

Centrum Somatische Gentherapie in der Abteilung Molekularbiologie und  
BioInformatik

Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin

Abteilungsleiter: Professor Dr. Burghardt Wittig

Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. Werner Reutter

**Entwicklung und Charakterisierung einer Methode zum direkten ballistischen  
Transfer von Genen in Tumorzellen zur Herstellung von autologen  
Anti-Tumorstoffen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von Andreas Albers  
aus Bremen

Referent: Professor Dr. Burghardt Wittig

Koreferent: Professor Dr. Werner Rosenthal

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der Freien Universität  
Berlin

Promoviert am: 13.09.2002

## DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Burghardt Wittig, für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Abteilung anfertigen zu dürfen und für die über den Themenbereich der Arbeit hinausreichende Motivation wissenschaftlich zu arbeiten.

Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern und Sponsoren des Centrum Somatische Gentherapie e.V. für die Gewährung eines großzügigen Stipendiums.

Für die Einarbeitung in den Themenbereich, die tolle Zusammenarbeit und die unzähligen hilfreichen Diskussionen bedanke ich mich bei Herrn Tomislav Dorbic, dem Leiter des Centrum Somatische Gentherapie e.V.

Herrn Priv. Doz. Dr. Reinhardt Wanner danke ich für die Durchsicht des Manuskriptes und all die hilfreichen Fragezeichen am Rande des Textes.

Dr. Matthias Schroff sei herzlich für die Überlassung der verwendeten Plasmide gedankt. Der gesamten Arbeitsgruppe Wittig und den Mitarbeitern des Centrum Somatische Gentherapie sei für die freundliche Unterstützung bei der Arbeit und das gute Arbeitsklima gedankt.

Meinem Freund Dr. Ilan Schnell sei für die Unterstützung bei allen Berechnungen und die Hilfe bei der Realisierung der Computersimulation gedankt.

Meiner Mutter danke ich für die liebevolle Motivation und konstante Unterstützung während des gesamten Studiums, ohne die nichts möglich gewesen wäre. Meinem Vater danke ich für das Interesse und die Neugier, die er mir an der Wissenschaft vermittelt hat.

Die selbständige Anfertigung versichere ich an Eides statt

Berlin, den \_\_\_\_\_  
(Datum)

\_\_\_\_\_  
(Andreas Albers)

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>10</b>
2.1	Hintergrund: Karzinogenese	10
2.2	Einführung zum Thema Gentherapie	13
2.2.1	Definition der Gentherapie	13
2.3	Übersicht über Gentherapiestrategien und Beispiele für Kandidatengene	14
2.3.1	Substitutionstherapie	14
2.3.2	Vermittlung einer zusätzlichen Funktion	15
2.4	Suizidgentherapie	15
2.5	Tumorsuppressor- und Anti-Onkogentherapie	16
2.6	Supportive Gentherapiemaßnahmen	16
2.7	Aktive Krebs-Immungentherapie	17
2.7.1	Tumorzellvakzine	17
2.7.1.1	Immunologische Grundlagen und Hintergründe	17
2.7.1.2	Tumor Antigene	18
2.7.2	Zytokin-Gentherapie von Krebs	19
2.7.2.1	Prinzipien zytokininduzierter Tumorummunität	20
2.7.2.2	Schlußfolgerungen	21
2.7.2.3	Klinische Studien mit IL-7 und GM-CSF exprimierenden autologen Tumorzellen zur Gentherapie metastasierender Karzinome	21
2.7.2.4	GM-CSF	25
2.7.2.5	Interleukin-7 (IL-7)	27
2.8	Gentransfer in der Gentherapie	32
2.8.1	Sicherheitsaspekte beim Gentransfer	33
2.8.2	Chemische Gentransfersysteme	34
2.8.2.1	Liposomaler Gentransfer	34
2.8.2.2	Calcium-Phosphat Transfektion	36
2.8.2.3	DEAE-Dextran Technik	36
2.8.3	Biologische Gentransfersysteme	37
2.8.3.1	Rezeptorvermittelter Gentransfer	37
2.8.3.2	Viraler Gentransfer	37
2.8.4	Physikalische Gentransfersysteme	39
2.8.4.1	Elektroporation	39
2.8.4.2	Mikroinjektion	40
2.8.4.3	Ballistischer Gentransfer	40
2.8.4.4	Ballistomagnetischer Gentransfer	42
2.9	Zielsetzung der Arbeit	43
<b>3</b>	<b>MATERIALIEN</b>	<b>44</b>
3.1	Verwendete Geräte	44
3.2	Verwendete Materialien und Chemikalien	45
3.3	Bakterienstämme und Zelllinien	46
3.4	Zellkulturmedien	46
3.5	Plasmidkonstrukte und Oligodesoxyribonukleotide	47
3.6	Puffer, Lösungen und Medien	47
<b>4</b>	<b>METHODEN</b>	<b>49</b>
4.1	DNA-Präparation und Aufreinigung	49
4.1.1	Herstellung elektrokompeter Bakterien	49

4.1.2 Elektroporation von Bakterien.....	49
4.1.3 Großpräparation von Plasmiden.....	50
4.1.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	51
4.1.5 Restriktionsverdau.....	51
4.1.6 Auftrennung von DNA in Agarosegelen.....	52
4.1.7 Photographie von Agarosegelen.....	52
4.2 Zellkulturarbeiten.....	53
4.2.1 Anzucht der Zellen.....	53
4.2.1.1 Adhärente Monolayerkulturen.....	54
4.2.1.2 Suspensionskulturen.....	55
4.2.1.3 Etablierung von Primärkulturen aus Nierenzellkarzinomen und malignen Melanomen.....	55
4.2.1.4 Kultivierung der einzelnen Zelllinien.....	55
4.2.1.5 Einfrieren von Zellen.....	56
4.2.1.6 Auftauen von eingefrorenen Zellen.....	56
4.2.1.7 Bestimmung von Zellzahl und Zellgröße nach der Coulter-Methode....	57
4.2.2 Beschichtung von Petrischalen mit Zellen nach „Burkholder et al.“.....	59
4.3 Ballistomagnetischer Gentransfer.....	59
4.3.1 Vorbereitungen zum ballistomagnetischen Gentransfer.....	59
4.3.1.1 Herstellung der Plasmid- oder Oligonukleotidsuspension zum Beschichten der Microcarrier.....	59
4.3.1.2 Beschichten der Micro- und der Macrocarrier.....	60
4.3.2 Durchführung des ballistomagnetischen Gentransfers.....	61
4.3.3 Isolieren der magnetisch markierten Zellen nach dem ballistomagnetischen Gentransfer.....	65
4.3.3.1 Vorbereitung der Trennsäule zur Selektion der magnetisch markierten Zellen.....	65
4.3.3.2 Isolieren der magnetisch markierten Zellen.....	66
4.4 Antikörperfärbung zum Nachweis der CD40L-Expression im Durchflußzytometer.....	67
4.5 Messungen mit dem Durchflußzytometer.....	68
4.5.1 Aufbau und Prinzip des Durchflußzytometers.....	68
4.5.2 Vorbereitung und Messung der Proben.....	69
4.5.3 Auswertung der Messungen.....	70
4.6 ELISA zur in vitro Quantifizierung der Zytokin-Expression.....	74
4.6.1 Sammeln und Lagern der Proben.....	74
4.6.2 Prinzip des hGM-CSF und hIL-7 ELISA von BioSource.....	74
4.6.2.1 Grenzen der Methode bei hohen Zytokinkonzentrationen.....	75
4.6.2.2 Sensitivität/ Spezifität.....	75
4.7 Näherungsformel zur Bestimmung der bei der MIP-Methode maximal einsetzbaren Zellzahl.....	76
4.7.1 Herleitung der Formel.....	76
4.8 Computerprogramm zur Simulation des Beschießens von Zellen.....	80
4.8.1 Ziel des Experiments.....	80
4.8.2 Beschreibung des Programms.....	80
4.8.3 Programm:.....	80
4.9 Fehlerbetrachtung der Versuchsergebnisse.....	83
<b>5 ERGEBNISSE.....</b>	<b>84</b>
5.1 Begriffsdefinitionen.....	84

5.2 Die MIP-Methode ermöglicht ballistischen Gentransfer in Zellen unabhängig von ihrer Fähigkeit zu adhären	84
5.2.1 Die MIP-Methode	86
5.2.1.1 Vorbereitung der Zellen	86
5.2.1.2 Equilibrieren der Polycarbonat-Membraneinsätze:	86
5.2.1.3 Berechnung der auszusäenden Zellzahl	87
5.2.1.4 Aussäen der Zellen	88
5.2.1.5 Ablösen der Zellen von der Polycarbonatmembran	89
5.2.2 Vergleich der MIP-Methode mit der Burkholder-Methode	90
5.2.3 Vergleich der Zellausbeute nach ballistischem Gentransfer mit der MIP-Methode oder der Burkholder-Methode nach magnetischer Anreicherung der Zellen	92
5.2.4 Vergleich der Transfektionsraten mit Reporter genen	94
5.2.4.1 Vergleich der Kotransfektion von CD40L und eGFP	95
5.3 Kotransfektion von Primärkulturen mit GM-CSF und IL-7	98
5.4 Computersimulation des ballistischen Gentransfers	100
5.4.1 Darstellung der Treffer pro Zelle bei unterschiedlichen Trefferraten	101
5.4.2 Trefferverteilung bei unterschiedlichen Gesamtrefferraten	102
5.4.3 Zusammenhang zwischen Zellgröße, Zellzahl und Partikelzahl	104
5.4.4 Zusammenhang zwischen Goldmenge und Partikelzahl- und -größe	105
<b>6 DISKUSSION</b>	<b>106</b>
6.1 Statistische Auswertung der Ergebnisse	106
6.2 Auswertung der durchflußzytometrischen Messungen	106
6.3 MIP-Methode	108
6.4 Berechnung der auszusäenden Zellzahl	109
6.5 Vergleich der MIP-Methode mit der Burkholder-Methode	109
6.5.1 Aussäen der Zellen	109
6.5.2 Effizienz der magnetischen Separation	111
6.6 Ballistischer Gentransfer	111
6.6.1 Transfektionsrate mit einem Reporter gen	112
6.6.2 Kotransfektion von CD40L und eGFP	112
6.6.3 Kotransfektion von Primärkulturen mit GM-CSF und IL-7	113
6.7 Computersimulation des ballistischen Gentransfers	114
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>116</b>
<b>8 ANHANG</b>	<b>128</b>
8.1 Abkürzungsverzeichnis	128
8.2 Protokoll: Ballistomagnetischer Gentransfer mit der MIP-Methode	129
<b>9 CURRICULUM VITAE</b>	<b>132</b>
<b>10 PUBLIKATIONSListe</b>	<b>135</b>