

SILKE ALBERMANN

*IN SITU* ELEKTROPORATION ADHÄRENTER  
SÄUGERZELLEN

2004

Biochemie

***In situ* Elektroporation adhärenter Säugerzellen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich  
Chemie und Pharmazie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
**Silke Albermann, geb. Arndt**  
aus Wuppertal

2004

---

Dekan:	Prof. Dr. J. Leker
Erster Gutachter:	Prof. Dr. H.-J. Galla
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. H. Oberleithner
Tag der mündlichen Prüfung:	<u>23. April 2004</u>
Tag der Promotion:	<u>23. April 2004</u>

Alles Wissen und alle Vermehrung unseres Wissens  
endet nicht mit einem Schlusspunkt,  
sondern mit einem Fragezeichen.

*Hermann Hesse*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Elektroporation	1
1.1.1 Theorie zur Elektropermeabilisierung von Zellmembranen	2
1.1.1.1 Bildung von Elektroporen	2
1.1.1.2 Zurückbildung und Verschluss von Elektroporen	7
1.1.1.3 Optimierung von Parametern bei der <i>in vitro</i> -Elektroporation	8
1.1.2 Anwendungen der Elektroporation	9
1.1.2.1 <i>In vitro</i> -Elektroporation	9
1.1.2.2 <i>In vivo</i> -Elektroporation	15
1.1.2.3 Klinischer Nutzen der Elektroporation in der Krebsbehandlung	15
1.2 Transfektionsmethoden	16
1.2.1 Biologische Methoden	17
1.2.1.1 Retroviren	17
1.2.1.2 Adenoviren	17
1.2.2 Biochemische Methoden	18
1.2.2.1 Präzipitation mit $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	18
1.2.2.2 Kationische Polymere	18
1.2.2.3 Liposome	20
1.2.3 Physikalische Methoden	20
1.2.3.1 Biolistik	20
1.2.3.2 Mikroinjektion	21
1.2.3.3 Magnetofektion	21
1.3 Transfektion konfluenter Zellschichten	21
<b>2 Zielsetzung</b>	<b>25</b>
<b>3 Experimenteller Teil</b>	<b>26</b>
3.1 Zellbiologische Methoden	26
3.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen	26
3.1.1.1 Subkultivierung	26
3.1.1.2 Kryokonservierung	27

3.1.2 MDCK-II-Epithelzellen .....	27
3.1.3 NRK-Epithelzellen .....	27
3.1.4 HEK 293-Zellen .....	28
3.1.5 COS 7-Zellen .....	28
3.1.6 Lebend-Tod-Test .....	28
3.1.7 Transiente Transfektion .....	29
3.1.8 Nachweis der $\beta$ -Galaktosidase .....	30
<b>3.2 Mikrobiologische Methoden .....</b>	<b>31</b>
3.2.1 Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) Zellen .....	31
3.2.2 Transformation von <i>E. coli</i> Zellen .....	31
3.2.3 Kultur von <i>E. coli</i> Zellen .....	32
3.2.4 Lagerung von <i>E. coli</i> Zellen .....	32
<b>3.3 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>33</b>
3.3.1 Quantifizierung der Nukleinsäuren .....	33
3.3.1.1 Konzentrationsbestimmung durch UV/VIS-Spektroskopie .....	33
3.3.1.2 Konzentrationsbestimmung durch Färbung mit Ethidiumbromid .....	33
3.3.2 Agarose-Gelelektrophorese .....	33
3.3.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen .....	35
3.3.4 Isolation von Plasmid DNA .....	36
3.3.5 Fällung von Plasmid-DNA .....	36
3.3.6 Klonierung und Ligation .....	36
3.3.6.1 Restriktion .....	36
3.3.6.2 5'-Dephosphorylierung mit SAP .....	37
3.3.6.3 Ligation .....	37
3.3.7 Sequenzierung .....	37
3.3.8 <i>In-vitro</i> -Transkription .....	37
<b>3.4 Biophysikalische Methoden .....</b>	<b>38</b>
3.4.1 <i>Electric Cell-Substrate Impedance Sensing</i> (ECIS) .....	38
3.4.1.1 Messaufbau .....	38
3.4.1.2 Grundlagen der Impedanzspektroskopie (IS) .....	40
3.4.1.3 Auswertung der Impedanzspektren .....	42
3.4.1.4 <i>Micromotion</i> .....	44
3.4.2 Elektroporation .....	47
3.4.3 Rasterkraftmikroskopie .....	50

<b>4 Ergebnisse</b>	<b>51</b>
4.1 Theoretische Betrachtungen	51
4.1.1 Simulation von Impedanzspektren	51
4.1.1.1 Variation der zellschichtbeschreibenden Parameter	51
4.1.1.2 Variation der Elektrodenparameter	54
4.1.2 Simulation der Spannungsprofile für die Elektroporation	56
4.2 Elektroporation mit unterschiedlichen Farbstoffsonden	59
4.2.1 Eintrag von <i>Lucifer Yellow</i> in NRK-Zellen	59
4.2.2 Eintrag von FITC-Dextran in NRK-Zellen	60
4.2.3 Eintrag von FITC-Dextran in MDCK-II-Zellen	61
4.2.4 Eintrag von FITC-BSA in NRK-Zellen	62
4.2.5 Eintrag von TRITC-Phalloidin in NRK-Zellen	63
4.3 Einfluss der Elektroporation auf die Impedanz der Zellschicht	64
4.3.1 Elektroporation von NRK-Zellen	64
4.3.2 Elektroporation von MDCK II-Zellen	66
4.4 Elektroporation bei Variation der Pulsform	68
4.4.1 Elektroporation unter Standardbedingungen	69
4.4.2 Elektroporation bei verlängerter Pulsdauer	73
4.4.3 Elektroporation mit dem PV-Sinus in unterschiedlichen Medien	77
4.5 Elektroporation mit Nukleinsäuren	79
4.5.1 Elektroporation mit pDNA	79
4.5.2 Elektroporation mit mRNA	82
<b>5 Diskussion</b>	<b>83</b>
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>98</b>
<b>7 Literatur</b>	<b>99</b>

<b>8 Anhang</b> .....	<b>106</b>
8.1 Akronyme.....	106
8.2 Materialien.....	107
8.2.1 Materialien für molekularbiologische Arbeiten.....	107
8.2.2 Materialien für mikrobiologische Arbeiten.....	108
8.2.3 Materialien für zellbiologische und biophysikalische Arbeiten.....	108
8.3 Vektorkarten.....	109
8.3.1 pcDNA3.....	109
8.3.2 pCMV $\beta$ .....	110
8.3.3 pEGFP-N1.....	110
8.3.4 pEYFP-Actin.....	110
8.3.5 pSV $\beta$ -Galctosidase.....	111

# 1 Einleitung

Der Eintrag von Makromolekülen verschiedener Art in das Zytoplasma lebender Zellen eröffnet sowohl der biochemischen als auch der biomedizinischen Forschung vielseitige experimentelle Möglichkeiten. Ein erzwungener Transfer von Makromolekülen über die Zellmembran erfolgt üblicherweise mittels chemischer, biologischer oder physikalischer Methoden. Die biologischen Methoden bedienen sich spezieller Transportmoleküle (*Carrier*), um membranimpermeable Makromoleküle wie Nukleinsäuren, Proteine oder andere Substanzen (Medikamente, Farbstoffe) Endocytose-vermittelt in das Zytoplasma zu transportieren. Detergenzien und Proteasen (Lemons et al., 1988) werden bei chemischen Methoden zur Membranpermeabilisierung verwendet, diese sind jedoch meist ineffizient und schädigen die Zellen nachhaltig. Bei den physikalischen Methoden wird eine Vielzahl von Techniken zum Transfer von Makromolekülen in lebende Zellen genutzt: Optoporation (Membranpermeabilisierung durch Laserpulse; Kurata et al., 1986), Sonoporation (Permeabilisierung mittels Ultraschall; Guzmàn et al., 2002), Mikroinjektion (Graessmann, 1983; De Pamphilis et al., 1988; Soreq und Seidman, 1992), Partikelbeschuss per *biolistic gun* (Heiser, 1994) und Elektroporation (Engström et al., 1999; Jaroszeski et al., 2000; Mir et al., 1988).

Eine selektive und reversible Permeabilisierung der Zellmembran ist Grundvoraussetzung für viele biotechnologische und biomedizinische Anwendungen. Dabei hat sich die Elektroporation in weiten Teilen dieser Anwendungen als geeignete Methode etabliert. Sie basiert auf der Applikation eines externen elektrischen Feldes zur transienten Öffnung der Zellmembran. Es ist möglich, die Elektroporation an isolierten Zellen eines Gewebes durchzuführen und *in vitro* den Eintrag der Makromoleküle (DNA, RNA, Antikörper u.a.) in die intakten Zellen zu studieren (Verspohl et al., 1997). Dies brachte in den letzten zehn Jahren den Durchbruch für einige erfolgreiche medizinische Anwendungen wie der Elektrochemotherapie, dem elektrisch unterstützten Transport von Chemotherapeutika in Tumorgewebe krebserkrankter Patienten (Sersa et al., 2000). *In vivo* ist es ebenfalls gelungen DNA in Haut (Prausnitz et al., 1993), Leber (Heller et al. 1996), und Skelettmuskeln (Gehl et al., 1999) zu transferieren.

Die der Elektropermeabilisierung zugrunde liegenden Mechanismen sind auch heute noch keineswegs vollständig verstanden. Die Wichtigkeit und breite Anwendbarkeit von experimentellen oder auch therapeutischen Methoden, die auf einer Elektroporation der Plasmamembran lebender Zellen basieren, unterstreichen die Notwendigkeit grundlegender Untersuchungen in diesem Forschungsgebiet.

## 1.1 Elektroporation

Aufbauend auf theoretische Studien und experimentelle Untersuchungen an Lipid-Doppelschichten aus den Jahren 1960 bis 1970 wurde 1982 von Neuman et al. die erste Publikation zum Gentransfer in Säugetierzellen per Elektroporation veröffentlicht. Die ersten Experimente auf diesem Gebiet wurden in speziell angefertigten Elektroporationskammern durchgeführt. Bald wurden kommerzielle

Geräte zur Elektroporation in Suspension entwickelt und vermarktet, so dass sich die Elektroporation, insbesondere zum Transfer von DNA in bakterielle Zellen, in der Forschung stark verbreitete. Bei der Transformation von Bakterien ist es aufgrund der kurzen Verdopplungszeiten in Kombination mit effizienten Selektionsstrategien prinzipiell ausreichend, ein einzelnes überlebendes, transformiertes Bakterium zu erhalten. Vorschriften zur Transformation von Bakterien befassen sich daher nur in geringem Maße mit der Überlebensrate der Zellen nach der Elektroporation. Es ist folglich nicht erstaunlich, dass die Elektroporation als eine sehr invasive Methode zum Gentransfer in Zellen angesehen wird.

In den 80er Jahren wurden mehrere *in vitro* Studien zur Elektroporation von verschiedenen Molekülen in suspendierte, eukaryotische Zellen veröffentlicht (z.B. Melvic et al., 1986; Mir et al., 1988); ab den frühen 90er Jahren kamen *in vivo* Studien zu Elektroporation hinzu (Belehradek et al., 1991; Mir et al., 1991; Salford et al., 1993; Heller et al., 1995). Die erste klinische Studie zur Elektroporation von Chemotherapeutika in Tumore wurde 1993 von Belehradek et al. publiziert. Danach wurden mehrere verschiedene Studien zu diesem Thema veröffentlicht (Heller et al., 1998; Mir et al., 1998; Gehl und Geertsen 2000, Sersa et al., 2000).

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden die Geräte zur Elektroporation immer weiter verfeinert. So ist es seitdem technisch möglich, die Parameter Pulsamplitude und Pulsdauer unabhängig voneinander zu variieren. Dies ermöglicht eine bessere Optimierung der Elektroporationsparameter für den jeweiligen Zelltyp und damit eine erhöhte Vitalitätsrate der Zellen nach der Elektroporation.

Bei fast allen *in vitro*-Elektroporationen adhärenter tierischer Zellen wird der elektrische Puls appliziert, während sich die Zellen in Suspension befinden. Diese müssen dazu mit Trypsin und/oder EDTA behandelt werden, was zu einer vorübergehenden Störung des Zellteilungszyklus sowie zu einer Änderung des metabolischen Status' der Zellen führt (Vasiliev, 1985). Sensible adhärenente Zellen, beispielsweise aus Primärkulturen, sind für eine Elektroporation in Suspension häufig nicht geeignet. Auch experimentelle Gegebenheiten, wie die direkte Detektion des Einflusses des elektrischen Pulses, können eine solche Elektroporation unmöglich machen. Untersuchungen zur *in situ*-Elektroporation adhärenter Zellen, bei welcher der elektrische Puls appliziert wird, während die Zellen auf ihrem Substrat fest verankert sind, könnten diese Probleme umgehen. 1990 wurde die erste Studie zur *in situ*-Elektroporation adhärenter Zellen von Raptis und Firth veröffentlicht. Eine weitere Untersuchung auf diesem Gebiet wurde 1993 von Gosh et al. publiziert.

## 1.1.1 Theorie zur Elektroporpermeabilisierung von Zellmembranen

### 1.1.1.1 Bildung von Elektroporen

Die Elektroporation beruht auf einer transienten reversiblen Permeabilisierung der Zellmembran mittels kurzer Spannungspulse. Ein extern angelegtes elektrisches Feld induziert diese Permeabilisierung, indem es eine Ladungsakkumulation an den Grenzflächen der Zellmembranen

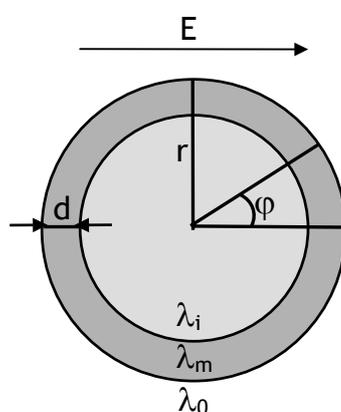
bewirkt, die deren elektrische Kapazität übersteigt. Das Transmembranpotential  $\Delta\Phi_m$  einer suspendierten Zelle, durch ein externes elektrisches Feld induziert, beschreiben Kotnik et al. (1998) durch folgende Gleichung:

$$\Delta\Phi_m = fEr \cos \varphi \quad (1.1)$$

Dieser Beziehung liegen folgende Annahmen zugrunde: Die Zellen sind kugelförmig, besitzen keine Oberflächenladung und werden einem statischen E-Feld ausgesetzt.  $E$  beschreibt die Stärke des externen elektrischen Feldes,  $r$  ist der Zellradius,  $\varphi$  bezeichnet den Winkel zwischen der Oberflächennormalen an einer Stelle der Membran und der E-Feld-Richtung und  $f$  ist eine Funktion, welche die elektrischen und geometrischen Eigenschaften der Zelle widerspiegelt:

$$f = \frac{3\lambda_0 [3dr^2\lambda_i + (3d^2r - d^3)(\lambda_m - \lambda_i)]}{2r^3 (\lambda_m + 2\lambda_0) \left(\lambda_m + \frac{1}{2}\lambda_i\right) - 2(r-d)^3 (\lambda_0 - \lambda_m)(\lambda_i - \lambda_m)} \quad (1.2)$$

Dabei sind  $\lambda_i$ ,  $\lambda_m$  und  $\lambda_0$  die Leitfähigkeiten des Zytoplasmas, der Zellmembran und des extrazellulären Mediums. Der Zellradius wird wiederum durch den Parameter  $r$  beschrieben,  $d$  spiegelt die Dicke der Zellmembran wider. Abbildung 1.1 veranschaulicht die Bedeutung der Parameter aus Gleichung (1.2).



**Abb. 1.1:** Veranschaulichung der Parameter aus Gleichung (1.1) und (1.2): Die Zellen ist kugelförmig mit dem Radius  $r$ , sie hat eine Zellmembran der Dicke  $d$ . Die Richtung des homogenen externen elektrischen Feldes  $E$  bleibt gleich. Die spezifischen Leitfähigkeiten des Zytoplasmas, der Zellmembran und des extrazellulären Mediums werden repräsentiert durch  $\lambda_i$ ,  $\lambda_m$  und  $\lambda_0$ .  $\varphi$  ist der für Gleichung 1.1 benötigte Winkel.

Durch das applizierte elektrische Feld wird eine Potentialdifferenz über die Membran aufgebaut, die dem endogenen Membranpotential überlagert ist. Elektropermeabilisierung der Zellmembran wird dann erreicht, wenn diese Potentialdifferenz einen bestimmten Grenzwert ( $\Delta\Phi_s$ ) übersteigt. Dieser Grenzwert ist für eine Reihe verschiedener Zellen ähnlich, da die Lipiddoppelschicht ein

gemeinsames Merkmal eukaryotischer Zellen ist (Gehl, 2003). Allgemein geht man von einer Grenzpotentialdifferenz  $\Delta\Phi_S$  in der Größenordnung von 1 V aus (Kinosita und Tsong, 1977). Teissié und Rols haben jedoch 1993 experimentell und theoretisch beschrieben, dass  $\Delta\Phi_S$  bereits in der Größenordnung von 200 mV für eine Elektroporation ausreichend ist. Die Gleichungen 1.1 und 1.2 verdeutlichen hierbei den großen Einfluss von zellspezifischen Parametern auf die Elektropermeabilisierung der Zellmembran verschiedener Zelltypen. Generell ist festzuhalten, dass bei kleinerem Zellradius das extern angelegte elektrische Feld größer werden muss, um bei gleicher Schwellenspannung eine Permeabilisierung zu erreichen (Gleichung 1.1). Dies verdeutlicht zum einen, dass zur Elektroporation von Bakterien größere Feldstärken notwendig sind, als zur Permeabilisierung der Membran von eukaryotischen Zellen. Es zeigt andererseits aber auch, dass Zellorganelle (z.B. Mitochondrien) durch elektrische Pulse, die eine Permeabilisierung der Zellmembran bewirken, nicht permeabilisiert oder geschädigt werden.

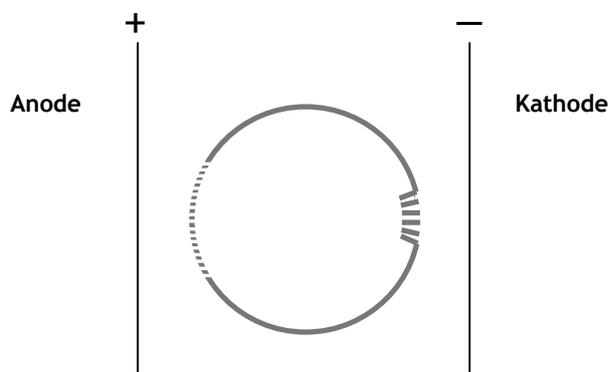
Neuere Forschungen beschäftigen sich mit der Elektroporation kleiner Zellorganellen ohne jedoch gleichzeitig die Zellmembran zu permeabilisieren (Schoenbach et al. 2001). Dies ist möglich durch Applikation extrem kurzer Pulse im Nanosekunden-Bereich und bei gleichzeitig sehr hohen Spannungsamplituden (9 kV). Die Zellmembran wird dabei nicht elektroporiert, da sich während der kurzen Pulsdauer keine Ladungsakkumulation an den Membrangrenzflächen aufbauen kann. Die Zeit, die notwendig ist, um eine Ladungsakkumulation an den Membrangrenzflächen aufzubauen, hängt von der Membrankapazität sowie von dem zellumgebenden Medium ab. Für eine kugelförmige Zelle, deren Zellmembran sich wie ein ideales Dielektrikum verhält, gilt folgende Formel (Schoenbach et al., 2001):

$$\tau_c = \left( \rho_c + \frac{\rho_a}{2} \right) c_m r \quad (1.3)$$

Dabei ist  $c_m$  die spezifische Kapazität der Zellmembran,  $r$  der Zellradius,  $\rho_c$  der Widerstand des Zytoplasmas und  $\rho_a$  der Widerstand des extrazellulären Mediums. Für eine Zelle mit einem Radius von 5  $\mu\text{m}$ , einem Zytoplasma- und Mediumswiderstand von 100  $\Omega\text{cm}$  und einer Membrankapazität von 1  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$  berechneten Schoenbach et al. (2001) eine Ladungszeit  $\tau_c$  von 75 ns. Für intrazelluläre Granula beträgt die Ladungszeit etwa 18 ns. Schoenbach et al. (2001) legten an humane Eosinophile *in vitro* elektrische Felder von bis zu 53 kV/cm an. Durch 3 bis 5 Pulse von jeweils 60 ns Dauer konnten Schoenbach et al. Fluoreszenzfarbstoffe, die durch andere Methoden in das Zytoplasma gebracht wurden, in intrazelluläre Granula einbringen, ohne dabei die Zellmembran zu elektroporieren. Dieser intrazelluläre Effekt erweitert die konventionelle Elektroporation von Zellen und eröffnet neue Anwendungsmöglichkeiten z.B. zur Apoptoseinduktion (siehe 1.1.2) oder bei dem Gentransfer in den Zellkern.

Ist die Potentialdifferenz  $\Delta\Phi_S$  der Zellmembran überschritten, bestimmt die Amplitude des Elektroporationspulses die Größe der permeabilisierten Zellfläche, während die Pulslänge das Ausmaß der Permeabilisierung der Membran in einer gegebenen Fläche bestimmt (Gehl, 2003). Gabriel und Teissie (1997) konnten zeigen, dass die permeabilisierte Fläche auf der Zellseite, die in

Richtung der Anode weist, größer ist. Der Grad der Permeabilisierung hingegen ist auf der zur Kathode weisenden Seite größer. Das zeigt, dass größere Moleküle eher auf Seite der negativen Elektrode aufgenommen werden, die Aufnahmefläche jedoch an der positiven Elektrode größer ist (Tekle et al., 1990). Abbildung 1.2 soll diesen Zusammenhang verdeutlichen.



**Abb. 1.2:** Eine Zelle während der Applikation eines statischen elektrischen Feldes: Die Membran auf Seite der Anode wird zuerst durchlässig und die permeabilisierte Fläche ist größer als die auf der kathodischen Seite. Mit zunehmender Amplitude des Feldes vergrößert sich diese Fläche. Mit zunehmender Pulsdauer vergrößern sich die Poren auf der Seite der Kathode.

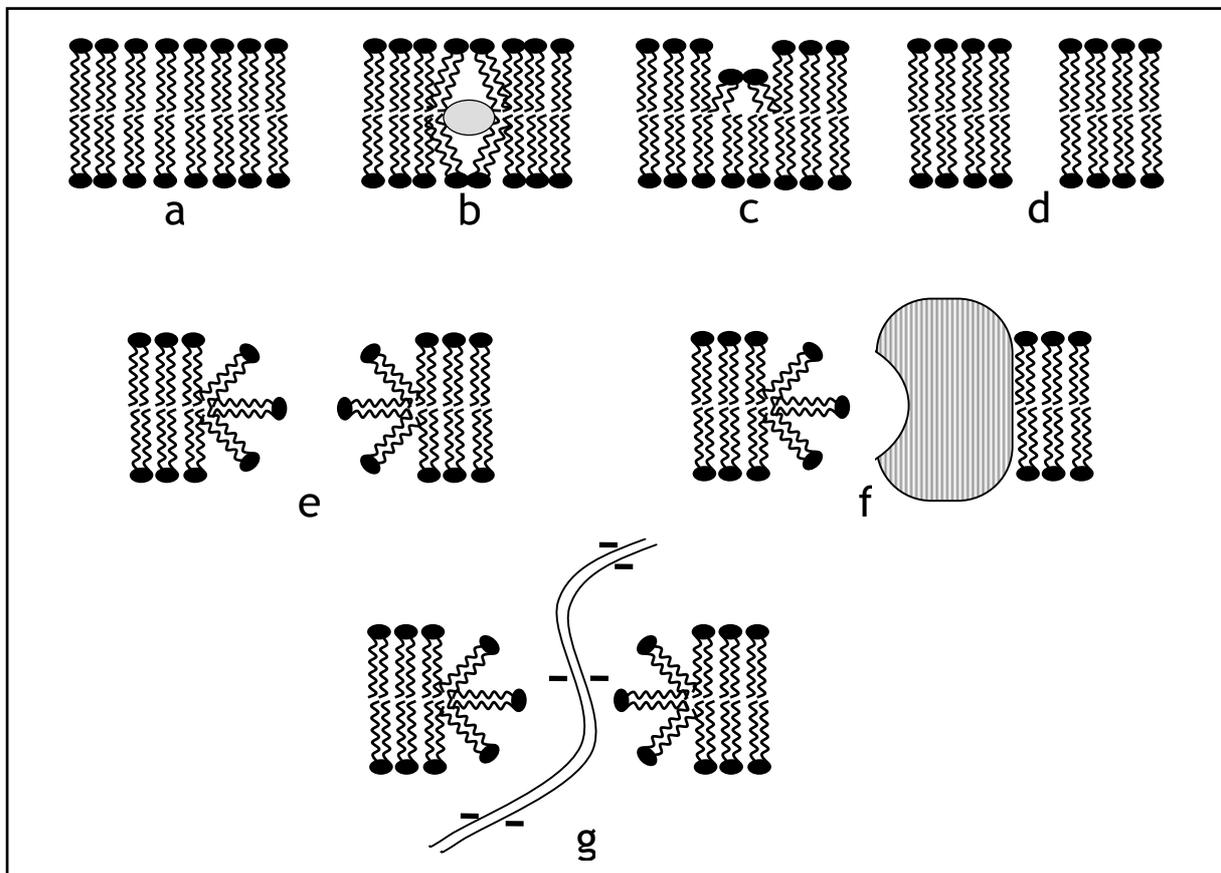
Die Entstehung elektropermeabilisierter Bereiche in einer Zelle werden durch die reversible Bildung von Elektroporen mechanistisch erklärt. Dazu gibt es zwei verschiedene Modelle.

(i) Das sogenannte statistische Modell stützt sich auf strukturelle Veränderungen der Phospholipide in der Zellmembran. Durch Anlegung eines externen elektrischen Feldes und der damit induzierten lokalen Wärme werden Phasenübergänge der Lipide induziert. Dies führt zu einer lokal erhöhten Beweglichkeit der Membran. Durch gesteigerte laterale Diffusion und flip-flop Effekte der Phospholipide bilden sich zunächst kleine lokale Defekte in der Phospholipiddoppelschicht. Diese werden dann durch Umorganisation ihrer polaren Kopfgruppen in hydrophilen Poren, den Elektroporen, stabilisiert. (Abidor, 1979; Glaser et al.; 1988).

(ii) Im elektrostatischen Modell wird die Membran aufgrund ihrer fluiden, aber strukturierten Form als ein elastisches, dielektrisches Medium betrachtet. Das angelegte elektrische Feld führt zu einer Instabilität in der Membran durch gegensätzlich orientierte elektrokompulsive und elastische Kräfte. Diese Instabilität verursacht Defekte in der Plasmamembran, die sich zu größeren Poren ausdehnen können (Riemann et al., 1975; Crowley, 1973).

Beide Modelle beschreiben zunächst die Bildung kleiner lokaler Defekte in der Lipiddoppelschicht, welche sich bei anhaltendem elektrischen Puls in den hydrophilen Elektroporen stabilisieren. Weaver (2000) veranschaulicht verschiedene Veränderung der Zellmembran bis hin zur Ausbildung der Elektroporen (siehe Abb. 1.3). Diese Veranschaulichung ist nur hypothetisch möglich, da es bis zum heutigen Tage nicht gelungen ist, Elektroporen bildhaft darzustellen. Es ist zunächst denkbar, dass durch freie Fluktuation der Lipidmoleküle der Eintritt von ungeladenen kleinen Molekülen in die Zellmembran möglich wird (Abb. 1.3.b). Auch kann durch das applizierte elektrische Feld die Zellmembran lokal komprimiert werden und dadurch ebenfalls lokal an Dicke abnehmen (Abb.

1.3.c). Möglich wäre aber auch die Bildung von hydrophoben Poren durch laterale Fluktuation (Abb. 1.3.d). Durch diese minimalen Defekte der Lipiddoppelschicht können sich dann bei andauerndem elektrischen Puls hydrophile Elektroporen ausbilden. Auch die Elektroporen können in der Zellmembran unterschiedlich ausgeprägt sein. Favorisiert wird hierbei die Vorstellung, dass die hydrophilen Kopfgruppen der Phospholipide die Pore abgrenzen (Abb. 1.3.e). Denkbar wäre auch, dass die Elektropore auf einer Seite durch ein Transmembranprotein abgegrenzt wird (Abb. 1.3.f). Eine Vorstellung zur Stabilisierung der Elektropore ist das Bild vom „Fuß in der Tür“: Ein langes, geladenes Molekül interagiert mit der sich ausbildenden hydrophilen Pore und führt so zu Stabilisierung der resultierenden Elektropore bei (Abb. 1.3.g). Diese Vorstellung wird durch die experimentellen Befunde von Sukharev et al. (1992) gestützt. Dort konnte gezeigt werden, dass die Membranpermeabilität für unterschiedliche wasserlösliche Farbstoffe sehr viel größer ist, wenn bei der Elektroporation gleichzeitig DNA-Moleküle in die Zelle eingebracht werden.



**Abb. 1.3:** Hypothetische strukturelle Membranveränderungen durch ein extern angelegtes elektrisches Feld und Bildung der hydrophilen Elektroporen: (a) Intakte Zellmembran vor dem elektrischen Puls, (b) Defekt durch Eintritt eines ungeladenen Moleküls in die Zellmembran, (c) Lokale Kompression der Lipiddoppelschicht, (d) Bildung einer hydrophoben Pore durch laterale Fluktuation, (e) Favorisiertes Modell einer hydrophilen Elektropore, (f) Einseitige Begrenzung der Elektropore durch ein Transmembranprotein, (g) „Fuß-in-der-Tür“-Modell eines langen geladenen Moleküls in der Elektropore.

### 1.1.1.2 Zurückbildung und Verschluss von Elektroporen

Unter optimalen Bedingungen ist die Permeabilisierung von Zellmembranen reversibel. Das bedeutet, dass sich die Elektroporen nach Abschalten des externen elektrischen Feldes wieder verschließen und auf diese Weise der intakte Zustand der Zellmembran wiederhergestellt wird. Dieser Vorgang wird auch *Resealing* genannt. Der Mechanismus des Wiederverschlusses der transient gebildeten Elektroporen ist nicht genau bekannt. 1977 wurde erstmals der Wiederverschluss von Zellmembranen durch Kinosita und Tsong beschrieben. Seitdem beschäftigen sich zahlreiche Arbeiten mit dem *Resealing*-Effekt nach der Elektroporation. Der Effekt des Wieder-verschlusses der Zellmembran ist stark temperaturabhängig; Bei Abnahme der Temperatur verlangsamt sich der Prozess deutlich (Orlowski und Mir, 1993; Teissie et al., 1999). So läuft das *Resealing* bei Raumtemperatur innerhalb von 30 min nach dem Abschalten des Elektroporationspulses ab. Werden die Zellen nach der Elektroporation jedoch auf Eis inkubiert dauert der Prozess deutlich länger als 30 min (Teissie et al., 1990). Bier et al. (1999) berichten ohne Angabe der Umgebungstemperatur von einer 9-minütigen *Resealing*-Dauer bestimmt durch  $Mg^{2+}$ -Einstrom in Skelettmuskelzellen. Die angegebenen Zeitwerte für den Wiederverschluss der Elektroporen können jedoch nur Anhaltspunkte darstellen. Nicht nur die Temperatur hat großen Einfluss auf das Ergebnis, auch die Größe des als Sonde verwendeten Moleküls, dessen Diffusion über die Zellmembran beobachtet wird, führt zu unterschiedlichen Ergebnissen. So konnten Saulis et al. (1991) zeigen, dass die Barrierefunktion der Zellmembran für mittelgroße Moleküle (Ascorbinsäure) bereits 2 - 3 min nach dem elektrischen Puls wieder hergestellt war. Für kleine Ionen ( $Na^+$ ) ermittelten sie eine *Resealing*-Zeit von 10 - 15 min.

Auch scheint der Zellzyklus hierbei eine Rolle zu spielen; Rols und Teissie (1992) beobachteten bei CHO-Zellen (*chinese hamster ovary*) in der Mitose eine *Resealing*-Dauer von weniger als 1 min, bei nichtmitotischen Zellen lag diese bei 30 min (gemessen am Trypan Blau-Einstrom in die Zelle).

Dem Zytoskelett, welches über Proteine an die Lipiddoppelschicht gebunden ist, wird ebenso eine entscheidende Rolle bei diesem Prozess zugeschrieben (Rols und Teissie, 1992). Die Zugabe von Colchicin, einem Gift, dass die Depolymerisation von Mikrotubuli induziert, zu CHO-Zellen vor der Elektroporation hat keinen Effekt auf die Permeabilisierung der Membran durch den Elektroporationspuls, zeigt jedoch einen sehr starken Effekt beim anschließenden *Resealing*. Colchicin verkürzt deutlich die Zeit bis zum Wiederverschluss der Poren (Rols und Teissie, 1992). Ein Fehlen von Mikrotubuli scheint also den *Resealing*-Prozess zu verkürzen. Im Einklang dazu steht die Beobachtung des *Resealings* bei mitotischen Zellen (s.o.): Während der Mitose lösen sich die Mikrotubuli des Zytoskeletts teilweise auf, vermutlich um das Baumaterial für die Mitosespindeln zu liefern, die sich während der Prophase im Zytoplasma bilden (Campbell, 1998).

Darüber hinaus spielen aber auch Ionenstärke (Rols und Teissie, 1989) und osmotische Kräfte eine Rolle (Rols und Teissie, 1990). Durch die dem Elektroporationsmedium zugesetzten Makromoleküle, die größer als die Poren sind und somit nicht in die Zelle diffundieren können, wird ein Anschwellen der Zelle verhindert (Tsong, 1990; Kinosita und Tsong, 1977). Das Schließen der Poren erfolgt dadurch schneller und eine mögliche Lyse der Zelle wird verhindert.

Steinhardt et al. (1994) vermuten, dass der *Resealing*-Prozess ähnlich wie die Exocytose von Neurotransmittern abläuft. So wurde gezeigt, dass 3T3-Fibroblasten-Zellen zum *Resealing* extrazellulär angebotenes Calcium benötigen. Extrazelluläres Magnesium konnte diesen Prozess inhibieren. Außerdem zeigten Steinhardt et al. (1994), dass eine Blockierung der  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-Kinase, welche die Verfügbarkeit exocytotischer Vesikel an Synapsen reguliert, ebenfalls das Membran-*Resealing* inhibiert.

Ein weiteres interessantes Gebiet stellt die Untersuchung von irreversiblen Membranschäden durch Elektroporation dar. Irreversible Schäden der Membran durch Elektroporation werden durch elektrische Pulse hoher Amplitude und extrem langer Dauer hervorgerufen. Bis heute ist über Möglichkeiten zum langsamen *Resealing* solcher Zellmembranen bei gleichzeitig geringem Verlust an intrazellulären Komponenten nicht viel bekannt. Es gibt jedoch Anzeichen dafür, dass Zelltod durch Elektroporation sehr viel eher *in vitro* als *in vivo* auftritt: *In vitro* ist der Verlust von zytosolischem Material sehr viel größer, da auch das extrazelluläre Volumen groß ist, während der extrazelluläre Raum in Geweben eher gering ist, wodurch auch der Austritt von intrazellulären Komponenten gering gehalten wird (Gehl et al.; 1999).

### 1.1.1.3 Optimierung von Parametern bei der *in vitro*-Elektroporation

Wie schon in Abschnitt 1.1 beschrieben, ist die Überlebensrate individueller Zellen bei der Elektroporation von Bakterien wegen der hohen Teilungsrate kein entscheidender Faktor. Bei der Elektroporation von Säugetierzellen hingegen ist die Überlebensrate ein äußerst wichtiger Parameter. Es ist demzufolge notwendig, die Parameter zur Elektroporation so zu optimieren, dass eine hohe Überlebensrate bei gleichzeitig hohem Prozentsatz an permeabilisierten und/oder transfizierten Zellen gewährleistet wird. Gehl et al. (1998) berichten von 90 % permeabilisierten Zellen und einer Überlebensrate von 95 % bei optimaler Elektroporation.

Folgende Punkte sollten bei der *in vitro*-Elektroporation beachtet werden:

(a) Form und Größe der Zellen

Wie aus den Gleichungen 1.1 und 1.2 ersichtlich, korreliert die zur Permeabilisierung von Zellen benötigte Stärke des externen elektrischen Feldes mit der Zellform, Zellgröße und Beschaffenheit der Zellmembran. Dies hat zur Folge, dass die Elektroporationsparameter für jeden Zelltyp neu optimiert werden müssen. Auch wird in diesem Zusammenhang deutlich, dass mit Zellen, die eine große Homogenität in Form und Größe aufweisen, sehr viel bessere Ergebnisse erzielt werden können als mit Zelllinien, welche in diesen Parametern große Variationen zeigen.

(b) Temperatur

Wie bereits in Abschnitt 1.1.1.2 beschrieben ist der Prozess des Wiederverschlusses der Elektroporen stark temperaturabhängig. Bei höheren Temperaturen erfolgt das *Resealing* wesentlich schneller als bei niedrigen (Teissie et al., 1990). Die Überlebensrate der Zellen

ist umso höher, je schneller sich die Elektroporen wieder verschließen, da so der Austritt von intrazellulärem Material verringert wird.

(c) Behandlung der Zellen nach dem Elektroporationspuls

Während und kurze Zeit nach Anlegen des elektrischen Feldes sind die permeabilisierten Zellen äußerst sensibel gegenüber Veränderung ihrer Umgebung. Gehl et al. (1998) konnten zeigen, dass eine 15 minütige Wartezeit nach der Elektroporation und vor der Überführung der Zellen in ihr Kulturgefäß die Überlebensrate erhöhte. Einen großen Vorteil stellt in diesem Kontext die Elektroporation adhärenter Zellen dar. Die Zellen werden dazu auf elektrisch leitenden Substraten kultiviert (Raptis und Firth, 1990; Gosh et al., 1993) und müssen daher weder vor, während noch nach der Elektroporation enzymatisch oder mechanisch manipuliert werden.

Zur Optimierung der *in vitro*-Elektroporation von suspendierten oder adhärenen Zellen werden häufig fluoreszierende Farbstoffe, wie Propidiumiodid (Sersa et al., 1995; Gabriel und Teissie, 1997) oder *Lucifer Yellow* (Mir et al., 1988, Dinchuk et al., 19992; Wegener et al., 2002) als Sonden eingesetzt, um permeabilisierte Zellen sichtbar zu machen.

## 1.1.2 Anwendungen der Elektroporation

### 1.1.2.1 *In vitro*-Elektroporation

Am häufigsten wird die *in vitro*-Elektroporation zur Transformation von Bakterien angewandt. In Abschnitt 1.1 wurde darauf schon näher eingegangen. Seit den 80er Jahren findet jedoch auch die Elektroporation von eukaryotischen Zellen zunehmend Anwendung. Die Pulsdauer liegt bei der *in vitro*-Elektroporation i.a. zwischen 10  $\mu$ s und 10 ms wobei die auf die Zellen wirkenden elektrischen Feldstärken zwischen 0.5 und 20 kV/cm variieren.

Die Anwendungen der *in vitro*-Elektroporation von eukaryotischen Zellen sind vielfältig:

Beebe et al. (2003) konnten durch Elektroporation intrazellulärer Membranen in humanen Zellen (Jurkat- und HL60-Zellen) Apoptose induzieren. Sie nutzten dazu elektrische Pulse hoher Intensität (26 - 150 kV/cm) und extrem kurzer Dauer (10 - 300 ns). Diese nsPEF-Technik (*nanosecond pulsed electric field*) eröffnet der biologischen Grundlagenforschung zahlreiche Möglichkeiten, intrazelluläre Strukturen und Funktion zu manipulieren und somit deren Funktion genauer zu untersuchen.

Durch Elektroporation von *Lucifer Yellow* in Lymphozyten konnten Dinchuk et al. (1992) nachweisen, dass Lymphozyten Transporter für organische Anionen besitzen, die denen von polarisierten, epithelialen Zellen und Makrophagen ähnlich sind.

Gehl et al. (1998) und Jaroszeski et al. (2000) beschreiben die Elektroporation von Zellen als eine sehr effiziente Methode, um die Zytotoxizität von Medikamenten (insbesondere Chemotherapeutika)

zu überprüfen, bevor diese in Tierversuchen und in den klinischen Erprobungsphasen I und II eingesetzt werden.

Glogauer und McCulloch (1992) haben verschiedene funktionelle Proteine (Anti-Vimentin-Antikörper und RNase A) in humane Fibroblasten elektroporiert und konnten zeigen, dass diese Proteine mit dem Zytoskelett bzw. der zellulären RNA interagieren. Verspohl et al. (1997) konnten ebenfalls verschiedene Antikörper per Elektroporation in lebende Zellen einbringen. Hierdurch wird wiederum deutlich, dass die Elektroporation eine spezifische Manipulation und Beobachtung intrazellulärer Mechanismen ermöglicht.

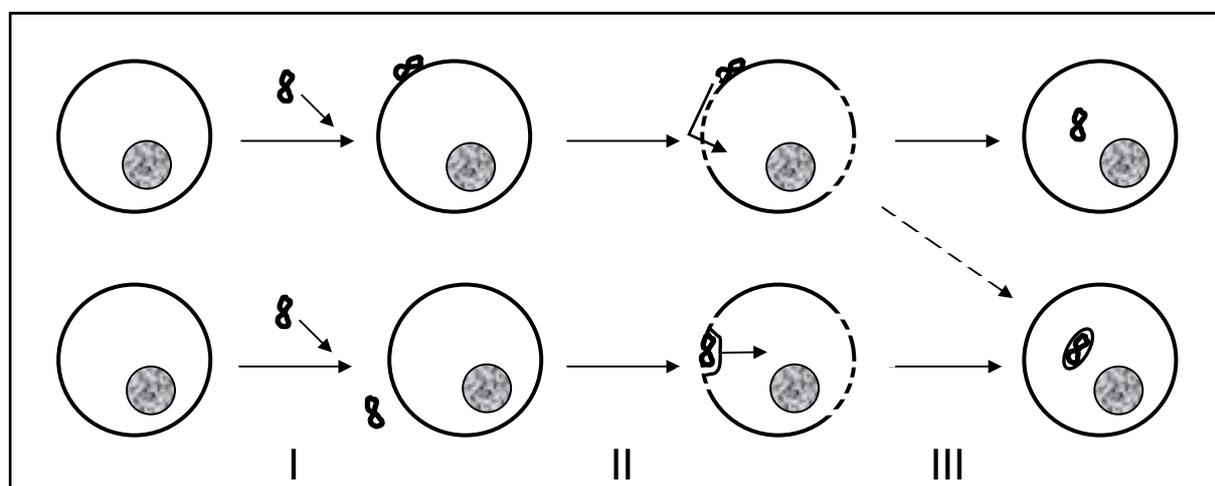
Spiller et al. (1998) beschreiben die Elektroporation als überlegene Technik zum Eintrag von Antisense-Oligonukleotiden in lebende Zellen. Der Eintrag von Antisense-Oligonukleotiden durch Transfektion mit Lipofectin oder durch Permeabilisierung mit Streptolysin-O ist nicht annähernd so effektiv wie durch Elektroporation.

Am häufigsten wird jedoch die Elektroporation von eukaryotischen Zellen genutzt, um einen Gentransfer mit dem Ziel der rekombinanten Expression in diese Zellen zu ermöglichen.

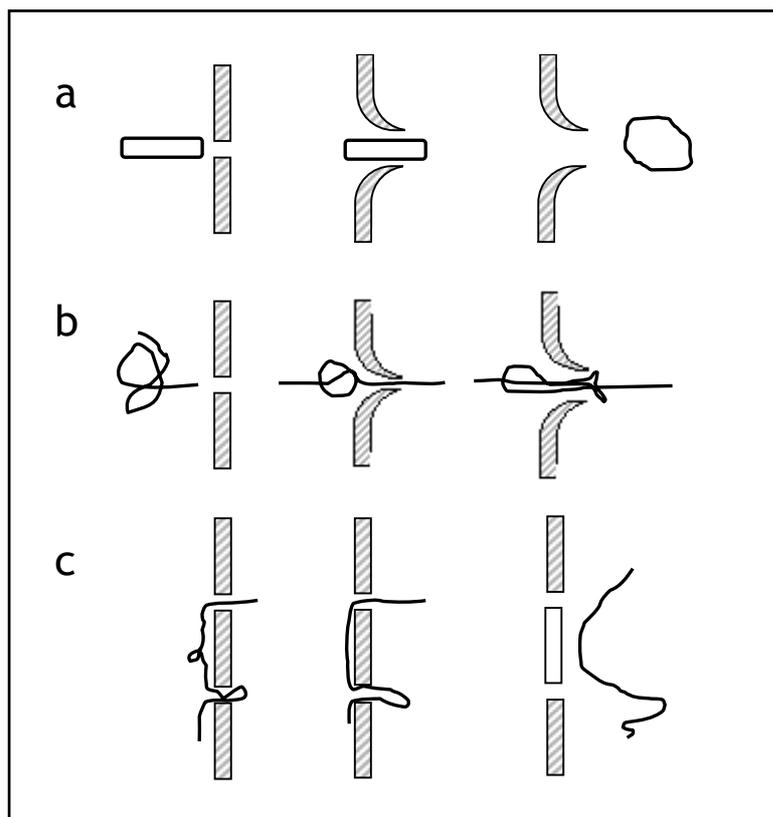
### ***Transfektion von eukaryotischen Zellen durch Elektroporation in Suspension***

Neumann et al. konnten 1982 erstmals ein Gen für die Thymidin-Kinase (TK) per Elektroporation in TK-defiziente Lyoma-Zellen aus Maus einbringen. Zwei Wochen nach der Elektroporation zeigten jedoch nur  $0.1\%$  der Zellen eine Expression der TK. Die Elektrotransfektion in Suspension entwickelte sich seitdem immer mehr zur Standardtechnik für die Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen. In den allermeisten Fällen wird dazu Plasmid-DNA eingesetzt (pDNA). Diese DNA hat ein sehr hohes Molekulargewicht (Ein 4 kb langes DNA-Fragment hat ein Molekulargewicht von ca. 2.4 MDa und einen Radius von 90 - 130 nm (Sebestyén et al., 1998)) und bis heute ist nicht bekannt, wie Moleküle dieser Größe durch Elektroporen in die Zelle gelangen. Xie et al. (1990) favorisieren ein Modell, in dem die DNA vor dem elektrischen Puls mit der Zellmembran interagiert und danach durch die Elektroporen in die Zelle diffundiert (Abb. 1.4 oberer Teil). Chernomordik et al. (1990) vermuten, dass elektrophoretische Kräfte des externen elektrischen Feldes für den Eintrag von DNA in die Zelle verantwortlich sind (Abb. 1.4 unterer Teil). Dabei wird die DNA durch Teile der Zellmembran in Vesikeln aufgenommen. Golzio et al. (1998) hingegen vermuten, dass es sich bei der Elektrotransfektion von DNA um einen sehr komplexen Prozess handelt, dessen Mechanismus aus einer Mischung der beiden genannten Modelle besteht. Sukharev et al. (1992) bevorzugen ebenfalls das Modell des elektrophoretischen Eintrags in das Zytoplasma der Zelle. Dabei gehen sie jedoch nicht davon aus, dass die eingetragene DNA von Vesikeln umschlossen wird. Sukharev et al. (1992) beschreiben drei verschiedene Möglichkeiten, wie die DNA mittels elektrophoretischer Kräfte durch die Elektroporen in das Innere der Zelle gelangen kann (Abb. 1.5). Zunächst gehen sie davon aus, dass Elektroporen einen Durchmesser von 1-10 nm haben, gewonnen aus den experimentellen Daten von Kinoshita und Tsong (1977) und Sowers und Lieber (1986). Nach Messungen von Houseal et al. (1989) beträgt der Durchmesser eines statistisch geknäulten 150 kb großen DNA-Moleküls 2000 nm. Sukharev et al. (1992) gehen nun davon aus, dass ein DNA-Molekül sehr flexibel ist und sich im elektrischen Feld während der Elektroporation in seiner Orientierung und seiner räumlichen Gestalt stark ändern kann. Dadurch ist es möglich, dass

ein Teil der DNA mit einer Elektropore interagiert und durch die elektrophoretische Kraft diese Pore aufweitet, so dass das gesamte DNA-Molekül in die Zelle dringen kann. Die DNA kann dabei durch eine einzige Elektropore als kompaktes Molekül in die Zelle gelangen (Abb. 1.5.a). Bei sehr kleinen Elektroporen könnte ein Ende eines linearisierten DNA-Moleküls mit der Pore interagieren und dann durch Elektrophorese in die Zelle gezogen werden (Abb. 1.5.b). Denkbar wäre nach Sukharev et al. (1992) aber auch, dass ein DNA-Molekül mit zwei Elektroporen interagiert und während der Elektrophorese einen Teil der Membran zwischen diesen Poren aus der gesamten Zellmembran ausschneidet (Abb. 1.5.c). Golzio et al. (2002) und Faurie et al. (2003) konnten durch Elektroporation mit fluoreszenzmarkierter DNA die Vermutung stützen, dass elektrophoretische Kräfte zum erfolgreichen Eintrag der DNA notwendig sind. Sie konnten beobachten, dass sich die negativ geladene DNA durch Elektrophorese zu der in Richtung der Kathode weisenden Seite der Zellmembran bewegt. Dort interagiert die DNA unter Bildung von Clustern mit der Membran. Nach dem elektrischen Puls erfolgt dann die allmähliche Einwanderung der DNA in das Zytoplasma.



**Abb. 1.4:** Zwei Modelle zur Elektrotransfektion von Zellen mit Plasmid-DNA (pDNA): Im oberen Teil bindet die Plasmid-DNA (pDNA) an die Zelloberfläche (Schritt I). Während und kurz nach der Elektroporation (Schritt II) diffundiert die pDNA durch die Elektroporen in das Zytoplasma der Zelle. Im unteren Teil wird die in näherer Umgebung befindliche pDNA (Schritt I) durch elektrophoretische Kräfte des angelegten elektrischen Feldes (Schritt II) in das Zytoplasma der Zelle eingetragen. Dabei wird die pDNA von Teilen der Zellmembran zum einem Vesikel umschlossen. Auch im oberen Teil ist es in Schritt II möglich, dass die oberflächlich gebundene pDNA durch endocytose-ähnliche Mechanismen in die Zelle gelangt. In diesem Fall wäre die DNA ebenfalls im Zytoplasma von einem Vesikel umschlossen. Schritt III stellt den Prozess des *Resealings* dar.



**Abb. 1.5:** Mögliche Interaktion der DNA mit der Zellmembran während der Elektroporation nach Sukharev et al. (1992): (a) Ein kompaktes DNA-Molekül gelangt durch Elektrophorese durch eine Elektropore und erweitert dabei den Durchmesser dieser Pore. (b) Ein Teil der linearisierten pDNA interagiert mit der Elektropore und per Elektrophorese gelangt das gesamte Molekül unter leichter Aufweitung der Pore ins Zellinnere. (c) Ein DNA-Molekül steht in Wechselwirkung mit zwei Elektroporen (oder mehreren) und während der Elektrophorese schneidet es den Membranteil zwischen den Poren aus der Zellmembran heraus (dargestellt durch den weißen Block).

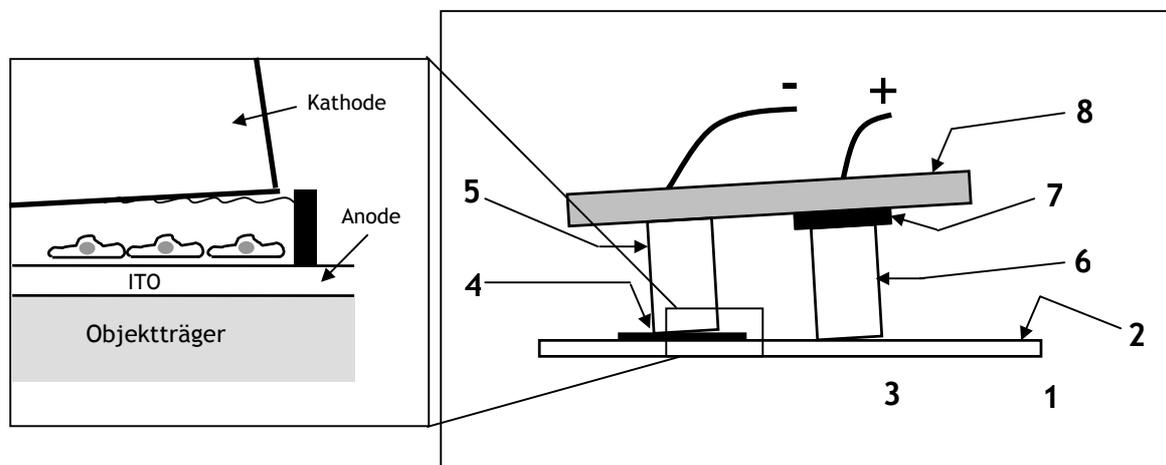
Die in das Zytoplasma der Zelle eingetragene pDNA muss nun in den Zellkern gelangen, um transkribiert zu werden. Dies geschieht in den darauffolgenden Mitosezyklen, wenn die Zellen nach der Elektroporation wieder in den normalen Kulturverlauf aufgenommen werden. Dabei ist die Effektivität des Gentransfers wie bei anderen Transfektionsmethoden, umso höher, je mehr Zellen sich zum Zeitpunkt der Elektroporation in der Proliferationsphase befinden (Colosimo et al., 2000). Je nach weiterer Behandlung der Zellen ist es so möglich transient und stabil transfizierte Zellen zu erhalten.

### ***Elektroporation und Transfektion adhärenter eukaryotischer Zellen in situ***

Um adhärenente eukaryotische Zellen in Suspension elektroporieren zu können, müssen sie zuvor von ihrem Substrat abgelöst werden. Diese Ablösung erfolgt mit Trypsin und/oder EDTA-Lösungen und führt zu unerwünschten physiologischen Effekten (Störung des Zellzyklus sowie Änderung des metabolischen Status' der Zellen (Vasiliev, 1985)), sowie zu einer Herabsetzung der Überlebensrate nach der Elektroporation.

Seit Anfang der 90er Jahre beschäftigen sich mehrere Arbeitsgruppen mit der *in situ*-Elektroporation adhärenter Zellen. Die erste Veröffentlichung zu diesem Thema kam 1990 von Raptis und Firth. Die beiden kultivierten dazu F111-Zellen (Fibroblasten aus Ratte) auf einem mit Indium-Zinn-Oxid (engl. *Indium-Tin-Oxide*, ITO) beschichteten Objektträger. ITO ist ein elektrisch leitfähiges und gleichzeitig optisch transparentes Mischoxid, das hervorragend als funktionelles Wachstumssubstrat für kultivierte Zellen geeignet ist, da sowohl elektrische als auch optische

Untersuchungen *in situ* durchgeführt werden können. Zur Permeabilisierung der Zellen wurden dann eine positive Elektrode mit der ITO-beschichteten Glasfläche und die negative Elektrode mit dem Kulturmedium kontaktiert, so dass ein exponentiell abfallender elektrischer Puls appliziert werden kann (Abb. 1.6).



**Abb. 1.6:** Elektroporationsaufbau nach Raptis et al. (1995): Die ITO-Beschichtung (2) auf der Oberfläche eines Objektträgers aus Glas (1) stellt eine leitende Verbindung zwischen der positiven (6) und der negativen (5) Elektrode her. Ein isolierender Rahmen (3) begrenzt die Zellwachstumsfläche und dient als Stütze für die Kathode (4). Während der Elektroporation fließt der Strom von der Anode über die ITO-Schicht, durch die Zellen und das Elektroporationsmedium zur Kathode. Eine Unterlegscheibe (7) am oberen Ende der Anode ermöglicht das Einstellen eines Winkels. Der Träger aus Plexiglas (8) fixiert die Apparatur.

Raptis und Firth (1990) konnte mit dieser Elektroporationstechnik sowohl Antikörper als auch pDNA in das Zytoplasma von F111-Zellen einbringen. Zur Untersuchung der Expression der elektroporierten pDNA wurden die Zellen fünf Stunden nach der Elektroporation im Verhältnis 1:10 auf gewöhnliche Petrischalen subkultiviert. Auf diese Weise konnte die pDNA während der Mitose in den Zellkern gelangen und exprimiert werden. 1994 verwendeten Raptis et al. die gleiche Technik, um den Farbstoff *Lucifer Yellow* in NIH 3T3-Fibroblasten zu elektroporieren. Dazu wurden Objektträger benutzt, die zur Hälfte mit ITO beschichtet waren. Nach der Elektroporation konnte auf diese Weise die Wanderung des Farbstoffes durch Membrankanäle zwischen den Zellen (*gap junctions*) in nicht-elektroporierte Zellen fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden. 1995 konnten Raptis et al. den Eintrag von Peptiden in das Zytoplasma adhärenter Zellen durch *in situ*-Elektroporation zeigen.

Zeng und Chang (1991) führten ebenfalls *in situ*-Elektroporationen an adhärenter Zellen durch. Sie konnten pDNA mit dem Gen für  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -gal) in 80 % der elektroporierten Zellen zur Expression bringen, bei einer Überlebensrate von 50 %. Die Zellen hatten bei diesen Experimenten noch keine Konfluenz erreicht. Die Transfektionseffizienz bei der Elektroporation der gleichen Zellen in Suspension geben Zeng und Chang (1991) in diesem Fall mit 20 % an.

Bei anderen Methoden wurden die Zellen zur Elektroporation auf mikroporösen Membranen oder auf Objektträgern mit Polyethylenterephthalat-Beschichtung kultiviert (Yang et al., 1995). Müller et al.

(2003) elektroporierten adhärenente und konfluente Zellen, die auf mikroporösen Filtereinsätzen kultiviert wurden, wie sie üblicherweise in der Zellkultur verwendet werden. Die Transfektions-effizienz für die Elektroporation konfluente Zellen mit *Exponential-decay*-Pulsen einer Feldstärke von 3 kV/cm geben Müller et al. (2003) mit 47 % an.

Das Verfahren der *in situ*-Elektroporation adhärenter Zellen lässt sich ebenso auf Goldfilmelektroden übertragen (Gosh et al., 1994). In der vorliegenden Arbeit werden ebenfalls Goldfilmelektroden zur *in situ*-Elektroporation adhärenter Zellen verwendet. Der große Vorteil dieser Technik besteht darin, dass Arbeitselektroden mit sehr kleinen Flächen ( $5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$ ) verwendet werden können, wodurch die applizierte Spannung zum überwiegenden Teil nur über den auf den Elektroden befindlichen Zellmonoschichten abfällt. Spannungen in der Größenordnung von 2 bis 5 V sind unter diesen Bedingungen ausreichend, um das zur Permeabilisierung benötigte elektrische Feld über der Membran zu generieren. Aus diesen Gründen kann die Elektroporation in herkömmlichen Zell-Kulturmedien mit physiologischer Salzkomposition und bei 37 °C durchgeführt werden, da durch diese Methode auch eine starke Aufwärmung des Mediums verhindert wird. Ein weiterer Vorteil dieser Technik ist die Möglichkeit, den morphologischen Zustand der Zellschicht sowie die Zellbewegungen vor und nach der Elektroporation durch nicht-invasive Impedanzmessungen (engl. *electric cell-substrate impedance sensing*, ECIS) zu analysieren. Das ECIS-Verfahren wurde 1984 von Giaever und Keese zum ersten Mal beschrieben. (Giaever und Keese, 1984; 1991; 1993). Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Bestimmung des Wechselstromwiderstandes der zu untersuchenden Zellschicht als Funktion der Frequenz des Erregersignals. Als Erregersignal dient eine sinusförmige Wechselspannung von wenigen mV. Gosh et al. (1993) kombinierte die ECIS-Technik mit der Elektroporation, um die Auswirkung des elektrischen Pulses auf die adhärenenten und konfluente Zellen zu beobachten. Dabei wurden Fibroblasten mit Amplituden von  $A = 1-5 \text{ V}$ , bei einer Frequenz von  $f = 4 \text{ kHz}$  und einer Pulsdauer von  $\tau = 200 \text{ ms}$  elektroporiert und die Erholung der Zellen durch Messung der Impedanz bei einer Frequenz von 4 kHz beobachtet. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich der Membranwiderstand der Zellschicht direkt nach dem Puls stark verringert, jedoch bereits 2.5 Sekunden nach dem Puls den Ausgangswert wieder erreicht.

Die ECIS-Technik wurde bisher eingesetzt, um z.B. die morphologischen Änderungen von Endothelzellen aus kapillaren Pulmonargefäßen unter dem Einfluss von  $\alpha$ -Thrombin zeitaufgelöst zu untersuchen (Tiruppathi et al., 1992). Moy et al. (1996) haben ECIS-Messungen eingesetzt, um den Einfluss von Änderungen der isometrischen Spannung humaner Nabelschnur-Endothelien (HUVEC) unter Histamin-Gabe auf die Zell-Substrat-Kontakte dieser Zellen zu quantifizieren. Reddy et al. (1998) konnten schnelle Änderungen der Zellform humaner Augenhöhlenfibroblasten unter Einsatz von Prostaglandin E durch ECIS-Messungen studieren. Arndt et al. (2004) konnten mittels ECIS die zeitliche Änderung in der Zellform von porcinen kapillären Hirnendothelzellen aus Schwein während apoptotischer Prozesse beobachten.

Die Sensitivität, mit der sich Änderungen der Zellmorphologie feststellen lassen, sowie die enorme zeitliche Auflösung machen ECIS zu einer vielseitig genutzten Technik bei verschiedensten Problemen, in denen Zell-Zell- oder Zell-Substrat-Kontakte und ihre Modulation eine Rolle spielen. Aus diesem Grunde wurde auch in der vorliegenden Arbeit die Elektroporation mit ECIS kombiniert.

Ein wichtiger aber dennoch häufig vernachlässigter Aspekt der Transfektion ist, dass die DNA zur Expression des Fremd-Gens in den Nukleus gelangen muss (Vacik *et al.*, 1999). Die meisten Transfektionsmethoden schleusen die DNA nur in das Zytoplasma. Handelt es sich dabei um „nackte“ DNA, kann das betreffende Gen nur durch Zellteilung in den Zellkern gelangen, wie es z.B. bei der Elektroporation von Zellen in Suspension der Fall ist. Für Zellen, die sich nicht mehr teilen (z.B. konfluente Zellen) müssen somit andere Lösungswege gefunden werden (siehe Kap. 1.2.3).

### 1.1.2.2 *In vivo*-Elektroporation

Die *in vivo*-Elektroporation wurde bisher an verschiedenen Tierarten entweder mit Platten- oder Nadelelektroden durchgeführt. In Leber (Heller *et al.*, 1996; Ramirez *et al.*, 1998), Harnblase (Kubota *et al.*, 1996), Gehirn (Salford *et al.*, 1993; Nishi *et al.*, 1996), Muskel (Gehl *et al.*, 1999; Mir *et al.*, 1999) und Haut (Prausnitz *et al.*, 1995; Dujardin *et al.*, 2001) konnte der erfolgreiche *in vivo*-Transfer von Medikamenten und Genen gezeigt werden.

Der *in vivo*-Gentransfer durch Elektroporation ist deshalb sehr interessant, weil zur Transfektion keine zusätzlichen Substanzen benötigt werden wie z.B. virale Vektoren. Diese bergen das Risiko von Immunreaktionen im elektroporierten Gewebe. Außerdem gilt der *in vivo*-Gentransfer als höchst effizient (Gehl *et al.*, 2003). In Muskelgeweben führt der Elektrogentransfer nicht nur zu einer transienten Transfektion, sondern es wurde dabei auch eine permanente Langzeit-Expression des betreffenden Gens beobachtet (Mir *et al.*, 1999). Der Bereich, in dem der Gentransfer stattfinden soll, ist durch die Elektroden klar begrenzt. Es ist daher möglich, einzelne Organe oder Gewebe zu elektroporieren, während umliegende Gewebe oder angrenzende Organe von dem elektrischen Feld vollkommen unberührt bleiben.

### 1.1.2.3 Klinischer Nutzen der Elektroporation in der Krebsbehandlung

Nachdem 1993 zum ersten Mal eine klinische Studie zur Elektroporation von Belehradec *et al.* veröffentlicht wurde, beschäftigen sich immer mehr Wissenschaftler mit dem Nutzen der Elektroporation in der Chemotherapie von Krebspatienten. Bei den meisten Chemotherapeutika handelt es sich um lipophile Substanzen, die eine Permeabilisierung der Zellmembran nicht erforderlich machen (Gehl *et al.*, 1998; Jaroszeski *et al.*, 2000). Zwei hydrophile Substanzen werden in der klinischen Behandlung von Krebs jedoch immer wieder verwendet: Bleomycin und cis-Platin. Bleomycin ist ein geladenes Molekül, das unter normalen Umständen nur in sehr geringen Mengen vom Gewebe aufgenommen wird (Mir *et al.*, 1996). Dennoch ist Bleomycin ein sehr cytotoxisches Medikament: Jedes einzelne Molekül verursacht in der DNA mehrere Doppelstrangbrüche (Tounekti *et al.* 1993). Durch die Elektroporation kann Bleomycin direkt in das Zytoplasma der Krebszellen eingetragen werden, was eine Steigerung seiner Cytotoxizität um das 300 - 5000fache bewirkt (Orlowski *et al.*, 1988; Gehl *et al.*, 1998; Jaroszeski *et al.*, 2000). Im Fall von cis-Platin wird die

Cytotoxizität durch Elektroporation um das 2 - 13fache gesteigert (Sersa et al., 1995; Gehl et al., 1998; Jaroszeski et al., 2000). Viele verschiedene Krebsarten wurden bereits mit der Elektrochemotherapie behandelt: Basalzellkarzinome (Glass et al., 1997), maligne Melanome (Heller et al, 1998; Gehl und Geertsen, 2000; Sersa et al., 2000), Adenokarzinome (Mir et al., 1998), Plattenepithelzellkarzinome (Belehradek et al., 1993) und Nierenzellkarzinome (Sersa et al., 2000). In allen diesen histologisch verschiedenen Krebsarten hat sich die Elektrochemotherapie als eine höchst effektive Methode zur Krebsbehandlung herausgestellt. So konnten Heller et al. (1998) in einer Studie über verschiedene Tumore der Haut zeigen, dass in 90 % der Fälle die einmalige Anwendung der Elektrochemotherapie ausreicht, um den Tumor komplett zu eliminieren.

Der große Vorteil der Elektrochemotherapie gegenüber der konventionellen Chemotherapie liegt in der lokal begrenzten Wirkung des Chemotherapeutikums. Dadurch können die Nebenwirkungen dieser Medikamente drastisch gesenkt werden. So berichten Gehl et al. (2003) nur von einer Hauptnebenwirkung bei der Elektrochemotherapie: Es kann zu leichten Kontraktionen der bei der Elektroporation unterliegenden Muskulatur kommen. Verglichen mit den allgemein bekannten Nebenwirkungen der konventionellen Chemotherapie wie z.B. Haarausfall, Erbrechen und Zerstörung gesunden Gewebes eröffnet die Elektrochemotherapie sehr viel schonendere Behandlungsmöglichkeiten bei Krebserkrankungen.

## 1.2 Transfektionsmethoden

Der Eintrag von Fremd-Genen in eukaryotische Zellen, insbesondere in Säugetierzellen, bildet die Grundlage sowohl zum Verständnis der Funktionalität von Genprodukten einschließlich der regulatorischen Sequenzen als auch zur Entwicklung von Strategien zur Genterapie. Aus diesem Grund wurden in den letzten zwei Jahrzehnten viele verschiedene Vektorsysteme zur Expression in eukaryotischen Zellen entwickelt. Die Wahl des Vektorsystems hängt vom jeweiligen Zelltyp und dem Ziel der Untersuchungen ab und beinhaltet die Wahl zwischen verschiedenen Promotor/Enhancer-Sequenzen unter Berücksichtigung der Art der Expression (transient oder stabil) und dem Expressionsgrad, der erreicht werden soll. Der Erfolg einer Transfektion hängt zusätzlich von der Aufreinigung des Expressionsvektor und insbesondere von der angewendeten Transfektionsmethode ab. Wie schon zu Beginn der Einleitung beschrieben, gibt es viele verschiedene Methoden, um einen Gentransfer in Zellen zu ermöglichen. Die Transfektionseffizienz für „nackte“ pDNA ist jedoch äußerst gering, so dass Hilfsmittel notwendig sind, die zu einem Eintritt in das Zytoplasma und weiter in den Nukleus der Zelle verhelfen. Solche Hilfsmittel können entweder biologischer (virale Transfektionsmethoden), biochemischer (Kalzium-Phosphat-präzipitation, kationische Polymere, Liposomen u.ä.) oder physikalischer (Elektroporation, Mikroinjektion, Biolistik, Magnetofektion) Natur sein. Die Elektroporation wurde in diesem Kontext bereits intensiv dargestellt. Es werden daher in diesem Kapitel weitere Methoden auf diesem Gebiet beschrieben, einschließlich der Vorteile und Problematiken, die sich bei Anwendung der Techniken ergeben.

## 1.2.1 Biologische Methoden

### 1.2.1.1 Retroviren

Bei Retroviren enthält das einzelne Viruspartikel zwei Kopien des einzelsträngigen RNA-Genoms, welches nach Infektion einer Zelle in eine komplementäre doppelsträngige DNA umgeschrieben wird und dann in das Genom der Zielzelle integriert. Im Viruspartikel mitenthalten sind die Reverse Transkriptase, welche die Umwandlung der viralen RNA in DNA katalysiert, und die Integrase, die eine ortsunspezifische Integration der viralen DNA in die chromosomale DNA vermittelt.

Retrovirale Vektoren werden im Allgemeinen so hergestellt, dass essentielle Bestandteile des viralen Genoms durch therapeutische Sequenzen oder Reportergene ersetzt werden, da Retroviren nicht in der Lage sind, zusätzliche genetische Information zu tragen. Dies liegt daran, dass virale RNA, die länger als das übliche Genom ist, nicht effizient in Viruspartikel verpackt werden kann. Die dadurch fehlenden viralen Proteine können *in trans* von sogenannten Verpackungszelllinien produziert werden.

Die ersten retroviralen Vektorsysteme basierten auf dem Maus-Leukämie-Virus (Übersicht: McLachlin et al., 1990) oder auf dem Milz-Nekrose-Virus (Günzburg und Salmons, 1997). Nachteile des retroviralen Gentransfers sind die Beschränkung auf proliferierende Zielzellen und die Limitierung der Einbringung von Fremdsequenzen auf eine Größe von max. 7 - 7.5 kb. Am häufigsten werden retrovirale Vektoren zur *ex vivo* Gentherapie eingesetzt (Günzburg und Salmons, 1997).

### 1.2.1.2 Adenoviren

Die Mastadenoviren, welche Säugetiere infizieren können, und die Aviadenoviren, die in verschiedenen Vogelarten nachgewiesen werden konnten, werden zu den Adenoviren zusammengefasst. Ein Adenovirus hat typischerweise einen Durchmesser von 60 - 90 nm und eine ikosaedrische Hülle, aus der Fiberproteine herausragen. Das Genom besteht aus einer linearen doppelsträngigen DNA von ca. 36 kb Länge. Ebenso wie bei der Herstellung retroviraler Vektoren (siehe 1.2.1.1) wird auch bei der Darstellung adenoviraler Vektoren ein Teil des viralen Genoms durch Fremdgene ersetzt. Ein Vorteil dabei ist, dass aufgrund der Größe des viralen Genoms sehr viel längere Fremdsequenzen eingebracht werden können als bei Verwendung von Retroviren. Zudem haben Adenoviren ein sehr breites Wirtsspektrum. Sie können sowohl mitotische, ruhende als auch bereits ausdifferenzierte Zellen befallen (Günzburg und Salmons, 1997). Am meisten Verwendung finden adenovirale Vektoren in der *ex/in vivo* Gentherapie. Seit längerer Zeit werden abgeschwächte Adenoviren als Impfstoffe oral verabreicht, um vor allem Atemwegsinfektionen zu bekämpfen (Top et al. 1971).

## 1.2.2 Biochemische Methoden

### 1.2.2.1 Präzipitation mit $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

Die Co-Präzipitation von DNA mit  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  hat bisher bei vielen verschiedenen Säugetierzellen zur erfolgreichen Transfektion geführt (Gruenert et al., 1988; Cozens et al., 1992). Die Transfektionseffizienz dieser Methode wird mit 1<sup>0</sup>/<sub>00</sub> bis 1 % angegeben (Colosimo et al., 2000). Es gibt einige Variationen dieser Technik, da verschiedene Pufferlösungen verwendet werden können. Eine Möglichkeit ist der Gebrauch von HEPES-Puffer (z.B. Cozens et al., 1992), aber auch Lösungen mit *N,N*-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure (BES) wurden verwendet (Colosima et al., 2000). Bei einigen Zelltypen kann die  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Präzipitation zur Lyse der Zellen führen. Eine Alternative bietet in diesem Fall die Präzipitation mit Strontiumphosphat ( $\text{Sr}_3(\text{PO}_4)_2$ ) (Brash et al., 1987). Der pH-Wert des phosphathaltigen Puffers ist bei der Optimierung dieser Transfektionstechnik ein nicht zu vernachlässigender Parameter. Für die HEPES-Methode ist ein pH von 7.1, für die BES-Methode ein pH von 6.95 optimal zur Transfektion mit  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Für  $\text{Sr}_3(\text{PO}_4)_2$  ermöglicht ein pH-Wert von 7.6 - 7.9 beste Effizienzen (Colosimo et al., 2000).

Die Zellen werden zur Transfektion mit dem Präzipitat versetzt und bei 37 °C, 5 Vol.-%  $\text{CO}_2$  und wasserdampfgesättigter Atmosphäre unter Bedingungen inkubiert, welche die Pinocytose der Zellen fördern. Dazu werden Substanzen wie Glycerol (Wilson und Smith, 1997) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) (Lopata et al., 1984) zugesetzt. Der Nachteil dieser Chemikalien ist jedoch ihre Zytotoxizität. Die Transfektionsbedingungen, wie die Konzentration dieser Substanzen und die Inkubationsdauer, müssen für jeden Zelltyp individuell optimiert werden, um eine Schädigung der Zellen so gering wie möglich zu halten. Nach der Inkubationszeit muss das DNA/ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Präzipitat entfernt werden. Geschieht diese nicht, so werden die Zellen so stark geschädigt, dass die Proliferation gestoppt wird und/oder die Zellen lysieren (Colosima et al., 2000).

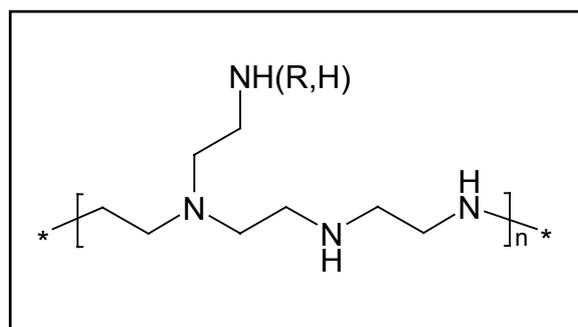
### 1.2.2.2 Kationische Polymere

Als erstes kationisches Polymer wurde DEAE-Dextran (Diethylaminoethyl-Dextran) zur Transfektion von eukaryotischen Zellen eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Reagenz den Eintritt von Nukleinsäuren in die Zellen ermöglicht und zu einer transienten Expression führt. Für stabile Transfektionen ist es jedoch nicht geeignet (Colosimo et al., 2000). Diese Methode hat ebenso wie die  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Präzipitation den Nachteil, dass die eingesetzte Substanz zytotoxisch ist. Es wurden daher weitere synthetische kationische Polymere zur Transfektion von Säugetierzellen verwendet, wie z.B. Protamin, Polyamidoamin-Dendrimere (Kukowska-Latallo et al., 1996; Tang et al., 1996) und in neuerer Zeit auch Polyethylenimin (PEI) (Boussif et al., 1995; Baker et al., 1997) und Poly-L-Lysin (Liu et al., 2001).

Verschiedene Studien haben sich bisher mit der *in vitro*-Transfektion mit Poly-L-Lysin-DNA-Komplexen (z.B. Liu et al., 2001) befasst. Ein großer Vorteil von Poly-L-Lysin wie auch von PEI ist

die starke Kondensierung der Nukleinsäure bei Ausbildung des Komplexes. Diese resultierenden DNA/Poly-L-Lysin-Komplexe sind kugelförmig mit einem Durchmesser von 15 - 30 nm (Liu et al., 2001). Dies erleichtert möglicherweise den DNA-Transfer in den Nukleus. Die Kondensierung setzt außerdem die Möglichkeit eines enzymatischen Abbaus der DNA (beispielsweise durch DNase I) stark herab (Liu et al., 2001), was die Stabilität der fremden DNA im Zytoplasma erhöhen kann.

PEI ist ebenfalls ein organisches Makromolekül mit einer sehr hohen positiven Oberflächenladungsdichte bei geeignetem pH-Wert. Bei jedem vierten Atom von PEI handelt es sich um ein Stickstoffatom einer Aminogruppe, welches protoniert werden kann (Abb. 1.7).



**Abb. 1.7:** Schematische Strukturformel der Wiederholungseinheiten von Polyethylenimin (PEI) mit Verzweigungen, teilweise Vernetzungen, die statistisch verteilt sind. Prim. : sek. : tert. Amin = 1 : 2 : 1

PEI und DNA bilden durch elektrostatische Wechselwirkung kondensierte komplexe Aggregate, welche bei einem optimalen Verhältniss der beiden Komponenten eine leicht positive Nettoladung aufweisen. Dies führt zu einer erleichterten endocytotischen Aufnahme in die Zelle, da die positiv geladenen Komplexe mit der negativ geladenen Zellmembran interagieren können und es wird vermutet, dass diese Aggregate die DNA vor einer Zerstörung durch Nukleasen schützen und somit zu einer erhöhten Transfektionseffizienz beitragen (Boussif et al., 1995). Ein weiterer Vorteil von PEI gegenüber anderen Transfektionsreagenzien ist seine äußerst geringe Zytotoxizität, wenn es in Form von DNA/PEI-Komplexen vorliegt (Godbey et al., 1999). Die Transfektionseffizienz von PEI ist außerdem  $10^4$ -fach höher als die Effizienz bei Transfektion mit Poly-L-Lysin (Boussif et al., 1995). Für die Transfektion mit PEI werden variierend mit dem Zelltyp Effizienzen von 20 - 60 % angegeben (Pollard et al., 1998). Die Größe der PEI/DNA-Komplexe werden in der Literatur mit 20 - 40 nm (Dunlap et al., 1997), 40 - 60 nm (Tang und Szoka., 1997) und 50 - 80 nm (Ogris et al., 1998) angegeben, abhängig von der DNA- und Salzkonzentration bei der Herstellung der Aggregate. Die Größe der Komplexe hat möglicherweise entscheidenden Einfluss auf die Transfektionseffizienz. Mit kleineren Partikeln wurde eine geringere Effizienz erreicht (Kircheis et al., 2001). Es wird vermutet, dass dies sowohl durch eine geringere Sedimentationsgeschwindigkeit der kleineren Partikel, als auch durch eine weniger effiziente Freisetzung der DNA/PEI-Komplexe aus den Endosomen bedingt ist.

### 1.2.2.3 Liposomen

Der Eintrag von Nukleinsäuren in Zellen kann ebenso durch Aggregatbildung mit Liposomen erfolgen. Es handelt sich dabei um artifizielle Lipidvesikel, die entweder mit der Zellmembran fusionieren und ihren Inhalt direkt in das Zytoplasma abgeben (Matsui et al., 1997), oder aber auf endocytotischen Wegen in die Zelle gelangen (Friend et al., 1996). Seit der ersten Verwendung von Lipiden zu Transfektionszwecken wurden mehrere Hundert verschiedene kationische Lipide entwickelt, deren Transfektionseffizienzen über einen sehr großen Bereich streuen (Colosimo et al., 2000). Der Liposomen-vermittelte Gentransfer hat den Vorteil, dass nicht nur DNA (Lee und Huang, 1997), sondern auch RNA (Malone et al., 1989) und Proteine (Colosimo et al., 2000) in das Zytoplasma von Zellen eingebracht werden kann. Ein großer Nachteil dieser Methode ist wiederum die Zytotoxizität der Transfektionsreagenzien. Studien mit verschiedenen kationischen Lipiden zeigen, dass die Transfektionseffizienz nicht immer proportional zur Menge der in die Zelle eingetragenen DNA ist. Dies lässt vermuten, dass die zelluläre Aufnahme der Lipid-DNA-Komplexe nicht den entscheidenden Schritt bei der Transfektion darstellt. Die meisten Zellen nehmen kationische Lipid-DNA-Komplexe auf, aber nur ein kleiner Teil exprimiert das betreffende Gen. Colosimo et al. (2000) vermuten, dass kationische Lipide weniger gut geeignet sind, um den Transfer der DNA aus dem Zytoplasma in den Zellkern zu ermöglichen. Dieser Transfer ist jedoch nach erfolgtem Eintrag der DNA in das Zytoplasma bei allen Transfektionsmethoden der entscheidende Schritt, da die Transkription ausschließlich im Nukleus erfolgen kann.

### 1.2.3 Physikalische Methoden

#### 1.2.3.1 Biolistik

Seit Beginn der 90er Jahre hat sich die Technik des biolistischen Partikelbeschusses (oder auch *gene gun* genannt) als neue physikalische Methode zur Transfektion von Zellen etabliert (Klein und Fitzpatrick-McElligott, 1993). In viele verschiedene Zell- und Gewebetypen konnte DNA per Biolistik bisher erfolgreich eingetragen werden. So z.B. in Haut-, Hirn- und Lebergewebe, aber auch in verschiedene epitheliale und endotheliale Zellkulturlinien (Colosimo et al., 2000). Zum Eintrag von DNA in Zellen werden kleine Metallpartikel hoher Dichte mit der gewünschten DNA beschichtet und dann per *gene gun* in die Zellen „geschossen“. (Zur detaillierten Beschreibung dieser Technik siehe Yang et al., 1990; Takagi und Kimura, 1997). Favorisiert werden hierbei Goldpartikel aufgrund ihrer Kugelform, ihrer einheitlichen Größe und wegen ihrer chemischen Inertheit. Ein großer Vorteil der Biolistik ist die geringe Schädigung der Zellen sowie die Möglichkeit, dass die DNA durch den Beschuss auch zufällig in den Zellkern gelangen kann. Außerdem werden nur sehr geringe Mengen an DNA benötigt und es ist möglich, sowohl transiente als auch stabile Transfektionen durchzuführen. Einen erheblichen Nachteil stellen die hohen Kosten für die technische Ausrüstung und die Goldpartikel dar.

### 1.2.3.2 Mikroinjektion

Eine weitere Möglichkeit zur Transfektion von Zellen ist die Mikroinjektion. Sie wurde bisher zum Gentransfer in Oocyten, Fibroblasten und epitheliale Zellen der Atemwege genutzt (Colosimo et al., 2000). Die Effizienz der Mikroinjektion ist sehr hoch, da die fremde DNA direkt in den Nukleus eingetragen werden kann. Diese Technik erlaubt es, neben dem DNA-Eintrag ebenfalls RNA, Proteine oder auch jegliche andere chemische Substanzen in die Zellen einzubringen. Dies kann zum Verständnis der Funktionalität von Genen, zur Wirkung chemischer und biologischer Substanzen auf Stoffwechselfunktion der Zelle und zur Entwicklung von Strategien zur Gentherapie beitragen. Viele Faktoren beeinflussen den erfolgreichen Eintrag verschiedener Substanzen in die Zelle; Z.B. die Beschaffenheit der Injektionspipette, die Substanzkonzentration aber auch Viskosität und Größe der zu injizierenden Zelle. Es ist leicht nachzuvollziehen, dass es sehr viel einfacher ist in eine Froschoocyte zu mikroinjizieren als in eine 1000fach kleinere Oocyte aus der Maus. Auch ist es leichter DNA in das Zytoplasma einer Zelle zu injizieren als in den Zellkern. Ein weiterer Nachteil der Mikroinjektion ist, dass in kurzer Zeit nur eine sehr geringe Anzahl von Zellen transfiziert werden kann.

### 1.2.3.3 Magnetofektion

Bei dieser Transfektionsmethode werden magnetische Felder genutzt, um pDNA in Zellen einzutragen. Dazu werden kleine magnetische Partikel mit kationischen Polymeren wie z.B. PEI beschichtet, so dass die pDNA über die Beschichtung mit den Partikeln aggregieren kann. Durch Inkubation der Zellen mit den magnetischen DNA-beschichteten Partikeln über einem permanenten Magneten erfolgt dann der Gentransfer in die Zellen (Plank et al., 2003). Ein großer Vorteil der Magnetofektion ist die schnelle Sedimentation der partikelgebundenen DNA, so dass durch Anlegen des magnetischen Feldes ein großer Teil dieser Partikel in die Zellen gelangt. Krötz et al. (2003) konnten durch Magnetofektion Transfektionseffizienzen von 39 % bei nicht konfluenten Endothelzellen und 4 % bei konfluenten Endothelzellen erreichen. Einen Nachteil dieser Methode stellt die leichte Toxizität der beschichteten magnetischen Partikel dar.

## 1.3 Transfektion konfluenter Zellschichten

Zum Gentransfer wird die fremde DNA bei nahezu allen Transfektionsmethoden durch verschiedene Mechanismen ausschließlich in das Zytoplasma der Zelle befördert. Damit es zur Expression der DNA kommen kann, muss diese in den Zellkern gelangen. Dies geschieht in den meisten Fällen dadurch, dass sich die Zellen bei der Transfektion noch in der Wachstumsphase befinden und die DNA während der Mitose nach dem Zusammenbruch der Kernmembran in den Nukleus gelangen kann.

Für postmitotische Zellen, wie z.B. Zellen in konfluenten Monolayern, müssen daher zusätzliche Strategien bei der Transfektion verfolgt werden.

Eine Möglichkeit ist die Verwendung von PEI (siehe Kap. 1.2.2.2) als Transfektionsreagenz. Dieses kationische Polymer scheint nicht nur die Zellmembran-Barriere überwinden zu können, sondern erleichtert vermutlich zusätzlich den Durchtritt der DNA/PEI-Komplexe durch die Kernporen in das Innere des Nukleus. Bis heute ist der Mechanismus des Transportes dieser Komplexe vom Zytoplasma in den Zellkern nicht bekannt, jedoch konnten Godbey et al. (1999) zeigen, dass sich nach der Transfektion intakte DNA/PEI-Komplexe im Zellkern befanden. Dies zeigt, dass eine Trennung von Polykation und DNA beim Eintritt in den Zellkern nicht erforderlich ist. Die Transfektionseffizienz mit PEI ist jedoch für postmitotische Zellen ( $G_0$ - und  $G_1$ -Phase) sehr viel geringer als bei Zellen, die die Mitose nach der Transfektion noch durchlaufen (späte S-,  $G_2$ - und M-Phase) (Brunner et al., 2002). Zur Transkription der in den Zellkern gelangten DNA muss eine Trennung von PEI und DNA stattfinden. Über den Mechanismus ist ebenfalls nichts bekannt, es wird jedoch vermutet, dass dieser Prozess DNA-Polymerase-vermittelt abläuft, ähnlich der Abwicklung der DNA von Histonen (Thomas und Klibanov, 2003).

Eine weitere Möglichkeit, den Übergang der fremden DNA aus dem Zytoplasma in den Zellkern zu ermöglichen besteht darin, dass der aktive Transport dieser DNA in den Nukleus durch den Kernporenkomplex (engl. *nuclear pore complex*, NPC) per Kernlokalisierungssignal (engl. *nuclear localisation signal*, NLS) verstärkt bzw. erst ermöglicht wird.

Der Zellkern ist in eukaryotischen Zellen durch zwei Lipiddoppelschichten vom Zytoplasma getrennt. Diese Trennung ist notwendig, um die genomische DNA der Zelle vor cytosolischen Komponenten zu schützen, gleichzeitig muss aber gewährleistet sein, dass z.B. bestimmte Proteine sowohl aus dem Kern heraus, als auch wieder in ihn hinein gelangen können. Dies wird durch die NPCs per aktivem Transport ermöglicht. Die NPCs importieren beispielsweise Proteine in den Zellkern, die zur Transkription oder Replikation der DNA benötigt werden und transportieren mRNAs, tRNAs und rRNAs aus dem Zellkern heraus. Eine Kernpore besitzt einen Durchmesser von ca. 10 nm (Adam et al., 1990), was die freie Diffusion von Ionen, Metaboliten und kleineren Proteinen (Molekulargewicht max. 40 - 60 kDa) durch den NPC erklärt. Alle anderen Moleküle können die Kernmembran ausschließlich durch aktiven Transport überwinden. Für diesen Transport werden viele verschiedene Faktoren benötigt, von denen bisher nur wenige bekannt sind. Die Kernlokalisierungssignale (NLS) sind einer Gruppe der bisher bekannten Faktoren. Es handelt sich dabei um bestimmte Aminosäuresequenzen innerhalb eines Proteins. Die meisten Proteine, die durch die Kernmembran transportiert werden, enthalten eigene NLS-Sequenzen. Es gibt aber auch Proteine, deren Eintritt in den Nukleus durch Interaktion mit anderen NLS-enthaltenden Proteinen bewirkt wird (Nigg, 1997). Es gibt bisher nur wenige Studien zum Transport der verschiedenen RNAs aus dem Zellkern in das Zytoplasma. Vermutet wird, dass RNA-bindende Proteine NLS-, bzw. NES (*nuclear export signals*)-Sequenzen beinhalten und dadurch die RNA zum Export befähigen. Im Falle von mRNA werden hnRNPs (*heterogenous nuclear RNA-binding proteins*) mit dem Transport in Verbindung gebracht (Michael et al., 1995).

Als weiterer Faktor ist die GTPase Ran zu nennen, welche zur Familie der Ras-Proteine gehört. Dieses in Säugetierzellen häufig vorkommende Protein kann zwischen zwei Formen wechseln: Ran-

GTP und Ran-GDP. Ran stellt auf diesem Wege durch GTP-Hydrolyse die für den nukleocytoplasmatischen Transport benötigte Energie zur Verfügung. Es wird vermutet, dass zusätzlich weitere GTPasen und/oder ATPasen an diesem Prozess beteiligt sind (Nigg, 1997).

Zusätzlich sind bestimmte Shuttle-Proteine bekannt, die einerseits an NLS-Proteine binden und andererseits den Kontakt zum NPC herstellen. Zu nennen sind hier Importin- $\alpha$ , Importin- $\beta$ , hnRNP A1 und Nucleolin (Nigg, 1997).

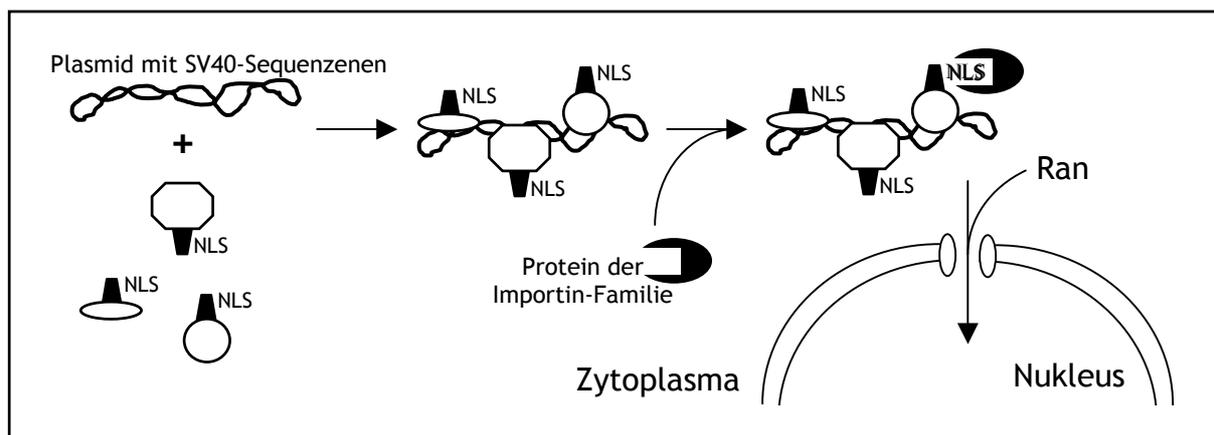
Der Transport zwischen Zellkern und Zytoplasma ist außerdem auch vom Zellzyklus abhängig. Feldherr und Akin (1994) konnten zeigen, dass die Transportrate des NPC in proliferierenden Zellen größer ist als in postmitotischen Zellen. Der Transport durch den NPC kann zusätzlich durch andere Faktoren beeinflusst werden. Allgemein anerkannt ist, dass in viral infizierten Zellen der Export viraler RNA aus dem Kern heraus gegenüber dem Export zellulärer mRNA verstärkt wird (Nakielny et al., 1997). Über die Mechanismen der NPC-Regulation ist bis heute nicht viel bekannt. Man weiß jedoch, dass bestimmte Proteine vom Zytoplasma in den Zellkern transportiert werden, wenn die Zelle beispielsweise Hormonen und Wachstumsfaktoren ausgesetzt ist (Nigg, 1990; Karin 1995).

Seit Mitte der 90er Jahre untersuchen mehrere Arbeitsgruppen den nukleocytoplasmatischen Transport und machen sich dabei das Wissen über NLS zunutze. Branden et al. (1999) stellten eine Verbindung aus peptidischer Nukleinsäure (engl. *peptide nucleic acid*, PNA) und einem NLS-Oligopeptid her. Dieses PNA-NLS-Peptid wurde dann per Restriktion in pDNA eingefügt. Die PEI-Transfektion mit diesem plasmidischen Konstrukt zeigte eine achtfach erhöhte Effizienz im Vergleich zu einer PEI-Transfektion mit der unbehandelten pDNA.

Subramanian et al. (1999) synthetisierten eine Verbindung aus zwei verschiedenen NLS-Sequenzen und pDNA. Dieses Konstrukt transfizierten sie in konfluente Endothelzellen und erhielten eine 83 %ige Transfektionseffizienz, was einer 63-fachen Steigerung der Gen-Expression entspricht.

Ebenfalls im Jahr 1999 synthetisierten Zanta et al. NLS-markierte DNA. Sie konnten mit dieser DNA die Transfektionseffizienz um das 10 - 1000fache steigern, unabhängig vom Zelltyp.

Dean (1997), Vacik et al. (1999) und Dean et al. (1999) verwendeten zur Transfektion pDNA, die Fragmente des SV40 (Simian Virus 40) *enhancer* und des SV40 *early promotor* enthielt. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Transfektionseffizienz bei Verwendung dieser pDNA durch vermehrten Eintrag dieser DNA in den Zellkern erhöht, insbesondere in den Nukleus von postmitotischen Zellen. Es wird vermutet, dass NLS-enthaltende Proteine im Zytoplasma an diese DNA-Sequenzen binden, dadurch vom NPC erkannt werden und dann aktiv in den Zellkern transportiert werden (Abb. 1.8).



**Abb. 1.8:** Modell für den pDNA-Import in den Nucleus: An pDNA mit SV40 *promotor/enhancer* binden im Zytoplasma verschiedene NLS-haltige Proteine, so dass der aktive Transport durch den NPC unter Mitwirkung von Importin und Ran-GTP in den Zellkern stattfinden kann.

Ein weiterer Ansatz zur Transfektion adhärenter und konfluenter Zellen ist die *in vitro*-Transkription des gewünschten Gens. Das bedeutet, dass die Transkription außerhalb der Zelle durchgeführt wird und die auf diese Weise erhaltene mRNA direkt zur Transfektion eingesetzt werden kann. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Nucleinsäure nicht in den Nucleus gelangen muss, sondern der Eintrag in das Zytoplasma zur Genexpression ausreichend ist. In der Literatur ist dieses Verfahren schon häufiger beschrieben worden (Van Tendeloo *et al.*, 2001; Ponsaerts *et al.*, 2002; Yokoe und Meyer, 1996). Van Tendeloo und Ponsaerts führten die Elektroporation in Suspension an humanen dendritischen Zellen durch, während Yokoe und Meyer mRNA in adhärenente RBL-Zellen (*rat basophilic leukemia*) über Elektroporation eintrugen. Dieses Verfahren lässt sich prinzipiell auch auf die Elektroporation von Zellen auf elektrisch leitenden Substraten anwenden.

## 2 Zielsetzung

Der Eintrag biologisch aktiver Moleküle in lebende Zellen ermöglicht eine Vielzahl verschiedener spezifischer Manipulationen des Zellmetabolismus. Die Elektroporation ist eine der Techniken, durch die solche Moleküle in Zellen eingebracht werden können. Zur Beobachtung der Zellreaktion auf eingetragene Moleküle können mannigfaltige Techniken genutzt werden. Die Kombination der Elektroporation mit ECIS (*electric cell-substrate impedance sensing*) erlaubt es, eine Manipulation vorzunehmen und gleichzeitig morphologische Änderungen sehr sensitiv zu detektieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die *in situ* Elektroporation adhärenter und konfluenter Säugetierzellen unter Verwendung von Wechselspannungspulsen zu etablieren und näher zu charakterisieren, wenn diese Zellen auf planaren Goldfilmelektroden kultiviert werden. Dabei sollten zunächst aus elektrochemischer Sicht die optimalen Elektroporationsparameter bestimmt werden, um einen effizienten Eintrag membranimpermeabler Moleküle bei zugleich minimaler Invasivität zu ermöglichen. Durch Kombination der *in situ* Elektroporation mit der ECIS-Technik sollte der Einfluss des Elektroporationspulses auf die Morphologie der Zellen untersucht werden unter besondere Berücksichtigung verschiedener Pulsformen. Durch Applikation eines optimierten Elektroporationspulses sollte daraufhin der Eintrag von Nukleinsäuren in adhärente Zellmonoschichten *in situ* mit dem Ziel der rekombinanten Genexpression erreicht werden.

## 3 Experimenteller Teil

### 3.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die routinemäßige Anzucht der Zellkulturen (NRK-, MDCK II-, HEK 293 und COS 7-Zellen) erfolgt in Kulturflaschen aus Polystyrol mit einer Wachstumsfläche von 25 cm<sup>2</sup>. Während der gesamten Kulturdauer werden die Zellen in einem Brutschrank bei 37 °C und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 Vol.-% CO<sub>2</sub> aufbewahrt. Zur Durchführung der ECIS- und Elektroporationsexperimente werden die Zellen in Elektrodenarrays des Typs 8W1E der Firma Applied BioPhysics Inc. (Troy, N.Y., USA) mit einer Wachstumsfläche von 0.75 cm<sup>2</sup> angezogen.

##### 3.1.1.1 Subkultivierung

Die Subkultivierung der Zellkulturen erfolgt einmal wöchentlich nach folgendem Protokoll. Die Zellschichten werden zweimal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, *phosphate buffered saline* ohne Zusatz von Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) gewaschen, um das Kulturmedium vollständig zu entfernen. Es wird eine 5 mM EDTA-Lösung in PBS zugesetzt, um zweiwertige Kationen wie Mg<sup>2+</sup> oder Ca<sup>2+</sup>, die die nachfolgende Verdauung der Haftproteine durch Trypsin inhibieren, zu komplexieren. Es folgt eine 10 minütige Inkubation bei 37 °C. Um die Zellen proteolytisch vom Kultursubstrat zu lösen, werden sie mit einer 0.25 %igen (w/v) Trypsin-Lösung in PBS versetzt, der 1 mM EDTA zugesetzt ist. Die hierfür benötigte Inkubationszeit beträgt ca. 10 min bei 37 °C. Nachdem sich die Zellen unter leichtem Schütteln vom Substrat gelöst haben, wird die Verdauungsreaktion mit ca. 20 ml Kulturmedium abgestoppt und die Zellsuspension 10 min bei 110 × g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wird im Kulturmedium resuspendiert und in der gewünschten Aussaatdichte auf die jeweiligen Kultur- und Messgefäße gesplittet. Ein Medienwechsel erfolgt in zweitägigen Abständen bzw. 24 h vor jedem Experiment zur Standardisierung der Stoffwechselsituation während der Experimente.

PBS:

Reinstwasser	140 mM NaCl
	2.7 mM KCl
	8.1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>



NRK-Medium:

Dulbeccos MEM Earle (1X)	10 % (v/v) FCS
mit 3.7 g/l NaHCO <sub>3</sub>	100 µg/ml Penicillin
4.5 g/l D-Glucose	100 µg/ml Streptomycin
110 mg/ml Na-Pyruvat	2 mM Glutamin

### 3.1.4 HEK 293-Zellen

Zur Kultivierung der HEK 293-Zellen wird das unten angegebene Medium verwendet. Bei der Subkultivierung werden die Zellen im Verhältnis 1:10 gesplittet und auf unbeschichtete Kultursubstrate ausgesät. Unter diesen Bedingungen erreichen die Zellen nach 4 bis 5 Tagen Konfluenz.

HEK 293-Medium:

Dulbeccos MEM Earle (1X)	10 % (v/v) FCS
mit 3.7 g/l NaHCO <sub>3</sub>	100 µg/ml Penicillin
4.5 g/l D-Glucose	100 µg/ml Streptomycin
110 mg/ml Na-Pyruvat	1 mM Glutamin

### 3.1.5 COS 7-Zellen

Zur Kultivierung der COS 7-Zellen wird das unten angegebene Medium verwendet. Bei der Subkultivierung werden die Zellen im Verhältnis 1:10 gesplittet und auf unbeschichtete Kultursubstrate ausgesät. Unter diesen Bedingungen erreichen die Zellen nach 4 bis 5 Tagen Konfluenz.

COS 7-Medium:

Basal Isocove Medium	8 % (v/v) FCS
	2 % (v/v) Hühnerserum
	100 µg/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin
	2 mM Glutamin

### 3.1.6 Lebend-Tod-Test

Um die Vitalität der Zellen 24 h nach der Elektroporation zu überprüfen, wird der *Live/Dead® Viability/Cytotoxicity*-Kit von MoBiTec verwendet. Bei diesem Test wird den Zellen der Fluoreszenzfarbstoff Ethidium-Homodimer zugesetzt, der nur dann in den Zellkern gelangen und dort in die DNA interkalieren kann, wenn die Plasmamembran der jeweiligen Zellen stark geschädigt

und somit permeabel ist. Stark beeinträchtigte oder tote Zellen können so unter dem Fluoreszenzmikroskop durch einen rot fluoreszierenden Zellkern detektiert werden.

Der Test wird nach den Experimenten auf den Goldelektroden durchgeführt. Die Zellen auf den ECIS-Elektroden werden dazu 24 h nach der Elektroporation mit je 200  $\mu$ l Ethidium-Homodimer-Lösung (1  $\mu$ M in PBS<sup>++</sup>) bedeckt. Man inkubiert für 30 min unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur und nimmt dann die Ethidium-Homodimer-Lösung wieder ab. Die Zellen werden gewaschen und danach mikroskopiert (Absorptionsmax.: 550 nm, Emissionsmax.: 570 nm).

PBS<sup>++</sup>:

Reinstwasser	140 mM NaCl
	2.7 mM KCl
	8.1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0.5 mM MgCl <sub>2</sub>
	1.0 mM CaCl <sub>2</sub>

### 3.1.7 Transiente Transfektion

Durch transiente Transfektion kann fremde DNA oder auch fremde RNA in Zellen eingebracht werden. Ein Teil der DNA dringt während der Zellteilung in den Zellkern ein und wird für einige Tage transkribiert. Die DNA integriert dabei nicht in das Genom und wird daher zerstört, wenn ein Selektionsdruck fehlt. Die eingebrachte RNA verbleibt im Zytoplasma und wird dort für kurze Zeit translatiert.

#### *Transfektion mit DNA durch Polyethylenimin (PEI)*

Zur Transfektion wird die benötigte Menge PEI (25 kDa, linear; Stocklösung = 1 mM in H<sub>2</sub>O bidest.) in 50  $\mu$ l 150 mM NaCl gelöst, gut durchmischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die gewünschte Menge DNA wird ebenfalls in 50  $\mu$ l 150 mM NaCl gelöst. Die Konzentrationen von PEI und DNA werden so gewählt, dass sich ein Verhältnis von Phosphat<sub>(DNA)</sub> zu Stickstoff<sub>(PEI)</sub> von 1:10 ergibt. Das kationische Polymer wird dann zur DNA-Lösung gegeben, gut durchmischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Transfektionslösung wird nach Zusatz von BSA (*bovine serum albumine*, 6 mg/ml) auf die mit PBS<sup>++</sup> gewaschenen Zellen gegeben und 2 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgt die Umstellung auf das entsprechende Kulturmedium. 48 h nach der Transfektion wird der Nachweis auf das entsprechende Protein durchgeführt.

#### *Transfektion von DNA mit Superfect®*

Das Superfect®-Reagenz ist ein Dendrimer, welches sich mit DNA zu einer kompakten Struktur zusammenlagert. Diese kompakte Struktur optimiert den Eintritt der DNA in die Zelle bei der Transfektion.

Die Transfektion wird nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wird die DNA in serum- und antibiotikafreiem Medium gelöst, mit dem Superfect-Reagenz versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zusatz von Kulturmedium wird diese Transfektionslösung auf die mit PBS gewaschenen Zellen gegeben und 3 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Transfektionslösung von den Zellen entfernt und erneut mit PBS gewaschen. Daraufhin werden die Zellen wieder mit Kulturmedium versetzt. Nach 48 h wird dann die Genexpression analysiert.

### **Transfektion von RNA mit DMRIE-C®**

Das DMRIE-C®-Reagenz (Invitrogen) ist eine äquimolare Mischung des kationischen Lipids DMRIE (1,2-Dimyristyloxypropyl-3-dimethylhydroxyethylammoniumbromid) und Cholesterin in steril gefiltertem Wasser. Es bildet mit der negativ geladenen Nukleinsäuren Lipid-RNA-Komplexe. Die Transfektion wird nach den Angaben des Herstellers wie folgt durchgeführt. Die Zellen werden bei 50 - 80 %iger Konfluenz mit serumfreien Medium (SFM) gewaschen.

DMRIE-C® und SFM werden vermischt, die RNA (als unaufgereinigter *In-vitro*-Transkriptionsansatz) zugefügt und anschließend auf die Zellen gegeben.

Nach vierstündiger Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wird das Reaktionsgemisch abgezogen und die Zellen wieder auf Kulturmedium umgestellt. Nach 12 h Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wird der Nachweis auf das translatierte Protein durchgeführt.

SFM:

Dulbeccos MEM Earle (1X)	100 µg/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin
	2 mM Glutamin

### **3.1.8 Nachweis der $\beta$ -Galaktosidase**

Um Zellen, in die  $\beta$ -Galaktosidase-codierende mRNA oder DNA transfiziert bzw. elektroporiert wurde, auf Expression des Enzyms zu untersuchen, wird eine Färbelösung hinzugefügt, die X-Gal als Substrat für die  $\beta$ -Galaktosidase enthält.

Die Zellen werden zu Beginn zweimal mit je 400 µl PBS<sup>++</sup> gewaschen, dann mit 200 µl 4 % (w/v) Paraformaldehyd fixiert. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird wiederum zweimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen. Um die Zellen anzufärben, werden 200 µl frisch angesetzte X-Gal-Färbelösung hinzugegeben. Anschließend werden die Zellen 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach wird erneut zweimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen. Die blaue Färbung der Zellen kann mittels Durchlichtmikroskopie beobachtet werden.

X-Gal-Färbelösung:

PBS	4 mM $K_4[Fe(CN)_6]$
	4 mM $K_3[Fe(CN)_6]$
	2 mM $MgCl_2$
	1 mg/ml X-Gal

## 3.2 Mikrobiologische Methoden

### 3.2.1 Herstellung kompetenter *Escherichia coli* (*E. coli*) Zellen

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen werden 50 µl einer Zellsuspension auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert, um einzelne Kolonien zu erhalten. Eine Kolonie wird dann in 3 ml LB-Medium überführt und über Nacht unter leichtem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wird soviel Volumen der Über-Nacht-Kultur in 100 ml LB-Medium überführt, dass sich eine finale Optische Dichte (OD) von 0.1 ergibt. Die Bakteriensuspension wird so lange bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert, bis sich eine OD von 0.7 bis 1.0 eingestellt hat. 50 ml dieser Kultur werden 5 min bei 4 °C und 4500 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 20 ml einer eiskalten 0.1 M  $MgCl_2$ -Lösung resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer zweiten Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 4500 x g erfolgt die Resuspension des Pellets in 20 ml einer eiskalten 0.1 M  $CaCl_2$ -Lösung. Nach einer weiteren Zentrifugation (5 min, 4 °C, 4500 x g) werden die Zellen in 2 ml einer eiskalten 0.1 M  $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert. Nach Zusatz von 500 µl Glycerol und guter Durchmischung wird die Zellsuspension in 100 µl Aliquots aufgeteilt und sofort in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gefroren. Die kompetenten *E. coli* Zellen werden bei -70 °C gelagert.

LB- Medium:

Reinstwasser	1 % (w/v) Peptone
	0.5 % (w/v) Hefe Extrakt
	1 % (w/v) NaCl

LB-Agar-Platten:

LB-Medium	1.5 % (w/v) Agar
-----------	------------------

### 3.2.2 Transformation von *E. coli* Zellen

#### *Klassische Transformation*

Zur Transformation werden 100 µl kompetente *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut und mit 10 µl einer Ligations-Lösung bzw. mit 1 µl isolierter Plasmid-DNA versetzt. Nach vorsichtiger Durchmischung erfolgt eine 40 minütige Inkubation auf Eis. Zur Permeabilisierung der Zellmembran werden die *E.*

*colis* einem Hitzeschock bei 37 °C für 5 min ausgesetzt. Nach einer 5 minütigen Inkubation auf Eis werden 300 µl LB-Medium zugesetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen werden dann auf vorgewärmte LB-Agar-Platten ausgestrichen, denen ein geeignetes Selektionsantibiotikum (50 mg/ml) zugesetzt wurde. Die LB-Agar-Platten werden mindestens über Nacht bei 37 °C inkubiert, bis einzelne Kolonien gewachsen sind.

### ***Transformation durch Elektroporation***

Für die Elektroporation wird der *E.coli*-Stamm DH10B verwendet. Dieser Bakterienstamm wird als elektrokompotent berechnet, d.h. er ist zur Aufnahme von DNA durch Elektroporation besonders befähigt.

Die zu transformierende DNA wird gefällt, in 1 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und auf Eis gekühlt. Die bei -70 °C gelagerten DH10B werden ebenfalls auf Eis inkubiert. 25 µl Bakteriensuspension und die gesamte DNA-Lösung werden in die auf 0 °C gekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Nach dem Einbau der Küvette in die Elektroporationsapparatur wird die Transformation bei einem Gleichspannungspuls mit einer Amplitude von 1.8 kV für 200 ms durchgeführt. Sofort nach dem Elektroporationspuls wird 1 ml SOC-Medium (Invitrogen) zugegeben. Diese Suspension wird 1 h bei 37 °C unter permanentem Schütteln (180 rpm) inkubiert. Die Zellen werden dann auf vorgewärmte LB-Agar-Platten ausgestrichen, denen ein geeignetes Selektionsantibiotikum (50 mg/ml) zugesetzt wurde. Die LB-Agar-Platten werden mindestens über Nacht bei 37 °C inkubiert, bis einzelne Kolonien gewachsen sind.

### **3.2.3 Kultur von *E. coli* Zellen**

Zu Gewinnung von Plasmid-DNA wird die gewünschte *E. coli*-Kolonie gepickt und in 3 ml LB-Medium mit dem geeigneten Selektionsantibiotikum (50 µg/ml) überführt. Die Zellen werden für 5 bis 8 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Von dieser Über-Tag-Kultur werden 300 µl in 100 ml LB-Medium mit Antibiotikum (50 µg/ml) überführt und über Nacht bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert.

### **3.2.4 Lagerung von *E. coli* Zellen**

Zur Langzeit-Konservierung von transformierten *E. coli* Zellen wird die gewünschte Kolonie gepickt und in 3 ml LB-Medium mit dem geeigneten Selektionsantibiotikum (50 µg/ml) überführt. Die Zellen werden für 5 bis 8 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Von dieser Über-Tag-Kultur werden 700 µl abgenommen und mit 300 µl Glycerol versetzt. Nach guter Durchmischung wird die Zellsuspension bei -70 °C eingefroren und gelagert.

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

Sämtliche Verbrauchsmaterialien für molekularbiologische Experimente werden vor Versuchsbeginn für mind. 20 min autoklaviert. Die Materialien für die Arbeit mit RNA werden gesondert behandelt, um eine Kontamination mit Ribonukleasen (RNasen) zu vermeiden. Alle Materialien aus Glas oder Metall werden bei 180 - 200 °C mindestens 4 h sterilisiert. Nicht sterilisierbare Verbrauchsmaterialien werden RNase-frei von den jeweiligen Herstellern bezogen. Bidestilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) wird mit 0.1 % (v/v) Dimethylpyrocarbonat (DMPC) versetzt, kräftig geschüttelt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Zur vollständigen Entfernung des überschüssigen DMPCs muss das Wasser mindestens 1 h autoklaviert werden. Sämtliche Lösungen werden mit DMPC behandeltem Wasser angesetzt und für 20 min autoklaviert.

#### 3.3.1 Quantifizierung der Nukleinsäuren

##### 3.3.1.1 Konzentrationsbestimmung durch UV/VIS-Spektroskopie

Die Konzentration von DNA bzw. RNA wird mit einem UV/VIS-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Bei der verwendeten 1 cm Küvette entspricht eine Optische Dichte OD<sub>260</sub> von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml ds (*double strand*) DNA.

Durch Messung der optischen Dichte bei 280 nm (OD<sub>280</sub>) kann die Reinheit der isolierten DNA bestimmt werden, da bei 280 nm aromatische Aminosäuren von Proteinen eine hohe Absorption zeigen. Der Quotient OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> sollte für DNA größer als 1.8 sein. Bei der in dieser Arbeit verwendeten DNA liegt dieser Quotient immer über dem Wert von 1.8.

##### 3.3.1.2 Konzentrationsbestimmung durch Färbung mit Ethidiumbromid

Die Konzentrationsbestimmung der DNA kann über ein ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel bestimmt werden. Dies ist insbesondere bei Restriktionen und Ligationen sehr hilfreich. Bei der Agarose-Gelelektrophorese wird dazu eine kommerziell erhältliche DNA-Leiter (*SMART-Ladder*) mitgeführt. Diese enthält in jeder sichtbaren Bande eine definierte Menge an DNA. Durch Vergleich der Intensität der Bande der experimentellen DNA mit den Intensitäten der *SMART-Ladder* kann die Konzentration der Probe abgeschätzt werden.

#### 3.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Eine optimale Auftrennung wird durch die Abstimmung der Agarosekonzentration auf die

Länge der Nukleinsäuren erreicht, da diese Konzentration die Maschenweite bestimmt. Bei denen in dieser Arbeit verwendeten Agarosegelen handelt es sich um 1%ige (w/v) Gele, die Nukleinsäurefragmente von 0.4 - 8 kB Länge optimal auftrennen.

Die Elektrophorese wird bei neutralem pH durchgeführt, um die negative Ladung der Nukleinsäuren aufrechtzuerhalten. Es wurden daher TAE-(*Tris-Acetat-EDTA*)-Puffer für die nichtdenaturierenden Gele und MOPS-(*Morpholinopropansulfonsäure*)-Puffer für die denaturierenden Gele verwendet.

50 X TAE :

Reinstwasser	2 M Tris
pH 7.4 - 7.8	2 M Natriumacetat
	0.05 M EDTA

10 X MOPS:

Reinstwasser	0.2 M MOPS
	0.1 M Natriumacetat
	10 mM EDTA

Die Nukleinsäure-Banden werden nach Anfärben mit Ethidiumbromid (DNA) oder SYBR<sup>®</sup>-Gold (RNA) durch Exposition auf einem UV-Transluminator (254 nm) sichtbar gemacht. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA-Helix, SYBR<sup>®</sup>-Gold bindet an das Zucker-Phosphat-Rückgrat.

### ***Nicht-denaturierende Gele***

Die jeweils benötigte Menge Agarose wird mit 1 X TAE-Puffer versetzt, durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und in eine Gelkammer gegossen. Die Proben werden mit DNA-Lade-Puffer im Volumenverhältnis 5:1 versetzt und nach Abkühlung des Gels in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung der Proben erfolgt durch Elektrophorese bei 5 V pro cm Gel-Länge. Zur Detektion der Fragmentgröße werden kommerziell erhältliche DNA-Leitern mitgeführt. Nach der Elektrophorese werden die Gele in einer ethidiumbromid-haltigen Lösung (0.5 µg/ml in 1X TAE-Puffer) für 15 bis 20 min inkubiert.

10 X DNA-Lade-Puffer:

Reinstwasser	0.25 % (w/v) Bromphenolblau
	0.25 % (w/v) Xylencyanol
	15 % Ficoll

### ***Denaturierende Gele***

Die benötigte Menge Agarose wird mit DMPC-Wasser versetzt und in der Mikrowelle bis zum Verschwinden der Trübung erhitzt. Anschließend werden umgehend 10 x MOPS-Puffer (Endkonzentration: 1 X) und 17.5 % Formaldehyd zugegeben. Die entstandene Lösung wird in den Gelschlitten gefüllt und nach dem Erhärten mit 350 ml 0.5 x TAE-Puffer (RNasen-frei) überschichtet. Die Proben und ein 1 kB-Marker werden auf das Agarosegel aufgetragen und die Elektrophorese bei

einer Feldstärke von 8 V pro cm Gel-Länge durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Gele in einer SYBR<sup>®</sup>-Gold haltigen Lösung (1 : 10.000 in 0.5 X TAE-Puffer) für 2 -4 h inkubiert.

### **Vorbereitung der RNA-Proben**

Die RNA-Proben werden nach folgendem Pipettierschema aufgearbeitet:

RNA-Probe:	6 µl RNA-Lösung
	1.5 µl MOPS (10 X)
	5.25 µl Formaldehyd
	15 µl Formamid

Marker:	1 µl RNA-Lösung
	1.7 µl MOPS (1 X)
	0.75 µl Formaldehyd
	1.7 µl Formamid

Die RNA-Proben und der Marker werden 10 min bei 68 °C denaturiert und anschließend für 1 min auf Eis gegeben. Zum Marker werden 0.34 µl, zu den RNA-Proben 2.8 µl 10 X RNA-Probenpuffer gegeben.

10 X RNA-Probenpuffer:	
DMPC-Wasser	30 % (v/v) Glycerin
	0.4 % (w/v) Bromphenolblau
	0.4 % (w/v) Xylencyanol
	1 mM EDTA

### **3.3.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen**

Zur Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wird das *QIAquick Gel Extraction Kit* verwendet und nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Dazu wird das gewünschte DNA-Fragment aus dem Gel geschnitten, gewogen, im Verhältnis 1:3 mit dem Puffer QG versetzt und für 10 min bei 50 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wird Isopropanol im Volumenverhältnis 1:1 zugesetzt und die DNA über eine *QIAquick spin* Säule aufgereinigt. Die DNA adsorbiert dabei an die Silica-Membran der Säule, während andere Bestandteile (Proteine, Salze, etc.) ausgewaschen werden. Die aufgereinigte DNA wird dann mit 30 bis 50 µl Reinstwasser eluiert und die Konzentration bestimmt (siehe 3.3.1).

### 3.3.4 Isolation von Plasmid-DNA

Zur Isolation von Plasmid-DNA wird ein Klon des entsprechenden *E. coli* Stammes über Nacht in LB-Medium mit dem geeigneten Selektionsantibiotikum (50 µg/ml) kultiviert. Mit dem *QIAprep Spin Maxiprep* Kit wird dann die Plasmid-DNA aus den Bakterien extrahiert. Dabei werden die Bakterien einer alkalischen Lyse unterworfen und die genomische DNA, Proteine und Zellreste werden präzipitiert. Es folgt die Adsorption der DNA an eine Silica-Membran und ein Waschschriff zur weiteren Aufreinigung. Die Plasmid-DNA wird in Reinstwasser eluiert und die Konzentration bestimmt (siehe 3.3.1). Die Vorgehensweise bei der Plasmid-Isolierung richtet sich genau nach den Vorgaben des Herstellers.

### 3.3.5 Fällung von Plasmid-DNA

In wässrigen Lösungen mit einem hohen Anteil an Ethanol und einer hohen Konzentration monovalenter Kationen neigt DNA zur Ausfällung, da ihr die Hydrathülle entzogen wird. Dabei wird die DNA von anderen löslichen Stoffen gereinigt, sterilisiert und kann aufkonzentriert werden.

Wässrige DNA-Lösungen werden durch Zugabe eines zehntel Volumens 3 M Natriumacetat und des dreifachen Volumens eiskalten Ethanols gefällt. Nach 5 minütiger Inkubation auf Eis wird die DNA bei 15 °C und 13000 x g in 20 min pelletiert. Anschließend wird der Überstand abgenommen, das einfache Volumen eiskaltes 70 %iges Ethanol auf das Pellet gegeben und 20 min bei 13000 x g und 15 °C zentrifugiert. Das Ethanol wird abgenommen und das DNA-Pellet im sterilen Luftstrom getrocknet. Die getrocknete DNA wird anschließend im gewünschten Puffer aufgenommen.

### 3.3.6 Klonierung und Ligation

Bei der Konstruktion von Vektoren werden ausschliesslich kommerziell erhältliche Plasmide verwendet. Dazu werden der gewünschte Vektor sowie das Zielinsert mit Restriktionsendonucleasen aus den ursprünglichen Plasmiden herausgeschnitten. Um passende Enden zu erhalten werden dabei für Vektor wie Insert dieselben Endonucleasen verwendet. Es folgt eine 5'-Dephosphorylierungsreaktion des Vektors mit *shrimp alkaline phosphatase* (SAP), um eine Autoligation zu vermeiden. Nach der Ligation wird der Ligationsansatz zur Amplifizierung des Plasmids in *E. coli* transformiert. Das amplifizierte Plasmid wird isoliert und sequenziert.

#### 3.3.6.1 Restriktion

1 bis 5 µg DNA werden mit 1 µl Restriktionsendonuclease (20 U/µl) in dem passenden Restriktionspuffer bei einem finalen Volumen von 20 µl geschnitten. Der Restriktionsansatz wird dazu 60 min

bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Analyse der Restriktionsschnitte erfolgt durch Agarosegelelektrophorese (siehe 3.3.2) und die linearisierte DNA (Vektor bzw. Insert) wird durch Gel-Extraktion (siehe 3.3.3) isoliert.

### 3.3.6.2 5'-Dephosphorylierung mit SAP

1 µg des linearisierten Vektors aus der Restriktion (siehe 3.3.6.1) wird mit 1 µl SAP (1 U/µl) in Ligase-Puffer versetzt. Die Dephosphorylierungsreaktion findet bei 37 °C innerhalb von 30 min statt. Die Reaktion wird durch Denaturierung der SAP bei 65 °C binnen 15 min abgestoppt. Dieser Reaktionsansatz kann dann direkt in der Ligation (siehe 3.3.6.3) verwendet werden.

### 3.3.6.3 Ligation

Vor der Ligation wird die Konzentration der gereinigten und linearisierten DNA ermittelt, wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben. Für die Ligation ist ein Stoffmengenverhältnis Vektor/Insert von 1:3 am günstigsten. Zur Berechnung der einzusetzenden Masse des Inserts wird folgende Formel verwendet:

$$d [\text{ng Insert}] = \frac{a [\text{ng Vektor}] \cdot b [\text{bp Insert}]}{c [\text{bp Vektor}]} \cdot 3$$

### 3.3.7 Sequenzierung

Die durch Ligation neu hergestellten Vektoren werden zur vollständigen Charakterisierung sequenziert. Alle Sequenzierungen werden von der Firma MWG-Biotech in München durchgeführt. Von dem jeweiligen Insert werden dazu am 5'-Ende wie auch am 3'-Ende jeweils 800 bp ansequenziert und mit der Ursprungssequenz verglichen.

### 3.3.8 *In-vitro*-Transkription

Alle *In-vitro*-Transkriptionen werden mit dem T7-Cap-Scribe-Kit der Firma Roche durchgeführt. Dieser Kit enthält eine T7-RNA-Polymerase, somit kommen für diese Versuche nur Vektoren als Template in Frage, in denen die Expression des zu transkribierenden Gens direkt von einem T7-Promoter kontrolliert wird. Die Durchführung erfolgt nach den Angaben des Herstellers.

Vor der *In-vitro*-Transkription wird der entsprechende Vektor per Restriktionsschnitt (siehe 3.3.6.1) downstream zu der 3'-Poly-A-Sequenz linearisiert. Es werden 0.5 µg Plasmid-DNA eingesetzt, das Gesamtvolumen beträgt 20 µl. Die *In-vitro*-Transkription erfolgt bei 37 °C binnen 2 h.

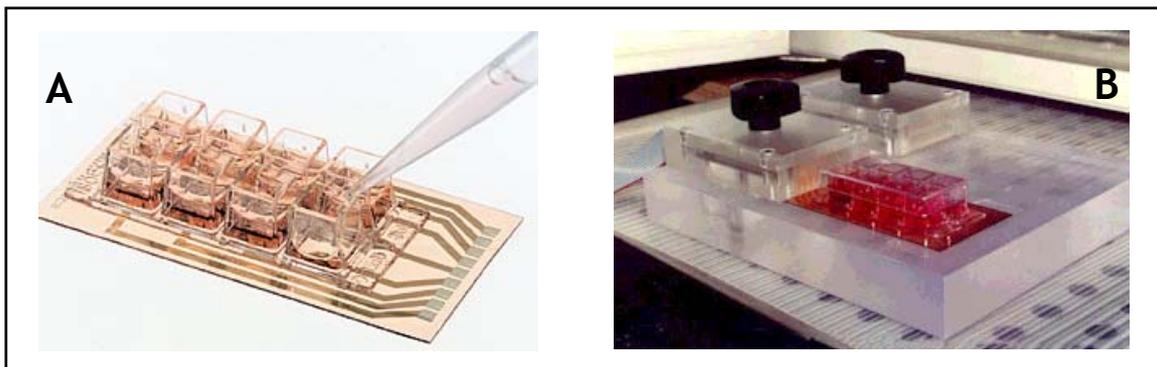
## 3.4 Biophysikalische Methoden

### 3.4.1 Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS)

Das Prinzip der ECIS-Technik beruht auf der Bestimmung des Wechselstromwiderstandes (Impedanz) einer zu untersuchenden Zellschicht als Funktion der Frequenz des Erregersignals. Die Zellen werden dazu direkt auf der Oberfläche von Goldelektroden kultiviert. Durch Messung der Impedanz ist es möglich, Informationen über die Morphologie und die Dynamik der Zellen auf der Elektrode zu gewinnen.

#### 3.4.1.1 Messaufbau

Die Zellen werden sowohl zur Durchführung der ECIS-Messungen als auch für die Elektroporationsexperimente auf Goldelektroden der Firma Applied BioPhysics Inc. (Troy, NY) kultiviert, die integriert sind in ein Array mit 8 Messkammern (*wells*) (Abb. 3.1).



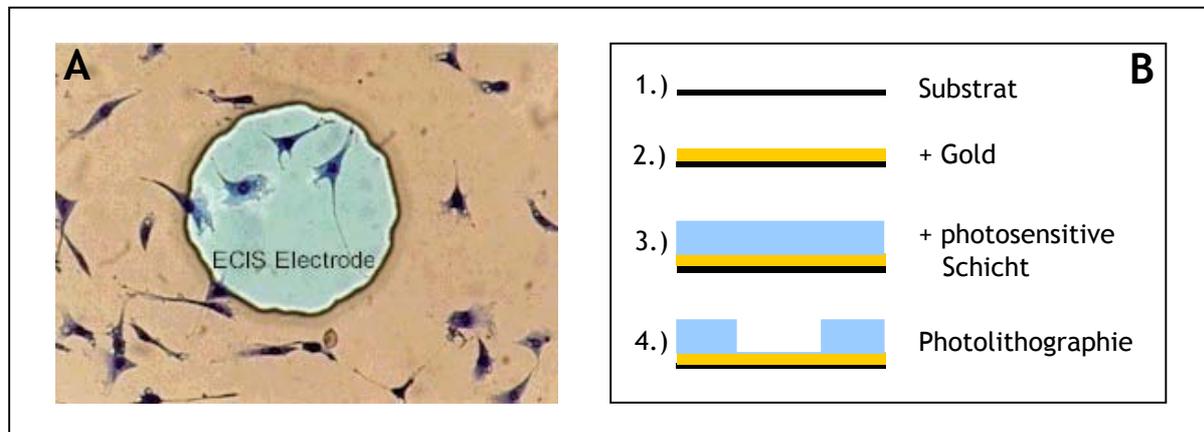
**Abb. 3.1:** A: 8-Well Elektrodenarray der Firma Applied BioPhysics Inc.  
B: Elektrodenarray nach Einbau in die Kontakthalterung (Quelle: [www.biophysics.com](http://www.biophysics.com)).

Jede Kammer enthält eine Arbeitselektrode mit einer Fläche von  $5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$  sowie eine Gegenelektrode, deren Fläche  $0.15 \text{ cm}^2$  beträgt. Durch das Größenverhältnis von Arbeitselektrode zu Gegenelektrode von 1:300 werden die gemessenen Impedanzbeiträge nahezu ausschließlich durch die Arbeitselektrode hervorgerufen. Das gesamte Array einschließlich der Goldelektroden ist mit einer photoresistenten Polymerschicht überzogen. Nur die Arbeitselektroden, Gegenelektrode und Kontaktpunkte sind mittels Photolithografie von der Polymerschicht befreit worden. Die einzelnen Schichten sind in Abbildung 3.2B gut zu erkennen.

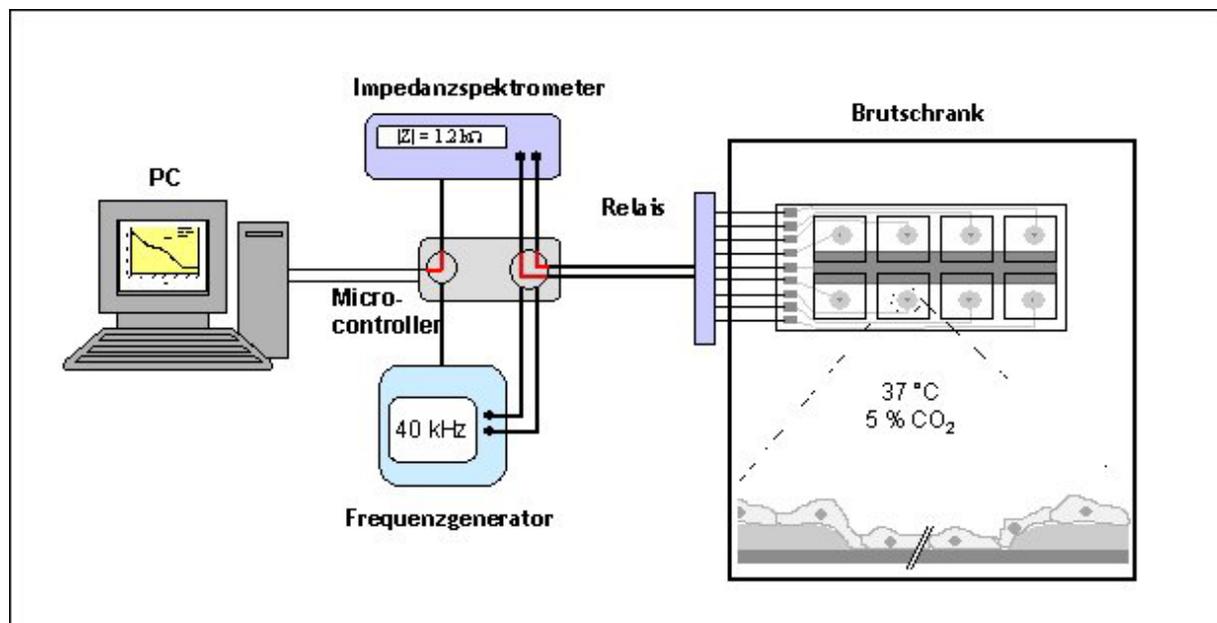
Um während der Messung eine automatisierte Kontaktierung der acht Arbeitselektroden zu ermöglichen, wird ein Relais-Modul verwendet, welches je nach Operationsmodus (ECIS oder Elektroporation) mit dem Impedanz-Analysator (SI 1260, Solartron Instruments) oder dem externen

Frequenzgenerator (33120A, Hewlett Packard) verbunden ist. Relais-Modul, Impedanz-Analysator und Frequenzgenerator werden von einem herkömmlichen PC gesteuert, der ebenfalls die ECIS-Messdaten erfasst und speichert. Während der gesamten Messung befindet sich die Messkammer in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 Vol.-% CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

Die Abbildung 3.3 skizziert den experimentellen Aufbau.



**Abb. 3.2:** A: ECIS Goldfilmelektrode mit angefärbten Zellen (Quelle: <http://www.biophysics.com>). Der Durchmesser der Elektrode beträgt 250 µm.  
B: Herstellungsschritte des Arrays.



**Abb. 3.3:** Schematischer Messaufbau für kombinierte Elektroporations-ECIS-Experimente. Der Microcontroller ermöglicht das Umschalten zwischen Frequenzgenerator (HP 33120 A) für die Elektroporation und dem Impedanzspektrometer (SI-1260) zur ECIS-Messung. Die Steuerung des Microcontrollers und die Aufzeichnung der Daten erfolgt über einen PC. Das Elektrodenarray befindet sich in einem Brutschrank bei 37 °C und ist über das Relais mit dem Microcontroller verbunden. Der vergrößerte Abbildungsteil zeigt schematisch die Situation an der Elektrodenoberfläche bei konfluenter Bedeckung der Elektrode.

### 3.4.1.2 Grundlagen der Impedanzspektroskopie (IS)

Die IS beruht auf der Detektion des Wechselstromwiderstandes (Impedanz) eines zu untersuchenden Systems in Abhängigkeit von der Frequenz des Erregersignals. Dabei können die elektrischen Eigenschaften des Systems über einen ausgedehnten Frequenzbereich analysiert werden. Um eine zerstörungsfreie Messung der Probe zu ermöglichen und ihren elektrischen Zustand durch die Messung nur wenig zu beeinflussen, werden Wechselspannungen und -ströme kleiner Amplitude verwendet.

Zur Aufnahme von Impedanzspektren wird in dieser Arbeit das *continuous wave* Verfahren verwendet. Das Erregersignal besteht dabei aus einer sinusförmigen Wechselspannung kleiner Amplitude und definierter Frequenz, die über den zu untersuchenden Frequenzbereich diskret variiert wird. Der resultierende Wechselstrom wird bei jeder Frequenz separat detektiert, die Impedanz berechnet und in einem Impedanzspektrum zusammengetragen.

In elektrischen Wechselstromkreisen ist neben den Amplituden von Strom und Spannung auch deren Phasenlage relativ zueinander zu berücksichtigen. Die Berechnung der Impedanz erfordert daher die Verrechnung von periodischen Funktionen gleicher Frequenz, aber unterschiedlicher Amplitude und Phase, die sich vorteilhaft durchführen lässt, wenn Spannung, Strom und Impedanz als komplexe Größen formuliert werden.

Für die Wechselspannung  $U(t)$  gilt bei einer Frequenz  $\omega$ :

$$U(t) = U_0 e^{i\omega t} \quad (3.1)$$

$U(t)$ : Momentanwert der Spannung

$U_0$ : Spannungsamplitude

$\omega$ : Kreisfrequenz ( $2\pi f$ )

$t$ : Zeit

$i$ :  $\sqrt{-1}$

Für die Stromstärke gilt entsprechend:

$$I(t) = I_0 e^{i(\omega t - \varphi)} \quad (3.2)$$

$I(t)$ : Momentanwert der Stromstärke

$I_0$ : Stromamplitude

$\varphi$ : Phasenverschiebung zwischen Spannung  $U(t)$  und Stromstärke  $I(t)$

Die Impedanz ist definiert als Quotient aus Spannung und Stromstärke:

$$Z = \frac{U(t)}{I(t)} = \frac{U_0}{I_0} e^{i\varphi} = |Z| e^{i\varphi} \quad (3.3)$$

Komplexe Größen lassen sich am besten als Zeiger in einer Gaußschen Zahlenebene darstellen, in welcher der Realteil auf der Abszisse und der Imaginärteil auf der Ordinate aufgetragen wird. Dabei entspricht der Betrag der Impedanz  $|Z|$  der Länge des Zeigers, während sich die Phasenverschiebung  $\varphi$  in dem Winkel zwischen Zeiger und realer Achse widerspiegelt (Abb 3.4).

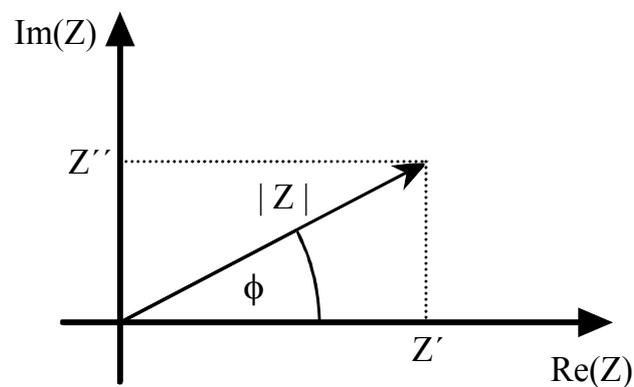


Abb. 3.4 Darstellung der Impedanz  $Z$  in einer Gaußschen Zahlenebene.

Der Realteil  $Z'$  und Imaginärteil  $Z''$  der komplexen Impedanz  $Z$  lassen sich in einem kartesischen Koordinatensystem folgendermaßen ausdrücken:

$$Z = Z' + iZ'' \quad (3.4)$$

Für den Betrag  $|Z|$  und die Phasenverschiebung  $\varphi$  ergeben sich daraus folgende Zusammenhänge:

$$|Z| = \sqrt{Z'^2 + Z''^2} \quad (3.5)$$

$$\varphi = \arctan\left(\frac{Z''}{Z'}\right) \quad (3.6)$$

### 3.4.1.3 Auswertung der Impedanzspektren

Zur Auswertung der Impedanzspektren, die mit der ECIS-Technik aufgenommen wurden, wird das Modell von Giaever und Keese (1991) benutzt.

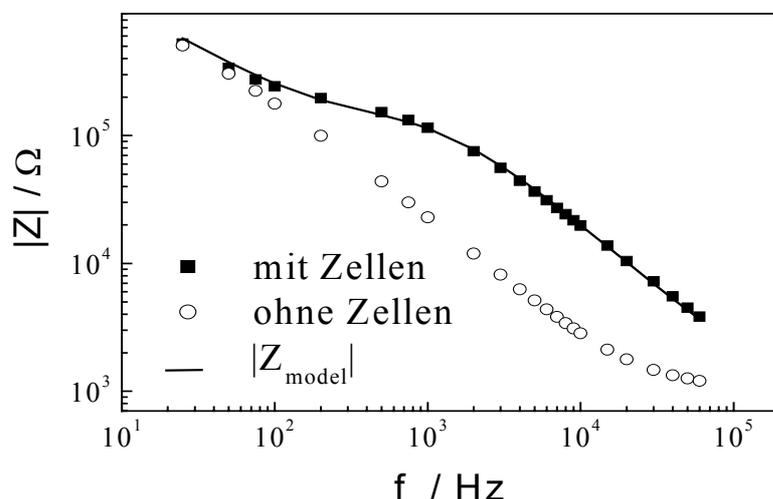
Die Impedanzbeiträge der Zellschicht setzen sich aus den drei Parametern  $\alpha$ ,  $R_b$  und  $C_m$  zusammen.  $R_b$  beschreibt den Widerstand zwischen den Zellen, der die Dichtigkeit der Zell-Zell-Kontakte, z. B. der *tight junctions*, widerspiegelt.  $\alpha$  drückt die frequenzabhängige Impedanz innerhalb des Zell-Substrat-Kontaktes aus und ist definiert als  $\alpha = r_c(\rho/h)^{0.5}$ . In diesem Ausdruck bezeichnet  $r_c$  den Radius der Zelle,  $\rho$  den spezifischen Elektrolytwiderstand im Spalt zwischen Zelle und Substrat und  $h$  den Abstand zwischen Zelle und Substrat. Die spezifische Kapazität der Zellmembran, bestimmt durch deren dielektrische Eigenschaften und Morphologie, wird durch  $C_m$  beschrieben. Nach Giaever und Keese (1991) kann die Impedanz zellbedeckter Goldelektroden durch folgende Übertragungsfunktion ausgedrückt werden:

$$\frac{1}{Z_{total}} = \frac{1}{Z_n} \cdot \left\{ \frac{Z_n}{Z_n + Z_m} + \frac{\frac{Z_m}{Z_n + Z_m}}{\frac{\gamma r_c}{2} \cdot \frac{I_0(\gamma r_c)}{I_1(\gamma r_c)} + R_b \left( \frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m} \right)} \right\} \quad (3.7)$$

$$\text{mit } \gamma = \frac{\alpha}{r_c} \cdot \sqrt{\frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m}}$$

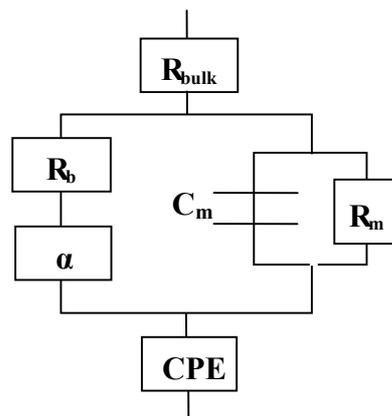
Darin bezeichnet  $Z_n$  die Impedanz der Elektrode ohne Zellen,  $Z_m$  ist die Impedanz der Plasmamembran ( $Z_m = 1/i\omega C_m$ ).  $I_0$  und  $I_1$  stellen modifizierte Bessel-Funktionen erster Art der Ordnung 0 und 1 dar. Die iterative Anpassung der Übertragungsfunktion an die gemessenen Impedanzspektren zur Bestimmung der Parameter  $R_b$ ,  $\alpha$  und  $C_m$  erfolgte nach dem Verfahren von Wegener et al. (2000).

In der Abbildung 3.5 ist die gute Übereinstimmung zwischen den experimentell ermittelten Daten mit dem beschriebenen Modell nach Anpassung der Parameter exemplarisch dargestellt.



**Abb. 3.5:** Typische Impedanzspektren einer ECIS-Goldelektrode ohne Zellen und mit Zellen. Die durchgezogene Linie repräsentiert die angepasste Übertragungsfunktion.

Im Allgemeinen kann man für die quantitative Auswertung eines Impedanzspektrums ein Ersatzschaltbild erstellen, das anhand von klassischen elektrischen Bauteilen die elektrischen Eigenschaften des Systems so genau wie möglich beschreibt. Dazu muss das Ersatzschaltbild die gleiche Frequenzabhängigkeit der Impedanz wie das System selbst aufweisen. Die Verwendbarkeit idealer elektrischer Bauteile zur Beschreibung eines realen elektrochemischen Systems ist jedoch limitiert. Daher muss unter Umständen auf nicht-ideale elektrochemische Impedanzelemente zurückgegriffen werden. Aus den Parametern  $\alpha$ ,  $R_b$  und  $C_m$  des ECIS-Modells und einigen zusätzlichen elektrischen Komponenten, welche die elektrischen Eigenschaften der Elektrode und des Mediums berücksichtigen, lässt sich eine das ECIS-Modell näherungsweise veranschaulichende Ersatzschaltung erstellen (Abb. 3.6).



**Abb. 3.6** Schematische näherungsweise Darstellung der Ersatzschaltung einer Zellschicht auf Goldelektroden basierend auf dem Modell von Gjaever und Keese (1991).  $R_{\text{bulk}}$ : Widerstand der Elektrolytlösung,  $R_b$ : Widerstand des Interzellularspaltes,  $\alpha$ : Impedanzelement zur Beschreibung des frequenzabhängigen Impedanzbeitrages aus dem Zell-Substrat-Kontakt,  $C_m$ : Kapazität der Plasmamembran,  $R_m$ : Membranwiderstand, CPE: konstantes Phasenelement.

Die Ersatzschaltung besteht im wesentlichen aus ohmschen Widerständen mit der Impedanz  $R$  und einer Phasenverschiebung von  $0$ , Kondensatoren  $C$  mit der Impedanz  $\frac{1}{i\omega C}$  und einer

Phasenverschiebung von  $-\frac{\pi}{2}$ , den nicht-idealen Impedanzbeiträgen durch das konstante Phasen-

element CPE (*constant phase element*) und dem Impedanzbeitrag des Zell-Substrat-Kontaktes  $\alpha$ . Das CPE ist ein empirisches Impedanzelement, das keine Entsprechung in einem idealen elektrischen Bauteil findet, aber die Impedanz an der Grenzfläche zwischen einer Edelmetallelektrode und einer Elektrolytlösung adäquat beschreibt. Die Impedanz beträgt  $\frac{1}{(i\omega)^n A}$  und für die

Phasenverschiebung gilt dementsprechend  $-n\frac{\pi}{2}$  mit  $n = [0,1]$ . Die Frequenzabhängigkeit der Impedanz wird entscheidend vom Parameter  $n$  bestimmt und liegt zwischen denen eines ohmschen

Widerstandes ( $n = 0$ ,  $R = 1/A$ ) und eines idealen Kondensators ( $n = 1$ ,  $C = A$ ).  $R_{\text{bulk}}$  beschreibt die elektrischen Eigenschaften des Kulturmediums. Die elektrischen Eigenschaften des Zellmonolayers werden durch den Kondensator mit der Kapazität  $C_m$ , den ohmschen Widerstand  $R_b$  sowie durch die frequenzabhängige Komponente  $\alpha$  dargestellt.  $C_m$  ist parallel zu  $R_b$  und diese drei Komponenten sind seriell mit CPE und  $R_{\text{bulk}}$  verschaltet.

#### 3.4.1.4 *Micromotion*

Es ist bekannt, dass lebende adhärenente Zellen in einer konfluenten Schicht vertikale Bewegungen durchführen, die man über entsprechende Transducer elektrisch registrieren kann (Giaever und Keese, 1991). Dabei ist es wichtig sicherzustellen, dass es sich bei den fluktuierenden Signalen ausschließlich um biologisches und nicht technisches Rauschen handelt.

Lo et al. (1993) haben zeigen können, dass die mit der ECIS-Technik anhand von Impedanzfluktuationen registrierten Mikrobewegungen, sog. *Micromotion* direkt mit der metabolischen Aktivität der Zellen verknüpft sind. Vor diesem Hintergrund soll die Invasivität verschiedener Elektroporationsbedingungen anhand von *Micromotion*-Experimenten untersucht werden. Dabei wird die Impedanz der Zellschicht auf einer Arbeitselektrode bei einer festen Frequenz, in diesem Fall 4 kHz, in äquidistanten Zeitabschnitten von etwa 800 ms aufgenommen. Der experimentelle Aufbau zur Durchführung von *Micromotion*-Experimenten gleicht dem oben beschriebenen ECIS-Mesaufbau (siehe Abb. 3.3). Die Steuerung erfolgt über eine in *Labview* programmierte Software. Dabei wird bei jeder Elektrode folgender Ablauf durchgeführt:

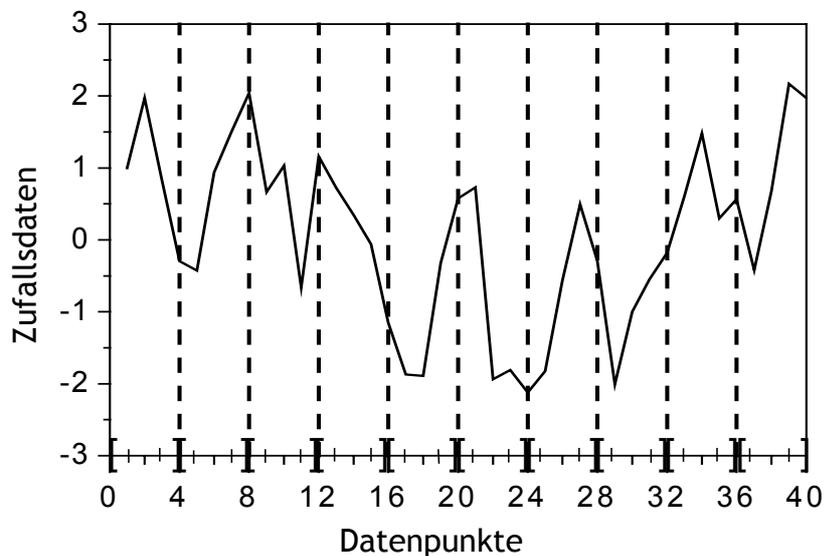
Zunächst werden 15 min lang Datenpunkte im *Micromotion*-Modus aufgenommen. Dann wird die Elektroporation vorgenommen. Anschließend werden nach einer Wartezeit von 90 min erneut für 15 min im *Micromotion*-Modus Impedanzspektren aufgenommen. Zur Quantifizierung der gemessenen Daten werden diese dann nach den im folgenden Abschnitt vorgestellten Analysemethoden ausgewertet.

##### ***Numerische Analyse der Messdaten***

Nach Lo et al. (1993) gibt es im wesentlichen drei verschiedene Arten zur Auswertung fluktuierender Zeitserien wie sie z. B. bei der Messung im *Micromotion*-Modus anfallen. Bei der ersten Methode wird zur Auswertung der Messdaten der gesamte Datensatz zunächst in gleichgroße Intervalle aufgeteilt und die Varianz der Inkremente für die einzelnen Beobachtungsintervalle berechnet und über alle Intervalle gemittelt. Die Auftragung der berechneten, mittleren Varianz gegen die Größe des Beobachtungsintervalls liefert eine aussagekräftige Charakterisierung der beobachteten Fluktuationen. Bei der zweiten Methode wird die Standardabweichung der Inkremente für verschiedene Abtastraten über den ganzen Datensatz berechnet und gegen die jeweilige Abtastrate aufgetragen. Die dritte Methode beruht auf der üblicherweise bei diesen Fragestellungen eingesetzten Fast-Fourier-Transformation (FFT).

### Mittlere Varianz der Inkremente für verschieden große Beobachtungsintervalle

An einem Zufallsdatensatz (siehe Abb. 3.7) wird das Analyseverfahren zur Bestimmung der mittleren Varianz der Inkremente zur Vereinfachung genauer erläutert.

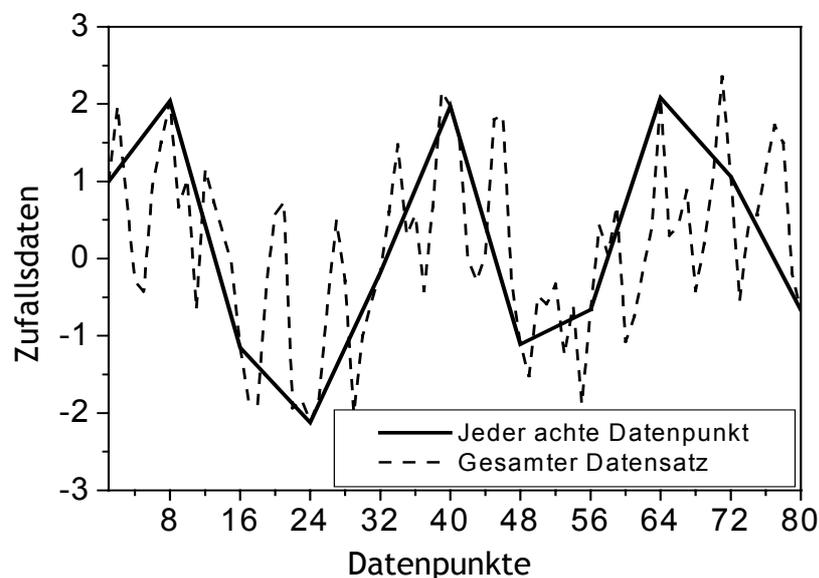


**Abb. 3.7:** Zufallsdatensatz zur Illustration des Analyseverfahrens zur Bestimmung der Varianz der Inkremente für verschieden große Beobachtungsintervalle. Es sind Intervalle von jeweils 4 Datenpunkten markiert.

Es handelt sich hierbei um einen Datensatz mit 40 Elementen, der in unterschiedlich große Beobachtungsintervalle unterteilt wird, wobei  $n = \{2, 4, 8, 16, 32, \dots\}$  Datenpunkte ein Intervall bilden. Abbildung 3.7 zeigt exemplarisch die Situation für Beobachtungsintervalle mit  $n = 4$ . Es wird für jedes Beobachtungsintervall die Varianz, also das Quadrat der Standardabweichung der Inkremente, berechnet. Die Inkremente sind definiert als die Differenz aufeinanderfolgender Messwerte. Die berechneten Varianzen der einzelnen Beobachtungsintervalle werden dann über alle 10 Intervalle gemittelt, und diese gemittelte Varianz wird in doppeltlogarithmischer Darstellung gegen die Größe des Beobachtungsintervalls (hier  $n = 4$ ) aufgetragen. Dieselbe Rechnung erfolgt nun völlig analog für Beobachtungsintervalle mit  $n = \{8, 16, 32, \dots, 256\}$  Elementen. Das auf diese Weise ermittelte Diagramm der mittleren Varianzen in Abhängigkeit von der Größe der Beobachtungsintervalle wird dann für verschiedene Messungen abgebildet und charakterisiert die jeweilige Zellmotilität.

### Standardabweichung der Inkremente als Funktion der Abtastrate

Das Analyseverfahren zur Bestimmung der Standardabweichung der Inkremente wird ebenfalls anhand eines Zufallsdatensatzes veranschaulicht (siehe Abb. 3.8).



**Abb. 3.8:** Zufallsdatensatz zur Illustrierung der Bestimmung der Standardabweichung der Inkremente. Der gesamte Datensatz ist durch eine gestrichelte Linie, jeder 8te Datenpunkt durch eine durchgezogene Linie markiert.

Es werden die Inkremente bei verschiedenen Abtastraten berechnet. Für eine bestimmte Abtastrate wird dann die Standardabweichung der Inkremente für den gesamten Datensatz bestimmt, d. h. es wird sukzessive jeder, dann nur jeder zweite, vierte, achte, sechzehnte usw. Messpunkt berücksichtigt. Die Standardabweichung wird anschließend halblogarithmisch in Abhängigkeit der jeweiligen Abtastrate in einem Diagramm aufgetragen.

Wird zum Beispiel eine Abtastrate von 8 gewählt, wie es in Abbildung 2.8 dargestellt ist, so werden die Inkremente nur von jedem achten Messpunkt berechnet. Von diesen Inkrementen wird dann die Standardabweichung über den gesamten Messbereich von 80 Datenpunkten ermittelt und gegen die Abtastrate von 8 in einem Diagramm aufgetragen. Die Abtastrate wird sukzessive reduziert bis nur noch jeder 256te Messpunkt berücksichtigt wird. Durch die Standardabweichung der Inkremente erhält man ebenfalls Informationen über die Zellmotilität.

### Fast-Fourier-Transformation

Bei der Untersuchung von Zeitserien ist es üblich diese Serien durch eine Fourier-Transformation aus der Zeit- in die Frequenzdomäne zu übertragen, um Periodizitäten oder Zu- bzw. Abnahme von Fluktuationen oder oszillierenden Phänomenen zu untersuchen.

Da die Fourier-Transformationen theoretisch nur an unendlichen Zeitserien durchgeführt werden kann, die gemessenen Datensätze aber nicht unendlich sind, muss derselbe Datensatz durch den zur

Rechnung verwendeten Algorithmus „unendlich“ oft aneinandergereiht werden. Damit die Übergänge am Ende des ersten Datensatzes und Anfang des angehangenen neuen, aber identischen Datensatzes aufgrund eines impliziten Trends nicht fälschlicherweise zu sehr bei der anschließenden Transformation ins Gewicht fallen, wird die gemessene Zeitserie mit einer Fensterfunktion multipliziert, die eine Glättung dieser Übergänge bewirkt. Es gibt dabei im wesentlichen zwei verschiedene Funktionen, die Hamming- und die Hanning-Funktion, die beide für sich einen glockenartigen Verlauf zeigen und einen Anfangs- bzw. Endpunkt von nahezu Null besitzen. Durch die Multiplikation dieser Fensterfunktionen mit den gemessenen Zeitserien werden die sprunghaften Übergänge der zu transformierenden Funktion glatt und es treten keine artifiziellen Peaks bei der anschließenden Fourier-Transformation auf.

Der gesamte aus den *Micromotion*-Untersuchungen aufgezeichnete Datensatz wird auf 2048 Elemente begrenzt, da Fourier-Transformationen mit Hilfe von Fast-Fourier-Algorithmen nur mit Zeitserien vorgenommen werden, die über  $2^n$  Elemente verfügen. Der gesamte Datensatz wird dazu in vier gleiche Untergruppen mit je 512 Datenpunkten unterteilt.

Das Quadrat der durch Fast-Fourier-Analyse bestimmten Fourier-Koeffizienten wird nun in einem sogenannten Powerspektrum doppellogarithmisch gegen die Frequenz aufgetragen. Man erhält die Spektraldichte in Abhängigkeit der Frequenz, d. h. die Intensität eines gemessenen Frequenzbeitrages im gemessenen Zeitverlauf. Die Daten sollten vor der Fourier-Analyse normalisiert werden, d.h. die Werte werden durch die durchschnittlichen Impedanzbeträge für die gesamte zu untersuchende Periode dividiert. Dies eliminiert kleine Unterschiede der Elektrodengröße zwischen den einzelnen Messungen. Die Fourier-Transformation inklusive der Multiplikation der Zeitserie mit der Hanning-Fensterfunktion sowie die doppeltlogarithmische Darstellung wurden mit einer in LabView geschriebenen Software (J. Wegener) erstellt.

Aus dem Powerspektrum lassen sich sowohl die Intensität der Zellbewegung vor und nach der Elektroporation bestimmen als auch eventuelle periodisch wiederkehrende Strukturen ermitteln.

### 3.4.2 Elektroporation

Vermittelt durch Elektroporation sollen extrazellulär angebotene Makromoleküle in die Zelle eingebracht und die Effektivität des Eintrages je nach Eigenschaft des Makromoleküls mikroskopisch, fluoreszenzmikroskopisch und impedanzspektroskopisch detektiert werden. Die Elektroporation wurde in den zuvor beschriebenen Elektrodenarrays der Firma Applied BioPhysics durchgeführt (siehe 3.4.1.1). Der Zustand der Zellschicht wurde mit Hilfe der ECIS-Methode vor und nach der Elektroporation in allen acht *wells* als Funktion der Zeit verfolgt. Soweit nicht anders angegeben wird zur Elektroporation eine sinusförmige Wechselspannung mit folgenden Charakteristika eingesetzt: Frequenz ( $f$ ) = 100 kHz, Amplitude ( $A$ ) = 3 V, Pulsdauer ( $\tau$ ) = 200 ms. Zusätzlich werden auch Messungen mit denselben Messparametern durchgeführt, bei denen aber anstelle einer rein sinusförmigen Wechselspannung eine positiv oder negativ unipolare sinusförmige Wechselspannung bei der Elektroporation verwendet wird. Bei Variation sowohl der Amplitude als

auch der Pulsdauer werden Amplituden von 3 V oder 4 V und Pulsdauern von 100 ms, 200 ms und 500 ms verwendet.

Während der Messung befinden sich die Zellen in einem Brutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> (v/v) und wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

Nach Beendigung des Experimentes werden die Zellen mikroskopisch untersucht. Bei den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wird ein Aufricht-Mikroskop der Firma Olympus Optical verwendet. Die nötige Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes wurde durch Einsatz einer Quecksilberdampf-Lampe (100 Watt, Olympus Optical, Japan) kombiniert mit einem SWB- bzw. MW-Filter-Set (SWB, Exc.: 494 nm, Emis.: 518 nm; MW, Exc.: 550 nm, Emis.: 615 nm, Omega Optical Japan) erzeugt. Die Detektion des Fluoreszenzbildes erfolgt mit einer Digitalkamera (Hamamatsu, Japan). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgen mit einem 20 x Objektiv der Firma Olympus Optical Japan (NA = 0.4).

Bei allen Phasen-contrastaufnahmen wird ein 20 x Objektiv (NA = 0.4) mit dem entsprechenden Ph1-Filter des Mikroskops der Firma Diaphot TMD verwendet.

### ***Elektroporation mit fluoreszierenden Makromolekülen***

Folgende Makromoleküle werden bei diesen Experimenten in den angegebenen Arbeitskonzentrationen eingesetzt: Lucifer Yellow (0.5 kDa, c = 2 mg/ml), Fluoreszein Isothiocyanat (FITC)-markiertes Dextran (4 - 2000 kDa, c = 8 mg/ml), FITC-markiertes *bovine serum albumin* (BSA) (67 kDa, c = 10 mg/ml), sowie TRITC-markiertes Phalloidin (1.3 kDa). Die Substanzen werden mit Ausnahme des Phalloidins entweder in *Earl's Balanced Salt Solution* (EBSS), MEM Earle (1X) oder in Elektroporationspuffer gelöst. TRITC-Phalloidin wird in PBS<sup>++</sup> mit 1 % (w/v) BSA gelöst (c = 0.65 µg/ml).

Zunächst werden Impedanzspektren aufgezeichnet bis sich für alle Elektroden konstante Impedanzwerte und damit stationäre Bedingungen ergeben. Dann wird das Medium von den Zellen entfernt und 200 µl bis 300 µl der jeweiligen Elektroporationslösung zugegeben. Anschließend wird die Re-Äquilibration des Systems anhand von ECIS-Messungen verfolgt und zu einem geeigneten Zeitpunkt die Elektroporation durchgeführt. Nach der Elektroporation werden über mind. 2 h weiterhin komplette Impedanzspektren aufgezeichnet, um den morphologischen Zustand der Zellschicht zu charakterisieren. Zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung werden die Zellen dann dreimal mit je 400 µl EBSS gewaschen. Danach werden in jedes *well* 200 µl EBSS pipettiert und anschließend wird der mit Silikon auf dem Arrayboden befestigte Plastikaufsatz zur mikroskopischen Untersuchung vorsichtig abgetrennt.

MEM-Earle (1X):

ohne Phenolrot	100 µg/ml Streptomycin
	100 µg/ml Penicillin
	2 mM L-Glutamin

**Earles balanced salt solution (EBSS)**

ohne Phenolrot

ohne NaHCO<sub>3</sub>**Elektroporations-Puffer:**

Reinstwasser	88 mM NaCl
	12.5 mM HEPES
	6 mM NaHCO <sub>3</sub>
	5.5 mM KCl
	1.5 mM CaCl <sub>2</sub>
	0.7 mM MgCl <sub>2</sub>
	0.6 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0.6 mM MgSO <sub>4</sub>
	0.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

**Elektroporation mit DNA**

Zunächst werden Impedanzspektren aufgezeichnet, bis sich für alle Elektroden konstante Impedanzwerte und damit stationäre Bedingungen ergeben. Zur Elektroporation von DNA wird das Medium von den Zellen entfernt und pro *well* 10 µg Plasmid-DNA in 200 µl EBSS zugesetzt. Anschließend wird die Re-Äquilibrierung des Systems anhand von ECIS-Messungen verfolgt und zu einem geeigneten Zeitpunkt die Elektroporation durchgeführt. Nach der Elektroporation werden über mind. 2 h weiterhin komplette Impedanzspektren aufgezeichnet. Danach wird die Elektroporationslösung gegen 400 µl Kulturmedium pro *well* ausgetauscht und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wird das Kulturmedium erneut gewechselt (mit einem Zusatz von 10 mM Buttersäure-Natriumsalz, falls das verwendete Plasmid einen CMV-Promotor besitzt) und die Zellen 16 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 Vol.-% CO<sub>2</sub> inkubiert. Zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung werden die Zellen dann einmal mit je 400 µl EBSS gewaschen. Danach werden in jedes *well* 200 µl EBSS pipettiert und anschließend wird der mit Silikon auf dem Arrayboden befestigte Plastikaufsatz zur mikroskopischen Untersuchung vorsichtig abgetrennt.

**Elektroporation mit RNA**

Bei der Elektroporation mit RNA werden 2 µl bis 20 µl (max. 10 µg RNA) des nicht-aufgereinigten *In-vitro*-Transkriptionsansatzes (siehe 3.3.8) eingesetzt. Die noch enthaltene DNA wurde durch Zusatz von DNasen zerstört.

Um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden, wird 24 h vor der Messung das serumhaltige Medium entfernt und durch 400 µl SFM ersetzt. Vor Beginn des Experimentes wird das Medium erneut durch 150 µl bis 200 µl SFM ersetzt. Es werden Impedanzspektren bis zur Äquilibrierung des zellulären Systems aufgezeichnet. Anschließend wird die RNA in 50 µl EBSS aufgenommen, in die Messkammern pipettiert und vermischt. Nach Re-Äquilibrierung der Zellen erfolgt die Elektroporation.

### ***Elektroporation in chloridfreiem Medium***

Um den Einfluss des ins Positive verschobenen unipolaren Sinus-Pulses (PV-Sinus) bei der Elektroporation in Abhängigkeit des zellumgebenden Mediums zu untersuchen, wurden NRK-Zellen sowohl in EBSS als auch in chloridfreiem Medium elektroporiert.

Dazu wird 24 h vor der Elektroporation das übliche Medium abgezogen und durch 400 µl chloridfreies Medium ersetzt. Unmittelbar vor Beginn der Messung wird das Medium dann noch einmal nahezu komplett abgezogen und durch 200 µl chloridfreies Medium ersetzt. Es werden Impedanzspektren bis zur Äquilibration des zellulären Systems aufgezeichnet. Die Elektroporation wird mit den Pulsformen Sinus und PV-Sinus unter den angegebenen Elektroporationsparametern durchgeführt. Die Regeneration der Zellen wird impedanzspektroskopisch verfolgt.

chloridfreies Medium:

Reinstwasser	114 mM Natriumgluconat
	25 mM Glucose
	20 mM NaHCO <sub>3</sub>
	10 mM HEPES
	5 mM Kaliumgluconat
	1.95 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	1.25 mM CaSO <sub>4</sub>
	1.1 mM Magnesiumacetat

### **3.4.3 Rasterkraftmikroskopie**

Die rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Nanoscope III Multimode-AFM (Digital Instruments, Santa Barbara, California, USA) und einem E-type Scanner (max. Scan-Fläche 15 x 15 µm) im Kontaktmodus in Flüssigkeit aufgenommen. Frisch abgezogene Glimmerplättchen wurden mit doppelseitigem Klebeband auf Edelstahlscheiben befestigt und in einer kommerziell erhältlichen *fluid cell* (Digital Instruments) montiert. Zum Scannen wurden V-förmige Oxid-geschärfte Cantilever mit einer Federkonstanten von 0.06 N/m (Digital Instruments) eingesetzt. Die mikroskopischen Bilder (512 x 512 Bildpunkte) wurden auf einer Scan-Fläche von 1 bis 25 µm<sup>2</sup> mit einer Scan-Rate von 12 Hz (12 Scan-Linien/s) und einer vorgegebenen Kraft von weniger als 1 nN aufgenommen. Die Aufnahmen wurden mit der Software SPIP (Scanning probe image processor, Image Metrology, Lyngby, Dänemark) bearbeitet. Alle rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. rer. nat. Hermann Schillers, Institut für Physiologie II, Universitätsklinikum Münster, aufgenommen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Theoretische Betrachtungen

#### 4.1.1 Simulation von Impedanzspektren

Zur Auswertung der impedanzspektroskopischen Rohdaten aus Messungen an zellbedeckten Goldfilmelektroden wird das ECIS-Modell von Giaever und Keese (1991) verwendet. In diesem Modell sind  $\alpha$ ,  $R_b$  und  $C_m$ , welche die Zellschicht beschreibenden Parameter. Das konstante Phasenelement (CPE) mit den Parametern  $A$  und  $n$  beschreibt die nicht-ideale Grenzflächenimpedanz der Goldfilmelektrode (siehe 3.4.1.3). Der Widerstand der Elektrolytlösung wird durch  $R_{\text{bulk}}$  beschrieben. Die genannten Parameter werden zur Auswertung der Impedanzspektren durch iterative Anpassung der Übertragungsfunktion des Modells an experimentell gewonnene Daten (Betrag  $|Z|(f)$ , Phasenverschiebung  $\varphi(f)$ ) ermittelt.

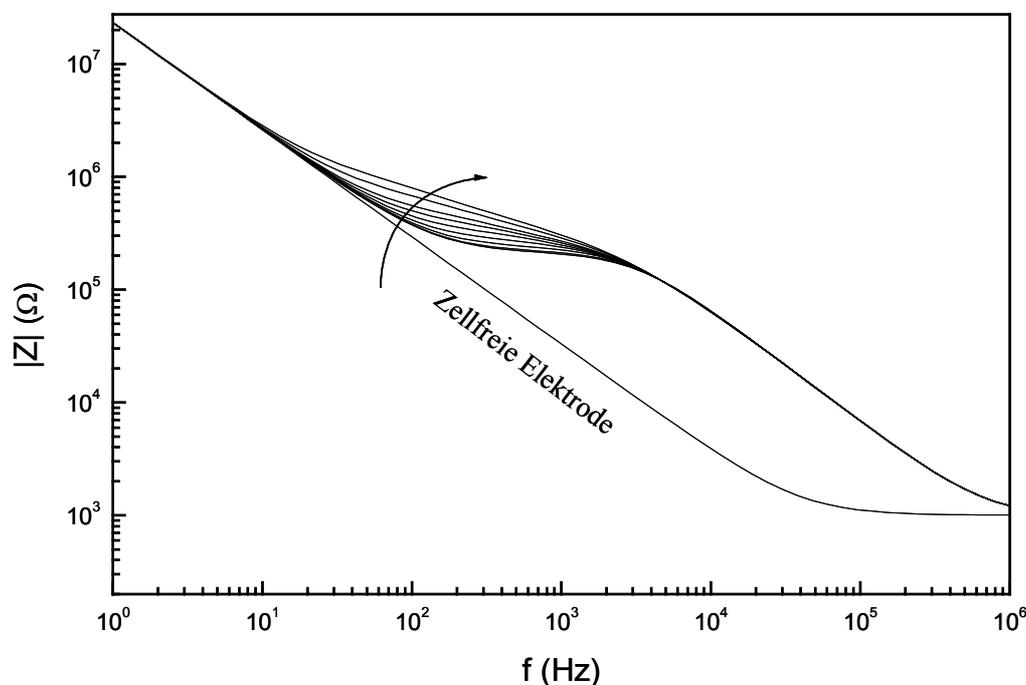
Da das eingesetzte elektrochemische Modell die Grundlage der Dateninterpretation darstellt, werden zunächst Impedanzspektren auf der Grundlage des ECIS-Modells simuliert. Ausgehend von einer Zellschicht mit Standardwerten ( $R_b = 100 \Omega\text{cm}^2$ ,  $\alpha = 20 \Omega^{1/2}\text{cm}$ ,  $C_m = 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) wird jeweils ein Parameter in physiologisch sinnvollen Bereichen variiert, während die anderen beiden konstant gehalten werden. Die Auswirkungen von Variationen eines der Parameter der Zellschicht auf die Impedanzspektren werden theoretisch berechnet und graphisch dargestellt.

Die Simulationen erfolgen in einem Frequenzbereich von 1 bis  $10^6$  Hz und werden mit der Software *MatLab* berechnet. Es wird nur der Verlauf des Impedanz-Betrages  $|Z|(f)$  nicht aber die Phasenverschiebung  $\varphi(f)$  in die Betrachtung miteinbezogen. Die Fläche der Elektrode betrug für alle Simulationen  $5 \cdot 10^{-4} \text{cm}^2$ .

##### 4.1.1.1 Variation der zellschichtbeschreibenden Parameter

In Abbildung 4.1 ist die Veränderung der Impedanzspektren bei Variation des Parameters  $\alpha$  dargestellt, die auf zellulärer Ebene eine Änderung der Zell-Substrat-Interaktion entspricht.  $R_b$  wird in diesem Fall bei  $100 \Omega\text{cm}^2$ ,  $C_m$  bei  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  konstant gehalten. Im Bereich mittlerer Frequenzen führt die Variation von  $\alpha$  zu einer Änderung der Steigung des Plateaus. Mit Zunahme des Wertes von  $\alpha$  wird auch die Steigung des Plateaus größer. Damit ist die Frequenzabhängigkeit dieses Parameters aufgezeigt. Per Definition ist  $\alpha$  umgekehrt proportional zum Abstand zwischen Zellschicht und Substrat (siehe 3.4.1.3). Mit abnehmendem Abstand von Zellschicht und Substrat nimmt der Wert von  $\alpha$  zu und die Steigung des Plateaus innerhalb mittlerer Frequenzen erhöht sich. Eine Erhöhung des spezifischen Widerstandes des Elektrolytmediums führt ebenfalls zu einer Erhöhung von  $\alpha$  und somit zu einer höheren Steigung.

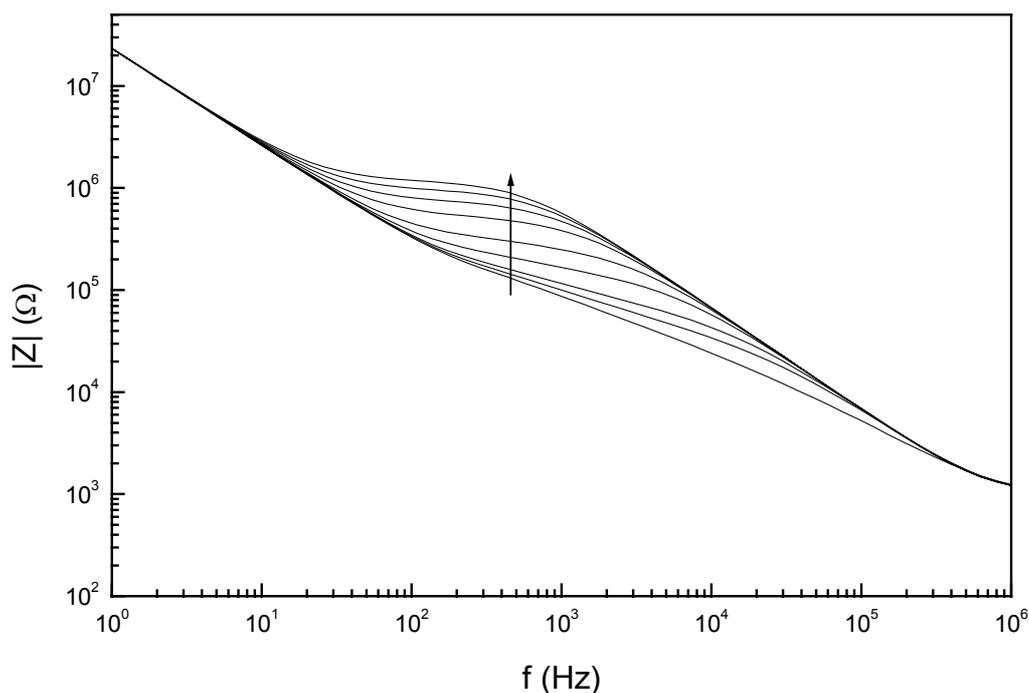
Abbildung 4.1 zeigt außerdem den typischen Verlauf eines Impedanzspektrums einer zellfreien Elektrode. Dieses Spektrum wird ausschließlich von der Grenzflächenimpedanz (CPE) und dem Widerstand des Mediums ( $R_{\text{bulk}}$ ) bestimmt. Ein Vergleich der Impedanzspektren von zellfreier und zellbedeckter Elektrode macht deutlich, dass die elektrischen Eigenschaften der Zellschicht im Bereich von  $10^2$  Hz bis  $10^5$  Hz dominieren.



**Abb. 4.1:** Simulation der Impedanzspektren bei Variation von  $\alpha$  ( $R_b = 100 \Omega\text{cm}^2$ ;  $C_m = 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ). Der Pfeil zeigt die Zunahme der Steigung des Plateaus bei Erhöhung des Wertes von  $\alpha$  im Bereich mittlerer Frequenzen an. Es werden für  $\alpha$  folgende Werte eingesetzt (Einheit  $\Omega^{1/2}\text{cm}$ ): 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 und 50.

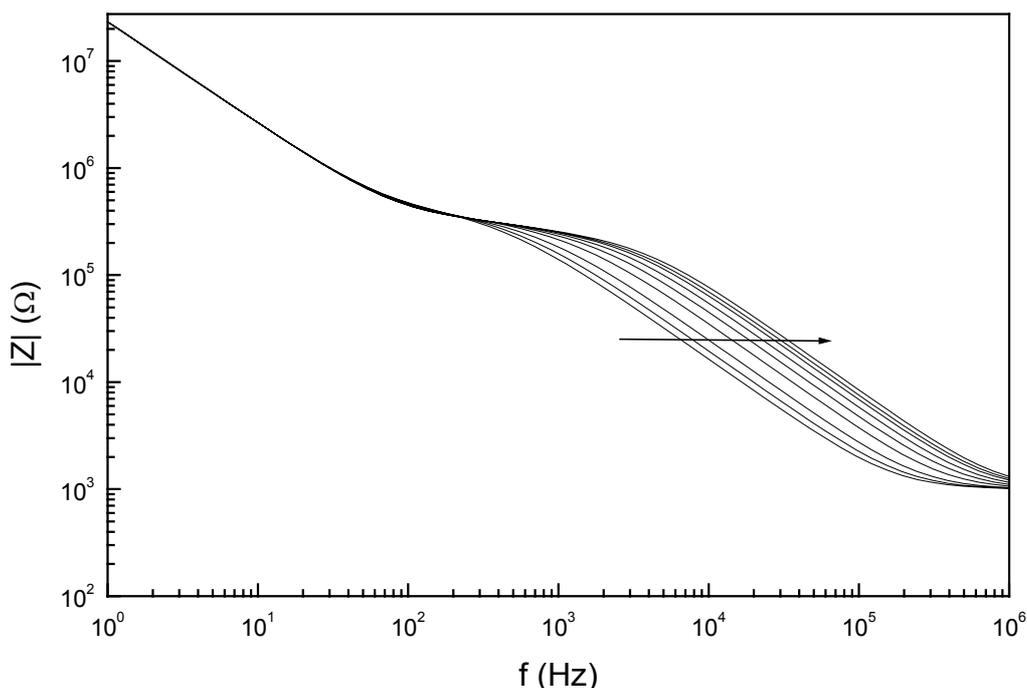
Abbildung 4.2 zeigt die Veränderung von Impedanzspektren bei Variation des Widerstandes der Zell-Zell-Kontakte ( $R_b$ ).  $C_m$  wird bei  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ,  $\alpha$  bei  $20 \Omega^{1/2}\text{cm}$  konstant gehalten. Der ohmsche Widerstand  $R_b$  ist durch seine Frequenzunabhängigkeit für die Ausbildung des für ECIS-Experimente typischen Plateaus verantwortlich. Je höher der Widerstand der Zell-Zell-Kontakte ist, desto höher liegt auch das Plateau. Bei niedrigen Widerständen wird die Kurve jedoch steiler, da bei kleinem  $R_b$  das Impedanzspektrum zunehmend durch den Beitrag von  $\alpha$  dominiert wird. Der Wert von  $\alpha$  bestimmt also die Steigung im Plateau, während  $R_b$  die Höhe desselben festlegt. Eine Zunahme von  $R_b$  kann mit dichteren Zell-Zellkontakten gleichgesetzt werden.

Der kapazitative Beitrag der Zellmembran wird unter diesen Bedingungen erst bei höheren Frequenzen, der Beitrag des CPEs erst bei kleineren Frequenzen bedeutsam.



**Abb. 4.2:** Simulation der Impedanzspektren bei Variation von  $R_b$  ( $\alpha = 20 \Omega^{1/2}\text{cm}$ ,  $C_m = 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ). Der Pfeil zeigt die Parallelverschiebung des Plateaus bei Zunahme des Widerstandes der Zell-Zell-Kontakte an. Es werden folgende Werte für  $R_b$  eingesetzt (Einheit:  $\Omega\text{cm}^2$ ): 1, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400 und 500.

In Abbildung 4.3 sind Simulationen von Impedanzspektren bei Variation der Membrankapazität ( $C_m$ ) gezeigt.  $R_b$  wird bei  $100 \Omega\text{cm}^2$ ,  $\alpha$  bei  $20 \Omega^{1/2}\text{cm}$  konstant gehalten. Eine Erhöhung der Membrankapazität führt zu einer Parallelverschiebung des Anstiegs des Impedanzspektrums im Bereich hoher Frequenzen. Bei einer Abnahme des Wertes von  $C_m$  wird der Anstieg der Impedanzkurve zu höheren Frequenzen hin verschoben. Die Steigung ändert sich dabei jedoch nicht. Eine Änderung der Membrankapazität wird mit einer unterschiedlichen starken Faltung der Plasmamembran assoziiert. eine Zunahme der Membrankapazität kann auf eine stärkere Faltung der Plasmamembran zurückgeführt werden (J.Wegener, 1998).



**Abb. 4.3:** Simulation der Impedanzspektren bei Variation von  $C_m$  ( $R_b = 100 \Omega\text{cm}^2$ ,  $\alpha = 20 \Omega^{1/2}\text{cm}$ ). Der Pfeil zeigt die Parallelverschiebung des Anstiegs des Spektrums zu höheren Frequenzen bei Abnahme der Membrankapazität. Es werden folgende Werte für  $C_m$  eingesetzt (Einheit:  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ ): 0.8, 0.9, 1, 1.2, 1.5, 2, 3, 4 und 5.

#### 4.1.1.2 Variation der Elektrodenparameter

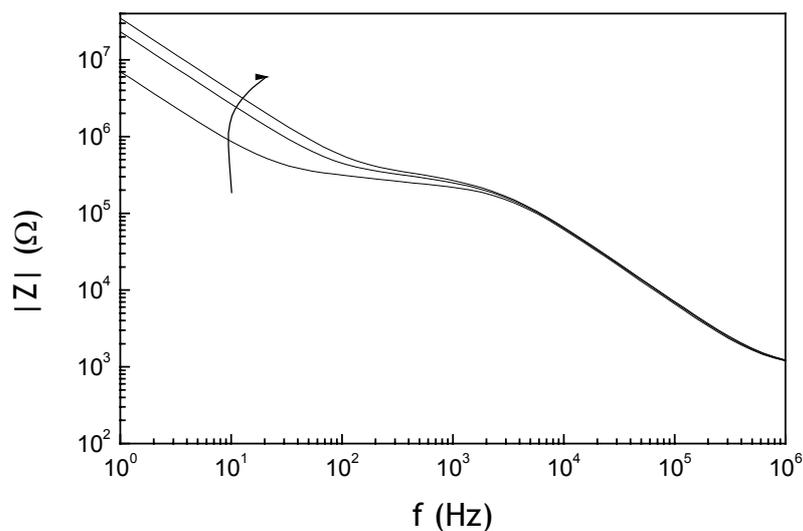
Ausgehend von einer simulierten Zellschicht mit den Parametern  $R_b = 100 \Omega\text{cm}^2$ ,  $\alpha = 20 \Omega^{1/2}\text{cm}$  und  $C_m = 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  folgt nun die Variation der Parameter der Elektrodengrenzfläche ( $A$ ,  $n$ ). Dies soll den Einfluss des konstanten Phasenelementes (CPE) bei der Auswertung von Impedanzspektren hervorheben. In den vorangegangenen Simulationen (siehe 4.1.1.1) wurden folgende Erfahrungswerte für diese Parameter eingesetzt:

$$A = 1.5 \cdot 10^{-5} \mu\text{F s}^{n-1} \text{cm}^{-2}$$

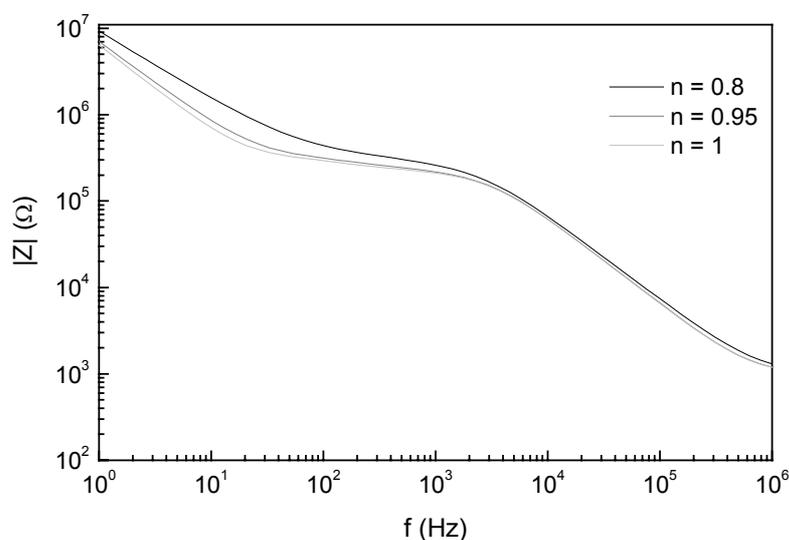
$$n = 0.95$$

Die Abbildungen 4.4 und 4.5 zeigen den Einfluss der Variationen von  $A$  bzw.  $n$  auf simulierte Impedanzspektren.  $R_b$  wird bei  $100 \Omega\text{cm}^2$ ,  $\alpha$  bei  $20 \Omega^{1/2}\text{cm}$  und  $C_m$  bei  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  konstant gehalten. Ebenfalls werden wechselseitig die Werte für  $A$  und  $n$  wie oben angegeben konstant gehalten. Variationen von  $n$  und  $A$  wirken sich stark im niederfrequenten Bereich ( $f < 100 \text{ Hz}$ ) aus. Dieser Bereich wird von der Grenzflächenimpedanz dominiert, modelliert durch das CPE. Die Veränderung des Parameters  $n$  in einem geringen Maße zu kleineren Werten hin, führt zu einer drastischen Änderung des Spektrums im niederfrequenten Bereich (Abb. 4.5). Verändert man  $A$  bei konstantem  $n$ , so tritt der schon bei der Variation von  $C_m$  beobachtete Effekt der Parallelverschiebung der Kurve ohne Änderung der Steigung auf. Bei Abnahme des Wertes von  $A$ , erfolgt eine Verschiebung des

Anstiegs zu höheren Frequenzen hin (Abb. 4.4). Ebenso tritt bei der Verkleinerung des Parameters  $n$  eine Verschiebung der Kurve zu höheren Frequenzen auf.



**Abb. 4.4:** Simulation der Impedanzspektren bei Variation von  $A$ , eines Parameters des CPE ( $R_b = 100 \Omega \text{cm}^2$ ,  $\alpha = 20 \Omega^{1/2} \text{cm}$ ,  $C_m = 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ,  $n = 0.95$ ). Der Pfeil zeigt die Parallelverschiebung des Anstiegs des Spektrums zu höheren Frequenzen bei Abnahme von  $A$ . Es werden folgende Werte für  $A$  eingesetzt (Einheit:  $\mu\text{F s}^{n-1} \text{cm}^{-2}$ ):  $5 \times 10^{-5}$ ,  $1.5 \times 10^{-5}$  und  $1 \times 10^{-5}$ .

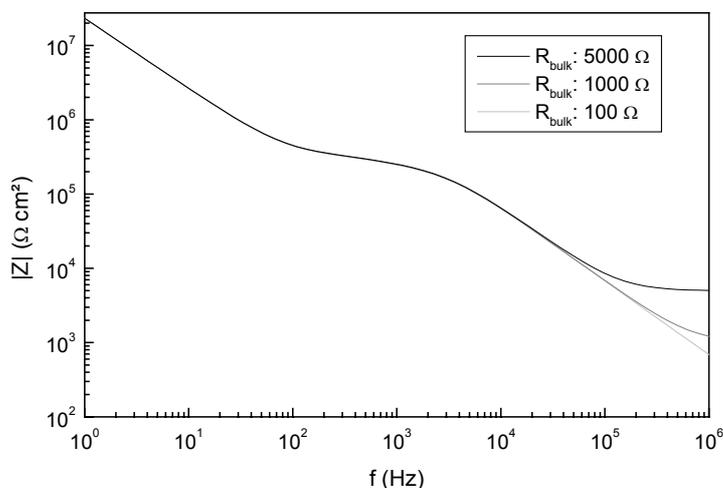


**Abb. 4.5:** Simulation der Impedanzspektren bei Variation von  $n$ , eines Parameters des CPE ( $R_b = 100 \Omega \text{cm}^2$ ,  $\alpha = 20 \Omega^{1/2} \text{cm}$ ,  $C_m = 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ,  $A = 1.5 \cdot 10^{-5} \mu\text{F s}^{n-1} \text{cm}^{-2}$ ).

Abbildung 4.6 zeigt simulierte Impedanzspektren bei Variation des Elektrolytwiderstandes  $R_{\text{bulk}}$ . Die Parameter  $R_b$ ,  $\alpha$ ,  $C_m$ ,  $n$  und  $A$  werden in diesem Fall konstant gehalten (siehe Bildunterschrift Abb. 4.6). In den vorangegangenen Simulationen wurde für den Parameter  $R_{\text{bulk}}$  als Standardwert  $1000 \Omega$  eingesetzt.

Bei Variation des Elektrolytwiderstandes erfolgt eine Parallelverschiebung des Impedanz-Plateaus im hochfrequenten Bereich ( $f > 100 \text{ kHz}$ ). Durch Zunahme des Wertes von  $R_{\text{bulk}}$  verschiebt sich dieses

Plateau zu höheren Impedanzbeträgen. Bei niedrigen Elektrolytwiderständen übernimmt die Membrankapazität im größten Teil dieses Bereiches die Hauptkomponente der Impedanz.

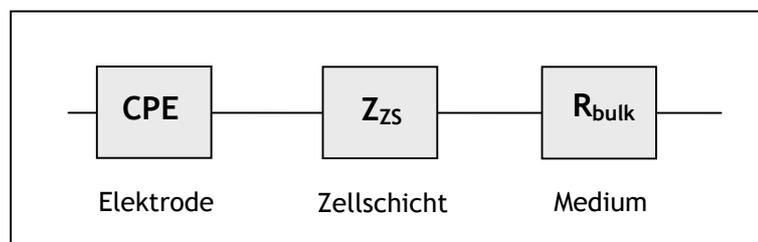


**Abb. 4.6:** Simulation der Impedanzspektren bei Variation von  $R_{\text{bulk}}$  ( $R_b = 100 \Omega \text{cm}^2$ ,  $\alpha = 20 \Omega^{1/2} \text{cm}$ ,  $C_m = 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ,  $A = 1.5 \cdot 10^{-5} \mu\text{F s}^{n-1} \text{cm}^{-2}$ ,  $n = 0.95$ ).

#### 4.1.2 Simulation der Spannungsprofile für die Elektroporation

Ebenso wie bei den nicht-invasiven impedanzspektroskopischen Messungen werden die Zellen bei der Elektroporation einer sinusförmigen Wechselspannung ausgesetzt jedoch mit einer vielfach höheren Amplitude und einer sehr viel geringeren Dauer. Um eine effektive Elektroporation (d.h. eine Permeabilisierung der Zellmembran) zu ermöglichen, muss ein Großteil der angelegten Spannung über der Zellschicht abfallen. Es wurden daher Simulationen durchgeführt, um die optimale Frequenz zur Elektroporation zu ermitteln.

Das Ersatzschaltbild (Abb. 4.7) stellt die Situation von adhärennten Zellen auf elektrisch leitenden Oberflächen vereinfacht dar. In diesem vereinfachten Schaltbild, sind die Zellparameter ( $R_b$ ,  $\alpha$  und  $C_m$ ) durch die komplexe Impedanz  $Z_{\text{ZS}}$  zusammengefasst.

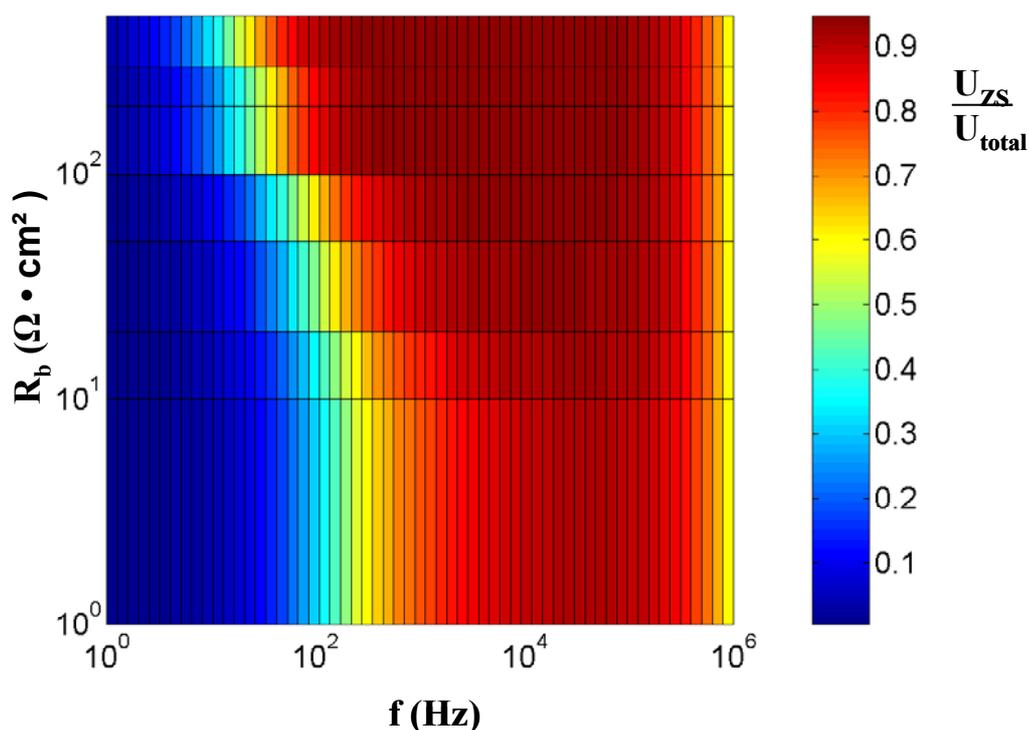


**Abb. 4.7:** Vereinfachtes Ersatzschaltbild für adhärennte Zellen auf elektrisch leitenden Oberflächen. CPE und  $R_{\text{bulk}}$  entsprechen den Parametern des ECIS-Modells,  $Z_{\text{ZS}}$  fasst die Komponenten der Zellschicht ( $R_b$ ,  $\alpha$ , und  $C_m$ ) zu einer Größe zusammen.

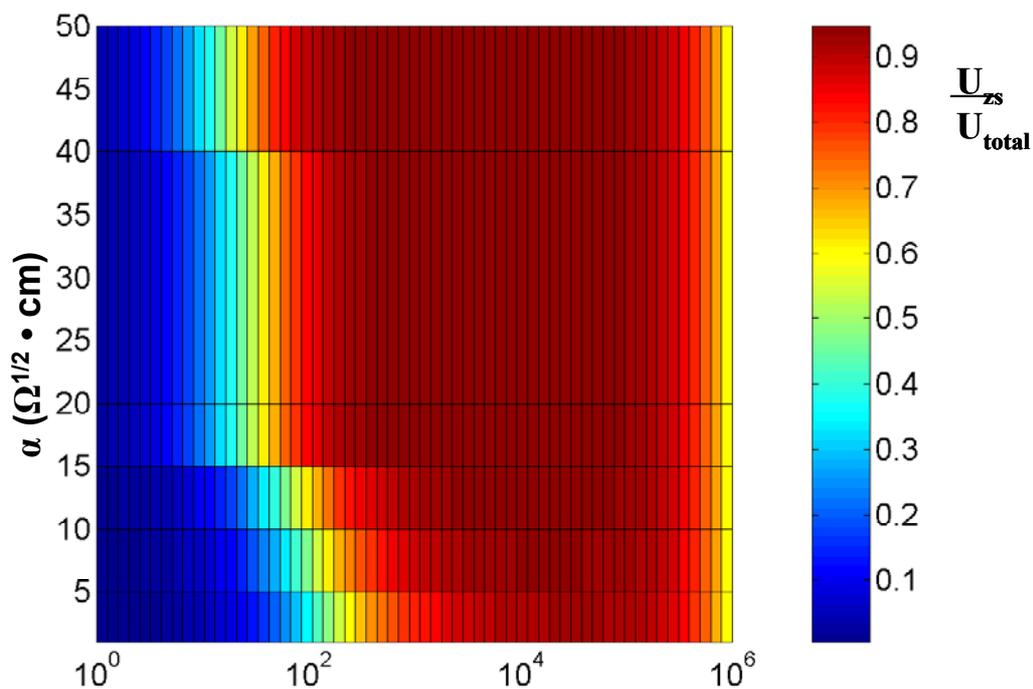
Das Ausmaß des Spannungsabfalls über den einzelnen Elementen des Ersatzschaltbildes der Elektroporation ist frequenzabhängig.

Unter Annahme von Erfahrungswerten für  $R_{\text{bulk}}$  ( $R_{\text{bulk}} = 1000 \Omega$ ) und für die Parameter des CPE ( $n = 0.95$ ;  $A = 1.5 \cdot 10^{-5} \mu\text{Fs}^{n-1} \text{cm}^{-2}$ ) für das elektrische System wird der Spannungsabfall über der Zellschicht als Funktion der Frequenz berechnet. Zur Berechnung der Impedanz der Zellschicht  $Z_{\text{ZS}}$  werden die Parameter  $R_b = 100 \Omega\text{cm}^2$ ,  $\alpha = 20 \Omega^{1/2} \text{cm}$  und  $C_m = 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  sowie eine Elektrodenfläche von  $5 \cdot 10^{-4} \text{cm}^2$  zugrunde gelegt. Ausgehend von dieser Anfangssituation werden nacheinander jeweils die Parameter  $R_b$ ,  $\alpha$  oder  $C_m$  unter Konstanthaltung der beiden anderen im physiologisch sinnvollen Rahmen variiert, um deren individuellen Einfluss auf das frequenzabhängige Spannungsprofil und damit die Auslegung der Elektroporationsparameter zu verfolgen.

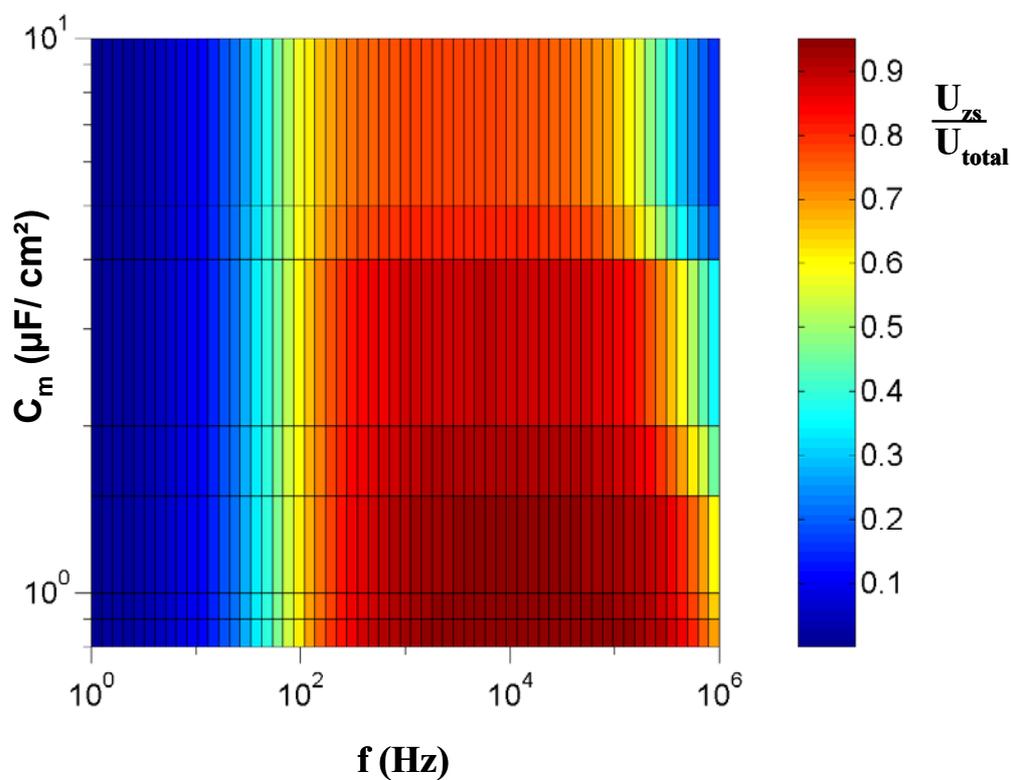
Alle Simulationen werden mit einem auf *MatLab* basierendem Programm durchgeführt. Die Frequenz wird in einem Bereich von 1 bis  $10^6$  Hz variiert. Zur Darstellung der Resultate dieser Simulationen, wird der relative Spannungs-abfall über der Zellschicht bezogen auf die applizierte Spannung durch eine Farbcodierung dargestellt. Die nachfolgenden Abbildungen (4.8 bis 4.10) zeigen die frequenzabhängigen Spannungsprofile über der Zellschicht als Funktion von  $R_b$ ,  $\alpha$  und  $C_m$ .



**Abb. 4.8:** Frequenzabhängiges Spannungsprofil über einer Zellschicht bei Variation des Parameters  $R_b$  ( $\alpha = 20 \Omega^{1/2}\text{cm}$ ,  $C_m = 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ). Der relative Spannungsabfall über der Zellschicht bezogen auf die insgesamt applizierte Spannung ist durch den rechts abgebildeten Farbcode wiedergegeben.



**Abb. 4.9:** Frequenzabhängiges Spannungsprofil über einer Zellschicht bei Variation des Parameters  $\alpha$  ( $R_b = 100 \Omega\text{cm}^2$ ,  $C_m = 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ). Der relative Spannungsabfall über der Zellschicht bezogen auf die insgesamt applizierte Spannung ist durch den rechts abgebildeten Farbcode wiedergegeben.



**Abb. 4.10:** Frequenzabhängiges Spannungsprofil über einer Zellschicht bei Variation des Parameters  $C_m$  ( $R_b = 100 \Omega\text{cm}^2$ ,  $\alpha = 20 \Omega^{1/2}\text{cm}$ ). Der relative Spannungsabfall über der Zellschicht bezogen auf die insgesamt applizierte Spannung ist durch den rechts abgebildeten Farbcode wiedergegeben.

Die berechneten Spannungsprofile zeigen, dass der überwiegende Teil der angelegten Spannung nur dann über der Zellschicht abfällt, wenn Wechselspannungen hoher Frequenz eingesetzt werden. Bei zu hohen ( $> 100$  kHz) bzw. zu niedrigen ( $< 5$  kHz) Frequenzen fällt nur ein Bruchteil der angelegten Spannung über der Zellschicht ab. Die abgebildeten Spannungsprofile zeigen außerdem, dass das zur Elektroporation geeignete Frequenzfenster umso größer wird, je größer die Werte für  $R_b$  und  $\alpha$  oder je kleiner die Werte für  $C_m$  werden.

Zellen mit wenig ausgeprägter Barrierefunktion ( $R_b$ ) und geringer Zell-Substrat-Adhäsion ( $\alpha$ ) sind daher nur mit Wechselspannungen hoher Frequenzen zu elektroporieren.

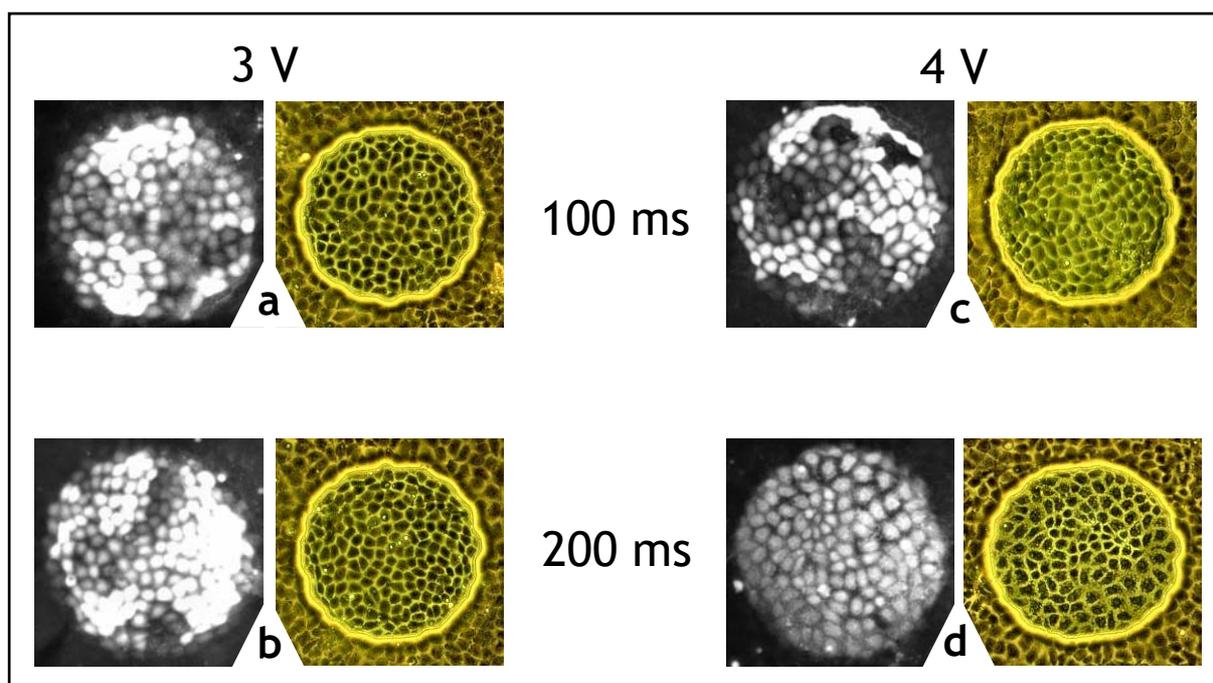
## 4.2 Elektroporation mit unterschiedlichen Farbstoffsonden

Unter Einbeziehung der theoretischen Überlegungen zur Elektroporation (siehe 4.1.2) sollen nun experimentell die Parameter ermittelt werden, die zu einer effektiven Elektroporation adhärenter Zellen führen. Für den Elektroporationspuls wird auf Basis der oben beschriebenen theoretischen Überlegungen als Frequenz 100 kHz gewählt. Die Höhe der Amplitude und die Dauer des Pulses sind die Parameter, welche durch Elektroporation einer konfluenten NRK-Zellschicht in Gegenwart des extrazellulär angebotenen Fluoreszenzfarbstoffes *Lucifer Yellow* ( $M = 0.5$  kDa) durch Detektion der Aufnahmeeffizienz optimiert werden sollen. Es folgen dann Untersuchungen zum Eintrag weiterer Fluoreszenz-markierter Makromoleküle, wie FITC-Dextran, FITC-BSA und TRITC-Phalloidin in konfluente Schichten von NRK- bzw. MDCK-II-Zellen.

### 4.2.1 Eintrag von *Lucifer Yellow* in NRK-Zellen

In Abbildung 4.11 ist der erfolgreiche Eintrag des niedermolekularen membranimpermeablen Farbstoffes *Lucifer Yellow* in lebende NRK-Zellen deutlich zu erkennen. Bei einem Vergleich der Fluoreszenzbilder 4.11a und 4.11b ist ein erhöhter Eintrag des Farbstoffes bei Änderung der Pulsdauer von 100 auf 200 ms (und gleichbleibender Amplitude von 3 V) festzustellen. In beiden Fällen zeigen die Aufnahmen im Phasenkontrast eine intakte konfluente Zellschicht. Ein Vergleich der Fluoreszenzaufnahmen 4.11a und 4.11c zeigt, dass eine Erhöhung der Amplitude von 3 auf 4 V bei gleicher Pulsdauer (100 ms) nicht zu einer erhöhten Farbstoffaufnahme, jedoch zu leichten Fehlstellen in der Zellschicht führt. Eine Erhöhung der Pulsdauer auf 200 ms bei einer Amplitude von 4 V führt zu einer starken Veränderung der Zellschicht auf der Elektrode, wie in Abbildung 4.11d (Phasenkontrastaufnahme) zu sehen ist.

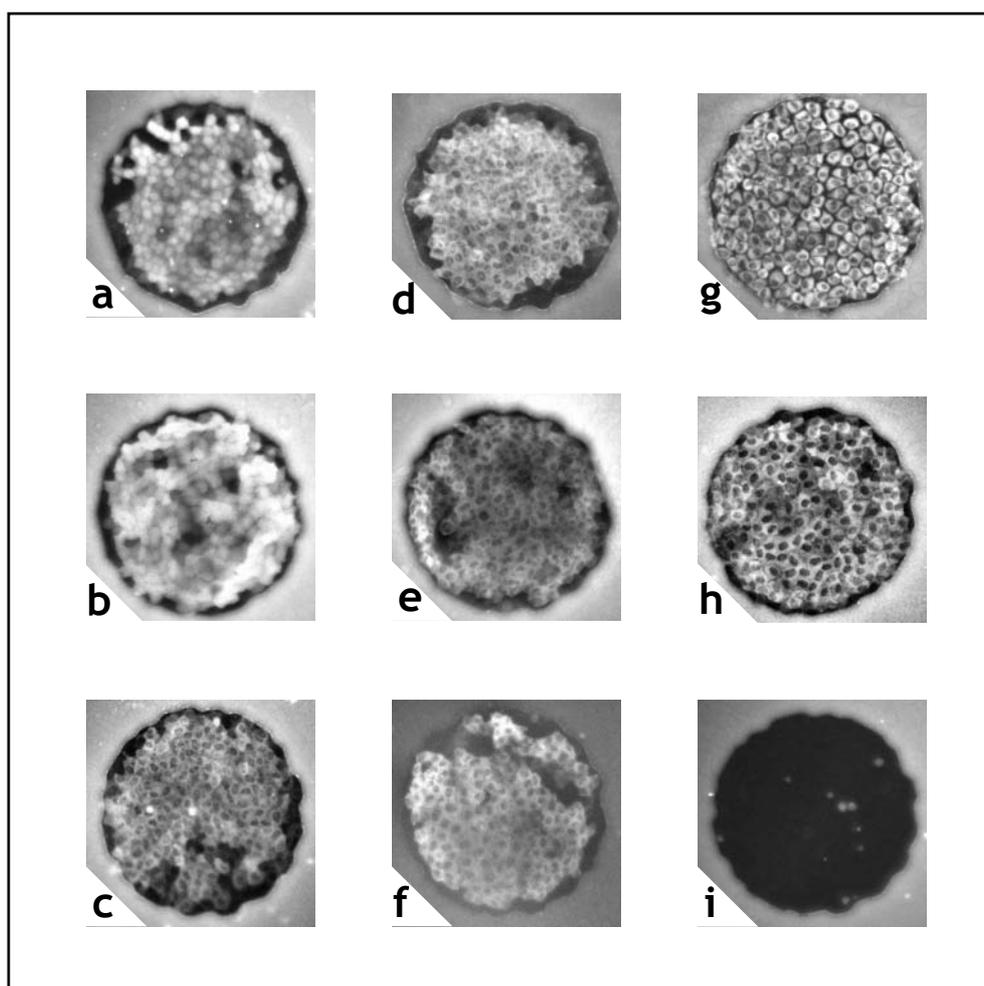
Aufgrund dieser Beobachtungen werden, soweit nicht anders angegeben, bei allen weiteren Elektroporationen die folgenden Parameter für den Elektroporationspuls verwendet:  $f = 100$  kHz,  $A = 3$  V und  $\tau = 200$  ms.



**Abb. 4.11:** Mikroskopische Aufnahmen (jeweils links Fluoreszenz, rechts Phasenkontrast) von NRK-Zellschichten nach Elektroporation in Gegenwart von *Lucifer Yellow* ( $M = 0.5$  kDa,  $c = 2$  mg/ml). Der Durchmesser der Elektrodenfläche beträgt  $250 \mu\text{m}$ . Elektroporationsbedingungen ( $f = 100$  kHz):  $A = 3$  V,  $\tau = 100$  ms (a);  $A = 3$  V,  $\tau = 200$  ms (b);  $A = 4$  V,  $\tau = 100$  ms (c);  $A = 4$  V,  $\tau = 200$  ms (d)

#### 4.2.2 Eintrag von FITC-Dextran in NRK-Zellen

Um zu klären, ob die Beladungseffizienz von adhärennten Zellen bei der *in situ* Elektroporation abhängig ist von der Größe der extrazellulär angebotenen Moleküle, wurden nun NRK-Zellschichten in Gegenwart von Dextran zunehmenden Molekulargewichtes elektroporiert. In Abbildung 4.12 ist der erfolgreiche Eintrag von membranimpermeablen FITC-markierten Dextran in lebende NRK-Zellen deutlich zu erkennen. Von Bild 4.12a bis 4.12h steigt die Größe der eingetragenen Dextran-Moleküle von 4 kDa auf bis zu 2000 kDa. Die Elektroporationseffizienz liegt bei 95 - 100 %. In Bild 4.12a und 4.12b sind NRK-Zellen zu sehen, bei welchen die Elektroporation in Gegenwart von 4 bzw. 20 kDa FITC-Dextran erfolgte. Die Zellen zeigen in beiden Fällen eine homogene Färbung sowohl des Zytoplasmas, als auch des Zellkerns. Die Aufnahmen 4.12c bis 4.12h zeigen NRK-Zellen mit einer homogenen Färbung des Zytoplasmas durch FITC-Dextrane der Größe 40 bis 2000 kDa. Bei all diesen Aufnahmen ist jedoch keine Fluoreszenzfärbung der Zellkerne zu erkennen. Die Kontrolle (Aufnahme 4.12i) zeigt, dass ohne Elektroporationspuls kein Eintrag von FITC-Dextran in die Zellen erfolgt. Die Phasenkontrastaufnahmen zeigen durchweg intakte konfluente Zellschichten (Phasenkontrastaufnahmen nicht dargestellt).

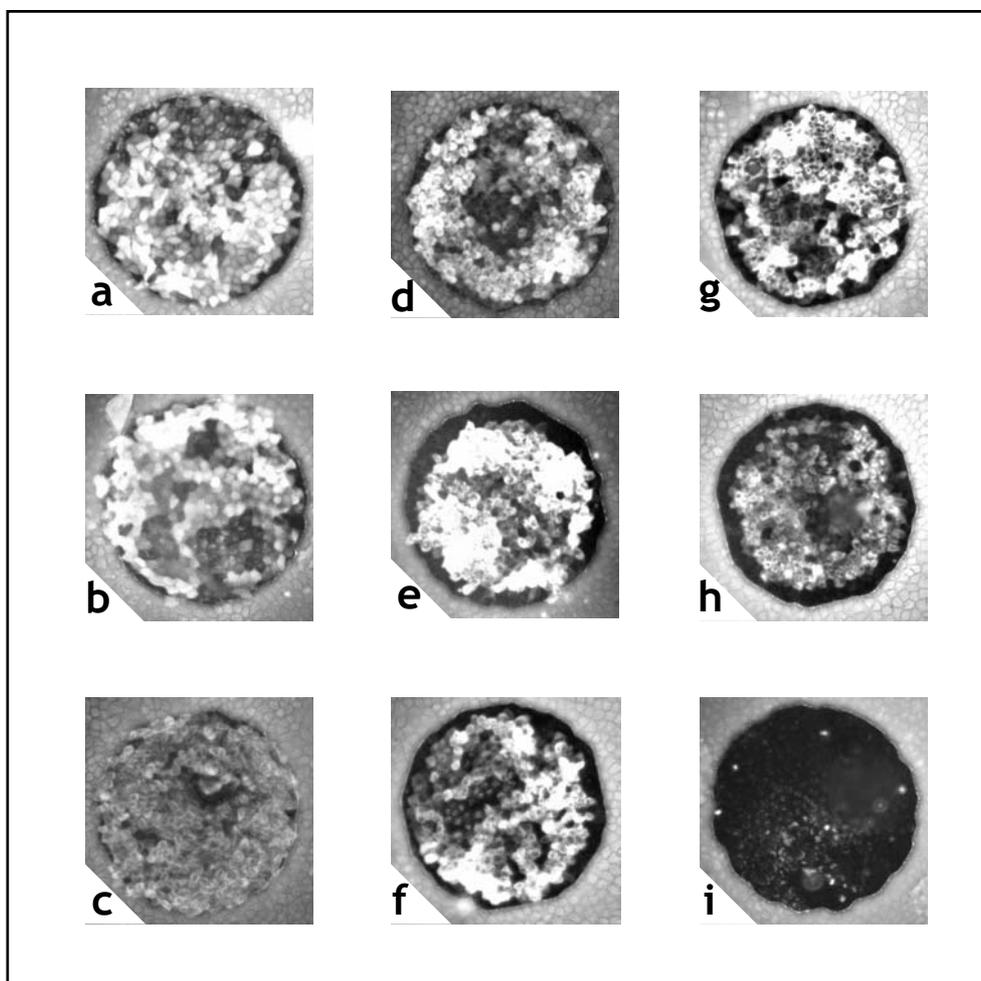


**Abb. 4.12:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von NRK-Zellschichten nach Elektroporation in Gegenwart von FITC-Dextran zunehmenden Molekulargewichtes ( $c = 8 \text{ mg/ml}$ ). Größe der eingetragenen FITC-Dextran-Moleküle: 4 kDa (a), 20 kDa (b), 40 kDa (c), 70 kDa (d), 150 kDa (e), 250 kDa (f), 500 kDa (g) und 2000 kDa (h). Elektroporationsbedingungen  $f = 100 \text{ kHz}$ ,  $A = 3 \text{ V}$ ,  $\tau = 200 \text{ ms}$ . Bei der Kontrolle erfolgte in Gegenwart von FITC-Dextran (4 kDa) keine Elektroporation. Der Durchmesser der Elektrodenfläche beträgt  $250 \mu\text{m}$ .

#### 4.2.3 Eintrag von FITC-Dextran in MDCK-II-Zellen

Um zu überprüfen, ob Moleküle verschiedener Größe durch *in situ* Elektroporation auch in adhärenente Zellen mit anderen elektrischen Parametern eingebracht werden können, wurden MDCK II-Zellen ebenfalls in Gegenwart von extrazellulär angebotenen FITC-Dextran zunehmender Molekülgröße elektropermeabilisiert. In Abbildung 4.13 ist der erfolgreiche Eintrag von membranimpermeablen FITC-markierten Dextran in lebende MDCK-II-Zellen zu erkennen. Die Elektroporationseffizienz bei 85 - 100 %. Ebenso wie bei der Elektroporation von NRK-Zellen (siehe Abschnitt 4.2.2) ist auch in diesem Fall eine homogene Färbung von Zytoplasma und Zellkern zu erkennen, wenn die Zellen in Gegenwart von 4 bzw. 20 kDa FITC-Dextran elektroporiert wurden (Bild 4.13a und 4.13b). Bei Verwendung größerer FITC-Dextran-Moleküle (40 bis 2000 kDa) zeigen

die MDCK II-Zellen ebenfalls eine homogene Färbung des Zytoplasmas, jedoch keine Anfärbung des Zellkerns (Bild 4.13c bis 4.13h). Die Kontrolle (Aufnahme 4.13i) zeigt, dass ohne Elektropuls kein Eintrag von FITC-Dextran in die Zellen erfolgt.

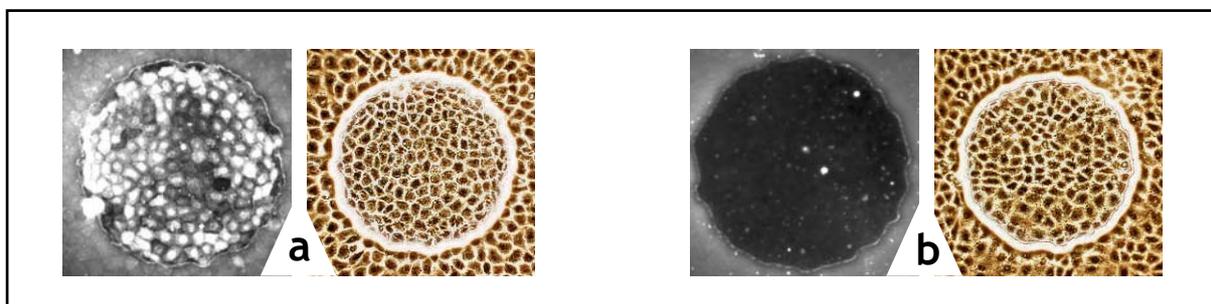


**Abb. 4.13:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von MDCK-II-Zellschichten nach Elektroporation in Gegenwart von FITC-Dextran ( $c = 8 \text{ mg/ml}$ ). Größe der eingetragenen FITC-Dextran-Moleküle: 4 kDa (a), 20 kDa (b), 40 kDa (c), 70 kDa (d), 150 kDa (e), 250 kDa (f), 500 kDa (g) und 2000 kDa (h). Elektroporationsbedingungen  $f = 100 \text{ kHz}$ ,  $A = 3 \text{ V}$ ,  $\tau = 200 \text{ ms}$ . Bei der Kontrolle (i) erfolgte in Gegenwart von FITC-Dextran (4 kDa) keine Elektroporation. Der Durchmesser der Elektrodenfläche beträgt  $250 \mu\text{m}$ .

#### 4.2.4 Eintrag von FITC-BSA in NRK-Zellen

Es sollte nun gezeigt werden, dass es durch *in situ* Elektroporation von NRK-Zellen ebenfalls möglich ist, Proteine in das Zytoplasma einzubringen. Abbildung 4.14 zeigt mikroskopische Aufnahmen von NRK-Zellen, die in Gegenwart von FITC-BSA ( $M = 67 \text{ kDa}$ ) elektroporiert wurden. Wie Bild 4.14a zeigt, sind alle Zellen auf der Elektrodenfläche nach der Elektroporation deutlich angefärbt, jedoch sehr viel stärker im Bereich des Zellkerns als im Bereich des Zytoplasmas. Die

Phasenkontrastaufnahme zeigt auch hier eine intakte konfluente Zellschicht. Bild 4.14b zeigt die Kontrolle, die mit FITC-BSA versetzt, aber nicht elektroporiert wurde. Der Zelllayer ist auch hier intakt (Phasenkontrast), es ist jedoch keine Anfärbung der Zellen zu erkennen.

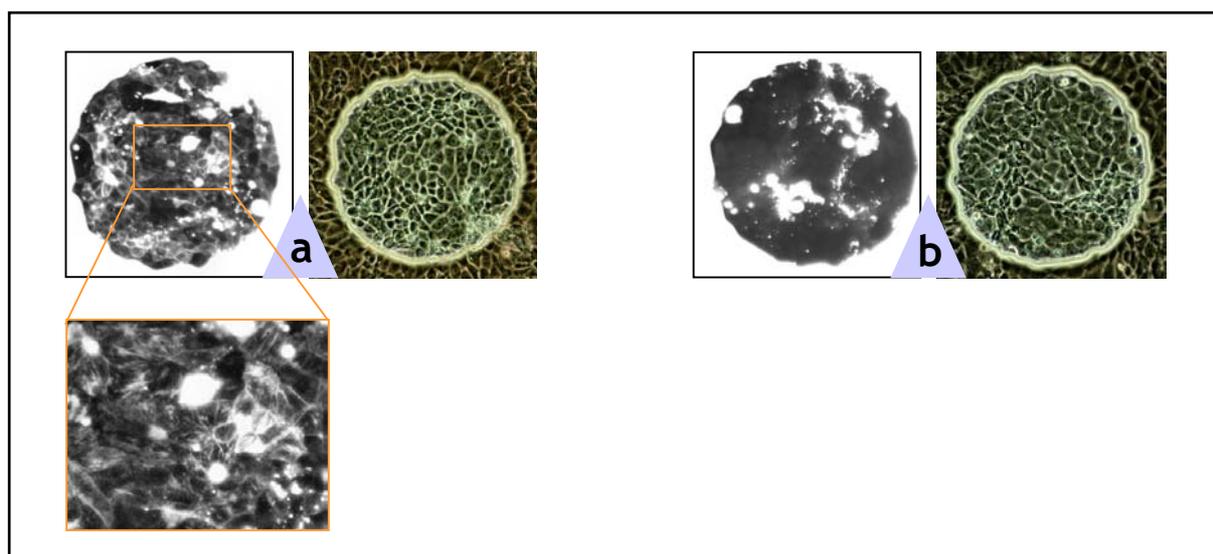


**Abb. 4.14:** Mikroskopische Aufnahmen (Fluoreszenz und Phasenkontrast) von NRK-Zellschichten nach Elektroporation in Gegenwart von FITC-BSA ( $M = 67$  kDa,  $c = 10$  mg/ml). Elektroporationsbedingungen:  $f = 100$  kHz,  $A = 3$  V,  $\tau = 200$  ms (a). Bei der Kontrolle (b) erfolgte in Gegenwart von FITC-BSA keine Elektroporation. Der Durchmesser der Elektrodenfläche beträgt  $250$   $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.5 Eintrag von TRITC-Phalloidin in NRK-Zellen

Phalloidin gehört zur Klasse der Phallotoxine, die in verschiedenen Knollenblätterpilzen vorkommen (*Amanita phalloides*). Es hat die Fähigkeit, sich an die Seiten der Actin-Filamente zu heften und sie gegenüber einer Depolymerisation zu stabilisieren. Trägt das Phalloidin-Molekül eine Fluoreszenzmarkierung, ist es möglich, die Mikrofilamente der Zellen nach der Bindung des Phalloidins fluoreszenzmikroskopisch sichtbar zu machen.

Abbildung 4.15 zeigt mikroskopische Aufnahmen von NRK-Zellen, die in Gegenwart von TRITC-Phalloidin elektroporiert wurden. Wie in Bild 4.15a zu sehen, sind die Zellen auf der Elektrodenfläche nach der Elektroporation deutlich angefärbt. Die angefärbten Aktinfilamente der NRK-Zellen sind gut zu erkennen. Die Phasenkontrastaufnahme zeigt auch hier nach der Elektroporation eine intakte konfluente Zellschicht. Bild 4.15b zeigt die Kontrolle; Die Zellen wurden ebenfalls mit TRITC-Phalloidin versetzt, jedoch nicht elektroporiert. Der Zelllayer ist auch hier intakt (Phasenkontrast), es ist jedoch keine Anfärbung innerhalb der Zellen zu erkennen. Beide Fluoreszenzbilder der Abbildung 4.15 zeigen kleine runde Bereiche mit starker Fluoreszenzintensität. Diese sind auf Molekülaggregate von TRITC-Phalloidin im zellumgebenden Medium zurückzuführen.



**Abb. 4.15:** Mikroskopische Aufnahmen (Fluoreszenz und Phasenkontrast) von NRK-Zellschichten nach Elektroporation in Gegenwart von TRITC-Phalloidin ( $M = 1.3 \text{ kDa}$ ,  $c = 0.65 \mu\text{g/ml}$ ). Elektroporationsbedingungen:  $f = 100 \text{ kHz}$ ,  $A = 3 \text{ V}$ ,  $\tau = 200 \text{ ms}$  (a). Bei der Kontrolle (b) erfolgte in Gegenwart von TRITC-Phalloidin keine Elektroporation. Der Durchmesser der Elektrodenfläche beträgt  $250 \mu\text{m}$ .

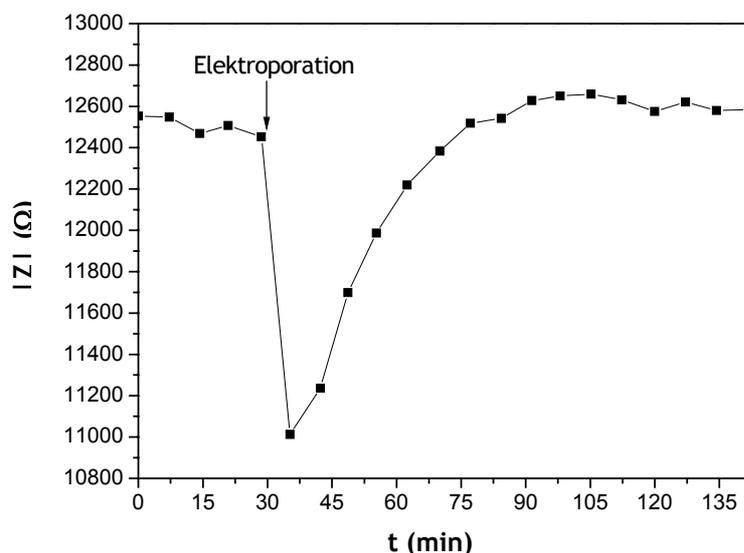
### 4.3 Einfluss der Elektroporation auf die Impedanz der Zellschicht

Um den Einfluss des Elektroporationspulses auf die morphologischen Eigenschaften der Zellen zu verfolgen, wurde die Impedanz der Zellschichten vor und unmittelbar nach der Elektroporation per ECIS gemessen. Als Elektroporationsbedingungen wurden die Standardparameter gewählt, die sich bei dem Eintrag von Farbstoffsonden als sehr effektiv erwiesen haben ( $f = 100 \text{ kHz}$ ,  $A = 3 \text{ V}$ ,  $\tau = 200 \text{ ms}$ ). Da zwischen den einzelnen Elektroporationsexperimenten (siehe 4.2.1 bis 4.2.5) keine grundlegenden Unterschiede in den Änderungen der Impedanzspektren zu sehen waren, werden hier exemplarisch sowohl die gemessenen Impedanzwerte, als auch die Auswertungen nach  $R_b$ ,  $\alpha$  und  $C_m$  von NRK- und MDCK II-Zellen grafisch dargestellt. Diese drei Parameter ermöglichen eine sehr sensitive Beschreibung der morphologischen Eigenschaften der Zellen.  $R_b$  stellt ein quantitatives Maß für die Dichtigkeit der Zell-Zell-Kontakte dar,  $\alpha$  beschreibt den Impedanzbeitrag aus dem Zell-Substrat-Kontakt und wird durch den Abstand von basaler Membran und Substrat beeinflusst und  $C_m$  entspricht der Kapazität der Plasmamembran.

#### 4.3.1 Elektroporation von NRK-Zellen

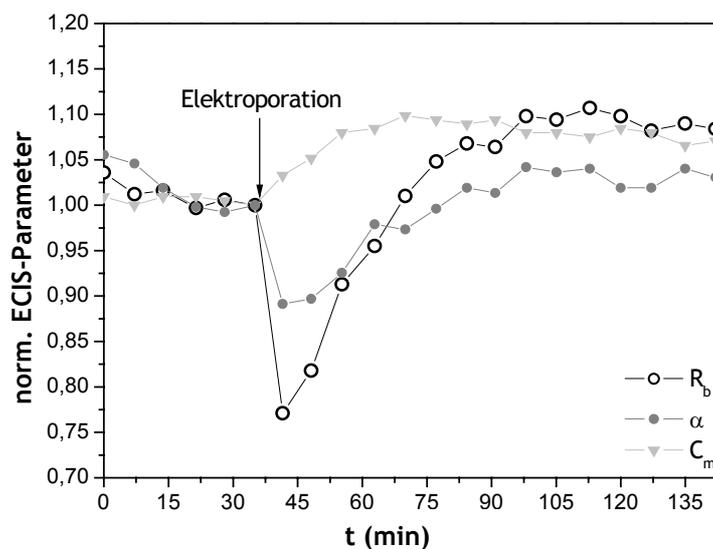
Abbildung 4.16 zeigt repräsentativ den typischen Verlauf der gemessenen Impedanz einer NRK-Zellschicht bei einer Frequenz von  $10 \text{ kHz}$ , sowohl vor als auch unmittelbar nach dem Elektroporationspuls ( $f = 100 \text{ kHz}$ ,  $A = 3 \text{ V}$ ,  $\tau = 200 \text{ ms}$ ). Es wurde die Frequenz von  $10 \text{ kHz}$  gewählt,

da sich in einem Bereich von 4 bis 10 kHz am sensitivsten Änderungen in der Gesamtimpedanz von NRK-Zellschichten detektieren lassen. Der Verlauf des Graphen in Abbildung 4.16 zeigt ein sofortiges Absinken der Gesamtimpedanz nach dem Elektroporationsereignis. Der Wert für die Gesamtimpedanz der NRK-Zellen sinkt auf 88 % des Ausgangswertes vor dem Puls. Außerdem ist zu beobachten, dass der Wert der Impedanz innerhalb der folgenden 70 min stetig zunimmt und bereits nach 50 min das Niveau des Anfangswertes vor der Elektroporation erreicht.



**Abb. 4.16:** Repräsentativer Zeitverlauf der Impedanz einer NRK-Zellschicht bei einer Frequenz von 10 kHz vor und nach der Elektroporation. Elektroporationsparameter:  $f = 100$  kHz,  $A = 3$  V,  $\tau = 200$  ms. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Elektroporation.

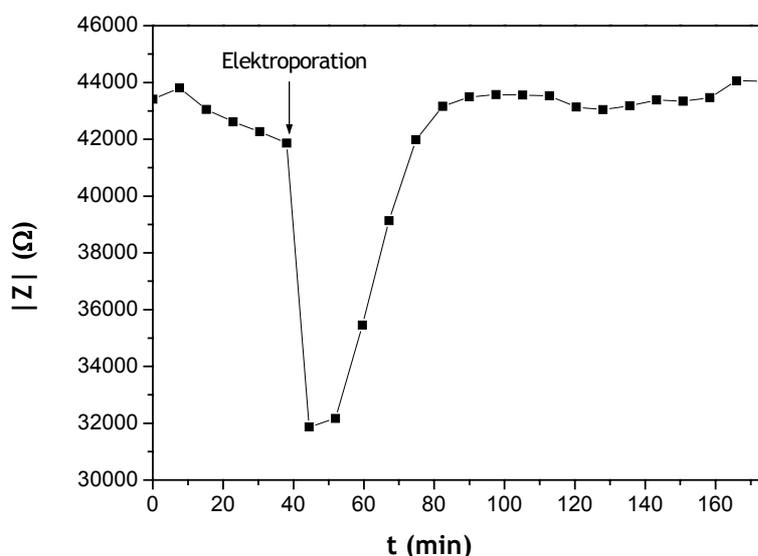
In Abbildung 4.17 ist der zeitliche Verlauf der ECIS-Parameter  $R_b$ ,  $\alpha$  und  $C_m$  vor und nach dem Elektroporationsereignis von NRK-Zellen dargestellt. Zu sehen ist eine starke Abnahme der Dichtigkeit der Zell-Zell-Kontakte ( $R_b$ ) unmittelbar nach dem Elektroporationspuls auf ca. 75 % des Ausgangswertes. Nach dieser Abnahme erfolgt eine rasche Zunahme der Werte bis nach ca. 35 min der Ausgangswert wieder erreicht ist. Danach steigt der Wert für  $R_b$  noch etwas weiter an und pendelt sich dann auf einem Niveau ein, dass ca. 10 % über dem Anfangswert liegt. Der Zell-Substrat-Abstand ( $\alpha$ ) erfährt ebenfalls unmittelbar nach dem Elektroporationspuls eine starke Änderung. Der Wert für  $\alpha$  fällt auf ca. 90 % des Ausgangswertes ab, gefolgt von einer stetigen Zunahme bis nach ca. 50 min der Ausgangswert wieder erreicht ist. Auch  $\alpha$  nimmt nach diesem Erreichen des Ausgangswertes noch weiter zu und pendelt sich dann auf einem Niveau ein, dass ca. 4-5 % über dem Ausgangsniveau liegt. Die Membrankapazität der NRK-Zellen nimmt nach dem elektrischen Puls kontinuierlich zu und erreicht nach 40 min ein Plateau, dass wie bei  $R_b$ , etwa 10 % über dem Ausgangswert liegt.



**Abb. 4.17:** Einfluss der Elektroporation auf die ECIS-Parameter  $R_b$ ,  $\alpha$  und  $C_m$  von NRK-Zellen. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der normierten ECIS-Parameter vor und nach dem elektrischen Puls (Pfeil).  $R_b(0) = 5.0 \Omega\text{cm}^2$ ,  $\alpha(0) = 5.2 \Omega^{0.5}\text{cm}$  und  $C_m(0) = 2.1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  geben die Absolutwerte dieser Parameter direkt vor dem Elektroporationspuls an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf  $R_b(0)$ ,  $\alpha(0)$  und  $C_m(0)$  normiert. Elektroporationsparameter:  $f = 100 \text{ kHz}$ ,  $A = 3 \text{ V}$ ,  $\tau = 200 \text{ ms}$ .

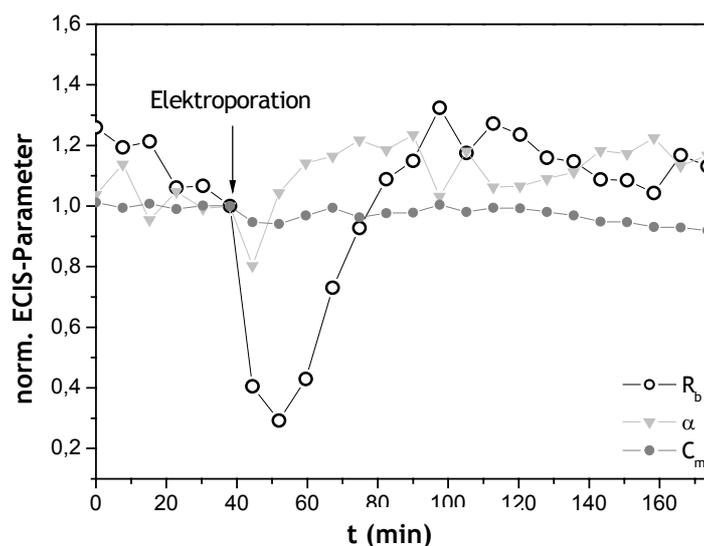
### 4.3.2 Elektroporation von MDCK II-Zellen

Abbildung 4.18 zeigt repräsentativ den typischen Verlauf der gemessenen Impedanz einer MDCK II-Zellschicht bei einer Frequenz von 2 kHz, sowohl vor als auch unmittelbar nach der Elektroporation ( $f = 100 \text{ kHz}$ ,  $A = 3 \text{ V}$ ,  $\tau = 200 \text{ ms}$ ). Es wurde in diesem Fall eine Frequenz von 2 kHz gewählt, da sich in diesem Bereich am sensitivsten Änderungen in der Gesamtimpedanz von MDCK II-Zellschichten detektieren lassen. Da MDCK II-Zellschichten eine größere Barrierefunktion (repräsentiert durch die ECIS-Parameter  $R_b$  und  $\alpha$ ) als NRK-Zellschichten aufweisen, verschiebt sich hier die Sensitivität hin zu kleiner Frequenzen (siehe auch Abschnitt 4.1.1.1). Der Verlauf des Graphen in Abbildung 4.18 zeigt ein sofortiges Absinken der Gesamtimpedanz der MDCK II-Zellen nach dem Elektroporationspuls, vergleichbar mit dem Verlauf der Impedanz von NRK-Zellen (siehe 4.3.1). Der Wert für die Gesamtimpedanz der MDCK II-Zellen sinkt hierbei auf 76 % des Ausgangswertes vor dem Puls. Auch hier ist zu beobachten, dass der Wert der Impedanz innerhalb der nachfolgenden 60 min stetig zunimmt und bereits nach 40 min das Niveau des Anfangswertes vor der Elektroporation erreicht.



**Abb. 4.18:** Repräsentativer Zeitverlauf der Impedanz einer MDCK II-Zellschicht bei einer Frequenz von 2 kHz vor und nach der Elektroporation. Elektroporationsparameter:  $f = 100$  kHz,  $A = 3$  V,  $\tau = 200$  ms. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Elektroporation.

In Abbildung 4.19 ist der zeitliche Verlauf der ECIS-Parameter  $R_b$ ,  $\alpha$  und  $C_m$  vor und nach der Elektropermeabilisierung von MDCK II-Zellen repräsentativ dargestellt. Auch in diesem Fall erfolgt eine starke Abnahme der Dichtigkeit der Zell-Zell-Kontakte ( $R_b$ ) unmittelbar nach dem Elektroporationspuls auf ca. 30 % des Ausgangswertes. Die MDCK II-Zellschichten erholen sich ebenfalls rasch wieder, der Ausgangswert von  $R_b$  ist bereits bis nach ca. 40 min wieder erreicht ist. Danach steigt der Wert für  $R_b$  noch etwas weiter an wie auch schon bei NRK-Zellen beobachtet (siehe 4.3.1) und liegt gegen Ende der Messung 5 % über dem Anfangsniveau. Der Wert für  $\alpha$  erfährt ebenfalls eine Abnahme auf ca. 80 % des Ausgangswertes. Bereits nach 10 min erreicht  $\alpha$  wieder seinen Ausgangswert und gegen Ende der Messung liegt der Wert für  $\alpha$  ca. 15 % über dem Ausgangsniveau. Die Membrankapazität der MDCK II-Zellen ändert sich nach dem elektrischen Puls nicht.

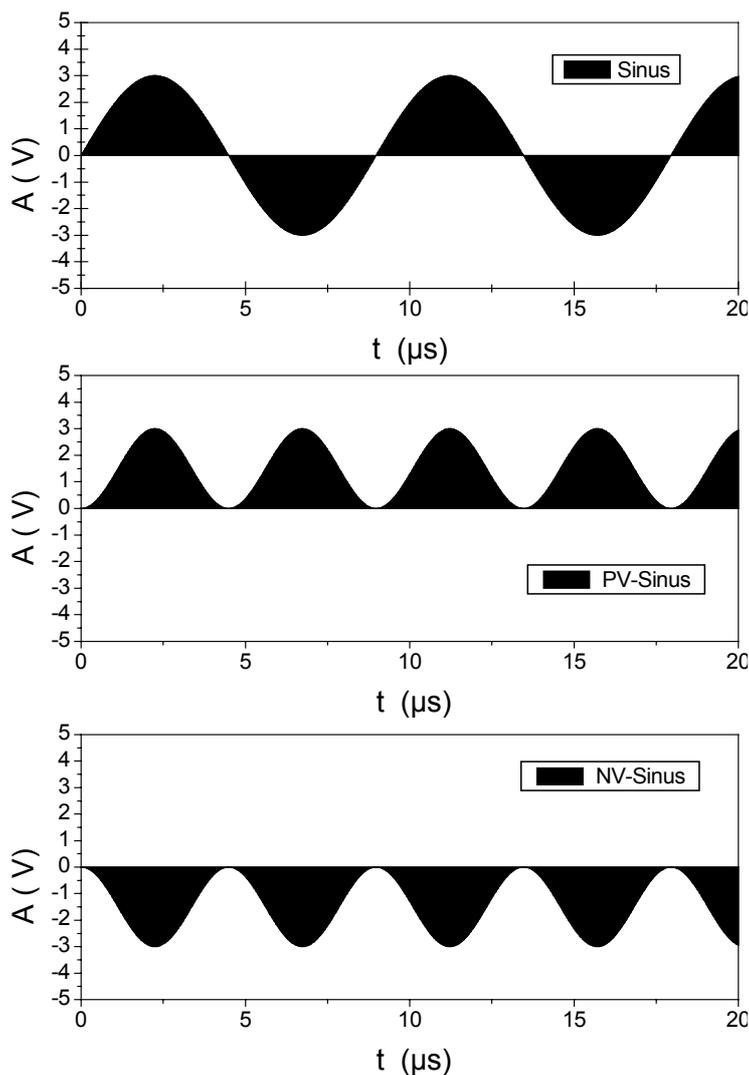


**Abb. 4.19:** Einfluss der Elektroporation auf die ECIS-Parameter  $R_b$ ,  $\alpha$  und  $C_m$  von MDCK II-Zellen. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der ECIS-Parameter vor und nach dem elektrischen Puls (Pfeil).  $R_b(0) = 19.7 \Omega\text{cm}^2$ ,  $\alpha(0) = 12.0 \Omega^{0.5}\text{cm}$  und  $C_m(0) = 5.1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  geben die Absolutwerte dieser Parameter direkt vor dem Elektroporationspuls an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf  $R_b(0)$ ,  $\alpha(0)$  und  $C_m(0)$  normiert. Elektroporationsparameter:  $f = 100 \text{ kHz}$ ,  $A = 3 \text{ V}$ ,  $\tau = 200 \text{ ms}$ .

#### 4.4 Elektroporation bei Variation der Pulsform

Da bei der Elektroporation mit Wechselstrompulsen der normalen Sinus-Form die Arbeitselektrode unter der Zellschicht eine wechselnde Polarisation erfährt, kann kein elektrophoretischer Effekt auf im Medium befindliche geladene Makromoleküle ausgeübt werden. Golzio et al. (1998, 2002) vermuten, dass Nukleinsäuren durch elektrophoretische Kräfte des externen elektrischen Feldes bei der Elektroporation in die Zelle gelangen. Es wurden daher in der vorliegenden Arbeit Elektroporationsexperimente an NRK-Zellen durchgeführt, bei denen die Pulsparameter, insbesondere die Pulsform, variiert wurden. Bei den verschiedenen Pulsformen, die hierbei eingesetzt wurden, handelt es sich um den in allen vorherigen Experimenten eingesetzten Sinus (bipolar), sowie zusätzlich um den ins Positive verschobene unipolaren Sinus (PV-Sinus) und den ins Negative verschobene unipolare Sinus (NV-Sinus) (siehe Abb. 4.20).

Die Auswirkungen der unterschiedlich dimensionierten Elektroporationspulse auf die Elektroporationseffizienz (*Dye-Uptake*) sowie die mit dem Puls einhergehende Invasivität (*Micromotion*- und *Recovery*-Studien) werden nun im Folgenden vergleichend dargestellt.



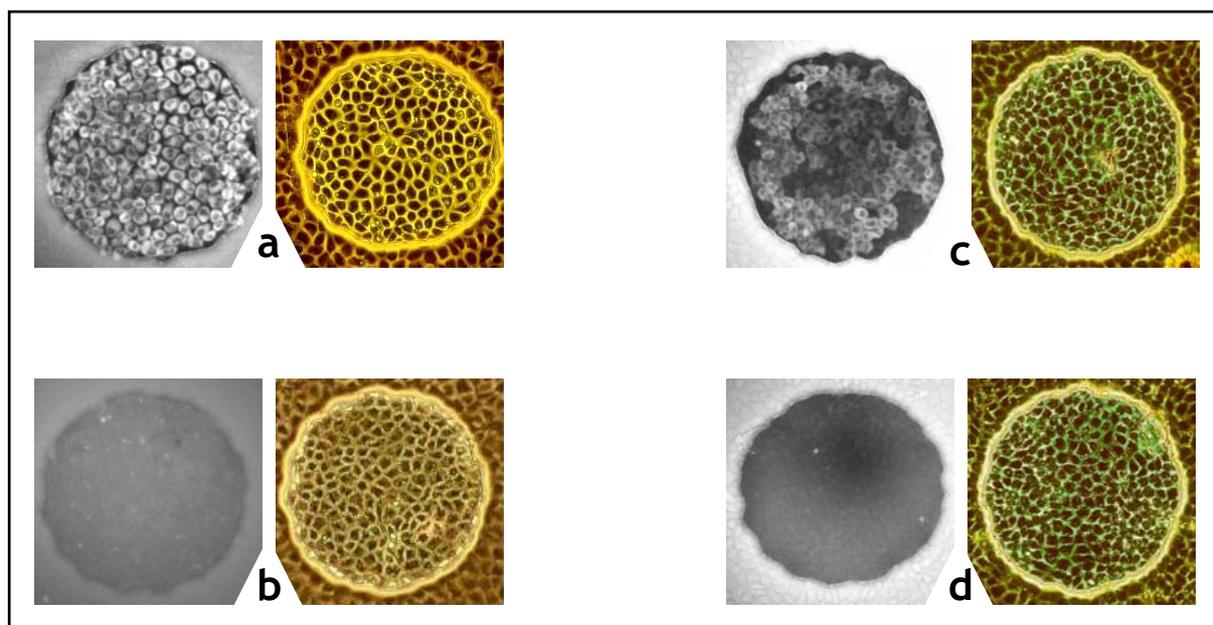
**Abb. 4.20:** Vergleichende Gegenüberstellung der verwendeten Pulsformen. Bei der in der vorliegenden Arbeit applizierten Frequenz der Elektroporationspulse von 100 kHz beträgt die Periodendauer 10  $\mu$ s. Es wurden Spannungsamplituden von  $A = 3$  V (wie dargestellt) eingesetzt.

#### 4.4.1 Elektroporation unter Standardbedingungen

Zunächst wurde unter Beibehaltung der Standard elektroporationsparameter ( $f = 100$  kHz,  $A = 3$  V,  $\tau = 200$  ms) die Pulsform wie oben angegeben variiert.

##### *Dye-Uptake*

Die Abbildung 4.21 zeigt fluoreszenzmikroskopische sowie phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen zellbedeckter ECIS-Elektroden nach Elektroporation mit FITC-Dextran ( $M = 500$  kDa,  $c = 8$  mg/ml).

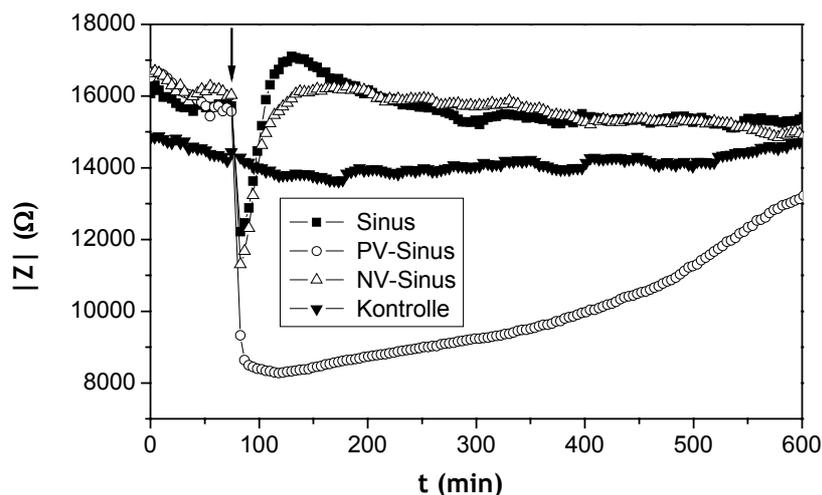


**Abb. 4.21:** Fluoreszenz- und phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von zellbedeckten ECIS-Elektroden nach Elektroporation in Gegenwart von FITC-Dextran ( $M = 500$  kDa,  $c = 8$  mg/ml). Die Pulsbedingungen wurden wie folgt gewählt:  $f = 100$  kHz,  $A = 3$  V,  $\tau = 200$  ms, Pulsform (a) Sinus, (b) PV-Sinus sowie (c) NV-Sinus. Bei der Kontrolle (d) erfolgte in Gegenwart von FITC-Dextran keine Elektroporation. Der Durchmesser der Elektrodenfläche beträgt  $250$   $\mu\text{m}$ .

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Aufnahme von FITC-Dextran (500 kDa) bei der Elektroporation unter Verwendung des normalen Sinus-Pulses (Abb. 4.21a) am effizientesten war. Alle NRK-Zellen auf der Elektrodenfläche konnten mit FITC-Dextran beladen werden. Bei der Elektroporation mit dem NV-Sinus-Puls (Abb. 4.21c) konnte in ca. 90 % der Zellen FITC-Dextran eingebracht werden. Dabei ist jedoch die Farbstoffverteilung inhomogener und die Farbstoffaufnahme geringer als bei Verwendung des reinen Sinus-Pulses. Durch Elektroporation mit dem PV-Sinus-Puls (Abb. 4.21b) konnte kein Eintrag von FITC-Dextran in NRK-Zellen beobachtet werden. Die Kontrolle (Abb. 4.21d), bei der in Gegenwart von FITC-Dextran keine Elektroporation erfolgte, zeigt ebenfalls keine Farbstoffaufnahme. Sie wird im folgenden nicht mehr abgebildet, obgleich sie bei allen Experimenten mitgeführt wurde.

#### ***ECIS-Studien im Recovery Modus***

Abbildung 4.22 zeigt den zeitlichen Verlauf des Impedanzbetrages  $|Z|$  bei einer Messfrequenz von 4 kHz vor und nach Elektroporation konfluenter NRK-Zellschichten mit verschiedenen Pulsformen unter Standardbedingungen. Der Elektroporationszeitpunkt ist in der Abbildung durch einen Pfeil gekennzeichnet.

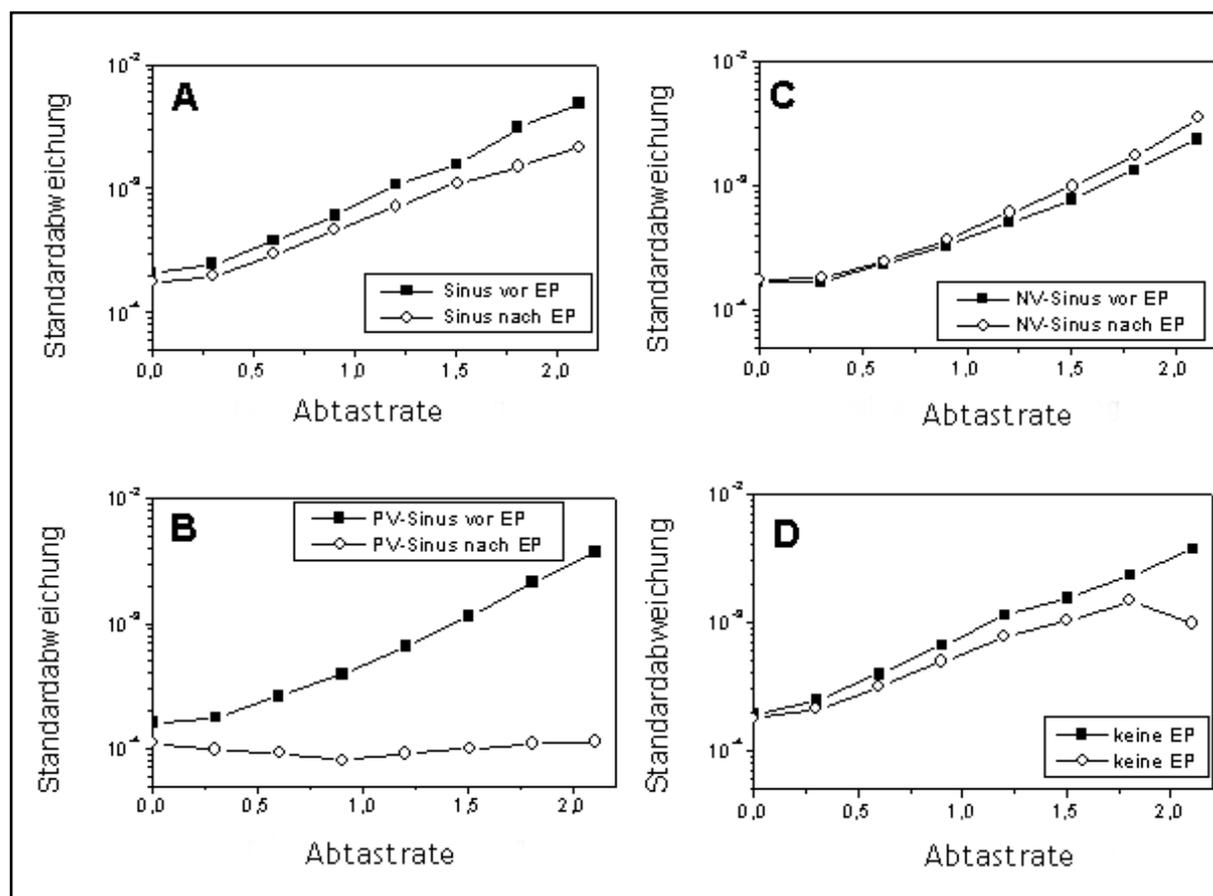


**Abb. 4.22:** Zeitverlauf der Impedanz bei einer Frequenz von 4 kHz einer NRK-Zellschicht vor und nach der Elektroporation mit unterschiedlichen Pulsformen (Sinus, PV-Sinus und NV-Sinus) sowie eine Kontrolle ohne Elektroporation. Elektroporationsparameter:  $f = 100$  kHz,  $A = 3$  V,  $\tau = 200$  ms. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Elektroporation.

Es ist deutlich erkennen, dass die Impedanzwerte bei der Elektroporation mit dem PV-Sinus-Puls signifikant stärker sinken als bei Verwendung einer normalen oder negativ verschobenen Sinus-Spannung. Dabei sinkt die Impedanz beim PV-Sinus etwa von 16000  $\Omega$  auf 8000  $\Omega$ , wohingegen sie bei dem normalen Sinus-Puls nur auf 12000  $\Omega$  sinkt und somit nur etwa die Hälfte an Änderung erfährt. Bei der Elektroporation mit dem NV-Sinus-Puls sinkt die Impedanz stärker bis auf einen Minimalwert von 11000  $\Omega$ . Während die Zellen sowohl bei dem NV-Sinus als auch bei dem normalen Sinus schon nach 30 min ihre Anfangsimpedanzbeträge wiedererlangt haben, erholen sie sich bei dem PV-Sinus sehr viel langsamer. Nach 9 h beträgt die Impedanz erst 13000  $\Omega$ , bei einem Anfangswert von 16000  $\Omega$  vor der Elektroporation. Die Kontrolle, bei der die NRK-Zellen nicht elektroporiert wurden, zeigt weitgehend unveränderte Impedanzwerte, die um einen Wert von 15000  $\Omega$  schwanken. Die Kontrolleexperimente werden bei den nächsten Messungen nicht mehr gezeigt, da sie bei allen Messungen sehr ähnlich verlaufen.

#### **ECIS Studien im Micromotion Modus**

Bei allen Untersuchungen wurde die Motilität der Zellen durch ECIS-Messungen im *Micromotion*-Modus vor und nach der Elektroporation (EP) charakterisiert. Die beobachteten Änderungen der Impedanzfluktuationen sind ein Maß für die Änderung der Zellmotilität und der metabolischen Aktivität der Zellen. Abbildung 4.23 zeigt die Analyse der *Micromotion*-Daten durch Berechnung der Standardabweichung der Inkremente als Funktion der Abtastrate in doppeltlogarithmischer Darstellung.



**Abb. 4.23:** Standardabweichung der Inkremente bei verschiedenen Pulsformen: Sinus (A), PV-Sinus (B), NV-Sinus (C) vor und nach der Elektroporation (EP) sowie eine Kontrolle (D), bei der keine EP erfolgte, in Abhängigkeit von der Abtastrate. Elektroporationsparameter:  $f = 100 \text{ kHz}$ ,  $A = 3 \text{ V}$ ,  $\tau = 200 \text{ ms}$ .

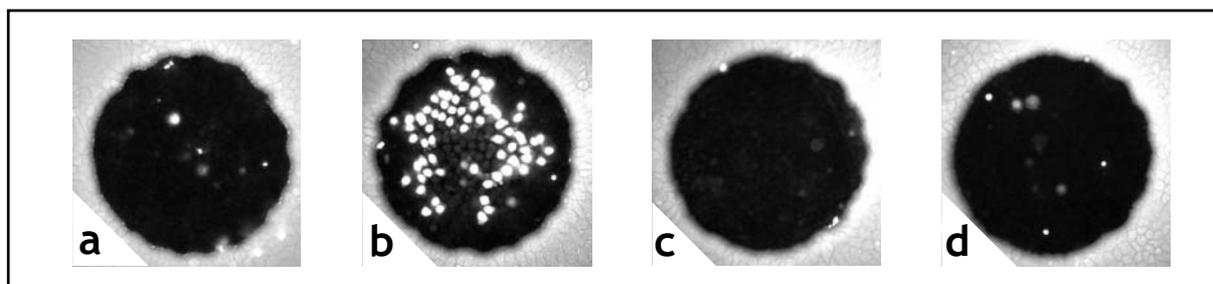
Es ist eine deutliche Abnahme der Standardabweichung nach der Elektroporation mit dem PV-Sinus zu sehen (Abb. 4.23B). Nach der Elektroporation beträgt die Steigung der Geraden annähernd Null, während sie vor der Elektroporation etwa 0.6 betrug. Diese Beobachtung gilt für die Elektroporation mit dem Sinus (Abb. 4.23A) und NV-Sinus (Abb. 4.23C) nicht. Dort ist die Gerade nach der Elektroporation nur leicht zu niedrigeren Standardabweichungen parallel verschoben bzw. beim NV-Sinus liegen beide Geraden vor und nach der Elektroporation bei gleichen Werten. Die Kontrolle (Abb. 4.23D) zeigt ebenfalls nur eine leichte Verschiebung der Geraden zu niedrigeren Werten. Dies bedeutet, dass die Zellmotilität nach der Elektroporation mit dem PV-Sinus stark vermindert ist, während sich die Zellbewegung durch die Elektroporation mit dem reinen Sinus-Puls und dem NV-Sinus nicht signifikant ändert.

#### **Lebend-Tot-Test**

Um die Überlebensrate der NRK-Zellschichten zu detektieren, wurde 2 h nach der Elektroporation ein Lebend-Tot-Test durchgeführt. Der Test basiert darauf, dass der Farbstoff Ethidium-Homodimer

die intakte Plasmamembran einer lebenden Zelle nicht überwinden kann und daher keine Anfärbung der DNA im Nukleus erfolgt. Tote Zellen mit irreversibel permeabilisierten Membranen sind jedoch für den Farbstoff zugänglich, so dass die DNA nach Interkalierung von Ethidium-Homodimer fluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden kann.

Die nachfolgende Abbildung 4.24 zeigt zellbedeckte, mit Ethidium-Homodimer behandelte ECIS-Elektroden nach der Elektroporation mit dem normalen Sinus-Puls (a), dem PV-Sinus-Puls (b), dem NV-Sinus-Puls (c) sowie eine Kontrolle (d), bei der keine Elektroporation erfolgte.



**Abb. 4.24:** Lebend-Tot-Test mit dem Farbstoff Ethidium-Homodimer 2 h nach der Elektroporation mit dem Sinus (a), dem PV-Sinus (b), dem NV-Sinus (c) sowie eine Kontrolle (d), bei der keine Elektroporation erfolgte. Fluoreszenzmarkierung der Kerne zeigt abgetötete Zellen an. Elektroporationsparameter:  $f = 100 \text{ kHz}$ ,  $A = 3 \text{ V}$ ,  $\tau = 200 \text{ ms}$ . Der Durchmesser der Elektrodenfläche beträgt  $250 \mu\text{m}$ .

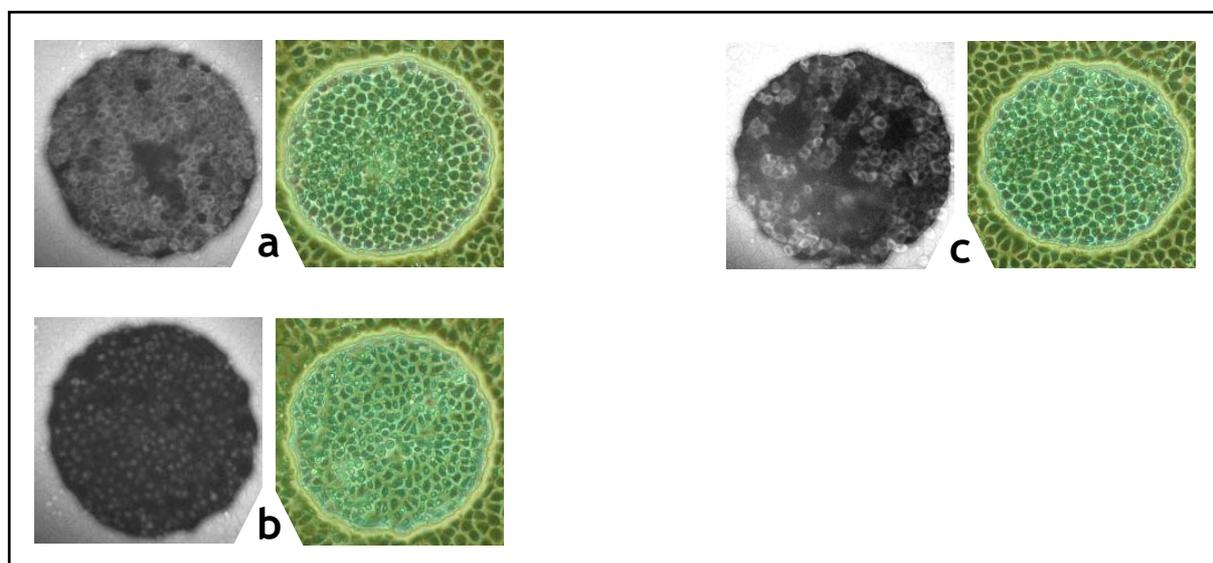
Die Abbildungen 4.24a, c und d zeigen nur sehr vereinzelt Färbungen der Zellkerne durch Ethidium-Homodimer. Durch Elektroporation mit dem Sinus (Abb. 4.24a) oder mit dem NV-Sinus (Abb. 4.24c) als Pulsform erfolgt also keine dauerhafte Permeabilisierung der Plasmamembran und damit auch kein irreversible Schädigung der NRK-Zellen. Die Kontrolle zeigt ebenfalls keine signifikante Anzahl toter durch Ethidium-Homodimer angefärbte Zellen (Abb. 4.24d). In Abbildung 4.24b hingegen kann eine erhöhte Anzahl toter Zellen auf der Elektrodenfläche festgestellt werden. Diese NRK-Zellen wurden mit der PV-Sinus-Spannung elektroporiert, welche eine starke Schädigung der Plasmamembran verursacht, so dass der Farbstoff in die Zellen gelangen und die DNA anfärben kann.

#### 4.4.2 Elektroporation bei verlängerter Pulsdauer

Um die Auswirkung der Pulsdauer unter gleichzeitiger Variation der Pulsform bei der Elektroporation zu analysieren, wurden NRK-Zellen unter folgenden Bedingungen elektroporiert:  $f = 100 \text{ kHz}$ ,  $A = 3 \text{ V}$ ,  $\tau = 500 \text{ ms}$ . Die Pulsform wurde wie schon im Abschnitt 4.4 beschrieben variiert.

**Dye-Uptake**

Die Abbildung 4.25 zeigt fluoreszenzmikroskopische sowie phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen zellbedeckter ECIS-Elektroden nach Elektroporation mit FITC-Dextran ( $M = 500$  kDa,  $c = 8$  mg/ml).

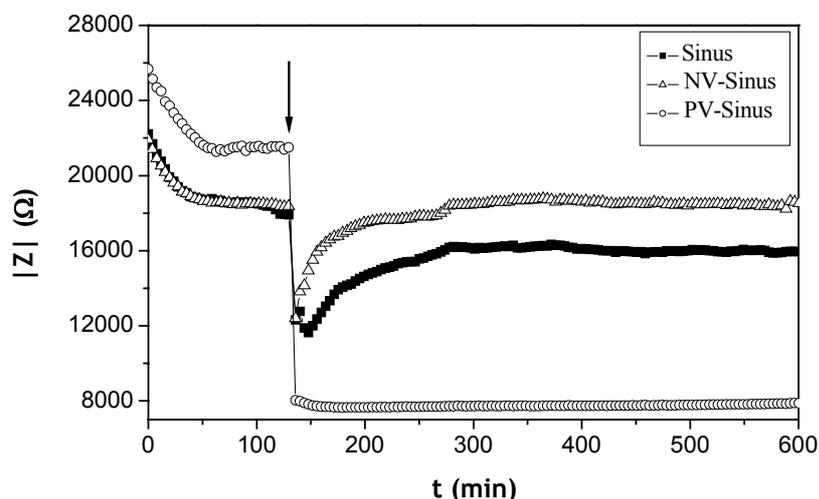


**Abb. 4.25:** Fluoreszenz- und phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von zellbedeckten ECIS-Elektroden nach Elektroporation in Gegenwart von FITC-Dextran ( $M = 500$  kDa,  $c = 8$  mg/ml). Die Pulsbedingungen wurden wie folgt gewählt:  $f = 100$  kHz,  $A = 3$  V,  $\tau = 500$  ms, Pulsform (a) Sinus, (b) PV-Sinus sowie (c) NV-Sinus. Der Durchmesser der Elektrodenfläche beträgt  $250$   $\mu\text{m}$ .

Ähnlich wie bei den *Dye-Uptake* Studien in Abschnitt 4.4.1 sieht man bei den in Abbildung 4.25 gezeigten fluoreszenzmikroskopischen Bildern einen deutlichen Unterschied sowohl in der Konzentration der aufgenommenen Farbstoffsonde als auch in der Homogenität der Farbstoffaufnahme. Die Elektroporation mit dem Sinus-Puls ist im Hinblick auf den Sondeneintrag am effektivsten, da fast alle Zellen auf der Elektrode den Farbstoff ins Zytoplasma aufgenommen haben (Abb. 4.25a). Auch ist die Farbstoffaufnahme in diesem Fall sehr homogen. Bei der Elektroporation mit der NV-Sinus-Spannung ist die Farbstoffaufnahme der NRK-Zellen sehr inhomogen (Abb. 4.25c). Der Zellkern ist auch hier deutlich dunkler als das Zytoplasma, in dem sich der Farbstoff befindet. Nach der Elektroporation mit dem PV-Sinus (Abb. 4.25b) in Gegenwart von FITC-Dextran erscheint das Zytoplasma weitgehend dunkel, während allein der Kern eine leichte Fluoreszenz aufweist. Offensichtlich ist durch den EP-Puls die Kernmembran permeabilisiert worden, so dass FITC-Dextran in den Zellkern eindringen konnte. Jedoch lässt sich der Farbstoff beim Auswaschen nach der Elektroporation nicht wieder vollständig aus dem Nukleus entfernen, während die Integrität des Zytoplasmas offensichtlich vollständig aufgehoben ist.

### ECIS-Studien im Recovery-Modus

Die Abbildung 4.26 zeigt den zeitlichen Verlauf des Impedanzbetrages  $|Z|$  bei einer Messfrequenz von 4 kHz vor und nach Elektroporation konfluenter NRK-Zellschichten mit verschiedenen Pulsformen unter folgenden Bedingungen:  $f = 100$  kHz,  $A = 3$  V,  $\tau = 500$  ms. Pulsformen: Sinus, PV-Sinus und NV-Sinus. Der Zeitpunkt der Elektroporation ist in der Abbildung durch einen Pfeil gekennzeichnet.



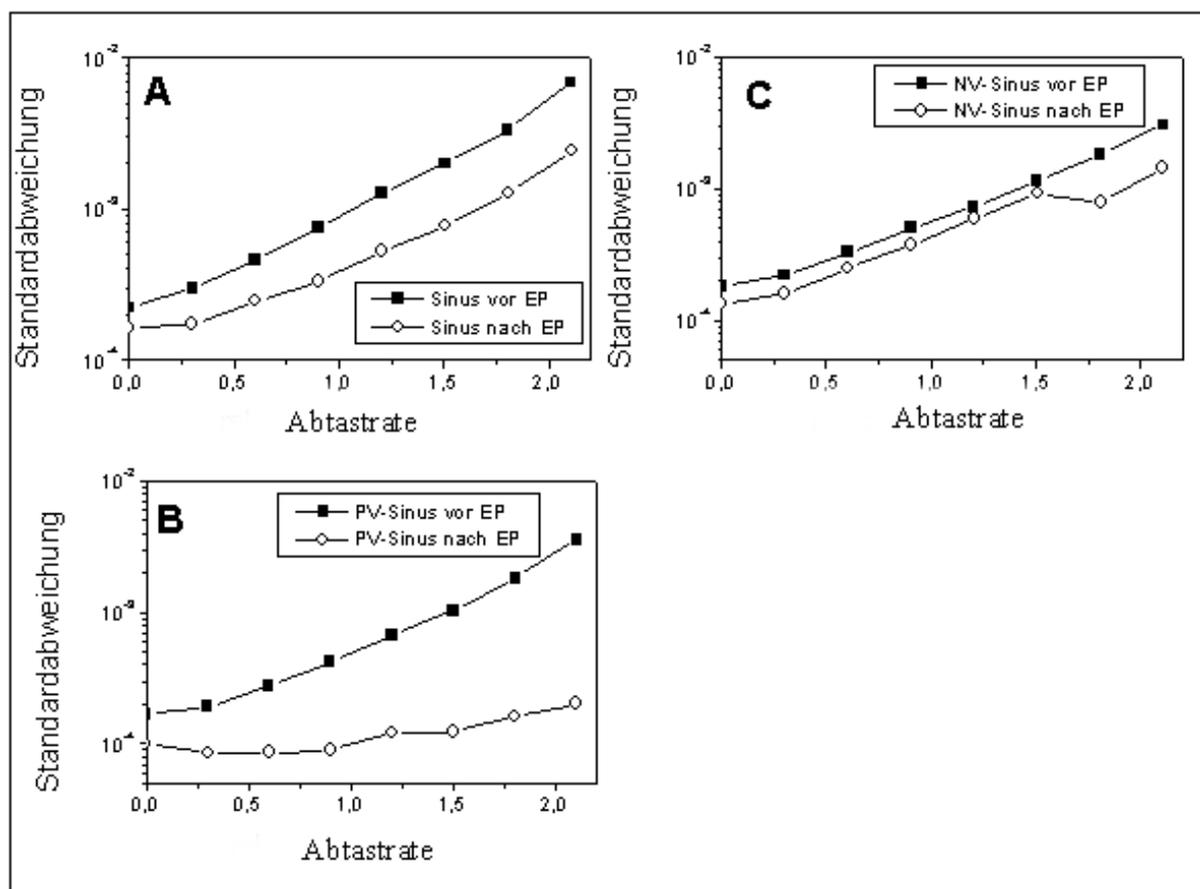
**Abb. 4.26:** Zeitverlauf der Impedanz bei einer Frequenz von 4 kHz einer NRK-Zellschicht vor und nach der Elektroporation mit unterschiedlichen Pulsformen (Sinus, PV-Sinus und NV-Sinus). Elektroporationsparameter:  $f = 100$  kHz,  $A = 3$  V,  $\tau = 500$  ms. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Elektroporation.

Die *Recovery*-Studien zeigen, dass eine Erhöhung der Pulsdauer von 200 ms auf 500 ms bei der Elektroporation zu einer stärkeren Schädigung der Zellen durch den PV-Sinus führt (Vergleiche Abb. 4.22). Die Impedanzwerte nach der Elektroporation bleiben bei 7000  $\Omega$  und die NRK-Zellen erholen sich auch nach 10 Stunden nicht mehr (Abb. 4.26). Es scheint also eine irreversible Schädigung vorzuliegen, was durch die Beobachtung aus den *Dye-Uptake*-Studien gestützt wird. Die Impedanz nach der Elektroporation mit dem Sinus erreicht direkt nach dem Puls ein Minimum von 12000  $\Omega$  und liegt damit um 1000  $\Omega$  tiefer als die entsprechenden Impedanzwerte nach Elektroporation mit dem NV-Sinus. Nach der Elektroporation mit dem Sinus-Puls erreichen die Impedanzwerte der NRK-Zellschicht nicht mehr ihren Ausgangswert von 18000  $\Omega$ , sondern bleiben über den gesamten Messzeitraum hinweg konstant bei Werten um 16000  $\Omega$ . Bei Elektroporation mit der NV-Sinus-Spannung werden die Ausgangswerte der Impedanz wieder erreicht.

Die NRK-Zellen haben scheinbar durch Elektroporation mit dem Sinus-Puls eine höhere Schädigung erfahren als durch die NV-Sinus-Spannung, was sich in der verzögerten Erholung der Zellen auf den Ausgangszustand der Impedanzwerte und einem stärkeren Abfall der Impedanzwerte bei der Elektroporation widerspiegelt.

### ECIS-Studien im Micromotion-Modus

Abbildung 4.27 zeigt die Standardabweichung der Inkremente in Abhängigkeit von der Abtastrate in doppeltlogarithmischer Darstellung. Die Standardabweichungen wurden aus den im *Micromotion*-Modus gemessenen ECIS-Daten vor und nach der Elektroporation ( $f = 100$  kHz,  $3$  V,  $500$  ms) berechnet.

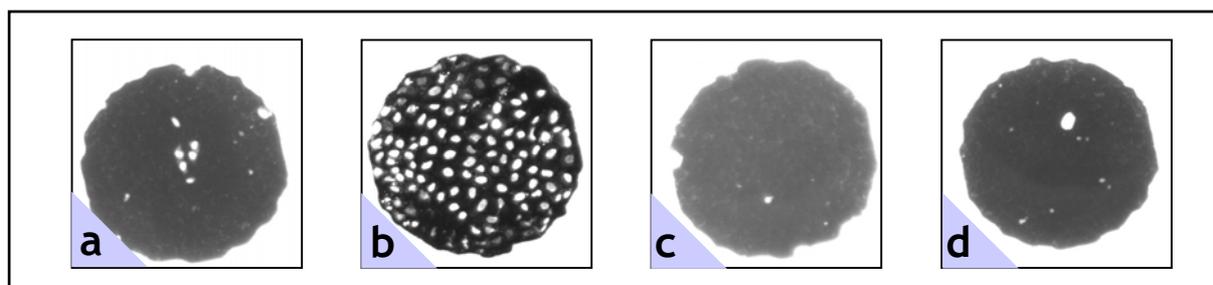


**Abb. 4.27:** Standardabweichung der Inkremente bei verschiedenen Pulsformen: Sinus (A), PV-Sinus (B), NV-Sinus (C) vor und nach der Elektroporation (EP), in Abhängigkeit von der Abtastrate. Elektroporationsparameter:  $f = 100$  kHz,  $A = 3$  V,  $\tau = 500$  ms.

Eine Analyse der Zellmotilität zeigt auch in diesem Falle eine starke Abnahme der Standardabweichung der Impedanzinkremente nach Elektroporation mit der PV-Sinus-Spannung (4.27B). Die Standardabweichung ändert sich nach der Elektroporation nur sehr wenig. Die Steigung des Graphen beträgt nahezu Null. Dies zeigt, dass die Zellen nach der Elektroporation mit dem PV-Sinus eine reduzierte Motilität besitzen und der Zellstoffwechsel eingeschränkt abläuft. Nach der Elektroporation mit dem Sinus-Puls (Abb. 4.27A) nimmt die Standardabweichung der Impedanzinkremente stärker ab, als durch die Elektroporation mit der NV-Sinus-Spannung (Abb. 4.27C). Die Motilität der NRK-Zellen scheint also durch Elektroporation mit dem NV-Sinus weniger stark beeinflusst zu werden, als durch die normale Sinus-Spannung.

### Lebend-Tot-Test

Die Abbildung 4.28 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zellbedeckter ECIS-Elektroden, die 2 h nach der Elektroporation mit dem Sinus (a), dem PV-Sinus (b) und NV-Sinus (c) durch den Fluoreszenzfarbstoff Ethidium-Homodimer angefärbt wurden. Zusätzlich ist eine nicht elektroporierte NRK-Zellschicht als Kontrolle abgebildet. Eine Anfärbung der Zellkerne erfolgt nur, wenn Zellen irreversibel geschädigt wurden, so dass der Farbstoff durch die beschädigte Plasmamembran in den Zellkern gelangen und dort in die DNA interkalieren kann.

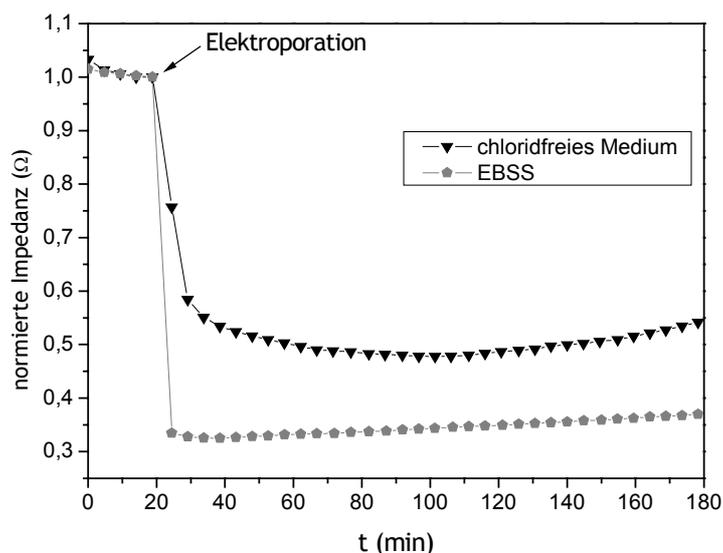


**Abb. 4.28:** Lebend-Tot-Test mit dem Farbstoff Ethidium-Homodimer 2 h nach der Elektroporation mit dem Sinus (a), dem PV-Sinus (b), dem NV-Sinus (c) sowie eine Kontrolle (d), bei der keine Elektroporation erfolgte. Fluoreszenzmarkierung der Kerne zeigt abgetötete Zellen an. Elektroporationsparameter:  $f = 100 \text{ kHz}$ ,  $A = 3 \text{ V}$ ,  $\tau = 500 \text{ ms}$ . Der Durchmesser der Elektrodenfläche beträgt  $250 \mu\text{m}$ .

Es ist deutlich zu erkennen, dass nur die Zellkerne in Abbildung 4.28b nach der Elektroporation mit dem PV-Sinus-Puls angefärbt wurden. Die Zellen auf dieser Elektrode sind folglich durch den Elektroporationspuls nahezu quantitativ abgetötet worden. Bei der Elektroporation mit der normalen Sinus-Spannung oder NV-Sinus-Spannung (Abb. 4.28a und c) sind nur sehr wenige tote Zellen auf der Elektrodenfläche zu erkennen. Die überwiegende Mehrheit der Zellen ist intakt und zeigt keine Färbung durch Ethidium-Homodimer. Die Kontrolle, bei der keine Elektroporation erfolgte, zeigt ebenfalls keine angefärbten Zellen.

#### 4.4.3 Elektroporation mit dem PV-Sinus in unterschiedlichen Medien

Die stark schädigende Wirkung des PV-Sinus-Pulses auf NRK-Zellen bei der Elektroporation könnte auf die Entstehung zellschädigender Radikale an der Elektrodengrenzfläche zurückgeführt werden. Um diese Vermutung zu unterstützen, aber auch um die schädigende Wirkung des PV-Sinus herabzusetzen, wurden Elektroporationsexperimente in chloridfreien Medien durchgeführt. In Abbildung 4.29 ist die Auswirkung der Elektroporation mit dem positiv DC-verschobenen Sinuspulse auf NRK-Zellen in unterschiedlichen Elektroporationsmedien als *Recovery*-Studie dargestellt. Die Elektroporation erfolgte, abgesehen von der Pulsform, unter Standardbedingungen ( $f = 100 \text{ kHz}$ ,  $A = 3 \text{ V}$ ,  $\tau = 200 \text{ ms}$ ).



**Abb. 4.29:** Zeitverlauf der Impedanz bei einer Frequenz von 10 kHz einer NRK-Zellschicht vor und nach der Elektroporation mit dem PV-Sinus. Die Zellen befanden sich zum Zeitpunkt der Elektroporation in unterschiedlichen Medien (EBSS oder chloridfreies Medium). Elektroporationsparameter:  $f = 100 \text{ kHz}$ ,  $A = 3 \text{ V}$ ,  $\tau = 200 \text{ ms}$ . Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Elektroporation.  $|Z|_{\text{EBSS}}(0) = 10202 \text{ } \Omega$  und  $|Z|_{\text{chloridfrei}}(0) = 11456 \text{ } \Omega$  geben die Absolutwerte der Impedanz der NRK-Zellen direkt vor dem Elektroporationspuls an. Die weiteren gemessenen Werte wurden auf  $|Z|_{\text{EBSS}}(0)$  bzw.  $|Z|_{\text{chloridfrei}}(0)$  normiert.

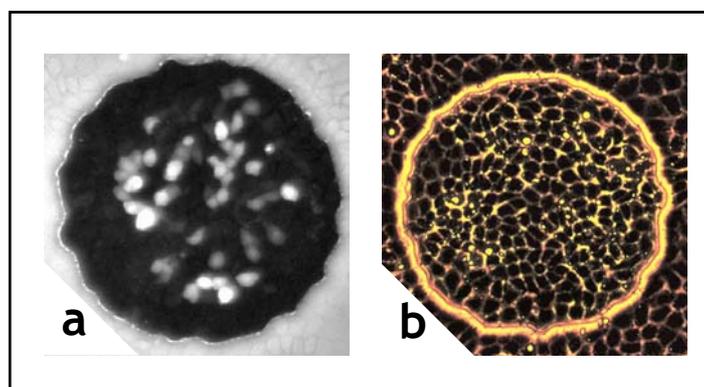
Die Abbildung 4.29 zeigt, dass die negative Auswirkung des PV-Sinus bei der Elektroporation auf die NRK-Zellen abhängig ist von dem zellumgebenden Medium. Im Falle der Elektroporation von NRK-Zellen in chloridhaltigem EBSS sinken die Impedanzwerte der Zellen auf 30 % ihres Ausgangswertes. Der Absolutwert der Impedanz zu diesem Zeitpunkt entspricht in etwa der Impedanz einer zellfreien Elektrode. Die Impedanz ändert sich nach dem elektrischen Puls nur sehr wenig. Die Zellen werden also durch die Elektroporation mit dem PV-Sinus sehr stark und irreversibel geschädigt (siehe auch Abschnitt 4.4.1 und 4.4.2). Die Elektroporation von NRK-Zellen in chloridfreiem Medium verursacht hingegen nur ein Absinken der Impedanzwerte auf 50 % ihres Ausgangswertes. Auch hier ändert sich die Impedanz nach der Elektroporation nur wenig, gegen Ende des Messzeitraumes ist jedoch ein Wieder-Ansteigen der Impedanzwerte zu beobachten. Die NRK-Zellen werden also auch in chloridfreiem Medium durch die Elektroporation mit der PV-Sinus-Spannung geschädigt, jedoch etwas weniger stark als in chloridhaltigem Medium. Eine schnelle Erholung des Zellschicht innerhalb von 30 bis 50 min (vergleiche Abb. 4.16), angezeigt durch das Erreichen der Ausgangswerte der Impedanz, ist hingegen nicht zu beobachten. Die NRK-Zellen werden also auch durch Elektroporation in chloridfreiem Medium durch den PV-Sinus irreversibel geschädigt.

## 4.5 Elektroporation mit Nukleinsäuren

Nach Etablierung des Verfahrens zur *in situ* Elektroporation folgen nun Ergebnisse zur Elektroporation adhärenter Zellen in Gegenwart von Nukleinsäuren. Ziel dabei war, Reportergene per Elektroporation in das Zytoplasma der Zelle einzutragen, um einen Gentransfer in adhärente und konfluente Zellen ohne biochemische Hilfsmittel zu ermöglichen und die durch das jeweilige Genprodukt ausgelöste Zellreaktion mit ECIS *in situ* zu verfolgen.

### 4.5.1 Elektroporation mit pDNA

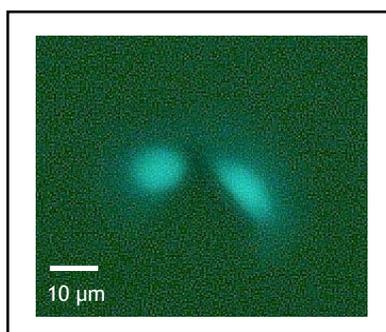
In Abbildung 4.30 sind NRK-Zellen zu sehen, die in Gegenwart von pEGFP-N1 unter Standardbedingungen (siehe Abschnitt 4.2.1) elektroporiert wurden.



**Abb. 4.30:** Mikroskopische Aufnahmen (Fluoreszenz (a) und Phasenkontrast (b)) von NRK-Zellen 48 h nach der Elektroporation mit pEGFP-N1 (10 µg/200 µl). Elektroporationsbedingungen:  $f = 100$  kHz,  $A = 3$  V,  $\tau = 200$  ms. Der Durchmesser der Elektrodenfläche beträgt 250 µm.

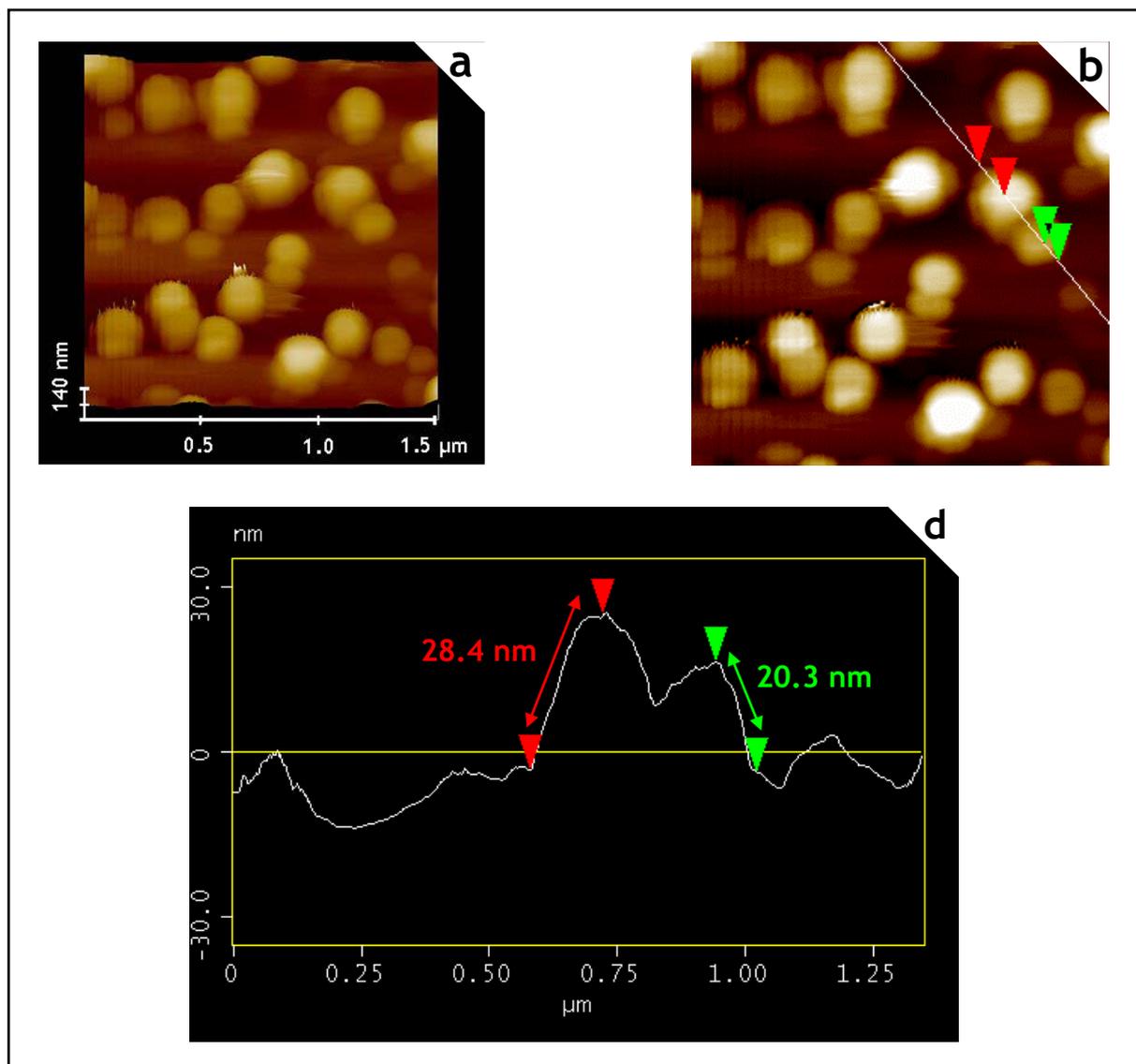
48 h nach der Elektroporation konnte bei ca. 30 % der Zellen auf der Elektrode eine Expression von GFP (*green fluorescent protein*) nachgewiesen werden (Abb. 3.29a). Abbildung 3.29b zeigt den intakten Monolayer der elektroporierten NRK-Zellen. Bei 2 von 30 Experimenten konnte eine Transfektion adhärenter und konfluenter Zellen durch Elektroporation erreicht werden. Bei den anderen Experimenten konnte weder in NRK- noch in MDCK II-Zellen eine Expression von GFP detektiert werden. Es wurden daher mit anderen Expressionsvektoren weitere Experimente zur Elektroporation durchgeführt. Verwendet wurden dabei pEYFP-Actin, pCMVβ und pSV-β-Galaktosidase. Das erstere enthält das Reportergen für das gelbe fluoreszierende Protein (engl. *yellow fluorescent protein*, YFP), das mit dem humanen zytoplasmatischen β-Aktin gekoppelt ist. Die beiden letzteren enthalten Sequenzen für das Enzym β-Galaktosidase (β-gal), welches nach

Expression im Zytoplasma der Zellen durch eine Farbreaktion nachgewiesen werden kann. Eine Expression des betreffenden Gens konnte jedoch in allen diesen Fällen nicht nachgewiesen werden. Um nachzuweisen, dass die pDNA durch den elektrischen Puls in die Zelle gelangt, wurden die in Gegenwart von pEGFP-N1 elektroporierten NRK-Zellen nach dem elektrischen Puls subkultiviert und 48 h später fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei konnte bei einigen Zellen die Expression von GFP detektiert werden (Abb. 4.31).



**Abb. 4.31:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von NRK-Zellen, die nach Elektroporation mit pEGFP-N1 subkultiviert wurden. Die Aufnahme erfolgte 48 h nach der Elektroporation.

Zur Steigerung des Eintrages von pDNA sowohl in das Zytoplasma als auch in den Nukleus der Zelle folgten Experimente, bei denen die pDNA durch PEI (Polyethylenimin) kondensiert (siehe Abschnitt 3.1.7) und dann in NRK-Zellen elektroporiert werden sollten. Abbildung 4.32a zeigt eine rasterkraftmikroskopische Aufnahme der kondensierten pDNA (pEGFP-N1). Die Form der einzelnen PEI/DNA-Komplexe ähnelt denen einer Kugel. Zur Ermittlung der Größe der PEI/DNA-Kugeln wurde eine Schnittlinie gewählt, auf der eine große, sowie eine kleine PEI/DNA-Kugel liegt (Abb. 4.32b). Die Erstellung eines Höhenprofils entlang der Schnittlinie zeigt die Größe der Komplexe (Abb. 4.32c). Der größere Komplex (rote Markierung) hat eine Höhe von 28.4 nm der kleinere (grüne Markierung) hat eine Höhe von 20.3 nm. Die horizontale Ausdehnung kann zur Größenermittlung der Partikel nicht herangezogen werden, da diese starken Schwankungen unterworfen ist (persönliche Mitteilung Dr. H. Schillers). Es wird daher näherungsweise davon ausgegangen, dass die PEI/DNA-Komplexe einen Durchmesser von 20 - 30 nm haben.



**Abb. 4.31:** (a) Rasterkraftmikroskopische Aufnahme (*Deflection*) von PEI/DNA-Komplexen. Als DNA wurde pEGFP-N1 eingesetzt. (b) Verlauf der Schnittlinie im topographischen Rasterkraftmikroskopischen Bild zur Ermittlung der Größe der PEI/DNA-Komplexe. Markiert sind ein großer (rot) und ein kleiner (grün) Komplex. (c) Höhenprofil entlang der Schnittlinie mit Angabe der Höhe der ausgewählten PEI/DNA-Komplexe. Die rasterkraftmikroskopischen Bilder wurden freundlicherweise von Dr. Hermann Schillers (Institut für Physiologie, Universitätsklinikum Münster) aufgenommen.

Es konnte jedoch auch bei durch die Verwendung von PEI bei der Elektroporation keine erhöhte Transfektionseffizienz detektiert werden.

## 4.5.2 Elektroporation mit mRNA

Durch die Elektroporation adhärenter und konfluenten Zellen in Gegenwart von mRNA kann die Problematik des zytonucleoplasmatischen Transportes von pDNA umgangen werden. Es ist dabei prinzipiell ausreichend, die Nukleinsäure per Elektroporation in das Zytoplasma der Zelle einzubringen, da dort die Translation von mRNA stattfindet.

Zur Synthese der mRNA wurden zunächst zwei Ausgangsvektore hergestellt: In die Multi-Cloning-Side (MCS) des Vektors pcDNA3 (Invitrogen) wurde zum einen die cDNA der  $\beta$ -Galaktosidase (aus pCMV $\beta$ , Clontech) einkloniert, im anderen Falle wurde die cDNA von GFP (aus pEGFP-N1, Clontech) eingefügt. Der Vektor pcDNA3 enthält einen T7-Promotor, der für die nachfolgende *in vitro*-Transkription erforderlich war. Die erfolgreiche Synthese der mRNA konnte durch Agarosegelelektrophorese bestätigt werden, bevor der unaufgereinigte Transkriptionsansatz bei der Elektroporation eingesetzt wurde. Durch die *in situ*-Elektroporation von adhärenten und konfluenten NRK- und COS 7-Zellen in Gegenwart von mRNA konnte jedoch keine Expression des betreffenden Proteins detektiert werden.

## 5 Diskussion

### ***Optimierung der Parameter zur in situ Elektroporation adhärenter Säugerzellen***

Die Elektroporation ermöglicht prinzipiell den Eintrag von Makromolekülen jedweder Art in das Zytoplasma lebender Zellen. Seit Anfang der 80er Jahre findet die Elektroporation von eukaryotischen Zellen daher zunehmend Anwendung, um einen Gentransfer in die Zellen mit dem Ziel der rekombinanten Expression zu ermöglichen. Am häufigsten erfolgt hierbei die Elektroporation der Zellen in Suspension. Ein großer Nachteil ist dabei jedoch, dass adhärenente eukaryotische Zellen zur Elektroporation zunächst von ihrem Substrat abgelöst werden müssen. Diese Ablösung erfolgt meist mit Trypsin und/oder EDTA-Lösungen und kann zu unerwünschten physiologischen Effekten wie eine Störung des Zellzyklus, Änderung des metabolischen Status' der Zellen (Vasiliev, 1985) und somit zu einer Herabsetzung der Überlebensrate führen. Durch die Elektroporation adhärenter Zellen, bei welcher der elektrische Puls appliziert wird während die Zellen fest mit ihrem Substrat verankert bleiben, kann die Invasivität des Elektroporationsereignisses reduziert werden. Mehrere Arbeitsgruppen beschäftigen sich seit Anfang der 90er Jahre mit dieser Art der Elektroporation. Raptis und Firth veröffentlichten 1990 erstmals eine Studie zur *in situ* Elektroporation adhärenter Zellen. Sie kultivierten dazu Fibroblasten auf ITO-beschichteten (ITO, engl. *indium tin oxide*) Objektträgern und applizierten den elektrischen Puls in Form von Gleichstrom, um eine Permeabilisierung der Zellen zu erreichen. Wie in 1.1.2.1 bereits beschrieben veröffentlichten weitere Arbeitsgruppen danach Studien zur *in situ* Elektroporation adhärenter Zellen (Zeng und Chang, 1991; Raptis et al., 1994; Yang et al., 1995; Müller et al., 2003). Allen gemeinsam ist dabei die Verwendung von Gleichstrom bei der Applikation des elektrischen Pulses. Bei Einsatz von Gleichspannungspulsen im Vergleich zu Wechselfspannungspulsen besteht jedoch eine höhere Gefahr der Bildung cytotoxischer Stoffe an der Elektrodenoberfläche, da die Elektrode dabei eine viel stärkere Polarisierung erfährt als bei Wechselfspannungspulsen, bei der sich die Polarität der Elektrode stets ändert.

Es ist bisher aber nur wenig über die Elektroporation mit Wechselfspannungspulsen von Säugerzellen, die in direktem Kontakt zur Elektrodenfläche stehen, bekannt. Gosh et al. (1993) haben erstmals auf Goldfilmelektroden kultivierte adhärenente Säugerzellen (Fibroblasten) mit Wechselfspannungspulsen elektroporiert und Veränderungen in der Membranpermeabilität durch Impedanzmessungen verfolgt. Als Parameter für den Elektroporationspuls wurden dabei für die Frequenz 4 kHz und für die Pulsdauer 200 ms gewählt. Variiert wurde lediglich die elektrische Spannung in einem Bereich von 1 - 5 V. In einer weiteren Studie (Wegener et al., 2002) wurden ebenfalls die optimalen Parameter zur *in situ* Elektroporation adhärenter Zellen experimentell ermittelt. NRK-Zellen wurden dazu Elektroporationspulsen ausgesetzt, die in folgenden Bereichen variierten:  $f = 40 \text{ Hz}, 400 \text{ Hz}, 4 \text{ kHz} \text{ und } 40 \text{ kHz}$ ;  $A = 2 \text{ V}, 3 \text{ V}, 4 \text{ V} \text{ und } 5 \text{ V}$ ;  $\tau = 50 \text{ ms}, 100 \text{ ms}, 200 \text{ ms} \text{ und } 500 \text{ ms}$ . Für NRK-Zellen stellten sich dabei die folgenden Bedingungen als optimale Elektroporationsparameter heraus:  $f = 40 \text{ kHz}, A = 4 \text{ V} \text{ und } \tau = 200 \text{ ms}$ .

In dieser Arbeit wurde ebenfalls *in situ* Elektroporationen adhärenter Zellen durch Einsatz von Wechselfspannungspulsen durchgeführt. Die Zellen wurden dazu auf Goldfilmelektroden kultiviert,

wie sie auch von Wegener et al. (2002) verwendet wurden. Der große Vorteil dabei ist, dass die Arbeitselektroden eine sehr kleine Fläche ( $5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$ ) aufweisen, wodurch die applizierte Spannung des Elektroporationspulses zum überwiegenden Teil über den auf den Elektroden befindlichen Zellmonoschichten abfällt. Es kann daher auf eine Kühlung der Elektrode und auf den Einsatz von Elektroporationsmedien mit unphysiologischen Salzkompositionen, wie es bei Suspensions-elektroporationen üblich ist, verzichtet werden.

Es wurden in dieser Arbeit zunächst Simulationen durchgeführt, durch welche die Verteilung der applizierten Spannung auf die einzelnen Komponenten des Systems (Elektrode, Zellschicht, Elektrolyt; siehe Abb. 4.7) in Abhängigkeit von der Frequenz ermittelt wurde. Verschiedene Zelltypen haben eine unterschiedliche Morphologie und besitzen daher unterschiedliche Parametertripel  $R_b$ ,  $\alpha$  und  $C_m$ , welche die jeweilige Zellschicht charakterisieren.  $R_b$  beschreibt dabei den Widerstand zwischen den Zellen, der die Dichtigkeit der Zell-Zell-Kontakte widerspiegelt,  $\alpha$  drückt die frequenzabhängige Impedanz innerhalb des Zell-Substrat-Kontaktes aus und die spezifische Kapazität der Zellschicht, bestimmt durch die dielektrischen Eigenschaften und die Morphologie der Plasmamembranen, wird durch  $C_m$  beschrieben. Diese Wertetripel können aus ECIS-Experimenten und anschließender Anpassung der Übertragungsfunktion gewonnen werden. Benutzt man nun dieses zelltypische Parametertripel als Ausgangswert für die elektrische Beschreibung der Zellen, so kann aus den erhaltenen Daten die Frequenz ermittelt werden, bei der ein Maximum der Spannung über der Zellschicht abfällt. Die grafischen Darstellungen der Simulationen bei Variation der Parametertripel zeigen, dass bei der Elektroporation der Spannungsabfall über die Zellschicht bei hohen Frequenzen (bis zu 100 kHz) am größten ist. Dies bestätigt die experimentellen Befunde von Wegener et al. (2002). Mit sinkender Frequenz ( $< 5 \text{ kHz}$ ) dominiert der Spannungsabfall über die Elektroden/Elektrolyt-Grenzfläche, was zu elektrochemisch induzierten Beschädigungen der Goldfilmelektrode führen kann. Sehr hohe Frequenzen ( $> 100 \text{ kHz}$ ) bewirken hingegen einen Spannungsabfall über das zellbedeckende Elektrolytmedium, was zu dessen Aufheizung führen kann. Bei Elektroporationen von suspendierten Zellen kommt es zu eben dieser Aufheizung des Elektrolytmediums, weshalb in diesem Falle oft Medien mit unphysiologischem Salzgehalt verwendet werden. Ausgehend von diesen theoretischen Betrachtungen wird in dieser Arbeit für die *in situ* Elektroporation adhärenter Säugerzellen eine Frequenz von 100 kHz für den Elektroporationspuls gewählt.

Wegener et al. (2002) verfolgten bei der Optimierung der Elektroporationsparameter den *Dye-Uptake* von *Lucifer Yellow* in adhärenzte Säugerzellen. Auch zur Optimierung der Suspensionselektroporation wurde dieser Farbstoff bereits eingesetzt (Mir et al., 1988, Dinchuk et al., 19992). Bei *Lucifer Yellow* handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff mit einer molekularen Masse von 0.5 kDa. Durch Einsatz dieses Farbstoffes konnten Wegener et al. (2002) die Elektroporationseffizienz im Hinblick auf eine Beladung der Zellen bei den verschiedenen Experimenten durch Fluoreszenzmikroskopie überprüfen.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde daher die weitere Optimierung der Elektroporationsparameter durch den Einsatz von *Lucifer Yellow* überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass durch Elektroporation bei einer Frequenz von  $f = 100 \text{ kHz}$ , Amplituden von  $A = 3$  und  $4 \text{ V}$ , sowie Pulsdauern von  $\tau = 100$  und  $200 \text{ ms}$  der membranimpermeable Fluoreszenzfarbstoff *Lucifer Yellow* erfolgreich in

adhärente und konfluente NRK-Zellen eingebracht werden konnte. Durch Einsatz der höheren Amplitude wurden wenige Zellen auf der Elektrode unabhängig von der Pulsdauer geschädigt, so dass Fehlstellen im Zellmonolayer auftraten. Diese Beobachtung machten Wegener et al. (2002) erst bei Amplituden von 5 V. Durch Elektroporation von NRK-Zellen mit den Pulsparametern  $f = 100$  kHz,  $A = 3$  V und  $\tau = 100$  oder 200 ms in Gegenwart von *Lucifer Yellow* konnte in dieser Arbeit eine Elektroporationseffizienz von annähernd 100 % erreicht werden. Die Farbstoffaufnahme war dabei unabhängig von der Pulsdauer nicht homogen über die elektroporierte Zellschicht verteilt. Jedoch konnte bei erhöhter Pulsdauer (200 ms) eine höhere Farbstoffaufnahme festgestellt werden. In dieser Arbeit wurden daher für die optimale Elektroporation adhärenter Säugerzellen die folgenden Parameter als Standardbedingungen eingesetzt:  $f = 100$  kHz,  $A = 3$  V und  $\tau = 200$  ms.

### ***Eintrag von verschiedenen Makromolekülen durch Elektroporation***

Wie schon erwähnt, erlaubt es die Elektroporation, prinzipiell jede Art von Molekül in lebende Zellen einzubringen. Einen entscheidenden, limitierenden Faktor könnte dabei jedoch die Molekülgröße der Substanzen darstellen. Über die Größe der Elektroporen, die während der Applikation des Elektroporationspulses gebildet werden, ist bisher wenig bekannt. Eine Ermittlung der Porengröße konnte bislang nur durch theoretische Überlegungen gestützt auf experimentelle Befunde durchgeführt werden, da es noch nicht gelungen ist, die kurzlebigen Elektroporen bildhaft darzustellen. Gosh et al. (1993) konnten feststellen, dass bei der Elektroporation von Fibroblasten in Gegenwart des Enzyms Meerrettichperoxidase kein Eintrag des Enzyms in die Zellen erfolgte, wenn folgende Pulsparameter gewählt wurden:  $f = 4$  kHz,  $A = 1$  oder 2 V,  $\tau = 200$  ms. Durch Impedanzmessungen an den Zellen konnten sie jedoch eine Permeabilisierung der Fibroblasten nachweisen. Unter der Annahme, dass pro Zelle 1000 Elektroporen gebildet werden und unter Zuhilfenahme der gemessenen Impedanzwerte berechneten Gosh et al. (1993) einen Durchmesser von 3 nm für eine einzelne Elektropore. Dies erklärt, warum die Meerrettichperoxidase (Durchmesser 5.34 nm) unter diesen Bedingungen nicht in die Zellen eingebracht werden konnte. Weiterhin konnten sie beobachten, dass die Größe der Elektroporen abhängig ist von der Amplitudengröße des Elektroporationspulses. Bei Verwendung von größeren Amplituden ( $A = 3, 4$  oder 5 V) unter ansonsten gleichen Elektroporationsbedingungen wurde die Meerrettichperoxidase erfolgreich in die Zellen eingetragen. Der Durchmesser der Poren nimmt also bei Erhöhung der Amplitude zu. Auch ist bekannt, dass die Pulsdauer einen entscheidenden Einfluss auf die Permeabilisierung von Zellen hat. Werden sehr kurze Pulsdauern gewählt, so erfolgt keine Elektroporation der Zellmembran, da die Zeit nicht ausreichend ist, um eine Ladungsakkumulation an den Grenzflächen der Zellmembran zu erreichen, die zur Bildung der Elektroporen notwendig ist. Bei langen Pulsdauern erfolgt eine so starke Permeabilisierung der Plasmamembran, dass daraus eine irreversible Schädigung der Zellen resultiert. Daraus geht hervor, dass eine exakte Ermittlung der Größe von Elektroporen nur schwer möglich ist. Anhaltspunkt für die Größe der Elektroporen unter bestimmten Bedingungen kann jedoch die Größe der in die Zellen eingetragenen Moleküle sein. So konnten durch Elektroporation eukaryotischer Zellen in Suspension über kleine Moleküle und Ionen (z.B.  $Mg^{2+}$ -Ionen, Bier et al., 1999), Moleküle mittlerer Größe wie Proteine (z.B. RNase A,

M = 66 kDa; Glogauer und McCulloch, 1992) bis hin zu Makromolekülen wie pDNA (4 kb pDNA hat ein Molekulargewicht von ca. 2.4 MDa und einen Radius von 90 - 130 nm; Sebestyén et al., 1998) in das Zytoplasma eingebracht werden. Ähnliche Ergebnisse lieferten Elektroporationen adhärenter Zellen (z.B. Raptis und Firth, 1990; Raptis et al., 1994). Bei der Elektroporation sowohl adhärenter als auch konfluenter Säugerzellen konnte bisher der Eintrag des Enzyms Meerrettichperoxidase (Gosh et al., 1993), des Fluoreszenzfarbstoffes *Lucifer Yellow* (M = 0.5 kDa) sowie von FITC-Dextran (M = 250 kDa) gezeigt werden (Wegener et al., 2002).

Auch in dieser Arbeit konnte der Eintrag von *Lucifer Yellow* in adhärente und konfluente NRK-Zellen gezeigt werden (s.o.). Darüber hinaus wurden FITC-Dextrane bis zu einer maximalen Molekülgröße von M = 2000 kDa sowohl in NRK- als auch in MDCK-II-Zellen erfolgreich elektroporiert. Die Elektroporationseffizienz lag für die NRK-Zellen bei 95 - 100 %, bei den MDCK II-Zellen bei 85 - 100 %. Dies bestätigt die Ergebnisse von Wegener et al. (2002), die durch Elektroporation in Gegenwart von *Lucifer Yellow* in mehr als 85 % der NRK-Zellen den Eintrag des Farbstoffes beobachten konnten. Auffallend bei der Elektroporation von Säugerzellen mit FITC-Dextran in der vorliegenden Arbeit ist die Verteilung des Fluoreszenz-gelabelten Moleküls innerhalb der Zellen. Bei den Elektroporationen mit FITC-Dextranen der Größe M = 4 kDa und M = 20 kDa ist die Verteilung der Dextran-Moleküle in der Zelle homogen im Zytoplasma sowie auch im Zellkern vorhanden. Ab einer Größe von M = 40 kDa hingegen ist ausschließlich das Zytoplasma homogen gefärbt. Im Bereich des Nukleus ist keine Fluoreszenz sichtbar. Dies zeigt einerseits, dass die freie Diffusion von Molekülen durch die Poren des Zellkerns bis zu einer Größe von 20 kDa möglich ist. Ab einer Molekülgröße von 40 kDa hingegen findet keine freie Diffusion über die Kernporen mehr statt. Dies bestätigt die Angaben von Adam et al. (1990) und Nigg (1997), die den Durchmesser der Kernporen mit 9 - 10 nm angeben, was Molekülen bis zu einer Größe von 30 - 40 kDa (Adam et al., 1990), bzw. 40 - 60 kDa (Nigg, 1997) die freie Diffusion über die Kernmembran erlaubt. Für NRK- und MDCK II-Zellen scheint diese Grenze der freien Diffusion über die Kernmembran bei einer Molekülgröße zwischen 20 und 40 kDa zu liegen. Andererseits zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit aber auch, dass durch die Elektroporation von adhärenter tierischen Zellen unter den gewählten Bedingungen wohl eine Permeabilisierung der Zellmembran, nicht jedoch der Kernmembran erreicht wird. Dieses Ergebnis wird unterstützt durch die Beobachtungen von Schönbach et al. (2001) und Beebe et al. (2003). In beiden Studien konnte gezeigt werden, dass zur Permeabilisierung zellulärer Substrukturen wie z.B. der Membran der Mitochondrien oder zytoplasmatischer Granula elektrische Pulse sehr hoher Intensität (26 - 150 kV/cm) und extrem kurzer Dauer (10 - 300 ns) notwendig sind. Mit den Bedingungen der Elektroporation von Zellmembranen, unter denen das auf die Zelle wirkende elektrische Feld i.a. eine Stärke von 0.5 bis 20 kV/cm hat, ist dies nicht möglich. Unter den Elektroporationsbedingungen, wie sie in der vorliegenden Arbeit gewählt wurden (A = 3 V), hat das auf die Zellen wirkende elektrische Feld nach Kalkulation von Wegener et al. (2002) unter der Annahme einer durchschnittlichen Zellhöhe der NRK-Zellen von 4 µm (Parak et al., 1999) eine Stärke von 2.5 kV/cm. Dieser Wert ist vergleichbar mit den Angaben der Feldstärken zur effektiven Elektroporation von Zellen anderer Autoren (Rols und Teissié, 1990: 1.6 kV/cm; Sukharev et al., 1992: 6 kV/cm; Neumann et al., 1998: 2.1 kV/cm).

Weiterhin konnte durch diese Experimente gezeigt werden, dass Moleküle bis hin zu einer Größe von 2 MDa durch Elektroporation in adhärente und konfluente NRK- und MDCK II-Zellen eingebracht werden können. Da ein FITC-Dextran-Molekül der Größe 2000 kDa einen Stokes-Radius von 20 nm hat, kann angenommen werden, dass der Durchmesser der Elektroporen in NRK- und MDCK II-Zellen unter den hier gewählten Bedingungen mindestens dem Durchmesser des FITC-Dextrans, also 40 nm, entspricht. Dieser Wert ist sehr viel größer als der von Gosh et al. (1993) angegebene Wert von 3 nm als auch größer als der von Sukharev et al. (1992) von 1 bis 10 nm für den Elektroporendurchmesser. Er unterstützt jedoch die experimentellen Befunde anderer Studien, bei denen durch Elektroporation in Suspension Moleküle bis hin zu einer Größe von pDNA-Molekülen (Sebestyén et al., 1998 geben für eine 4 kb große pDNA einen Radius von 90 - 130 nm an) in Zellen eingebracht werden konnten (z.B. Chu et al. 1987). Ob jedoch für den Eintrag von DNA in das Zytoplasma Elektroporen mit einem so großen Durchmesser vorhanden sein müssen, ist bis heute nicht geklärt. Sukharev et al. (1992) wie auch E. Neumann vermuten, dass die DNA mit kleinen hydrophilen Elektroporen oder an lokalen Defektstellen in der Zellmembran, die durch das angelegte elektrische Feld induziert wurden, interagiert und auf diese Weise die Elektropore stabilisiert. Das lange geladene DNA-Molekül schiebt sich dann durch diese Poren in das Zytoplasma der Zelle (siehe auch Abschnitt 1.1.1.1, Abb. 1.3g).

In der vorliegenden Arbeit wurden daraufhin weitere Elektroporationsexperimente von NRK-Zellen in Gegenwart von Fluoreszenz-markiertem Protein (FITC-BSA,  $M = 67$  kDa) und einem Fluoreszenz-markierten bicyclischen Heptapeptid (TRITC-Phalloidin,  $M = 1.3$  kDa) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Elektroporation von adhärennten und konfluenten NRK-Zellen in Gegenwart von FITC-BSA eine starke Anfärbung der Zellen erfolgte. Erstaunlicherweise war jedoch die Fluoreszenz im Bereich des Zellkerns sehr viel stärker als im Zytoplasma. Die Erkenntnisse aus den Elektroporationen mit FITC-Dextran würden vermuten lassen, dass FITC-BSA-Moleküle mit einer Größe von 67 kDa die Kernmembran nicht durch freie Diffusion überwinden können. Durch Elektroporationsexperimente mit aufgereinigtem FITC-BSA (wodurch freie FITC-Moleküle aus der Lösung entfernt wurden) konnte keine Anfärbung der NRK-Zellen erreicht werden. Dies legt den Schluss nahe, dass in den vorherigen Elektroporationen mit FITC-BSA ausschließlich freie FITC-Moleküle in die Zelle eingebracht wurden. FITC hat eine Größe von 0.4 kDa und kann daher leicht durch die Kernporen in das Innere des Nukleus gelangen. Wieso dies zu einer scheinbaren Akkumulation des Fluoreszenzfarbstoffes im Nukleus führt, konnte nicht geklärt werden.

Das zur Klasse der Phallotoxine gehörende Heptapeptid Phalloidin konnte in dieser Arbeit in adhärennte und konfluente NRK-Zellen per Elektroporation eingebracht werden. Da Fluoreszenz-markiertes Phalloidin (TRITC-Phalloidin) verwendet wurde, konnte der Eintrag durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen analysiert werden. Es zeigte sich dabei eine Elektroporationseffizienz von ca. 95 %. Offensichtlich liegen in der TRITC-Phalloidin-Lösung keine freien Fluoreszenzmoleküle vor (wie im Falle von BSA), da keine Anfärbung der Zellkerne beobachtet wurde. Die Anfärbung des Zytoskelettes durch Anheftung des in das Zytoplasma elektroporierten TRITC-Phalloidins an die Actin-Filamente ist hingegen deutlich zu erkennen (siehe Abb. 4.15).

### **Elektroporation und Zellerholung**

Giaever und Keese konnten 1984 zeigen, dass Säugetierzellen in einem konfluenten Monolayer permanent fluktuierende Bewegungen senkrecht zur Substratebene ausführen, die von den Autoren als *Micromotion* bezeichnet wurden. Als Kultursubstrate setzten sie dabei planare Goldfilmelektroden ein, so dass die fluktuierenden Bewegungen adhärenter Zellen durch Messung der elektrischen Impedanz analysiert werden konnten. Diese Beobachtungen führten zur Etablierung der impedanzspektroskopischen Technik, die heute unter dem Akronym ECIS (*Electric-Cell-Substrate-Impedance Sensing*) bekannt ist. Diese Methode basiert auf der nicht-invasiven Messung der elektrischen Impedanz zellbedeckter Goldfilmelektroden mit sehr hoher zeitlicher Auflösung (Millisekundenbereich) (Giaever und Keese, 1991).

Die Analyse der erhaltenen Impedanzspektren nach der Methode von Giaever und Keese (1991) (siehe Abschnitt 3.4.1.3) ermöglicht, Aussagen über die Form der Zellen auf der Elektrode in quantitativer Weise zu treffen (Wegener et al., 2000). Tiruppathi et al. (1992) nutzten die ECIS-Technik, um morphologische Änderungen von Endothelzellen aus kapillaren Pulmonargefäßen unter dem Einfluss von  $\alpha$ -Thrombin im zeitlichen Verlauf zu untersuchen, mit dem Ziel, die zugrunde liegende Signaltransduktion aufzuklären. Die Untersuchungen ergaben, dass die Zugabe von  $\alpha$ -Thrombin zu einer Kontraktion der Endothelzellen und zu einer Aufweitung des Interzellularspaltes (IZE) führt. Die Änderung der Zellform humaner Augenhöhlenfibroblasten unter Einwirkung von Prostaglandin E konnte ebenfalls durch ECIS beobachtet werden (Reddy et al., 1998). Es zeigte sich dabei, dass die Reaktion der Zellen auf Prostaglandin E durch den *second messenger* cAMP vermittelt ist. Arndt et al. (2004) konnten mittels ECIS die zeitliche Änderung in der Zellform von porcinen kapillären Hirnendothelzellen aus Schwein während der Apoptose beobachten. Es zeigte sich dabei, dass der apoptotische Prozess durch Zusatz von Hydrocortison verzögert werden kann.

Gosh et al. (1993) und Wegener et al. (2002) kombinierten die Elektroporation mit der ECIS-Technik, um die Auswirkung des elektrischen Pulses auf die adhärenten und konfluenten Zellen zu beobachten. Gosh et al. (1993) elektroporierten Fibroblasten mit Amplituden von  $A = 1-5$  V, bei einer Frequenz von  $f = 4$  kHz und einer Pulsdauer von  $\tau = 200$  ms und verfolgten Änderungen der Membranpermeabilität der Zellen durch Messung der Impedanz bei einer Frequenz von 4 kHz. Dabei konnten sie zeigen, dass sich der Membranwiderstand der Zellschicht direkt nach dem Puls stark verringert (auf 40 % des Anfangswertes bei Applikation eines 3 V-Pulses), jedoch bereits 2.5 Sekunden nach dem Puls den Ausgangswert wieder erreicht. Wegener et al. (2002) konnten durch ECIS-Messungen von konfluenten NRK-Zellen nach Elektroporation mit den Parametern  $f = 40$  kHz,  $A = 4$  V und  $\tau = 200$  ms zeigen, dass die Impedanz der Zellschicht direkt nach dem Puls stark abfällt, jedoch innerhalb von 30 bis 45 min wieder den Anfangswert der Impedanz erreicht. Die gemessenen Änderungen in der Impedanz der NRK-Zellschicht spiegeln Änderungen in der Zellmorphologie wieder. Die Studien von Wegener et al. (2002) zeigen also, dass die Applikation des Elektroporationspulses Änderungen in der Morphologie der Zellen bewirkt, welche jedoch nach 30 bis 45 min nicht mehr detektiert werden können.

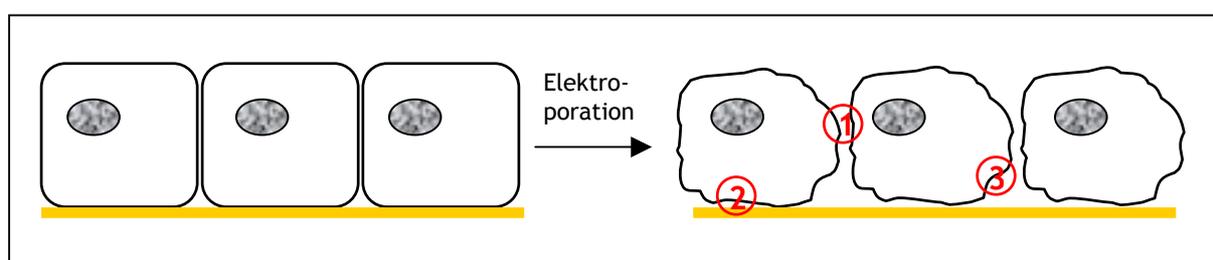
In dieser Arbeit wurde ebenfalls die ECIS-Technik mit der Elektroporation adhärenter und konfluenter Säugerzellen kombiniert, um die Auswirkungen des Elektroporationspulses auf die Zellmorphologie *in situ* detektieren zu können. Durch Impedanzmessungen an NRK-Zellen konnte

gezeigt werden, dass durch die Elektroporation unter den in dieser Arbeit gewählten Standardbedingungen ( $f = 100 \text{ kHz}$ ,  $A = 3 \text{ V}$ ,  $\tau = 200 \text{ ms}$ ) die Gesamtimpedanz der Zellschicht direkt nach dem elektrischen Puls auf ca. 85 bis 90 % der Anfangsimpedanz abfällt. Innerhalb von 30 bis 50 min erreichten die Impedanzwerte wieder ihren Ausgangswert. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Wegener et al. (2002) konnte also auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Elektroporationspuls Änderungen in der Zellmorphologie hervorruft, welche in relativ kurzer Zeit vollständig reversibel sind. Die Elektroporationen und ECIS-Messungen konfluenter MDCK II-Zellen brachten unter gleichen Elektroporationsbedingungen ähnliche Ergebnisse. Die Impedanz der Zellschicht sank dabei direkt nach dem Puls auf 75 bis 90 % des Anfangswertes und erholte sich ebenfalls innerhalb von 30 bis 50 min.

Um die Änderungen in der Zellmorphologie durch den elektrischen Puls näher zu charakterisieren, wurden die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Impedanzspektren nach dem Modell von Giaever und Keese (1991) ausgewertet (siehe Abschnitt 3.4.1.3.). Danach lassen sich aus den Impedanzspektren drei morphologische Parameter ableiten:  $R_b$ ,  $\alpha$  und  $C_m$ . Die Auswertungen der ECIS-Messungen von NRK-Zellen nach diesem Modell zeigten, dass die Auswirkung des elektrischen Pulses auf den Parameter  $R_b$  am stärksten ist. Der Wert für  $R_b$  fällt direkt nach dem Puls auf 75 % seines Anfangswertes, wohingegen  $\alpha$  nur auf 90 % des Ausgangswertes sinkt. Die Erholung dieser beiden Parameter erfolgte in verschiedenen Zeitspannen. So scheinen die Zell-Zell-Kontakte ihren Ausgangszustand schneller wieder herstellen zu können als die Zell-Substrat-Kontakte. Die Werte für den Parameter  $C_m$  zeigten hingegen nach Applikation des Elektroporationspulses kein Absinken, sondern wie die Parameter  $R_b$  und  $\alpha$ , gegen Ende der ECIS-Messung einen Anstieg um 5 bis 10 % über den Anfangswert. Die Auswertungen der ECIS-Messungen von MDCK II-Zellen nach dem Modell von Giaever und Keese (1991) zeigten für die Parameter  $R_b$  und  $\alpha$  gleiche Verläufe. Der Parameter  $C_m$  hingegen erfuhr keine Änderung durch den Elektrischen Puls. Es stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob die Erholung der Zellen (und damit der Parameter  $R_b$ ,  $\alpha$  und  $C_m$ ) auf ein langsames Ausheilen der Elektroporen zurückzuführen ist. Teissié et al. (1999) konnten beobachten, dass elektroporierte Zellen erst 30 min nach dem elektrischen Puls für den Farbstoff Trypan Blau impermeabel wurden. Wegener et al. (2002) und Hartmann (2003) konnte jedoch zeigen, dass bereits 1 min nach Elektroporation von NRK-Zellen (unter ähnlichen Bedingungen wie sie auch in dieser Arbeit vorlagen) kein Eintrag mehr von *Lucifer Yellow* in das Zellinnere erfolgt.

Bei der Auswertung von Impedanzspektren zellbedeckter Goldfilmelektroden nach dem oben genannten Modell wird der Membranwiderstand  $R_m$  (siehe Abb. 3.6.) vernachlässigt, da dessen Impedanz sehr viel höher ist als die Impedanz der parallel auftretenden Membrankapazität  $C_m$ . Durch Bildung von Elektroporen kann jedoch der Membranwiderstand herabgesetzt werden, so dass sich daraus Auswirkungen auf die Auswertung nach dem Modell von Giaever und Keese (1991) ergeben könnten. Hartmann (2003) konnte jedoch durch Simulationen von Impedanzspektren mit herabgesetztem Membranwiderstand zeigen, dass ein Absinken der Zellparameter  $R_b$  und  $\alpha$  direkt nach dem Elektroporationspuls nicht allein auf die Bildung von Elektroporen zurückzuführen ist, sondern sehr viel stärker durch morphologische Änderungen der Zellen überlagert ist. Die Änderungen der Morphologie sowohl von NRK- als auch MDCK II-Zellen sind also der Grund für die

Erholungsphasen von 30 bis 50 min, die durch ECIS in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden konnten. Die zellmorphologischen Änderungen durch die Elektroporation sind in Abbildung 5.1 modellhaft dargestellt. Durch den elektrischen Puls kommt es zu einer reversiblen Abrundung der Zellen auf der Goldfilmelektrode, was zu einer Aufweitung des Interzellularspaltes führt (Abb. 5.1, Kreis 1). Diese Aufweitung kann sich in dem Absinken des ECIS-Parameters  $R_b$  widerspiegeln. Die Abrundung der Zellen führt ebenfalls zu einer Erhöhung des Zell-Substrat-Abstandes (Abb. 5.1, Kreis 2), indiziert durch die Abnahme des Parameters  $\alpha$  nach dem Elektroporationspuls. Die Erhöhung der Membrankapazität nach der Elektroporationsbehandlung könnte dadurch erklärt werden, dass durch die Abrundung der Zellen sich eine größere Fläche für den kapazitiven Stromweg bei den ECIS-Messungen bietet (Abb. 5.1, Kreis 3). Gestützt wird diese Vorstellung durch Ergebnisse von Van Driessche et al. (1999). Dort konnte durch *patch clamp*-Messungen gezeigt werden, dass ein Anschwellen von Epithelzellen zu einer Herabsetzung der Membrankapazität führt.



**Abb. 5.1:** Modell zur Interpretation der ECIS-Analyse auf zellmorphologischer Ebene. Links sind adhärenente und konfluente Zellen auf Goldfilmelektroden vor dem Elektroporationspuls dargestellt. Auf der rechten Seite sind dieselben Zellen direkt nach dem Elektroporationspuls zu sehen. 1: Aufweitung des Interzellularspaltes. 2: Vergrößerung des Zell-Substrat-Abstandes. 3: Zunahme der Fläche für den kapazitiven Stromfluss.

### ***Einfluss der Pulsform bei der Elektroporation adhärenenter Zellen***

Über den Mechanismus wie pDNA durch Elektroporation in die Zelle gelangt, wird bis heute kontrovers diskutiert (siehe auch Abschnitt 1.1.2.1). Xie et al. (1990) favorisieren ein Modell, in dem die DNA nach vorheriger Interaktion mit der Zellmembran durch die Elektroporen in die Zelle diffundiert. Chernomordik et al. (1990) vermuten hingegen, dass elektrophoretische Kräfte des externen elektrischen Feldes für den Eintrag von DNA in die Zelle verantwortlich sind. Sukharev et al (1992) und Golzio et al. (1998) gehen ebenfalls davon aus, dass DNA mittels elektrophoretischer Kräfte durch die Elektroporen in das Innere der Zelle gelangt. Zudem führten Golzio et al. (2002) Elektroporationen mit Fluoreszenzfarbstoffen und fluoreszenzmarkierter pDNA an Zellen durch. Gleichzeitig verfolgten sie den Verlauf der Experimente an adhärenenten Einzelzellen mittels Fluoreszenzmikroskopie. Dabei stellte sich heraus, dass die DNA unter Einfluss des elektrischen Feldes durch Bildung lokaler Aggregate mit der Zellmembran interagiert und zwar nur auf der Seite, die in Richtung der negativen Elektrode wies. Erst 30 min nach dem Elektroporationspuls konnten Golzio et al. (2002) die fluoreszenzmarkierte DNA in der Zelle nachweisen. Die Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffes erfolgte hingegen auf beiden Seiten der Zelle. Diese Studie bestätigt die

Vermutung, dass der Eintrag von Molekülen in Zellen durch Elektroporation abhängig ist von der Ladung des Makromoleküls.

Bezogen auf die Elektroporation von adhären und konfluenten Zellen mit Wechsellspannungspulsen der normalen bipolaren Sinus-Form bedeutet dies, dass durch die wechselnde Polarisierung der Arbeitselektrode unter der Zellschicht der elektrophoretische Effekt auf die im Elektroporationsmedium befindlichen Makromoleküle herausgemittelt wird. Um eine elektrophoretische Bewegung von negativ geladenen Molekülen in die Zellen mit dem in dieser Arbeit verwendeten Elektroporationsaufbau zu erzielen, muss daher die Arbeitselektrode positiv polarisiert werden. Es wurden deshalb Elektroporationsexperimente an NRK-Zellen durchgeführt, bei denen eine Variation der Pulsform erfolgte. Zum Einsatz kamen sowohl der positiv verschobene unipolare Sinus (PV-Sinus) als auch der negativ verschobene unipolare Sinus (NV-Sinus). Der Unterschied von Sinus-Pulsen zu *Exponential-decay*-Pulsen, wie sie von Golzio et al. (2002) verwendet wurden, ist, dass die Amplituden, die zur Permeabilisierung der Zellmembran führen, nur für kurze Zeit aber repetitiv erreicht werden. Daraus resultiert eine höhere Überlebensrate der permeabilisierten Zellen, so dass es möglich ist, längere Pulsdauern bei der Elektroporation zu verwenden. Ein großer Vorteil dabei ist, dass durch längere Pulsdauern der elektrophoretische Effekt auf geladene Moleküle erhöht werden kann. Der Einfluss der verschiedenen Pulsformen bei der Elektroporation auf die adhären und konfluenten NRK-Zellschichten wurde in dieser Arbeit durch den Eintrag von FITC-Dextran in die Zellen, durch ECIS-Messungen der Zellerholung und der vertikalen Zellbewegung (*Micromotion*) untersucht.

Lo et al. (1993) konnten durch ECIS-Messungen zeigen, dass die Motilität humaner Fibroblasten bei einer Absenkung der Umgebungstemperatur von 37 °C auf 27 °C eine deutliche Abnahme erfährt, bedingt durch die geringere Zellaktivität bei unphysiologisch niedrigen Temperaturen. Diesen Effekt konnten Lo et al. (1993) ebenfalls bei Entzug von Glucose beobachten. Nach Austausch des Kulturmediums gegen ein glucosefreies Medium konnte sie über 40 Stunden eine kontinuierliche Abnahme der *Micromotion* detektieren. Durch erneuten Wechsel des Mediums in glucosehaltiges Kulturmedium nahm die Motilität der Zellen wieder deutlich zu bis zum Erreichen der Anfangswerte. Diese Studie zeigt recht deutlich die enge Korrelation der Stoffwechselsituation adhärenter Zellen und den mittels ECIS gemessenen Impedanzfluktuationen. Außerdem konnten Lo et al. (1993) mit ihren Untersuchungen zeigen, dass Veränderungen in der Zellbewegung durch ECIS nicht-invasiv und in hoher zeitlicher Auflösung aufgezeichnet werden können.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Verwendung verschiedener Pulsformen bei der Elektroporation (Sinus, PV-Sinus, NV-Sinus) einerseits Auswirkung auf die Effizienz der Farbstoffaufnahme hat, andererseits auch die Zellerholung maßgeblich beeinflusst. Die *Dye-Uptake*-Studien mit FITC-Dextran zeigen, dass durch Applikation des PV-Sinus-Pulses kein dauerhafter Eintrag des Farbstoffes in die NRK-Zellen erfolgte. In den *Recovery*-Studien konnte beobachtet werden, dass sich die Impedanz der NRK-Zellschicht nach Applikation des PV-Sinus-Pulses nicht wieder auf ihren Ausgangswert erholte. Dies zeigt, dass die Zellen eine sehr starke, irreversible Schädigung erfahren haben. Die Messung der *Micromotion* ergab ebenfalls, dass der PV-Sinus-Puls, der die zum Eintrag von Nukleinsäuren geeignete Polarität aufweist, die NRK-Zellen so stark beeinflusst, dass deren Motilität nach der Elektroporation drastisch reduziert sind.

Ein Vergleich der Ergebnisse der Elektroporationsexperimente, bei denen zusätzlich die Pulsdauer variiert wurde, zeigt, dass eine Pulsdauer von  $\tau = 500$  ms einen invasiven Einfluss auf die permeabilisierte Zellschicht ausübt. So zeigen alle Phasenkontrastaufnahmen von NRK-Zellen, die mit einer Pulsdauer von  $\tau = 500$  ms elektroporiert wurden, dass einige Zellen morphologische Unregelmäßigkeiten und die Zellschichten teilweise leichte Fehlstellen aufweisen. Dies ist eventuell dadurch zu erklären, dass der Spannungsabfall über der Grenzfläche zwischen Elektrode und Elektrolyt bei längerer Pulsdauer eine stärkere Joulesche Erwärmung bewirkt, so dass die Zellen stärker geschädigt werden. Die Fluoreszenzaufnahmen zeigen zusätzlich, dass durch die Elektroporation mit dem Sinus-Puls ein sehr homogener Farbstoffeintrag sowohl bei einer Pulsdauer von  $\tau = 200$  ms als auch bei  $\tau = 500$  ms in die Zellen erreicht werden konnte, wobei unter der erstgenannten Bedingung keine morphologischen Änderungen der Zellen beobachtet werden konnten. Die Verwendung des NV-Sinus zur Elektroporation führte bei beiden Pulsdauern zu einer sehr inhomogenen Farbstoffaufnahme. Durch Elektroporation mit dem PV-Sinus-Puls und einer Pulsdauer von  $\tau = 200$  ms konnte kein Farbstoffeintrag in die Zellen erreicht werden. Bei einer Pulsdauer von  $\tau = 500$  ms hingegen, scheint eine Permeabilisierung der Kernmembran stattgefunden zu haben, da in diesem Fall nur eine leichte Fluoreszenz im Bereich des Zellkerns zu beobachten war. Die Ergebnisse aus den ECIS-Messungen zur Zell-Recovery bestätigen diese Beobachtungen. Nach dem Elektroporationspuls mit einer Pulsdauer von  $\tau = 200$  ms erreichten die Impedanzwerte der Zellschichten sowohl bei Applikation des Sinus, als auch des NV-Sinus ihre Ausgangswerte nach ca. 30 min. Die NRK-Zellen, die bei derselben Pulsdauer mit dem PV-Sinus-Puls elektroporiert wurden, erfuhren eine derart starke Schädigung, dass die Impedanzwerte zwar gegen Ende des Messzeitraumes (10 h) wieder anstiegen, jedoch nicht mehr das Niveau der Anfangswerte erreichten. Bei der Elektroporation mit einer Pulsdauer von  $\tau = 500$  ms zeigte sich ein vergleichbares Bild. Auch in diesem Fall schädigte der PV-Sinus-Puls die Zellen irreversibel, so dass im gesamten Messzeitraum keine Erholung der Zellen festgestellt werden konnte. Nach Applikation des NV-Sinus-Pulses erholten sich die Zellen innerhalb von 70 min, während sich die Zellen nach dem Sinus-Puls in demselben Zeitrahmen wieder erholten, wobei jedoch die Ausgangsimpedanzwerte nicht mehr erreicht wurden. Bei den ECIS-Messungen im *Micromotion*-Modus und der anschließenden Auswertung mit Hilfe der Standardabweichung der Inkremente als Funktion der Abtastrate ist zu erkennen, dass sich nach der Elektroporation mit dem PV-Sinus-Puls sowohl bei einer Pulsdauer von  $\tau = 200$  ms als auch bei  $\tau = 500$  ms die Standardabweichung nicht mehr stark ändert. Da diese Methode die Möglichkeit bietet, sehr sensitiv Änderungen im Zellmetabolismus zu detektieren (Lo et al., 1993), kann daraus die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die NRK-Zellen durch Applikation des PV-Sinus-Pulses so stark beeinträchtigt werden, dass ihr Metabolismus nicht mehr in gewohntem Maße aufrecht erhalten werden kann und daher die Zellmotilität erlahmt. Diese Interpretation wird ebenfalls durch die Lebend-Tod-Färbungen der NRK-Zellen 2 h nach der Elektroporation bestätigt. Die oben genannten Beobachtungen konnten bei Applikation der beiden anderen Pulsformen (Sinus und NV-Sinus) bei der Elektroporation nicht gemacht werden. Nach der Elektroporation mit einer Pulsdauer von  $\tau = 200$  ms zeigte sich für beide Pulsformen keine signifikante Änderung der Standardabweichung. Hingegen bei Elektroporation mit  $\tau = 500$  ms nahm die Standardabweichung

der Inkremente als Funktion der Abtastrate nach Applikation des Sinus-Pulses etwas stärker ab, als bei Verwendung des NV-Sinus-Pulses. Diese Analyse zeigt, dass die Anwendung der beiden Pulsformen Sinus und NV-Sinus bei der Elektroporation keine Änderung im Zellstoffwechsel induzieren, d.h. die NRK-Zellen erfahren keine starke Beeinträchtigung. Eine Erhöhung der Pulsdauer bewirkt jedoch bei Applikation des Sinus-Pulses eine stärkere Einflussnahme auf den Zellmetabolismus. Dies bestätigt wiederum die zu Beginn dieser Arbeit bestimmten Elektroporationsparameter ( $f = 100 \text{ kHz}$ ,  $A = 3 \text{ V}$ ,  $\tau = 200 \text{ ms}$ ), die bei größtmöglicher Elektroporationseffizienz eine sehr geringe Invasivität des Permeabilisierungsprozesses auf die Zellen gewährleisten.

Die Ergebnisse aus den *Dye-Uptake*-, *Recovery*- und *Micromotion*-Studien bestätigen die Beobachtungen von Wegener et al. (2002), die ebenfalls durch *Dye-Uptake*-, und *Recovery*-Experimente zeigen konnte, dass eine Erhöhung der Pulsdauer auf  $\tau = 500 \text{ ms}$  zu einer starken Beeinträchtigung der Zellen führt.

Ein Wechsel der Pulsform vom Sinus zum PV-Sinus ist also unter den üblichen Elektroporationsbedingungen zur reversiblen Permeabilisierung von NRK-Zellen aufgrund zu hoher Invasivität nicht möglich. Die Vermutung liegt nahe, dass durch die Applikation des PV-Sinus-Pulses und die damit einhergehende positive Polarisierung der Goldelektrode bewirkt, dass negativ geladene Moleküle oder Ionen des Mediums, wie Chlorid- oder Hydroxidionen an der Elektrodenfläche oxidiert werden. Dies könnte zur Bildung freier Radikale führen, die eine nachhaltige Schädigung der Zellen hervorrufen. Gestützt wird diese Vermutung durch Angaben von Teissié et al. (1999), die reaktive sauerstoffenthaltende Spezies für eine Schädigung der Zellen verantwortlich machen, deren Ausmaß sowohl von der Feldstärke als auch der Dauer des Pulses abhängt.

Um die negative Auswirkung des PV-Sinus bei der Elektroporation auf die NRK-Zellen zu minimieren, wurden in dieser Arbeit Experimente durchgeführt, bei denen vor der Elektroporation das Kulturmedium gegen chloridfreies Medium ausgetauscht wurde. Dabei konnte in *ECIS-Recovery*-Studien gezeigt werden, dass die Elektroporation von NRK-Zellen mit dem PV-Sinus-Puls in chloridfreiem Medium zu einem etwas geringeren Absinken der Impedanzwerte führt, als bei Elektroporation in chloridhaltigem Medium. Jedoch wurden die NRK-Zellen auch bei der Elektroporation in chloridfreiem Medium irreversibel durch den PV-Sinus-Puls geschädigt, so dass die Impedanz der Zellschicht nach dem Puls innerhalb von 160 min ihre Ausgangswerte nicht wieder erreichte. Die tendenziell verminderte Invasivität in Abwesenheit von Chlorid-Ionen unterstützt einerseits die Vermutung der Bildung freier Radikale (s.o.), macht aber andererseits ebenso deutlich, dass der PV-Sinus-Puls unter den hier getesteten Bedingungen nicht dazu verwendet werden kann, um bei der Elektroporation adhärenter Zellen einen elektrophoretischen Effekt auf im Medium befindliche negativ geladene Moleküle wie beispielsweise Nukleinsäuren zu bewirken.

### ***Gentransfer in adhärenente Säugerzellen durch Elektroporation von Nukleinsäuren***

Die Elektroporation von eukaryotischen Zellen wird sehr häufig genutzt, um Nukleinsäuren mit dem Ziel der rekombinanten Expression in Zellen einzutragen. Erstmals konnten Neumann et al. 1982 ein Gen für die Thymidin-Kinase (TK) durch Suspensionselektroporation in TK-defiziente Lyoma-Zellen

aus Maus zur Expression bringen. Die Transfektionseffizienz war bei diesen Experimenten noch sehr gering und lag bei 0.1 ‰. Seitdem entwickelte sich die Elektroporation in Suspension immer mehr zur Standardtechnik für die Transfektion eukaryotischer Zellen mit DNA. In den allermeisten Fällen wird dazu Plasmid-DNA eingesetzt (pDNA).

Zum Gentransfer durch Elektroporation adhärenter Zellen, die dazu nicht von ihrem Substrat abgelöst werden, wurden bis heute nur wenige Studien veröffentlicht.

Raptis und Firth (1990) konnten durch Elektroporation adhärenter Zellen pDNA in das Zytoplasma von F111-Zellen einbringen. Zur Untersuchung der Expression der eingetragenen pDNA wurden die Zellen jedoch fünf Stunden nach der Elektroporation im Verhältnis 1:10 auf gewöhnliche Petrischalen subkultiviert. Auf diese Weise konnte die pDNA während der Mitose in den Zellkern gelangen und exprimiert werden. Zeng und Chang (1991) führten ebenfalls *in situ*-Elektroporationen an adhärenen Zellen durch. Sie konnten pDNA mit dem Gen für  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -gal) in 80 % der elektroporierten Zellen zu Expression bringen, bei einer Überlebensrate von 50 %. Die Zellen hatten bei diesen Experimenten jedoch noch keine Konfluenz erreicht. Yang et al. (1995) kultivierten Zellen auf mikroporösen Membranen aus Polyethylenterephthalat zur *in situ*-Elektroporation. Die zellbewachsenen Membranen wurden so zurecht geschnitten, dass sie zwischen die Elektroden eine Küvette für Suspensionselektroporation gesteckt werden konnten. Durch Elektropermeabilisierung in einem kommerziell erhältlichen Elektroporator für Suspensionselektroporation konnten Yang et al. (1995) in adhärenente Zellen unterschiedlicher Zellzyklusstadien pDNA eintragen und eine Expression des betreffenden Gens beobachten. Sie konnten dabei feststellen, dass die Transfektionseffizienz durch die Elektroporation abhängig vom Zellzyklus ist. Wurden Zellen im exponentiellen Wachstum elektroporiert, lag die Effizienz bei 20 - 30 %. Bei Zellen, deren Wachstum durch Serumentzug verhindert wurde, konnten Yang et al. (1995) durch Elektroporation eine Transfektionseffizienz von 1 - 15 % detektieren. Zellen, die im konfluenten Zustand elektroporiert wurden, zeigten nur eine Effizienz von 0.1 - 0.5 % eine Expression des entsprechenden Gens. Golzio et al. (2002) und Faurie et al. (2003) beobachteten den Eintrag von fluoreszenzmarkierter DNA durch Elektroporation in adhärenente Zellen. Elektroporiert wurden dabei einzelne Zellen, wobei die Aufklärung des Mechanismus wie DNA bei der Elektroporation in die Zellen gelangt im Vordergrund stand, so dass keine Angabe der Transfektionseffizienz erfolgte. Müller et al. (2003) elektroporierten adhärenente und konfluente Zellen, die auf mikroporösen Filtereinsätzen kultiviert wurden, wie sie üblicherweise in der Zellkultur verwendet werden. Die Transfektionseffizienz für die Elektroporation konfluenten Zellen mit *Exponential-decay*-Pulsen einer Feldstärke von 3 kV/cm geben Müller et al. (2003) mit 47 % an.

In der vorliegenden Arbeit wurden adhärenente und konfluente Zellen ebenfalls in Gegenwart von Nukleinsäuren *in situ* elektroporiert. Durch Elektroporation von NRK-Zellen in Gegenwart des Plasmids pEGFP-N1 konnte in 2 von 30 Experimenten eine Expression von GFP beobachtet werden. Die Transfektionseffizienz lag dabei bei ca. 30 %. Es war bisher jedoch nicht möglich weitere pDNA in adhärenente und konfluente NRK- oder MDCK II-Zellen per *in situ* Elektroporation zur Expression zu bringen. Eine Erklärung dafür könnte die Größe der eingesetzten Plasmide sein. pEGFP-N1 ist mit einer Länge von 4.7 kb das kleinste verwendete Plasmid. Die weiteren in dieser Arbeit eingesetzten Plasmide haben Größen von 5.8 kb (pEYFP-Actin) über 6.8 kb (pSV $\beta$ -Galactosidase) bis hin zu 7.2 kb

(pCMV $\beta$ ). Es wäre daher denkbar, dass die drei zuletzt genannten Plasmide aufgrund ihrer Größe in der freien Diffusion durch die Elektroporen gehindert werden. Eine weitere Erklärung für die Schwierigkeit der Transfektion von konfluenten Zellmonolayern durch Elektroporation könnte der Transport der in das Zytoplasma eingetragenen pDNA durch den Kernporenkomplex (engl. *nuclear pore complex*, NPC) in den Nukleus sein. Die Effektivität des Gentransfers ist umso höher, je mehr Zellen sich zum Zeitpunkt der Elektroporation in der Proliferationsphase befinden (Colosimo et al., 2000), da die im Zytoplasma befindliche pDNA in den Mitosezyklen der Zelle und damit während des Zusammenbruchs der Kernmembran in den Nukleus gelangen und dort transkribiert werden kann. Raptis und Firth (1990), die ebenfalls adhärente und konfluente Zellen in Gegenwart von pDNA elektroporierten, subkultivierten die Zellen aus diesem Grunde fünf Stunden nach der Elektroporation und konnte auf diese Weise eine Expression des betreffenden Gens erreichen. In anderen Studien werden die adhären Zellen im nicht konfluenten Zustand elektroporiert, um zu gewährleisten, dass die DNA während der Mitose in den Zellkern gelangt, was zu einer erhöhten Expressionsrate führte (Zeng und Chang, 1991; Yang et al. 1995).

Da die Elektroporationsmethode, die in dieser Arbeit verwendet wurde, in Zukunft dazu dienen soll die Auswirkung von exprimierten Genprodukten auf die Zellmorphologie *in situ* mittels ECIS zu beobachten, war es im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht sinnvoll, die Zellen im nicht konfluenten Zustand zu elektroporieren oder sie nach der Permeabilisierung einer Subkultivierung zu unterwerfen. Es wurden daher zunächst andere Strategien verfolgt, um einen Übergang der pDNA aus dem Zytoplasma in den Zellkern zu ermöglichen.

Eine dieser Strategien besteht darin, sich den aktiven Transport von DNA durch den NPC in den Nukleus per Kernlokalisierungssignal (engl. *nuclear localisation signal*, NLS) zunutze zu machen. Eine Kernpore besitzt einen Durchmesser von ca. 10 nm (Adam et al., 1990), was erklärt, warum eine freie Diffusion von Molekülen mit einem Molekulargewicht von mehr als 40 kDa durch den Kernporenkomplex nicht möglich ist, und diese nur durch aktiven Transport in den Nukleus gelangen können. Für diesen Transport werden viele verschiedene Faktoren benötigt, von denen bisher nur wenige bekannt sind. Die NLS sind eine Gruppe der bisher bekannten Faktoren. Es handelt sich dabei um bestimmte Aminosäuresequenzen innerhalb eines Proteins. Die meisten Proteine, die durch die Kernmembran transportiert werden, enthalten eigene NLS-Sequenzen. Zusätzlich sind bestimmte Shuttle-Proteine bekannt, die einerseits an NLS-Sequenzen binden und andererseits den Kontakt zum NPC herstellen. Zu nennen sind hier Importin- $\alpha$ , Importin- $\beta$ , hnRNP A1 und Nucleolin (Nigg, 1997). Dean (1997), Vacik et al. (1999) und Dean et al. (1999) machten sich das Wissen über NLS zunutze und verwendeten zur Transfektion pDNA, die Fragmente des SV40 (Simian Virus 40) *enhancer* und des SV40 *early promotor* enthielt. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Transfektionseffizienz bei Verwendung dieser pDNA durch vermehrten Eintrag dieser DNA in den Zellkern erhöht, insbesondere in den Nukleus von postmitotischen Zellen. Es wird vermutet, dass NLS-enhaltende Proteine im Zytoplasma der transfizierten Zellen an diese DNA-Sequenzen binden, dadurch vom NPC erkannt werden und dann aktiv in den Zellkern transportiert werden.

Es wurden deshalb auch in dieser Arbeit Plasmide (pEYFP-Actin und pSV $\beta$ -Galactosidase) zur Elektrotransfektion konfluenter Zellen verwendet, welche die von Dean et al. (1999) genannten Fragmente enthalten. Der Einsatz dieser Plasmide führte jedoch nicht zu einer gesteigerten

Transfektionseffizienz. Ein Grund dafür könnte die herabgesetzte Stoffwechselaktivität von Zellen in konfluenten Monolayern sein. Dean (1997) konnte zeigen, dass der Transport von pDNA aus dem Zytoplasma in den Nukleus nicht nur sequenzabhängig ist, sondern auch von der Transkriptionsaktivität der Zelle abhängt. Durch Inhibierung der Transkription verblieb die injizierte pDNA im Zytoplasma. Wurde hingegen nur die Translation der Zelle inhibiert, konnte keine signifikante Verringerung des aktiven Transportes der pDNA in den Nukleus detektiert werden. Möglicherweise haben NRK- und MDCK II-Zellen in konfluenten Monolayern eine so geringe Transkriptionsaktivität, dass der aktive Transport der Plasmide in den Nukleus nicht stattfinden kann. Bestätigt wird dies durch Studien von Feldherr und Akin (1994), die zeigen konnten, dass der Transport zwischen Zellkern und Zytoplasma vom Zellzyklus abhängig ist. Die Transportrate des NPC ist in proliferierenden Zellen sehr viel größer als in postmitotischen Zellen.

Eine weitere Strategie um den Transport der pDNA in den Zellkern zu ermöglichen, beinhaltet die Verwendung von Polyethylenimin (PEI, siehe auch Kap. 1.2.1.2) als zusätzliches Reagenz bei der Elektroporation konfluenter Zellschichten. Dieses kationische Polymer bildet mit DNA durch elektrostatische Wechselwirkung kondensierte komplexe Aggregate, deren Größe in der Literatur mit 20 - 40 nm (Dunlap et al., 1997), 40 - 60 nm (Tang und Szoka., 1997) und 50 - 80 nm (Ogris et al., 1998) angegeben wird, abhängig von der DNA- und Salzkonzentration bei der Herstellung der Aggregate.

Durch rasterkraftmikroskopische Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit hergestellten PEI/DNA-Komplexe eine Kugelform aufweisen und einen Durchmesser von 20 - 30 nm haben, was die Angaben von Dunlap et al. (1997) bestätigt.

Bei der Wahl des optimalen Verhältnisses von PEI und DNA (Verhältnis von  $\text{Phosphor}_{\text{DNA}}/\text{Stickstoff}_{\text{PEI}} = 1/10$ ) weisen die resultierenden Komplexe eine leicht positive Nettoladung auf. Dies führt zu einer erleichterten endocytotischen Aufnahme in die Zelle, da die positiv geladenen Komplexe mit der negativ geladenen Zellmembran interagieren können und gleichzeitig könnte die geringe Größe der Komplexe dazu führen, dass die bei der Elektropermeabilisierung gebildeten Elektroporen leichter durch freie Diffusion überwunden werden. Außerdem vermuten Boussif et al. (1995), dass diese Aggregate die DNA vor einer Zerstörung durch Nukleasen schützen und somit zu einer erhöhten Transfektionseffizienz beitragen. Das kationische Polymer PEI erleichtert vermutlich zusätzlich den Durchtritt der DNA durch die Kernporen in das Innere des Nukleus. Bis heute ist der Mechanismus dieses Transportes vom Zytoplasma in den Zellkern nicht bekannt, jedoch konnten Godbey et al. (1999) zeigen, dass sich nach der Transfektion intakte DNA/PEI-Komplexe im Zellkern befanden. Dies zeigt, dass eine Trennung von Polykation und DNA beim Eintritt in den Zellkern nicht erforderlich ist. Pollard et al. (1998) injizierten DNA/PEI-Komplexe direkt in den Zellkern und konnten eine 2 - 3fache Erhöhung der Expressionsrate im Vergleich zu Injektionen dieser Komplexe in das Zytoplasma beobachten. Dies zeigt, dass die starke Kondensation der DNA durch PEI die Transkription derselben im Nukleus nicht inhibiert.

Die in dieser Arbeit hergestellten DNA/PEI-Komplexe wurden bei der *in situ* Elektroporation adhärenter und konfluenter Zellen eingesetzt, um eine Steigerung der Transfektionseffizienz zu erreichen. Verwendet wurden dazu die bereits genannten Plasmide pEGFP-N1, pSV $\beta$ -Galactosidase

und pCMV $\beta$ . Es konnte dabei jedoch weder in NRK- noch in MDCK II-Zellen eine Expression der betreffenden Gens beobachtet werden. Ein Grund dafür könnte wiederum die geringe Transkriptionsaktivität der konfluenten Zellen sein. Brunner et al. (2002) konnten beobachten, dass bei Transfektionen unter Verwendung von verzweigten PEI-Molekülen die Genexpression von postmitotischen Zellen ( $G_0$ - und  $G_1$ -Phase) 100fach geringer ist als bei Zellen, welche die Mitose nach der Transfektion noch durchlaufen (späte S-,  $G_2$ - und M-Phase). Bei Einsatz von linearen PEI-Molekülen, wie sie auch in dieser Arbeit zum Einsatz kamen, konnten Brunner et al. (2002) nur noch eine 6fach geringere Expression in postmitotischen Zellen feststellen.

Eine weitere Vermutung für die geringe Effizienz bei der Elektrotransfektion konfluenter Zellschichten ist, dass die DNA auch unter zu Hilfenahme der genannten Strategien nicht in den Zellkern eingebracht werden und damit keine Transkription der DNA erreicht werden konnte. Um dieses Problem zu umgehen, wurden in der vorliegenden Arbeit Elektroporationsexperimente mit mRNA durchgeführt, wobei ein Import der Nukleinsäure in den Zellkern nicht erforderlich ist, da die Translation im Zytoplasma stattfindet. Die mRNA wurde durch *in vitro*-Transkription der entsprechenden Vektoren hergestellt und anschließend bei der Elektroporation konfluenter Zellschichten eingesetzt. Als Reportergene wurden dabei EGFP und  $\beta$ -Galactosidase eingesetzt, da sich deren Expressierung leicht detektieren lässt. In der Literatur sind ähnliche Verfahren schon häufiger beschrieben worden (Van Tendeloo *et al.*, 2001; Ponsaerts *et al.*, 2002; Yokoe und Meyer, 1996). Van Tendeloo und Ponsaerts führten die Elektroporation in Suspension an humanen dendritischen Zellen durch, während Yokoe und Meyer mRNA in adhärenzte RBL-Zellen (*rat basophilic leukemia*) über Elektroporation eintrugen.

In dieser Arbeit konnte jedoch keine Expression der mRNA nach *in situ* Elektroporation von konfluenten NRK- oder COS 7-Zellen beobachtet werden. Es konnte jedoch die biologische Aktivität der hergestellten mRNA durch DMIE-C<sup>®</sup>-Transfektion dieser Zelltypen bewiesen werden (persönliche Mitteilung C. Hartmann). Der unaufgereinigte Transkriptionsansatz wurde dafür zuvor mit DNase behandelt, um die noch enthaltenen DNA-Bruchstücke zu zerstören. Möglicherweise ist nicht nur die Transkriptionsaktivität sondern auch die Translationsrate von konfluenten Zellen so stark herabgesetzt, dass keine Expression der in das Zytoplasma eingetragenen mRNA mehr stattfindet.

Es stellt sich hierbei die Frage, ob durch die *in situ* Elektroporation adhärenzter und konfluenter Zellschichten Nukleinsäuren in das Zytoplasma eingebracht werden können. Es wurden daher in dieser Arbeit konfluente NRK-Zellschichten in Gegenwart von pDNA (pEGFP-N1) unter Standardbedingungen elektroporiert und 2 h nach der Permeabilisierung im Verhältnis 1:10 subkultiviert. Auf diese Weise kann die pDNA während der Mitose vom Zytoplasma in den Zellkern gelangen und dort transkribiert werden. Dabei konnte 48 h nach der Elektroporation in einigen Zellen (< 1 %) die Expression von EGFP detektiert werden. Diese geringe Transfektionseffizienz bestätigt die Ergebnisse Yang et al. (1995), die für die Elektrotransfektion konfluenter Zellen eine Effizienz von 0.1 - 0.5 % angeben. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen also, dass es prinzipiell möglich ist, Nukleinsäuren durch *in situ* Elektroporation in konfluente Zellschichten einzubringen, wenn auch mit noch geringer Expressionsrate.

## 6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Säugetierzellen auf planaren Goldfilmelektroden kultiviert, um in diesem System die *in situ* Elektroporation adhärenter und konfluenter Zellschichten näher zu charakterisieren. Über die Permeabilisierung von Zellen durch Applikation von Wechselspannungspulsen sollen zur gezielten Manipulation biologisch aktive Moleküle aus dem Extrazellularraum in die Zellen eingetragen werden.

Zunächst wurden daher sowohl durch theoretische Betrachtungen zur Elektropermeabilisierung als auch durch Elektroporation adhärenter Zellmonoschichten in Gegenwart eines Fluoreszenzfarbstoffes die optimalen Parameter zur *in situ* Elektroporation ermittelt.

Durch *in situ* Elektroporation adhärenter NRK- und MDCK II-Zellmonoschichten konnte der Eintrag fluoreszenzmarkierter Dextran-Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 2 MDa erreicht werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die bei der Permeabilisierung gebildeten Elektroporen einen Durchmesser von mindestens 40 nm besitzen müssen. Die Effizienz des Farbstoffeintrages lag bei 85 - 100 % im Hinblick auf die Zahl der beladenen Zellen und ist damit weit besser als es für die herkömmliche Suspensionselektroporation beschrieben wurde.

Die *in situ* Elektroporation adhärenter Zellmonoschichten wurde in dieser Arbeit mit der ECIS-Technik kombiniert, so dass der Einfluss des Wechselspannungspulses während der Elektroporation auf die Zellmorphologie verfolgt werden konnte. Dabei konnte erstmals gezeigt werden, dass durch die Elektroporation mit optimierten Parametern die Zellmorphologie, insbesondere Zell-Zell- und Zell-Substrat-Kontakte, beeinflusst werden. Diese Beeinflussung ist jedoch vollständig reversibel und bereits 30 - 50 min nach dem elektrischen Puls nicht mehr detektierbar.

Durch eine nicht-invasive, elektrische Messung der Zellmotilität (*Micromotion*) wurde der Einfluss von verschiedenen Pulsformen bei der Elektropermeabilisierung verfolgt. Dabei wurde deutlich, dass ein ins Positive verschobene unipolarer Sinus-Puls (PV-Sinus-Puls) die adhärenten Zellmonoschichten irreversibel schädigt, während der Einsatz eines bipolaren Sinus-Pulses und eines negativ verschobenen unipolaren Sinus-Pulses (NV-Sinus-Puls) keine Schädigung hervorruft. Der Eintrag von Farbstoffen mit der oben beschriebenen Effizienz konnte nur durch einen Elektroporationspuls mit dem bipolaren Sinus erreicht werden, nicht jedoch durch Verwendung des PV-Sinus. Durch Applikation des NV-Sinus-Pulses konnten ebenfalls Farbstoffe in die Zellen eingebracht werden, jedoch mit etwas geringerer Effizienz als bei der Elektroporation mit dem Sinus-Puls.

Erstmals konnte gezeigt werden, dass durch *in situ* Elektroporation adhärenter und konfluenter Zellen mit der in dieser Arbeit verwendeten Technik unter Einsatz von Wechselspannungspulsen sowohl der Eintrag von Peptiden als auch von Nukleinsäuren (Plasmid-DNA) möglich ist. Bei Einbringung der Plasmid-DNA konnte eine Expression des entsprechenden Gens mit einer Transfektionseffizienz von 30 % erreicht werden.

## 7 Literatur

### A

- Abidor I.G., Arakeleyan V.B., Chernomordik L.V., Chizmadzhev Y.A., Pastushenko V.F., Tarasevich M.R. (1979) Electric breakdown of bilayer membranes: I. The main experimental facts and their qualitative discussion. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 6: 37-52
- Adam S., Marr R.S., Gerace L. (1990) Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmatic factors. *J. Cell Biol.* 111: 807-816
- Arndt S., Seebach J., Psathaki K, Galla H.-J., Wegener J. (2004) Bioelectrical impedance assay to monitor changes in cell shape during apoptosis. *Biosens. Bioelectron.* 19: 583-594

### B

- Baker A., Saltik M., Lehrmann H., Killisch I., Mautner V., Lamm G., Christofori G., Cotten M. (1997) Polyethylenimine (PEI) is a simple, inexpensive and effective reagent for condensing and linking plasmid DNA to adenovirus for gene delivery. *Gene Ther.* 4: 773-782
- Beebe S.J., Fox P.M., Rec L.J., Willis E.L.K., Schoenbach K.H. (2003) Nanosecond, high-intensity pulsed electric fields induce apoptosis in human cells. *FASEB J.* 17: 1493-1495
- Belehradek J.Jr., Orłowski S., Poddevin B., Paoletti C., Mir L.M. (1991) Electrochemotherapy of spontaneous mammary tumours in mice. *Eur. J. Cancer* 27: 73-76
- Belehradek M., Domenge C., Luboinski B., Orłowski S., Behr J.P., Mir L.M. (1993) Electrochemotherapy, a new antitumour treatment. First clinical phase I-II trial. *Cancer* 72: 3694-3700
- Bier M., Hammer S.M., Canaday D.J., Lee R.C. (1999) Kinetics of sealing for transient electropores in isolated mammalian skeletal muscle cells. *Bioelectromagnetics* 20: 194-201
- Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M.A., Mergny M., Scherman D., Demeinex B., Behr J.P. (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7297-7301
- Branden L.J., Mohamed A.J., Smith C.I.E. (1999) A peptide nucleic acid-nuclear localization signal fusion that mediates nuclear transport of DNA. *Nature* 398: 784-787
- Brash D.F., Reddel R.R., Quanrud M., Yang K., Farrel M.P., Harris C.C. (1987) Strontium phosphate transfection of human cells in primary culture: stable expression of the simian virus 40 large T-antigen in primary human bronchial epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 7: 2031-2034
- Brunner S., Fürtbauer E., Sauer T., Kurs M., Wagner E. (2002) Overcoming the nuclear barrier: Cell cycle independent nonviral gene transfer with linear polyethylenimine or electroporation. *Mol. Ther.* 5: 80-86

### C

- Campbell N.A. (1998) *Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg
- Chernomordik L.V., Sokolov A.V., Budker V.G. (1990) Electrostimulated uptake of DNA by liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1024: 179-183
- Chu G., Hayakawa H., Berg P. (1987) Electroporation for the efficient expression of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Res.* 15: 1311-1326
- Colosimo A., Goncz K.K., Holmes A.R., Kunzelmann K., Novelli G., Malone R.W., Bennett M.J., Gruenert D.C. (2000) Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *Biotechniques* 29: 314-331
- Cozens A.L., Yezzi M.J., Chin L., Finkbeiner W.E., Wagner J.A., Gruenert D.C. (1992) Characterization of immortal cystic fibrosis tracheobronchial gland epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89: 5171-5175
- Crowley, J.M. (1973) Electrical breakdown of bimolecular lipid membranes as an electromechanical instability. *Biophys. J.* 13: 711-724

## D

- Dean D.A. (1997) Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific. *Exp. Cell Res.* 230: 293-302
- Dean D.A., Dean, B.S., Muller S., Smith L.C. (1999) Sequence requirements for plasmid nuclear import. *Exp. Cell Res.* 253: 713-722
- De Pamphilis M. L., Hermann S. A., Martinez-Salas E., Chalifour L. E., Wirka D. O., Cupo D. Y., Miranda M. (1988) Microinjecting DNA into mouse ova to study DNA replication and gene expression and to produce transgenic animals. *Biotechniques* 6 : 662-680
- De Ros A.D.G., van Zoelen E.J.J., Theuvenet A.P.R. (1996) Determination of gap junctional intercellular communication by capacitance measurements. *Pflügers Arch.* 431: 556-563
- Dinchuk J.E., Kelley K.A., Callahan G.N. (1992) Flow cytometric analysis of transport activity in lymphocytes electroporated with a fluorescent organic anion dye. *J. Immunol. Meth.* 155: 257-265
- Dujardin N., Van Der S.P., Preat V. (2001) Topical gene transfer into rat skin using electroporation. *Pharm. Res.* 18: 61-66
- Dunlap D.D., Maggi A., Soria M.R., Monaco L. (1997) Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. *Nucleic Acids Res.* 25: 3095-3101

## E

- Engström P.E., Persson B.R.R., Salford L.G. (1999) Studies of in vivo electroporation by gamma camera measurements of <sup>99m</sup>Tc-DTPA. *Biochim. Biophys. Acta* 1473: 321-328

## F

- Faurie C., Golzio M., Moller P., Teissié J., Rols M.-P. (2003) Cell and animal imaging of electrically mediated gene transfer. *DNA Cell. Biol.* 22: 777-783
- Feldherr C.M., Akin D (1994) Role of nuclear trafficking in regulating cellular activity. *Int. Rev. Cytol.* 151: 183-228
- Friend D.S., Papahadjopoulos D., Debs R.J. (1996) Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1278: 41-50

## G

- Gabriel B., Teissié J. (1997) Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecular asymmetrical interaction with the electroporated membrane. *Biophys. J.* 73: 2630-2637
- Gehl J., Skovsgaard T., Mir L.M. (1998) Enhancement of cytotoxicity by electroporation: an improved method for screening drugs. *Anticancer Drugs* 9: 319-325
- Gehl J., Sorensen T.H., Nielsen K., Raskmark P., Nielsen S.L., Skovsgaard T, Mir L.M. (1999) In vivo electroporation of skeletal muscle: threshold, efficacy and relation to electric field distribution. *Biochim. Biophys. Acta* 1428: 233-240
- Gehl J., Geertsen P. (2000) Efficient palliation of hemorrhaging malignant melanoma skin metastases by electrochemotherapy. *Melanoma Res.* 10: 585-589
- Gehl J. (2003) Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol. Scand.* 177: 437-447
- Giaever I., Keese C.R. (1984) Monitoring fibroblasts behaviour in tissue culture with an applied electric field. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3761-3764
- Giaever I., Keese C.R. (1991) Micromotion of mammalian cells measured electrically. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7896-7900
- Giaever I. Keese C.R. (1993) A morphological biosensor for mammalian cells. *Nature* 366: 591-592
- Glaser R.W., Leikin S.L., Chernomordik L.V., Chizmadzhev Y.A., Pastushenko V.F., Sokirko A.I. (1988) Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores. *Biochim. Biophys. Acta* 940: 275-287
- Glass L.F., Jaroszeski M., Gilbert R., Reintgen D.S., Heller R. (1997) Intralesional bleomycin-mediated electrochemotherapy in 20 patients with basal cell carcinoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 37: 596-599
- Godbey W.T., Wu K.K., Mikos A.G. (1999) Size matters: Molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. *J. Biomed. Mater. Res.* 45: 268-275

- Godbey W.T., Wu K.K., Mikos A.G. (1999) Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5177-5181
- Golzio M., Mora M.-P., Raynaud C., Delteil C., Teissié J., Rols M.-P. (1998) Control by osmotic pressure of voltage-induced permeabilization and gene transfer in mammalian cells. *Biophys. J.* 74: 3015-3022
- Golzio M., Teissié J., Rols M.P. (2002) Direct visualization at single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 1292-1297
- Gosh P.M., Keese C.R., Giaever I. (1993) Monitoring electropermeabilization in the plasma membrane of adherent mammalian cells. *Biophys. J.* 64: 1602-1609
- Gosh P.M., Keese C.R., Giaever I. (1994) Morphological response of mammalian cells to pulsed AC fields. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 33: 121-133
- Graessmann M., Graessmann A. (1983) Microinjection of tissue culture cells. *Methods Enzymol.* 101: 482-492
- Gruenert D.C., Basbaum C.B., Welsh M.J., Li M., Finkbeiner W.E., Nadel J.A. (1988) Characterization of human tracheal epithelial cells transformed by an origin-defective simian virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5951-5955
- Günzburg W.H., Salmons B (1997) *Gentransfer in Säugetierzellen*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg

## H

- Hartmann, C. (2003) *Elektroporation von in-vitro-transkribierter RNA in adhärenzte Zellen*. Diplomarbeit, Fachbereich Chemie und Pharmazie, WWU Münster
- Heiser W.C. (1994) Gene transfer into mammalian cells by particle bombardment. *Anal. Biochem.* 217: 185-196
- Heller R., Jaroszeski M., Leo-Messina J. (1995) Treatment of B16 mouse melanoma with the combination of electropermeabilization and chemotherapy. *Bioelectrochem. Bioenerget.* 36: 83-87
- Heller R., Jaroszeski M., Atkin A., Moradpour D., Gilbert R., Wands J., Nicolau C. (1996) In vivo gene electroinjection and expression in rat liver. *FEBS Lett.* 389: 225-228
- Heller R., Jaroszeski M., Reintgen D.S. (1998) Treatment of cutaneous and subcutaneous tumors with electrochemotherapy using intralesional bleomycin. *Cancer* 83: 148-157
- Houseal T.W., Bustamante R.F., Stump R.F., Maestre M.F. (1989) Real-time imaging of single DNA molecules with fluorescence microscopy. *Biophys. J.* 56: 507-516

## J

- Jaroszeski M.J., Dang V., Pottinger C., Hickey J., Gilbert R., Heller R. (2000) Toxicity of anticancer agents mediated by electroporation in vitro. *Anticancer Drugs* 11: 201-208

## K

- Karin M., Hunter T. (1995) Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the cell nucleus. *Curr. Biol.* 5: 747-757
- Kinosita K., Tsong B. (1977) Voltage-induced pore formation and hemolysis of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 471: 227-242
- Klein T.M., Fitzpatrick-McElligott (1993) Particle bombardment: a universal approach for gene transfer to cells and tissues. *Curr. Opin. Biotechnol.* 4: 583-590
- Kotnik T., Miklavcic D., Slivnik T. (1998) Time course of transmembrane voltage induced by time-varying electric fields - a method for theoretical analysis and its application. *Bioelectrochem. Bioenerget.* 45: 3-16
- Krötz F., Sohn H.-Y., Gloe T., Plank C. (2003) Magnetofection potentiates gene delivery to cultured endothelial cells. *J. Vasc. Res.* 40: 425-434
- Kubota Y., Nakada T., Yanai H., Kakizaki H., Sagawa I., Watanabe M. (1996) Electropermeabilization in bladder cancer chemotherapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 39: 67-70
- Kukowska-Latallo J.F., Bielinska A.U., Johnson J., Spindler R., Tomalia D.A., Baker J.R. (1996) Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 4897-4902
- Kurata S.-I., Tsukahoshi M., Kasuya T., Ikawa Y. (1986) The laser method for efficient introduction of foreign DNA into cultured cells. *Exp. Cell Res.* 162: 372-378

## L

- Lee R.J., Huang L. (1997) Lipidic vector system for gene transfer. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 14: 173-206
- Lemons R., Forster S., Thoene J. (1988) Protein microinjection by protease permeabilization of fibroblasts. *Anal. Biochem.* 172: 219-227
- Liu G., Molas M., Grossmann G.A., Pasumarthy M., Perales J.C., Cooper M.J., Hanson R.H. (2001) Biological properties of Poly-L-lysine-DNA complexes generated by cooperative binding of the polycation. *J. Biol. Chem.* 276: 34379-34387
- Lo C-M., Keese C.R., Giaever I. (1993) Monitoring motion of confluent cells in tissue culture. *Exp. Cell Res.* 204: 102-109
- Lopata M.A., Cleveland D.W., Sollner-Web B. (1984) High level transient expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment. *Nucleic Acids Res.* 12: 5707-5017

## M

- Malone R.W., Felgner P.L., Verma I.M (1989) Lipofectin-mediated RNA transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6077-6081
- Matsui H., Johnson L.G., Randell S.H., Boucher R.C. (1997) Loss of binding and entry of liposome-DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 272: 1117-1126
- McLachlin J.R., Cornetta K., Eglitis M. A., Anderson W.F. (1990) Retroviral-mediated gene transfer. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 38 : 91-135
- Melvik J.E., Pettersen E.O., Gordon P.B., Seglen P.O. (1986) Increase in cis-dichlorodiammineplatinum (II) cytotoxicity upon reversible electropermeabilization of the plasma membrane in cultured human NHIK 3025 cells. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 22: 1532-1530
- Michael W.M., Choi M., Dreyfuss G. (1995) A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell* 83: 415-422
- Mir L.M., Banoun H., Paoletti C. (1988) Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electropermeabilization: Direct access to the cytosol. *Exp. Cell Res.* 175: 15-25
- Mir L.M., Orłowski S., Belehradek J.Jr., Paoletti C. (1991) Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses. *Eur. J. Cancer* 27: 68-72
- Mir L.M., Tounekti O., Orłowski S. (1996) Bleomycin : A revival of an old drug. *Gen. Pharmacol.* 27: 745-748
- Mir L.M., Glass L.F., Sersa G. (1998) Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumors by electrochemotherapy. *Br. J. Cancer* 77: 2336-2342
- Mir L.M., Bureau M.F., Gehl J., Rangara R., Rouy D., Caillaud J.-M., Delaere P., Branellec D., Schwartz B., Scherman D. (1999) High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4262-4267
- Moy A.B., van Engelhoven J., Bodmer J., Kamath J., Keese C.R., Giaever I., Shasby S., Shasby D.M. (1996) Histamine and thrombin modulate endothelial focal adhesion through centripetal and centrifugal forces. *J. Clin. Invest.* 97: 1020-1027
- Müller K.J., Horbaschek M., Lucas K., Zimmermann U., Sukhorukov V.L. (2003) Electrotransfection of anchorage-dependent mammalian cells. *Exp. Cell Res.* 288: 344-353

## N

- Nakielný S., Fischer U., Michael W.M., Dreyfuss G. (1997) RNA transport. *Annu. Rev. Neurosci.* 20: 269-298
- Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P. H. (1982) Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 7: 841-845
- Nigg E.A. (1990) Mechanisms of signal transduction to the cell nucleus. *Adv. Cancer Res.* 55: 271-310
- Nigg E.A. (1997) Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* 386: 779-787

Nishi T., Yoshizato K., Yamashiro S. et al. (1996) Fundamentals of electroporative in vivo gene transfer using intraarterial plasmid DNA injection following in vivo electroporation. *Cancer Res.* 56: 1050-1055

## O

Ogris M., Steinlein P., Kursa M., Mechtler K., Kircheis R., Wagner E. (1998) The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther.* 5: 1425-1433

Orlowski S., Belehradek J.Jr., Paoletti C., Mir L.M. (1988) Transient electroporabilization of cells in culture. Increase of cytotoxicity of anticancer drugs. *Biochem. Pharmacol.* 37: 4727-4733

Orlowski S., Mir L.M. (1993) Cell electroporabilization: A new tool for biochemical and pharmacological studies. *Biochim. Biophys. Acta* 1154: 51-63

## P

Parak W.J., Domke M.G., Kardinal A., Radmacher M., Gaub H.E., de Roos A.D.G., Theuvenet A.P.R., Wiegand G., Sackmann E., Behrends J.C. (1999) Electrically excitable normal rat kidney fibroblasts: A new model system for cell-semiconductor hybrids. *Biophys. J.* 76: 1659-1667

Plank C., Schillinger U., Scherer F., Bergemann C., Rémy J.-S., Krötz F., Anton M., Lausier J., Rosenacker J. (2003) The magnetofection method: Using magnetic force to enhance gene delivery. *Biol. Chem.* 384: 737-747

Pollard H., Remy J.-S., Loussouarn G., Demolombe S., Behr J.-P., Escande D. (1998) Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 273: 7507-7511

Ponsaerts P., Van den Bosch G., Cools N. et al. (2002) Messenger RNA electroporation of human monocytes followed by rapid in vitro differentiation, leads to highly stimulatory antigen-loaded mature dendritic cells. *J. Immunol.* 169: 1669-1675

Prausnitz M.R., Bose V.G., Langer R., Weaver J.C. (1993) Electroporation of mammalian skin: A mechanism to enhance transdermal drug delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90 : 10504-10508

Prausnitz M.R., Edelman E.R., Gimm J.A., Langer R., Weaver J.C. (1995) Transdermal delivery of heparin by skin electroporation. *Biotechnology (NY)* 13: 1205-1209

## R

Ramirez L.H., Orlowski S., An D. Bindoula G., Dzodic R., Ardouim P., Bognel C., Belehradek J.Jr., Munck J.N., Mir L.M. (1998) Electrochemotherapy on liver tumors in rabbits. *Br. J. Cancer* 77: 2104-2111

Raptis L.H., Firth K.L. (1990) Electroporation of adherent cells in situ. *DNA Cell. Biol.* 9: 615-621

Raptis L.H., Brownell H.L., Firth K.L., Mackenzie L.W. (1994) A novel technique for the study of intracellular, junctional communication: Electroporation of adherent cells on a partly conductive slide. *DNA Cell. Biol.* 13: 963-975

Raptis L.H., Liu S.K.-W., Firth K.L., Stiles C.D., Alberta J.A. (1995) Electroporation of peptides into adherent cells in situ. *Biotechniques* 18: 104-114

Reddy L., Wang H.S., Keese C.R., Giaever I., Smith T.J. (1998) Assessment of rapid morphological changes associated with elevated cAMP levels in human orbital fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 245: 360-367

Riemann E., Zimmermann U., Pilwat, G. (1975) Release and uptake of haemoglobin and ions in red blood cells induced by dielectric breakdown. *Biochim. Biophys. Acta* 394: 449-462

Rols, M.-P., Teissié J. (1989) Ionic-strength modulation of electrically induced permeabilization and associated fusion of mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* 179: 109-115

Rols M.-P., Teissié J. (1990) Electroporabilization of mammalian cells. Quantitative analysis of this phenomenon. *Biophys. J.* 58: 1089-1098

Rols M.-P., Dahijhou F., Mishra K.P., Teissié J. (1990) Control of electric field induced cell membrane permeabilization by membrane order. *Biochemistry* 29: 1260-1269

Rols M.-P., Teissié J. (1992) Experimental evidence for the involvement of the cytoskeleton in mammalian cell electroporabilization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1444: 45-50

## S

- Salford L.G., Persson B.R., Brun A., Ceberg C.P., Kongstad P.C., Mir L.M. (1993) A new brain tumour therapy combining bleomycin with in vivo electroporation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194: 938-943
- Saulis G., Venslauskas M.S., Naktinis J. (1991) Kinetics of pore resealing in cell membranes after electroporation. *Bioelectrochem. Bioenerget.* 26: 1-13
- Schoenbach K.H., Beebe S.J., Buescher E.S. (2001) Intracellular effect of ultrashort electrical pulses. *Bioelectromagnetics* 22: 440-448
- Sebestyén M.G., Ludtke J.J., Bassik M.C., Zhang G., Budker V., Lukhtanov E.A., Hagstrom J.E, Wolff J.A. (1998) DNA vector chemistry: The covalent attachment of signal peptides to plasmid DNA. *Nat. Biotechnol.* 16: 80-85
- Sersa G., Cemazar M., Miklavcic D. (1995) Antitumor effectiveness of electrochemotherapy with cis-diamminedichloroplatinum(II) in mice. *Cancer Res.* 55: 3450-3455
- Sersa G., Stabuc B., Cemazar M., Miklavcic D., Rudolf Z. (2000) Electrochemotherapy with cisplatin: clinical experience in malignant meloma patients. *Clin. Cancer Res.* 6: 863-867
- Sersa G., Cufer T., Cemazar M., Rebersek M., Zvonimir R. (2000) Electrochemotherapy with bleomycin in the treatment of hypernephroma metastasis: case report and literature review. *Tumori* 86: 163-165
- Soreq H., Seidman S. (1992) *Xenopus* oocyte microinjection: from gene to protein. *Methods Enzymol.* 207: 225-265
- Sowers A.E., Lieber M.R. (1986) Electropores in individual erythrocyte ghosts: diameters, lifetimes, numbers and locations. *FEBS Lett.* 205: 179-184
- Spiller D.G., Giles R.V., Grzybowski J., Tidd D.M., Clark R.E. (1998) Improving the intracellular delivery and molecular efficacy of antisense oligonucleotides in chronic myeloid leukemia cell: A comparison of Streptolysin-O-permeabilization, electroporation and lipophylic conjugation. *Blood* 91: 4738-4746
- Steinhardt R.A., Bi G.Q., Alderton J.M. (1994) Cell membrane resealing by vesicular mechanism similar to neurotransmitter release. *Science* 263 : 390-393
- Subramanian A., Ranganathan P., Diamond S.L. (1999) Nuclear targeting peptide scaffolds for lipofection of nondividing mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 17: 873-877
- Sukharev S.I., Klenchin V.A., Serov S.M., Chernomordik L.V., Chizmadzhev Y.A. (1992) Electroporation and electroporetic DNA transfer into cells. *Biophys. J.* 63: 1320-1327

## T

- Takagi S., Kimura M. (1997) Low-voltage electric discharge biolistic device. *Biotechniques* 23: 650-652
- Tang M.X., Redemann C.T., Szoka Jr. (1996) In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug. Chem.* 7: 703-714
- Tang M.X., Szoka F.C. (1997) The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complex. *Gene Ther.* 4: 823-832
- Teissié J., Eynard N., Gabriel B., Rols M.P. (1999) Electroporation of cell membranes. *Adv. Drug Del. Rev.* 35: 3-19
- Teissié J., Rols M.P. (1993) An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electroporation. *Biophys. J.* 65: 409-413
- Teissié J., Eynard N., Gabriel B., Rols M.-P. (1999) Electroporation of cell membranes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35: 3-19
- Tekle E., Astumian R.D., Chick P.B. (1990) Electroporation of cell membranes: effect of the resting membrane potential. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172: 282-287
- Thomas M., Klibanov A.M. (2003) Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62: 27-34
- Tirupathi C., Malik A.B., DelVecchio P.J., Keese C.R., Giaever I. (1992) Electrical method for detection of endothelial cell shape change in real time: Assessment of endothelial barrier functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7919-7923
- Tounekti O., Pron G., Belehradek J.Jr., Mir L.M. (1993) Bleomycin, an apoptosis-mimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized. *Cancer Res.* 53: 5462-5469
- Top F.H., Buescher E. L., Bancroft W.H., Russell P.K. (1971) Immunization with live types 7 and 4 adenovirus vaccines. II Antibody response and protective effect against acute respiratory disease due to adenovirus type 7. *J. Infect. Dis.* 124: 155-160

Tsong T.Y. (1990) On electroporation of cell membranes and some related phenomena. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 24: 271-295

## V

Vacik J., Dean B. S., Zimmer W. E., Dean D. A. (1999) Cell-specific nuclear import of plasmid DNA. *Gene Ther.* 6: 1006-1014

Van Driessche W., De Vos R., Jans D., Simaels J., De Smet P., Raskin G. (1999) Transepithelial capacitance decrease reveals closure of lateral interspace in A6 epithelia. *Pflügers Arch.* 437:680-690

Van Tendeloo V. F. I, Ponsaerts P., Lardon F., Nijs G., Lenjou M., Van Broeckhoven C. (2001) Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood* 98: 49-56

Vasiliev J.M. (1985) Spreading of non-transformed and transformed cells. *Biochim. Biophys. Acta* 780: 21-65

Verspohl E.J., Kaiserling-Buddemeier I., Wienecke A. (1997) Introducing specific antibodies into electroporated cells is a valuable tool for eliminating specific cell functions. *Cell. Biochem. Funct.* 15: 127-134

## W

Weaver C.W. (2000) Electroporation of cells and tissues. *IEEE Trans. Plasma Sci.* 28: 24-33

Wegener J. (1998) Impedanzspektroskopische und mikrogravimetrische Untersuchungen an barrierebildenden Zellen auf planaren Goldelektroden. Inaugural-Dissertation, WWU Münster

Wegener J., Hakvoort A., Galla H.-J. (2000) Barrier function of porcine choroid plexus epithelial cells is modulated by cAMP-dependent pathways in vitro. *Brain Res.* 853: 115-124

Wegener J., Keese C.R., Giaever I. (2002) Recovery of adherent cells after in situ electroporation monitored electrically. *Biotechniques* 33: 348-357

Wilson S.P., Smith A.L. (1997) Addition of glycerol during DNA exposure enhances calcium phosphate transfection. *Anal. Biochem.* 246: 148-150

## X

Xie T.-D., Sun L., Tsong T.Y. (1990) Study of mechanisms of electric field-induced DNA transfection. I. DNA entry by surface binding and diffusion through membrane pores. *Biophys. J.* 58: 13-19

## Y

Yang N.S., Burkholder J.K., Roberts B., Martinell B., McCabe D. (1990) In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9568-9572

Yang T.-A., Heiser W.C., Sedivy J.M. (1995) Efficient in situ electroporation of mammalian cells grown on microporous membranes. *Nuc. Acids Res.* 23: 2803-2810

Yokoe H., Meyer T. (1996) Spatial dynamics of GFP tagged proteins investigated by local fluorescence enhancement. *Nat. Biotechnol.* 14: 1252-1256

## Z

Zanta M.A., Belguise-Valladier P., Behr J.-P. (1999) Gene delivery: A single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 91-96

Zeng Q., Chang D.C. (1991) High-efficiency gene transfection by in situ electroporation of cultured cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1088: 104-110

## 8 Anhang

### 8.1 Akronyme

BES	<i>N,N</i> -bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
β-gal	β-Galaktosidase
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CLSM	<i>confocal laser scanning microscope</i>
CPE	<i>constant phase element</i>
DEAE-Dextran	<i>Diethylaminoethyl-Dextran</i>
DMPC	<i>Dimethylpyrocarbonat</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
ds DNA	<i>double strand DNA</i>
EBSS	<i>Earles balanced salt solution</i>
ECIS	<i>electric cell-substrate impedance sensing</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>
EP	<i>Elektroporation</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	<i>Fluoreszein Isothiocyanat</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HEPES	<i>2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure</i>
hnRNP	<i>heterogenous nuclear RNA-binding protein</i>
ITO	<i>Indium-Tin-Oxide</i>
kb	<i>Kilo Basen</i>
kDa	<i>Kilo Dalton</i>
MCS	<i>Multi-Cloning-Side</i>
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
MOPS	<i>3-[N-Morpholino]-propylsulfonsäure</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NCS	<i>normal calf serum</i>
NES	<i>nuclear export signals</i>
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
NPC	<i>nuclear pore complex</i>
NRK	<i>normal rat kidney</i>
nsPEF	<i>nanosecond pulsed electric field</i>
OD	<i>Optische Dichte</i>
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PBS <sup>++</sup>	<i>phosphat buffered saline mit Calcium und Magnesium</i>
PC	<i>Personal Computer</i>
pDNA	<i>Plasmid-DNA</i>
PEI	<i>Polyethylenimin</i>
PNA	<i>peptide nucleic acid</i>
RBL	<i>rat basophilic leukemia</i>
rRNA	<i>ribosomal RNA</i>
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SFM	<i>serumfreieies Medium</i>
SPIP	<i>Scanning probe image processor</i>
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
tRNA	<i>transfer RNA</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
ZO-1	<i>Zonula-Occcludens-1-Protein</i>

## 8.2 Materialien

### 8.2.1 Materialien für molekularbiologische Arbeiten

#### **Chemikalien**

Agarose NEEO	Roth GmbH, Karlsruhe
Bromphenolblau	ICN, Biomedicals, Eschwege
Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
Dimethylpyrocarbonat (DMPC)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Roth GmbH, Karlsruhe
Ficoll 400	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Formaldehyd (37%)	Merck, Darmstadt
Formamid	Janssen, Neuss
Glycerin	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
MOPS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
SYBR <sup>®</sup> -Gold	Molecular probes
Tris (Base)	ICN, Biomedicals, Eschwege
Titriplex III (EDTA)	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	ICN, Biomedicals, Eschwege

#### **Kits für Molekularbiologie**

QiagenMiniPrepKit	Qiagen, Hilden
QiagenMaxiPrepKit	Qiagen, Hilden
QiagenSpinKit	Qiagen, Hilden
T7-Cap-Scribe-Kit	Roche, Mannheim

#### **Enzyme/ Sonstiges**

1 kB DNA Leiter	Gibco BRL
Cap-Puffer	Roche, Mannheim
RNA Ladder	New England Biolabs (USA)
SAP	Roche, Mannheim
SAP-Puffer	Roche, Mannheim
SMART DNA-Leiter (100 bp und 1 kb)	Eurogentec, Seraing
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (USA)
T4-Ligase-Puffer	New England Biolabs (USA)
T7-RNA-Polymerase	Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (USA)
Restriktionsenzym-Puffer	New England Biolabs (USA)

#### **Geräte/ Verbrauchsmaterialien**

Electrophoresis Power Supply EPS 1000	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala (S)
Fotokamera für Ethidiumbromidgele	Inats, Göttingen
Gelkammer	Cosma Bio Co. Japan
Kühlzentrifuge: Mikro Rapid/K 1306	Hettich, Tuttlingen
Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (0.5, 1.5, 2 ml)	Fischer, Frankfurt
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
UV-Spektrometer UV-2100	Shimatsu, Düsseldorf
Vortexer	IKA Labortechnik, Staufen

#### **Vektoren**

pcDNA3	Invitrogen, Karlsruhe
pCMVB	Clontech (USA)
pEGFP-N1	Clontech (USA)
pEYFP-Actin	Clontech (USA)
pSVβ-Galactosidase	Promega, Heidelberg

## 8.2.2 Materialien für Mikrobiologische Arbeiten

### **Chemikalien und Zusätze**

Agar	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Ampicilin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Glycerin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Peptone	Life Technologies, Paisley (GB)
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Hefe Extrakt	Life Technologies, Paisley (GB)

### **Geräte und Verbrauchsmaterialien**

MicroPulser™	BioRad, München
Zentrifugen 5415 C und 5804 R	Eppendorf, Hamburg
Inkubator Innova™ 4230	New Brunswick Scientific (USA)

## 8.2.3 Materialien für zellbiologische und biophysikalische Arbeiten

### **Chemikalien**

Basal Isocove Medium	Biochrom KG, Berlin
BSA	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Blutlaugensalz, gelb	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Blutlaugensalz, rot	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Calciumchloridhexahydrat	Merck, Darmstadt
Calciumsulfat	Merck, Darmstadt
CO <sub>2</sub>	Westfalen-AG, Münster
DMRIE-C®	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbeccos MEM Earle (1X)	Biochrom KG, Berlin
EBSS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
EDTA	Fluka, Neu-Ulm
Ethanol (techn. und abs.)	Merck, Darmstadt
FITC-BSA	Sigma Aldrich, Deisenhofen
FITC-Dextran (4 - 2000 kDa)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Fötale Kälberserum	PAA Lab GmbH, Linz (AUT)
Glucose	Sigma Aldrich Deisenhofen
Natriumgluconat	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Biochrom KG, Berlin
HEPES	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Hühnerserum	PAA Lab GmbH, Linz (AUT)
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumgluconat	Merck, Darmstadt
Lucifer Yellow	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Magnesiumacetat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchloridhexahydrat	Merck, Darmstadt
MEM Earle (1X)	Biochrom KG, Berlin
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Sigma Aldrich, Deisenhofen
(Di-)Natriumhydrogenphosphatdihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumgluconat	Merck, Darmstadt
NCS (Kälberserum)	Seromed, Berlin
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, Deisenhofen
PEI	Polysciences, Eppelheim
Penicillin	Seromed, Berlin
Reinstwasser	Millipore, Eschborn
Streptomycin	Seromed, Berlin
TRITC-Phalloidin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Trypsin	Biochrom KG, Berlin
X-Gal	Roth GmbH, Karlsruhe

### **Kits**

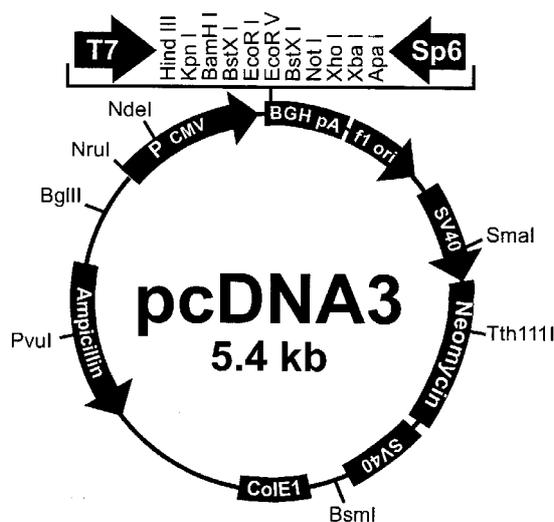
Life/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit	MoBiTec
Superfect®	Qiagen, Hilden
DMRIE®	Invitrogen, Karlsruhe

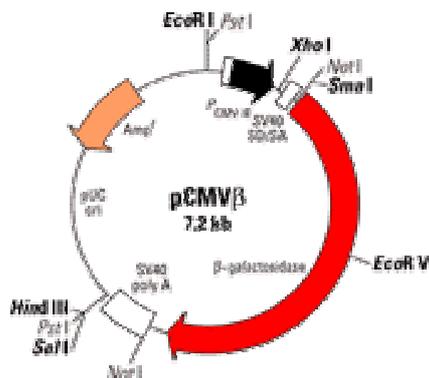
**Geräte/ Verbrauchsmaterialien**

12-well-Gewebekulturplatten	Costar, Bodenheim
24-well-Gewebekulturplatten	Costar, Bodenheim
48-well Gewebekulturplatten	Costar, Bodenheim
8-well Arrays	Applied Biophys. Inc. (USA)
Aluminiumfolie Qualität S	Roth GmbH, Karlsruhe
Auflicht-Fluoreszenzmikroskop	Olympus Optical, Japan
Autoklav 3870EL	Jürgens, Münster
Brutschränke:	
BB 6220 CU	Heraeus, Hanau
IG 150	Jouan, Unterhaching
IR1500	Flow, Meckenheim
Bunsenbrenner:	
Fireboy	Tecnomare, Fernwald
Fireboy plus	Integra Biosciences, Fernwald
Digitalkamera Nikon F-301	Nikon, Düsseldorf
Einmalpipetten	Brand, Wertheim
Einwegspritzen (5 und 20 ml)	Henke-Sass, Tuttlingen
Frequenzgenerator 33120 A	Hewlett Packard (USA)
Greiner Röhrchen (10 ml und 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Impedanzanalysator SI-1260	Solartron Instruments, Farnborough (GB)
Kanülen	Henke-Sass Wolf, Tuttlingen
Kryoröhrchen (1.8 ml)	Nunc GmbH, Wiesbaden-Bieberach
Kühlzentrifuge (J2-21/Rotor JA-14)	Beckmann, München
Kulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> )	Nunc GmbH, Wiesbaden-Bieberach
Laminar Flow BSB 6A und BSB 4A	Gelaire, Meckenheim
Latexhandschuhe (puderfrei)	Roth GmbH, Karlsruhe
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Phasenkontrastmikroskop Diaphot TMD	Nikon, Düsseldorf
Pipettenspitzen	Ratiolab GmbH, Dreieich
Sterilbank: Flow BSB 6A und BSB 4A	Gelaire, Meckenheim
Sterilfilter (12 mm, Porengröße 0.2 µm)	Satorius, Göttingen
Sterilisator: UT 6120	Heraeus, Meckenheim
Tischzentrifuge	Poly Labo (USA)
Wasserbad GFL 1004	GFL, Burgwedel

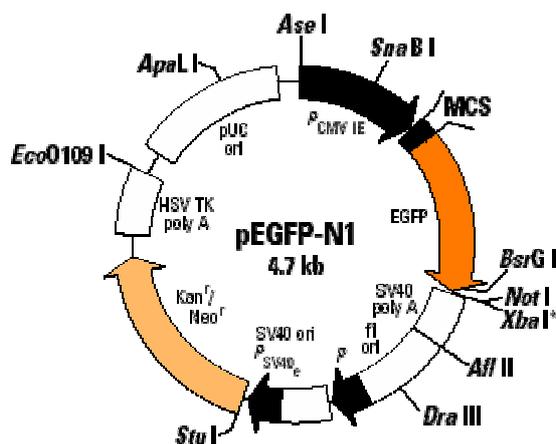
## 8.3 Vektorkarten

### 8.3.1 pcDNA3

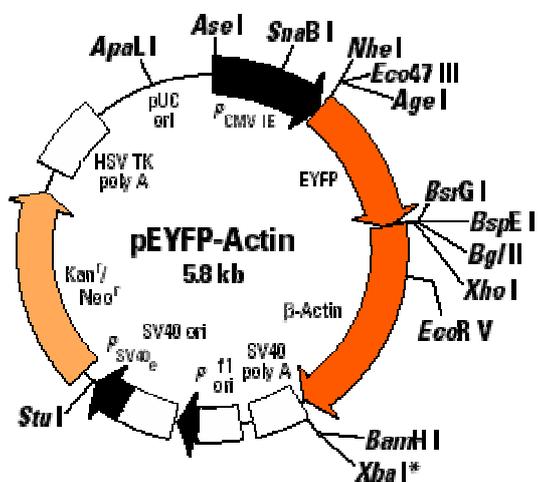


8.3.2 pCMV $\beta$ 

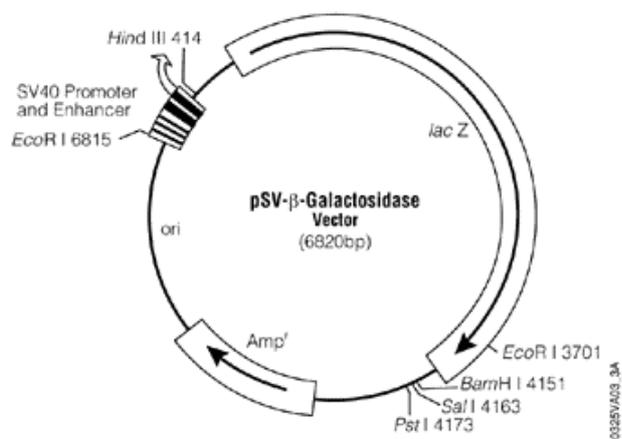
## 8.3.3 pEGFP-N1



## 8.3.4 pEYFP-Actin



### 8.3.5 pSV $\beta$ -Galactosidase



## Danksagung

Ich möchte mich bedanken bei...

Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Galla und Herrn Dr. Joachim Wegener für die interessante Themenstellung, für die Möglichkeit zur Entfaltung eigener Ideen und für das Interesse, dass sie dieser Arbeit entgegengebracht haben.

Herrn Prof. Dr. Hans Oberleithner für die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens.

allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und des gesamten Instituts für Biochemie für die angenehme Arbeitsatmosphäre, für die vielen (nicht immer nur) wissenschaftlichen Diskussionen und für die breite Akzeptanz meiner Paprika-Plantage.

Frau Dipl.-Chem. Karin Görner und Herrn Dipl.-Chem. Christoph Hartmann für die Unterstützung im Rahmen ihrer Diplomarbeiten und für die amüsanten Stunden bei der *Locomotion* oder der Einweisung in die Geheimnisse von Kniffel.

Herrn Dipl.-Biol. Lars Albermann, Herrn PD Dr. Thomas Rauen, Herrn Dipl.-Chem. Björn Reiß, Herrn Dr. Jochen Seebach und Herrn Dr. Joachim Wegener für das eifrige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Frau Lindsay Hübers für ihre Hilfsbereitschaft und die sehr selbstständige Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente.

Herrn Dr. Walter Storkebaum für die gesamte Organisation des Instituts für Biochemie, sowie dafür, dass ich durch die Organisation des OC-Praktikums für Biologen gemerkt habe, dass es neben der Forschung durchaus andere interessante Jobs gibt.

Frau Sabine Hüwel und Frau Steffi Wulff für die Organisation der gesamten Arbeitsgruppe und die vielen netten Gespräche abseits der Wissenschaft.

Herrn Dr. Fredrick Höhn und Herrn Dipl.-Ing. Wolfgang Willenbrink für das Bereitstellen der hervorragenden PC-Infrastruktur im Hause und für die Beseitigung der vielen kleinen Probleme, die jeder Doktorand während seiner Promotion „nebenbei“ hat.

Frau Hedda Elverich, Frau Lydia Klapper und Frau Antje Wiese für ihre stete Hilfsbereitschaft und das unermüdliche Gießen meiner Pflänzchen.

Herrn Dr. Jürgen Reinhardt und Herrn Dipl.-Biol. Lars Albermann für die vielen hilfreichen Diskussionen bezüglich der Molekularbiologie.

Herrn Dr. Hermann Schillers für die rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen.

der gesamten Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Hans Oberleithner im Institut für Physiologie II für die vielen unterhaltsamen Mittagspausen und die „zwischenzeitliche“ Belustigung während des Zusammenschreibens.

Christoph, Jan, Karin, Katta, Lertyot, Lindsay, Miriam, Sabine, Tina und Thorsten für die tolle Zusammenarbeit und die vielen lustigen Stunden nach 16 Uhr, in denen das Sprüche-Buch gefüllt werden konnte.

Björn ebenfalls für die tolle Zusammenarbeit und die spaßigen Stunden, aber auch für die unermüdliche Geduld und Hilfe, wenn mal wieder ein Computerprogramm nicht so wollte wie es sollte und für die vielen Diskussionen über Gott-und-die-Welt, auch wenn ich dabei so manches Mal einen „verbalen Overkill“ ertragen durfte. ☺

meiner mittlerweile vergrößerten Familie für die Unterstützung jedweder Art, ohne die diese Arbeit sicherlich nicht entstanden wäre.

Lars in ganz besonderen Maße, für die vielen hilfreichen Diskussionen, die Ermutigungen zum Durchhalten während der zahlreichen problematischen Phasen in der Zeit der Dissertation, für seine unbegrenzte Geduld und für vieles andere mehr.

## Lebenslauf

Name: Albermann  
Vorname: Silke  
Geburtsname: Arndt  
Geburtsdatum: 24. Februar 1977  
Geburtsort: Wuppertal-Elberfeld  
Familienstand: verheiratet  
Eltern: Ursula Arndt, geb. Schulze und Gerhard Wilgard

### Schulbildung

---

Grundschule Wilkhausstrasse, Wuppertal 1983-1984  
Grundschule Einern, Wuppertal 1984-1987  
Städt. Gymnasium Am Kothen, Wuppertal 1987-1996  
Allg. Hochschulreife: Gymnasium am Kothen am 17. Juni 1996

### Studium

---

Studium der Chemie (Diplom) an der WWU Münster 1996-2000  
Studium der Biologie (Diplom) and der WWU Münster 1998-2003  
Promotionsstudium im Fachbereich Chemie und Pharmazie an der WWU Münster 2000-2004

### Prüfungen

---

Diplom-Vorprüfung im Fach Chemie an der WWU Münster 22. Oktober 1998  
Diplom-Prüfung im Fach Chemie an der WWU Münster 27. September 2000

### Tätigkeiten

---

Studentische Hilfskraft am Institut für Biochemie der WWU Münster 05/2000-09/2000  
Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie der WWU Münster 11/2000-12/2003

### Dissertation

---

Beginn der Dissertation am Institut für Biochemie der WWU Münster unter der Betreuung von Prof. Dr. H.-J. Galla 11/2000