.d.R. wachsen adhärente Zellen nicht mehr weiter, sobald die gesamte Wachstumsfläche von Zellen bedeckt ist [12]. Diese Zellen wurden im Inkubator (Thermo Scientific) bei 37° C unter 5 % CO₂-Gehalt kultiviert.

3.4 Medien und Lösungen

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) stellt das Nährmittel für die angelegte Zellkultur dar. DMEM ist eine Variante des Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), beinhaltet jedoch mehr Nährmittel. In den Versuchen wird DMEM zum einen ohne jegliche Zusätze verwendet (DMEM o.Z.) zum anderen wird es mit 1 % PrenStrep, ein Gemisch aus 100 units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, und 10 % fötalem Kälberserum (FKS) angereichert.

Um Zellen zu passagieren, wird am häufigsten mit Trypsin-EDTA-Lösung gearbeitet. EDTA wirkt dabei als Ca²⁺-Chelat und löst vor allem die interzellulären Bindungen. Das Trypsin hingegen baut die Zell-Matrix-Verbindung an und sorgt letztendlich für das vollständige Ablösen der Zellen vom Kulturboden [12].

Mit Hilfe der 0,4 % Trypanblaulösung wurde ein Vitalitätstest durchgeführt. Nicht vitale Zellen nahmen den Farbstoff auf Grund ihrer veränderten Membrandurchlässigkeit auf und waren unter dem Mikroskop als blaue Punkte erkennbar [12].

In den Versuchen spielt es eine sehr wichtige Rolle steriles Wasser zu verwenden, das frei von RNA- oder DNA-Spuren ist. Dadurch soll verhindert werden, dass andere Nukleinsäuren den Versuch stören und die Messgenauigkeit beeinträchtigen.

Diese Bezeichnung ddH₂O steht für doppelt-destilliertes Wasser, das durch eine zweifache Destillation gewonnen wird. Bei der Verwendung von ddH₂O ist sichergestellt, dass das Wasser frei von Ionen ist, die während der Versuche stören könnten.

Neb2 wurde käuflich, zusammen mit einem Restriktionskit (Roche) erworben. Bovines Serum Albumin (BSA) ist ein

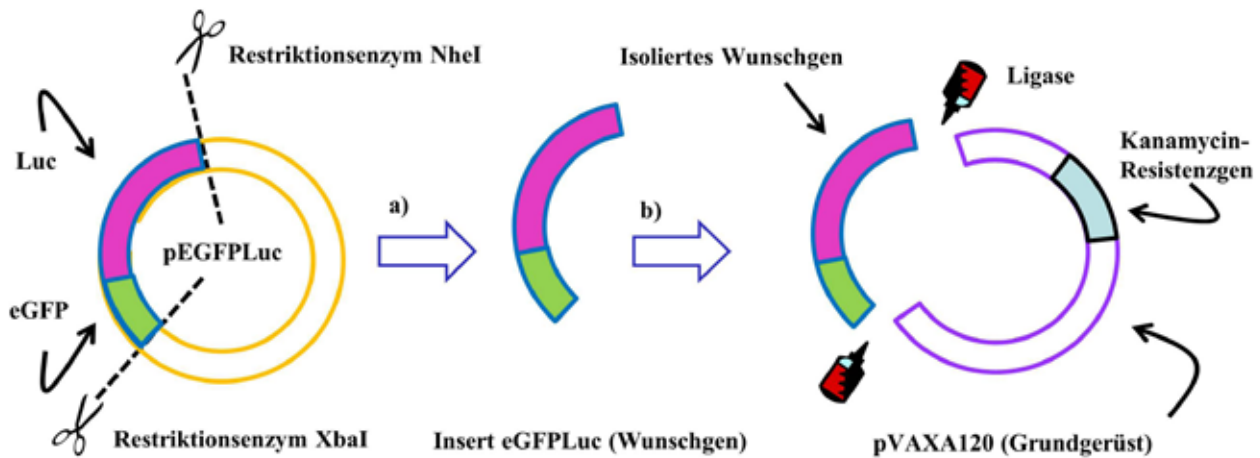


Abb. 2: Funktionsweise der Klonierung.

globuläres Protein, das Restriktionsenzyme während des DNA-Verdau stabilisiert und eine Adhäsion der Enzyme am Reaktionsgefäß verhindert [12].

Bei Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) handelt es sich um ein Puffergemisch, das sehr häufig zur Herstellung des Agarosegels bei der Gelelektrophorese verwendet wird. Das LB-Medium stellt das Nährmedium dar, um die Bakterienkultur zu kultivieren, die für die Amplifikation des rekombinanten Plasmides zuständig war.

Bei Loading-dye-Buffer handelt es sich um einen Ladefarbstoff, der dafür sorgt, dass Nukleinsäuren beim Auftragen in die Taschen eines Agarosegels für die Elektrophorese in den Taschen verbleiben und nicht, bevor die Gelelektrophorese gestartet wird, wegdiffundieren.

DNA-Dilution Buffer/T4 Ligation Buffer/T4 DNA Ligase und die T4 DNA Ligase waren Teil des Ligationskits. (Roche) Phosphate Buffered Saline (PBS) ist eine phosphatgepufferte Salzlösung, die in der Biochemie in vielfältiger Art und Weise verwendet wird. PBS ist nicht schädlich für Zellen und wird im Versuch der vorliegenden Arbeit meist zum Reinigen oder Verdünnen der Zellkultur verwendet.

4 Methodik

4.1 Klonierung - Herstellen des Kontrollplasmides

Die erste Zielsetzung war, das Reportergeninsert aus dem Plasmid pEGFP-Luc zu isolieren und in das Rückgrat des Plasmids pVAXA120 einzubauen. Aus pVAXA120 konnte durch In-Vitro-

Transkription mRNA hergestellt werden. Die Klonierung unterteilt sich in acht Teilschritte. Zu Beginn wurden in einem Restriktionsansatz sowohl das Plasmid pEGFP-Luc als auch das Backbone pVAXA120 mit Restriktionsenzymen geschnitten. Dazu wurden 6,0 µl (2 µg) des Plasmides pEGFP-Luc, das bereits in einem Verhältnis von 1:10 mit Wasser verdünnt wurde, 2,0 µl BSA, 2,0 µl Neb2, jeweils 0,5 µl der Restriktionsenzyme XbaI und NheI und 9,0 µl ddH₂O gemischt. In einem weiteren Eppendorfgefäß wurden 1,2 µl (1 µg) des Plasmides pVAXA120, 2,0 µl BSA, 2,0 Neb2, 0,5 µl des Restriktionsenzym NheI und 14,3 µl ddH₂O in Lösung gebracht. Das Gesamtvolumen betrug in beiden Eppendorfgefäßen 20,0 µl. Während einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden bei 37°C wurden nun zum einen die gewünschten Reportergene aus dem Plasmid pEGFP-Luc herausgeschnitten, zum anderen wurde das Plasmid pVAXA120 auf den Einbau des Genes vorbereitet. Es war ausreichend pVAXA120 nur mit einem Restriktionsenzym zu schneiden, da das ringförmige Plasmid bereits nach einem Schnitt eine lineare Struktur annahm und die gewünschten Gene somit leicht eingebaut werden konnten. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde die Enzymaktivität durch extreme Hitze einwirkung (65°C) deaktiviert. Die Abb. 2 verdeutlicht die grundlegende Idee der Klonierung.

Mit Hilfe einer Gelelektrophorese, dem zweiten Schritt der Klonierung, wurde überprüft, ob die richtigen DNA-Fragmente aus den Plasmiden herausgeschnitten wurden. Dazu wurde als erstes das

Agarose-Gel vorbereitet. Hierbei empfiehlt sich die Dichte des Agarose-Gels an die Menge des Reagenz anzupassen. Für ein 1 % Agarose-Gel wurde 1 g Agarose mit 100 ml 1x TAE Puffer vermischt und in der Mikrowelle erhitzt bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Die Gelelektrophorese-Kammer wurde vorbereitet, während das flüssige Gel leicht abkühlte. Um das Bandenmuster der DNA nach der Gelelektrophorese durch einen fluoreszierenden Effekt sichtbar zu machen, wurden zusätzlich 5 µl Ethidiumbromid zu dem noch flüssigen Gel hinzugefügt. Nachdem das Agarose-Gel in die Kammer gefüllt und fest geworden war, konnte der Kamm, der die Taschen für die Proben formt, entfernt werden und das Gel auf den Verbindungssteg zwischen den zwei Becken der Elektrophorese-Kammer platziert werden. Das Becken und das Gel wurden nun vollständig mit TAE-Puffer bedeckt. Dabei musste es sich um denselben Puffer handeln, mit dem das Gel hergestellt wurde. Zum Auftragen der Proben auf das Gel mussten jeweils 500 ng der Proben mit 2 µl 6x Loading-dye-Buffer, welches zum Beschweren der Proben im Gel beitrug, gemischt und in die Taschen gefüllt werden. Hierbei wurde ein Marker in die Mitte des Gels platziert. Er fungiert als Anhaltspunkt für die Größe der einzelnen DNA-Fragmente. Anschließend wurde die Gelelektrophorese-Kammer für eine Stunde an ein Spannungsgerät unter 100 V angeschlossen. Aufgrund der negativen Ladung der DNA beginnen die Teilchen zum Pluspol der angelegten Spannung zu wandern. Größere Fragmente wandern hierbei langsamer als kleinere DNA-Teile. Daraus ergab

sich ein charakteristisches Bandenmuster, das nun helfen sollte, die einzelnen Fragmente, die aus der Restriktion gewonnen werden konnten, unter einer UV-Imagingstation zu identifizieren [9]. Nachdem das gewünschte Gen, das in das Backbone eingebaut werden sollte, identifiziert wurde, wurde sowohl dieses Gen als auch das Backbone mit Hilfe eines autoklavierten und scharfen Skalpells aus dem Gel herausgeschnitten.

Im dritten Schritt der Klonierung wurden die DNA-Fragmente in einer Gel-Extraktion gereinigt. Auf die Gel-Extraktion folgte als vierter Schritt die Dephosphorylierung. Dabei wurden die restlichen Phosphatgruppen, die an den Restriktionsschnittstellen gebunden waren und bei der Ligation stören, entfernt. Es wurden hierfür 17 µl Backbone, 2 µl Puffer und 1 µl des Enzyms Alkaline Phosphatase in Lösung gebracht. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten bei 37°C. Wie bei der Restriktion, war es hier ebenso wichtig die Enzyme 2 Minuten bei einer Temperatur von 75°C zu inaktivieren, bevor der Versuch mit der Ligation fortgeführt werden konnte. Nach der Gelextraktion lag eine Konzentration von 1 µg Backbone/50 µl Puffer EB vor.

In der Ligation, dem fünften Schritt der Klonierung, sollte sich das Backbone pVAXA120 mit dem gewünschten Gen zu einem rekombinanten Plasmid verbinden. Dazu wurden Backbone und Insert in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Vorgegeben ist, dass bei Klonierungen stets 100 ng des Inserts verwendet werden müssen. Aus eigenen Berechnungen ging hervor, dass sich in 6,5 µl des Reagenz, das die gereinigten DNA-Fragmente beinhaltet, 100 ng des Inserts befanden. Dagegen wurden vom Backbone lediglich 1,4 µl gebraucht. Somit wurde das molare Verhältnis 1:3 beibehalten. Mit Hilfe dieser Angaben konnte nun das Ligation-Reaktionsgemisch angefertigt werden. Dazu wurden 6,5 µl Insert, 1,4 µl Backbone, 2 µl DNA Dilution Buffer (5x) und 0,1 µl ddH₂O gründlich gemischt. Anschließend wurden 10 µl T4 Ligation Buffer (2x) und 1 µl des Enzyms T4 DNA Ligase hinzugegeben. Nach nochmaligem Mischen des Ligationsansatzes, folgte eine Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur. Das Gesamtvolumen des

Ligationsansatzes betrug 21 µl [5]. Bevor das Reaktionsgemisch für die Transformation, den sechsten Schritt des Klonierungsversuches, verwendet werden konnte, mussten die Enzyme wiederum bei 75°C inaktiviert werden. Für die Transformation wird nur 1/10 des Ligationsansatzes gebraucht. Dies entsprach einer Menge von 2,1 µl. Für jede Transformation wurden zusätzlich 100 µl kompetente Bakterien benötigt. Kompetenz ist eine Eigenschaft, die manchen Zellen von Natur aus gegeben ist. Sie ist dafür verantwortlich, dass diese Zellen frei in einem Medium vorhandene DNA-Teilchen aufnehmen können. Kompetenz kann aber auch, besonders bei Bakterien, durch eine Calciumchlorid-Behandlung und einem anschließenden Hitzeschock künstlich erzeugt werden. Dies spielte bei der Transformierbarkeit bestimmter Bakterien wie *Escherichia coli*, eine wichtige Rolle. Kompetente Zellen sind sehr empfindlich, deshalb sollte beim Arbeiten mit solchen Zellen unnötiges Pipettieren unterlassen werden [8]. Zu Beginn der Transformation wurden die *E.coli*-Bakterien auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde vorsichtig die DNA zu den Bakterien hinzugefügt. Darauf folgte eine Inkubationszeit von 15-30 Minuten auf Eis. Im nächsten Schritt wurde durch einen zweiminütigen Hitzeschock bei 42°C die Permeabilität der Bakterienmembran erhöht, was die Aufnahmebereitschaft der Bakterien für DNA nochmals verstärkte. Nachdem 1 ml LB-Medium hinzugegeben wurde, folgte eine zweite Inkubationszeit von 15-30 Minuten auf Eis. Anschließend wurde das Reagenz aus *E.coli* und DNA eine Stunde bei 37°C vom Orbit Shaker (IKA-Schüttler MTS 2) leicht geschüttelt. Im vorletzten Schritt wurden Aliquote von jeweils 300 µl und 30 µl auf Agar-Platten ausplattiert. Die Agar-Platten besaßen einen Nährboden aus Agarose und waren mit 50 µg/µl des Antibiotikums Kanamycine versetzt. Die Bakterienlösung wurde dann mit Hilfe von autoklavierten Glaskugeln auf den Agar-Platten verteilt und mit dem Deckel nach unten bei 37 °C im Bakterien-Inkubator (Thermo Scientific) stehend bis zum nächsten Tag aufbewahrt [3]. Nur auf diese Weise konnten sich Bakterienkolonien bilden. Die wachsenden Bakterienkolonien waren gleichzeitig ein Indikator dafür, dass

hier das Backbone richtig aufgebaut war, da nur Bakterien mit unbeschädigtem Backbone auf einem kanamycinhaltigen Medium wachsen können. Zum Abschluss der Klonierung war es sehr wichtig zu prüfen, ob das Backbone das gewünschte Plasmid besaß und das gewünschte Gen in der richtigen Orientierung eingebaut war. Das Plasmid könnte sich beispielsweise wieder geschlossen haben, bevor es das Gen aufgenommen hat. Folglich würde das Plasmid zwar die Kanamycin-Resistenz besitzen, aber nicht das Reportergen. Eine weitere Möglichkeit wäre gewesen, dass sich das Reportergen falsch herum eingebaut hätte. Überprüft wurde die Orientierung des Gens mittels enzymatischen Verdau des Plasmids, nachdem die Plasmide mit Hilfe von Mini Präparation aus den Bakterien isoliert wurden. Nach der Isolierung wurde durch das Enzym *NcoI*, dessen Erkennungssequenz mit der Basenabfolge des Reportergens übereinstimmt, mitten ins Reportergen geschnitten. Schneidet das Enzym, so war dies ein Beweis dafür, dass das Reportergen vorhanden war und auch richtig eingebaut wurde.

4.2 Transfektion von mRNA in NIH3T3-Zellen mittels SM4-31 und MNP

4.2.1 Aussäen, Passagieren und zählen

Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen, in die das rekombinante Plasmid eingeschleust werden sollte, ausgesät. Es handelte sich hierbei um adhärenente Zellen. Sobald die gesamte Wachstumsfläche mit Zellen bedeckt und somit die Maximaldichte der Zellen erreicht war, mussten diese passagiert werden [12]. Dazu wurden alle benötigten Medien im Wasserbad (Memmer) bei 37°C aufgewärmt. Bevor der Überstand des alten Mediums unter der Sterilbank vorsichtig abgesaugt wurde, wurde die Vitalität der Zellen unter dem Lichtmikroskop (Zeiss) nochmals kontrolliert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe von 10 ml PBS gewaschen. Um die Zellen nun von der T75 Zellkulturflasche abzulösen, wurden 1,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung hinzugegeben. Dies ist eine weit verbreitete Methode, adhärenente Zellen zu subkultivieren. Jedoch muss darauf geachtet werden, dass die Zelllinie nicht zu lange im Kontakt mit der Trypsin-EDTA-Lösung steht, da dadurch die Lebensfähigkeit der Zellen irreversibel geschädigt wird [12]. Empfohlen werden

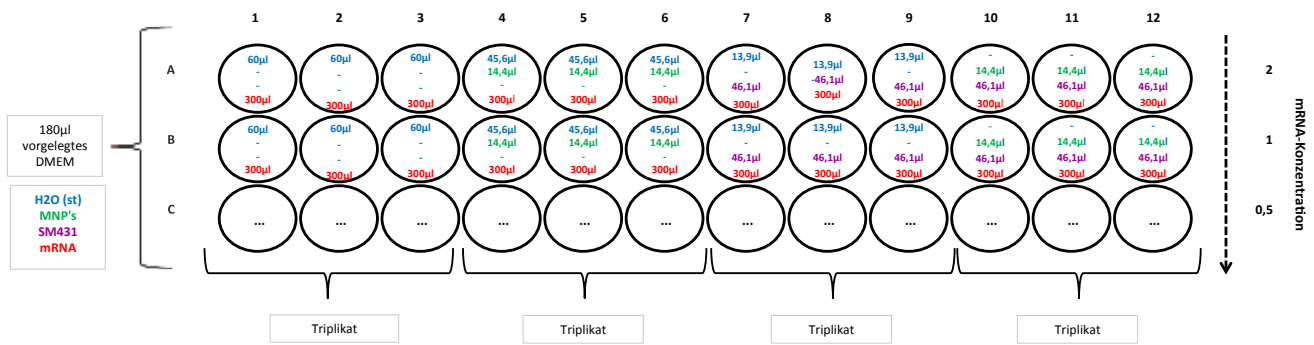


Abb. 3: Graphische Darstellung des Pipettierschemas für die Transfektionsplatte.

5 min Inkubationszeit. Die Kulturflasche wurde kurz geschwenkt, damit die Verteilung der Trypsin-EDTA-Lösung über die gesamte Zellkultur gewährleistet war. Nach Ablösen der Zellen, wurden 8,5 ml frisches Medium mit Serumzusatz hinzugegeben. Die Zellen wurden im Medium aufgenommen und das Trypsin gleichzeitig neutralisiert. Die Suspension wurde nun bei 1000 U/ 3 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Durch das Zentrifugieren setzten sich die Zellen ab und mögliche Substanzen, die bei der Transfektion stören würden, wurden mit dem Medium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen wiederum in 10 ml DMEM aufgenommen und resuspendiert. Hier war es wichtig gut zu mischen, um die Suspension in eine Einzelsuspension zu bringen. Mit 50 µl dieser Zellsuspension wurde nun eine 1:2 Verdünnung angelegt. Das heißt es werden 50 µl Zellsuspension mit 50 µl 0,4 % Trypanblau gemischt. Das Gemisch aus Zellsuspension und Trypanblau wurde in eine Neubauer Zählkammer gegeben. Mit Hilfe der Zählkammer konnte nun die Zellzahl bestimmt werden. Die Zellzahl gab Aufschluss über die Konzentration der Zellen/ml bzw. Zellen/Well. Bei dieser Zählung ergab sich eine Konzentration von 160×10^4 Zellen/ml. Benötigt wurden lediglich 5000 Zellen/Well/150 µl, d. h. für 100 Wells (eine 96 Wellplatte plus Überschuss) 5×10^5 Zellen/100wells/15 ml. Daher mussten 313 µl der Zellsuspension mit 14,7 ml frischem Medium verdünnt werden. Mit Hilfe einer 20-200 µl Transferpipette wurden pro Well 150 µl von der Zellsuspension (5000 Zellen) in eine 96 Wellplatte ausplattiert. Am nächsten Tag der Transfektion wurden die Zellen

unter dem Lichtmikroskop auf ihre Vitalität überprüft.

4.2.2 Anfertigung der Transfektionsplatte

Auf der Transfektionsplatte (96 Well Platte) wurden folgende Komplexe hergestellt. Zum einen wurden Duplexeinheiten, mRNA mit MNP, als auch mRNA mit SM4-31, hergestellt. Diese Komplexe dienten als Vergleich zu dem Triplexkomplex. Als Triplex wurde mRNA mit MNP und SM4-31 kombiniert. Als Kontrolle wurde die mRNA alleine eingesetzt. Pro Komplex wurden Triplikate für die nötige Statistik angefertigt. In allen Komplexen war der Ausgangswert an mRNA Konzentration (2 µg), MNP Menge und Lipid Volumen gleich. In A1, das Well, das der nackten mRNA zur Kontrolle entsprach, wurden 60 µl DNA/RNA-freies Wasser pipettiert. In A4 sollte die Transfektions-effizienz unter Verwendung der MNPs betrachtet werden. Dazu wurde A4 mit 14,4 µl MNPs und 45,6 µl H₂O (st) aufgefüllt. A7 beinhaltete den Duplex mit 46,1 µl SM4-31 und 13,9 µl H₂O (st). Mit Hilfe von A10 sollte das Zusammenwirken der MNPs mit SM4-31 und mRNA geprüft werden. A10 beinhaltete demnach 14,4 µl MNPs und 46,1 µl SM4-31. Nach diesem Pipettierschema wurde nun die 96 Well Platte angelegt. Gemäß der RNA Stock Solution (Master mix) wurden 62,4 µg mRNA in 1,3 ml DMEM für den gesamten Versuch verwendet. In A1, A2, A7 und A10 wurde am Schluss des Pipettieransatzes jeweils 300 µl (14,4 µg/Well) aus der RNA Stock Solution pipettiert. Das Endvolumen eines jeden Wells sollte 360 µl betragen. Wichtig war dabei, dass die Menge an mRNA zu kationischem Lipid

als auch zu MNP ein bestimmtes Verhältnis aufwies. Während sich die Komplexe innerhalb einer 20-minütigen Inkubationszeit ausbilden konnten, wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt.

4.2.3 Die Verdünnungsreihe

Um eine Dosis-Abhängigkeitsstudie aufstellen zu können, musste eine Verdünnungsreihe angefertigt werden. Sie sollte zeigen, ab welcher Konzentration die eingesetzten Materialien toxisch auf die Zellen wirken. Um die Verdünnungsreihe anzulegen, musste die Konzentration der mRNA in 1 µl bekannt sein. Berechnet wurde dies mit Hilfe der RNA Stock Solution. Dazu wird folgende Rechnung aufgestellt:

$$62,4 \mu\text{g (mRNA)} / 1300 \mu\text{l (DMEM)} = 0,048 \mu\text{g (mRNA) in } 1 \mu\text{l (DMEM)}$$

Jedes Well A1, A4, A7 und A10 beinhaltete 360 µl, das entspricht einer mRNA-Menge 14,4 µg. Anschließend wurden in den darunterliegenden Wells von A1, A4, A7 und A10 180 µl Medium ohne FKS (ohne Penstrep) vorgelegt (7 Wells). Danach wurden 180 µl Komplexmischung aus A1, A4, A7 und A10 jeweils entnommen und mit Hilfe einer Mehrkanalpipette ins nächste jeweilige Well mit dem vorgelegtem Medium gemischt. Die Konzentration der mRNA sank somit auf 7,2 µg mRNA in 360 µl Reagenz. Im nächsten Schritt wurden wiederum 180 µl nun aber aus B1, B4, B7 und B10 entnommen und mit der nächsten Reihe vermischt. Dieser Vorgang wurde für die gesamte Wellplatte vorgenommen, wobei sich die Konzentration der mRNA stetig um die Hälfte verringerte. Die Rechnungen, die zur

Verdünnungsreihe aufgestellt werden mussten, geben ebenfalls Aufschluss für das bereits erklärte Pipettierschema. Anhand der Ergebnisse der Berechnungen konnte festgestellt werden, wie viel MNPs oder SM4-31 eingesetzt werden muss. Studien ergaben bereits, dass die Transfektionseffizienz beim Einsatz von MNPs und mRNA im gleichen Verhältnis am höchsten ist. Demzufolge müssen ebenfalls 14,4 µg MNPs eingesetzt werden, um das Verhältnis 1:1 aufrecht zu erhalten. Beim eingesetzten Transfektionsmittel, hier SM4-31, greift das sog. W/V-Verhältnis, wobei W das Gewicht der Nukleinsäure und V die µl des Transfektionsmittel bezeichnen. Es soll dabei immer auf ein Verhältnis von 1:4 geachtet werden. Speziell in diesem Versuch wurden 3,2 µl Lipid zu 1 µg mRNA eingesetzt. Nach Abschluss der Berechnungen und Durchführung der Verdünnungsreihe war die Transfektionsplatte, die nochmals in Abb. 3 veranschaulicht wird, fertiggestellt. Jedes Well beinhaltet nun 180 µl Reagenz. Das endgültige Transfektionsvolumen für die Zellkultur betrug jedoch 50 µl/Well. Diese 50 µl wurden der Transfektionsplatte nun mit einer Mehrkanalpipette entnommen und in Triplikaten zur Zellkultur hinzugegeben. Die Konzentration der mRNA in der Zellkulturplatte in Reihe A betrug 2 µg in 50 µl. Die Zellkultur mit den unterschiedlichen Parametern wurde nun auf eine für eine 96 Wellplatte vorgefertigte Magnetplatte (OZ Biosciences) gesetzt. Die anschließende Inkubationszeit betrug 30 Minuten im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂-Zufuhr.

4.2.4 Luciferase-Messung

Wie bereits erwähnt, trug das Plasmid pVAXA120MetLuc das Reportergen, das für die Produktion des Enzyms Renilla Luciferase codiert. Vorteil dieser Messung ist, dass die Enzymaktivität im Labor leicht und schnell nachgewiesen werden kann. Durch die Zugabe des Substrats, Coelenterazin, kommt es zur Umwandlung in Produkt und Nebenprodukte. In diesem Fall ist Licht ein Nebenprodukt der Zersetzung des Substrates. Dieses Licht kann gemessen werden und verhält sich direkt proportional zur Genexpression. Um zusätzliche Informationen über die Expressionskinetik zu erlangen, welche Komplexe besser für die Einschleusung der mRNA in die

Zielzelle über einen längeren Zeitraum sind, wurden Messungen jeweils nach 6h, nach 24h, nach 48h und nach 72h durchgeführt.

5 Resultate und Diskussion

5.1 Gelelektrophorese-Banden des pVAXA120 und pEGFPuc

Um das Insert (EGFPuc) aus dem Plasmid pEGFPuc auszuschneiden und ins Backbone pVAXA120 einzufügen, wurde pEGFPuc zuerst mit XbaI und NheI geschnitten und pVAXA120 mit NheI. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 h bei 37°C wurden die Banden auf einem 1 % Agarosegel verifiziert.

Abb. 4 zeigt die Ergebnisse der Gelelektrophorese. Zur Kennzeichnung der Fragmentgröße wurde in die Mitte des Gels ein Marker gesetzt. Links des Markers sind die Banden des Plasmides pVAXA120 klar erkenntlich. pVAXA120 wurde mit dem Restriktionsenzym NheI geschnitten. Ziel war es, ein DNA-Fragment aus 3000 bp zu erhalten. Wie auf der Abb. 4 zu erkennen ist, liegt die Bande des Plasmides pVAXA120 knapp unter der neunten Bande des Markers d. h. knapp unter 3054 bp. Demnach wurde pVAXA120 linearisiert, was Voraussetzung für den Einbau des Inserts EGFPuc war. Die Banden des Plasmids pEGFPuc liegen auf der rechten Seite des Markers. Das Plasmid pEGFPuc trägt das Insert und wurde sowohl mit dem Restriktionsenzym XbaI als auch mit NheI geschnitten. Die gewünschten Fragmente aus 3920 bp und 2447 bp stellen das Insert dar und wurden zur weiteren Verwendung aus dem Gel herausgeschnitten. Das Kontrollgel zeigt für das Plasmid pEGFPuc drei Banden. Die obere befindet sich bereits bei Beginn des Markers und lässt deshalb davon ausgehen, dass diese Fragmente eine Größe von etwa 6000 bp haben. Die zweite Bande befindet sich im Bereich von 4000 bp. Die dritte Bande hingegen bei ca. 2500 bp. Die Tatsache, dass trotz enzymatischen Verdau, noch eine Bande bei 6000 bp zu sehen ist, lässt auf einen unvollständigen Verdau schließen. Insgesamt sind die Banden relativ unscharf zu erkennen, was jedoch für den weiteren Verlauf des Versuches nicht ausschlaggebend war. Anhand des Kontrollgels konnte gesagt werden, dass genügend gewünschte DNA-Fragmente zur Verfügung standen, um die fort-

führende Ligation durchzuführen.

5.2 Minipräparation-Kontrollverdau der Klone

Wie bereits im Klonierungsversuch geschildert, wird das Verfahren der Minipräparation dazu verwendet, um das Plasmid aus den Bakterienzellen zu isolieren. In diesem Verfahren werden die Bakterienzellen abzentrifugiert. Anschließend wird mit verschiedenen Pufferlösungen gearbeitet. Puffer P1 wird zur Resuspendierung der Bakterienpellets verwendet. Puffer P2 bricht die Bakterienzellen durch die Natronlauge, die der Puffer beinhaltet, auf. Puffer P3 neutralisiert Puffer P2. Danach wird zentrifugiert und im Überstand ist das Plasmid enthalten. Durch Zugabe von Isopropanol wird das Plasmid gefällt. Später wird das Plasmidpellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Zum Schluss wird das DNA-Pellet luftgetrocknet und in ddH₂O aufgenommen [4]. Ein Aliquot aus dieser Lösung wurde mit einem Enzym geschnitten. Mit diesem Kontrollverdau wurde überprüft, ob das Plasmid, das die Bakterien in den wachsenden Bakterienkolonien tragen, ein richtig eingebautes Reportergen besitzt.

Die gewünschten Fragmente waren hierbei DNA-Abschnitte der Größe von 3421bp, 1624bp und 305bp. Die Größe der Plasmide wurde mit Hilfe einer weiteren Gelelektrophorese ermittelt, die in der UV-Lichtbox das Bandenmuster aus Abb. 5 ergab.

Wie das Bandenmuster zeigt, ergab das Ergebnis des Kontrollverdaus jedoch lediglich Plasmide der Größe 2712bp, 1624bp und 1014bp. Die hohe Anzahl von Basenpaaren, die die isolierten und rückverdauten DNA-Fragmente aufweisen, bedeutet, dass die Plasmide zwar das Reportergen besitzen, dieses jedoch falschherum eingebaut wurde. Die Plasmide konnten daher nicht für die Transfektion verwendet werden. Aus diesem Grund wurde für den weiteren Verlauf des Versuches die aus dem Plasmid pVAXA120MetLuc transkribierte mRNA verwendet.

5.3 Luciferase-Werte und deren Standardabweichung

Die Ausgangskonzentration der mRNA in den Wells A1, A4, A7 und A10 be-

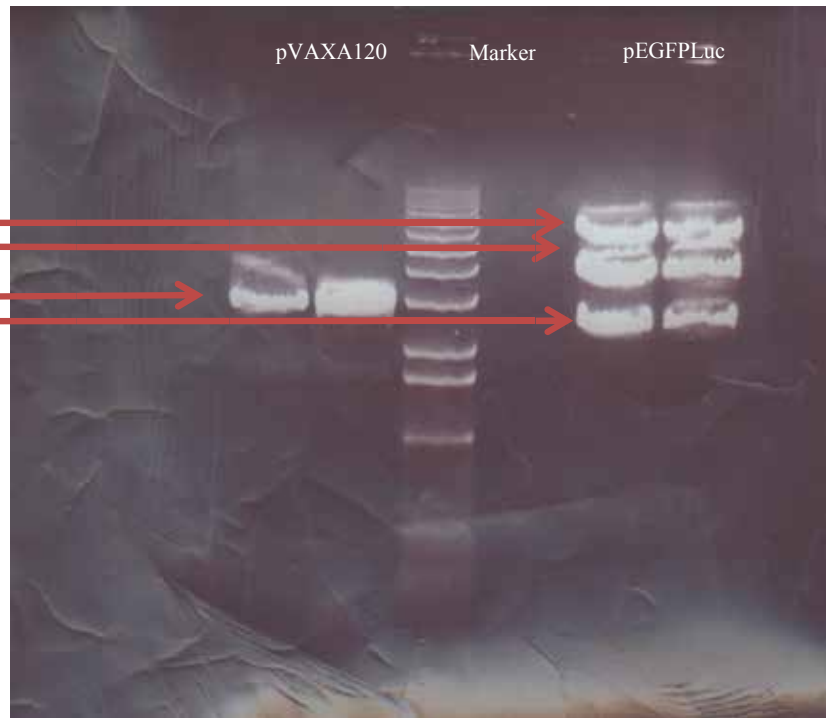
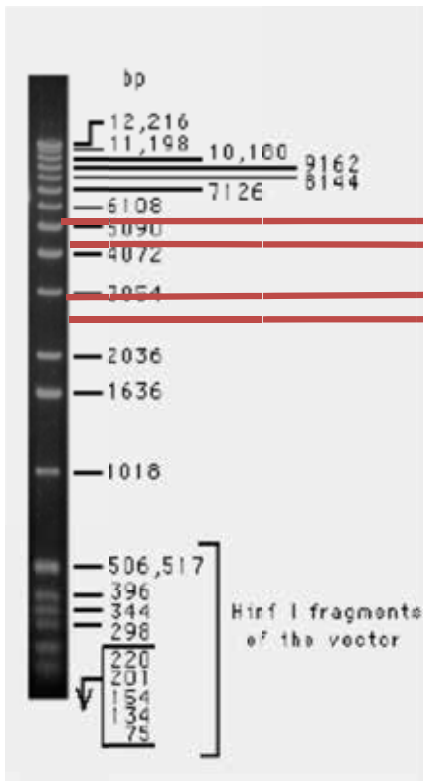


Abb. 4: Marker als Referenz zur Größenbestimmung der Gelelektrophoresebanden (links), Kontrollgel - Gelelektrophorese-Banden nach der Restriktion (rechts).

trug $2\mu\text{g}/3,2\mu\text{l}$. Diese Konzentration c. $[\mu\text{g}/\mu\text{l}]$ nahm jedoch auf Grund der Verdünnungsreihe, die bereits vor den Messungen angelegt wurde, stetig um den Faktor 0,5 ab. In den Tabellen 1,2,3 und 4 (S. 43) wurden die Messdaten festgehalten. Sie geben Auskunft über die Konzentration der mRNA, die Anzahl an ausgesandten Lichtquanten, die proportional zur Anzahl an produzierten Enzymmolekülen ist und letztendlich die Standardabweichung (S) der angegebenen Messdaten. Die Standardabweichung ist der Mittelwert, der sich aus den Messschwankungen, die in den jeweiligen Triplikaten auftreten, berechnen lässt, d. h. bei Abweichungen in der Lichtquantenzahl, die die einzelnen Triplikate aussenden, gibt die Standardabweichung Auskunft über die Stärke der Schwankung. Die Standardabweichung sollte hierbei nicht größer als 10 % zum erhaltenen Messergebnis sein. Sehr hohe Standardabweichungen lassen sich auf unvermeidliche Pipettierungenauigkeiten zurückführen.

Ziel der Messungen war es festzustellen, unter welchen Bedingungen die Transfektionseffizienz am höchsten ist. Außerdem konnte im Rahmen einer Dosis-Abhängigkeitsstudie überprüft werden, welche mRNA-Konzentration der Transfektionseffizienz zu Gute kommt. Zu Beginn



Abb. 5: Gelelektrophorese-Banden nach der Minipräparation.

wurde nur mRNA ohne jegliche Hilfsmittel mit den Zellen in Kontakt gebracht. Dies ist lediglich eine Kontrolle, um zu zeigen, dass ohne Transfektionsmittel kein oder nur wenig genetisches Material von den Zellen aufgenommen wird. Im Well A4 kamen nun die magnetischen Nanopartikel zum Einsatz. Besonders diese Ergebnisse spielten eine bedeutsame Rolle, um die These, die zu Beginn der Arbeit aufgestellt wurde, zu beweisen. Zusätzlich wurde im Well A7 die Transfektionseffizienz unter Verwendung eines mRNA/SM4-31-Komplexes überprüft. Diese Messdaten, die die letzten drei Wells lie-

feren, sollten zeigen wie sich die Transfektionseffizienz beim Zusammenspiel aller Parameter verhält. Hier wurde die mRNA mittels Magnetpartikel und dem Lipid SM4-31 transportiert.

Die Anzahl ausgesandter Lichtquanten als Maß für die transferierte mRNA und des deshalb gebildeten Reporterproteins belaufen sich nach einer sechsständigen Inkubationszeit auf eine Menge von 898 bis 958 (siehe Tab. 1). Die Standardabweichungen liegen zwischen 4 und 6 %. Die maximale Anzahl an Lichtquanten, die unter diesen Bedingungen erzielt

werden kann, ist 958+62. Das Minimum liegt bei 898-34. Die höchste Transfektionseffizienz unter der Verwendung nackter mRNA ohne Transfektionshilfen wird demnach bei einer mRNA-Konzentration von 0,02 µg/3,2 µl erzielt.

Die Verwendung magnetischer Nanopartikel (MNP) ergibt eine Menge von 848 bis 930 Lichtquanten, wobei die Standardabweichung zwischen 1 und 8 % liegt (siehe Tab. 1). Das Maximum der Messwerte liegt demnach bei 961. Erforderlich dafür ist jedoch eine mRNA-Konzentration von 2 µg/3,2 µl. Bei einer mRNA-Konzentration von 0,5 µg/3,2 µl liegt ein Minimum von 821 vor.

Nach Erhalt dieser Messwerte kann bereits ein Vergleich der beiden Versuche und deren Bedingungen sehr nützlich und aufschlussreich sein. Die Messdaten zeigen, dass bei einer mRNA-Konzentration von 2 µg/3,2 µl die höchste Transfektionseffizienz beim Einsatz von MNPs gegeben ist. Der Gentransfer ohne Hilfsmittel, wie es z. B. die Magnetpartikel sind, erzielt bei solch einer hohen Konzentration von 2 µg/3,2 µl immer noch einen größeren Erfolg, als es der Versuch mit den Magnetpartikeln zeigt. Bezüglich dessen wäre ein Gentransfer mittels magnetischen Nanopartikeln alles andere als rentabel. Die nächsten Versuche beweisen jedoch das Gegenteil.

Lediglich das Verwenden des Transfektionsmittel SM4-31 zeigt einen größeren Erfolg beim mRNA-Transport. Die Werte liegen zwischen 1042 und 3847 ausgesandten Lichtquanten (siehe Tab. 1). Aufgrund von Pipettierungenauigkeiten beläuft sich die hohe Standardabweichung von 14 % auf ein Maximum von 4387 und eine Abweichung von 2 % auf ein Minimum von 1025. Hier liegt die höchste Transfektionseffizienz ebenfalls bei einer mRNA-Konzentration von 2 µg/3,2 µl.

Wird der Gentransfer nun von MNPs und dem kationischen Lipid SM4-31 unterstützt, was im nächsten Versuch untersucht wurde, wird eine Anzahl von 2606 bis 10156 erhalten (siehe Tab. 1). Die Standardabweichung von 1% führt zu einem Maximum von 10293, aufgrund einer achtprozentigen Schwankung zu einem Minimum von 2406. Bei einer mRNA-Konzentration von 1 µg/3,2 µl werden am meisten Lichtquanten ausgesendet.

Dies ist ein Beweis dafür, dass nur im Zusammenspiel von MNPs und SM4-31, die höchsten Erfolge beim Gentransfer erzielt werden können.

Nach 24 Stunden wurden ebenfalls Messergebnisse erfasst, die in der Tabelle 2 auf gezeigt werden.

Auch diese Werte zeigen eine klare Steigerung der Transfektionseffizienz beim Einsatz des Lipides SM4-31 und MNPs in Kombination. Die Konzentrationsbereiche, die ein Maximum von produzierten Enzymen aufzeigen, sind im Vergleich zu den 6 Stunden-Werten nicht mehr im oberen Bereich, wie 2µg/3,2µl, sondern haben sich eher nach unten verlagert. Das Maximum der Enzymproduktion liegt bei den 24-Stunden-Werten im Bereich 0,25-0,02µg/3,2µl. Eine mRNA-Konzentration von 1µg/3,2µl erzielt hingegen eine wesentlich schlechtere Transfektionseffizienz. Mit einer Standardabweichung von 3% ist der Wert 105925 des Kombinationsversuches mit MNPs und SM4-31, der höchste, der sich aus der gesamten 24-Stunden Messung ergeben hat. Der Vergleich zur 6-Stunden Messung, deren höchster Wert ebenfalls aus dem Kombinationsversuch resultierend bei 10156 liegt, zeigt, dass die Aktivität der Expression nach 24-Stunden nicht abgenommen hat, sondern zunimmt.

Nach zwei Tagen (siehe Tab. 3) kann immer noch eine Aktivität der Expression festgestellt werden. Der höchste Wert der 48 Stunden-Messung ist nun jedoch nicht mehr Ergebnis des Kombinationsversuches, sondern wurde vom Gentransfer mittels SM4-31 erzielt. Dies kann als Zeichen dafür gesehen werden, dass sich die Expressionsaktivität im Kombinationsversuch mit SM4-31 und MNPs langsam auf ein Niveau einpendelt hat, wie aus der 48 Stunden-Messung entnommen werden kann, bei etwa 168262, oder langsam zum Erliegen kommt. Eine mRNA-Konzentration von 0,5µg/3,2ml scheint daher nach zwei Tagen die beste Bedingung sowohl für den Gentransfer mit SM4-31 als auch für den Kombinationsversuch zu sein.

Die Messungen nach drei Tagen (siehe Tab. 4) zeigen ein ähnliches Ergebnis, wie gerade aufgeführt. Die höchste Expressionsrate liegt im Versuch mit SM4-31 bei 353656 mit der Standardabweichung von 25 %. Im Kombina-

tionsversuch liegt das Maximum mit einer Standardabweichung von 21 % und einer mRNA-Konzentration von 1 µg/3,2 µl bei 191074. Dieser Wert unterscheidet sich nicht wesentlich zum höchsten Wert nach zwei Tagen und belegt die vorher aufgestellte Hypothese, dass sich die Expressionsrate unter der kombinierten Verwendung von SM4-31 und MNPs nach etwa 72 Stunden auf einem konstanten Niveau einpendelt. Die optimale mRNA-Konzentration für eine möglichst hohe Expressionsrate liegt hier zwischen 0,13-1 µg/3,2 µl. Was aus den Tabellen nicht ersichtlich wird, jedoch durch eine abschließende mikroskopische Observation bewiesen werden konnte, ist, dass bei einer mRNA-Konzentration von 2 µg/3,2 µl tote Zellen vorhanden sind. Demnach resultiert eine mRNA-Konzentration von 2 µg/3,2 µl in einem toxischen Effekt für die Zelle. Dies ist eine wichtige Erkenntnis für die zukünftige, therapeutische Anwendung des Verfahrens.

In den Abb. 6 und 7 werden die erhaltenen Messergebnisse graphisch nochmals dargestellt. Die Steigerung und Verbesserung der Transfektionseffizienz ist an den Spitzen erkenntlich, die im Versuch mit SM4-31 und MNPs in Kombination einen eindeutig höheren Ausschlag aufweisen als die Versuche mit den einzelnen Komponenten.

6 Fazit

Das Ergebnis des Versuches mittels mRNA in Kombination mit einem „enhancer“ die Effizienz des Gentransfers zu erhöhen, hat eindeutige Erfolge gezeigt. Die Hypothese, die einleitend aufgestellt wurde, ist somit bewiesen. Durch das experimentelle Arbeiten konnten zusätzliche Erkenntnisse gewonnen werden. Der alleinige Gebrauch von magnetischen Nanopartikeln, um mRNA in eine eukaryotische Zelle einzuschleusen, zeigt überraschend wenig Erfolg. In Verbindung mit einem Transfektionsmittel, wie es in diesem Fall mit dem kationischen Lipid SM4-31 überprüft wurde, steigern magnetische Nanopartikel jedoch enorm die frühe Transfektionsleistung. Um diesen Unterschied der variierenden Transfektionseffizienz zu erörtern, müssen weitere Charakterisierungsstudien in Bezug auf Komplexgröße und -ladung durchgeführt werden. Eine höchst detaillierte und breitgefächerte Forschung am Versuchsoptimum ist daher sehr wichtig. Nicht nur die mRNA-Konzentration, wie sie in

c [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	mRNA	S	mit MNP	S	SM4-31	S	Lipid/MNP	S
2	946	25	930	31	3847	540	9635	103
1	929	31	900	68	3029	79	10156	137
0,5	899	14	848	27	3030	99	8362	182
0,25	912	10	873	11	2455	164	6805	315
0,13	914	10	898	22	2006	75	7364	508
0,06	898	34	873	26	1437	54	5502	468
0,03	933	21	903	36	1163	56	4377	111
0,02	958	62	926	18	1042	17	2606	200

Tab. 1: 6-Stunden-Messung bei einer Anfangskonzentration von $2\mu\text{g}/3,2\mu\text{l}$ [16], aufgetragen ist jeweils die Anzahl der empfangenden Lichtquanten von mRNA, MNP, SM4-31 und dem Komplex SM4-31/MNP. c: Konzentration in [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$], S: Standardabweichung.

c [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	mRNA	S	mit MNP	S	SM4-31	S	Lipid/MNP	S
2	727	117	855	53	38248	4133	63508	2094
1	689	26	801	20	42129	2670	78966	6686
0,5	734	46	831	61	56586	4073	82861	745
0,25	788	29	848	37	70659	1849	92866	11437
0,13	767	49	842	66	64863	3009	105925	9791
0,06	765	23	837	80	41473	2381	82219	12365
0,03	794	38	859	72	22200	1277	67755	4112
0,02	1124	64	1279	123	11370	868	47128	1835

Tab. 2: 24-Stunden-Messung bei einer Anfangskonzentration von $2\mu\text{g}/3,2\mu\text{l}$ [16], aufgetragen ist jeweils die Anzahl der empfangenden Lichtquanten von mRNA, MNP, SM4-31 und dem Komplex SM4-31/MNP.

c [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	mRNA	S	mit MNP	S	SM4-31	S	Lipid/MNP	S
2	859	9	991	151	140244	11593	102212	12321
1	916	56	1201	407	158458	17879	122466	21628
0,5	835	29	1121	310	205112	7444	168262	3242
0,25	851	36	1033	328	135233	13132	142329	10633
0,13	829	28	999	145	94848	2841	110546	3746
0,06	824	30	996	239	64144	1797	83375	9829
0,03	879	17	1040	207	31472	1932	56332	8515
0,02	1996	131	2001	77	13849	2527	41497	2279

Tab. 3: 48-Stunden-Messung bei einer Anfangskonzentration von $2\mu\text{g}/3,2\mu\text{l}$ [16], aufgetragen ist jeweils die Anzahl der empfangenden Lichtquanten von mRNA, MNP, SM4-31 und dem Komplex SM4-31/MNP.

c [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	mRNA	S	mit MNP	S	SM4-31	S	Lipid/MNP	S
2	797	20	1120	506	353656	83217	183367	1705
1	782	27	1646	1367	301483	75219	191074	40669
0,5	780	8	1368	916	205567	60470	174141	23596
0,25	788	3	1324	893	155843	48945	183780	5381
0,13	787	23	1019	348	102063	23342	126213	2681
0,06	831	21	1127	460	74421	17092	74014	7150
0,03	863	24	1206	523	32254	2841	49649	8438
0,02	2051	181	2529	188	14258	7802	48935	924

Tab. 4: 72-Stunden-Messung bei einer Anfangskonzentration von $2\mu\text{g}/3,2\mu\text{l}$ [16], aufgetragen ist jeweils die Anzahl der empfangenden Lichtquanten von mRNA, MNP, SM4-31 und dem Komplex SM4-31/MNP.

dieser Arbeit durch die Dosis-Abhängigkeitsstudie erforscht wurde, spielt eine entscheidende Rolle, sondern auch Faktoren wie die Stärke des Magnetfeldes, die eine Steuerung der MNPs ermöglichen, die Zusammensetzung des Kerns des Magnetpartikels oder dessen Beschichtung. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen nicht nur, dass und wie die Transfektionseffizienz der Magnetofektion gesteigert werden kann, sondern auch, dass sich der Einsatz von mRNA, welcher in der aktuellen Wissenschaft noch nicht etabliert ist, durchaus bewährt. Die Ergebnisse dieses Projektes stellen somit eine Bereicherung des aktuellen Forschungsstandes dar.

7 Ausblick

Die Magnetofektion ist ein vielversprechendes Verfahren für die Gentherapie. Es erschließen sich neue Perspektiven für die Bekämpfung einiger zentral medizinischer Problemstellungen. Nach einer US-Studie sterben am Tag weltweit 20.000 Menschen an Krebs. Angesichts dessen wird ein Verfahren wie die Magnetofektion, die solch großes Potenzial zur Krebsheilung vorweist, unbedingt notwendig. Beachtliche therapeutische Erfolge konnten bereits mit einem anderen Verfahren erzielt werden, in dem magnetische Nanopartikel zum Einsatz kommen: Magnetische Nanopartikel werden direkt in Tumore injiziert. Der Tumor wird dann selektiv durch Einstrahlung eines alternierenden Magnetfeldes erhitzt, wodurch die Tumorzellen absterben. 66 Tumorpatienten befanden sich an der Berliner Charité bereits in Behandlung. Dabei wurde die Nano-Therapie gleichzeitig zu anderen Therapien eingesetzt, wodurch sich die Lebensdauer der Patienten auf durchschnittlich eineinhalb Jahre verdoppelte [15]. Hier wurden die magnetischen Eigenschaften der Partikel genutzt, ohne dass eine Gentherapie zum Einsatz kam. Genau eine solche Kombination ist jedoch denkbar und sogar in Erforschung. Das Einsatzgebiet der Magnetofektion ist demnach

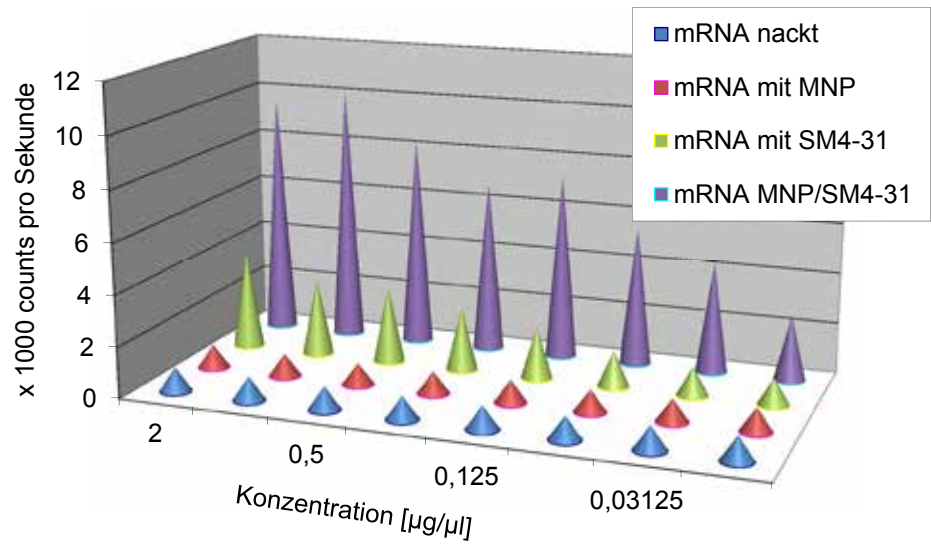


Abb. 6: Anzahl empfangener Lichtquanten nach 6h in Abhängigkeit der Konzentration. Mit steigender Konzentration nimmt die Transfektion zu.

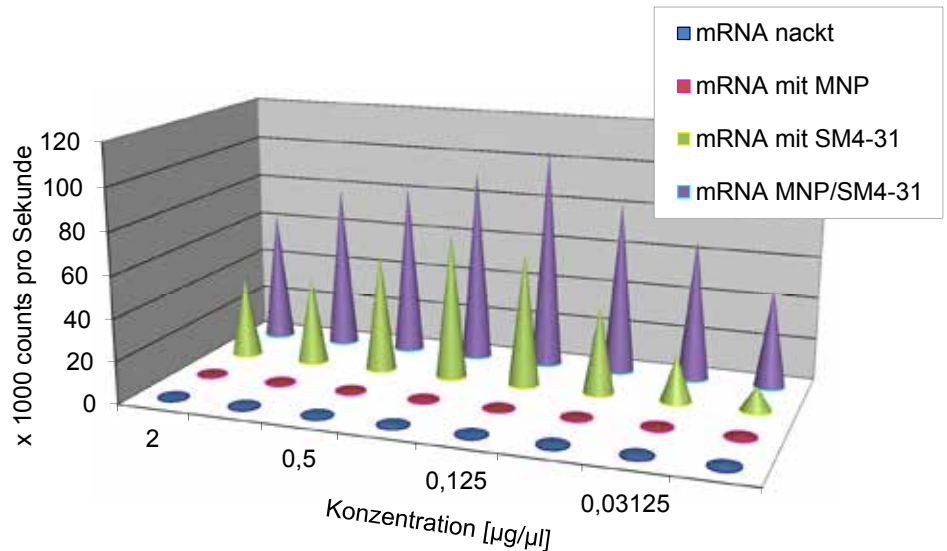


Abb. 7: Anzahl empfangener Lichtquanten nach 24h in Abhängigkeit der Konzentration. Der MNP Komplex ist über den großen Zeitraum im Vergleich zu anderen Transfektionsmethoden besonders stabil.

breit gefächert. Auch im Bereich der Gerontologie werden der Magnetofektion große Chancen angerechnet. Dennoch ist das Potenzial des Verfahrens noch nicht vollends ausgeschöpft. Vor allem Deutschland stellt bezüglich rechtlicher und finanziell unterstützender Basis ein schwieriges Terrain dar, um die Funktionsweise gänzlich zu erforschen. Viele Risiken der Nano-Medizin sind noch ungeklärt. Dosis-Abhängigkeits-Studien, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, helfen festzustellen, ab wann nanotechnologische Strukturen für den Körper schädlich wirken. Ohne therapeutische Zielsetzung als Begründung für das gentechnische Manipulieren von Organismen, sind gentechnische Ver-

fahren aus ethischen Gesichtspunkten immer noch stark kritisiert. Trotzdem ist die Magnetofektion sowohl aufgrund der Heilungsprozesse, die durch diese Art von Gentherapie erheblich verbessert werden konnten [15], als auch aufgrund der wirtschaftlichen Chancen nach einer sorgfältigen Abwägung der Chancen und Risiken unbedingt zu unterstützen, um sie zu einem ethisch vertretbaren Standard entwickeln zu können.

Danksagung

Ich bedanke mich bei Professor Dr. Christian Plank für die Möglichkeit der Durchführung meines Praktikums am Klinikum rechts der Isar im Institut für Experimentelle Onkologie und Thera-

pieforschung der TU München, und die Möglichkeit, in seinem Labor diese Arbeit durchzuführen.

Weiterhin gebührt mein Dank Doktorandin Dipl.-Biotechnologin Mehrije Ferizi für die Anleitung des Praktikums, die Einführung in das wissenschaftliche

Arbeiten und für die ausgezeichnete Betreuung. Dadurch wurden mir entscheidende Einblicke in wissenschaftliche Arbeitsweisen gewährt.

Bei der Arbeitsgruppe Plank bedanke ich mich für ihre Diskussionsbereitschaft und die wertvollen Anregungen.

Quellenverzeichnis

- [1] Mykhaylyk, Olga; Steingötter, Andreas; Perea, Hector; Aigner, Joachim; Botnar, René; Plank, Christian: Nucleic Acid Delivery to Magnetically –Labeled Cells. In: Journal of Biomedical Nanotechnology 2009 Vol. No. 5, S. 693
- [2] Mykhaylyk, Olga; Zelphati, Olivier; Rosenecker, Joseph; Plank, Christian: siRNA delivery by magnetofection. In: Current Opinion in Molecular Therapeutics 2008 Vol. 10 No. 5, S. 2
- [3] Anton, Martina: Transformation Protokoll, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München-Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
- [4] Anton, Martina: Plasmid DNA Mini Preparation (quick and dirty), Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München-Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
- [5] Roche Diagnostics GmbH-Roche Applied Science: Rapid DNA Dephos & Ligation Kit, Mannheim, Dezember 2006
- [6] Cornel, Mülhardt: Der Experimentator, Molekularbiologie/ Genomics. Heidelberg, 6. Auflage 2009, S.47
- [7] M. Abercrombie; C.J. Hickman; M.L. Johnson: A Dictionary of Biology. Aylesbury, 6th Edition 1973, S. 127
- [8] R. Knippers; K.P. Schäfer; E. Fanning: Molekulare Genetik. Stuttgart; New York, 3., völlig neubearb. u. erw. Aufl., 1982
- [9] Biocompare - The Buyer's Guide for Life Science. "Agarose Gel Electrophoresis Protocol". Product Discovery. <http://www.biocompare.com/protocols/protocol/318/Agarose-Gel-Electrophoresis.html> [Stand: 28.04.2011]
- [10] Bundesministerium für Bildung und Forschung. „Lexikon-Transiente Genexpression“. Biosicherheit. <http://www.biosicherheit.de/lexikon/778.transiente-genexpression.html> [Stand: 03.11.11]
- [11] Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie-Berlin: „Zellzählung und Vitalitätstest mit Trypanblau“. Immunkurs 2000-Anleitung 1. http://www.molim.uni-erlangen.de/lehrInfo/F1_neubauer1.pdf [Stand:22.08.11]
- [12] Lindl, T.; Gstraunthaler, G.: Zell-und Gewebekultur-Von den Grundlagen zur Laborbank. o.O., Spektrum Akademischer Verlag, 6. Auflage, 2008.
- [13] Nickel, Fabian; Stein,Timo: „Ferrofluid“. Untersuchung und Herstellung von Ferrofluiden. 20. Oktober 2011. http://www.ferrofluide.de/ferrofluid_de.php [Stand: 10.08.11]
- [14] Sachsen Anhalt Ministerium für Landwirtschaft und Umwelt. „Gentechnik in der Medizin“. <http://www.sachsen-anhalt.de/index.php?id=pgmrnj16o9ne> [Stand: 01.11.11]
- [15] Geiger, Boris: Nano-Medizin – kleine Teilchen mit großer Wirkung. Bayerisches Fernsehen, 04.04.2011. Film.
- [16] Praktikum: Klinikum rechts der Isar, München, Abteilung für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung bei Prof. Dr. Christian Plank, April und Juni 2011, 8 Tage
- [17] Kariko K, Buckstein M, Ni H, Weissman D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. Immunity 2005; 23 165-75
- [18] Kormann MS, Hasenpusch G, Aneja MK, et al. Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. Nat Biotechnol 2011; 29 154-7