

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Lokaler Gentransfer mit implantierbaren Arzneistoffträgern.
Neue Wege zur Rekonstruktion von Haut- und Knochengewebe**

vorgelegt von
Martin Kullmer
aus Freiburg im Breisgau

2006

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn PD Dr. Christian Plank (TU München) betreut und von Herrn Professor Dr. Ernst Wagner vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 27.10.2006



(Martin Kullmer)

Dissertation eingereicht am 27.10.2006

1. Gutachter: Professor Dr. Ernst Wagner

2. Gutachter: PD Dr. Christian Plank (TU München)

Mündliche Prüfung am 18.01.2007

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Genterapie	6
1.2. Virale und nicht-virale Genvektoren.....	7
1.2.1. Virale Genvektoren	7
1.2.2. Nicht-virale Genvektoren.....	8
1.2.3. Nicht-virale Genvektoren mit PEI.....	10
1.2.4. Modifikationen nicht-viraler Genvektoren mit PEI	11
1.3. Lokale Genterapie mit nicht-viralen Genvektoren.....	13
1.3.1. Genaktivierte Biomaterialien	14
1.4. Tissue Engineering.....	15
1.4.1. Biomaterialien in der regenerativen Medizin.....	16
1.4.2. Genaktivierte Biomaterialien in der regenerativen Medizin.....	18
1.5. Untersuchungsziele	19
2. Material und Methoden	21
2.1. Chemikalien und Reagenzien.....	21
2.2. Genvektoren	23
2.2.1. Formulierung ungeschützter Genvektoren	23
2.2.2. Formulierung geschützter Genvektoren	23
2.2.3. Radioaktivmarkierung von Plasmid-DNA	24
2.2.4. Radioaktivmarkierung von PEI 25	25
2.3. Zellkultur.....	26
2.3.1. Humane Keratinozyten.....	26
2.3.2. Zelllinien	27
2.4. <i>In vitro</i> Transfektion.....	27
2.5. <i>In vitro</i> Transfektion nach Vorinkubation.....	28
2.6. Genaktivierte Fibrin(ogen) Matrix	28
2.6.1. Genvektoren in Fibrinogen-Lösung	29
2.6.2. Genvektoren in Fibrinogen-Lyophilisat	30

2.7.	Laser Scanning Mikroskopie.....	31
2.8.	Genaktivierte Oberflächen aus PDLLA und PLGA.....	32
2.8.1.	Beschichtungen in 96-Loch-Zellkulturplatten	32
2.8.2.	Beschichtungen von Folien aus Aluminiumlegierung	33
2.9.	Genaktivierte Oberflächen aus DTE05DT und DTE30DT	33
2.10.	Durchflusszytometrie (FACS).....	34
2.11.	Integrität Plasmid-DNA	35
2.12.	Freisetzung von Plasmid-DNA und PEI 25	35
2.13.	Bruchdehnung PLGA.....	36
2.14.	Zellproliferation	37
2.15.	Proteinkonzentration	37
2.16.	Luciferase-Expression.....	38
2.17.	EGF Expression.....	38
2.18.	BMP-2 Expression	39
3.	Ergebnisse.....	40
3.1.	Charakterisierung Genvektoren.....	40
3.1.1.	Ungeschützte und geschützte Genvektoren mit PEI 25	40
3.1.2.	Ungeschützte und geschützte Genvektoren mit PEI 22	42
3.2.	Transfektion in genaktivierter Fibrin(ogen) Matrix	45
3.2.1.	Einsatz ungeschützter Genvektoren mit PEI 22.....	45
3.2.2.	Optische Darstellung Transfektionsverlauf.....	48
3.2.3.	Vergleich ungeschützter und geschützter Genvektoren	51
3.2.4.	Einfluss von Fibrinogen auf Genvektoren	53
3.2.5.	Einsatz genaktivierter Fibrinogen-Lyophilisate	57
3.3.	Transfektion über genaktivierte Oberflächen aus PDLLA und PLGA.....	60
3.3.1.	Optimierung Versuchsbedingungen.....	60
3.3.2.	Bestimmung der Transfektionseffizienz	64
3.3.3.	Freisetzungsverhalten von Plasmid-DNA und PEI 25	68
3.3.4.	Alternative Filmbildner	78
3.3.5.	Genaktivierte Oberflächen auf Aluminium – Luciferase-Expression.....	82
3.3.6.	Genaktivierte Oberflächen auf Aluminium – BMP-2-Expression.....	83

4. Diskussion	85
4.1. Genaktivierter Biomaterialien in der regenerativen Medizin.....	85
4.1.1. Tissue Engineering.....	85
4.1.2. Genaktivierte Biomaterialien	86
4.2. Genaktivierte Fibrinmatrix.....	87
4.2.1. Auswahl Genvektoren.....	88
4.2.2. Formulierung und Charakterisierung	90
4.2.3. Fibrin als aktive Trägermatrix.....	91
4.2.4. Formulierungsstrategie.....	92
4.2.5. Praxisrelevanz	93
4.3. Genaktivierte Polymeroberflächen.....	94
4.3.1. Formulierung.....	95
4.3.2. Freisetzung Genvektoren.....	96
4.3.3. Effektivität und Toxizität	97
4.3.4. Alternative Filmbildner	99
4.3.5. Praxisrelevanz	99
4.4. Individuelles Matrixdesign genaktivierter Biomaterialien.....	100
5. Zusammenfassung	102
6. Anhang.....	104
6.1. Abkürzungen	104
6.2. Publikationen.....	107
6.2.1. Vorträge.....	107
6.2.2. Poster-Präsentationen	108
7. Literatur	109
8. Danksagung	119
9. Lebenslauf	121

1. Einleitung

1.1. Gentherapie

Im Mai 1966 legten Joshua Lederberg und Edward Tatum im Rahmen der Fachtagung „Reflections on Research and the Future of Medicine“ an der Columbia-Universität in New York den Grundstein der Gentherapie [1]. Friedmann und Roblin diskutierten 1972 erstmals die Möglichkeiten und ethische Grundlagen der Gentherapie [2]. Therapeutisches Grundelement ist das Einbringen von Nukleinsäuren (DNA bzw. RNA) in Zellen, Gewebe und Organe eines Empfängerorganismus, mit dem Zweck, einen therapeutischen oder prophylaktischen Nutzen für das Individuum zu erzielen [3]. Dabei erfüllt das fremde genetische Material ähnliche Funktionen wie ein klassisches Medikament. Die eingesetzten Nukleinsäuren können in Zielzellen zur Produktion von therapeutischen Proteinen verwendet werden, die letztlich zu einer gewünschten Wirkung führen [4]. Andererseits können übertragene Nukleinsäuren selbst als Inhibitoren definierter Gene zur Korrektur biochemischer Fehlaktivitäten fungieren (z. B. „*Antisense*“-Oligonukleotide bzw. siRNA) [5, 6].

Das Behandlungskonzept der Gentherapie wird derzeit in mehreren klinischen Studien mit unterschiedlichen Indikationen eingesetzt. Die Therapie von Krebs-Erkrankungen steht dabei im Vordergrund. Ebenso stellen die Behandlungen von Erbkrankheiten (z. B. „*severe combined immune deficiency*“ SCID, Hämophilie A, Zystische Fibrose, Sichel-Zell-Anämie), Gefäßerkrankungen oder Infektionskrankheiten wichtige Indikationen der Gentherapie dar [7].

Die Behandlung von Krankheiten durch das Einbringen von Nukleinsäuren birgt enormes medizinisches Potential. Für eine erfolgreiche Behandlung ist die Effektivität des Nukleinsäuretransfers in Zielzellen von entscheidender Bedeutung. Die Entwicklung von geeigneten Transfer-Systemen für Nukleinsäuren, die als Genfähren oder Genvektoren bezeichnet werden, steht dabei im Vordergrund.

1.2. Virale und nicht-virale Genvektoren

Viren sind natürlich vorkommende Transfer-Systeme für Nukleinsäuren. Das virale Genom wird in die Wirtszellen eingeschleust und unter Verwendung zellulärer Mechanismen vervielfacht. Neue infektiöse Viruspartikel entstehen und werden meist unter Zerstörung der Wirtszelle freigesetzt. Im Laufe der Evolution wurde dieser Ablauf optimiert und dient heute als Vorlage für die Konstruktion von Genfähren. Dabei wird zwischen viralen und nicht-viralen Genvektoren unterschieden. Während virale Genvektoren von natürlichen Viren abgeleitet sind, stellen nicht-virale Genvektoren eine Klasse synthetisch konstruierter Genfähren dar.

1.2.1. Virale Genvektoren

Als erste Generation viraler Genvektoren wurden Viren eingesetzt, deren Gene zur Replikation gegen therapeutische Gene ausgetauscht wurden. Das veränderte Genom wurde durch natürliche virale Mechanismen in Zielzellen eingeschleust und führte zur Expression von therapeutischen Proteinen, ohne sich selbst dabei vermehren zu können. Modifizierte Retroviren, Lentiviren, Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren (AAV), Pockenviren, Vakziniaviren, Herpesviren und Hepatitisviren werden derzeit als virale Genvektoren eingesetzt. Unterschiedliche Therapiekonzepte erfordern eine individuelle Anpassung der eingesetzten Genvektoren. Derzeit werden in klinischen Studien überwiegend retrovirale und adenovirale Genvektoren verwendet [7].

Retrovirale Genvektoren werden vor allem für den *ex vivo* Gentransfer eingesetzt. Der effiziente Nukleinsäuretransfer erfolgt unter stabiler Integration der genetischen Information in das Genom der Wirtszelle. Während retrovirale Genvektoren, abgeleitet vom „*murine leukemia virus*“ (MLV), den Moment der Zellteilung für eine erfolgreiche Infektion von Wirtszellen benötigen [8, 9], werden ruhende Zellen durch lentivirale Genvektoren direkt transduziert [10, 11].

Die ersten vielversprechenden klinischen Erfolge unter Verwendung retroviraler Genvektoren wurden in der Behandlung der „*severe combined immunodeficiency-X1*“ (SCID-X1) [12] erzielt. Alle teilnehmenden Patienten konnten erfolgreich mit autologen hämatopoietischen Stammzellen behandelt werden, die durch MLV-abgeleitete Retroviren *ex vivo* transduziert wurden. Drei Jahre nach der gentherapeutischen Behandlung wurden jedoch bei 2 Patienten Leukämien diagnostiziert [13]. In beiden Fällen wurden die Patienten mittels Chemotherapie weiter behandelt. Als Ursache dieser schwerwiegenden Folgeerscheinung wurde die

mutagene Insertion des Retrovirus in das menschliche Genom identifiziert. Neuere Untersuchungen zeigen vor allem für den Einsatz MLV-abgeleiteter Retroviren eine Einbau-Präferenz in Startregionen für die Transkription des Wirtszellengenoms [14]. Der stabile Einbau essentieller Erbinformationen ins menschliche Genom birgt enormes therapeutisches Potential, aber gleichzeitig auch ein hohes Risiko von Veränderungen intakter Gene.

Adenovirale Genvektoren [15] werden dagegen nicht stabil in das Genom von Wirtszellen eingebaut. Daher besteht wenig Gefahr einer mutagenen Veränderung des Erbguts. Adenovirale Genvektoren zeichnen sich durch hocheffizienten Gentransfer in teilende und ruhende Zellen aus [16]. Ein klinischer Einsatz ist allerdings aufgrund der natürlichen Antigenität des Virus im menschlichen Organismus begrenzt. Die Viruspartikel können zu einer starken Immunantwort sowie akuten Entzündungsreaktionen führen, die bereits zum Tod eines Patienten geführt haben [17-19]. Zur Verringerung adenoviraler Nebenwirkungen wurden virusspezifische Gene systematisch aus dem Virusgenom entfernt. Während in der ersten Generation adenoviraler Genvektoren lediglich ein einzelnes virales Gen (E1) ausgetauscht wurde [20], sind in aktuellen Konstrukten sämtliche virale Leserahmen deletiert [21, 22]. Doch auch mit dieser als „*helper-dependent*“ oder „*gutless*“ bezeichneten Virus-Generation gelang es bisher nicht, unerwünschte Nebenwirkungen im Empfängerorganismus vollständig zu unterbinden [23]. Nach Abwägung von Nutzen und Risiko kann für den Einzelfall eine gentherapeutische Behandlung mit viralen Genvektoren eine Alternative zu konventionellen Behandlungsformen darstellen. Doch gerade das Minimieren von Risiken ist die Herausforderung neuer gentherapeutischer Konzepte [24, 25].

1.2.2. Nicht-virale Genvektoren

Nicht-virale Genvektoren stellen neben den viralen Genvektoren die zweite Klasse von Gentransfer-Systemen dar. Die einfachste Version dieser synthetisch konstruierten Genfähren sind Nukleinsäuren selbst [26]. Der erforderliche Nukleinsäuretransport in eine Zielzelle kann für nicht-virale Genvektoren auf physikalische oder chemische Weise erfolgen [27]. Zu den etablierten physikalischen Methoden des nicht-viralen Gentransfers gehören u. a. die Mikroinjektion und der Einsatz der „*gene gun*“ als mechanische Transferprinzipien, sowie Elektroporation und Ultraschall [28].

Chemische Methoden basieren auf der Komplexbildung von Nukleinsäuren und synthetischen Trägersubstanzen, wie z. B. kationische Lipide oder kationische Polymere [29]. Aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen entstehen Partikel im Nanometerbereich, die als „Lipoplexe“ bzw. „Polyplexe“ bezeichnet werden. Die formulierten Partikel vermitteln

Gentransfer und weisen gegenüber freien Nucleinsäuren eine höhere Stabilität gegenüber Serumnucleasen auf [30, 31]. Kationische Lipide setzen sich aus kationischen Kopfgruppen und lipophilen Endgruppen zusammen [32]. Zu der Gruppe der kationischen Polymere zählen natürliche Verbindungen wie Histone oder Protamine, sowie synthetische Polyaminosäuren (Poly-Lysin, Poly-Arginin, u.a.) und eine Vielzahl weiterer synthetischer Polykationen wie Polyethylenimin und ähnliche Verbindungen [33-35].

Die Variabilität von Nucleinsäuren und Trägersubstanzen zur Bildung nicht-viraler Genvektoren im Nanometerbereich ermöglicht große Variationsmöglichkeiten im Vektordesign [36]. Formulierungen synthetischen Ursprungs zeichnen sich gegenüber viralen Genvektoren durch ein geringes immunogenes Potential aus. Die einzelnen Vektorbausteine können im Großmaßstab vergleichsweise günstig und schnell hergestellt werden. Die Effizienz des nicht-viralen Nucleinsäuretransfers ist gegenüber viralen Genvektoren allerdings deutlich reduziert. Hohe Applikationsmengen sind erforderlich, um die gewünschten Effekte zu erzielen. In den letzten Jahren konnte sich Polyethylenimin (PEI) als Trägersubstanz für Nucleinsäuren etablieren und stellt derzeit eines der effektivsten Transfektions-Reagenzien des nicht-viralen Gentransfers dar [37].

1.2.3. Nicht-virale Genvektoren mit PEI

Polyethylenimin (PEI) ist ein organisches Makromolekül mit der höchsten Dichte an protonierbaren Aminogruppen [38]. Jede dritte Position im Molekül ist ein protonierbares Stickstoffatom. Unter physiologischen Bedingungen (pH 7) sind die Aminogruppen nicht vollständig protoniert. Die daraus resultierende Pufferkapazität des Moleküls ist eine wichtige Voraussetzung für einen erfolgreichen Einsatz als Gentransferreagens. Häufige Verwendung findet PEI in einer verzweigten und einer linearen Struktur (s. Abb. 1).

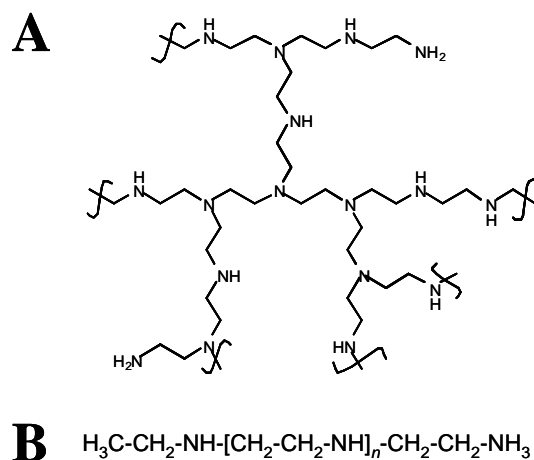


Abbildung 1: Strukturformel von verzweigtem PEI (A) und linearem PEI (B)

Nukleinsäuren werden unter Bildung von Nanopartikeln durch PEI kompaktiert [39]. Das molare Verhältnis zwischen PEI und Nukleinsäuren bzw. zwischen Aminogruppen (N) des PEI-Moleküls und negativ geladenen Phosphatgruppen (P) der DNA, wird durch die „N/P-Ratio“ beschrieben. Die Effektivität formulierter Nanopartikel wird durch PEI-Struktur, N/P-Ratio sowie durch die Salzkonzentration des Formulierungsmilieus entscheidend beeinflusst [40-42]. Nach der Kompaktierung binden nicht-virale Genvektoren mit PEI unspezifisch an negativ geladene Strukturen (Proteoglykane) der Zelloberfläche [43, 44] und werden über Endozytose in die Zelle aufgenommen [45-47]. Die Pufferkapazität von PEI verhindert trotz endosomaler Ansäuerung durch Protonen einen Abfall des pH-Werts und bietet auf diese Weise Schutz vor lysosomalem Abbau. Es folgt eine passive Diffusion von Chlorid-Ionen, die zu einem Anstieg des osmotischen Drucks in den Endosomen und letztlich zum Platzen der Vesikel führt. Dieser als „proton-sponge-effect“ bezeichnete Vorgang wird als Mechanismus für die endosomale Freisetzung von nicht-viralen Genvektoren in das Zytoplasma der Zelle angenommen [48, 49]. Nach Weitertransport in den Zellkern kommt es letztlich zur Umsetzung der genetischen Information [50, 51]. Durch Variation von Struktur

und Molekulargewicht [52, 53], sowie durch chemische Modifikationen von [54, 55] wurden bisher in zahlreichen Untersuchungen neue Formulierungen von PEI entwickelt und untersucht. Das wachsende Verständnis zellulärer Abläufe sowie neue Erkenntnisse im Genvektordesign [56, 57] ermöglichen eine stetige Optimierung des nicht-viralen Gentransfers mit PEI.

1.2.4. Modifikationen nicht-viraler Genvektoren mit PEI

Aufgrund der unspezifischen, elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen PEI-Polyplexen und negativ geladenen Zellstrukturen ist eine gezielte Transfektion ausgewählter Zellen nicht möglich. Durch die Bindung spezifischer Rezeptor-Liganden an PEI-Polyplexe entstand eine neue Klasse nicht-viraler Genvektoren, die über den Kontakt von Rezeptorliganden und Zell-Oberflächenrezeptoren natürliche Aufnahmemechanismen bestimmter Zellgruppen nutzte [58]. Abhängig von den entsprechenden Zielzellen wurden Peptide [59-61], Wachstumsfaktoren [62], Kohlenhydrate [63, 64] oder Antikörper [65, 66] als Liganden für rezeptorvermittelte Endozytose von PEI-Polyplexen eingesetzt. Nach der Aufnahme von PEI-Polyplexen in die gewünschte Zielzelle, stellte die endosomale Freisetzung der Partikel in das Zytoplasma den nächsten entscheidenden Schritt für effektiven Gentransfer dar. Durch das Einbringen membranaktiver Substanzen wie z. B. Melittin in PEI-Polyplexe wurde die intrazelluläre Freisetzung in das Zytoplasma deutlich verbessert [67-69].

Der Einsatz nicht-viraler Genvektoren mit PEI unter *in vivo*-Bedingungen stellte sich allerdings als limitiert heraus. PEI-Polyplexe interagierten aufgrund ihrer positiven Ladung unspezifisch mit einer Vielzahl von Blutbestandteilen wie z. B. Albumin, Fibrinogen oder Fibronectin und führten zu Komplementaktivierung und Erythrozyten-Aggregation [70, 71]. Kurze Zeit nach systemischer Applikation wurden die Polyplex-Aggregate im engen Gefäßsystem der Lunge zurückgehalten [72]. Eine ungehinderte Zirkulation im Blutkreislauf war über einen längeren Zeitraum nicht gewährleistet. Durch den Einsatz von Polyethylenglykol (PEG) als zusätzlichen Bestandteil der Polyplex-Formulierung, konnte die positive Partikelladung effektiv abgeschirmt werden [71, 73, 74]. Diese „PEG-ylierung“ reduzierte die Polyplex-induzierte Erythrozyten-Aggregation, verlängerte die systemische Verweildauer von PEI-Polyplexen und verringerte deren Toxizität. Die Herstellung abgeschirmter PEI-Polyplexe erfolgt zum einen über die kovalente Bindung von PEG an bereits formulierte PEI-Polyplexe („*post grafting*“) sowie alternativ über die kovalente Bindung von PEG an PEI, das im Anschluss als PEG-PEI zur Komplexierung von DNA eingesetzt wird. Ein weiteres Formulierungsprinzip abgeschirmter PEI-Polyplexe beruht auf

elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen PEI-Polyplexen und einem negativ geladenen Schutz-Polymer, das als „*Protective Copolymer*“ (PROCOP) bezeichnet wird. Hierbei handelt es sich um ein Co-Polymer bestehend aus einer negativ geladenen Peptidgruppe (YE5C) sowie einer PEG-Einheit (P6), die über ein entsprechendes Linker-Molekül miteinander verbunden sind. Das negativ geladene Co-Polymer „P6YE5C“ lagert sich aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen an positiv geladene PEI-Polyplexe an und bildet abgeschirmte PEI-Polyplexe im Nanometerbereich aus, die als „*Copolymer Protected Gene Vectors*“ (COPROGs) bezeichnet werden [75] (s. Abb. 2).

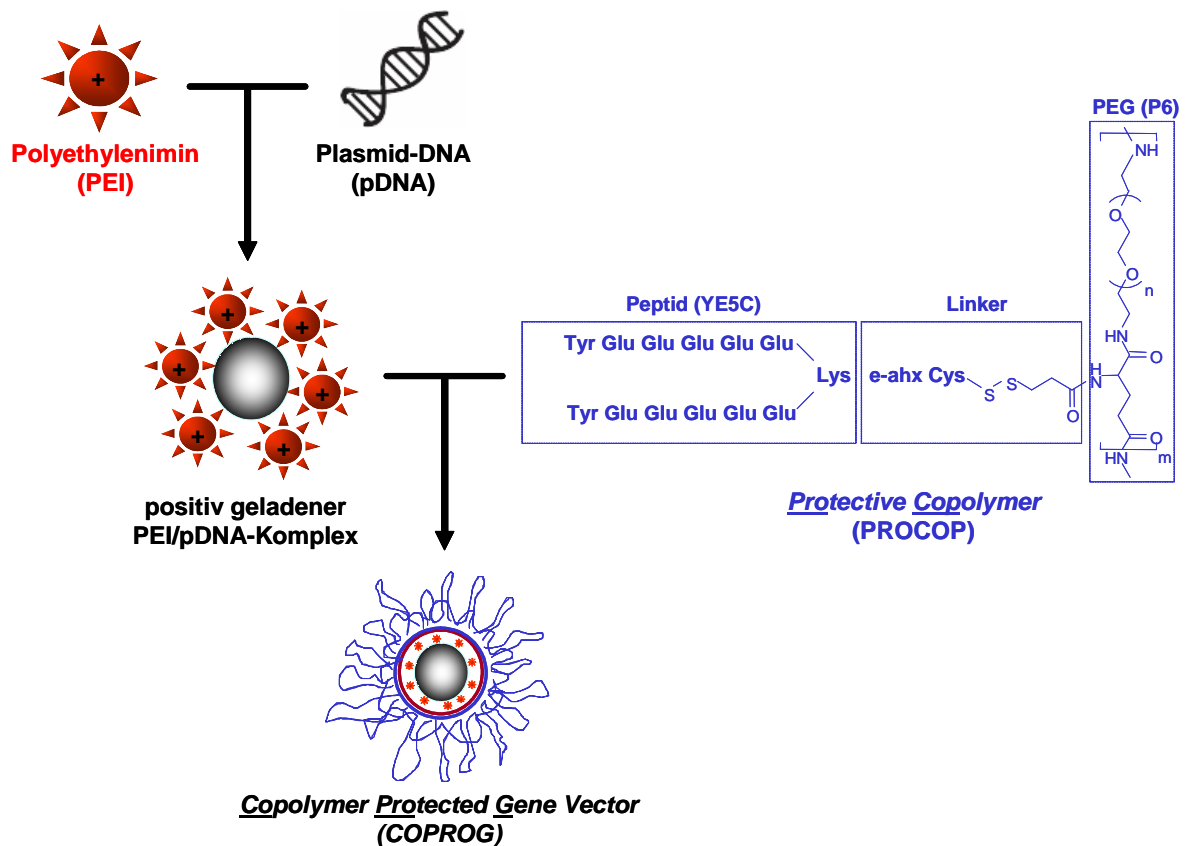


Abbildung 2: Bildung von „*Copolymer Protected Gene Vectors*“ (COPROGs) aufgrund elektrostatischer Wechselwirkung zwischen positiv geladenen PEI/pDNA-Komplexen und negativ geladenem „*Protective Copolymer*“ (PROCOP) P6YE5C.

Die nach außen neutralen COPROGs-Partikel sind stabil und zeigen keine Salz- bzw. Serumalbumin-induzierte Aggregation. Gegenüber ungeschützten PEI-Polyplexen führte der COPROGs-Einsatz *in-vivo* zu einer drastischen Verringerung der Komplementaktivierung sowie zu deutlich reduzierten Interaktionen zwischen Polyplexen und Serumproteinen [75]. Gegenüber Genvektoren mit kovalent gebundenem PEG ist das „*Protective Copolymer*“ (PROCOP) aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen lediglich reversibel an PEI-Polyplexe gekoppelt und könnte durch geladene Proteinstrukturen

(z. B. der extrazellulären Matrix) aus der COPROGs-Formulierung verdrängt werden. Die einfache Herstellungsweise sowie die vielseitige Einsatzmöglichkeit der COPROGs machen sie jedoch im breiten Spektrum nicht-viraler Genvektoren mit PEI zu einer attraktiven Alternative, die bereits in zahlreichen Untersuchungen erfolgreich eingesetzt werden konnten. Modifikationen nicht-viraler Genvektoren mit PEI tragen entscheidend zur Überwindung extrazellulärer und intrazellulärer Barrieren des nicht-viralen Gentransfers bei [76]. Die Imitation effektiver Mechanismen des viralen Gentransfers unter Verwendung synthetischer Materialien stellt einen viel versprechenden Ansatz zur Optimierung nicht-viraler Transfersysteme dar [77].

1.3. Lokale Gentherapie mit nicht-viralen Genvektoren

Während systemisch applizierte DNA-Partikel unter Überwindung extrazellulärer Barrieren [78] zu Zielzellen gelangen müssen, werden Genvektoren in der lokalen Gentherapie direkt im gewünschten Gewebe eingesetzt. Die erhöhte DNA-Konzentration im Zielgewebe kann sich dabei positiv auf den gewünschten Transfektionserfolg auswirken [79]. Eine lokale Applikation verhindert die systemische Verteilung der DNA-Partikel und verringert auf diese Weise das Risiko vor Transfektionen unerwünschter Zelltypen und systemischen Nebenwirkungen.

Hautgewebe bietet aufgrund idealer Applikationsmöglichkeiten gute Voraussetzungen für die lokale Gentherapie. DNA-beladene Goldpartikel können mit Hilfe einer „gene gun“ direkt in die Zellen von Hautarealen geschossen werden und führen lokal zur Expression des gewünschten Transgens. Die Expression des Wachstumsfaktors EGF führte dabei zu einer Beschleunigung der Wundheilung [80]. Eine weitere Methode zur lokalen Transfektion von Hautzellen stellt die Elektroporation dar. Der lokale Einsatz eines elektrischen Feldes führte im Behandlungsbereich zu einer Destabilisierung der Zellmembran und zu einer erhöhten Aufnahme der Genvektorformulierung [81, 82]. Im Muskelgewebe wurde lokaler Gentransfer durch eine direkte Injektion von nackter Plasmid-DNA erzielt [83], die durch zusätzlichen Einsatz der Elektroporation weiter gesteigert werden konnte [84]. Eine klinisch relevante Applikationsform für lokalen Gentransfer stellt die Inhalation von Genvektor-Aerosolen dar. Bereits geringste Mengen formulierter Plasmid-DNA führten lokal zu effektivem Gentransfer [85]. Neue Transfertechniken nicht-viraler Genvektoren bieten viel versprechende Perspektiven für die lokale Gentherapie. Assoziate aus Genvektorformulierungen und magnetischen Nanopartikeln konnten unter Einfluss eines Magnetfelds gezielt in gewünschte

Transfektionsareale dirigiert werden [86]. Die magnetisch induzierte Anreicherung von Genvektoren eröffnet zahlreiche neue Indikationsfelder für lokalen Gentransfer *in vitro* und *in vivo* [87]. Ein weiteres Prinzip der lokalen Gentherapie stellt der Einsatz genaktivierter Biomaterialien dar. In zahlreichen Applikationsformen werden Kombinationen aus Genvektoren und Trägermaterialien für die unterschiedlichsten medizinischen Indikationen eingesetzt.

1.3.1. Genaktivierte Biomaterialien

Durch Formulierung von nicht-viralen Genvektoren in natürlichen und synthetischen Polymerstrukturen entstehen genaktivierte Biomaterialien, die im Prinzip neuartigen „drug delivery systems“ [88, 89] entsprechen. Die formulierten Genvektoren stellen dabei die Wirkstoffkomponente dar. Durch die Einarbeitung in Polymerstrukturen sind Genvektoren besser vor äußeren Einflüssen geschützt und können über einen längeren Zeitraum kontinuierlich abgegeben werden. Der lokale Einsatz genaktivierter Biomaterialien entspricht von vornherein einer Anreicherung von DNA im Applikationsgebiet und kann für eine Reduzierung systemischer Nebenwirkungen geeignet sein. Durch kontrollierte Freisetzung aus Trägermaterialien wird lokal eine konstante DNA-Konzentration aufrechterhalten, die eine Verringerung der Dosierungsmengen und Dosierungshäufigkeit ermöglicht [90]. Der Mechanismus der DNA-Freisetzung aus Biomaterialien beruht auf Diffusion sowie auf konstanter Degradation der Trägermaterialien [91]. Werden Genvektoren in Polymerstrukturen immobilisiert, kommt es zu „Matrix-mediertem“ Gentransfer über den direkten Kontakt von Zellen und Matrixstrukturen [92]. Interaktionen zwischen Genvektoren und Trägermaterialien erfolgen entweder unspezifisch über hydrophobische, elektrostatische und van der Waals-Bindungen oder spezifisch über funktionelle Gruppen an Genvektor- und Polymerstrukturen [93]. Genaktivierte Biomaterialien können abhängig von Polymerstruktur und Indikation als Nanopartikel [94-97], Mikropartikel [98-102], dreidimensionale Gerüststrukturen [103-106] oder Beschichtungen [107-110] formuliert und eingesetzt werden. Neben Vakzinierungs-Studien [111-115] stellt die Geweberegeneration [116] ein wichtiges Einsatzgebiet genaktivierter Biomaterialien dar.

1.4. Tissue Engineering

Tissue Engineering [117, 118] ist ein interdisziplinäres Forschungsfeld der Materialwissenschaften, Zellbiologie und Medizin zur Entwicklung biologischer Applikationsformen, die Gewebe- und Organfunktionen ersetzen, erhalten oder verbessern sollen [119]. Das regenerative Potential dieser Behandlungsform beruht auf einer aktiven Integration biologischer Transplantate in den Heilungsprozess eines Organismus. Dreidimensionale Gerüststrukturen werden mit lebenden Zellen kombiniert und imitieren den natürlichen Verbund von körpereigenen Zellen mit extrazellulären Matrixbestandteilen. Diese „lebenden Konstrukte“ sollen körpereigene Regenerationsprozesse unterstützen und ggf. initiieren [120]. Über Proliferation, Differenzierung, Zell-Zell-Interaktionen und der Bildung neuer extrazellulärer Matrixstrukturen tragen lebende Zellen entscheidend zur Reorganisation und Integration des Transplantats *in vivo* bei. Zum Einsatz kommen individuelle Zelltypen autologer, allogener und xenogener Quellen. Die Vielfalt an unterschiedlichen Zelltypen, die für eine vollständige Erneuerung sowie für eine dauerhafte Instandhaltung von Gewebe erforderlich ist, macht den Regenerationsvorgang komplex. Multipotente Stammzellen können in verschiedene Zelltypen differenzieren und haben das Potential zur Selbsterneuerung. Diese für die Geweberegeneration hervorragenden Eigenschaften machen Stammzellen für Tissue Engineering interessant [121, 122]. Neben embryonalen Stammzellen [123], deren Einsatz aus regulatorischen und ethischen Gründen strengen Kontrollen unterliegt, sind adulte Stammzellen [124] heute von besonderem Interesse [125]. Die Regeneration zu intaktem Gewebe setzt eine Zelldifferenzierung voraus, die durch eine Vielzahl von Mediatoren wie z. B. Wachstumsfaktoren, Zytokinen oder Hormonen gesteuert wird [126, 127]. Durch den Einsatz gentherapeutischer Maßnahmen ist es möglich geworden, aktiv in diese Steuermechanismen einzugreifen [128-133]. Transfektionen und Expression therapeutischer Proteine im Wundgebiet gewährleisten eine lokale Bereitstellung wichtiger Faktoren und geben einen zusätzlichen Impuls für gerichteten Gewebewiederaufbau.

Neben der zellulären Komponente spielt für Tissue Engineering die Auswahl geeigneter Trägermaterialien eine entscheidende Rolle. Zahlreiche natürliche und synthetische Biomaterialien werden derzeit auf ihre Eignung als Aufbaumatrix in der regenerativen Medizin untersucht. Neben ihrer Funktion als Gerüststruktur stellen sie gleichzeitig das Umfeld für zelluläre Abläufe und aktive Regenerationsprozesse dar.

1.4.1. Biomaterialien in der regenerativen Medizin

Der Einsatz von Biomaterialien zur Wiederherstellung defekter Gewebe- und Organfunktionen beschreibt ein umfangreiches Behandlungskonzept der regenerativen Medizin. In den 60er und 70er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde die erste Generation moderner Biomaterialien für die Anwendung im Organismus entwickelt und untersucht. Mit wachsendem Verständnis für das menschliche Immunsystem wurden Materialien erforscht, die sich durch ein minimales Risiko vor immunologischen Reaktionen im Empfängerorganismus auszeichneten. Ideale Biomaterialien entsprachen den physikalischen Anforderungen des Gewebeersatzes und waren biologisch inert [134]. Diese zwei grundlegenden Voraussetzungen für die Auswahl geeigneter Biomaterialien haben noch bis zum heutigen Tag ihre Gültigkeit.

In den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts wurden Biomaterialien der zweiten Generation entwickelt, die sich neben einer physikalischen und immunologischen Eignung durch ein bioaktives Potential auszeichneten [135]. Im Empfängerorganismus lösten diese Materialien lokal kontrollierte physiologische Reaktionen aus. Die erwünschte Interaktion zwischen Organismus und Biomaterial führte zu einer Aktivierung der applizierten Matrixstrukturen und verbesserte deren Integration im Empfängerorganismus. Ein weiterer Vorteil der zweiten Generation stellte die Entwicklung resorbierbarer Biomaterialien dar, die über definierte chemische Reaktionen vollständig vom Organismus abgebaut und resorbiert wurden [136]. Die Verweildauer von Biomaterialien im Applikationsgebiet wurde kontrollierbar und konnte durch die gezielte Wahl geeigneter Materialien optimal den erforderlichen Bedingungen angepasst werden. Doch die Biomaterialien der zweiten Generation waren in ihrem Regenerationspotential zur Wiederherstellung von Gewebe- und Organfunktionen begrenzt.

Es folgte die Entwicklung der dritten Generation von Biomaterialien, die die jeweiligen Vorzüge der zweiten Generation vereinte [137]. Es wurden resorbierbare Materialien mit bioaktiven Komponenten entwickelt, die neben ihrer physikalischen Aufgabe als Matrixgerüst auch stimulierend für einen gerichteten Gewebewiederaufbau wirken sollten. Als Vorbild dafür diente die aus Proteinen, Glycoproteinen und Proteoglycanen bestehende extrazelluläre Matrix (EZM), die in der natürlichen Wundheilung, neben ihrer Primärfunktion zur Hämostase, als körpereigene Leitstruktur eine entscheidende Rolle für den Wiederaufbau zerstörter Gewebe- und Organfunktionen übernimmt [138, 139]. Strukturmerkmale für Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von Zellen wie Integrine, RGD-Sequenzen oder Wachstumsfaktoren steuern den Regenerationsprozess und tragen entscheidend für die Entstehung von funktionellem Gewebe bei [140]. Der Versuch, die komplexen Vorgänge der

Wundheilung durch den Einsatz natürlicher und synthetischer Biomaterialien zu imitieren, stellt eine Kernaufgabe der dritten Generation von Biomaterialien dar.

Natürliche Biomaterialien sind ideal für den Ersatz der extrazellulären Matrix geeignet. Die aus Polypeptiden, Polysacchariden, Polyestern und anorganischen Substanzen bestehenden Materialien werden zum größten Teil aus Blutplasma gewonnen. Sie enthalten neben natürlichen Proteinen für den Aufbau fibrillärer Matrixstrukturen mit viskoelastischer Gel-Charakteristik auch natürliche Funktionsproteine wie z. B. Integrine, Enzyme, Wachstumsfaktoren und Interleukine. Häufig sind die Materialien den mechanischen Anforderungen gut angepasst und können vom Organismus vollständig abgebaut werden. Die eigene physiologische Aktivität natürlicher Biomaterialien ist ein entscheidendes Kriterium für ihren Einsatz in der Geweberegeneration. Aktuell wird eine Vielzahl natürlicher Biomaterialien für die Behandlung von Gewebe- und Organdefekten untersucht und eingesetzt. Neben Fibrin, Fibronectin, Kollagen, Hyaluronsäure oder Hydroxyapatit als Biomaterialien humanen Ursprungs werden u. a. auch Alginat, Agarose, Gelatine oder Chitosan als natürliche Biomaterialien verwendet. Allerdings birgt der Einsatz natürlicher Biomaterialien auch Probleme. Die Gefahr besteht, dass die aus Blutplasma oder anderen organischen Quellen gewonnenen Materialien Virus-Infektionen oder immunologische Reaktionen im Empfängerorganismus verursachen können. Herstellungsbedingt kann es zu Schwankungen in der Zusammensetzung kommen. Sie zeigen in der Anwendung häufig eine geringe Flexibilität gegenüber Änderungen des Matrixdesigns und zeichnen sich im Verlauf von Langzeit-Applikationen meist durch einen schnellen Alterungsprozess aus.

Synthetische Biomaterialien [141] stellen eine attraktive Alternative zu natürlichen Biomaterialien dar. Sie sind in ihrer chemischen Zusammensetzung eindeutig definiert und können in reproduzierbarer Qualität in großem Maße hergestellt werden. Über steuerbare Syntheseschritte werden Materialien produziert, deren Struktur, mechanische Stabilität und Abbaurate im Empfängerorganismus kontrolliert und variiert werden können [142].

Synthetische Polyester der Milchsäure „*poly (lactic acid)*“ (PLA), der Glykolsäure „*poly (glycolic acid)*“ (PGA) und ihrer co-Polymere „*poly (lactic-co-glycolic acid)*“ (PLGA), ϵ -Capronsäure sowie Poly- ρ -Dioxanon stellen nur einige Grundbausteine einer großen Gruppe von resorbierbaren Polymeren und Co-Polymeren dar. Neue Strategien für die Herstellung von Biomaterialien imitieren unter Verwendung chemisch modifizierter Bausteine die Biosynthese extrazellulärer Matrixstrukturen [143]. Durch den gezielten Einsatz von rekombinanter DNA, modifizierten Aminosäuren und Polysacchariden entstehen künstliche Versionen einer extrazellulären Matrix mit kontrollierbaren und optimierten

Eigenschaften [144]. Die Vielfalt und Variationsmöglichkeit synthetischer Biomaterialien ist enorm. Dennoch stellt das Fehlen natürlicher Strukturmerkmale für Zell-Adhäsion, -Proliferation und -Differenzierung einen Nachteil für die Integration im Empfängerorganismus dar und zeigt die Grenzen der synthetischen Biomaterialien auf. Eine einseitige physikalische Matrixcharakteristik kann nur einen begrenzten Beitrag zur Wiederherstellung von Gewebe- und Organfunktionen leisten. Das vielschichtige Anforderungsprofil an moderne Biomaterialien der dritten Generation ist komplex und erfordert die Entwicklung intelligenter Biomaterialien, die den *in vivo* Bedingungen optimal angepasst sind. Durch spezifische Matrixzusätze, wie z. B. RGD-Peptide, Wachstumsfaktoren, Zytokine, Antibiotika oder Nukleinsäuren entstehen komplexe Matrixstrukturen, die sich in den Regenerationsprozess integrieren. Die Aktivierung von Biomaterialien durch Genvektoren führte zur lokalen Expression therapeutischer Transgene, die zur Stimulation der Wundheilung dienten.

1.4.2. Genaktivierte Biomaterialien in der regenerativen Medizin

Akute Verletzungen oder chronische Schädigungen von Körperteilen führen zur Zerstörung von Gewebe- oder Organstrukturen. Die natürlichen Reparaturmechanismen des Organismus führen nicht immer zur vollständigen Wiederherstellung der ursprünglichen Gewebestruktur sondern können sich auf Ausbildung von Narbengewebe beschränken oder unterbleiben teilweise völlig. Genaktivierte Biomaterialien stellen in der regenerativen Medizin ein viel versprechendes Behandlungskonzept dar. Angepasste Matrixstrukturen werden mit Genvektoren zur Produktion essentieller Signalstoffe für den Wiederaufbau zerstörter Gewebe- und Organstrukturen in einer Applikationsform kombiniert. Die gezielte Auswahl therapeutischer Gene führt zur lokalen Produktion gewünschter Wundheilungsmediatoren und kann abhängig der Indikation variiert werden [145].

Die „genaktivierte Matrix“ (GAM) unter Verwendung nicht-viraler Genvektoren wurde 1996 erstmals erfolgreich von Fang et al. zur Stimulation der Knochen-Neubildung eingesetzt [146]. Das Prinzip beruhte auf der Einarbeitung nackter Plasmid-DNA zur Expression von „*bone morphogenic protein-4*“ (BMP-4) und Parathormon (PTH) in Kollagenstrukturen, die in Form eines genaktivierten Kollagen-Schwammes in Knochendefekte eingebracht wurden. Das anhaltende Expressionsprofil osteogener Faktoren über einen Zeitraum von 6 Wochen entsprach der für die Geweberegeneration erwünschten Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren im Applikationsgebiet [147]. Weitere Behandlungskonzepte genaktivierter Biomaterialien folgten. Zur Regeneration von Vollhautwunden wurde von

Andree et al. 2001 eine durch nackte Plasmid-DNA aktivierte Fibrinmatrix für die lokale Expression des Wachstumsfaktors „*epidermal growth factor*“ (EGF) eingesetzt. Die genaktivierte Matrix diente gleichzeitig als Transplantationsmedium autologer Keratinozyten und führte *in vivo* gegenüber DNA-freien Versuchsgruppen zu einer beschleunigten Wundheilung [148]. In einer weiteren Studie führte der Einsatz eines genaktivierten Hydrogels durch lokale Expression des Wachstumsfaktors „*transforming growth factor-β1*“ (TGF-β1) zu einer verbesserten Heilung diabetischer Wunden [149]. Während Haut- sowie Knorpelgewebe über Diffusionsblut versorgt werden, stellt die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung ein zentrales Problem in der Regeneration vieler weiterer Gewebearten dar. Genaktivierte Biomaterialien zur lokalen Expression der Wachstumsfaktoren *vascular endothelial growth factor* (VEGF) [150] und „*fibroblast growth factor 4*“ (FGF-4) [151] wurden erfolgreich zur Stimulation von Angiogenese *in vivo* eingesetzt. In einem Modell zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit diente eine genaktivierte Fibrinmatrix aufgrund geeigneter Materialeigenschaften zur Stabilisierung der linken Ventrikel-Geometrie und gleichzeitig als DNA-Träger für die lokale Expression von Pleiotrophin (PTN) [152]. Die Applikation der genaktivierten Matrix zeigte gegenüber Injektionen mit nackter Plasmid-DNA nach Myokard-Infarkt eine gesteigerte Neo-Vaskularisierung. Aufgrund der geringen Gentransfereffizienz durch den Einsatz nackter Plasmid-DNA wurden in aktuellen Untersuchungen genaktivierte Biomaterialien unter Verwendung nicht-viraler Genvektoren mit PEI formuliert und eingesetzt. Zur Regeneration von kranialen Knochendefekten wurden unterschiedliche genaktivierte PLGA-Strukturen zur lokalen Expression von „*bone morphogenic protein-4*“ (BMP-4) miteinander verglichen. Der Einsatz nicht-viraler Genvektoren mit PEI führte gegenüber nackter Plasmid-DNA zu einer deutlichen Steigerung der Knochenbildung [153] und damit zu einer erhöhten Effektivität des Behandlungskonzepts.

1.5. Untersuchungsziele

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung und Charakterisierung implantierbarer Arzneistoffträger für den lokalen Gentransfer, die zur Rekonstruktion zerstörter Gewebe- und Organstrukturen eingesetzt werden können. Das größte Organ des menschlichen Organismus ist die Haut. Sie grenzt den Organismus ab und schützt ihn vor äußeren Einflüssen. Größere Wunden erhöhen die Gefahr von Infektionen und können zur Austrocknung des Organismus führen. Die Reepithelialisierung zerstörter Hautareale ist eine essentielle Schutzreaktion des Organismus und muss im Notfall medizinisch gewährleistet werden [154, 155]. Neben

autologer und allogener Hauttransplantate konnten sich in den letzten Jahren neue Prinzipien der Geweberegeneration etablieren [156]. Kultivierte Keratinozyten wurden als Einzelzellsuspension in Fibrin erfolgreich zur Reepithalisierung chronischer Wunden eingesetzt [157]. Die injizierbare Fibrinkleberzubereitung diente zum einen als Transplantationsmatrix für Keratinozyten und gleichzeitig als physiologische Gerüststruktur für den gerichteten Gewebewiederaufbau. Die Aktivierung der eingesetzten Fibrinmatrix mit nicht-viralen Genvektoren könnte zu einer lokalen Transfektion von Reparationszellen und zur Expression therapeutischer Transgene führen. Die Entwicklung und Optimierung einer injizierbaren Fibrinmatrix für den lokalen Gentransfer unter Verwendung nicht-viraler Genvektoren mit PEI ist ein Ziel der vorliegenden Arbeit. Die Modulierbarkeit der eingesetzten Fibrinkleberzubereitung ist ein wichtiges Element für die Regeneration elastischer Gewebestrukturen wie z. B. Haut. Für die Regeneration von hartem Stützgewebe wie z. B. Knochen ist eine genaktivierte Fibrinmatrix dagegen wahrscheinlich nicht geeignet. Für die Behandlung von Knochenbrüchen ist der Einsatz medizinischer Implantate essentiell. Künstliche Hüftgelenke, Drähte, Schrauben oder Platten sind nur einige Beispiele, die zur Regeneration von Frakturen eingesetzt werden. Die verwendeten Implantate dienen dabei in erster Linie zur Stabilisierung des zerstörten Knochengewebes. In den letzten Jahren wurde das Funktionsspektrum medizinischer Implantate durch das Aufbringen biologisch aktiver Beschichtungen ausgeweitet. Ein stabiler Polymerfilm aus *poly D/L-lactic acid* (PDLA) [158] wurde erfolgreich als Träger verschiedener Arzneistoffe eingesetzt. Die Beschichtung orthopädischer Implantate mit PDLA und Gentamicin führte nach lokaler Applikation zu einer signifikanten Reduzierung der Implantat-assoziierten Infektionsrate im Tiermodell [159]. Der Einsatz rekombinanter Wachstumsfaktoren als aktive Komponente des Implantatüberzuges führte nach lokaler Applikation *in vivo* zu einer beschleunigten Frakturheilung. Die verbesserte Knochenheilung wurde sowohl für die parallele Freisetzung der Wachstumsfaktoren IGF und TGF- β 1 aus PDLA [160] als auch für BMP-2 [161] beobachtet. Der Einsatz nicht-viraler Genvektoren in Polymerbeschichtungen aus PDLA stellt eine attraktive Alternative für den Einsatz rekombinanter Wachstumsfaktoren dar. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung und Charakterisierung einer genaktivierten Oberflächenbeschichtung aus PDLA und PLGA für lokalen Gentransfer und lokale Expression therapeutischer Transgene durch nicht-virale Genvektoren mit Polyethylenimin (PEI).

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Reagenzien

Der Zweikomponenten-Fibrinkleber TISSUCOL[®]-Kit Immuno wurde von der Firma Baxter (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

Die synthetischen Polymere *poly [D/L lactic acid]* (PDLLA) mit dem Handelsnamen Resomer[®] R 203 S und *poly [lactic-co-glycolic acid]* (PLGA) mit dem Handelsnamen Resomer[®] RG 503 H wurden von der Firma Boehringer Ingelheim Pharma (Ingelheim, Deutschland) erworben und mit den Konzentrationen von 20, 40, 80 und 160 mg/ml in Ethylacetat bzw. Chloroform/Isopropanol (v/v = 19/1) eingesetzt.

Die synthetischen Polymere *poly(DTE-co-5% DT carbonate)* (DTE05DT) und *poly(DTE-co-30% DT carbonate)* (DTE30DT) wurden von Professor J. Kohn (Rutgers State University of New Jersey, New Jersey Center for Biomaterials, Piscataway, NJ, USA) zur Verfügung gestellt und mit den Konzentrationen von 40 und 80 mg/ml in Chloroform / Isopropanol (v/v = 19/1) eingesetzt.

Verzweigtes Polyethylenimin mit einem mittleren Molekulargewicht von 25 kDa (PEI 25) wurde von der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. PEI 25 wurde in Wasser gelöst, mit HCl neutralisiert, gegen Wasser dialysiert und nach Sterilfiltration mit einer Konzentration von 2,9 mg/ml verwendet. Lineares Polyethylenimin mit einem mittleren Molekulargewicht von 22 kDa (PEI 22) wurde unter dem Handelsnamen ExGen[®] 500 von der Firma Euromedex (Souffelweyersheim, Frankreich) erworben und nach den Empfehlungen des Herstellers eingesetzt.

Für Gentransferstudien wurden unterschiedliche eukaryotische Expressionsplasmide verwendet. Zur Expression des Reportergens *green fluorescent protein* (GFP) unter Kontrolle des CMV-Promotors wurden die Plasmide pEGFP-N1 von der Firma Clontech (Palo Alto, CA, USA) und pGeneGrip[®]-GFP von der Firma Gene Therapy Systems (San Diego, CA, USA) erworben. Zur Expression des Fusionsproteins GFP-Zeocin unter Kontrolle des EF-1 α -Promotors für eine selektive Expression von GFP in Säugetierzellen sowie zur Expression des Wachstumsfaktors *epidermal growth factor* (EGF) unter Kontrolle des CMV-Promotors wurde das Plasmid pTracer[®]-CMV2 von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Zur Expression des Reportergens *photinus pyralis luciferase* unter

Kontrolle des CMV-Promotors wurde das Plasmid pCMV-luc [162], eingesetzt. Zur Expression des Wachstumsfaktors *epidermal growth factor* (EGF) unter Kontrolle des CMV-Promotors wurde das Plasmid pWRG-1630-EGF [80], verwendet. Zur Expression des Wachstumsfaktors *bone morphogenic protein-2* (BMP-2) unter Kontrolle des CMV-Promotors wurde das Plasmid pB-BMP-2 von PD Dr. C. Plank (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, München, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Mit *XL2 blue ultracompetent cells* der Firma Stratagene (La Jolla, CA, USA) wurden Plasmide vermehrt. Isolierung und Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit EndoFree Plasmid Mega Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland). Anschließend wurden Plasmide in Wasser gelöst und nach Bestimmung der DNA-Konzentration im UV-Spektrometer Beckmann DU-600 der Firma Beckmann Instruments (Fullerton, USA) mit einer Ratio $OD_{260}/OD_{280} \geq 1,8$ eingesetzt.

Das Schutzpolymer P6YE5C wurde nach Finsinger et al. [75] synthetisiert und aufgereinigt. Das Reaktionsprodukt wurde gegen Wasser dialysiert und für die Formulierung von Genvektoren eingesetzt.

Das der C β -Kette von Fibrinogen abgeleitete Peptid „Haptid“ mit der Aminosäuresequenz KGSWYSMRKMSMKIRPFFPQQ [163] wurde nach Merrifield et al. [164] über Festphasen-Peptidsynthese an einem Chlorotriylchlorid-Harz hergestellt. Nach 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Methode (Fmoc) wurde die Peptidsynthese unter Verwendung des automatisierten Peptid Synthesizers 431A der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland) durchgeführt. Nach Abspaltung vom Trägerharz wurde das Peptid „Haptid“ über die C-18 reversed phase Säule 218TP der Firma Grace Vydac (Hesperia, CA, USA) gereinigt, mittels Massenspektrometrie identifiziert und mit einer Konzentration von $c = 8,31$ mg/ml in Wasser gelöst.

Der Fibrin-Polymersiationsinhibitor Pefabloc[®] FG mit der Aminosäuresequenz GPRP wurde von der Firma Pentapharm (Basel, Schweiz) erworben und mit einer Konzentration von $c = 1,53$ mg/ml in Wasser gelöst.

Alle weiteren Chemikalien und Reagenzien wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

2.2. Genvektoren

2.2.1. Formulierung ungeschützter Genvektoren

Für die Herstellung von Genvektoren bestehend aus PEI 25 bzw. PEI 22 und Plasmid-DNA, wurden die Bestandteile separat in Wasser vorgelegt. Nach Definition der gewünschten Plasmid-Menge und N/P-Ratio, wurde das Verhältnis der einzelnen Bestandteile festgelegt. Für das Formulieren der Genvektoren wurden N/P-Ratios von 4, 6, 8 und 10 gewählt. Das Endvolumen der vorgelegten Genvektor-Bestandteile wurde mit Wasser angeglichen. Unter Schütteln wurde Plasmid-DNA-Lösung der PEI-Lösung beigemischt und für einige Sekunden mitgeschüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur bildeten sich unter Kondensierung der einzelnen Bestandteile Genvektoren bestehend aus PEI 25 bzw. PEI 22 und Plasmid-DNA. Die Endkonzentration der kondensierten Plasmid-DNA betrug 0,04 µg/µl. Genvektoren in Wasser wurden mit NaCl-Lösung (5M) als isotone Lösung (150 mM) eingestellt, bevor sie direkt für die Transfektion von Zellen eingesetzt wurden.

Für die Herstellung von Genvektoren bestehend aus PEI 22 und Plasmid-DNA nach der Empfehlung des Herstellers von ExGen[®] 500 (PEI 22) wurde die gewünschte Plasmid-Menge in isotoner NaCl-Lösung vorgelegt und mit der für N/P-Ratio 6 erforderlichen Menge ExGen[®] 500 (PEI 22) versetzt. Unmittelbar nach Zugabe von ExGen[®] 500 (PEI 22), wurde der Ansatz für einige Sekunden kräftig geschüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur bildeten sich unter Kondensierung der einzelnen Bestandteile Genvektoren bestehend aus ExGen[®] 500 (PEI 22) und Plasmid-DNA.

2.2.2. Formulierung geschützter Genvektoren

Für die Herstellung von geschützten Genvektoren bestehend aus PEI 25 bzw. PEI 22, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C, wurden die Bestandteile separat in Wasser vorgelegt. Nach Definition der gewünschten Plasmid-Menge und N/P-Ratio wurde das Verhältnis der einzelnen Bestandteile festgelegt. Für das Formulieren der Genvektoren wurden N/P-Ratios von 4, 6, 8 und 10 gewählt. Generell wurden 3 Ladungsäquivalente Schutzpolymer P6YE5C bezogen auf die negative Ladung der eingesetzten Plasmid-Menge verwendet. Das Endvolumen der vorgelegten Genvektor-Bestandteile wurde mit Wasser angeglichen. Unter Schütteln wurde Plasmid-DNA-Lösung der PEI-Lösung beigemischt und für einige Sekunden mitgeschüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur bildeten sich unter Kondensierung der einzelnen Bestandteile Genvektoren

bestehend aus PEI 25 bzw. PEI 22 und Plasmid-DNA. Danach wurden Genvektoren bestehend aus PEI 25 bzw. PEI 22 und Plasmid-DNA unter Schütteln der P6YE5C-Lösung beigemischt und für einige Sekunden mitgeschüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur bildeten sich geschützte Genvektoren bestehend aus PEI 25 bzw. PEI 22, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C (s. Abb. 3). Die Endkonzentration der kondensierten Plasmid-DNA betrug $0,04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Geschützte Genvektoren in Wasser wurden mit NaCl-Lösung (5M) als isotone Lösung (150 mM) eingestellt, bevor sie direkt für die Transfektion von Zellen eingesetzt wurden.

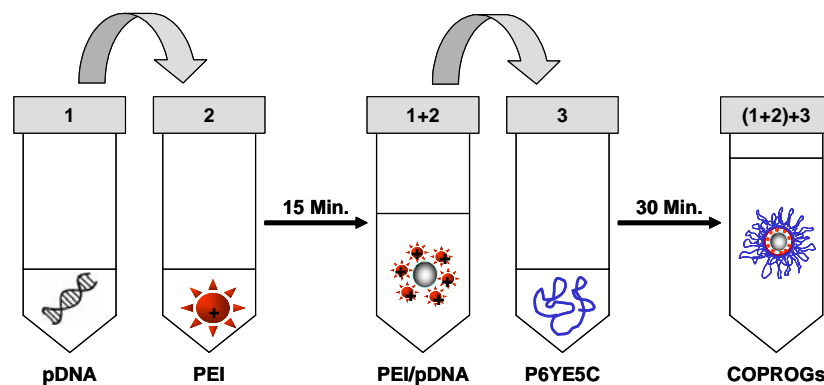


Abbildung 3: Darstellung der Formulierung geschützter Genvektoren in Wasser. Im ersten Formulierungsschritt wird der gesamte Inhalt von Reaktionsgefäß 1 (pDNA in Wasser) unter Schütteln in Reaktionsgefäß 2 (PEI in Wasser) überführt. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur und Bildung von PEI/pDNA-Komplexen wird die gesamte Mischung aus Reaktionsgefäß 1 und 2 unter Schütteln in Reaktionsgefäß 3 überführt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur bilden sich geschützte Genvektoren (COPROGs) in der Mischung aus Reaktionsgefäß 1, 2 und 3.

2.2.3. Radioaktivmarkierung von Plasmid-DNA

Die Radioaktivmarkierung der Plasmid-DNA pB-luc wurde mit radioaktivem I^{125} nach der Methode von Terebesi et al. [165] durchgeführt. Das Protokoll stellte eine Modifikation der I^{125} -Markierung nach Commerford et al. [166] dar. Die Effizienz der I^{125} -Markierung von Plasmid-DNA wurde bestimmt durch Messung der Absorption bei 260 nm (DNA-Konzentrationsbestimmung) und durch Messung der Radioaktivität im Gamma Counter Wallac 1480 Wizard 3'' der Firma Perkin Elmer (Boston, MA, USA). Über Gelelektrophorese und Autoradiographie wurde I^{125} -markierte Plasmid-DNA analysiert, im Verhältnis 1:4 mit nicht-markierter Plasmid-DNA gemischt und für die Herstellung von geschützten Genvektoren eingesetzt.

2.2.4. Radioaktivmarkierung von PEI 25

Die Radioaktivmarkierung von PEI 25 wurde mit radioaktivem I^{131} durchgeführt. Der Markierungsansatz setzte sich aus 1 ml einer wässrigen PEI 25-Lösung (10 mg/ml) und 2 eq. Bolton-Hunter Reagenz der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) zusammen (2 eq. = 210,56 μg = 21,06 μl einer Lösung von 10 mg/ml in DMF). Nach einstündiger Inkubationszeit wurden jeweils 500 μl des Markierungsansatzes auf zwei Iodogen-Tubes der Firma Perbio (Bonn, Deutschland) aufgeteilt und mit 0,1 mCi I^{131} versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 5-10 Minuten wurde das Reaktionsprodukt über Sephadex G25 PD-10-Säule der Firma GE Healthcare (München, Deutschland) in 1,5 M NaCl aufgereinigt. Im Anschluss wurde das gereinigte Produkt dreimal gegen Wasser dialysiert. Die Konzentrationsbestimmung mittels CuSO_4 -Test ergab eine PEI-Endkonzentration von $c = 1,49$ mg/ml. Mittels Radioaktivmessung wurde eine spezifische Aktivität von 16898 CPM/ μg ermittelt.

2.3. Zellkultur

2.3.1. Humane Keratinozyten

Primäres Hautgewebe wurde von der Abteilung Plastische und Handchirurgie der Universitätsklinik Freiburg (Ärztlicher Direktor: Professor Dr. G. B. Stark) und der Abteilung für Plastische- und Wiederherstellungschirurgie der Technischen Universität München (Vorstand: Professor Dr. E. Biemer) mit Einverständnis der Patienten für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt. Das im Rahmen plastischer Operationen gewonnene Hautgewebe wurde unter sterilen Bedingungen sorgfältig von Fett- und Dermisanteilen befreit. Das verbleibende Gewebe wurde in 2-3 cm breite Streifen geschnitten und für maximal 1 Minute in 70 % Ethanol desinfiziert. Danach wurden die Hautstreifen zweimal für wenige Minuten in PBS gewaschen und im Anschluss über Nacht bei 4 °C in 0,5 % Dispase-Lösung (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) inkubiert. Am Folgetag wurde die Epidermis vorsichtig vom restlichen Dermisanteil des Hautgewebes abgetrennt und für 30 Minuten bei 37 °C in Trypsin-EDTA (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) inkubiert. Nach Inkubationszeit wurde die Epidermis/Trypsin-Mischung in 10 % (v/v) fötales Kälberserum der Firma PAA (Linz, Österreich) überführt und kräftig resuspendiert. Durch Filtration der Mischung durch ein Zellsieb der Firma BD Biosciences Discovery Labware (Bedford, MA, USA) mit einer Porengröße von 70 µm wurden humane Keratinozyten als Einzelzellsuspension von restlichen Epidermisstrukturen abgetrennt und unter Zellkulturbedingungen kultiviert. Für die Zellkultur wurde das serumfreie Zellkulturmedium Keratinocyte-SFM COMBO der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) mit Rinderhypophysenextrakt als beigefügter Mediumzusatz und 0,3 % Gentamicin (m/v) mit dem Handelsnamen Refobacin 120 der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Humane Keratinozyten wurden unter Standardbedingungen bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ im Brutschrank der Firma Thermo Quest (Egelsbach, Deutschland) inkubiert. Die in Versuchen eingesetzten Keratinozytenkulturen wurden jeweils nach der 2. Passage verwendet.

2.3.2. Zelllinien

NIH/3T3 Zellen (murine embryonale Fibroblasten) der Firma LGC Promochem (Wesel, Deutschland) wurden unter Standardbedingungen in Dublecco's Modified Eagle's Medium der Firma Biochrom (Berlin, Deutschland) mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum der Firma PAA (Linz, Österreich), 100 U/ml Penicillin der Firma Biochrom (Berlin, Deutschland) und 100 µg/ml Streptomycin der Firma Biochrom (Berlin, Deutschland) kultiviert.

HEK 293 Zellen sind mit Adenovirus 5 transformierte humane embryonale Nierenzellen (*human embryonic kidney cells*) epithelialen Ursprungs [167] und wurden unter Standardbedingungen in Dublecco's Modified Eagle's Medium der Firma Biochrom (Berlin, Deutschland) mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum der Firma PAA (Linz, Österreich), 100 U/ml Penicillin der Firma Biochrom (Berlin, Deutschland) und 100 µg/ml Streptomycin der Firma Biochrom (Berlin, Deutschland) kultiviert.

Beide Zelllinien wurden unter Standardbedingungen bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ im Brutschrank der Firma Thermo Quest (Egelsbach, Deutschland) inkubiert.

2.4. *In vitro* Transfektion

In Vertiefungen von 96-Loch-Zellkulturplatten wurden 24 Stunden vor Transfektion 7000 humane Keratinozyten in 200 µl Zellkulturmedium Keratinocyte-SFM COMBO mit Rinderhypophysenextrakt als beigefügter Mediumzusatz und 0,3 % Gentamicin (m/v) ausplattiert. Am Tag der Transfektion wurde der Zellkulturüberstand durch 150 µl frisches Zellkulturmedium ersetzt. Ungeschützte Genvektoren bestehend aus PEI 25 bzw. PEI 22 und der Plasmid-DNA pB-luc sowie geschützte Genvektoren bestehend aus PEI 25 bzw. PEI 22, der Plasmid-DNA pB-luc und dem Schutzpolymer P6YE5C wurden mit N/P-Ratios von 4, 6, 8 und 10 formuliert und als isotone Lösung dem Zellkulturüberstand in einem Applikationsvolumen von 50 µl beigemischt. Für die Transfektion wurden Plasmid-Mengen von 0,25; 0,5; 1 und 2 µg pB-luc eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden unter Standardbedingungen bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ im Brutschrank wurde der Zellkulturüberstand durch 200 µl frisches Zellkulturmedium ersetzt und weiter kultiviert. Die Bestimmung der Luciferase-Expression erfolgte 24 Stunden nach der Transfektion.

2.5. *In vitro* Transfektion nach Vorinkubation

In die Vertiefungen von 96-Loch-Zellkulturplatten wurden 24 Stunden vor Transfektion 7000 humane Keratinozyten in 200 μ l Zellkulturmedium Keratinocyte-SFM COMBO mit Rinderhypophysenextrakt als beigefügter Mediumzusatz und 0,3 % Gentamicin (m/v) ausplattiert. Am Tag der Transfektion wurde der Zellkulturüberstand durch 150 μ l frisches Zellkulturmedium ersetzt. Ungeschützte Genvektoren bestehend aus PEI 25 und der Plasmid-DNA pB-luc sowie geschützte Genvektoren bestehend aus PEI 25, der Plasmid-DNA pB-luc und dem Schutzpolymer P6YE5C wurden mit einer N/P-Ratio von 8 formuliert und mit wässrigen Lösungen von Fibrinogen (Inkubationslösung 1 [$c = 100$ mg/ml]), Haptid (Inkubationslösung 2 [$c = 8,31$ mg/ml]; $M = 2634,1$ g/Mol) und Pefabloc FG (Inkubationslösung 3 [$c = 1,53$ mg/ml]; $M = 485,5$ g/Mol) vorinkubiert. Dafür wurden Genvektoren mit einer Plasmid-Menge von 63,75 μ g pB-luc in 1446 μ l Wasser mit 100 μ l der jeweiligen Inkubationslösung versetzt und für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde der Inkubationsansatz mit 48 μ l NaCl-Lösung (5M) als isotone Lösung (150 mM) eingestellt. Danach wurden 50 μ l Inkubationsansatz und einer Plasmid-Menge von 2 μ g pB-luc dem Zellkulturüberstand beigemischt. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden unter Standardbedingungen bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ im Brutschrank wurde der Zellkulturüberstand durch 200 μ l frisches Zellkulturmedium ersetzt und weiter kultiviert. Die Bestimmung der Luciferase-Expression erfolgte neben der Bestimmung der Proteinkonzentration 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion.

2.6. Genaktivierte Fibrin(ogen) Matrix

Für die Transfektion humaner Keratinozyten in genaktivierter Fibrin(ogen) Matrix wurde der Zweikomponenten-Fibrinkleber Tissucol-Kit der Firma Baxter (Heidelberg, Deutschland) verwendet. Der Zweikomponentenkleber setzte sich aus lyophilisiertem Fibrinogen und Aprotinin als Lösungsmittel ($c_{\text{Aprotinin}} = 3000$ KIE/ml Rinderalbumin), sowie aus lyophilisiertem Thrombin und Calciumchlorid als Lösungsmittel ($c_{\text{CaCl}_2} = 5,88$ mg/ml) zusammen. Fibrinogen-Lösung wurde mit einer Konzentration von $c_{\text{Fibrinogen}} = 100$ mg/ml und Thrombin-Lösung mit einer Konzentration von $c_{\text{Thrombin}} = 500$ IE/ml verwendet. Zum Verdünnen der Thrombin-Lösung wurde ein Puffer der Firma Baxter eingesetzt, der die physiologische Zusammensetzung der Thrombin-Lösung trotz Verdünnung konstant hielt. Die genaue Zusammensetzung des Puffers wurde von der Firma Baxter nicht bekannt gegeben.

2.6.1. Genvektoren in Fibrinogen-Lösung

Ungeschützte Genvektoren bestehend aus PEI 22 und der Plasmid-DNA pTracer-GFP-EGF bzw. pWRG1630-EGF wurden mit einer N/P-Ratio von 6 nach Angaben des Herstellers (ExGen 500) formuliert. Zusätzlich wurden geschützte Genvektoren bestehend aus PEI 25, der Plasmid-DNA pWRG1630-EGF und dem Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 8 hergestellt. Mit 150 μ l der jeweiligen Genvektor-Formulierungen und einer Plasmid-Menge von 10 μ g pTracer-GFP-EGF bzw. pWRG1630-EGF wurden 200 000 humane Keratinozyten suspendiert und mit 150 μ l Fibrinogen-Lösung ($c_{\text{Fibrinogen}} = 100 \text{ mg/ml}$) gemischt. Der Ansatz wurde in die Vertiefungen einer 24-Loch Zellkulturplatte überführt und durch die Zugabe von 300 μ l Thrombin-Lösung ($c_{\text{Thrombin}} = 250 \text{ IE/ml}$) zur genaktivierten Fibrin(ogen) Matrix polymerisiert (s. Abb. 4). Nach einer Polymerisationszeit von 30 Minuten wurden die ausgehärteten Fibringerinnsel mit 1 ml Zellkulturmedium Keratinocyte-SFM COMBO mit Rinderhypophysenextrakt als beigefügter Mediumzusatz und 0,3 % Gentamicin (m/v) überschichtet und unter Standardbedingungen bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Über einen Zeitraum von 7 bzw. 8 Tagen wurde mittels ELISA täglich die EGF-Konzentration in den Versuchsüberständen bestimmt. Nach Transfektionen mit Plasmid-DNA pTracer-GFP-EGF erfolgte an den ersten drei Auswertungstagen zusätzlich eine qualitative Bestimmung von *green fluorescent protein* (GFP) durch Detektion von GFP-Fluoreszenz im Mikroskop Axiovert 135 der Firma Zeiss (Jena, Deutschland). Dokumentiert wurde GFP-Expression mit digitalen Aufnahmen der Kamera AxioCam MRc der Firma Zeiss (Jena, Deutschland).

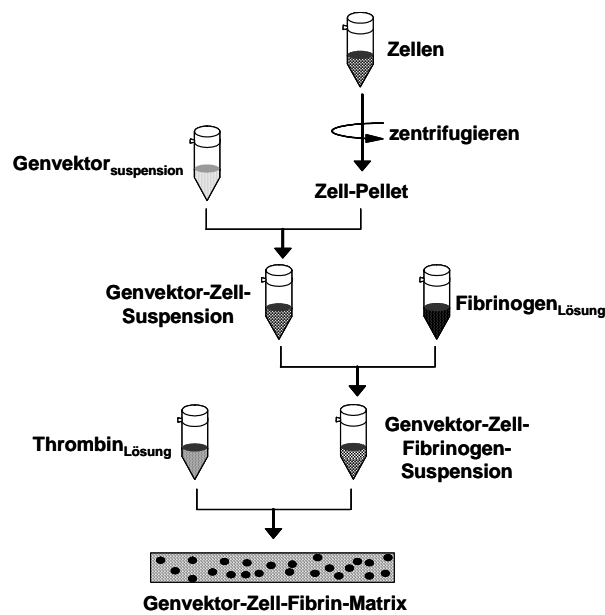


Abbildung 4: Herstellung einer Genaktivierten Fibrin(ogen) Matrix bestehend aus Genvektoren, Zellen und Fibrinogen-Lösung. Die formulierte Genvektor-Suspension wurde zunächst mit der entsprechenden Anzahl Zellen und im Anschluss mit Fibrinogen-Lösung gemischt. Die entstandene Genvektor-Zell-Fibrinogen-Suspension wurde durch die Zugabe von Thrombin-Lösung zur Genaktivierten Fibrin(ogen) Matrix polymerisiert.

2.6.2. Genvektoren in Fibrinogen-Lyophilisat

Ungeschützte Genvektoren bestehend aus PEI 22 und Plasmid-DNA mit einer N/P-Ratio von 6, geschützte Genvektoren bestehend aus PEI 22, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 6 sowie geschützte Genvektoren bestehend aus PEI 25, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 8 wurden in Wasser formuliert und jeweils mit einer Plasmid-Konzentration von $c_{\text{Plasmid}} = 200 \mu\text{g/ml}$ mit Fibrinogen-Lösung ($c_{\text{Fibrinogen}} = 100 \text{ mg/ml}$) gemischt. Als Plasmid-DNA wurde pWRG-1630-hEGF zur Expression des Wachstumsfaktors *epidermal growth factor* (EGF) eingesetzt. Durch Gefriertrocknung wurde den Mischungen das Wasser entzogen. Im Anschluss wurden die Lyophilisate bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Zum Zeitpunkt der Transfektion wurden die genaktivierten Fibrinogen-Lyophilisate mit Wasser rehydratisiert und mit einer Fibrinogen-Konzentration von $c_{\text{Fibrinogen}} = 100 \text{ mg/ml}$ bereitgestellt. Danach wurden $8 \mu\text{l}$ Thrombin-Lösung ($c_{\text{Thrombin}} = 500 \text{ IE/ml}$) in die Vertiefungen einer 24-Loch-Zellkulturplatte überführt. Anschließend wurden 20 000, 50 000, 100 000 und 200 000 humanen Keratinozyten in jeweils $17 \mu\text{l}$ Zellkulturmedium suspendiert mit $25 \mu\text{l}$ rehydratisierter Fibrinogenlösung gemischt und den vorgelegten $8 \mu\text{l}$ Thrombin-Lösung hinzugefügt (s. Abb. 5). Nach einer Polymerisationszeit von 30 Minuten wurden die ausgehärteten Fibringerinnsel mit 1 ml

Zellkulturmedium Keratinocyte-SFM COMBO mit Rinderhypophysenextrakt als beigefügter Mediumzusatz und 0,3 % Gentamicin (m/v) überschichtet und unter Standardbedingungen bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurde täglich mittels ELISA die EGF-Konzentration in den Versuchüberständen bestimmt.

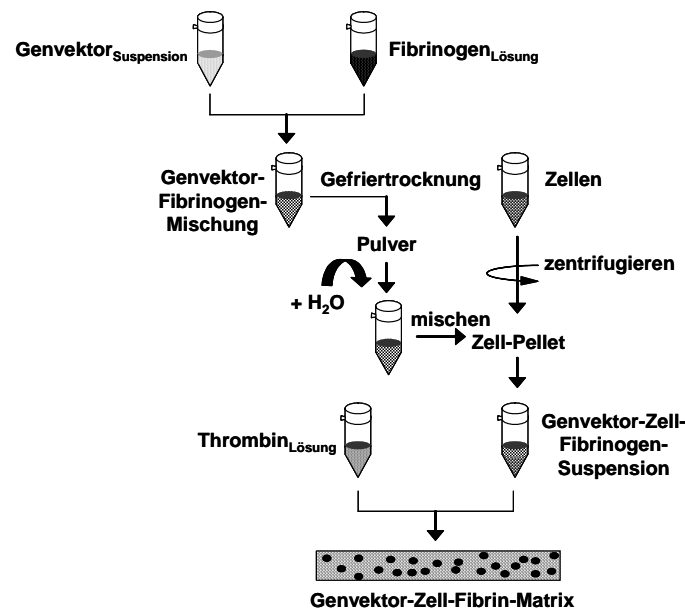


Abbildung 5: Herstellung einer Genaktivierten Fibrin(ogen) Matrix bestehend aus einem Genvektor-Fibrinogen-Lyophilisat. Die formulierte Genvektor-Suspension wurde zunächst mit Fibrinogen-Lösung gemischt und im Anschluss gefriergetrocknet. Das entstandene Genvektor-Fibrinogen-Lyophilisat wurde zum Versuchszeitpunkt mit Wasser rehydratisiert und mit der entsprechenden Anzahl Zellen gemischt. Die entstandene Genvektor-Zell-Fibrinogen-Suspension wurde durch die Zugabe von Thrombin-Lösung zur Genaktivierten Fibrin(ogen) Matrix polymerisiert.

2.7. Laser Scanning Mikroskopie

Ungeschützte Genvektoren bestehend aus PEI 22 und der Plasmid-DNA pGeneGrip-GFP wurden mit einer N/P-Ratio von 6 nach Angaben des Herstellers (ExGen 500) formuliert. Mit 75 µl der Genvektor-Formulierung und einer Plasmid-Menge von 5 µg pGeneGrip-GFP wurden 100 000 humane Keratinozyten suspendiert und mit 75 µl Fibrinogen-Lösung ($c_{\text{Fibrinogen}} = 100 \text{ mg/ml}$) gemischt. Der Ansatz wurde in die Vertiefungen eines *chambered coverglass* der Firma Nunc (Wiesbaden, Deutschland) überführt und durch die Zugabe von 150 µl Thrombin-Lösung ($c_{\text{Thrombin}} = 250 \text{ IE/ml}$) zur genaktivierten Fibrin(ogen) Matrix polymerisiert. Nach einer Polymerisationszeit von 30 Minuten wurden die ausgehärteten Fibringerinnsel mit 1 ml Zellkulturmedium Keratinocyte-SFM COMBO mit Rinderhypophysenextrakt als beigefügter Mediumzusatz und 0,3 % Gentamicin (m/v)

überschichtet und unter Standardbedingungen bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Über einen Zeitraum von 48 Stunden wurde die rote Rhodamin-Fluoreszenz der Plasmid-Markierung von pGeneGrip-GFP sowie die grüne GFP-Fluoreszenz zu den Zeitpunkten 0, 4, 24 und 48 Stunden nach Formulierung der genaktivierten Fibrin(ogen) Matrix im konfokalen Laser-Scanning Mikroskop LSM 410 der Firma Zeiss (Jena, Deutschland) mit Laser-Wellenlängen von 488 nm, 546 nm und 633 nm detektiert und dokumentiert. Rhodamin-Fluoreszenz wurde mit der Laserwellenlänge von 546 nm angeregt und bei einer Emissionswellenlänge von 575 nm detektiert. GFP-Fluoreszenz wurde mit der Laserwellenlänge von 488 nm angeregt und bei einer Emissionswellenlänge von 510 nm detektiert. Unter Verwendung der Software LSM 5 der Firma Zeiss (Jena, Deutschland) wurden digitale Aufnahmen 2- und 3-dimensional dargestellt und analysiert.

2.8. Genaktivierte Oberflächen aus PDLLA und PLGA

2.8.1. Beschichtungen in 96-Loch-Zellkulturplatten

Geschützte Genvektoren bestehend aus PEI 25, der Plasmid-DNA pB-luc und dem Schutzpolymer P6YE5C wurden mit einer N/P-Ratio von 8 formuliert, in einen zylindrischen Glashomogenisator (10 ml) der Firma Schütt Labortechnik (Göttingen, Deutschland) überführt und in einer Mischung aus Ethanol und Trockeneis tiefgefroren. Nach Gefriertrocknung wurden lyophilisierte Genvektoren nach Zugabe von Ethylacetat gleichmäßig mit einem Teflon-Pistill der Firma Schütt Labortechnik (Göttingen, Deutschland) dispergiert und mit den Plasmid-Konzentrationen von 0,4; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125; 0,00625; 0,003125 µg/µl bereitgestellt. PDLLA und PLGA wurden mit den Konzentrationen 20, 40, 80 und 160 mg/ml in Ethylacetat gelöst. In einer 96-Loch-Zellkulturschale aus Polypropylen der Firma Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) wurden jeweils 25 µl Polymerlösung mit 25 µl Genvektor-Dispersion gemischt. Nach Verdampfen des Lösungsmittels und anschließender Hochvakuumtrocknung verblieben Polymerfilme aus 500, 1000, 2000 und 4000 µg PDLLA bzw. PLGA, die Genvektoren mit einer Plasmid-Menge von 0,078; 0,156; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5 und 10 µg pB-luc enthielten. Es wurden jeweils 7000 NIH/3T3 Zellen in 200 µl Zellkulturmedium Duplecco's Modified Eagle's Medium der Firma Biochrom (Berlin, Deutschland) appliziert und über den Kontakt mit geschützten Genvektoren transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurde, neben der Messung der metabolischen Aktivität, die Luciferase-Expression sowie die Proteinkonzentration transfizierter Zellen bestimmt.

2.8.2. Beschichtungen von Folien aus Aluminiumlegierung

Geschützte Genvektoren bestehend aus PEI 25, der Plasmid-DNA pB-luc bzw. pB-BMP-2 und dem Schutzpolymer P6YE5C wurden mit einer N/P-Ratio von 8 formuliert, in einen zylindrischen Glashomogenisator (10 ml) der Firma Schütt Labortechnik (Göttingen, Deutschland) überführt und in einer Mischung aus Ethanol und Trockeneis tiefgefroren. Nach Gefriertrocknung wurden lyophilisierte Genvektoren mit den Plasmid-Konzentrationen von 0,1; 0,2 und 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in 100 μl einer Lösung aus PDLLA in Ethylacetat mit der Konzentration von $c_{\text{PDLLA}} = 50 \text{ mg/ml}$ gleichmäßig mit einem Teflon-Pistill der Firma Schütt Labortechnik (Göttingen, Deutschland) dispergiert und auf eine Folie aus Aluminiumlegierung (\varnothing 16 mm) aufgetragen. Nach Verdampfen des Lösungsmittels und anschließender Hochvakuumtrocknung verblieben Polymerfilme aus 5000 μg PDLLA, die Genvektoren mit einer Plasmid-Menge von 10, 20 und 40 μg pB-luc bzw. pB-BMP-2 enthielten. Die beschichteten Folien wurden einzeln in die Vertiefungen einer 24-Loch-Zellkulturplatte überführt und mit 200 000 Zellen in 1 ml Zellkulturmedium Dublecco's Modified Eagle's Medium der Firma Biochrom (Berlin, Deutschland) besiedelt, die über den Kontakt mit geschützten Genvektoren transfiziert wurden. Transfektionen mit pB-luc wurden mit NIH/3T3 Zellen durchgeführt. Für Transfektion mit pB-BMP-2 wurden HEK 293 Zellen eingesetzt. Über einen Zeitraum von 7 Tagen wurde täglich Luciferase- bzw. BMP-2-Expression bestimmt.

2.9. Genaktivierte Oberflächen aus DTE05DT und DTE30DT

Geschützte Genvektoren bestehend aus PEI 25, der Plasmid-DNA pB-luc und dem Schutzpolymer P6YE5C wurden mit einer N/P-Ratio von 8 formuliert, in einen zylindrischen Glashomogenisator (10 ml) der Firma Schütt Labortechnik (Göttingen, Deutschland) überführt und in einer Mischung aus Ethanol und Trockeneis tiefgefroren. Nach Gefriertrocknung wurden lyophilisierte Genvektoren nach Zugabe von Chloroform/Isopropanol (v/v = 19/1) gleichmäßig mit einem Teflon-Pistill der Firma Schütt Labortechnik (Göttingen, Deutschland) dispergiert und mit den Plasmid-Konzentrationen von 0,4; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125; 0,00625; 0,003125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bereitgestellt. DTE05DT und DTE30DT [168] wurden mit den Konzentrationen 40 und 80 mg/ml in Chloroform/Isopropanol (v/v = 19/1) gelöst. Lösungen von PDLLA in Chloroform/Isopropanol (v/v = 19/1) mit den Konzentrationen 40 und 80 mg/ml wurden als Kontrolle eingesetzt. In einer 96-Loch-Zellkulturschale aus Polypropylen der Firma Greiner

Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) wurden jeweils 25 µl Polymerlösung-Lösung mit 25 µl Genvektor-Dispersion gemischt. Nach Verdampfen des Lösungsmittels und anschließender Hochvakuumtrocknung verblieben Polymerfilme aus 1000 und 2000 µg DTE05DT, DTE30DT bzw. PDLLA, die Genvektoren mit einer Plasmid-Menge von 0,078; 0,156; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5 und 10 µg pB-luc enthielten. Es wurden jeweils 7000 NIH/3T3 Zellen in 200 µl Dublecco's Modified Eagle's Medium der Firma Biochrom (Berlin, Deutschland) appliziert und über den Kontakt mit geschützten Genvektoren transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurde, neben der Messung der metabolischen Aktivität, die Luciferase-Expression sowie die Proteinkonzentration transfizierter Zellen bestimmt.

2.10. Durchflusszytometrie (FACS)

Geschützte Genvektoren bestehend aus PEI 25, der Plasmid-DNA pEGFP-N1 und dem Schutzpolymer P6YE5C wurden mit einer N/P-Ratio von 8 formuliert, in einen zylindrischen Glashomogenisator (10 ml) der Firma Schütt Labortechnik (Göttingen, Deutschland) überführt und in einer Mischung aus Ethanol und Trockeneis tiefgefroren. Nach Gefriertrocknung wurden lyophilisierte Genvektoren nach Zugabe von Ethylacetat gleichmäßig mit einem Teflon-Pistill der Firma Schütt Labortechnik (Göttingen, Deutschland) dispergiert und mit der Plasmid-Konzentration von 0,025 µg/µl bereitgestellt. PDLLA und PLGA wurden mit den Konzentrationen 40 und 80 mg/ml in Ethylacetat gelöst. In einer 96-Loch-Zellkulturschale aus Polypropylen der Firma Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) wurden jeweils 25 µl Polymerlösung-Lösung mit 25 µl Genvektor-Dispersion gemischt. Nach Verdampfen des Lösungsmittels und anschließender Hochvakuumtrocknung verblieben Polymerfilme aus 1000 und 2000 µg PDLLA bzw. PLGA, die Genvektoren mit einer Plasmid-Menge von 0,625 µg pEGFP-N1 enthielten. Es wurden jeweils 7000 NIH/3T3 Zellen in 200 µl Zellkulturmedium Dublecco's Modified Eagle's Medium der Firma Biochrom (Berlin, Deutschland) appliziert und über den Kontakt mit geschützten Genvektoren transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurden Zellen mit Trypsin-EDTA der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) von der genaktivierten Oberfläche abgelöst, 2 x mit einer Pufferlösung aus PBS, 1 % FCS und 0,02 % Na-Azid gewaschen und bis zur Messung der Transfektionseffizienz auf Eis gelagert. Propidiumjodid (PI) wurde zur Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen der Zellsuspension mit einer Endkonzentration von $c_{PI} = 1 - 0,1$ µg/ml beigemischt. Nach Verlust der Zell-Integrität

ist eine DNA-Färbung mit PI im Zellkern möglich. Der Prozentsatz an lebenden, transfizierten Zellen wurde mit dem Messgerät FACS Vantage der Firma BD Biosciences (San Jose, CA, USA) bestimmt. Die zu untersuchende Zellpopulation wurde aus einem Streudiagramm (vorwärts/seitwärts) ausgewählt. PI-Fluoreszenz als Maß für den Anteil toter Zellen wurde bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 585 ± 42 nm detektiert. GFP-Fluoreszenz als Maß für den Anteil transfizierter Zellen wurde bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 ± 30 nm detektiert. Die Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde jeweils mit 5000 Zellen durchgeführt.

2.11. Integrität Plasmid-DNA

Geschützte Genvektoren bestehend aus PEI 25, der Plasmid-DNA pB-luc und dem Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 8, dispergiert in Ethylacetat, wurden mit Plasmid-Mengen von 40, 20 bzw 7,5 µg pB-luc bei geöffnetem Deckel gelagert und bis zur Trockene eingedampft. Mit jeweils 500 µl Wasser wurden geschützte Genvektoren rehydratisiert. Ein Elektrophorese-Gel mit 0,6 % Agarose in 0,05 M NaOH und 1 mM EDTA wurde hergestellt und mit den wässrigen Lösungen der Genvektoren beladen. Dabei wurden Plasmid-Mengen von 800, 400 und 150 ng pB-luc appliziert. Frisch formulierte Genvektoren bestehend aus PEI 25, der Plasmid-DNA pB-luc und Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 8 wurden mit Plasmid-Mengen von 400 und 200 ng pB-luc neben 200 ng nackter Plasmid-DNA pB-luc als Kontrollgruppen eingesetzt. Nach Elektrophorese-Dauer von 30 Minuten bei 60 V in Gegenwart von Ethidiumbromid (EtBr) mit einer Konzentration von $c_{\text{EtBr}} = 0,5$ µg/ml wurde die Integrität von Plasmid-DNA nach Dispersion in Ethylacetat im UV-Licht untersucht.

2.12. Freisetzung von Plasmid-DNA und PEI 25

Geschützte Genvektoren bestehend aus I^{131} -markiertem PEI 25, der I^{125} -markierten Plasmid-DNA pB-luc und dem Schutzpolymer P6YE5C wurden mit einer N/P-Ratio von 8 formuliert, in einen zylindrischen Glashomogenisator (10 ml) der Firma Schütt Labortechnik (Göttingen, Deutschland) überführt und in einer Mischung aus Ethanol und Trockeneis tiefgefroren. Nach Gefriertrocknung wurden lyophilisierte Genvektoren nach Zugabe von Ethylacetat gleichmäßig mit einem Teflon-Pistill der Firma Schütt Labortechnik (Göttingen, Deutschland) dispergiert und mit den Plasmid-Konzentrationen von 0,025; 0,0125; 0,00625;

0,003125 µg/µl bereitgestellt. PDLLA und PLGA wurden mit den Konzentrationen 20, 40, 80 und 160 mg/ml in Ethylacetat gelöst. In einer 96-Loch-Zellkulturschale aus Polypropylen der Firma Greiner Bio-One (Frickenhäusen, Deutschland) wurden jeweils 25 µl Polymerlösung mit 25 µl Genvektor-Dispersion gemischt. Als interner Standard dienten 25 µl der jeweiligen Genvektor-Dispersion. Nach Verdampfen des Lösungsmittels und anschließender Hochvakuumtrocknung verblieben Polymerfilme aus 500, 1000, 2000 und 4000 µg PDLLA bzw. PLGA, die Genvektoren mit einer Plasmid-Menge von 0,625; 1,25; 2,5; 5 und 10 µg pB-luc enthielten. Überschichtet wurden die genaktivierten Oberflächen mit 200 µl Zellkulturmedium Dublecco's Modified Eagle Medium der Firma Biochrom (Berlin, Deutschland) und unter Zellkulturbedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 99 % Luftfeuchtigkeit für 4 Wochen im Brutschrank inkubiert. Nach 1, 2, 4, 24, 48, 72, 168, 240, 336, 504 und 672 Stunden Inkubationszeit wurden die Versuchsüberstände gesammelt und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Die Radioaktivität der einzelnen Versuchsüberstände wurde im Gamma Counter Wallac 1480 Wizard 3'' der Firma Perkin Elmer (Boston, MA, USA) bestimmt. Die kumulative Freisetzung von I¹²⁵-markierter Plasmid-DNA und I¹³¹-markiertem PEI 25 wurde prozentual zur eingesetzten Menge an Plasmid-DNA und PEI 25 dargestellt.

2.13. Bruchdehnung PLGA

Lösungen von Resomer RG 503 H (PLGA) in Ethylacetat bzw. Chloroform mit einer Konzentration von $c_{PLGA} = 120$ mg/ml und einem Zusatz von 0,01 % Methylviolett (m/v) wurden in einem Applikationsvolumen von 2 ml auf Aluminium-Flachstangen aus AlMgSiO mit einem Querschnitt von 20 x 2 mm und einer Länge von 130 mm aufgebracht. Die Flachstangen wurden als Zugproben zur Analyse der Eigenschaften von PLGA-Schichten unter Längendehnung in der Universalprüfmaschine Wolpert TZZ 707 der Firma Istron Wolpert (Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Die Messungen bis zum Versagen der Testkörper wurden mit Dehnungsmessstreifen EP-08-250 BG-120 W der Firma Measurement Group Messtechnik GmbH (Lochham/München, Deutschland) bei einer Prüfgeschwindigkeit von 10 mm/Min. durchgeführt. Die freie Einspannlänge der Proben betrug 105 mm. Nach erfolgter Bruchdehnung wurden die PLGA-Beschichtungen makroskopisch auf Oberflächenveränderungen untersucht.

2.14. Zellproliferation

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurde des Tetrazoliumsals WST[®]-1 der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) eingesetzt. Mit 10 µl Applikationsmenge pro 100 µl Zellkulturüberstand wurde WST[®]-1 verwendet. Als Kulturmediumzusatz wird WST[®]-1 durch mitochondriale Dehydrogenasen aktiver Zellen gespalten. Nach Inkubationszeiten von 3 bzw. 4 Stunden entstand dunkelrotes Formazan, dessen Konzentration bei einer Wellenlänge von 450 nm im Multilabel Counter Wallac Victor² 1420 der Firma Perkin Elmer (Boston, MA, USA) kolorimetrisch bestimmt wurde. Gegen Referenzmessung bei einer Wellenlänge von 590 nm wurde die gemessene Formazan-Konzentration direkt mit der Zahl metabolisch aktiver Zellen ins Verhältnis gesetzt. Die metabolische Aktivität transfizierter Zellen wurde prozentual zur metabolischen Aktivität untransfizierter Zellen dargestellt, deren metabolische Aktivität mit 100 % gewertet wurde.

2.15. Proteinkonzentration

Zum Messzeitpunkt wurden transfizierte Zellen wie in Finsinger et al. [75] beschrieben mit PBS gewaschen und danach mit 0,1 % Triton-X in 250 mM Tris bei einem pH-Wert von 7,8 lysiert. Zellen in 96- bzw. 24-Loch-Zellkulturplatten wurden mit 100 bzw. 400 µl Lysepuffer versetzt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration im Zelllysate wurde der Bio-Rad Protein Assay Kit II der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) basierend auf der Methode von Bradford et al. (1976 Bradford) eingesetzt. Für die Bestimmung der Proteingesamtmenge richtete man sich nach dem Protokoll des Herstellers. In einer durchsichtigen 96-Loch-Zellkulturplatte der Firma TPP (Trasadingen, Schweiz) wurden dafür 10 µl Zelllysate und 150 µl Wasser mit 40 µl Bio-Rad Protein Assay Reagenz versetzt, geschüttelt und für 5 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde die Absorption der Proben mit dem Multilabel Counter Wallac Victor² 1420 der Firma Perkin Elmer (Boston, MA, USA) bei einer Wellenlänge von 590 nm gemessen. Bovines Serum Albumin mit der Bezeichnung „Protein Standard II“ der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) wurde zum Erstellen einer Eichkurve verwendet.

2.16. Luciferase-Expression

Zum Messzeitpunkt wurden transfizierte Zellen wie in Finsinger et al. [75] beschrieben mit PBS gewaschen und danach mit 0,1 % Triton-X in 250 mM Tris bei einem pH-Wert von 7,8 lysiert. Zellen in 96- bzw. 24-Loch-Zellkulturplatten wurden mit 100 bzw. 400 µl Lysepuffer versetzt. Zur Bestimmung der Biolumineszenz wurden 50 µl Zellysate in schwarze 96-Loch-Zellkulturplatten der Firma Corning Incorporated (New York, USA) überführt, mit 100 µl Substrat-Puffer Luciferase Assay System der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) versetzt und im Microplate Scintillation Counter TopCount der Firma Canberra Packard (Dreieich, Deutschland) vermessen. Luciferase wurde in Picogramm pro Gesamtzellzahl bzw. in Picogramm pro Milligramm Protein dargestellt. Rekombinante Luciferase der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) wurde in definierten Konzentrationen als Standardsubstanz zum Erstellen einer Eichgeraden eingesetzt.

2.17. EGF Expression

Die Expression des Wachstumsfaktors *epidermal growth factor* (EGF) wurde mittels ELISA in Zellkulturüberständen bestimmt. Dafür wurden in die Vertiefungen einer durchsichtigen 96-Loch-Zellkulturplatte mit flachem Boden der Firma TPP (Trasadingen, Schweiz) jeweils 100 µl einer Lösung des monoklonalen Antikörpers MAB 236 der Firma R & D (Minneapolis, USA) in PBS und 0,02 % (m/v) Natrium-Azid mit einer Konzentration von 1,25 µg/ml überführt und für 16-20 Stunden bei 4 °C inkubiert. Danach wurden 300 µl einer Lösung aus Blotting-Grade Blocker der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) in PBS und 0,02 % (m/v) Na-Azid mit einer Konzentration von 50 mg/ml in die vorinkubierten Vertiefungen der 96-Loch-Zellkulturplatte gegeben und für weitere 16-20 Stunden bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Vertiefungen 4 x mit 300 µl einer 1 %-igen (m/v) Lösung von bovinem Serum Albumin in PBS gewaschen. Für die Bestimmung von *epidermal growth factor* (EGF) in den Versuchsansätzen, wurden jeweils 200 µl der Zellkulturüberstände in die Vertiefungen der beschichteten 96-Loch-Zellkulturplatte überführt und für 16-20 Stunden bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Vertiefungen 4 x mit 300 µl einer 1 %-igen (m/v) Lösung von bovinem Serum Albumin in PBS gewaschen. Der Polyklonale Antikörper sc-275 der Firma Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) wurde in einer Konzentration von 0,96 µg/ml in PBS und 3 % (m/v) BSA gelöst. Mit 100 µl sc-275-Lösung wurden die Vertiefungen für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 3 x mit 300 µl einer 1 %-igen (m/v) Lösung von bovinem Serum Albumin in PBS gewaschen. Mit 100 µl des

Antikörpers sc-2004 der Firma Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) in PBS und 5 % (m/v) Blotting-Grade Blocker der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) mit einer Konzentration von 0,11 µg/ml wurden die Vertiefungen im Anschluss für 1,5 Stunden inkubiert. Danach wurden die Vertiefungen 4 x mit 300 µl einer 0,1 %-igen (m/v) Lösung von Tergitol NP 40 in Wasser gewaschen. Mit 100 µl TMB-Peroxidase-Komplex des TMB Peroxidase EIA Substrate Kits der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) wurde eine Farbreaktion ausgelöst. Nach 4-8 Minuten Inkubationszeit wurden die Vertiefungen mit 100 µl H₂SO₄ (1N) versetzt. Innerhalb 30 Minuten wurde die optische Dichte der Versuchsansätze bei einer Wellenlänge von 450 nm mit dem Multilabel Counter Wallac Victor² 1420 der Firma Perkin Elmer (Boston, MA, USA) bestimmt. Eine weitere Messung der optischen Dichte bei 570 nm diente als Korrekturmessung. Zum Erstellen einer Eichgeraden, wurde rekombinantes humanes EGF der Firma R & D (Minneapolis, USA) als Standardsubstanz eingesetzt.

2.18. BMP-2 Expression

Die Expression des Wachstumsfaktors *bone morphogenic protein-2* (BMP-2) wurde mittels ELISA Quantikine BMP-2 Immunoassay der Firma R & D (Minneapolis, USA) in Zellkulturüberständen bestimmt. Für die Bestimmung der BMP-2-Konzentration wurden 200 µl Zellkulturüberstand eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die optische Dichte der Versuchsansätze wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm mit dem Multilabel Counter Wallac Victor² 1420 der Firma Perkin Elmer (Boston, MA, USA) bestimmt. Eine weitere Messung der optischen Dichte bei 570 nm diente als Korrekturmessung. Zum Erstellen einer Eichgeraden, wurde rekombinantes humanes BMP-2 der Firma R & D (Minneapolis, USA) als Standardsubstanz eingesetzt.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung Genvektoren

3.1.1. Ungeschützte und geschützte Genvektoren mit PEI 25

Genvektoren bestehend aus PEI 25 und Plasmid-DNA wurden in unterschiedlichen Formulierungen zur Transfektion von 7000 humanen Keratinozyten eingesetzt. Genvektoren wurden durch die Wahl der N/P-Ratios von 4, 6, 8 und 10, sowie durch An- und Abwesenheit des Schutzpolymers P6YE5C variiert. Bezogen auf die negative Ladung der eingesetzten Plasmid-DNA wurden geschützte Genvektoren mit 3 Ladungsäquivalenten des Schutzpolymers P6YE5C formuliert. Geschützte Genvektoren bestehend aus PEI 25, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C wurden in Effektivität und Toxizität den ungeschützten Genvektoren bestehend aus PEI 25 und Plasmid-DNA gegenübergestellt. Genvektoren mit der Plasmid-Menge von 0,25; 0,5; 1 und 2 μg pB-luc zur Expression von Luciferase wurden für die Transfektion von 7000 humanen Keratinozyten eingesetzt (s. Abb. 6).

Bei einer N/P-Ratio von 4 (Abb. 6 A) konnten ungeschützte und geschützte Genvektoren mit Plasmid-Mengen bis zu 2 μg pB-luc eingesetzt werden, ohne dabei die metabolische Aktivität der transfizierten Keratinozyten zu beeinflussen. Ab einer Plasmid-Menge von 2 μg pB-luc wurde Luciferase-Expression detektiert, die nach dem Einsatz ungeschützter Genvektoren im Vergleich zu geschützten Genvektoren höher ausfiel.

Der Einsatz von Genvektoren mit einer N/P-Ratio von 6 (s. Abb. 6 B) zeigte eine Abhängigkeit zwischen der Plasmid-Menge und der metabolischen Aktivität transfizierter Keratinozyten. Die Steigerung der Plasmid-Menge auf 2 μg pB-luc, führte nach Transfektion mit ungeschützten Genvektoren zu einem Rückgang der metabolischen Aktivität auf ca. 60 %. Nach Transfektion mit geschützten Genvektoren zeigte sich die metabolische Aktivität gegenüber ungeschützten Formulierungen leicht erhöht. Die reduzierte Toxizität geschützter Genvektoren nahm bei einer N/P-Ratio von 6 keinen Einfluss auf die Luciferase-Expression. Ungeschützte und geschützte Genvektoren zeigten nach Steigerung der Plasmid-Menge auf 2 μg pB-luc einen kontinuierlichen Anstieg der Luciferase-Expression.

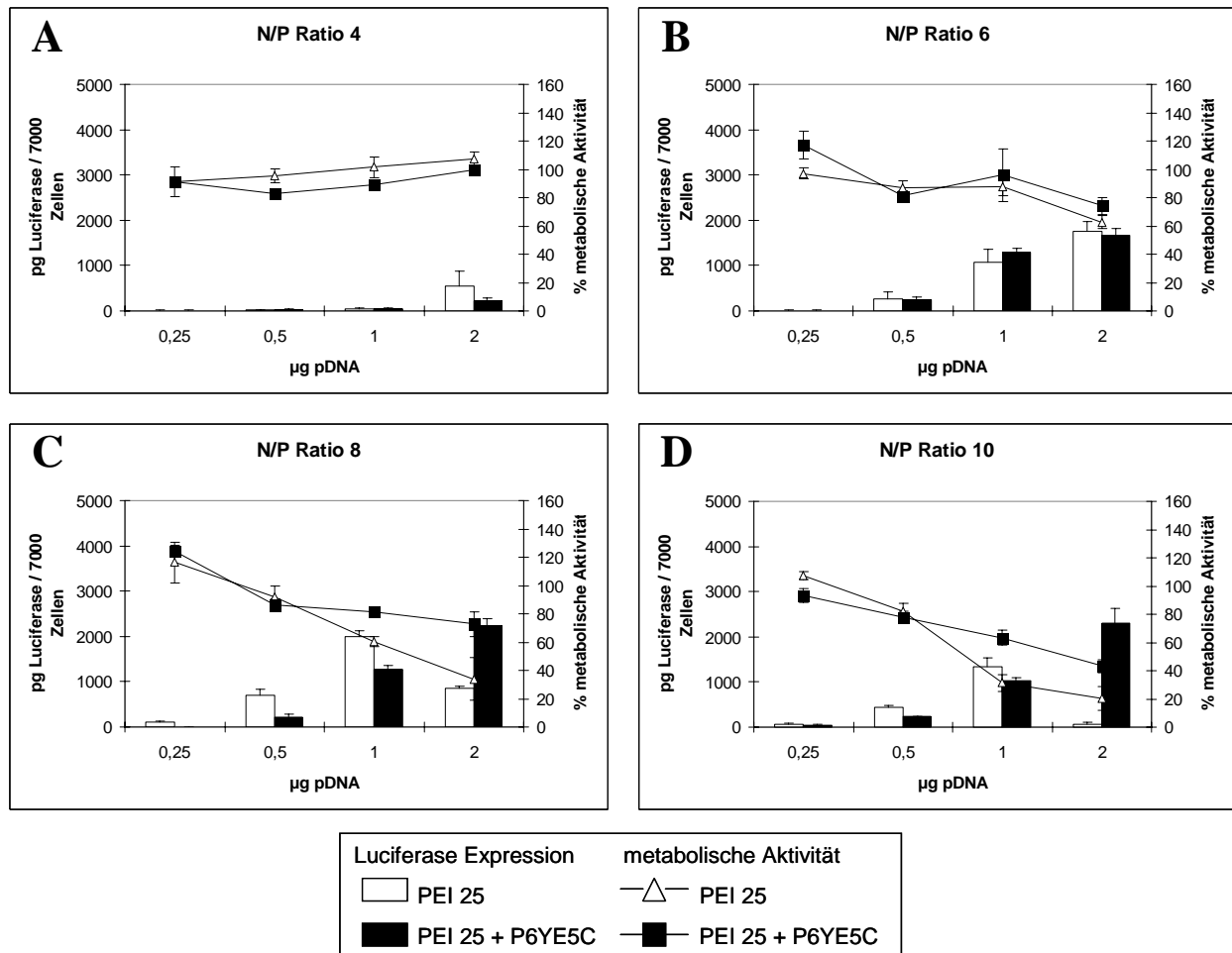


Abbildung 6: Darstellung der Luciferase-Expression und der metabolischen Aktivität humaner Keratinozyten nach Transfektion mit ungeschützten Genvektoren bestehend aus PEI 25 und Plasmid-DNA sowie mit geschützten Genvektoren bestehend aus PEI 25, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C. Genvektoren wurden mit einer N/P Ratio von 4 (A), 6 (B), 8 (C) und 10 (D) eingesetzt. Für die Transfektion von 7000 humanen Keratinozyten wurden Genvektoren mit Plasmid-Mengen von 0,25; 0,5; 1 und 2 µg pB-luc zur Expression von Luciferase eingesetzt. Die Luciferase-Expression 24 Stunden nach Transfektion wurde in Balken dargestellt (Skalierung in linker y-Achse). Die metabolische Aktivität transfizierter Zellen nach einer 4-stündigen Inkubation mit dem Zellproliferationsassay WST[®]-1 (Roche, Mannheim, D) wurde prozentual zur metabolischen Aktivität nicht-transfizierter Zellen in Linien dargestellt (Skalierung in rechter y-Achse). Aus identischen Versuchsansätzen in dreifacher Ausführung wurden Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet.

Bei einer N/P-Ratio von 8 (s. Abb. 6 C) zeigten ungeschützte und geschützte Genvektoren deutliche Unterschiede im Transfektionsverhalten humaner Keratinozyten. Die Steigerung der Plasmid-Menge auf 2 µg pB-luc führte mit ungeschützten Genvektoren zu einem Rückgang der metabolischen Aktivität auf ca. 30 %. Dagegen reduzierten geschützte Genvektoren die metabolische Aktivität transfizierter Zellen deutlich geringer. Bei einer N/P-Ratio von 8 wurde nach Transfektion mit ungeschützten Genvektoren bis zu einer Plasmid-Menge von 1 µg pB-luc eine Steigerung der Luciferase-Expression beobachtet. Gegenüber Genvektor-Formulierungen mit N/P-Ratios von 4 und 6, wurde insgesamt eine höhere Luciferase-Expression erzielt. Eine weitere Steigerung der Plasmid-Menge auf 2 µg pB-luc verursachte

einen Rückgang der Luciferase-Expression. Die Toxizität der ungeschützten Genvektoren in hoher Konzentration mit einer Plasmid-Menge von 2 µg pB-luc limitierte einen weiteren Anstieg der Luciferase-Expression. Geschützte Genvektoren mit einer N/P-Ratio von 8 zeigten nach kontinuierlicher Steigerung der Plasmid-Menge auf 2 µg pB-luc auch eine kontinuierliche Steigerung der Luciferase-Expression, die nicht durch die Toxizität der Genvektor-Formulierung beeinflusst wurde.

Ungeschützte Genvektoren mit einer N/P-Ratio von 10 (s. Abb. 6 D) zeigten gegenüber Genvektoren mit einer N/P-Ratio von 8 vergleichbare Abhängigkeiten zwischen Toxizität und Luciferase-Expression, bei einer stärker verringerten metabolischen Aktivität und Luciferase-Expression. Geschützte Genvektoren mit einer N/P-Ratio von 10 (s. Abb. 6 D) zeigten gegenüber Genvektoren mit einer N/P-Ratio von 8 (s. Abb. 6 C) eine reduzierte metabolischen Aktivität bei einer vergleichbaren Luciferase-Expression.

3.1.2. Ungeschützte und geschützte Genvektoren mit PEI 22

In analogen Versuchen wurden Genvektoren bestehend aus PEI 22 und Plasmid-DNA in unterschiedlichen Formulierungen zur Transfektion von 7000 humanen Keratinozyten eingesetzt. Genvektoren wurden durch die Wahl der N/P-Ratios von 4, 6, 8 und 10, sowie durch An- und Abwesenheit des Schutzpolymers P6YE5C variiert. Bezogen auf die negative Ladung der eingesetzten Plasmid-DNA wurden geschützte Genvektoren mit 3 Ladungsäquivalenten Schutzpolymers P6YE5C formuliert. Geschützte Genvektoren bestehend aus PEI 22, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C wurden in Effektivität und Toxizität den ungeschützten Genvektoren bestehend aus PEI 22 und Plasmid-DNA gegenübergestellt. Genvektoren mit der Plasmid-Menge von 0,25; 0,5; 1 und 2 µg pB-luc zur Expression von Luciferase wurden für die Transfektion von 7000 humanen Keratinozyten eingesetzt (s. Abb. 7).

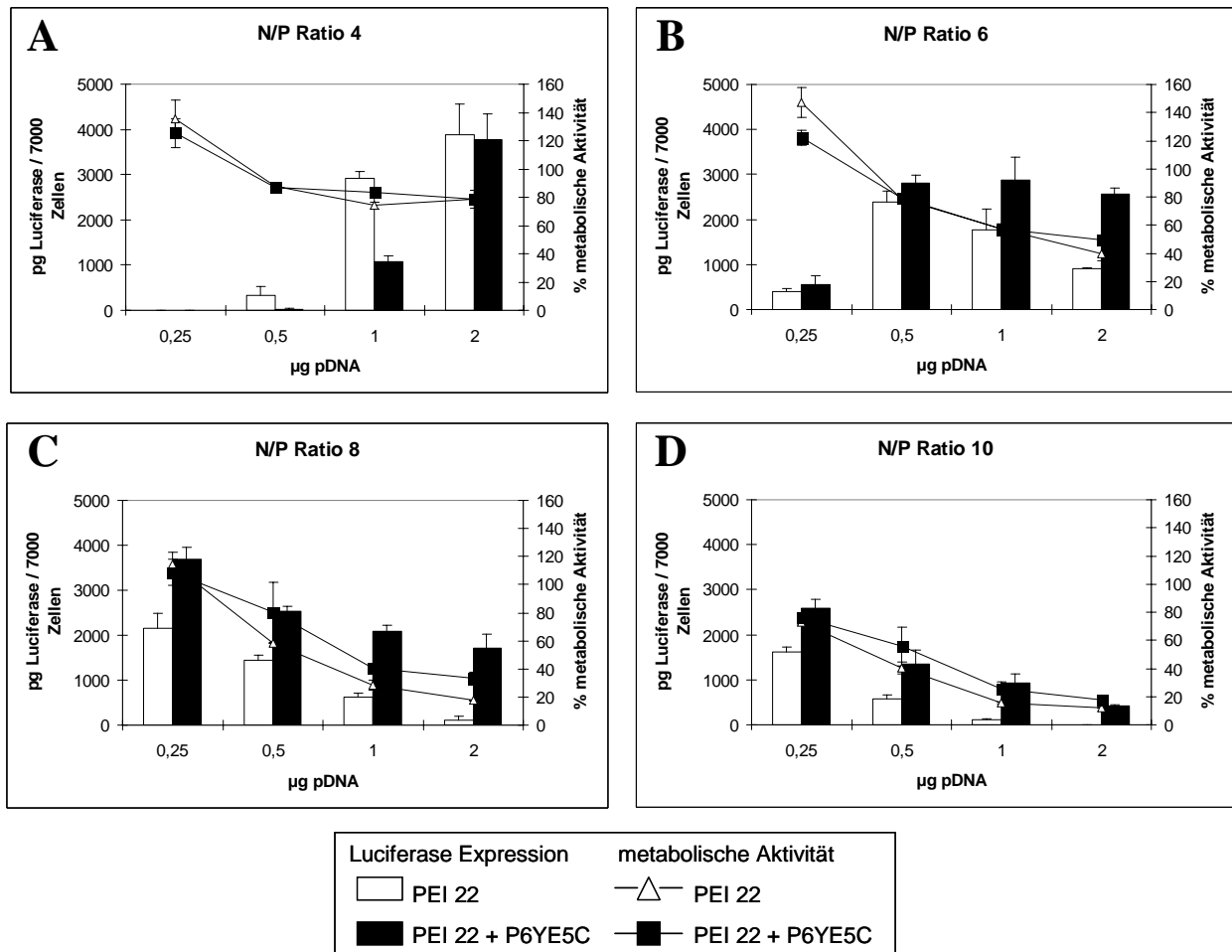


Abbildung 7: Darstellung der Luciferase-Expression und der metabolischen Aktivität humaner Keratinozyten nach Transfektion mit ungeschützten Genvektoren bestehend aus PEI 22 und Plasmid-DNA sowie mit geschützten Genvektoren bestehend aus PEI 22, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C. Genvektoren wurden mit einer N/P Ratio von 4 (A), 6 (B), 8 (C) und 10 (D) eingesetzt. Für die Transfektion von 7000 humanen Keratinozyten wurden Genvektoren mit Plasmid-Mengen von 0,25; 0,5; 1 und 2 µg pB-luc zur Expression von Luciferase eingesetzt. Die Luciferase-Expression 24 Stunden nach Transfektion wurde in Balken dargestellt (Skalierung in linker y-Achse). Die metabolische Aktivität transfizierter Zellen nach einer 4-stündigen Inkubation mit dem Zellproliferationsassay WST[®]-1 (Roche, Mannheim, D) wurde prozentual zur metabolischen Aktivität nicht-transfizierter Zellen in Linien dargestellt (Skalierung in rechter y-Achse). Aus identischen Versuchsansätzen in dreifacher Ausführung wurden Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet.

Bei einer N/P-Ratio von 4 (s. Abb. 7 A) wurde nach Transfektion mit ungeschützten und geschützten Genvektoren nach Steigerung der Plasmid-Menge auf 2 µg pB-luc eine Reduzierung der metabolischen Aktivität transfizierter Zellen auf ca. 80 % der Ausgangsaktivität beobachtet. Der Einsatz des Schutzpolymers P6YE5C zeigte keinen Einfluss auf die metabolische Aktivität. In beiden Versuchgruppen wurde mit steigender Plasmid-Konzentration ein kontinuierlicher Anstieg der Luciferase-Expression beobachtet. Ungeschützte Genvektoren zeigten mit Plasmid-Mengen von 0,5 und 1 µg pB-luc gegenüber geschützten Genvektoren höhere Luciferase-Expressionen.

Nach Applikation ungeschützter und geschützter Genvektoren mit einer N/P-Ratio von 6 wurde die metabolische Aktivität transfizierter Zellen nach Steigerung der Plasmid-Menge kontinuierlich reduziert und zeigte bei einer Plasmid-Menge von 2 µg pB-luc ca. 40 % der Ausgangsaktivität. Wie bereits bei Genvektoren mit einer N/P-Ratio von 4 beobachtet, zeigte der Einsatz des Schutzpolymers P6YE5C keinen Einfluss auf die metabolische Aktivität. Bei einer N/P-Ratio von 6 wurde mit ungeschützten Genvektoren bis zu einer Plasmid-Menge von 0,5 µg pB-luc eine Steigerung der Luciferase-Expression beobachtet. Eine weitere Steigerung der Plasmid-Menge auf 1 und 2 µg pB-luc führte zu einem Abfall der Luciferase-Expression. Die Toxizität ungeschützter Genvektoren verursachte bei einer Plasmid-Menge von 1 und 2 µg pB-luc einen Rückgang der Luciferase-Expression. Für geschützte Genvektoren mit einer N/P-Ratio von 6 wurde bei der Plasmid-Menge von 0,5 µg pB-luc die maximale Luciferase-Expression beobachtet, die nach Erhöhung der Plasmid-Menge auf 1 bzw. 2 µg pB-luc nicht weiter anstieg. Geschützte Genvektoren zeigten bei einer N/P-Ratio von 6 generell eine höhere Luciferase-Expression als ungeschützte Genvektoren.

Durch Genvektoren mit einer N/P-Ratio von 8 wurde die metabolische Aktivität transfizierter Zellen abhängig von der steigenden Plasmid-Konzentration deutlich reduziert. Nach der Applikation ungeschützter Genvektoren mit einer Plasmid-Menge von 2 µg pB-luc wurde die metabolische Aktivität transfizierter Zellen auf ca. 20 % reduziert. Durch die Zugabe des Schutzpolymers P6YE5C wurde die metabolische Aktivität unter gleichen Bedingungen auf 40 % reduziert. Ungeschützte und geschützte Genvektoren mit einer Plasmid-Menge von 0,25 µg pB-luc zeigten nach Transfektionen die höchste Luciferase-Expression. Eine Steigerung der Plasmid-Menge führte zu einem kontinuierlichen Abfall der Luciferase-Expression. Mit dem Einsatz geschützter Genvektoren wurden höhere Luciferase-Expressionen erzielt.

Durch Genvektoren mit einer N/P-Ratio von 10 wurde die metabolische Aktivität transfizierter Zellen in Abhängigkeit der steigenden Plasmid-Konzentrationen stark reduziert. Nach Applikation ungeschützter Genvektoren mit einer Plasmid-Menge von 2 µg pB-luc wurde die metabolische Aktivität transfizierter Zellen auf ca. 10 % reduziert. Durch die Zugabe des Schutzpolymers P6YE5C wurde die metabolische Aktivität unter gleichen Bedingungen auf 20 % reduziert. Ungeschützte und geschützte Genvektoren mit einer Plasmid-Menge von 0,25 µg pB-luc zeigten nach Transfektionen die höchste Luciferase-Expression. Eine Steigerung der Plasmid-Menge führte zu einem kontinuierlichen Abfall der Luciferase-Expression. Der Einsatz geschützter Genvektoren erzielte gegenüber ungeschützten Genvektoren höhere Luciferase-Expressionen. Genvektoren mit einer N/P-

Ratio von 10 führten gegenüber Genvektoren mit einer N/P-Ratio von 8 generell zu geringeren Luciferase-Expressionen.

Die untersuchten Formulierungen von Genvektoren führten unter Berücksichtigung einer individuellen Abhängigkeit von N/P-Ratio und Plasmid-Menge zu einer erfolgreichen Transfektion humaner Keratinozyten. Genvektoren, bestehend aus PEI 25 und Plasmid-DNA zeigten insgesamt eine geringere Effektivität gegenüber Genvektoren bestehend aus PEI 22 und Plasmid-DNA. Allerdings verursachte die höhere Toxizität der Genvektoren mit PEI 22 bereits in geringeren Mengen eine Reduzierung der Genexpression gegenüber Genvektoren mit PEI 25. Die Zugabe des Schutzpolymers P6YE5C verringerte die Toxizität ungeschützter Formulierungen und steigerte damit deren Effektivität. Untersuchte Genvektoren, bestehend aus PEI 25 und Plasmid-DNA mit einer N/P-Ratio von 8, ließen sich mit Schutzpolymer P6YE5C besonders effektiv abschirmen und wurden in dieser Zusammensetzung in nachfolgenden Untersuchungen als geschützte Genvektoren eingesetzt. Genvektoren, bestehend aus PEI 22 und Plasmid-DNA wurden nicht vollständig mit Schutzpolymer P6YE5C abgeschirmt. Nach Empfehlungen des Herstellers wurden Genvektoren bestehend aus PEI 22 und Plasmid-DNA in nachfolgenden Untersuchungen mit einer N/P-Ratio von 6 eingesetzt.

3.2. Transfektion in genaktivierter Fibrin(ogen) Matrix

3.2.1. Einsatz ungeschützter Genvektoren mit PEI 22

Für die Transfektion von humanen Keratinozyten in genaktivierter Fibrin(ogen) Matrix wurden ungeschützte Genvektoren bestehend aus PEI 22 und Plasmid-DNA nach der Empfehlung des Herstellers mit einer N/P Ratio von 6 formuliert und mit einer Plasmid-Menge von 10 µg pTracer-GFP-EGF zur parallelen Expression von des Reportergens *green fluorescent protein* (GFP) und des Wachstumsfaktors *epidermal growth factor* (EGF) formuliert und zur Suspension von 200 000 humanen Keratinozyten eingesetzt. In der Kontrollgruppe wurden humane Keratinozyten mit der entsprechenden Menge nackter Plasmid-DNA suspendiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension mit der Fibrinogen-Lösung des Fibrinklebers Tissucol[®]-Kit (Baxter Deutschland GmbH, Heidelberg, Deutschland) gemischt. Die Mischung bestehend aus Fibrinogen, ungeschützten Genvektoren und humanen Keratinozyten wurde in eine 24-Loch-Zellkulturplatte überführt und dort mit der Thrombinlösung des Fibrinklebers zu einem Fibringerinnsel polymerisiert. Zur Charakterisierung des Matrixeinflusses erfolgten Transfektionsversuche in An- und

Abwesenheit von Fibrin. Über einen Zeitraum von 8 Tagen wurde täglich mittels ELISA die Konzentration von EGF in den Zellkulturüberständen bestimmt (s. Abb. 8). GFP-Expression wurde durch tägliche Kontrolle der Versuchsansätze im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen (s. Abb. 9).

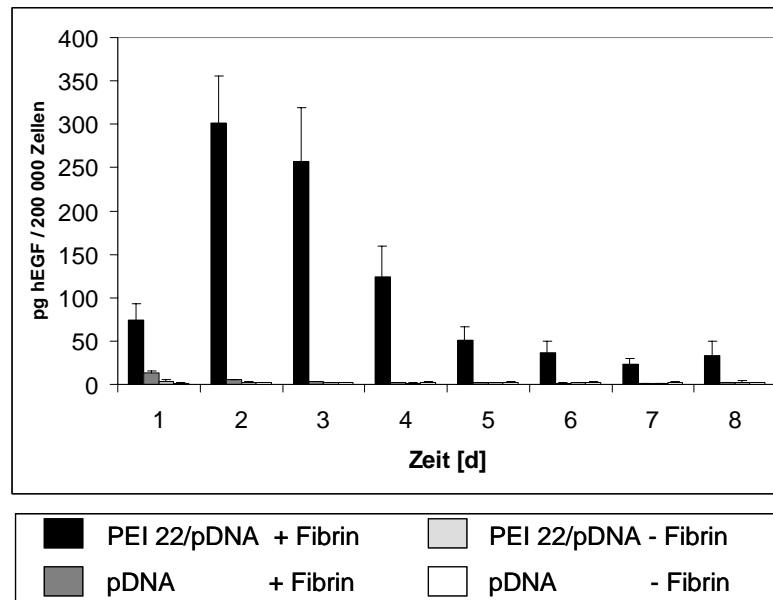


Abbildung 8: EGF-Expression humaner Keratinozyten nach Transfektion in genaktivierter Fibrin(ogen) Matrix. Für die Transfektion wurden ungeschützte Genvektoren bestehend aus PEI 22 und Plasmid-DNA mit einer N/P-Ratio von 6, sowie nackte Plasmid-DNA in An-(+) und Abwesenheit (-) von Fibrin eingesetzt. 200 000 humane Keratinozyten, wurden mit einer Plasmid-Menge von 10 µg pTracer-GFP-EGF transfiziert. Mittels ELISA wurde über einen Zeitraum von 8 Tagen täglich die EGF-Konzentration im Zellkulturüberstand bestimmt. Aus identischen Versuchsansätzen in sechsfacher Ausführung wurden Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet.

Die höchste EGF-Expression wurde nach Transfektion humaner Keratinozyten mit ungeschützten Genvektoren in Anwesenheit von Fibrin erzielt. Der gemessene Expressionverlauf ergab einen Anstieg der EGF-Konzentration in den ersten beiden Tagen, ein Maximum am 2. Tag gefolgt von einem kontinuierlichen Abfall bis zum 8. Tag der Versuchsauswertung. Nach Transfektion humaner Keratinozyten mit nackter Plasmid-DNA in Fibrin wurden lediglich Spuren von EGF gemessen. Hierbei könnte es sich um eine geringe Expression von EGF nach Transfektion mit pTracer-GFP-EGF handeln oder wahrscheinlicher um den ursprünglichen EGF-Gehalt des verwendeten Fibrinklebers.

In fibrinfreien Kontrollgruppen wurde nach der Transfektion mit ungeschützten Genvektoren über den Versuchszeitraum von 8 Tagen keine intakte Zellstruktur identifiziert. EGF-Expressionen konnten durch den schnellen Zelltod der eingesetzten Keratinozyten nicht gemessen werden. Eine normale Zellproliferation wurde dagegen in fibrinfreien Kontrollgruppen nach Transfektion mit nackter Plasmid-DNA beobachtet. EGF-Expressionen

wurden, möglicherweise durch das ineffektive Gentransfer-Potential nackter pDNA *in vitro*, ebenfalls nicht beobachtet. Die mikroskopische Kontrolle der fibrinhaltigen Versuchsansätze zeigte dagegen einzeln suspendierte Keratinozyten in Fibrin. Neben der Bestimmung des Wachstumsfaktors EGF im Zellkulturüberstand wurde parallel das Reportergen *green fluorescent protein* (GFP) im Fluoreszenzmikroskop detektiert und dokumentiert (s. Abb. 9). GFP konnte ausschließlich nach Transfektion humaner Keratinozyten mit ungeschützten Genvektoren in Anwesenheit von Fibrin detektiert werden. Dokumentiert wurde GFP-Expression zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden nach Formulierung der genaktivierten Fibrin(ogen) Matrix. In den weiteren Versuchsgruppen wurde keine GFP-Expression detektiert.

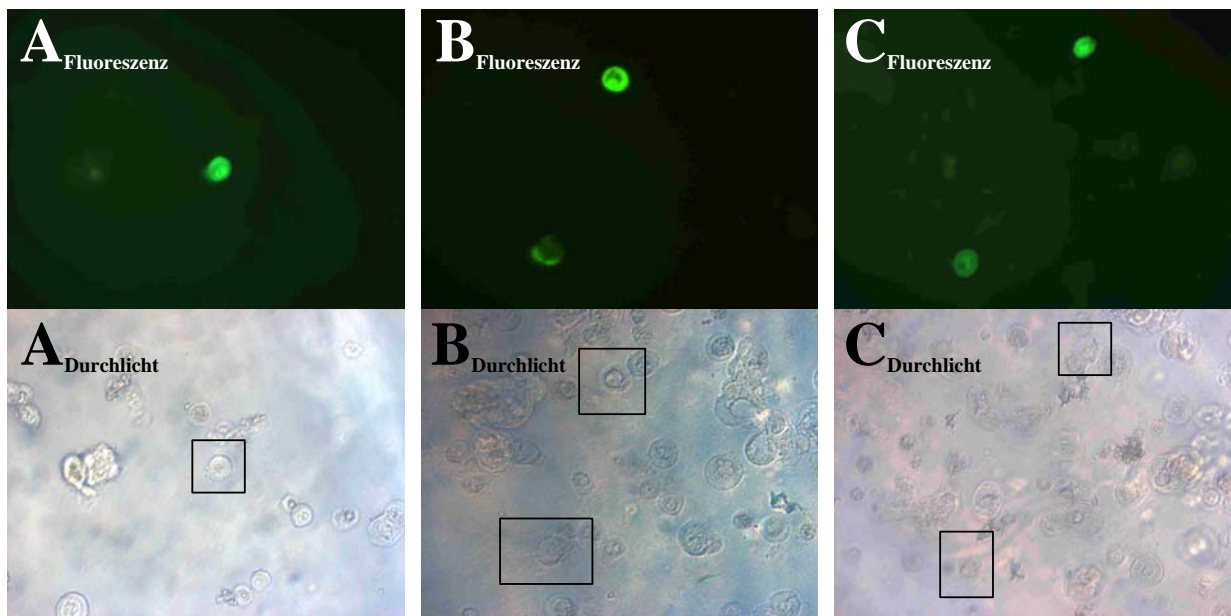


Abbildung 9: GFP-Expression humaner Keratinozyten nach Transfektion mit ungeschützten Genvektoren bestehend aus PEI 22 und der Plasmid-DNA mit einer N/P-Ratio von 6 in genaktivierter Fibrin(ogen) Matrix. 200 000 humane Keratinozyten wurden mit einer Plasmid-Menge von 10 µg pTracer-GFP-EGF in Fibrin transfiziert. Korrespondierende Aufnahmen nach Kontrolle im Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop (x 400), zeigten GFP-positive Zellen ($A_{\text{Fluoreszenz}}$, $B_{\text{Fluoreszenz}}$, $C_{\text{Fluoreszenz}}$) und ihre Lokalisation in Fibrin ($A_{\text{Durchlicht}}$, $B_{\text{Durchlicht}}$, $C_{\text{Durchlicht}}$) 24 Stunden (A), 48 Stunden (B) und 72 Stunden (C) nach Transfektion. Eingerahmte Zellen im Durchlicht zeigten im Fluoreszenzlicht grüne GFP-Fluoreszenz.

3.2.2. Optische Darstellung Transfektionsverlauf

Zur Dokumentation des Transfektionsverlaufs humaner Keratinozyten in genaktivierter Fibrin(ogen) Matrix, wurde pGeneGrip[®]-GFP als Rhodamin-markierte Plasmid-DNA zur Expression des Reportergens *green fluorescent protein* (GFP) eingesetzt. Es wurden ungeschützte Genvektoren bestehend aus PEI 22 und Plasmid-DNA mit einer N/P Ratio von 6 eingesetzt. In der genaktivierten Fibrin(ogen) Matrix wurden 100 000 humane Keratinozyten mit 5 µg Plasmid-DNA transfiziert. Rote Rhodamin-Fluoreszenz wurde zu den Zeitpunkten 0, 4, 24 und 48 Stunden nach Formulierung der genaktivierten Fibrin(ogen) Matrix im konfokalen Mikroskop detektiert. Expression von GFP wurde nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit grüner Fluoreszenz im konfokalen Mikroskop detektiert. (s. Abb. 10).

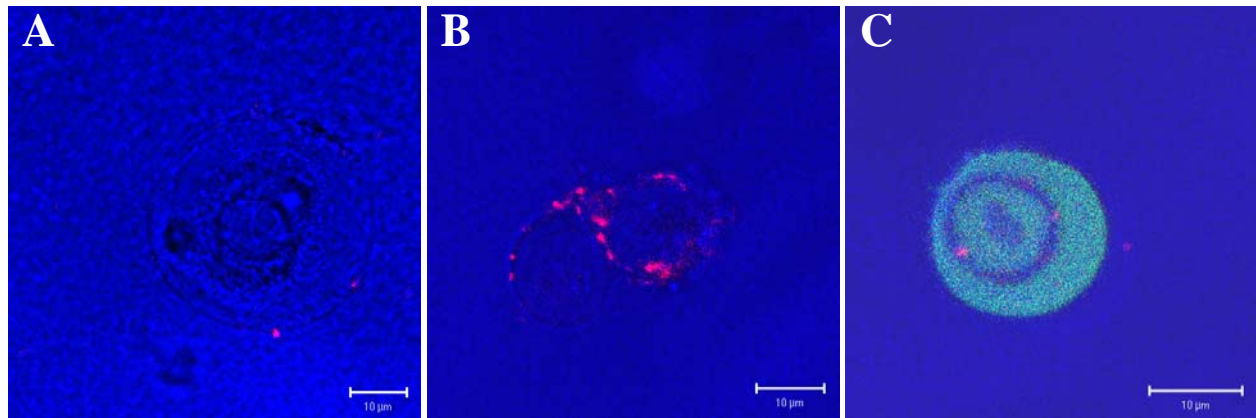


Abbildung 10: Dokumentation der Transfektion humaner Keratinozyten mit ungeschützten Genvektoren bestehend aus PEI 22 und der Rhodamin-markierten Plasmid-DNA pGeneGrip-GFP mit einer N/P-Ratio von 6 in genaktivierter Fibrin(ogen) Matrix. Mit Detektion der roten Rhodamin-Fluoreszenz (konfokale Mikroskopie) zu den Zeitpunkten 0 (A), 4 (B) und 24 Stunden (C) nach Transfektion wurden ungeschützte Genvektoren bestehend aus PEI 22 und der Rhodamin-markierten Plasmid-DNA pGeneGrip[®]-GFP nachgewiesen. Mit Detektion der grünen GFP-Fluoreszenz (konfokale Mikroskopie) 24 Stunden nach Transfektion wurde die Expression von GFP im Versuchsansatz nachgewiesen. Die Expression von GFP diente als Indikator für eine erfolgreiche Transfektion humaner Keratinozyten in genaktivierter Fibrin(ogen) Matrix.

Unmittelbar nach Formulierung der genaktivierten Fibrin(ogen) Matrix zur Transfektion humaner Keratinozyten mit ungeschützten Genvektoren bestehend aus PEI 22 und Plasmid-DNA wurde die rote Fluoreszenz der Rhodamin-Markierung von pGeneGrip-GFP an isolierten Bereichen der Zelloberfläche detektiert (s. Abb. 10 A). Ein Kontakt zwischen Plasmid-DNA und Zellen wurde bereits während der Formulierung der genaktivierten Fibrin(ogen) Matrix hergestellt. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden wurde die rote Fluoreszenz der Rhodamin-Markierung von pGeneGrip-GFP im Inneren der Zellen detektiert, die damit eine zelluläre Aufnahme von pGeneGrip-GFP anzeigte (s. Abb. 10 B). Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde neben der roten Rhodamin-Fluoreszenz im Zellinneren einzelner Zellen, zusätzlich die Expression von GFP mit grüne Fluoreszenz nachgewiesen (s. Abb. 10 C).

Aufgrund des Prinzips der konfokalen Mikroskopie wurde eine dreidimensionale Ansicht Rhodamin- und GFP-positiver Zellen erstellt, um auf diese Weise die rote Fluoreszenz der Rhodamin-Markierung von pGeneGrip-GFP eindeutig im Inneren einer GFP-positiven Zellen nachzuweisen (s. Abb. 11).

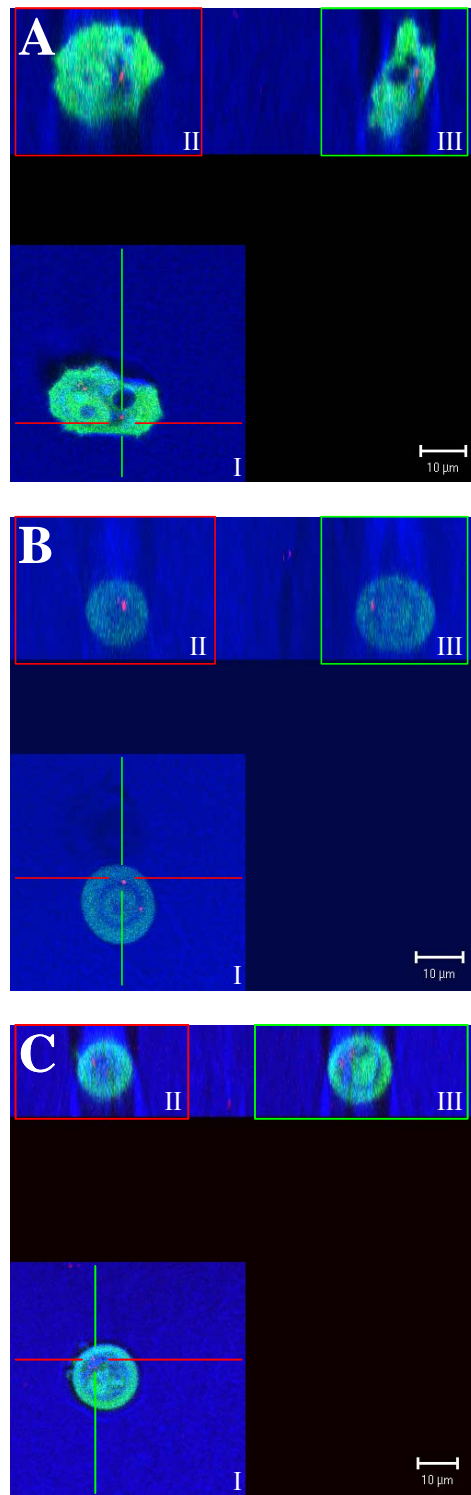


Abbildung 11: Aufnahmen im konfokalen Mikroskop von GFP-positiven humanen Keratinozyten im Verlauf der Transfektion mit ungeschützten Genvektoren bestehend aus PEI 22 und der Rhodamin-markierten Plasmid-DNA pGeneGrip-GFP mit einer N/P-Ratio von 6 in genaktivierter Fibrin(ogen) Matrix. 100 000 humane Keratinozyten, wurden mit 5 µg Plasmid-DNA in Fibrin transfiziert. Mit Detektion der roten Rhodamin-Fluoreszenz zu den Zeitpunkten 24 (A, B) und 48 Stunden (C) nach Transfektion wurde pGeneGrip[®]-GFP im Inneren der GFP-positiven Zellen nachgewiesen (AI, BI, CI). Durch dreidimensionale Darstellung wurde die Rhodamin-markierte Plasmid-DNA pGeneGrip-GFP eindeutig im Inneren der GFP-positiven Zellen nachgewiesen. Rote Linien in AI, BI und CI wurden als waagerechte Bildebenen in roten Rahmen dargestellt (AII, BII, CII). Grüne Linien in AI, BI, CI wurden als senkrechte Bildebenen in grünen Rahmen dargestellt (AIII, BIII, CIII).

3.2.3. Vergleich ungeschützter und geschützter Genvektoren

Für die Transfektion humaner Keratinozyten in genaktivierter Fibrin(ogen) Matrix wurden unterschiedliche Formulierungen von Genvektoren eingesetzt. Untersucht wurde die Effektivität ungeschützter Genvektoren bestehend aus PEI 22 und Plasmid-DNA mit einer N/P-Ratio von 6, sowie geschützter Genvektoren bestehend aus PEI 25, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 8. Zur Charakterisierung des Matrixeinflusses wurde das Transfektionsverhalten der Genvektor-Formulierungen in An- und Abwesenheit von Fibrin untersucht. Genvektoren mit einer Plasmid-Menge von 10 µg pWRG-1630-EGF zur Expression von *epidermal growth factor* (EGF) wurden zur Transfektion von 200 000 humanen Keratinozyten in An- und Abwesenheit von Fibrin eingesetzt. Die Konzentration von EGF wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen täglich mittels ELISA in Zellkulturüberständen bestimmt(s. Abb. 12).

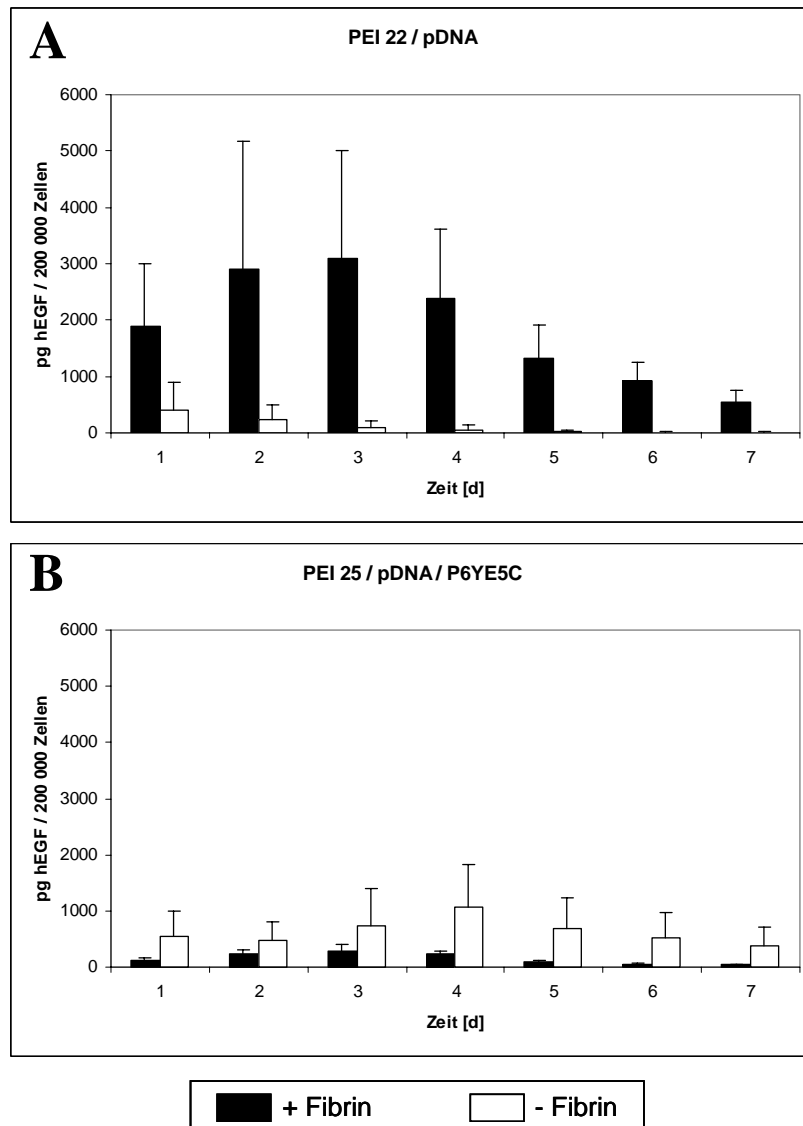


Abbildung 12: EGF-Expression humaner Keratinozyten nach Transfektion in genaktivierter Fibrin(ogen) Matrix. Für die Transfektion wurden ungeschützte Genvektoren bestehend aus PEI 22 und Plasmid-DNA mit einer N/P-Ratio von 6, sowie geschützte Genvektoren bestehend aus PEI 25, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 8 in An-(+) und Abwesenheit (-) von Fibrin eingesetzt. 200 000 humane Keratinozyten, wurden mit einer Plasmid-Menge von 10 μ g pWRG-1630-EGF zur Expression des Wachstumsfaktors EGF transfiziert. Mittels ELISA wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen täglich die EGF-Konzentration im Zellkulturüberstand bestimmt. Aus identischen Versuchsansätzen in sechsfacher Ausführung wurden Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet.

Nach Transfektion humaner Keratinozyten mit ungeschützten Genvektoren in genaktivierter Fibrin(ogen) Matrix wurde hohe EGF-Expressionen erzielt. Der Verlauf der Expression zeigte einen Anstieg der EGF-Konzentration in den ersten drei Tagen, ein Maximum am 3. Tag und einen kontinuierlichen Abfall bis zum 7. Tag der Versuchsauswertung. In der fibrinfreien Kontrollgruppe konnte nach Transfektion mit ungeschützten Genvektoren nur sehr geringe EGF-Expressionen gemessen werden. Ausgehend von der geringen EGF-Expression am 1. Tag, lag die EGF-Konzentration ab dem 4. Tag im Bereich der Nachweisgrenze.

Nach Transfektion humaner Keratinozyten mit geschützten Genvektoren in genaktivierter Fibrin(ogen) Matrix wurde nur eine geringe Expression erzielt. Der Verlauf der Expression zeigte parallel zur Versuchsgruppe mit ungeschützten Genvektoren einen Anstieg der EGF-Konzentration in den ersten drei Tagen, ein Maximum am 3. Tag und einen kontinuierlichen Abfall bis zum 7. Tag der Versuchsauswertung. In der fibrinfreien Kontrollgruppe wurde dagegen nach Transfektion mit geschützten Genvektoren eine höhere EGF-Expression gemessen. Ausgehend von einer erhöhten EGF-Expression am 1. Tag, stieg die EGF-Konzentration bis zu einem Maximum am 4. Tag weiter an und fiel bis zum 7. Tag der Versuchsauswertung kontinuierlich ab.

Die Transfektion humaner Keratinozyten mit ungeschützten und geschützten Genvektoren wurde durch Fibrin deutlich beeinflusst. Die Transfektion mit hohen Konzentrationen an ungeschützten Genvektoren wurde ohne Fibrin durch die Toxizität der Genvektoren limitiert. Mit ungeschützten Genvektoren, wurden aufgrund der toxischen Einflüsse nur geringe Mengen des Wachstumsfaktors EGF exprimiert. Die Transfektion unter gleichen Bedingungen in Fibrin erzielte dagegen sehr hohe EGF-Expressionen. Dies könnte mit einer Fibrin-induzierten Reduzierung der Toxizität ungeschützter Genvektoren und der daraus resultierenden Erhöhung der EGF-Expression zu erklären sein.

Die Transfektion humaner Keratinozyten mit hohen Konzentrationen geschützter Genvektoren bestehend aus PEI 25, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C führte ohne Fibrin zu deutlich höheren EGF-Expressionen gegenüber ungeschützten Genvektoren. Durch eine Abschirmung mit Schutzpolymer P6YE5C wurde die Toxizität gegenüber ungeschützten Formulierungen reduziert. Die geringere Toxizität äußerte sich in einer Steigerung der EGF-Expression. In Fibrin lieferten geschützte Genvektoren allerdings niedrigere Expressionen gegenüber den fibrinfreien Versuchsgruppen.

3.2.4. Einfluss von Fibrinogen auf Genvektoren

Um einen Einfluss von Fibrin(ogen) bzw. eines davon abgeleiteten Peptids auf das Transfektionsverhalten von Genvektoren untersuchen zu können, wurden humane Keratinozyten mit ungeschützten Genvektoren bestehend aus PEI 25 und Plasmid-DNA mit einer N/P-Ratio von 8 und geschützten Genvektoren bestehend aus PEI 25, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 8 nach Vorinkubation mit Fibrinogen transfiziert. Verglichen wurde das Transfektionsverhalten der ungeschützten und geschützten Genvektoren vor und nach der Vorinkubation mit Fibrinogen. Da die verwendete Fibrinogenlösung als Teil eines therapeutischen Fibrinkleberpräparats auch Spuren anderer

Plasma-Bestandteile aufwies und deren Einfluss auf das Transfektionsverhalten von Genvektoren nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde zusätzlich eine charakteristische Sequenz der β -Kette des Fibrinogens synthetisiert, gereinigt und ebenfalls zur Vorinkubation von Genvektoren eingesetzt. Die beschriebene Sequenz wurde als „Haptid“ bezeichnet [163] setzte sich aus 21 Aminosäuren zusammen und wies Eigenschaften eines Aktivators der Fibrin-Polymerisation auf. Zum Nachweis eines spezifischen Einflusses von Fibrinogen bzw. der davon abgeleiteten Peptidstruktur auf das Transfektionsverhalten von ungeschützten und geschützten Genvektoren, wurde ein Haptid-Antagonist als Negativkontrolle zur Vorinkubation der Genvektoren eingesetzt. Der Fibrin-Polymerisations-Inhibitor Pefabloc[®] FG der Firma Pentapharm wurde dafür ausgewählt. Ungeschützte und geschützte Genvektoren mit einer Plasmid-Menge von 2 μ g pB-luc wurden nach Vorinkubation für die Transfektion von 7000 humanen Keratinozyten eingesetzt. Die Versuchsauswertung erfolgte am 1., 2. und 3. Tag nach Transfektion durch Messung der Luciferase-Expression im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge (s. Abb. 13).

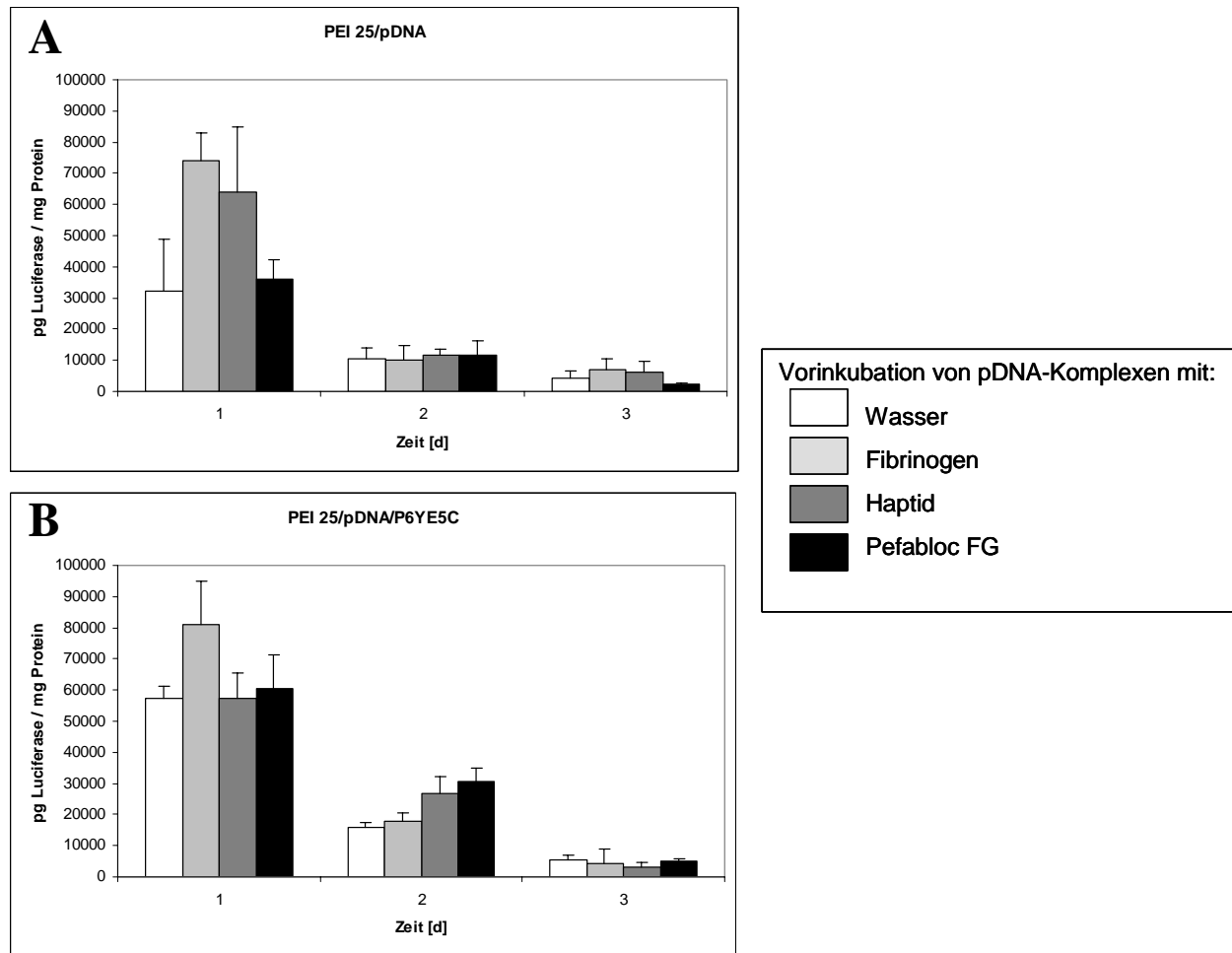


Abbildung 13: Luciferase-Expression humaner Keratinozyten nach Transfektion mit ungeschützten Genvektoren bestehend aus PEI 25 und Plasmid-DNA mit einer N/P-Ratio von 8 (A) und geschützten Genvektoren bestehend aus PEI 25, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 8 (B). Genvektoren wurden mit einer Plasmid-Menge von 2 μ g pB-luc zur Transfektion von 7000 humanen Keratinozyten eingesetzt. Genvektoren wurden vor der Transfektion entweder mit Wasser, einer wässrigen Fibrinogen-Lösung, einer wässrigen Haptid C β -Lösung oder einer wässrigen Pefabloc[®]FG-Lösung für 30 Minuten vorinkubiert. Über einen Zeitraum von 3 Tagen, wurde täglich die Luciferase-Expression bestimmt und im Verhältnis zur Proteingesamtmenge dargestellt. Aus identischen Versuchsansätzen in dreifacher Ausführung wurden Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet.

Durch die Vorinkubation ungeschützter Genvektoren mit unterschiedlichen Peptidstrukturen wurden die Eigenschaften der Genvektoren beeinflusst und führten zu einer veränderten Genexpression transfizierter Zellen. Ungeschützte Genvektoren, vorinkubiert mit Wasser, wurden als Kontrollgruppe eingesetzt. Transfektionen mit ungeschützten Genvektoren nach Vorinkubation mit Fibrinogen-Lösung führten am 1. Tag der Versuchsauswertung gegenüber der Kontrollgruppe zu einer Steigerung der Luciferase-Expression um mehr als das Doppelte. Ungeschützte Genvektoren wurden durch die Vorinkubation mit Fibrinogen deutlich effizienter. Nach Vorinkubation ungeschützter Genvektoren mit synthetisiertem Haptid wurde am 1. Tag der Versuchsauswertung gegenüber der Kontrollgruppe ebenfalls eine deutliche

Steigerung der Luciferase-Expression beobachtet. Ungeschützte Genvektoren wurden auch durch die Vorinkubation mit Haptid deutlich effizienter. Nach Vorinkubation ungeschützter Genvektoren mit dem Fibrin-Polymerisations-Inhibitor Pefabloc[®] FG wurde dagegen keine Veränderung der Luciferase-Expression gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet. Damit wurde ein positiver Einfluss von Fibrinogen bzw. des davon abgeleiteten Haptids auf das Transfektionsverhalten ungeschützter Genvektoren bestätigt, der zu einer Steigerung der Luciferase-Expression nach Transfektion humaner Keratinozyten führte. Dieser Effekt wurde nur am 1. Auswertungstag beobachtet.

Durch Vorinkubation geschützter Genvektoren mit unterschiedlichen Peptidstrukturen wurden die Eigenschaften der Genvektoren weniger stark beeinflusst. Gegenüber der Kontrollgruppe, in der geschützte Genvektoren mit Wasser vorinkubiert wurden, zeigte lediglich eine Vorinkubation mit Fibrinogen eine Steigerung der Luciferase-Expression am 1. Tag der Versuchsauswertung. Nach Vorinkubation geschützter Genvektoren mit Haptid- oder Pefabloc[®] FG-Lösung wurde gegenüber der Kontrollgruppe keine Steigerung der Luciferase-Expression am 1. Tag beobachtet. Nach Luciferase-Messungen am zweiten sowie dritten Tag wurde keine deutliche Veränderung der Gentransfer-Effizienz durch Vorinkubation mit unterschiedlichen Peptidstrukturen beobachtet.

Die Transfektion humaner Keratinozyten mit ungeschützten und geschützten Genvektoren, nach Vorinkubation mit Wasser, zeigte für ungeschützte Genvektoren eine geringere Luciferase-Expression. Nach Vorinkubation mit Fibrinogen lieferten ungeschützte und geschützte Genvektoren vergleichbar hohe Expressionswerte für Luciferase. Durch die Vorinkubation mit Fibrinogen wurde die Transfektionseffizienz ungeschützter und geschützter Genvektoren angeglichen. Die Vorinkubation mit synthetisiertem Haptid zeigte für ungeschützte Genvektoren gesteigerte Expressionswerte für Luciferase, die der erhöhten Transfektionseffizienz geschützter Genvektoren entsprachen. Gegenüber der Vorinkubation mit Wasser konnte durch Vorinkubation geschützter Genvektoren mit Haptid keine weitere Steigerung der Luciferase-Expression mehr beobachtet werden. Durch Vorinkubationen mit Pefabloc[®] FG wurde die Luciferase-Expression gegenüber der Vorinkubation mit Wasser kaum beeinflusst.

3.2.5. Einsatz genaktivierter Fibrinogen-Lyophilisate

Bisher erforderte die Transfektion humaner Keratinozyten in genaktivierter Fibrin(ogen) Matrix einen aufwendigen Versuchsaufbau, in dem die einzelnen Versuchskomponenten zur gleichen Zeit in einer bestimmten Reihenfolge miteinander gemischt wurden. Auf diese Weise beeinflussten einzelne Versuchskomponenten in variierenden Konzentrationen direkt die Endzusammensetzung der genaktivierten Fibrin(ogen) Matrix. Um die Nutzung der genaktivierten Fibrin(ogen) Matrix in der Praxis einfacher zu gestalten, wurde eine Formulierungstechnik entwickelt, die sich in zwei Herstellungsschritte gliederte. Im ersten Schritt wurde eine Mischung aus Fibrinogen und Genvektor hergestellt, der durch Gefriertrocknung das Wasser entzogen wurde. Im lyophilisierten Zustand war die Formulierung stabil und konnte über einen längeren Zeitraum bei 4 °C gelagert werden. Im zweiten Schritt wurde das Lyophilisat zum Zeitpunkt der Transfektion mit der erforderlichen Menge Wasser gelöst. Die gewünschte Zellzahl wurde als Suspension dazugegeben. Anschließend wurde die genaktivierte Fibrin(ogen) Matrix durch die Zugabe von Thrombinlösung polymerisiert. Diese Modifikation der Herstellungsmethode wurde im Hinblick auf die Anwendung eines kommerziellen Produkts entwickelt. Somit unterschied sich die Formulierung nicht in der Handhabung, wohl aber in der Zusammensetzung der ursprünglichen Fibrinkleberzubereitung.

Angewendet wurde diese neue Herstellungsmodifikation zur Transfektion von humanen Keratinozyten mit ungeschützten und geschützten Genvektoren in genaktivierter Fibrin(ogen) Matrix zur lokalen Bereitstellung des Wachstumsfaktors *epidermal growth factor* (EGF). Als Plasmid-DNA wurde pWRG-1630-EGF eingesetzt. Es wurden ungeschützte Genvektoren bestehend aus PEI 22 und Plasmid-DNA mit einer N/P-Ratio von 6, geschützte Genvektoren bestehend aus PEI 25, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 8 und geschützte Genvektoren bestehend aus PEI 22, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 6 mit der Fibrinogen-Lösung gemischt und lyophilisiert. Zum Zeitpunkt der Transfektion wurden die Lyophilisate in Wasser gelöst, mit 20.000, 50.000, 100.000 und 200.000 humanen Keratinozyten vermischt und mit Thrombin als genaktivierte Fibrin(ogen) Matrix polymerisiert. Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurde täglich mittels ELISA die EGF-Expression humaner Keratinozyten in den Versuchüberständen bestimmt (s. Abb. 14).

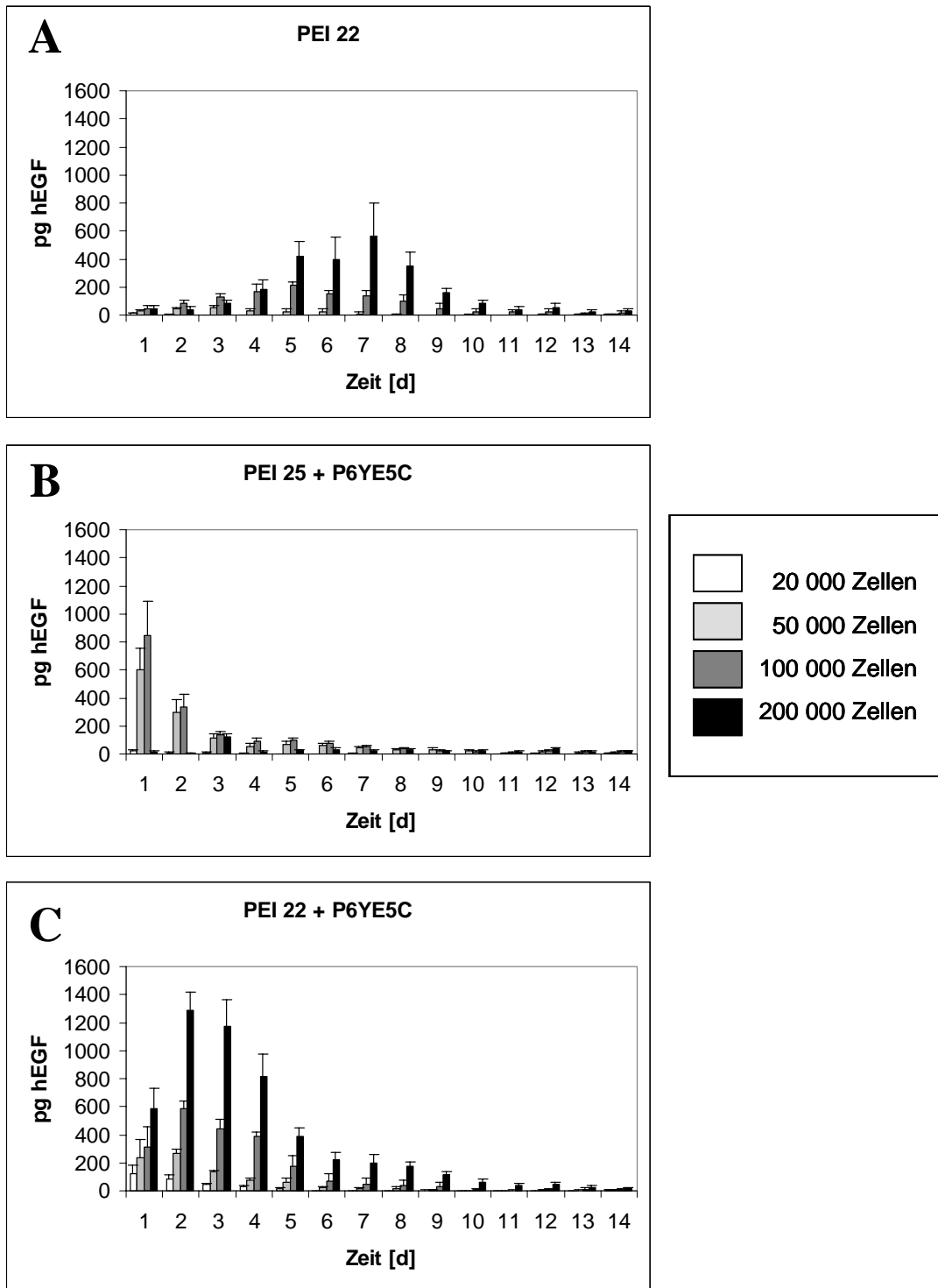


Abbildung 14: EGF-Expression humaner Keratinozyten nach Transfektion mit unterschiedlichen Genvektoren in genaktivierter Fibrin(ogen)-Matrix unter Verwendung genaktivierter Fibrinogenlyophilisate. Es wurden ungeschützte Genvektoren bestehend aus PEI 22 und Plasmid-DNA mit einer N/P-Ratio von 6 (A), geschützten Genvektoren bestehend aus PEI 25, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 8 (B) und geschützte Genvektoren bestehend aus PEI 22, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 6 (C) eingesetzt. Genvektoren mit einer Plasmid-Menge von 5 µg pWRG-1630-EGF wurden für die Transfektion von 20.000, 50.000, 100.000 und 200.000 humanen Keratinozyten verwendet. Mittels ELISA wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen täglich die EGF-Konzentration im Zellkulturüberstand bestimmt. Aus identischen Versuchsansätzen in dreifacher Ausföhrung wurden Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet.

Die Fibrinmatrix löste sich unabhängig von den verschiedenen Formulierungen zwischen dem 3. und dem 4. Tag vollständig auf. Die Transfektion humaner Keratinozyten mit ungeschützten Genvektoren bestehend aus PEI 22 und Plasmid-DNA in genaktivierter Fibrin(ogen) Matrix zeigte eine starke Abhängigkeit zwischen Zellzahl und Expression des Wachstumsfaktors *epidermal growth factor* (EGF). Je höher die eingesetzten Zellzahlen, desto größere Mengen EGF wurden bei einer Verzögerung des Expressionsmaximums gebildet (s. Abb. 14 A). Nach Transfektion von 200.000 Zellen konnte das Expressionsmaximum erst am siebten Tag beobachtet werden. Die höchsten EGF-Expressionen wurden erst nach der Auflösung des Fibringerinnsels zwischen dem 3. und dem 4. Tag detektiert.

Nach Transfektion humaner Keratinozyten mit geschützten Genvektoren bestehend aus PEI 25, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C, wurden bei mittleren Zellzahlen von 50.000 und 100 000 Zellen bereits am ersten Auswertungstag die höchsten Expressionen von EGF beobachtet. Der hohen Expression am ersten Tag folgte ein kontinuierlicher Abfall von EGF bis zum Ende der Versuchsauswertung.

Nach Transfektion humaner Keratinozyten mit geschützten Genvektoren bestehend aus PEI 22, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C wurde auch eine Abhängigkeit zwischen Zellzahl und EGF-Expression festgestellt. Je höher die eingesetzten Zellzahlen, desto stärker wurde der Wachstumsfaktor EGF exprimiert. Der Einsatz geschützter Genvektoren bestehend aus PEI 22, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C erbrachte eine deutliche Steigerung der EGF-Expression gegenüber Genvektoren ohne Schutzpolymer, und es wurde eine Verschiebung der einzelnen Expressionsmaxima zu wesentlich früheren Zeitpunkten beobachtet.

Die vorliegenden Daten der Transfektion humaner Keratinozyten in der genaktivierten Fibrin(ogen) Matrix zeigten, welchen wichtigen Einfluss das Schutzpolymer P6YE5C auf den Verlauf der Transfektion humaner Keratinozyten ausübte. Der Einsatz des Schutzpolymers P6YE5C führte generell zu einer deutlichen Steigerung der Genexpression, die durch eine Reduzierung der Toxizität ungeschützter Genvektoren erklärt werden könnte. Zusätzlich beeinflusste P6YE5C den Zeitpunkt der maximalen Genexpression. Durch die Zugabe des Schutzpolymers P6YE5C könnte die schlechte Löslichkeit ungeschützter Genvektoren nach Lyophilisation entscheidend verbessert worden sein. Dies könnte zu einer schnelleren Verfügbarkeit der Genvektoren und damit zu einer schnelleren Genexpression gegenüber ungeschützten Formulierungen führen.

3.3. Transfektion über genaktivierte Oberflächen aus PDLLA und PLGA

3.3.1. Optimierung Versuchsbedingungen

Poly-D/L-lactic acid (Resomer[®] R 203, Boehringer, Ingelheim, D) ist ein Polymer der D/L-Milchsäure mit einem mittleren Molekulargewicht von 25.000 – 29.000 Dalton und einer inherenten Viskosität von 0,25-0,35. In vergangenen Untersuchungen zeichneten sich Polymerfilme aus *poly-D/L-lactic acid* (PDLLA) durch eine hohe mechanische Stabilität sowie durch eine hervorragende Zellkompatibilität aus und eigneten sich besonders für die Beschichtung medizinischer Implantate mit arzneimittelhaltigen Überzügen. *Poly-lactic-co-glycolic acid* (Resomer[®] RG 503 H, Boehringer, Ingelheim, D) ist ein co-Polymer aus Milchsäure und Glykolsäure-Einheiten mit einem mittleren Molekulargewicht von 30 – 35.000 Dalton und einer inherenten Viskosität von 0,32-0,44. Aktuelle Untersuchungen zeigten für Polymerfilme aus *poly-lactic-co-glycolic acid* (PLGA) ebenfalls eine hohe mechanische Stabilität bei einer wesentlich höheren Hydrolyserate gegenüber Polymerfilmen aus PDLLA. Die makroskopische Untersuchung von PLGA-Beschichtungen nach Bruchdehnung zeigte keine Delamination an den Bruchstellen (s. Abb. 15).

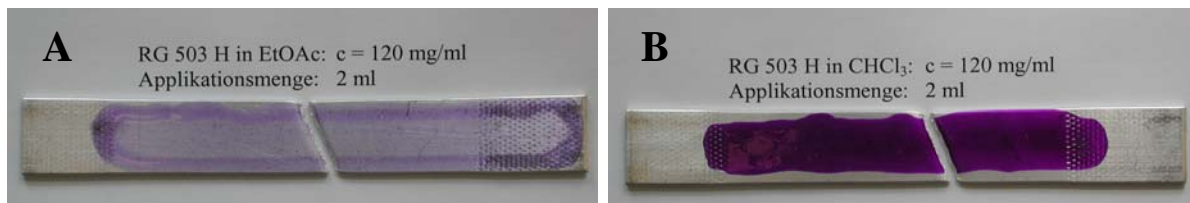


Abbildung 15: Aluminium-Flachstangen mit PLGA-Beschichtungen nach Bruchdehnung in der Universalprüfmaschine Wolpert TZZ 707 mit Dehnungsmessstreifen EP-08-250 BG-120 W. PLGA-Beschichtungen wurden aus Lösungen von PLGA in Ethylacetat (A) und PLGA in Chloroform (B) hergestellt. Eine makroskopische Untersuchung der PLGA-Beschichtungen an den Bruchstellen wurde durchgeführt.

In folgenden Untersuchungen wurden Polymerfilme aus PDLLA und PLGA als genaktivierte Oberflächen zur Beschichtung von 96-Loch-Zellkulturplatten aus Polypropylen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, D) eingesetzt.

Für die Herstellung genaktivierter Oberflächen aus PDLLA und PLGA wurden zunächst geschützte Genvektoren bestehend aus PEI 25, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 8 formuliert, danach lyophilisiert und im Anschluss in Ethylacetat dispergiert. Als Plasmid-DNA wurde pB-luc zur Expression des Reportergens Luciferase eingesetzt. Zur Überprüfung der DNA-Integrität nach Dispersion in Ethylacetat wurde die eingesetzte Plasmid-DNA im direkten Vergleich mit unbehandelter Plasmid-DNA mittels

Gelelektrophorese untersucht (s. Abb. 16). Es konnten keine herstellungsbedingten Veränderungen der Plasmid-Qualität nach Lyophilisation und Dispersion in Ethylacetat gegenüber unbehandelter Plasmid-DNA festgestellt werden.

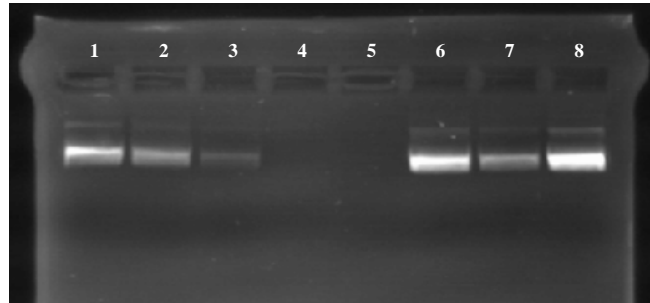


Abbildung 16: Überprüfung der DNA-Integrität in geschützten Genvektoren bestehend aus PEI 25, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 8 nach Dispersion in Ethylacetat. Basische Gelelektrophorese wurde mit 0,6 % Agarose in 0,05 M NaOH und 1 mM EDTA bei 60 V für 30 Minuten durchgeführt. Gelelektrophorese wurde mit 800 ng (1), 400 ng (2) und 150 ng (3) Plasmid-DNA aus Genvektoren, die in Ethylacetat dispergiert wurden neben 400 ng (6) und 200 ng (7) Plasmid-DNA aus nicht dispergierten Genvektoren sowie mit 200 ng (8) unklomplexierter Plasmid-DNA durchgeführt. Die Geltaschen 4 und 5 wurden nicht beladen.

In 96-Loch-Zellkulturplatten aus Polypropylen wurden Polymerfilme aus 500, 1000, 2000 und 4000 μg PDLLA und PLGA hergestellt, die jeweils geschützte Genvektoren mit Plasmid-Mengen von 0,078125; 0,15625; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5 und 10 μg pB-luc zur Expression von Luciferase enthielten. 7000 NIH/3T3 Zellen wurden appliziert und über den Kontakt mit geschützten Genvektoren transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurde, neben der Messung der metabolischen Aktivität, die Luciferase-Expression im Verhältnis zur Gesamt-Proteinmenge transfizierter Zellen bestimmt (s. Abb. 17 A, B). Die metabolische Aktivität transfizierter Zellen wurde nach einer 3-stündigen Inkubation mit WST[®]-1 (Roche, Mannheim, D) prozentual zur metabolischen Aktivität nicht-transfizierter Zellen bestimmt (s. Abb. 17 C, D). Auf diese Weise wurde der Einfluss der Polymer- und Plasmid-Mengen auf den Transfektionserfolg von NIH/3T3 Zellen über genaktivierte Oberflächen aus PDLLA und PLGA in 96-Loch-Zellkulturplatten untersucht.

PDLLA- und PLGA-Beschichtungen mit eingearbeiteten Genvektoren zeigten nach Transfektionen mit Plasmid-Mengen bis zu 0,3125 μg pB-luc steigende Luciferase-Expressionen in vergleichbarer Höhe. Beschichtungen mit 4000 μg PDLLA bzw. PLGA zeigten dabei die geringsten Luciferase-Expressionen. Mit einer Plasmid-Menge von 0,625 μg pB-luc in PDLLA- und PLGA-Beschichtungen aus 500, 1000 und 2000 μg Polymer wurden vergleichbare maximale Expressionen von Luciferase beobachtet. Für PDLLA fiel dieses

Expressionsmaximum bei der dünnsten Polymerschicht von 500 μg am höchsten aus und wurde durch steigende PDLLA-Mengen kontinuierlich reduziert.

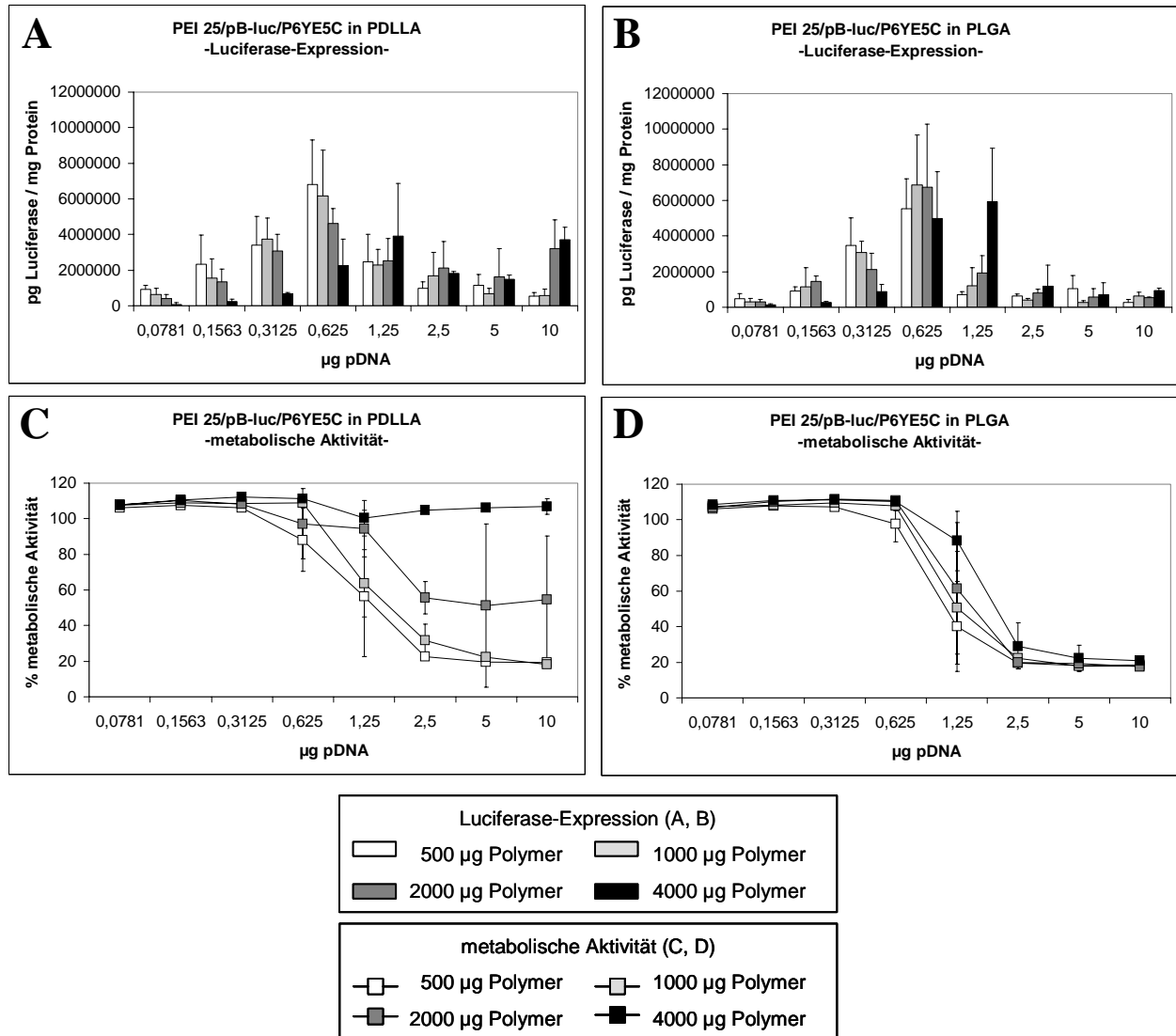


Abbildung 17: Transfektion von 7000 NIH/3T3 Zellen über genaktivierte Oberflächen aus PDLLA und PLGA. Geschützte Genvektoren bestehend aus PEI 25, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 8 wurden in Polymerfilme aus PDLLA und PLGA eingearbeitet. Als Plasmid-DNA wurde pB-luc zur Expression von Luciferase eingesetzt. Es wurden Beschichtungen aus 500, 1000, 2000 und 4000 μg Polymer hergestellt, die jeweils geschützte Genvektoren mit Plasmid-Mengen von 0,078125; 0,15625; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5 und 10 μg pB-luc enthielten. 48 Stunden nach Applikation und Transfektion von 7000 NIH/3T3 Zellen wurde die Luciferase-Expression bestimmt und im Verhältnis zur Protein-Gesamtmenge dargestellt (A, B). Die metabolische Aktivität transfizierter Zellen wurde nach einer 3-stündigen Inkubation mit WST[®]-1 (Roche, Mannheim, D) prozentual zur metabolischen Aktivität nicht-transfizierter Zellen bestimmt (C, D). Aus identischen Versuchsansätzen in dreifacher Ausführung wurden Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet.

Für Beschichtungen aus PLGA wurde maximale Luciferase-Expression mit einer Plasmid-Menge von 0,625 µg pB-luc unabhängig von der Polymerkonzentration beobachtet. Mit einer genaktivierten Oberfläche aus 4000 µg PDLLA bzw. PLGA wurde erst mit einer Plasmid-Menge von 1,25 µg pB-luc eine maximale Luciferase-Expression erreicht. Bei Plasmid-Mengen größer 0,625 µg pB-luc wurden für Beschichtungen aus PDLLA und PLGA unterschiedliche Luciferase-Expressionen beobachtet. Genaktivierte Oberflächen aus 500 und 1000 µg PDLLA zeigten durch Steigerung der Plasmid-Menge auf bis zu 10 µg pB-luc einen kontinuierlichen Abfall der Luciferase-Expression. Diese Tendenz wurde auch bei einer PDLLA-Menge von 2000 µg beobachtet. Allerdings wurde hier bei der hohen Plasmid-Menge von 10 µg pB-luc eine leicht erhöhte Luciferase-Expression beobachtet. Auch bei einer PDLLA-Menge von 4000 µg konnte mit einer Plasmid-Menge von 10 µg pB-luc eine erhöhte Luciferase-Expression beobachtet werden. Genaktivierte Oberflächen aus PLGA zeigten generell durch Steigerung der Plasmid-Menge auf bis zu 10 µg pB-luc einen kontinuierlichen Abfall der Luciferase-Expression. Die metabolische Aktivität transfizierter Zellen, blieb unabhängig von der PDLLA- und PLGA-Konzentration bis zu einer Plasmid-Menge von 0,3125 µg unbeeinflusst (s. Abb. 17 C, D). Ein weiterer Anstieg von Plasmid-DNA in den genaktivierten Oberflächen aus PDLLA und PLGA führte zu unterschiedlichen Einflüssen auf die metabolische Aktivität. In Beschichtungen aus PDLLA führte eine Steigerung der Plasmid-Menge in Abhängigkeit der PDLLA-Konzentration zu einem Abfall der metabolischen Aktivität (s. Abb. 17 C). Dieser Effekt zeigte sich bei transfizierten Zellen mit der geringsten Polymermenge von 500 µg PDLLA am deutlichsten und wurde durch Steigerung der Polymermengen bis zu 4000 µg PDLLA kontinuierlich abgeschwächt. Bei der hohen Polymermenge von 4000 µg PDLLA blieb die metabolische Aktivität bei maximaler Plasmid-Menge von 10 µg pB-luc unbeeinflusst. In Beschichtungen aus PLGA führte eine Steigerung der Plasmid-Menge unabhängig von der eingesetzten Polymer-Konzentration generell zu einem Abfall der metabolischen Aktivität (s. Abb. 17 D). Ausschließlich bei einer Plasmid-Menge von 1,25 µg pB-luc wurde eine Reduzierung der metabolischen Aktivität in Abhängigkeit der PLGA-Menge beobachtet. NIH/3T3 Zellen ließen sich erfolgreich über genaktivierte Oberflächen aus PDLLA und PLGA transfizieren. Für maximale Luciferase-Expression wurden geschützte Genvektoren mit einer Plasmid-Menge von 0,625 µg pB-luc benötigt, die mit einer optimalen Polymermenge von 500, 1000 und 2000 µg formuliert wurden. Eine Steigerung der Plasmid-Menge über den Optimalbereich hinaus führte aufgrund toxischer Konzentrationen zum Abfall der metabolischer Aktivität und der Luciferase-Expression.

3.3.2. Bestimmung der Transfektionseffizienz

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden 7000 NIH/3T3 Zellen mit geschützten Genvektoren bestehend aus PEI 25, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 8 über genaktivierte Oberflächen aus PDLLA und PLGA transfiziert. In 96-Loch-Zellkulturplatten aus Polypropylen wurden Genvektoren mit 0,625 µg Plasmid-DNA pEGFP-N1 zur Expression des Reportergens *green fluorescent protein* (GFP) in 1000 und 2000 µg PDLLA bzw. PLGA eingearbeitet. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden nach Transfektion wurde GFP-Expression über genaktivierte Oberflächen aus PDLLA (s. Abb. 18) bzw. PLGA (s. Abb. 19) im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen und dokumentiert. Im Anschluss daran wurden NIH/3T3 Zellen von den Polymeroberflächen abgelöst, mit Propidiumjodid gefärbt und mittels FACS-Analyse (FACS Vantage, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) die Transfektionseffizienz der Versuchsansätze mit PDLLA (s. Abb. 20) bzw. PLGA (s. Abb. 21) bestimmt.

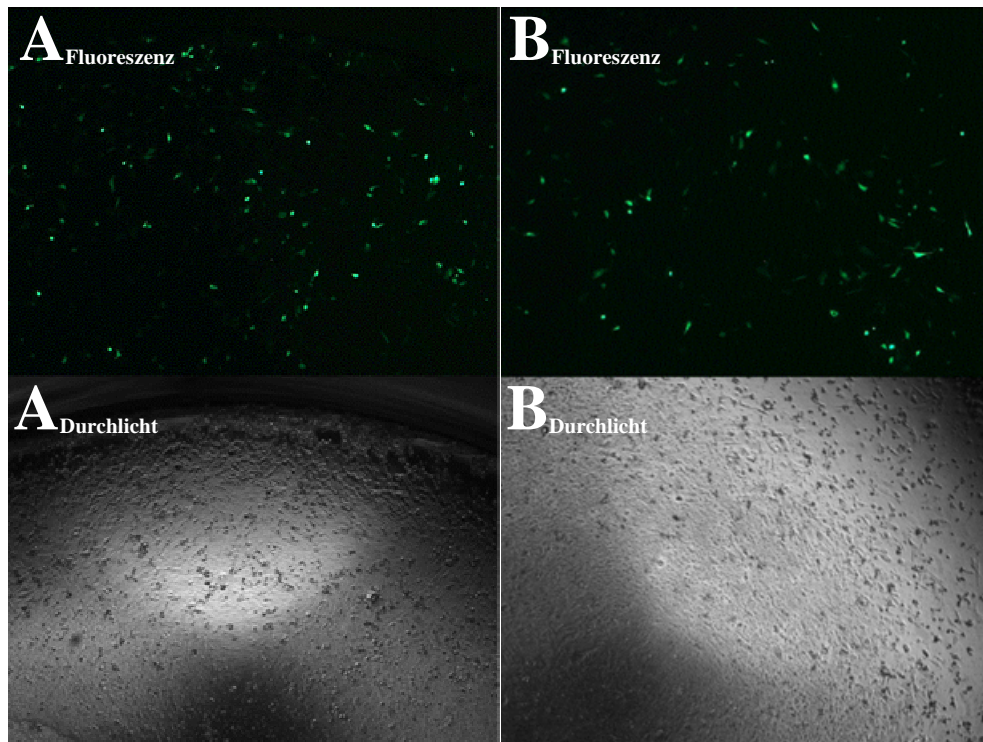


Abbildung 18: Transfektion von 7000 NIH/3T3 Zellen über genaktivierte Oberflächen aus PDLLA. Geschützte Genvektoren bestehend aus PEI 25, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 8 wurden in Polymerfilme aus 1000 µg (A) und 2000 µg (B) PDLLA eingearbeitet. Es wurden jeweils Genvektoren mit einer Plasmid-Menge von 0,625 µg pEGFP-N1 zur Expression von *green fluorescent protein* (GFP) eingesetzt. Korrespondierende Aufnahmen nach Kontrolle im Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop (x 40), zeigten GFP-positive Zellen ($A_{\text{Fluoreszenz}}$, $B_{\text{Fluoreszenz}}$) und ihre Lokalisation auf der genaktivierten Oberfläche PDLLA ($A_{\text{Durchlicht}}$, $B_{\text{Durchlicht}}$) 48 Stunden nach Transfektion.

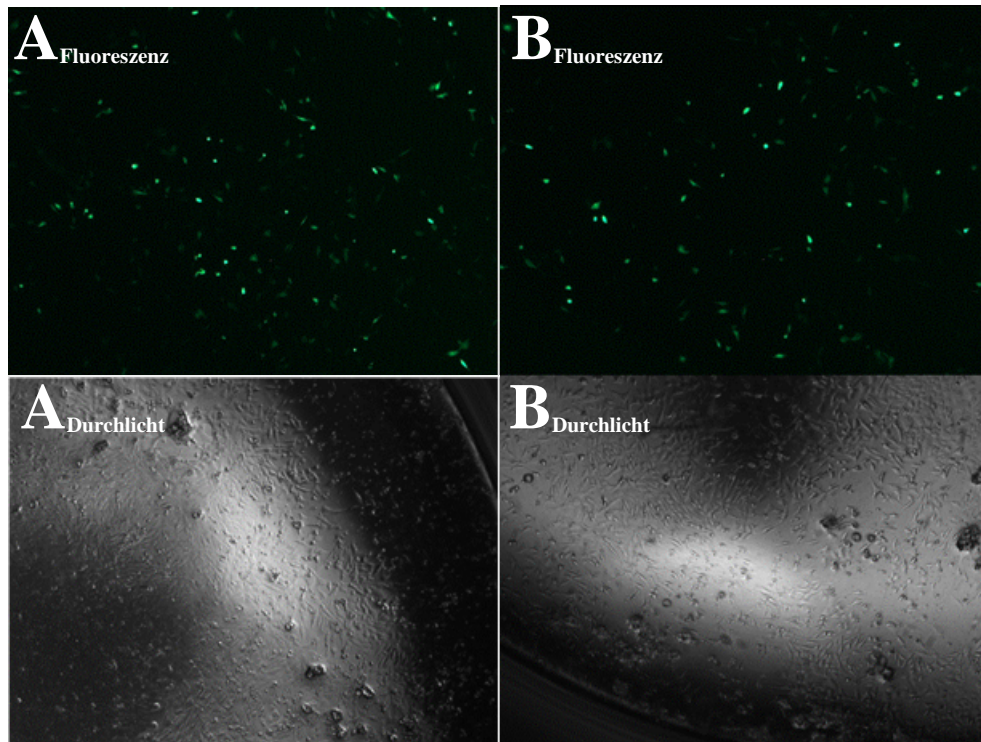


Abbildung 19: Transfektion von 7000 NIH/3T3 Zellen über genaktivierte Oberflächen aus PLGA. Geschützte Genvektoren bestehend aus PEI 25, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 8 wurden in Polymerfilme aus 1000 µg (A) und 2000 µg (B) PLGA eingearbeitet. Es wurden jeweils Genvektoren mit einer Plasmid-Menge von 0,625 µg pEGFP-N1 zur Expression von *green fluorescent protein* (GFP) eingesetzt. Korrespondierende Aufnahmen nach Kontrolle im Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop (x 40), zeigten GFP-positive Zellen (A_{Fluoreszenz}, B_{Fluoreszenz},) und ihre Lokalisation auf der genaktivierten Oberfläche PLGA (A_{Durchlicht}, B_{Durchlicht}) 48 Stunden nach Transfektion.

Nach der Transfektion von 7000 NIH/3T3 Zellen über genaktivierte Oberflächen aus PDLLA mit einer Plasmid-Menge von 0,625 µg pEGFP-N1 wurde mittels FACS-Analyse im Versuchsansatz mit 1000 µg PDLLA eine Transfektionseffizienz von 21,41 % (s. Abb. 20 B) bzw. mit 2000 µg PDLLA eine Transfektionseffizienz von 23,55 % (s. Abb. 20 D) bestimmt.

Nach der Transfektion von 7000 NIH/3T3 Zellen über genaktivierte Oberflächen aus PLGA mit einer Plasmid-Menge von 0,625 µg pEGFP-N1, wurde mittels FACS-Analyse im Versuchsansatz mit 1000 µg PLGA eine Transfektionseffizienz von 11,50 % (s. Abb. 21 B) bzw. mit 2000 µg PLGA eine Transfektionseffizienz von 9,36 % (s. Abb. 21 D) bestimmt.

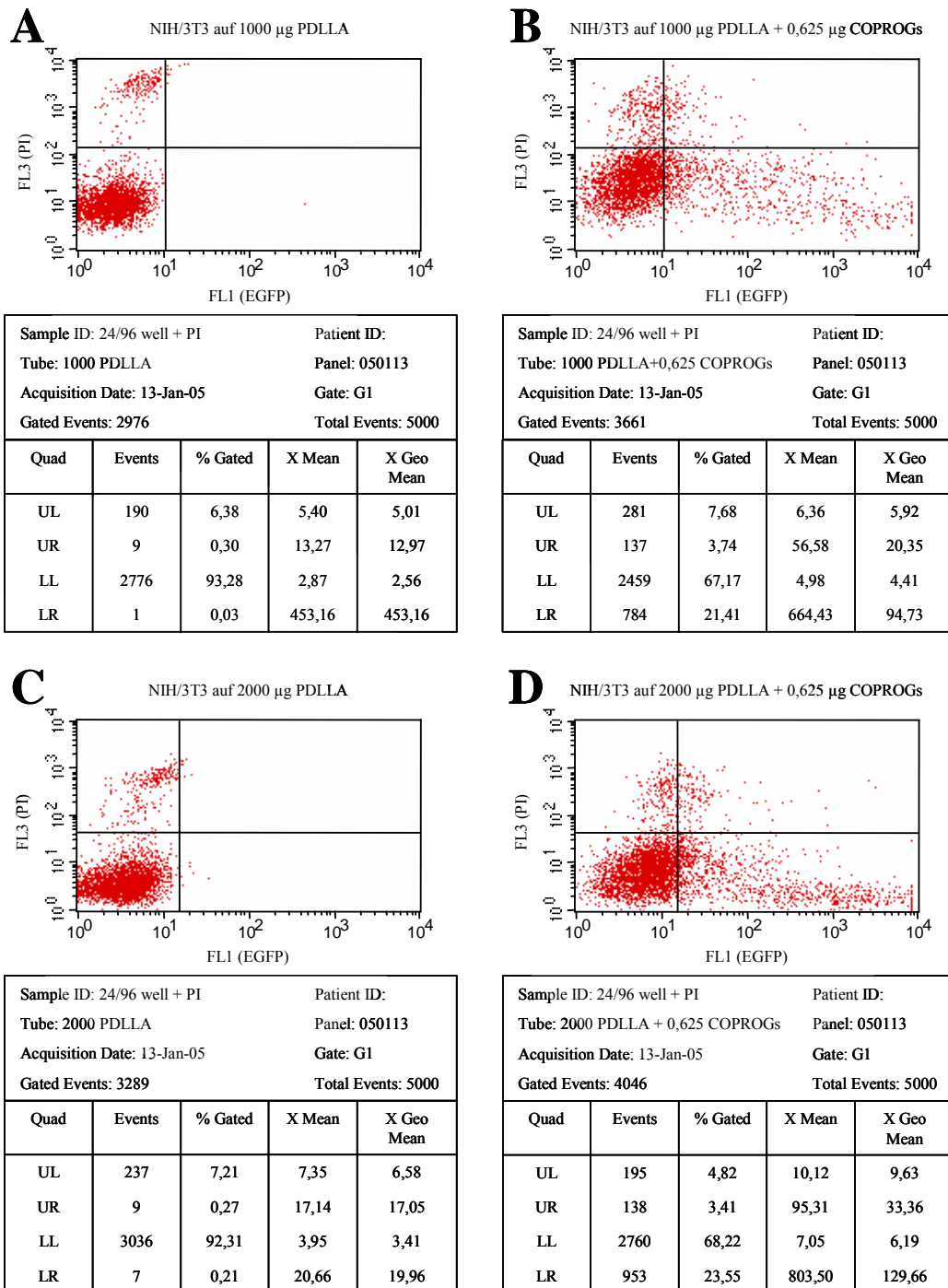


Abbildung 20: Graphische und numerische Darstellung nach FACS-Analyse von 5000 NIH/3T3 Zellen 48 Stunden nach Transfektion über 1000 μg (A) bzw. 2000 μg (C) PDLLA ohne Genvektoren sowie über 1000 μg (B) bzw. 2000 μg (D) PDLLA mit Genvektoren, bestehend aus PEI 25, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 8. Es wurden jeweils Genvektoren mit 0,625 μg Plasmid-DNA pEGFP-N1 zur Expression von *green fluorescent protein* (GFP) eingesetzt. Zellen wurden vor der Messung mit Propidium-Jodid (PI) gefärbt. Entlang der y-Achse wurde PI-Fluoreszenz detektiert. Oberhalb des Schnittpunkts der waagerechten Begrenzungslinie mit der y-Achse wurden Ereignisse als PI-positiv gewertet und entsprachen der Anzahl zerstörter Zellen. Entlang der x-Achse wurde GFP-Fluoreszenz detektiert. Oberhalb des Schnittpunkts der senkrechten Begrenzungslinie mit der x-Achse wurden Ereignisse als GFP-positiv gewertet und entsprachen der Anzahl transfizierter Zellen.

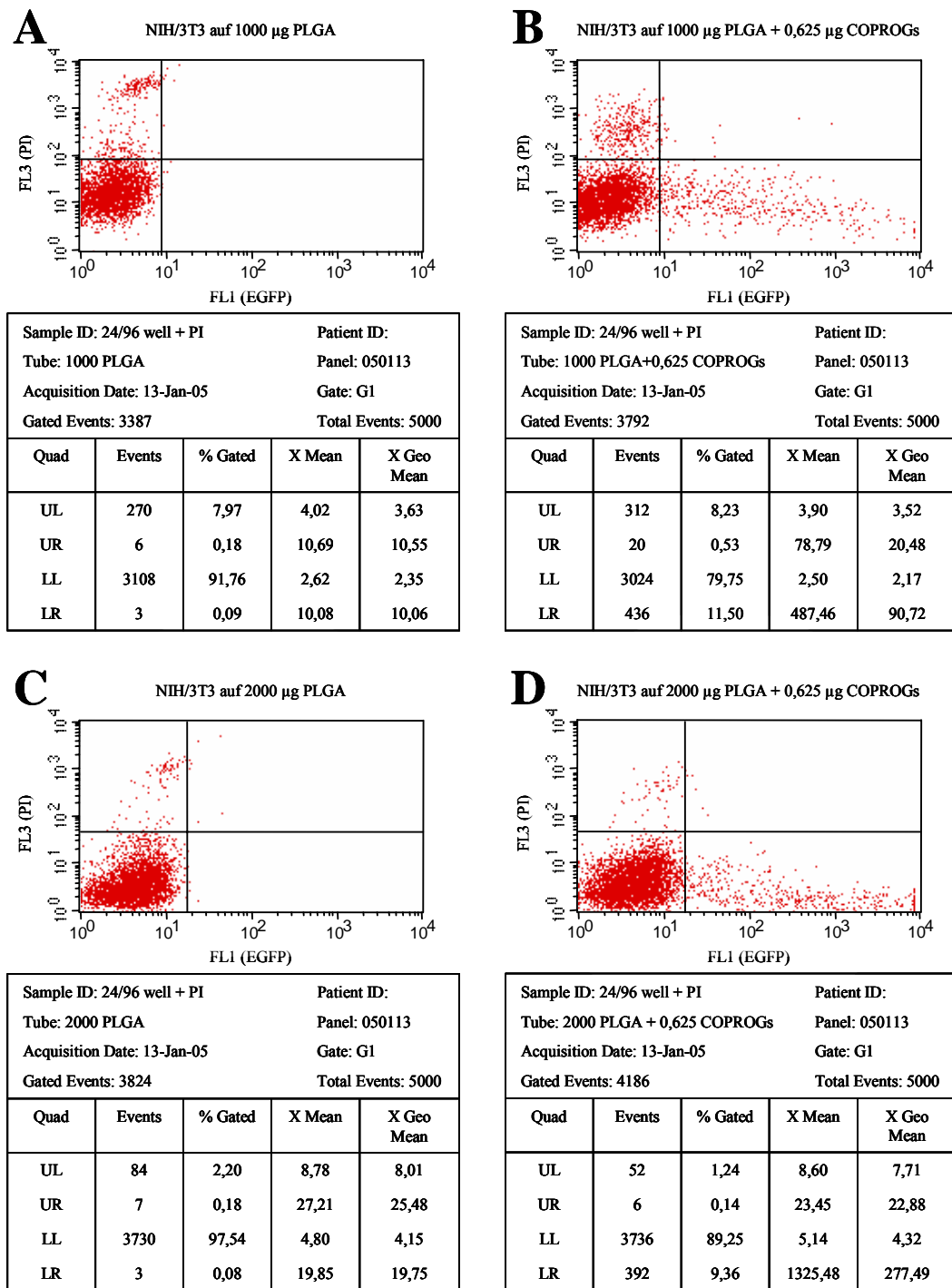


Abbildung 21: Graphische und numerische Darstellung nach FACS-Analyse von 5000 NIH/3T3 Zellen 48 Stunden nach Transfektion über 1000 μ g (A) bzw. 2000 μ g (C) PLGA ohne Genvektoren sowie über 1000 μ g (B) bzw. 2000 μ g (D) PLGA mit Genvektoren, bestehend aus PEI 25, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 8. Es wurden jeweils Genvektoren mit 0,625 μ g Plasmid-DNA pEGFP-N1 zur Expression von *green fluorescent protein* (GFP) eingesetzt. Zellen wurden vor der Messung mit Propidium-Jodid (PI) gefärbt. Entlang der y-Achse wurde PI-Fluoreszenz detektiert. Oberhalb des Schnittpunkts der waagerechten Begrenzungslinie mit der y-Achse wurden Ereignisse als PI-positiv gewertet und entsprachen der Anzahl zerstörter Zellen. Entlang der x-Achse wurde GFP-Fluoreszenz detektiert. Oberhalb des Schnittpunkts der senkrechten Begrenzungslinie mit der x-Achse wurden Ereignisse als GFP-positiv gewertet und entsprachen der Anzahl transfizierter Zellen.

3.3.3. Freisetungsverhalten von Plasmid-DNA und PEI 25

Zur Untersuchung der Freisetzung von Plasmid-DNA und PEI 25 aus genaktivierten Oberflächen PDLLA und PLGA wurden Genvektoren bestehend aus radioaktiv-markiertem PEI 25, radioaktiv-markierter Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 8 hergestellt und in 96-Loch-Zellkulturplatten aus Polypropylen in Polymerschichten aus PDLLA und PLGA eingearbeitet. Das Polykation PEI 25 wurde mit radioaktivem Jod¹³¹ (I^{131}) und Plasmid-DNA pB-luc mit radioaktivem Jod¹²⁵ (I^{125}) markiert. Die unterschiedliche Markierung von PEI 25 und Plasmid-DNA ermöglichte die individuelle Detektion der Komponenten während der Freisetzungsversuche und gab Aufschluss über parallele oder unabhängige Freisetzung der Genvektor-Bestandteile. In genaktivierten Oberflächen aus 500, 1000, 2000 und 4000 μg PDLLA bzw. PLGA wurden jeweils Genvektoren mit 0,625; 1,25; 2,5 und 5 μg Plasmid-DNA pB-luc eingearbeitet und unter Standardbedingungen in Zellkulturmedium Duplecco's Modified Eagle's Medium (Biochrom AG, Berlin, D) inkubiert. Über einen Zeitraum von 4 Wochen, wurde nach 1, 2, 4, 24, 48, 72, 168, 240, 336, 504 und 672 Stunden Inkubationszeit die Radioaktivität der freigesetzten Menge an Plasmid-DNA, sowie an freigesetztem PEI 25 in den Versuchsüberständen gemessen. Die Freisetzung von Plasmid-DNA aus PDLLA und PLGA wurde prozentual zur eingesetzten Plasmid-Menge als kumulative (s. Abb. 22) und direkte Darstellung der einzelnen Messwerte (s. Abb. 23) gegenübergestellt. Zusätzlich wurden die Absolutmengen freigesetzter Plasmid-DNA aus PDLLA und PLGA kumulativ dargestellt (s. Abb. 24). Entsprechend wurde die Freisetzung von PEI 25 aus PDLLA und PLGA prozentual zur eingesetzten PEI 25-Menge als kumulative (s. Abb. 25) und direkte Darstellung der einzelnen Messwerte (s. Abb. 26) gegenübergestellt. Zusätzlich wurden die Absolutmengen des freigesetzten PEI 25 aus PDLLA und PLGA kumulativ dargestellt (s. Abb. 27). Mit definierten Konzentrationen von I^{125} -markierter Plasmid-DNA und I^{131} -markiertem PEI 25 als Standardsubstanzen wurden die formulierten Plasmid- und PEI 25-Mengen in genaktivierten Oberflächen aus PDLLA und PLGA bestimmt. Statt gewünschten Plasmid-Mengen von 0,625; 1,25; 2,5 und 5 μg Plasmid-DNA wurden effektiv nur 0,36; 0,78; 1,59 und 3,30 μg Plasmid-DNA formuliert. Die reduzierten Plasmid-Mengen wurden in den folgenden Darstellungen berücksichtigt. Die entsprechenden PEI 25-Mengen wurden mit 0,37; 0,83; 1,65 und 3,44 μg PEI 25 bestimmt. Das Verhältnis zwischen PEI 25- und Plasmid-DNA-Freisetzung aus PDLLA und PLGA wurde durch die Darstellung der N/P-Ratio freigesetzter Genvektorformulierungen untersucht (s. Abb. 28).

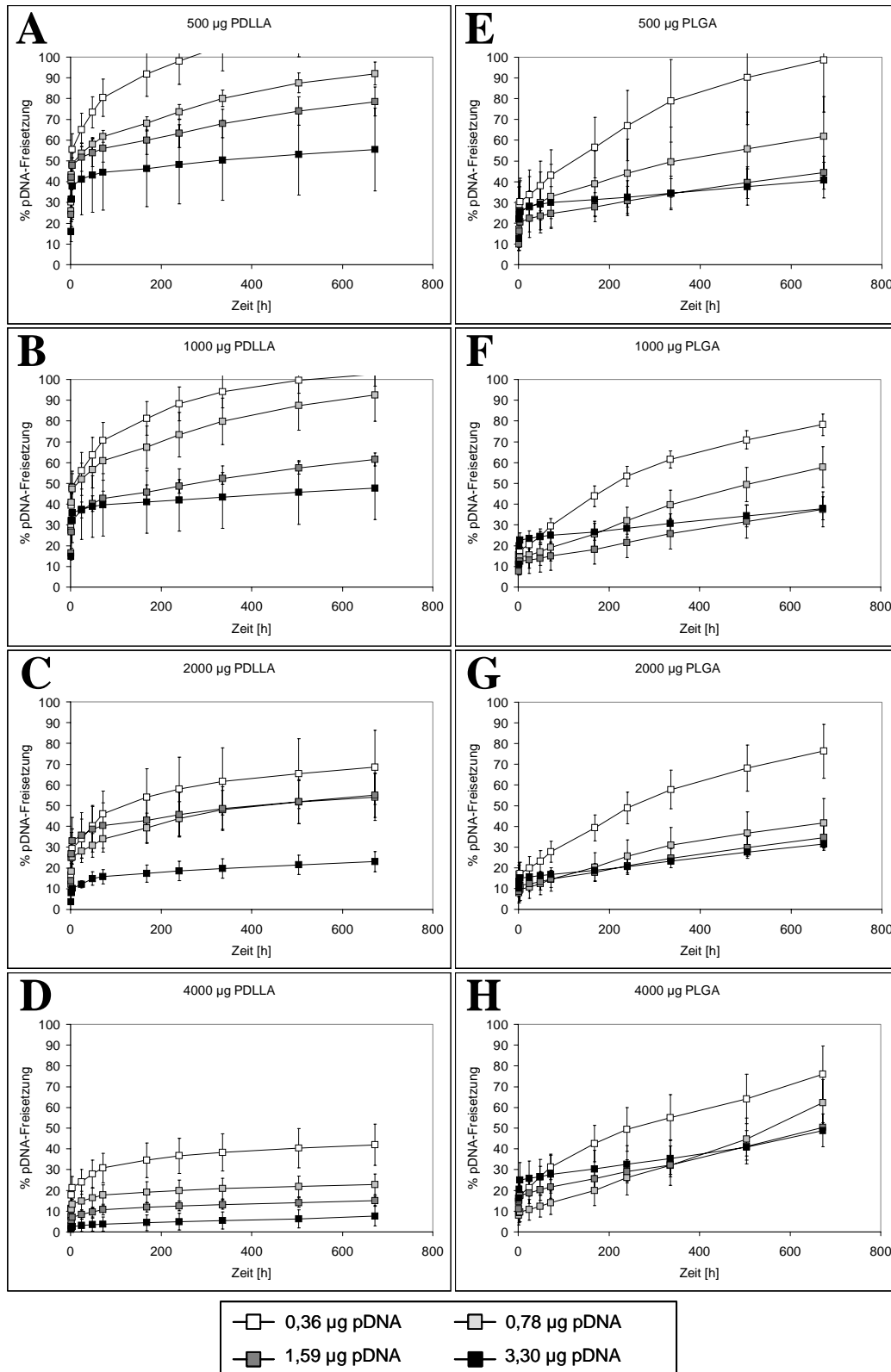


Abbildung 22: Kumulative Freisetzung von I^{125} -markierter Plasmid-DNA aus genaktivierten Oberflächen PDLLA (A-D) und PLGA (E-H). In Polymerschichten aus 500, 1000, 2000 und 4000 μg PDLLA bzw. PLGA wurden jeweils Genvektoren mit einem Anteil von 0,36; 0,78; 1,59 und 3,30 μg Plasmid-DNA eingearbeitet und über einen Zeitraum von 4 Wochen inkubiert. Die Freisetzung von I^{125} -markierter Plasmid-DNA wurde nach einer Inkubationszeit von 1, 2, 4, 24, 48, 72, 168, 240, 336, 504 und 672 Stunden (x-Achse) in den Versuchsüberständen detektiert und prozentual zur eingesetzten Plasmid-Menge (y-Achse) dargestellt.

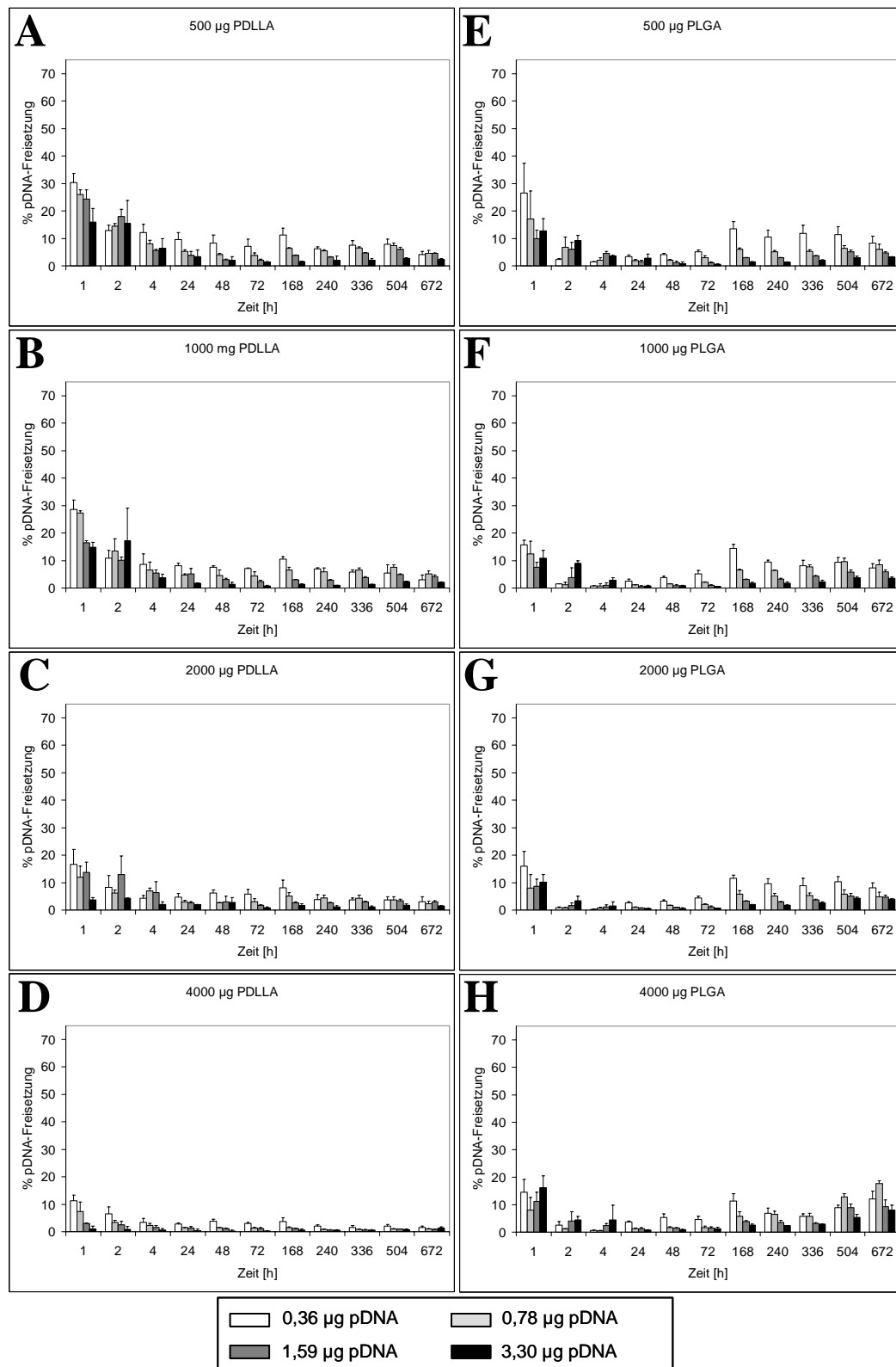


Abbildung 23: Freisetzung von I^{125} -markierter Plasmid-DNA aus genaktivierten Oberflächen PDLLA (A-D) und PLGA (E-H) zu den entsprechenden Messzeitpunkten. In Polymerschichten aus 500, 1000, 2000 und 4000 µg PDLLA bzw. PLGA wurden jeweils Genvektoren mit einem Anteil von 0,36; 0,78; 1,59 und 3,30 µg Plasmid-DNA eingearbeitet und über einen Zeitraum von 4 Wochen inkubiert. Die Freisetzung von I^{125} -markierter Plasmid-DNA wurde nach einer Inkubationszeit von 1, 2, 4, 24, 48, 72, 168, 240, 336, 504 und 672 Stunden (x-Achse) in den Versuchsüberständen detektiert und prozentual zur eingesetzten Plasmid-Menge (y-Achse) dargestellt.

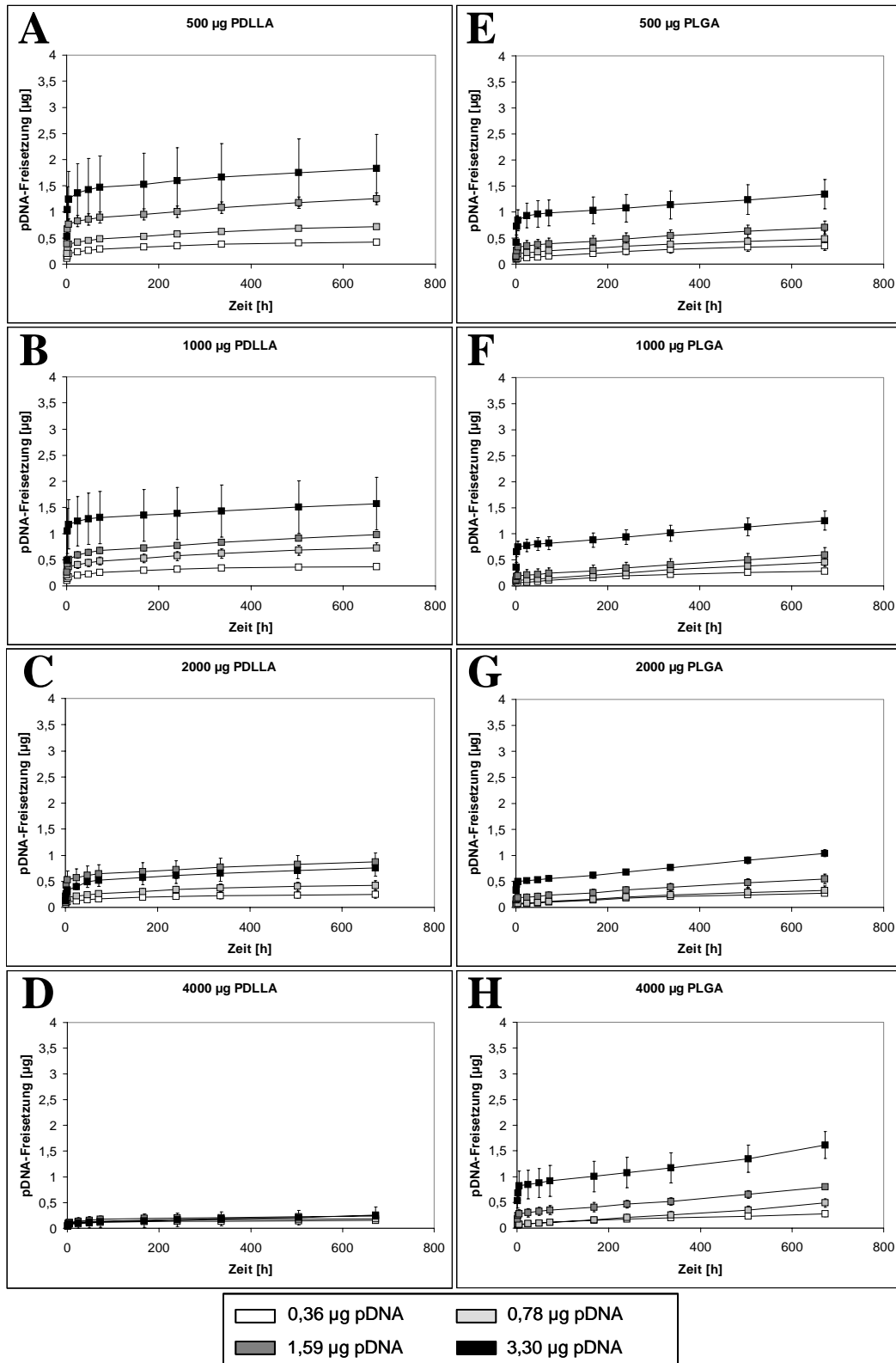


Abbildung 24: Kumulative Freisetzung von I^{125} -markierter Plasmid-DNA aus genaktivierten Oberflächen PDLLA (A-D) und PLGA (E-H). In Polymerschichten aus 500, 1000, 2000 und 4000 μg PDLLA bzw. PLGA wurden jeweils Genvektoren mit einem Anteil von 0,36; 0,78; 1,59 und 3,30 μg Plasmid-DNA eingearbeitet und über einen Zeitraum von 4 Wochen inkubiert. Die Freisetzung von I^{125} -markierter Plasmid-DNA wurde nach einer Inkubationszeit von 1, 2, 4, 24, 48, 72, 168, 240, 336, 504 und 672 Stunden (x-Achse) in den Versuchsüberständen detektiert und in Absolutmengen [μg] dargestellt (y-Achse).

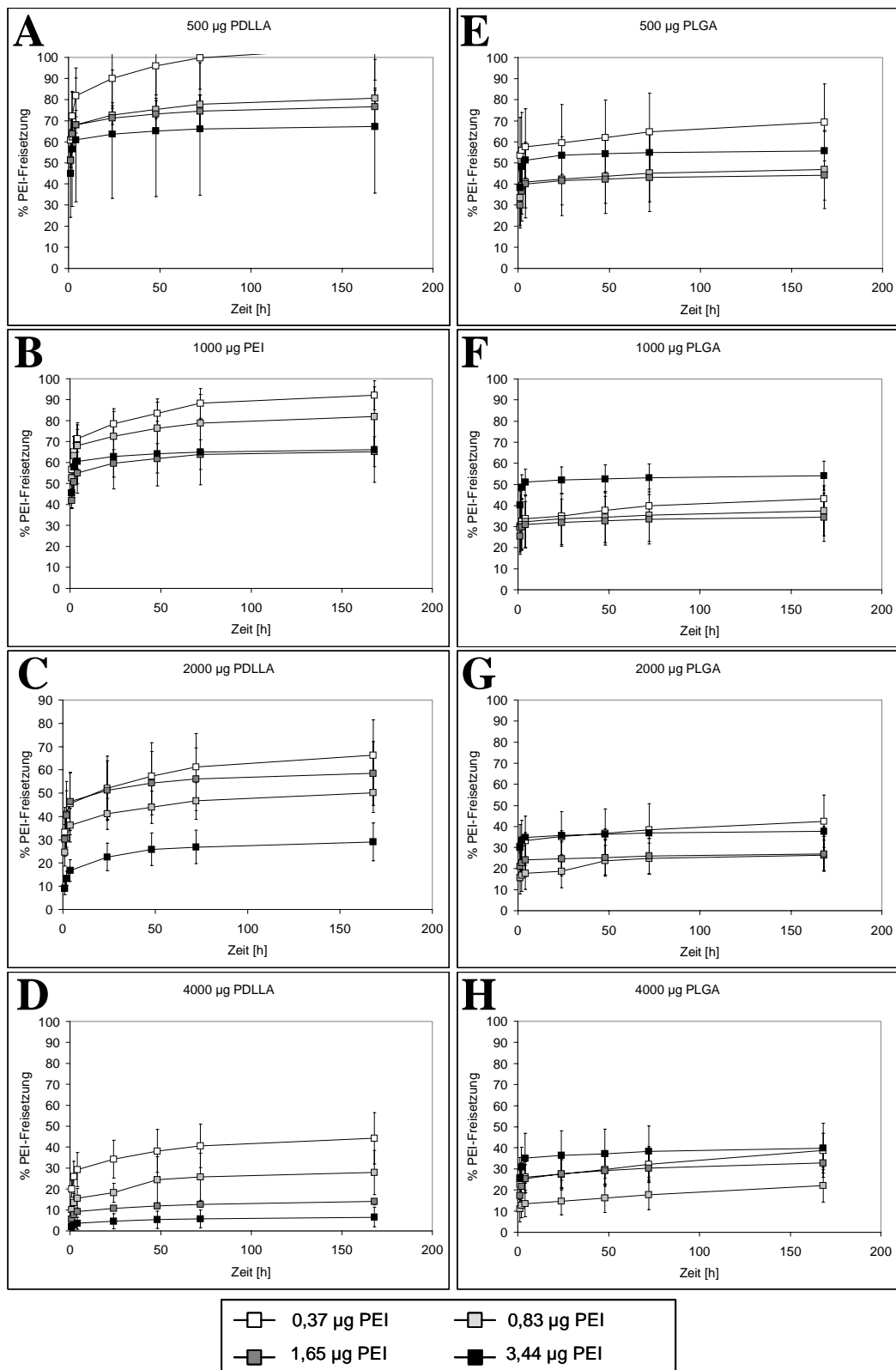


Abbildung 25: Kumulative Freisetzung von I^{131} -markiertem PEI 25 aus genaktivierten Oberflächen PDLLA (A-D) und PLGA (E-H). In Polymerschichten aus 500, 1000, 2000 und 4000 μg PDLLA bzw. PLGA wurden jeweils Genvektoren mit einem Anteil von 0,37; 0,83; 1,65 und 3,44 μg PEI 25 eingearbeitet und über einen Zeitraum von 4 Wochen inkubiert. Die Freisetzung von I^{131} -markiertem PEI 25 wurde nach einer Inkubationszeit von 1, 2, 4, 24, 48, 72 und 168 Stunden (x-Achse) in den Versuchsüberständen detektiert und prozentual zur eingesetzten PEI 25-Menge (y-Achse) dargestellt.

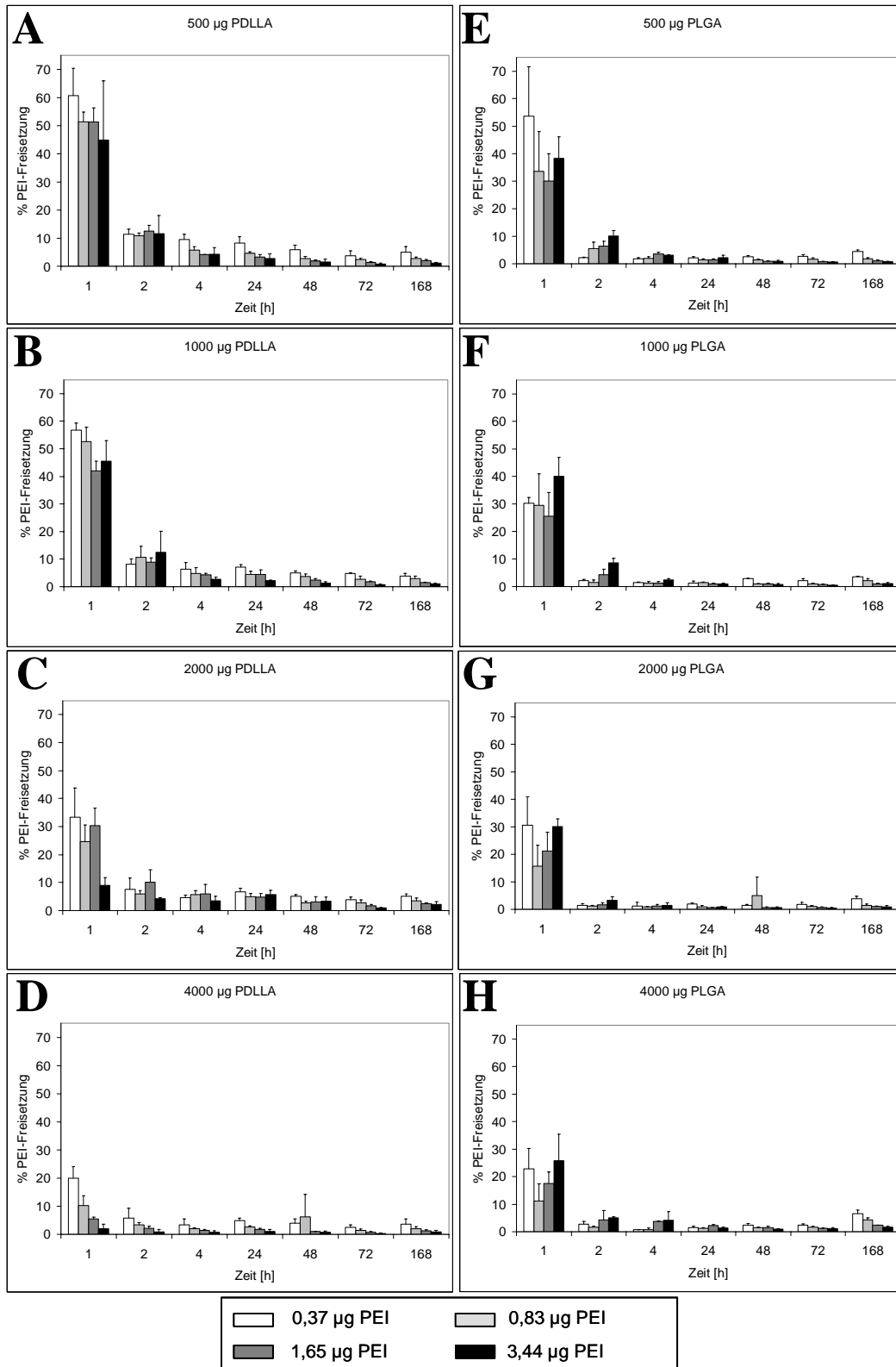


Abbildung 26: Freisetzung von I^{131} -markiertem PEI 25 aus genaktivierten Oberflächen PDLLA (A-D) und PLGA (E-H) zu den entsprechenden Messzeitpunkten. In Polymerschichten aus 500, 1000, 2000 und 4000 µg PDLLA bzw. PLGA wurden jeweils Genvektoren mit einem Anteil von 0,37; 0,83; 1,65 und 3,44 µg PEI 25 eingearbeitet und über einen Zeitraum von 4 Wochen inkubiert. Die Freisetzung von I^{131} -markiertem PEI 25 wurde nach einer Inkubationszeit von 1, 2, 4, 24, 48, 72 und 168 Stunden (x-Achse) in den Versuchsüberständen detektiert und prozentual zur eingesetzten PEI 25-Menge (y-Achse) dargestellt.

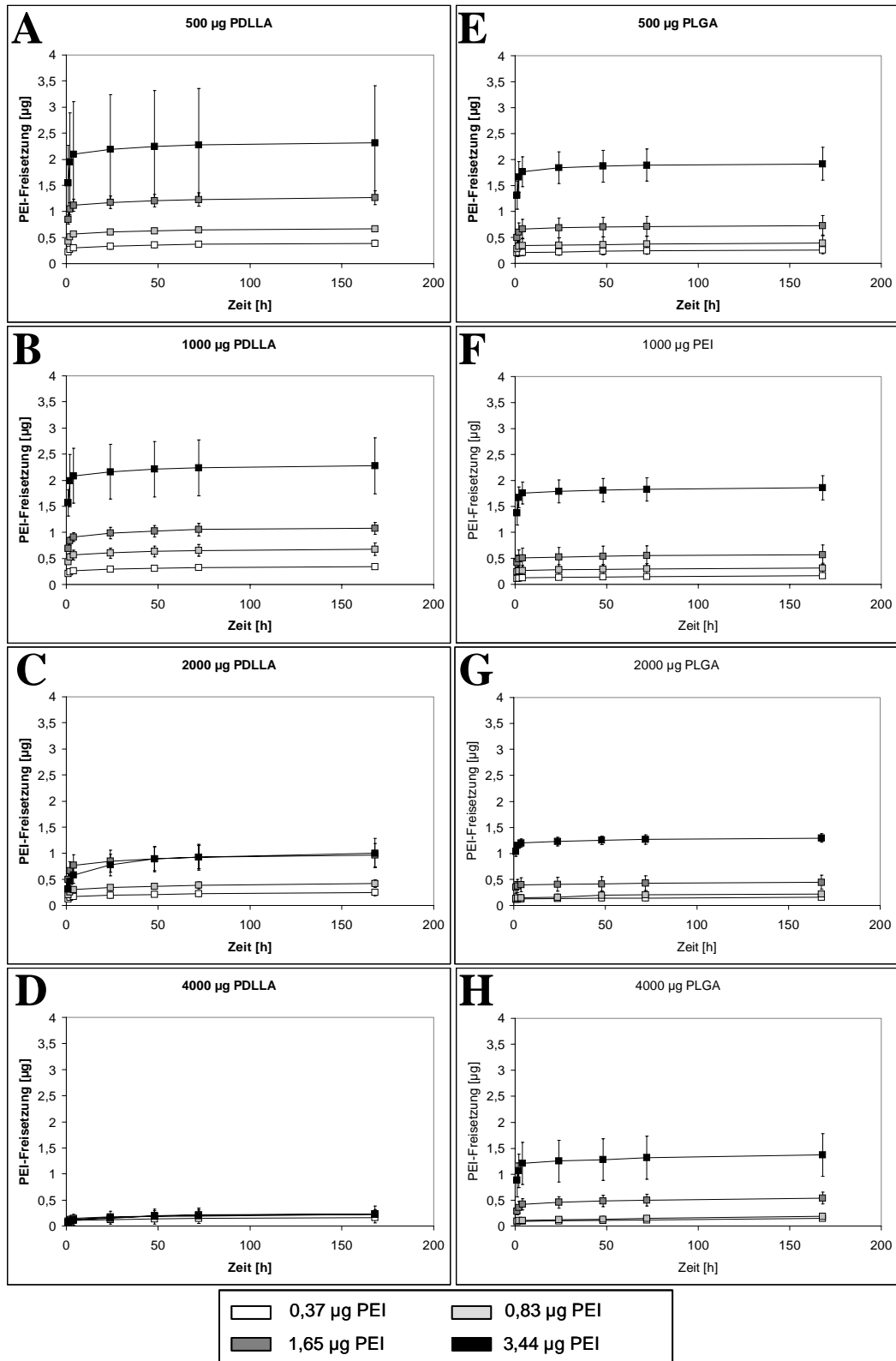


Abbildung 27: Kumulative Freisetzung von I^{131} -markiertem PEI 25 aus genaktivierten Oberflächen PDLLA (A-D) und PLGA (E-H). In Polymerschichten aus 500, 1000, 2000 und 4000 µg PDLLA bzw. PLGA wurden jeweils Genvektoren mit einem Anteil von 0,37; 0,83; 1,65 und 3,44 µg PEI 25 eingearbeitet und über einen Zeitraum von 4 Wochen inkubiert. Die Freisetzung von I^{131} -markiertem PEI 25 wurde nach einer Inkubationszeit von 1, 2, 4, 24, 48, 72 und 168 Stunden (x-Achse) in den Versuchüberständen detektiert und in Absolutmengen [µg] dargestellt (y-Achse).

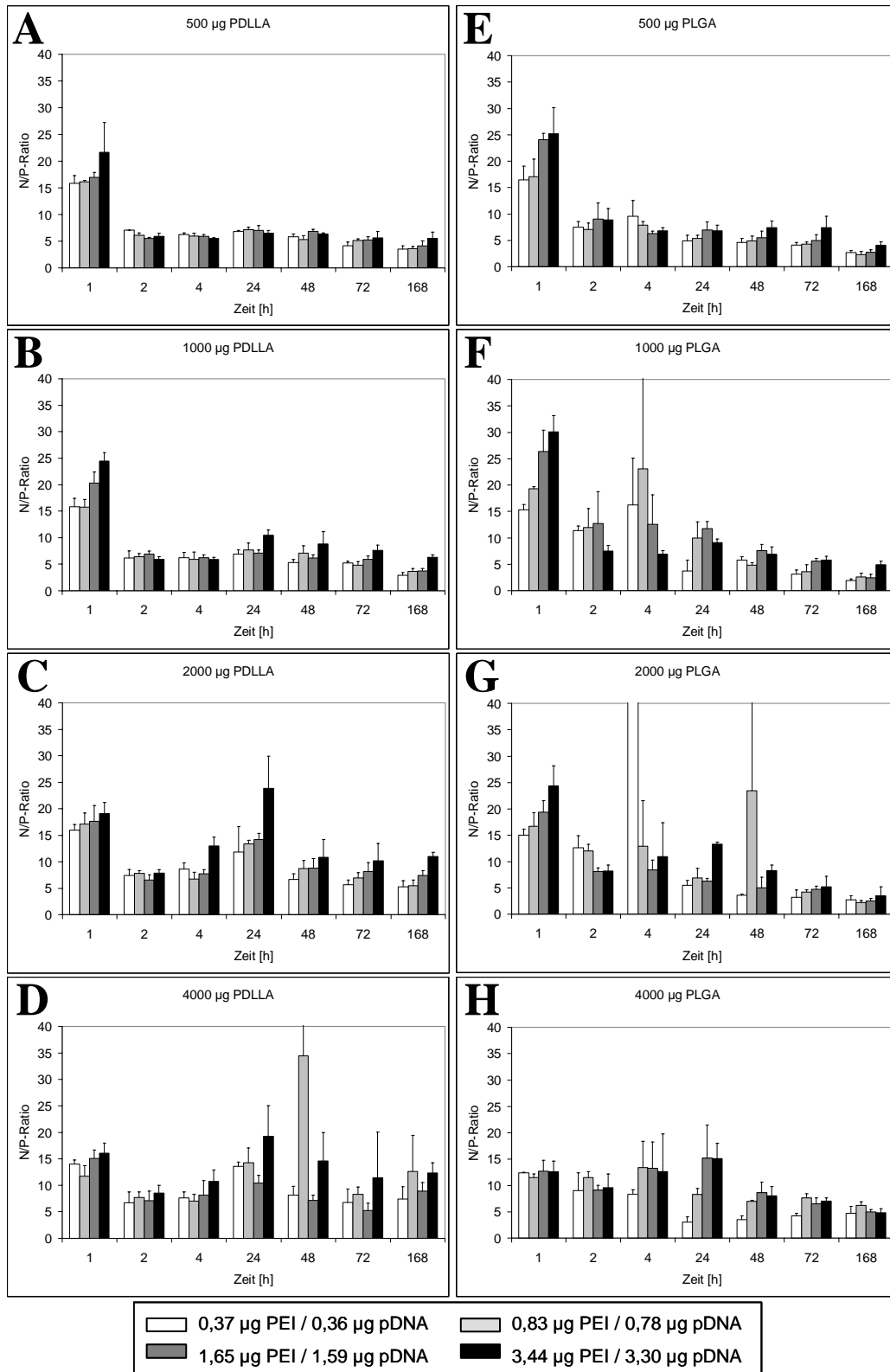


Abbildung 28: Darstellung der N/P-Ratio freigesetzter Genvektorformulierungen aus genaktivierten Oberflächen PDLLA (A-D) und PLGA (E-H) zu den entsprechenden Messzeitpunkten. In Polymerschichten aus 500, 1000, 2000 und 4000 µg PDLLA bzw. PLGA wurden jeweils Genvektorformulierungen in den jeweiligen Verhältnissen von 0,37/0,36, 0,83/0,78, 1,65/1,59, 3,44/3,30 [µg PEI/µg pDNA] eingearbeitet und über einen Zeitraum von 4 Wochen inkubiert. Die Freisetzung der eingesetzten Genvektorformulierungen wurde nach einer Inkubationszeit von 1, 2, 4, 24, 48, 72 und 168 Stunden (x-Achse) in den Versuchsüberständen detektiert und N/P-Ratio (y-Achse) dargestellt. Die ursprünglich eingesetzten Genvektoren wurden mit N/P-Ratio 8 formuliert.

Es wurde ein deutlicher Unterschied zwischen der prozentualen Freisetzung radioaktiv-markierter Plasmid-DNA aus PDLLA und PLGA beobachtet. Die Freisetzung von Plasmid-DNA aus PDLLA verlief abhängig von der eingesetzten Plasmid- und PDLLA-Konzentration (s. Abb. 22 A-D). Mit der niedrigsten Plasmid-Menge von 0,36 µg pB-luc, wurde bei den unterschiedlichen PDLLA-Konzentrationen prozentual am meisten Plasmid-DNA freigesetzt. Je höher die eingesetzte Plasmid-Menge bei der jeweiligen Menge an PDLLA war, desto geringer verlief die prozentuale Plasmid-Freisetzung. Einzige Ausnahme stellte die im Verhältnis leicht erhöhte prozentuale Freisetzung von 1,59 µg Plasmid-DNA aus 2000 µg PDLLA dar. Zusätzlich wurde eine PDLLA-abhängige Freisetzung von radioaktiv-markierter Plasmid-DNA aus PDLLA beobachtet. Im direkten Vergleich konstanter Plasmid-Mengen wurde beobachtet, dass prozentual mehr Plasmid-DNA aus der geringsten PDLLA-Konzentration von 500 µg freigesetzt wurde. Je höher die eingesetzte PDLLA-Menge bei konstanter Plasmid-Menge war, desto geringer verlief die prozentuale Plasmid-Freisetzung. Die kumulative Darstellung freigesetzter Absolutmengen von Plasmid-DNA bestätigte eine deutliche Abhängigkeit zwischen Reduzierung der Plasmid-DNA-Freisetzung und Steigerung der PDLLA-Mengen (s. Abb. 24 A-D). Die prozentuale Freisetzung radioaktiv-markierter Plasmid-DNA aus PDLLA zu den entsprechenden Messzeitpunkten (s. Abb. 23 A-D) zeigte für alle Plasmid- und PDLLA-Konzentrationen bereits am ersten Auswertungszeitpunkt nach 1 Stunde Inkubationszeit eine maximale Plasmid-Freisetzung („*initial burst*“). Im weiteren Verlauf der Untersuchung wurde ein konstanter Abfall der Plasmid-Freisetzung aus PDLLA beobachtet. Die Höhe der maximalen Plasmid-Freisetzung nach 1 Stunde Inkubationszeit nahm mit steigender PDLLA-Menge konstant ab.

Die Freisetzung von radioaktiv-markierter Plasmid-DNA aus PLGA verlief vergleichsweise unabhängig von den eingesetzten PLGA-Konzentrationen (s. Abb. 22 E-H, 24 E-H). Es konnten lediglich geringe Einflüsse der eingesetzten Plasmid-Menge auf die Freisetzung von Plasmid-DNA beobachtet werden. Mit der niedrigsten Plasmid-Menge von 0,36 µg pB-luc wurde bei den unterschiedlichen PLGA-Konzentrationen prozentual am meisten Plasmid-DNA freigesetzt. Mit Plasmid-Mengen von 0,78; 1,59 und 3,30 µg pB-luc wurden unabhängig der PLGA-Konzentration vergleichbare prozentuale Freisetzungen von Plasmid-DNA beobachtet. Ausnahmen stellten die im Verhältnis leicht erhöhten prozentualen Freisetzungen von 0,78 µg Plasmid-DNA aus 500 und 1000 µg PLGA dar. Eine PLGA-abhängige Freisetzung von radioaktiv-markierter Plasmid-DNA aus PLGA konnte gegenüber PDLLA nicht beobachtet werden. Im direkten Vergleich der prozentualen Freisetzung von Plasmid-DNA aus PLGA wurden für die PLGA-Mengen von 500, 1000, 2000 und 4000 µg

PLGA keine deutlichen Unterschiede festgestellt. Die prozentuale Freisetzung radioaktiv-markierter Plasmid-DNA aus PLGA verlief mit der geringsten Plasmid-Konzentration von 0,36 µg pB-luc erhöht und generell unabhängig von den eingesetzten PLGA-Mengen. Die prozentuale Freisetzung radioaktiv-markierter Plasmid-DNA aus PLGA zu den entsprechenden Messzeitpunkten (s. Abb. 23 E-H) zeigte für alle Plasmid- und PDLLA-Konzentrationen bereits am ersten Auswertungszeitpunkt nach 1 Stunde Inkubationszeit eine maximale Plasmid-Freisetzung („*initial burst*“). Im weiteren Verlauf der Untersuchung wurde bis zum Auswertungszeitpunkt nach 72 Stunden Inkubationszeit ein konstanter Abfall der Plasmid-Freisetzung aus PLGA beobachtet. Danach stieg die prozentuale Freisetzung von Plasmid-DNA aus PLGA wieder an. Offensichtlich führte die höhere Abbaurate von PLGA gegenüber PDLLA nach 168 Stunden Inkubationszeit zu einer höheren prozentualen Freisetzung von Plasmid-DNA. Im direkten Vergleich der Einzelwerte der prozentualen Freisetzung von Plasmid-DNA aus PLGA wurden für die PLGA-Konzentrationen von 500, 1000, 2000 und 4000 µg keine deutlichen Unterschiede beobachtet.

Die Freisetzung von radioaktiv-markiertem PEI 25 aus PDLLA und PLGA (s. Abb. 25, 26, 27) verlief unter vergleichbaren Abhängigkeiten von PEI 25- und Polymer-Mengen, wie es bereits für die Freisetzung von Plasmid-DNA beschrieben wurde. Die prozentualen Freisetzung von radioaktiv-markiertem PEI 25 aus PDLLA und PLGA zu den entsprechenden Messzeitpunkten (s. Abb. 26) zeigte allerdings am ersten Auswertungszeitpunkt nach 1 Stunde Inkubationszeit eine gegenüber Plasmid-DNA deutlich erhöhte prozentuale PEI 25-Freisetzung. Offensichtlich wurden Genvektoren mit einem Überschuss an PEI 25 formuliert und in genaktivierte Oberflächen aus PDLLA und PLGA eingearbeitet. Die Darstellung der N/P-Ratio (s. Abb. 28) zeigte in der ersten Messung nach 1 Stunde Inkubationszeit einen deutlichen Überschuss von PEI gegenüber Plasmid-DNA in der freigesetzten Genvektorformulierung. Dieser Überschuss zeigte sich vor allem in Versuchsgruppen mit geringen Polymermengen von 500 µg bzw. 1000 µg. Der PEI 25-Überschuss wurde bis zum Messzeitpunkt nach 1 Stunde Inkubationszeit ausgewaschen und führte zur hohen prozentualen Freisetzung von PEI 25. Die darauf folgenden Messungen der prozentualen Freisetzung von PEI 25 waren in Höhe und Verlauf mit der prozentualen Freisetzung von Plasmid-DNA vergleichbar und ließen eine parallele Freisetzung von PEI 25 und Plasmid-DNA vermuten.

Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von I^{131} wurden ab Messzeitpunkten größer 168 Stunden Inkubationszeit keine verlässlichen Messwerte von radioaktivem I^{131} mehr gemessen. Aus diesem Grund wurde auf die Darstellung der Freisetzung von radioaktivem PEI 25 nach einer Inkubationszeit größer 168 Stunden verzichtet.

3.3.4. Alternative Filmbildner

In folgender Untersuchung wurden die Polymere DTE05DT und DTE30DT als alternative Filmbildner zu PDLLA bzw. PLGA für die Transfektion von NIH/3T3 Zellen über genaktivierte Oberflächen eingesetzt. Die Polymere sind Poly-(Carbonate) bestehend aus Desaminotyrosyl-L-Tyrosin-Ethylester-Einheiten (DTE) mit einem Anteil von 5 % (05) bzw. 30 % (30) freiem Desaminotyrosyl-L-Tyrosin (DT) (s. Abb. 29).

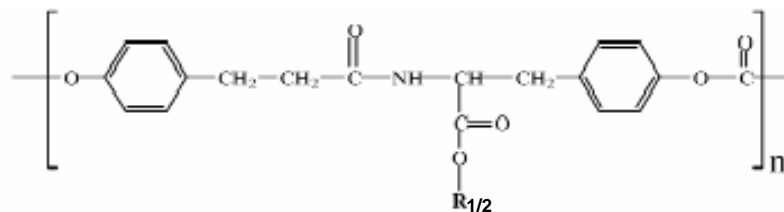


Abbildung 29: Allgemeine Darstellung (R = Alkyl) der Polymerstruktur Poly-(DTR-Carbonat). Für DTE05DT gilt $R_1 = CH_2CH_3$ und $R_2 = H$ (5 %). Für DTE30DT gilt $R_1 = CH_2CH_3$ und $R_2 = H$ (30 %)

Als Positivkontrolle wurde PDLLA in Chloroform/Isopropanol (19:1) für die Herstellung genaktiverter Oberflächen eingesetzt. Um einen möglichen Einfluss des Lösungsmittels Chloroform/Isopropanol auf den Transfektionserfolg über genaktivierte Oberflächen aus PDLLA festzustellen, wurden die Versuchsergebnisse den Resultaten aus 3.3.1 gegenübergestellt, in denen Ethylacetat als Lösungsmittel für PDLLA verwendet wurde (s. Abb. 17).

Für die Herstellung genaktivierter Oberflächen aus DTE05DT, DTE30DT und PDLLA wurden zunächst geschützte Genvektoren bestehend aus PEI 25, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 8 formuliert, danach lyophilisiert und im Anschluss in Chloroform/Isopropanol (19:1) dispergiert. Als Plasmid-DNA wurde pB-luc zur Expression des Reportergens Luciferase eingesetzt. In 96-Loch-Zellkulturplatten aus Polypropylen wurden Polymerfilme aus 1000 und 2000 µg DTE05DT, DTE30DT bzw. PDLLA hergestellt, die jeweils geschützte Genvektoren mit einer Plasmid-Menge von 0,078125; 0,15625; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5 und 10 µg pB-luc enthielten. 7000 NIH/3T3 Zellen wurden appliziert und über den Kontakt mit geschützten Genvektoren transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurde neben der Messung der metabolischen Aktivität die Luciferase-Expression im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge transfizierter Zellen bestimmt (s. Abb. 30 A, B, E, F). Die metabolische Aktivität transfizierter Zellen wurde nach einer 3-stündigen Inkubation mit WST[®]-1 (Roche, Mannheim, D) prozentual zur metabolischen Aktivität nicht-transfizierter Zellen bestimmt (s. Abb. 30 C, D, G, H). Auf diese Weise wurde der Einfluss der Polymer- und Plasmid-Mengen auf den Transfektionserfolg von NIH/3T3 Zellen über genaktivierte Oberflächen aus DTE05DT, DTE30DT und PDLLA in 96-Loch-Zellkulturplatten untersucht.

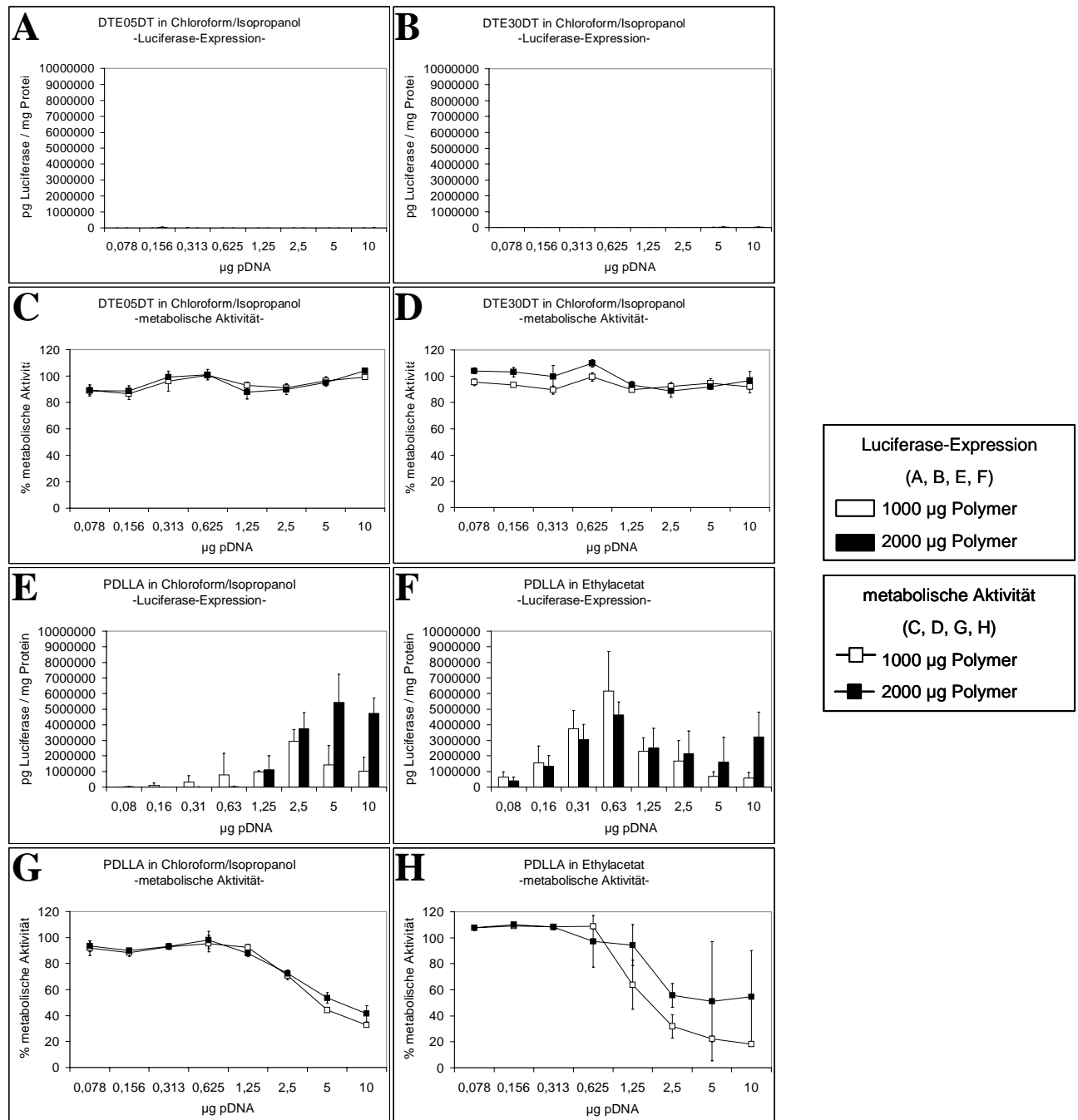


Abbildung 30: Transfektion von 7000 NIH/3T3 Zellen über genaktivierte Oberflächen aus DTE05DT, DTE30DT und PDLLA. Geschützte Genvektoren bestehend aus PEI 25, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 8 wurden in Polymerfilme aus DTE05DT, DTE30DT und PDLLA eingearbeitet. DTE05DT und DTE30DT wurden in Chloroform/Isopropanol (19/1) gelöst (A, B, C, D). Als Lösungsmittel für PDLLA wurde Chloroform/Isopropanol (19:1) (E, G) und Ethylacetat (F, H) als Kontrolle verwendet. Als Plasmid-DNA wurde pB-luc zur Expression von Luciferase eingesetzt. Es wurden Beschichtungen aus 1000 und 2000 µg Polymer hergestellt, die jeweils geschützte Genvektoren mit einer Plasmid-Menge von 0,078125; 0,15625; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5 und 10 µg pB-luc enthielten. 48 Stunden nach Applikation und Transfektion von 7000 NIH/3T3 Zellen wurde die Luciferase-Expression bestimmt und im Verhältnis zur Proteing Gesamtmenge dargestellt (A, B, E, F). Die metabolische Aktivität transfizierter Zellen wurde nach einer 3-stündigen Inkubation mit WST[®]-1 (Roche, Mannheim, D) prozentual zur metabolischen Aktivität nicht-transfizierter Zellen bestimmt (C, D, G, H). Aus identischen Versuchsansätzen in dreifacher Ausführung wurden Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet.

Der Einsatz der Poly-Tyrosin-Carbonate DTE05DT und DTE30DT als genaktivierte Oberflächen zur Transfektion von NIH/3T3 Zellen führte nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden unabhängig von Plasmid- und Polymer-Konzentration zu keiner Expression von Luciferase. Die metabolische Aktivität von NIH/3T3 Zellen blieb nach der Variation von Plasmid- und Polymer-Konzentration unbeeinflusst. Offensichtlich wurde die Verfügbarkeit der Genvektoren für NIH/3T3 Zellen nach der Formulierung in DTE05DT und DTE30DT vollständig unterbunden. Im Rahmen der angegebenen Versuchsbedingungen stellten sich die Poly-Tyrosin-Carbonate DTE05DT und DTE30DT als nicht geeignete Filmbildner für die Transfektion von NIH/3T3 Zellen über genaktivierte Oberflächen heraus.

Der Einsatz von PDLLA als Positivkontrolle für die Transfektion von NIH/3T3 Zellen über eine genaktivierte Oberfläche führte wie erwartet zur Expression von Luciferase (s. Abb. 30 E, F). Der Einsatz von Chloroform/Isopropanol (19:1) als Lösungsmittel von PDLLA führte allerdings zu einem veränderten Expressionsprofil gegenüber Ethylacetat als Lösungsmittel (s. Abb. 30 F). Mit Chloroform/Isopropanol (19:1) (s. Abb. 30 E) führten genaktivierte Oberflächen aus 1000 µg PDLLA bei einer Plasmid-Menge von 2,5 µg pB-luc zu einem Expressionsmaximum von Luciferase. Genaktivierte Oberflächen aus 2000 µg PDLLA führten bei einer Plasmid-Menge von 5 µg zu einem Maximum der Luciferase-Expression. Verglichen mit Ethylacetat (s. Abb. 30 F) für PDLLA zeigte sich bei identischen PDLLA-Konzentrationen eine Verschiebung der maximalen Luciferase-Expressionen zu höheren Plasmid-Mengen. Trotz Verschiebung der Expressionsmaxima wurden vergleichbare Mengen an Luciferase exprimiert.

Die metabolische Aktivität von NIH/3T3 Zellen blieb bei genaktivierten Oberflächen aus PDLLA mit dem Lösungsmittel Chloroform/Isopropanol (19:1) unabhängig von der PDLLA-Konzentration bis zu einer Plasmid-Menge von 0,625 µg pB-luc unbeeinflusst (s. Abb. 30 G). Ein weiterer Anstieg der Plasmid-Konzentration führte zu einer kontinuierlichen Reduzierung der metabolischen Aktivität, die bei den Plasmid-Mengen von 5 und 10 µg in 1000 µg gegenüber 2000 µg PDLLA stärker ausgeprägt war. Verglichen mit Ethylacetat als Lösungsmittel (s. Abb. 30 H) zeigte sich bei 1000 µg PDLLA mit Chloroform/Isopropanol (19:1) eine schwächere Reduzierung der metabolischen Aktivität nach Steigerung der Plasmid-Konzentration.

Durch den Einsatz von Chloroform/Isopropanol (19:1) gegenüber Ethylacetat als Lösungsmittel von PDLLA wurde nach Transfektion von NIH/3T3 Zellen über genaktivierte Oberflächen aus PDLLA eine höhere Toleranz gegenüber eingearbeiteten Plasmid-Mengen beobachtet. Das Expressionsmaximum von Luciferase wurde mit höheren Plasmid-Mengen

erreicht, und die metabolische Aktivität wurde durch identische Plasmid-Mengen weniger stark reduziert. Die beschriebenen Effekte könnten aufgrund einer veränderten Aushärtung des PDLLA-Films bzw. durch Einflüsse auf die Dispersion von Genvektoren durch unterschiedliche Lösungsmittel zu erklären sein.

3.3.5. Genaktivierte Oberflächen auf Aluminium – Luciferase-Expression

In folgender Untersuchung wurden NIH/3T3 Zellen über eine genaktivierte Oberfläche aus PDLLA auf einer Folie aus Aluminiumlegierung transfiziert. Die Folien mit einem Durchmesser von 16 mm wurden als kostengünstige Modeloberfläche für Folien aus Titan verwendet, die in geplanten Untersuchungen als medizinische Implantate eingesetzt werden sollen. Es wurden geschützte Genvektoren bestehend aus PEI 25, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 8 formuliert und mit einer Plasmid-Menge von 10 µg pB-luc zur Expression von Luciferase in 5000 µg PDLLA auf Folien aus Aluminiumlegierung aufgetragen. Als Kontrolle wurden Folien aus Aluminiumlegierung mit 5000 µg PDLLA ohne Genvektoren beschichtet. Überführt in eine 24-Loch-Zellkulturplatte wurden die beschichteten Folien mit 200.000 NIH/3T3 Zellen besiedelt, die über den Kontakt mit geschützten Genvektoren transfiziert wurden. Über einen Zeitraum von 7 Tagen wurde täglich die Luciferase-Expression bestimmt (s. Abb. 31). Luciferase-Expression transfizierter NIH/3T3 Zellen wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen täglich nachgewiesen. Nach geringer Expression am 1. Tag wurde ein Expressionsmaximum für Luciferase am 2. Tag der Versuchsauswertung beobachtet. Im weiteren Versuchsverlauf wurde die tägliche Expression von Luciferase bis zum 7. Tag kontinuierlich reduziert. Es wurde keine Luciferase-Expression in Beschichtungsgruppen ohne Genvektoren detektiert.

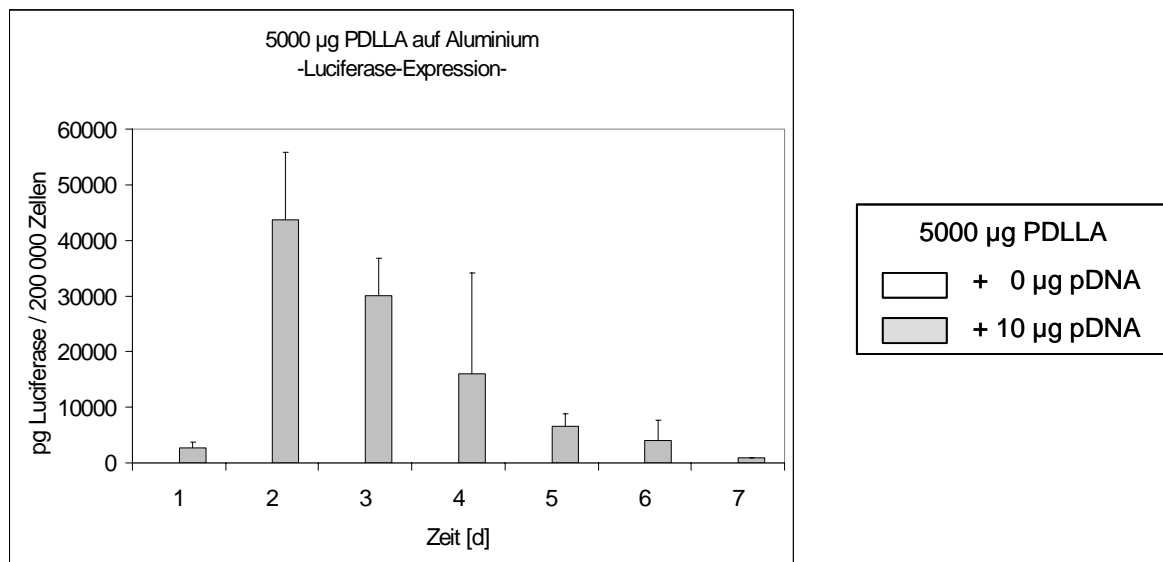


Abbildung 31: Transfektion von 200.000 NIH/3T3 Zellen über eine genaktivierte Oberfläche aus PDLLA auf einer Folie aus Aluminiumlegierung (\varnothing 16 mm). Es wurden geschützte Genvektoren bestehend aus PEI 25, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 8 formuliert und mit einer Plasmid-Menge von 10 μ g pB-luc zur Expression von Luciferase in 5000 μ g PDLLA auf Folien aus Aluminiumlegierung aufgetragen. Als Kontrolle wurden Folien aus Aluminiumlegierung mit 5000 μ g PDLLA ohne Genvektoren beschichtet. Über einen Zeitraum von 7 Tagen (x-Achse), wurde täglich die Luciferase-Expression bestimmt und im Verhältnis zur Zellzahl dargestellt (y-Achse). Aus identischen Versuchsansätzen in dreifacher Ausführung wurden Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet.

3.3.6. Genaktivierte Oberflächen auf Aluminium – BMP-2-Expression

In folgender Untersuchung wurden HEK293 Zellen über eine genaktivierte Oberfläche aus PDLLA auf einer Folie aus Aluminiumlegierung transfiziert. Die Folien mit einem Durchmesser von 16 mm dienten als kostengünstige Modeloberfläche für Folien aus Titan und stellten einen Modellversuch zur Beschichtung metallischer Implantate für die Unfallchirurgie dar, die eine lokale Produktion des Wachstumsfaktors *bone morphogenic protein 2* (BMP-2) bzw. eine Verbesserung der Knochenheilung gewährleisten sollen. Es wurden geschützte Genvektoren bestehend aus PEI 25, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 8 formuliert und mit einer Plasmid-Menge von 10, 20 und 40 μ g pB-BMP-2 zur Expression des Wachstumsfaktors BMP-2 in 5000 μ g PDLLA auf Folien aus Aluminiumlegierung aufgetragen. Überführt in eine 24-Loch-Zellkulturplatte wurden beschichtete Folien mit 200.000 HEK 293 Zellen versetzt und über den Kontakt mit geschützten Genvektoren transfiziert. Über einen Zeitraum von 7 Tagen, wurde täglich mittels ELISA die Expression von BMP-2 im Zellkulturüberstand bestimmt (s. Abb. 32).

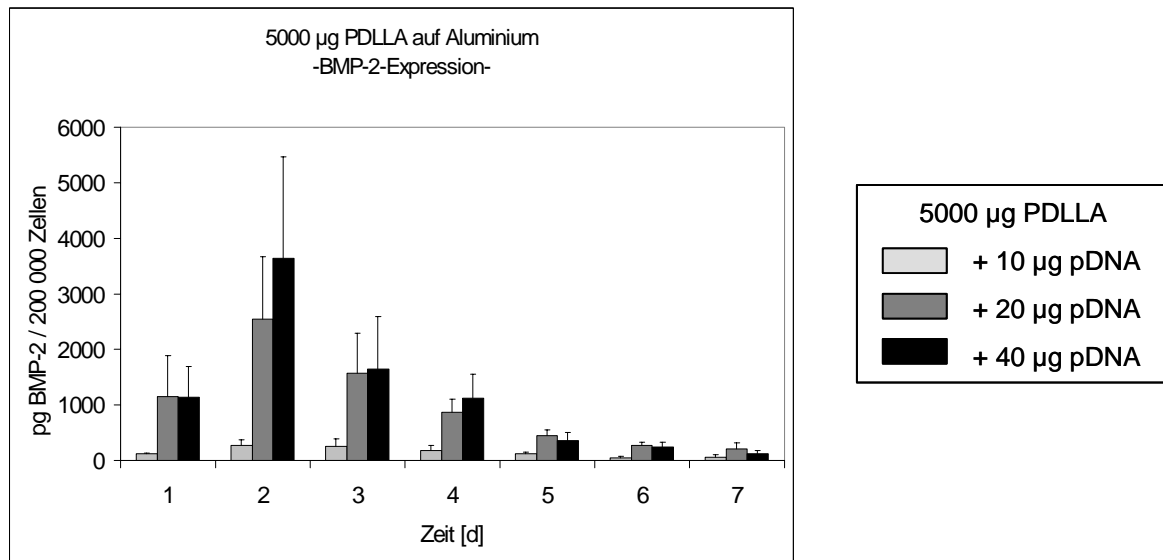


Abbildung 32: Transfektion von 200.000 HEK 293 Zellen über eine genaktivierte Oberfläche aus PDLLA auf einer Folie aus Aluminiumlegierung (\varnothing 16 mm). Es wurden geschützte Genvektoren bestehend aus PEI 25, Plasmid-DNA und Schutzpolymer P6YE5C mit einer N/P-Ratio von 8 formuliert und mit einer Plasmid-Menge von 10, 20 und 40 µg pB-BMP-2 zur Expression des Wachstumsfaktors BMP-2 in 5000 µg PDLLA auf Folien aus Aluminiumlegierung aufgetragen. Über einen Zeitraum von 7 Tagen (x-Achse) wurde täglich mittels ELISA die Expression von BMP-2 (y-Achse) im Zellkulturüberstand bestimmt. Aus identischen Versuchsansätzen in dreifacher Ausführung wurden Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet.

Über einen Zeitraum von 7 Tagen wurden täglich die BMP-2 Expressionen der transfizierten HEK 293 Zellen im Zellkulturüberstand detektiert. Nach geringer Expression von BMP-2 am 1. Tag und einem Expressionsmaximum am 2. Tag der Versuchsauswertung nahm die BMP-2-Konzentration in den Versuchsüberständen bis zum 7. Tag kontinuierlich ab. Transfektionen über die genaktivierte Oberfläche PDLLA mit einer Plasmid-Menge von 10 µg pB-BMP-2 in 5000 µg PDLLA lieferten geringe Expressionen von BMP-2. Durch Steigerung der Plasmid-Menge auf 20 µg pB-BMP-2, wurde eine deutliche Steigerung der BMP-2-Expression erzielt. Die Daten zur Steigerung der Plasmid-Menge von 20 µg auf 40 µg pB-BMP-2 zeigten einen weiteren, nicht signifikanten Anstieg der BMP-2-Expression. Das optimale Verhältnis zwischen Polymer- und Plasmid-Menge für die Transfektion von HEK 293 Zellen über eine genaktivierte Oberfläche aus PDLLA auf einer Folie aus Aluminiumlegierung wurde bisher noch nicht eindeutig bestimmt und muss durch weitere Steigerung der Plasmid-Menge in 5000 µg PDLLA identifiziert werden.

4. Diskussion

4.1. Genaktivierter Biomaterialien in der regenerativen Medizin

4.1.1. Tissue Engineering

„Tissue Engineering“ als Konzept zur Regeneration zerstörter Gewebe- und Organstrukturen löste in den 90er Jahren eine Welle der Begeisterung aus. Mit großer Zuversicht wurden Konzepte zur Lösung medizinischer Probleme diskutiert und untersucht. Die Möglichkeit, defekte Organe ersetzen zu können, rückte in erreichbare Nähe und mit großen Erwartungen wurde in die Branche investiert. Im Jahr 2000 bezeichnete das Time Magazine eine berufliche Karriere im Bereich „Tissue Engineering“ als eine der „10 attraktivsten Beschäftigungen der Zukunft“ [169]. Die Eingliederung der neuen Behandlungsstrategie in das bestehende Gesundheitswesen erwies sich in den letzten Jahren allerdings als schwierig. Die Zulassung anwendbarer Produkte erforderte einen hohen administrativen Aufwand und führte eine Vielzahl von Unternehmen an die Grenzen ihrer finanziellen Möglichkeiten. Aufgrund fehlender Langzeit-Erfahrungen wurden die hohen Kosten für Tissue Engineering-Produkte gegenüber etablierten Behandlungsmethoden meist nicht von den staatlichen Gesundheitssystemen übernommen. Aktuellere Untersuchungen stellen den Marktanteil der Branche in den letzten Jahren dar [170] und versuchen Erklärungen für die teilweise deutlichen Umsatzrückgänge vieler Unternehmen zu geben [171]. Häufig wurden hohe Produktkosten nur schlecht in Business-Plänen einkalkuliert. Aufgrund mangelhafter Kommunikation wurde die medizinische Zielgruppe nicht genügend von der Qualität der Produkte überzeugt. Gemessen an den hohen Erwartungen, die an die Geweberegeneration durch Tissue Engineering gestellt wurden, erscheint das aktuelle Kosten/Nutzen-Verhältnis für entsprechende Produkte nicht überzeugend. Der potenzielle medizinische Nutzen der jungen und innovativen Behandlungsform bleibt allerdings bestehen und wird in zukünftigen Forschungsprojekten weiter ausgebaut werden. Anregungen zur Aktualisierung des Begriffs Tissue Engineering und zur Neuausrichtung entsprechender Behandlungsziele versuchen das Missverhältnis zwischen Erwartungshaltung und Möglichkeiten zu relativieren [120]. Williams aktualisierte Definition von Tissue Engineering als „Bildung von neuem Gewebe für die therapeutische Wiederherstellung des menschlichen Organismus über bewusste und kontrollierte Stimulation ausgewählter Zielzellen durch definierte Kombinationen molekularer

und mechanischer Signale“ beinhaltet nicht den Einsatz künstlicher Ersatzteile für den Austausch defekter Gewebe- und Organstrukturen, sondern beschreibt ein Behandlungskonzept, das die natürlichen Reparationsmechanismen des menschlichen Organismus durch den Einsatz zusätzlicher Heilungsimpulse stimuliert. Nur in seltenen Fällen führt die körpereigene Wundversorgung alleine zur vollständigen Wiederherstellung der ursprünglichen Gewebezusammensetzung [172]. Die Bildung von Narbengewebe als Beispiel natürlicher Wundversorgung zeigt die begrenzte Regenerationsfähigkeit des menschlichen Organismus. Die Wiederherstellung ursprünglicher Gewebestrukturen kommt einem kreativen Aufbauprozess gleich, dessen Realisierung nur durch komplexe Behandlungsstrategien erreicht werden kann. Die von Williams beschriebene „Kombination molekularer und mechanischer Signale für die therapeutische Wiederherstellung des menschlichen Organismus“ entspricht der Entwicklung moderner Biomaterialien der dritten Generation, deren Potential in der Stimulation und Initiierung von Wundheilungsmechanismen liegt. Die physiologischen Steuerungsmechanismen des „Bioreaktors“ Mensch dienen dabei zur Integration der Applikationsform in den Heilungsprozess und letztlich zur Bildung von funktionellem Gewebe.

4.1.2. Genaktivierte Biomaterialien

Durch den Einsatz der Gentherapie kann das Regenerationspotential von Reparationszellen gesteigert werden. Werden Zielzellen mit geeigneten therapeutischen Genen transfiziert, kommt es zur lokalen Produktion ausgewählter Wundheilungsmediatoren, die entscheidend zur Verbesserung der Geweberegeneration und zur Wiederherstellung ursprünglicher Gewebestrukturen beitragen können. Die Wahl der möglichen Transgene ist nahezu unbegrenzt und kann abhängig von der Indikation getroffen werden. Werden Biomaterialien in der regenerativen Medizin mit Genvektoren angereichert, erhalten die Gerüststrukturen neben ihrer Aufgabe als Aufbaumatrix zusätzlich die Funktion eines Trägers genetischer Information. Mechanische und molekulare Elemente zum Wiederaufbau zerstörter Gewebe- und Organstrukturen sind in einer Applikationsform kombiniert. Das Anforderungsprofil an geeignete Biomaterialien steigt und muss individuell der entsprechenden Indikation angepasst werden. Je nach Anwendung sollen die eingesetzten Materialien bioabbaubar sein und sich in den Regenerationsprozess zerstörter Gewebe- und Organstrukturen integrieren. Darüber hinaus werden sie als Träger von Genvektoren für die lokale Transfektion von Zielzellen eingesetzt und können als Transfektionsmilieu einen entscheidenden Einfluss auf den Transfektionserfolg ausüben [173]. Die Verträglichkeit von Biomaterialien und Zielzellen

sowie von Biomaterialien und Genvektorformulierungen sind wichtige Voraussetzungen für einen erfolgreichen Einsatz genaktivierter Biomaterialien. Die enorme Vielfalt natürlicher und synthetischer Matrixstrukturen zur Herstellung genaktivierter Biomaterialien erlaubt die Entwicklung individuell angepasster Therapiekonzepte. Durch die gezielte Auswahl geeigneter Trägermaterialien entstehen u. a. Therapiekonzepte zur Regeneration flexibler Gewebestrukturen (z. B. Haut) sowie von hartem Stützgewebe (z. B. Knochen).

4.2. Genaktivierte Fibrinmatrix

Das in der vorliegenden Arbeit beschriebene Modell einer genaktivierten Fibrinmatrix basiert auf den klinischen Erfahrungen der Abteilung Plastische und Handchirurgie der Universitätsklinik Freiburg. Mit dem Einsatz einer Keratinozyten-Fibrinkleber-Suspension (*Keratinocyte-Fibrin-Glue-Suspension* „KFGS“) konnten Vollhautwunden erfolgreich behandelt werden [157]. Die Auswahl der natürlichen Polymerstruktur Fibrin als Aufbaumatrix zur Regeneration von Vollhautwunden orientierte sich grundsätzlich am natürlichen Ablauf der Wundheilung. Die Bildung eines Fibringerinnsels ist eine erste physiologische Reaktion des Körpers auf eine Verletzung der Haut. Auf diese Weise kommt es zur Blutstillung und zur Abgrenzung des verletzten Gewebes nach außen. Der physiologischen Erstreaktion folgt eine komplexe Vernetzung von Reparationsmechanismen unter Einbeziehung von Zellen, Signalstoffen und extrazellulärer Matrixstrukturen [174]. Der klinisch etablierte Fibrinkleber Tissucol (Fa. Baxter, Wien, A) imitiert die natürliche Fibrinbildung im Wundgebiet durch eine gemeinsame Aushärtung der flüssigen Kleberkomponenten Fibrinogen und Thrombin zu einer festen Fibrinmatrix. Mit einem speziellen Applikator-System lassen sich die flüssigen Komponenten einfach applizieren und in Form und Größe individuell anpassen. Die aus humanem Plasma gewonnene Fibrinogenkomponente ist natürlichen Ursprungs und beinhaltet Spuren weiterer Plasmabestandteile. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung dient Fibrin als mechanische und molekulare Leitstruktur für den gerichteten Gewebewiederaufbau und ist für die Regeneration von Haut einfachen synthetischen Materialien vorzuziehen. Mit dem Zusatz autologer Keratinozyten wird das Regenerationspotential der Fibrinkleberzubereitung im Rahmen der Wundheilung weiter gesteigert. Die körpereigenen Zellen werden vom Organismus toleriert und für den Aufbau einer neuen Epidermis in die Wundheilung integriert. Unter der Bezeichnung „BioSeed-S“ (Fa. BioTissue Technologies, Freiburg, D)

wurde die beschriebene Fibrinkleberzubereitung als kommerzielles Produkt in den Handel gebracht.

Neben der Anreicherung mit körpereigenen Zellen sollen Genvektoren als Matrixzusatz zu einer lokalen Produktion des Wachstumsfaktors EGF im Wundgebiet und damit zu einem zusätzlichen Heilungsimpuls führen. Idealerweise sorgt dieser Stimulus in der frühen Heilungsphase für den nötigen Regenerationsimpuls und ist zeitlich begrenzt.

4.2.1. Auswahl Genvektoren

Die langjährige Erfahrung unserer Arbeitsgruppe mit dem Einsatz nicht-viraler Genvektoren führte zum Einsatz nicht-viraler Genvektoren mit PEI. In vergleichenden Studien wurde die Effektivität und Toxizität nicht-viraler Genvektoren bestehend aus PEI 22 bzw. PEI 25 und Plasmid-DNA *in vitro* untersucht. Bereits die strukturellen Unterschiede von PEI führten zu deutlichen Unterschieden im Transfektionsverhalten. Variationen von N/P-Ratio und Genvektormengen führten ebenfalls zu jeweils unterschiedlichen Transfektionsergebnissen. Die Steigerung der N/P-Ratio für Genvektoren mit PEI 22 führte zu einer drastischen Verschiebung des Expressionsprofils transfizierter Keratinozyten. Maximale Expressionswerte für Genvektoren mit einer N/P-Ratio von 4 erfordern für PEI 22 eine hohe DNA-Menge von 2 µg. Die Steigerung des PEI 22-Anteils der Genvektorformulierung auf N/P-Ratios von 6, 8 und 10 zeigte eine deutliche Verschiebung der maximalen Expression auf deutlich geringere DNA-Mengen. Aufgrund des gestiegenen Anteils an PEI 22 und der damit verbundenen Toxizitätssteigerung musste die Gesamtmenge an Genvektor-Formulierung für effektiven Gentransfer reduziert werden. Gleiche Abhängigkeiten von N/P-Ratio, DNA-Menge und Expressionsprofil wurden für Genvektoren mit PEI 25 beobachtet. Die Intensität der beobachteten Effekte war gegenüber Genvektoren mit PEI 22 allerdings deutlich geringer. In beiden Fällen führte nur ein optimales Gleichgewicht zwischen Effektivität und Toxizität der eingesetzten Genvektorformulierung zu maximalen Genexpressionen. Bereits geringe Abweichungen verursachten eine deutliche Reduzierung des Transfektionserfolgs.

Eine Reduzierung der Toxizität wurde durch den Einsatz des schützenden Hüllpolymers P6YE5C erreicht. Aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen bindet das negativ geladene Hüllpolymer an positiv geladene Genvektoren und kann u. a. deren Toxizität reduzieren. Dieser Effekt konnte sowohl für PEI 25 als auch für PEI 22 beobachtet werden. Es wurde eine gesteigerte Toleranz gegenüber höheren DNA-Mengen beobachtet. Toxische Effekte ungeschützter Genvektoren wurden abgemildert und führten unmittelbar zur Erhöhung der Genexpression, allerdings auch nur, wenn zuvor eine durch Toxizität bedingte Reduzierung der

Genexpression vorgelegen hatte. Die Reduzierung der Toxizität fiel für Genvektoren mit PEI 25 bei einer N/P-Ratio von 8 am deutlichsten aus (s. Abb. 6 C). Frühere Untersuchungen zeigten, dass die entsprechenden Partikel in ihrer Gesamtladung neutral sind, keine salzinduzierte Aggregation zeigen und somit als effektiv abgeschirmt gelten können [75]. Daneben untersuchte die Studie den Einfluss ungeschützter und geschützter Genvektoren mit PEI 25 im Blut. Auch hier wurde bei einer N/P-Ratio von 8 ein maximaler Schutzeffekt durch die Zugabe von P6YE5C beobachtet [75]. Als Maß diente hierbei u. a. die Reduzierung der Thrombozytenaggregation und Komplementaktivierung. Die Zugabe von P6YE5C übt auf Genvektoren mit PEI 22 ebenfalls einen positiven Effekt gegenüber ungeschützten Formulierungen aus. Dieser Effekt zeigte sich vor allem mit steigender N/P-Ratio über eine Reduzierung der Genvektor-Toxizität und Steigerung der Expressionsraten (s. Abb. 7 B, C, D). Allerdings kann bei PEI 22 gegenüber PEI 25 nicht von einer effektiven Abschirmung durch P6YE5C ausgegangen werden.

Die sensiblen Abhängigkeiten zwischen PEI-Struktur, N/P-Ratio, Applikationsmengen und Genvektor-Abschirmung mit P6YE5C zeigen letztlich, dass das Genvektordesign individuell für einen erfolgreichen und komplikationsfreien Einsatz optimiert werden muss. Die Verringerung der Thrombozytenaggregation, der Komplementaktivierung und der Vektortoxizität stellen wichtige Kriterien für den Einsatz von Genvektoren *in vivo* dar und empfehlen die Verwendung abgeschirmter Formulierungen. Das einfache Formulierungsprinzip und die Erfahrungen der eigenen Arbeitsgruppe führten letztlich zur Einbeziehung der abgeschirmten Genvektorformulierung COPROGs. In alternativen Methoden der Abschirmung wird Polyethylenglykol (PEG) vor der Genvektorformulierung kovalent an das Polykation PEI gebunden [175]. Die entsprechende Bindung ist, im Gegensatz zur elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen P6YE5C und PEI, kovalent und daher stabiler. Das unterschiedliche Aufbauprinzip der entsprechenden Genvektoren könnte zu einem veränderten Verhalten unter *in vivo*-Bedingungen führen und den Transfektionserfolg entscheidend beeinflussen. Vergleichende Studien könnten die möglichen Unterschiede beider Prinzipien aufzeigen. Bioaktive Proteine wie z. B. Melittin sowie die gründliche Abtrennung ungebundener PEI-Moleküle [176] könnten das Potential der eingesetzten Formulierungen weiter erhöhen.

4.2.2. Formulierung und Charakterisierung

Für die Transfektion humaner Keratinozyten in einer 3-dimensionalen Fibrinmatrix wurden unterschiedliche Genvektor-Formulierungen mit PEI und nackte Plasmid-DNA als Kontrollgruppe eingesetzt. Frühere Untersuchungen zur genaktivierten Fibrinmatrix unter Verwendung nackter Plasmid-DNA führten bereits zur gewünschten Expression von EGF im Nacktmausmodell [148]. Aufgrund der hohen Plasmidmengen, die für die Produktion von nur geringen Mengen EGF erforderlich waren, ist das Kosten/Nutzen-Verhältnis der beschriebenen Formulierung allerdings nicht überzeugend. Die Verwendung nicht-viraler Genvektoren mit PEI führte in unseren Untersuchungen zu einer deutlich höheren Expression von EGF bei deutlich geringeren DNA-Mengen. Die Kompaktierung der negativ geladenen Plasmid-DNA durch Polyethylenimin führt zur Bildung eines positiv geladenen Partikels. Die positive Gesamtladung sowie die Kompaktierung des DNA-Moleküls könnten für die Verbesserung der EGF-Expression verantwortlich sein. In einer dreidimensionalen Mischung aus Trägermaterial, Zellen und Genvektor-Formulierung ist der Zellkontakt von DNA-Partikel gegenüber Zellkulturbedingungen erschwert. Mit der Rhodamin-markierten Plasmid-DNA pGeneGrip[®]-GFP wurden Genvektoren mit PEI 22 (N/P-Ratio 6) bzw. nackter Plasmid-DNA innerhalb der Fibrinmatrix lokalisiert. Nur in Versuchsgruppen mit PEI wurde die rote Rhodamin-Fluoreszenz der markierten Plasmid-DNA an isolierten Bereichen der Zelloberfläche detektiert. In Versuchsgruppen mit nackter Plasmid-DNA dagegen nicht. Das manuelle Mischen der Ansatz-Komponenten stellte den Kontakt zwischen suspendierten Zellen und Genvektoren her. Aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen könnten die positiv geladenen Genvektoren mit PEI an negativ geladene Membranstrukturen der Zelloberfläche binden, während nackte Plasmid-DNA suspendiert bliebe [44]. Die verbesserte Bindung an Zelloberflächen könnte folglich ein entscheidender Schritt für die Steigerung der EGF-Expression nach Transfektion humaner Keratinozyten in einer genaktivierten Fibrinmatrix gewesen sein.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Expression von EGF nach Transfektion mit unterschiedlichen Genvektoren in Fibrin untersucht. Dabei wurden ungeschützte Genvektoren mit PEI 22 (N/P-Ratio 6), geschützte Genvektoren mit PEI 25 und P6YE5C (N/P-Ratio 8) und nackte Plasmid-DNA als Kontrollgruppe eingesetzt. Unter optimalen Transfektionsbedingungen stellen Genvektoren mit PEI 22 (N/P-Ratio 6) ein effektives Transfektionsreagenz dar. Die gewählte Genvektor-Konzentration für die Transfektion humaner Keratinozyten in Fibrin führte zu Gentransfer und zur Expression von EGF im Versuchsansatz. In der fibrinfreien Kontrollgruppe kam es dagegen zu einem drastischen

Verlust der Genexpression. Ein optimales Verhältnis zwischen Effektivität und Toxizität der Genvektorformulierung schien ohne umgebende Fibrinmatrix nicht gegeben gewesen zu sein und ließ eine zu toxische Konzentration der Genvektorformulierung vermuten. Mögliche Interaktionen zwischen Genvektorformulierung und Matrixstrukturen könnten ebenfalls einen Einfluss auf das Transfektionsverhalten von Genvektoren mit PEI 22 in Fibrin gehabt haben. Identische Versuche wurden unter Verwendung geschützter Genvektoren mit PEI 25 und schützendem Hüllpolymer P6YE5C (N/P-Ratio 8) durchgeführt. Im direkten Vergleich der Effektivität ungeschützter und geschützter Genvektoren in Fibrin zeigten sich deutliche Unterschiede. Während ungeschützte Genvektoren mit PEI 22 in Fibrin hohe Expressionswerte erzielten, zeigten geschützte Genvektoren mit PEI 25 lediglich geringe Expressionsraten in Fibrin. Geht man von der bereits beschriebenen Vorstellung einer Bindung von Genvektoren an Zelloberflächen während des Formulierungsvorgangs aus, könnte eine positiv geladene Genvektorformulierung mit PEI 22 gegenüber einer ungeladenen Formulierung mit PEI 25 und P6YE5C erneut von Vorteil sein. Geschützte Formulierungen mit PEI 25 und P6YE5C blieben demnach gegenüber ungeschützten Formulierungen mit PEI 22 überwiegend frei in der Fibrinmatrix suspendiert und stünden für die Transfektion humaner Keratinozyten nicht unmittelbar zur Verfügung. Die reduzierte Toxizität der geschützten Genvektoren gegenüber ungeschützter Formulierungen scheint in der Fibrinmatrix eine untergeordnete Rolle zu spielen. Allerdings ist eine deutliche Steigerung der EGF-Expression gegenüber ungeschützten Formulierungen in fibrinfreien Kontrollgruppen zu beobachten. Im zweidimensionalen Transfektionsraum ohne Fibrin scheint die gewählte Konzentration geschützter Genvektoren mit PEI 25 gegenüber der ungeschützten Formulierung einem besseren Verhältnis von Effektivität und Toxizität zu entsprechen.

4.2.3. Fibrin als aktive Trägermatrix

Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses von Fibrin auf das Transfektionsverhalten von Genvektoren wurden diese in einem unabhängigen Zellkulturversuch jeweils mit einer Lösung der Fibrin-Vorstufe Fibrinogen vorinkubiert bevor sie unter Standardbedingungen für die Transfektion humaner Keratinozyten in Zellkultur eingesetzt wurden. Vorinkubiert wurden ungeschützte Genvektoren mit PEI 25 (N/P-Ratio 8) sowie geschützte Genvektoren mit PEI 25 und P6YE5C (N/P-Ratio 8). Transfektionen mit Fibrinogen-vorinkubierten Genvektoren führten zu deutlich gesteigerten Expressionsraten gegenüber nicht vorinkubierten Genvektoren. Die Vorinkubation von Genvektoren mit einer synthetisierten Teilsequenz des Fibrinogen-Proteins führte ebenfalls zu einer deutlichen Steigerung der

Genexpression. Die gemeinsame Applikation von Genvektoren und Fibrinogenstrukturen könnte folglich zu einer Steigerung der Effektivität eingesetzter Genvektoren führen. Interaktionen zwischen Fibrinogen und Genvektoren wurden bereits in vergangenen Untersuchungen festgestellt. Die Vorinkubation von Lipid-DNA-Komplexen mit Fibrinogen führte ebenfalls zu einer Steigerung der Genvektor-Effizienz [177]. Dagegen führte die Vorinkubation mit anderen Plasmabestandteilen zu einem Abfall der Transfektionseffizienz. Weitere Interaktionen zwischen Genvektoren und Fibrin wurden bei Untersuchungen der Genvektor-Freisetzung festgestellt. Während nackte Plasmid-DNA schnell aus Fibrin freigesetzt wurde, blieben geschützte Genvektoren aus PEI 25 und P6YE5C formuliert und wurden nur sehr langsam abgegeben. Ebenfalls untersucht wurde der antikoagulative Effekt von Polyethylenimin auf die Fibrinpolymersiation [178]. Bei der Verwendung nicht-viraler Genvektoren mit PEI in der Trägermatrix Fibrin müssen folglich neben Auswirkungen auf Zielzellen auch Interaktionen mit der Trägermatrix Fibrin berücksichtigt werden.

4.2.4. Formulierungsstrategie

Aus der Perspektive einer kommerziellen Anwendung, scheint der Einsatz einer genaktivierten Fibrinmatrix ein neues vielversprechendes Behandlungskonzept darzustellen. Allerdings war das bisherige Herstellungsprotokoll aufwendig und für die Praxis eher ungeeignet. Eine neue Formulierungsstrategie wurde entwickelt, die sich in zwei Herstellungsschritte aufteilte. Im ersten Schritt wurde die flüssige Fibrinogenkomponente mit der Genvektorzubereitung gemischt und im Anschluss lyophilisiert. Danach erhielt man ein lagerungsfähiges Lyophilisat aus genaktiviertem Fibrinogen. Zum Versuchszeitpunkt wurde diese genaktivierte Fibrinklebervorstufe mit Wasser rehydratisiert und gemeinsam mit Thrombin zur Herstellung einer genaktivierten Fibrinmatrix eingesetzt. Ein erneuter Vergleich des Transfektionsverhaltens ungeschützter und geschützter Genvektoren in Fibrin zeigte aufgrund der neuen Formulierungsstrategie ein verändertes Expressionsprofil von EGF. Im direkten Vergleich von ungeschützten Genvektoren mit PEI 22 (N/P-Ratio 6) und geschützten Genvektoren mit PEI 25 und P6YE5C (N/P-Ratio 8) zeigte sich kein deutlicher Unterschied in der Höhe der EGF-Expression. Allerdings unterschied sich der jeweilige Expressionsverlauf deutlich. Während ungeschützte Genvektoren erst nach 3-4 Tagen zu einer Expression führten, zeigten geschützte Formulierungen bereits am ersten Auswertungstag maximale Expressionen von EGF. Geschützte Genvektor-Formulierungen schienen gegenüber ungeschützten wesentlich früher verfügbar gewesen zu sein. Eine mögliche Erklärung könnte ein unterschiedliches Verhalten in der Löslichkeit ungeschützter und

geschützter Genvektor-Lyophilisate sein. Während sich ungeschützte Formulierungen schlechter lösten, würden die geschützten Formulierungen dagegen eine gute Löslichkeit aufweisen. Bestätigt wurde diese Vermutung nach der Transfektion durch geschützte Genvektoren mit PEI 22 und P6YE5C (N/P-Ratio 6). Der Zusatz des schützenden Hüllpolymers verursachte eine deutliche Verschiebung der maximalen Expression zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt. Der Zusatz von P6YE5C könnte hier zu einer Verbesserung der Löslichkeit der lyophilisierten Genvektorformulierung geführt haben. Die zusätzliche Steigerung des Expressionsmaximums durch P6YE5C lässt den Schluss zu, dass es sich bereits um eine toxische Konzentration von PEI 22 gehandelt haben könnte. Durch den Zusatz von P6YE5C wurde zusätzlich das Verhältnis von Effektivität und Toxizität der eingesetzten Formulierung verbessert. Die grundsätzliche Steigerung der Genexpression bei steigenden Zellzahlen spricht dabei ebenfalls für eine gegenüber dem Optimum zu toxische Genvektormenge.

4.2.5. Praxisrelevanz

Die durchgeführten Untersuchungen führten zur Entwicklung einer genaktivierten Fibrinkleberzubereitung zur Behandlung von Vollhautwunden. Die Applikationsform zeichnete sich durch die gemeinsame Formulierung humaner Keratinozyten und nicht-viraler Genvektoren zur lokalen Expression des Wachstumsfaktors EGF in der Trägermatrix Fibrin aus. Neben einer Vielzahl weiterer Möglichkeiten für die Wiederherstellung zerstörter Hautareale [156, 179] stellt die genaktivierte Fibrinmatrix speziell für die Behandlung von Problemwunden, wie z. B. chronischen oder diabetischen Wunden, eine attraktive und vielversprechende Behandlungsstrategie dar. Die lokale Expression von Wachstumsfaktoren führt zu einer Anreicherung biologischer Signalpeptide im Wundgebiet. Sie übernehmen zentrale Aufgaben im komplexen System der Geweberegeneration und liefern entscheidende Regenerationsimpulse [180]. In aktuellen Untersuchungen zeigte die parallele Applikation von Keratinozyten und EGF in Fibrin gegenüber der jeweiligen Einzelapplikation einen synergistischen Effekt und führte zu einer deutlich verbesserten Regeneration von Vollhautwunden [181]. Neben der gentherapeutischen Bereitstellung von EGF [80, 148, 182] wurde auch die lokale Expression der Wachstumsfaktoren KGF [183, 184], FGF-7 [185], TGF- β [186, 187] und PDGF [188] in Studien für eine verbesserte Wundheilung untersucht. Unsere Formulierung der genaktivierten Fibrinmatrix entspricht in der Anwendung einer klinisch etablierten Fibrinkleberzubereitung. Die Kleberkomponente Fibrinogen ist als genaktiviertes Lyophilisat lagerungsfähig und nach Lösen in Wasser direkt verwendbar. In

einer aktuellen Studie zur Behandlung von Vollhautwunden im Schweinemodell wird derzeit das Regenerationspotential der beschriebenen Formulierung *in vivo* untersucht.

In einer anderen Arbeitsgruppe wurde eine genaktivierte Fibrinmatrix für die lokale Expression von Pleiotrophin (PTN) erfolgreich zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit eingesetzt [152]. Die Applikation der genaktivierten Matrix zeigte gegenüber Injektionen mit nackter Plasmid-DNA nach Myokard-Infarkt eine gesteigerte Neo-Vaskularisierung. Eine weitere Version der genaktivierten Fibrinmatrix führte über kovalent gebundene Genvektoren zur lokalen Expression von „*hypoxia-inducible factor*“ (HIF) und daraufhin zur Steigerung der Angiogenese während der Wundheilung [189].

4.3. Genaktivierte Polymeroberflächen

Trotz der vielversprechenden Erfolge mit dem Einsatz bioaktiver Polymerstrukturen für den gerichteten Gewebewiederaufbau bleibt der Einsatz von Implantaten in der regenerativen Medizin ein zentrales Therapieprinzip. Medizinische Implantate werden in zahlreichen Variationen für die Wiederherstellung zerstörter Gewebe- und Organstrukturen eingesetzt. Ein wichtiges Einsatzgebiet ist die Stabilisierung von Knochenbrüchen. Metallische Implantate werden u. a. in Form von Drähten, Schrauben oder Platten zur Stabilisierung von Frakturen eingesetzt. Diese Implantate werden als Fremdkörper in den Organismus eingebracht und führen *in vivo* nicht selten zu Infektionen oder weiterer Komplikationen [190]. Durch synthetische Polymerüberzüge können neue Grenzflächen zwischen Implantat und Organismus geschaffen werden, die man durch individuelle Zusammensetzungen optimal den erforderlichen Bedingungen anpassen kann. Neben allgemeinen Anforderungen wie Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit müssen die Polymerbeschichtungen auch nach dem Einbringen in den Knochen stabil am Implantat haften. Die synthetischen Polymere *poly[D/L-lactic acid]* (PDLLA) und *poly[lactic-co-glycolic acid]* (PLGA) konnten in der Vergangenheit bereits erfolgreich für die Beschichtung medizinischer Implantate eingesetzt werden [191].

Bioaktive Zusätze wie z. B. Antibiotika oder Wachstumsfaktoren konnten das therapeutische Potential von Polymerüberzügen weiter steigern. Gentamicin zur Reduzierung der Implantat-assoziierten Infektionsrate [159], sowie rekombinante Wachstumsfaktoren zur Beschleunigung der Knochenheilung [192] wurden dabei erfolgreich eingesetzt. Die Formulierung zur lokalen Freisetzung des Antibiotikums Gentamicin über einen Polymerfilm aus PDLLA wurde unlängst als Medizinprodukt zugelassen (Fa. Synthes GmbH & Co. KG, Umkirch, D)

4.3.1. Formulierung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung genaktivierter Polymerfilme für die lokale Expression therapeutischer Gene beschrieben. Die Auswahl der eingesetzten Materialien sowie die Festlegung eines Herstellungsprotokolls standen dabei im Vordergrund. Basierend auf den Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe in der Formulierung von PDLLA-Filmen wurde ein Konzept zur Formulierung von genaktivierten Polymeroberflächen aus PDLLA und PLGA entwickelt. Die Beschichtung von Oberflächen für den lokalen Gentransfer stellte bisher eine schwierige Herausforderung dar, die in unserer Studie auf einfache Weise realisiert werden konnte. Zur Vermeidung einer Emulsion aus wässriger und organischer Phase [108, 193] stellte die Suspension von lyophilisierten Genvektoren in organischer Polymerlösung das zentrale Element der Formulierung dar. Die schwierige und ineffiziente Einarbeitung der wässrigen Genvektorformulierung in die organische Polymerlösung konnte auf diese Weise umgangen werden. Als Genvektorkomponente wurden COPROGs (s. Abb. 2) eingesetzt. Die geschützten Genvektoren aus PEI 25 und P6YE5C (N/P-Ratio 8) halten der Gefriertrocknung stand und stehen Zielzellen im wässrigen Milieu unmittelbar zur Verfügung (s. Abb. 14 B). Selbst nach Lyophilisation und Dispersion in organischer Polymerlösung blieb die eingesetzte Plasmid-DNA in Form der COPROGs-Formulierung strukturell und funktionell intakt (s. Abb. 16). Nach Applikation der COPROGs-Dispersion in lösungsmittelresistenten Zellkulturplatten bildeten sich nach Abdampfen des organischen Lösungsmittels genaktivierte Polymerfilme aus PDLLA und PLGA. Diese führten nach der Besiedelung mit Zellen zur Expression des entsprechenden Transgens. Durch Variation des Filmbildners, sowie durch Veränderung der Genvektor- bzw. Polymermenge wurde das System optimiert. Das unterschiedliche Freisetzungsverhalten formulierter Genvektoren stellte sich als Schlüsselgröße einer erfolgreichen Transfektion heraus.

4.3.2. Freisetzung Genvektoren

Genvektoren bestehend aus I^{131} -markiertem PEI und I^{125} -markierter Plasmid-DNA wurden in unterschiedlichen Konzentrationen in Polymerfilme eingearbeitet und über einen Zeitraum von 4 Wochen unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Zu festgelegten Messzeitpunkten wurden die freigesetzten Genvektor-Bestandteile unabhängig voneinander im Kulturüberstand bestimmt. Bereits nach einer einstündigen Inkubationszeit wurden hohe Mengen freigesetzter Genvektorbestandteile im Kulturüberstand detektiert. Dieser Effekt ist in der Literatur unter dem Begriff „*initial burst*“ bekannt [194-196]. Die hohe N/P-Ratio des freigesetzten Materials lässt auf einen deutlichen Überschuss an PEI im Kulturüberstand schließen. Innerhalb der ersten Stunde der Inkubationszeit wurde prozentual gegenüber Plasmid-DNA etwa die doppelte Menge PEI freigesetzt. Die darauffolgenden Proben wiesen dagegen eine N/P-Ratio auf, die in etwa der COPROGs-Formulierung entsprach. Es ist bekannt, dass nach einem Standardprotokoll zur Formulierung nicht-viraler Genvektoren mit PEI ein Überschuss an ungebundenem Polykation PEI vorliegt [56, 75]. Die initiale Freisetzung dieses ungebundenen PEI-Anteils innerhalb der ersten Stunde der Inkubationszeit könnte zu der ungewöhnlich hohen N/P-Ratio geführt haben. Der beschriebene Effekt zeigte sich am deutlichsten unter Verwendung geringer Polymermengen (s. Abb. 28). Die Normalisierung der N/P-Ratio nach der initialen Freisetzung des ungebundenen PEI-Anteils sowie die gemessene Genexpression lassen grundsätzlich auf eine Freisetzung intakter Genvektoren schließen.

Unabhängig des Phänomens „*initial burst*“ zeigten die über den gesamten Inkubationszeitraum gewonnenen Daten, dass der Einsatz von PDLLA gegenüber PLGA zu einer Freisetzung abhängig der eingesetzten Genvektor- und Polymermengen führte. Über die Darstellung der Genvektorfreisetzung konnte ermittelt werden, dass mit ansteigender PDLLA-Menge formulierte Genvektoren stärker in der Polymerstruktur zurückgehalten wurden. Ein Anstieg der PLGA-Menge zeigte dagegen kaum Einfluss auf die Freisetzung formulierter Genvektoren. Die unterschiedlichen Polymerstrukturen und Hydrolyseraten von PDLLA und PLGA könnten Gründe für das unterschiedliche Freisetzungsprofil sein [197, 198]. Die zur Freisetzung erforderliche Grenzfläche von Polymer und Umgebung könnte sich für PDLLA und PLGA im wässrigen Milieu unterscheiden. Die geringere Hydrolyserate von PDLLA sowie die reduzierte Genvektor-Freisetzung abhängig von der Polymermenge lassen den Schluss zu, dass die Abgabe von Genvektoren ausschließlich über die äußeren Grenzflächen der Polymerschicht stattfindet. Genvektoren in tieferen Polymerschichten würden zunächst formuliert bleiben und könnten erst nach Hydrolyse von PDLLA freigesetzt

werden. Aufgrund der erhöhten Hydrolysezeiten [199, 200] würde die Formulierung mit PDLLA eine Langzeitapplikation von Genvektoren mit verzögerter Freisetzung darstellen. Die Beobachtung einer konzentrationsabhängigen Freisetzung von Genvektoren bei konstanten Polymermengen unterstreicht die Vermutung einer Freisetzung aus äußeren Polymerschichten. Beobachtet wurde ein Abfall der prozentualen Freisetzung der Genvektorformulierung bei steigenden Genvektormengen. Im Falle einer Freisetzung aus äußeren PDLLA-Schichten, würde sich mit steigenden Genvektormengen auch gleichzeitig der Anteil von Genvektoren im Inneren der Polymerstruktur erhöhen. Gleichzeitig würde dieser Anteil für eine Freisetzung nicht zur Verfügung stehen. Im Falle höherer Genvektormengen könnte sich dieser Effekt durch eine prozentual verringerte Freisetzung äußern, da der größere Teil der Gesamtmenge in der Polymermatrix formuliert bliebe. Gegenüber der Freisetzung aus einer äußeren PDLLA-Schicht scheinen Genvektoren dagegen gleichmäßig aus der gesamten PLGA-Matrix freigesetzt zu werden. Steigende Genvektor- und Polymermengen nahmen keinen Einfluss auf das Freisetzungsprofil formulierter Genvektoren. Es wäre möglich, dass der heterogene Aufbau von PLGA aus Milchsäure- und Glykolsäure-Bausteinen im wässrigen Milieu aufgrund eines veränderten Löslichkeitsverhaltens gegenüber PDLLA zu einer poröseren Matrixstruktur führt [201, 202]. Der Abbau des homogen aus Milchsäure-Einheiten aufgebauten PDLLA würde dagegen langsamer und kontinuierlich von außen nach innen voranschreiten. Während sich die Plasmid-Freisetzung aus PDLLA im Verlauf der Freisetzungsstudie immer weiter reduziert, scheint sich die Freisetzung von Plasmid-DNA aus PLGA zu späteren Messzeitpunkten immer weiter zu erhöhen. Die zunehmende prozentuale Freisetzung von Plasmid-DNA aus PLGA-Schichten gegen Ende der Freisetzungsstudie (s. Abb. 23) könnte ebenfalls auf eine gegenüber PDLLA gesteigerte Hydrolyserate von PLGA hinweisen. Die Effektivität der unterschiedlichen Formulierungen ließ sich durch Messungen der Transfektionseffizienz sowie der metabolischen Aktivität transfizierter Zellen bestimmen.

4.3.3. Effektivität und Toxizität

Die Steigerung der Genvektormenge in einer konstanten Polymerschicht führte zunächst zu einer Steigerung der Genexpression. Über ein Expressionsmaximum hinaus führte eine weitere Steigerung der Genvektormenge zum Abfall der Expressionsraten. Die Bestimmung der metabolischen Aktivität transfizierter Zellen zeigte bis zum Expressionsmaximum keine Beeinflussung der Zellproliferation. Eine weitere Steigerung der Genvektormenge führte dagegen zu einem drastischen Abfall der metabolischen Aktivität. Im Expressionsmaximum

lag demnach ein optimales Verhältnis zwischen Genvektor-Effektivität und –Toxizität vor, während darunter zu wenig bzw. darüber zu viel der Genvektorformulierung freigesetzt wurde. Letztlich zeigte sich, dass nur eine bestimmte Menge freigesetzter Genvektoren zu maximalen Genexpressionen führte. Vom Optimum abweichende Genvektormengen führten dagegen unmittelbar zu einem Abfall der Expressionsraten. Variationen der Polymermenge, die zur Ausbildung des genaktivierten Oberflächenfilms eingesetzt wurde, führten ebenfalls zu Veränderungen des Expressionsprofils. Vergleicht man die Expressionswerte bei konstanten Genvektormengen im Bereich bis zur maximalen Genexpression, führten dünnere Schichten PDLLA und PLGA gegenüber dickeren zu höheren Expressionswerten. Die für eine Optimalbedingung noch zu geringe Konzentration an Genvektoren war in überflüssigen Mengen an Polymer eingearbeitet und für Zellen ggf. schlechter verfügbar. Formulierungen mit Genvektormengen oberhalb der maximalen Genexpression führten abhängig vom verwendeten Polymertyp zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während dickere Polymerschichten aus PDLLA die toxischen Effekte der steigenden Genvektormengen durch Reduzierung der Freisetzung kontinuierlich verringerten, zeigten Polymerschichten aus PLGA unabhängig von den eingesetzten Polymermengen keine abschirmenden Eigenschaften.

Trotz unterschiedlicher Materialeigenschaften konnten sowohl PDLLA als auch PLGA erfolgreich als genaktivierte Oberflächen für den lokalen Gentransfer eingesetzt werden. Bestimmungen der Transfektionseffizienz ergaben für unseren Versuchsaufbau und die von uns eingesetzten Zellen maximale Werte zwischen 10 und 20 % transfizierte Zellen. Die dargestellte Methode der Oberflächenaktivierung mit genaktivierten Polymerstrukturen ließ sich erfolgreich zur Beschichtung von Folien aus Aluminiumlegierung oder von Kirschnerdrähten übertragen. Neben dem Reporter gen Luciferase wurde das Gen des Wachstumsfaktors *bone morphogenic protein-2* (BMP-2) eingesetzt. Erste vorläufige Versuchsergebnisse der Arbeitsgruppe von PD Dr. G. Schmidmaier des Zentrums für Muskuloskeletale Chirurgie an der Charité in Berlin zeigten bereits, dass der Einsatz beschichteter Kirschnerdrähte zur lokalen Expression von BMP-2 eine vergleichbare Beschleunigung der Frakturheilung im Rattenmodell gegenüber Beschichtungen mit rekombinantem Wachstumsfaktor BMP-2 vermitteln konnte.

4.3.4. Alternative Filmbildner

Als strukturelle Polymeralternativen zu PDLLA und PLGA wurden in einem Folgeversuch die Poly-[Tyrosincarbonate] DTE05DT und DTE30DT (s. Abb. 30) als Filmbildner zur Bildung genaktivierter Oberflächen eingesetzt. Die Polymerstrukturen lösten sich gegenüber PDLLA und PLGA nicht in Ethylacetat, sondern wurden in einer Mischung aus Chloroform und Isopropanol (19:1) gelöst. Um einen möglichen Einfluss des veränderten Lösungsmittels auf die Bildung von genaktivierten Oberflächen identifizieren zu können, wurde PDLLA ebenfalls in der Chloroform/Isopropanol-Mischung gelöst und als interne Kontrolle eingesetzt. Während Polymerfilme aus PDLLA und PLGA in vorangegangenen Untersuchungen erfolgreich für die Transfektion von Zellen eingesetzt werden konnten, führten DTE05DT und DTE30DT unter gleichen Bedingungen nicht zur Genexpression. Gegenüber der genvektorfreen Kontrollgruppe wurde selbst mit hohen Genvektor-Konzentrationen keine Veränderung der metabolischen Aktivität festgestellt. Es hatte den Anschein, als wären die formulierten Genvektoren in DTE05DT und DTE30DT für Zellen nicht verfügbar. Anschließende Freisetzungsstudien unter der Verwendung radioaktiv-markierter Genvektoren könnten diesen Verdacht bestätigen. Genaktivierte Polymeroberflächen aus PDLLA führten dagegen erneut zu Gentransfer. Die erwartete Abhängigkeit zwischen Genvektor-Konzentration und Genvektor-Toxizität (s. Abb. 17 A, C) konnte ebenfalls beobachtet werden. Die Lösungsmittel-Mischung aus Chloroform und Isopropanol (19:1) führte gegenüber Ethylacetat allerdings zu einer Verschiebung der maximalen Genexpression zu deutlich höheren Konzentrationen formulierter Genvektoren. Mögliche Erklärungen dafür könnten lösungsmittelabhängige Einflüsse auf die Ausbildung des Polymerfilms bzw. auf die Dispersion von Genvektoren sein.

4.3.5. Praxisrelevanz

Die durchgeführten Untersuchungen führten zur Entwicklung von genaktivierten Polymerstrukturen, die für die Beschichtung medizinischer Implantate eingesetzt werden können. Im direkten Vergleich mit bisherigen Beschichtungsstrategien erwies sich das von uns entwickelte Modell als einfach in der Herstellung und effektiv in der Transfektion von Zellen. Das System kann an unterschiedliche Implantatstrukturen angepasst werden und wurde erfolgreich zur lokalen Produktion des therapeutischen Proteins *bone morphogenic protein-2* (BMP-2) eingesetzt. Für effektiven Gentransfer ist eine individuelle Optimierung der Versuchsparameter essentiell. Polymer-Art und -Menge sowie die

Genvektorkonzentration stellen zentrale Stellschrauben der Systemoptimierung dar. Die optimale Formulierungsstrategie für genaktivierte Oberflächen aus PDLLA und PLGA kann nicht direkt auf andere Stoffklassen, wie z. B. Poly-[Tyrosincarbonate], übertragen werden, sondern muss unabhängig ermittelt werden. In zahlreichen Studien wird das Potential einer Oberflächenaktivierung medizinischer Implantate in vielversprechenden Konzepten unter Verwendung unterschiedlicher Trägermaterialien für oberflächenvermittelten Gentransfer eingesetzt [203-205]. Neuere Beschichtungsmethoden unter Einsatz der „*layer-by-layer*“ (LBL)-Technologie, bei der DNA-Moleküle und degradierbare Polykationen wie z. B. Poly-L-Glutaminsäure oder Poly-Lysin mehrschichtig auf Oberflächen aufgetragen werden, stellen ebenfalls vielversprechende Prinzipien zur Aktivierung medizinischer Implantate dar [206-208].

4.4. Individuelles Matrixdesign genaktivierter Biomaterialien

Die grundlegende Basis für die Regeneration zerstörter Gewebe- und Organstrukturen ist eine Behandlungsstrategie, die zur Wiederherstellung der betroffenen Körperregionen führt. Die Auswahl geeigneter Biomaterialien als Aufbaumatrix und Trägermatrix für Zellen, bioaktive Substanzen oder Genvektoren ist für eine erfolgreiche Behandlung essentiell. Der Einsatz natürlicher oder synthetischer Biomaterialien hängt von der entsprechenden Materialanforderung ab. Während sich für den Ersatz von extrazellulären Matrixstrukturen besonders natürliche Biomaterialien empfehlen, eignen sich synthetische Biomaterialien aufgrund kontrollierbarer Matrixeigenschaften hervorragend als „*drug delivery systems*“ oder Darreichungsformen, bei denen physikalische Eigenschaften im Vordergrund stehen. Ist die grundsätzliche Wahl einer Aufbaumatrix getroffen, können Matrixzusätze das Behandlungskonzept weiter verbessern. Die lokale Bereitstellung bioaktiver Substanzen wie z. B. Wachstumsfaktoren oder Integrine kann die Regeneration zerstörter Gewebestrukturen entscheidend verbessern. Aufgrund der hohen Produktionskosten und der geringen Halbwertszeit *in vivo* ist der Einsatz rekombinanter Funktionspeptide allerdings limitiert. Der Einsatz von Genvektoren als Matrixzusätze für die Expression gewünschter Wundheilungs-Mediatoren stellt eine attraktive Alternative für die lokale Bereitstellung bioaktiver Substanzen dar. Durch Variation der eingesetzten Nukleinsäuren können therapeutische Effekte durch die gezielte Auswahl eines Transgens der entsprechenden Indikation angepasst werden. Die parallele Formulierung von Genvektoren und Biomaterialien zur lokalen Anwendung erfordert Kompatibilität der einzelnen Ansatz-Komponenten. Mögliche

Interaktionen müssen berücksichtigt werden, um die nötige Funktionalität der einzelnen Matrix-Bestandteile zu gewährleisten. Die in der vorgestellten Studie beschriebenen Formulierungsstrategien erforderten Lyophilisierbarkeit der Genvektor-Formulierung, um eine applikationsgerechte Darreichungsform zu gewährleisten, sowie Beständigkeit in organischem Lösungsmittel. Nach der Formulierung als genaktivierte Biomaterialien, müssen Genvektoren für Zielzellen verfügbar sein, damit es zur gewünschten lokalen Expression gewünschter Substanzen kommt. Die Fülle an beeinflussenden Faktoren, die zu Erfolg oder Misserfolg eines Systems führen, ist enorm. Einzelne Veränderungen im komplexen Verbund aus Matrixstrukturen, Genvektoren und Zielzellen können drastische Effekte im Gesamtsystem verursachen. Der Einsatz genaktivierter Biomaterialien erfordert ein individuelles Konzept und individuelle Optimierungsarbeit, um den Erfolg der eingesetzten Applikationsform zu ermöglichen. Wird dieser Arbeitsaufwand investiert, bietet der Einsatz genaktivierter Biomaterialien ein großes therapeutisches Potential. Die Entwicklung funktioneller und applikationsgerechter Modelle für den kommerziellen Einsatz stellen in der vorliegenden Arbeit wichtige Grundsätze der Formulierungsstrategie dar. Derzeit wird über eine Änderung des Medizinproduktegesetzes diskutiert, die eine Zulassung genaktivierter Biomaterialien unter Verwendung nicht-viraler Genvektoren als Medizinprodukt erlauben würde. Diese Vereinfachung der Zulassung könnte die Markteinführung genaktivierter Produkte erheblich erleichtern.

5. Zusammenfassung

Die Behandlung zerstörter Gewebe- und Organstrukturen nach akuten Verletzungen oder chronischen Krankheitsverläufen hat sich zu einer enormen Belastung für das heutige Gesundheitswesen entwickelt. Neue Konzepte der Geweberekonstruktion durch Tissue Engineering führten in den letzten Jahren zu einer erheblichen Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung und Charakterisierung einer genaktivierten Fibrinmatrix zur lokalen Expression des Wachstumsfaktors *epidermal growth factor* (EGF). Das Konzept beinhaltet die gemeinsame Applikation autologer Keratinozyten und nicht-viraler Genvektoren mit PEI in Form einer injizierbaren Fibrinkleberzubereitung.

Durch Variationen von PEI-Struktur, N/P-Ratio und dem Zusatz des abschirmenden Hüllpolymers P6YE5C wurde das Transfektionsverhalten unterschiedlicher Genvektorformulierungen in der Fibrinmatrix untersucht. Durch den Einsatz von fluoreszenzmarkierten Genvektoren wurde der Transfektionsverlauf innerhalb der Matrix visualisiert und dokumentiert. Größere Mengen ungeschützter Genvektoren führten in Fibrin trotz ihres toxischen Potentials zu hohen Genexpressionen. Ein protektiver Effekt durch den Zusatz des schützenden Hüllpolymers P6YE5C schien in Fibrin als nicht zwingend notwendig. Daraufhin wurde ein möglicher Einfluss der Fibrinmatrix auf Genvektorformulierungen untersucht. Erste Vorversuche in Zellkultur zeigten eine Steigerung des Transfektionspotentials nicht-viraler Genvektoren mit PEI nach Vorinkubation mit einer Fibrinogen-Lösung.

Aus der Perspektive einer kommerziellen Anwendung heraus wurde ein lagerungsfähiges Lyophilisat aus genaktiviertem Fibrinogen entwickelt, das zum Versuchszeitpunkt als Fibrinklebervorstufe mit Wasser rehydratisiert und gemeinsam mit Thrombin zur Herstellung der genaktivierten Fibrinmatrix eingesetzt werden konnte. Der Einsatz des schützenden Hüllpolymers P6YE5C hatte dabei einen entscheidenden Einfluss auf die unmittelbare Verfügbarkeit der eingesetzten Genvektoren.

Für die Regeneration von Knochenbrüchen bleibt dagegen der Einsatz medizinischer Implantate von entscheidender Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wird in einem weiteren Ansatz die Entwicklung und Charakterisierung genaktivierter Polymerfilme aus PDLLA und PLGA zur Beschichtung medizinischer Implantate beschrieben. Die neue Grenzfläche zwischen Implantat und Knochenstruktur soll zur lokalen Transfektion und Expression therapeutischer Gene dienen. Dafür wurden nicht-virale Genvektoren lyophilisiert und als Dispersion in organischen Lösungen der Polymere PDLLA und PLGA auf resistente Oberflächen aufgetragen und getrocknet. Die Besiedelung der verbliebenen Polymerfilme mit Zellen führte über den direkten Kontakt mit genaktivierten Polymerstrukturen zur Expression des eingesetzten Gens. Durch Variation von Polymer- und Genvektormenge wurde anhand der gemessenen Genexpressionen sowie der metabolischen Aktivität transfizierter Zellen das System optimiert. Die Bestimmung der Transfektionseffizienz sowie des Freisetzungsverhaltens formulierter Genvektoren diente zur Charakterisierung der genaktivierten Polymeroberflächen aus PDLLA und PLGA. Trotz struktureller Ähnlichkeiten der eingesetzten Filmbildner zeigte sich das Freisetzungsverhalten aus PDLLA gegenüber PLGA abhängig der eingesetzten Polymer- und Genvektormengen. Das Beschichtungsprinzip konnte ebenfalls für die Aktivierung von Folien aus Aluminiumlegierung eingesetzt werden und führte zur Expression des therapeutischen Gens *bone morphogenic protein-2* (BMP-2). Die Verwendung von Poly-[Tyrosincarbonaten] als strukturelle Alternative zu PDLLA bzw. PLGA führte zu keiner Genexpression.

Hohe medizinische Anforderungen und individuelle Interaktionen einzelner Matrixkomponenten machen genaktivierter Biomaterialien zu komplexen Applikationsformen der regenerativen Medizin. Kleinste Veränderungen im komplexen Verbund aus Matrixstrukturen, Genvektoren und Zielzellen können drastische Effekte im Gesamtsystem verursachen. Abhängig von Indikation und Materialeigenschaften müssen die Formulierungen individuell angepasst und optimiert werden. Wird dieser Arbeitsaufwand investiert, bietet der Einsatz genaktivierter Biomaterialien gegenüber herkömmlichen Behandlungsformen großes therapeutisches Potential.

6. Anhang

6.1. Abkürzungen

AAV	<i>adeno associated virus</i>
AlMgSiO	Aluminiumlegierung
BMP-2 bzw. -4	<i>bone morphogenic protein-2 bzw. -4</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CMV	<i>cytomegalovirus</i>
COPROGs	<i>copolymer protected gene vectors</i>
CpG	<i>cytosin-phosphate-guanosin</i>
CuSO ₄	Kupfersulfat
DMEM	Dublecco's Modified Eagle's Medium
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DT	<i>desaminotyrosyl-L-tyrosine</i>
DTE	<i>desaminotyrosyl-L-tyrosine ethylester</i>
DTE05DT	<i>poly(DTE-co-5% DT carbonate)</i>
DTE30DT	<i>poly(DTE-co-30% DT carbonate)</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF-1 α	<i>elongation factor-1 alpha</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eq.	<i>equivalent</i>
EtBr	Ethidium Bromid
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FGF-4	<i>fibroblast growth factor-4</i>
FGF-7	<i>fibroblast growth factor-7</i>
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
GAM	<i>gene activated matrix</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>

GPRP	Glycin(G)/Prolin(P)/Arginin(R)/Prolin(P) - Peptid
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HIF	<i>hypoxia inducible factor</i>
I ¹²⁵	Radioaktives Iod ¹²⁵
I ¹³¹	Radioaktives Iod ¹³¹
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
KFGS	<i>keratinocyte fibrin glue suspension</i>
KGF	<i>keratinocyte growth factor</i>
KIE	Kallikrein inhibierende Einheit
LBL	<i>layer by layer</i>
Luc	<i>photinus pyralis luciferase</i>
mCi	Milli-Curi (1 Ci = 37 Giga-Becquerel)
MLV	<i>murine leukemia virus</i>
N/P-Ratio	Molares Verhältnis positiv geladener Aminogruppen (N) und negativ geladener Phosphatgruppen (P)
P6YE5C	Co-Polymer aus PEG und YE5C
pB-BMP-2	Plasmid kodierend für <i>bone morphogenic protein-2</i> unter Kontrolle des CMV-Promotors
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
pCMV-luc	Plasmid kodierend für <i>photinus pyralis luciferase</i> unter Kontrolle des CMV-Promotors
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
pDNA	Plasmid-DNA
PEG	Polyethylenglykol
pEGFP-N1	Plasmid kodierend für <i>enhanced green fluorescent protein</i> unter Kontrolle des CMV-Promotors
PEI	Polyethylenimin
PEI 22	lineares PEI, 22 kDalton
PEI 25	verzweigtes PEI, 25 kDalton
PGA	<i>poly-glycolic acid</i>
pGeneGrip-GFP	Rhodamin-markiertes Plasmid kodierend für <i>green fluorescent protein</i> unter Kontrolle des CMV-Promotors
PI	Propidium Iodid
PLA	<i>poly-lactic acid</i>

PLGA	<i>poly-lactic-co-glycolic acid</i>
PROCOPs	<i>protective copolymers (=P6YE5C)</i>
PTH	Parathormon
PTN	Pleiotrophin
pTracer-CMV2	Plasmid kodierend für Fusionsprotein <i>green fluorescent protein-Zeocin</i> unter Kontrolle des EF-1 α -Promotors und <i>multiple cloning site</i> unter Kontrolle des CMV2-Promotors
pTracer-GFP-EGF	Plasmid kodierend für Fusionsprotein <i>green fluorescent protein-Zeocin</i> unter Kontrolle des EF-1 α -Promotors und kodierend für <i>epidermal growth factor</i> unter Kontrolle des CMV2-Promotors
pWRG-1630-EGF	Plasmid kodierend für <i>epidermal growth factor</i> unter Kontrolle des CMV-Promotors
RGD	Arginin(R)/Glycin(G)/Asparaginsäure(D) - Peptid
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TGF- β 1	<i>transforming growth factor-β1</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
YE5C	Tyrosin(Y)/5 x Glutaminsäure(E)/Cystein(C) – Peptid

6.2. Publikationen

6.2.1. Vorträge

M. Kullmer, C. Andree, G. B. Stark (2002), Untersuchungen zur non-viralen Transfektion humaner Keratinozyten im Transfektionsmilieu Fibrin, 3. Jahrestagung der Chirurgischen Arbeitsgemeinschaft für Wundheilung (CAW), Freiburg, Deutschland

M. Kullmer, C. Andree, U. Schillinger, C. Plank, A. Stemberger, G. B. Stark (2004), Fibrin as an active biomatrix for non-viral gene vector delivery to human keratinocytes – investigations of various vector formulations, Joint Meeting of the „Tissue Engineering Society International“ and the „European Tissue Engineering Society“, Lausanne, Schweiz

M. Kullmer, C. Andree, C. Plank, U. Schillinger, G. B. Stark und A. Stemberger (2004), Fibrin als aktive Biomatrix zur non-virale Transfektion humaner Keratinozyten - Untersuchungen verschiedener Vektor-Formulierungen, Chirurgische Arbeitsgemeinschaft für Biomaterialien (CAB), München, Deutschland

M. Kullmer, C. Plank, U. Schillinger, C. Andree, G. B. Stark and A. Stemberger (2005), Fibrin and β -chain 441-461 peptide as a 3D biomatrix for tissue engineering improves tolerability and efficiency of non-viral gene vector formulations, 49. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V., Mannheim, Deutschland

M. Kullmer, B. Kersek, C. Plank, C. Koch, A. Stemberger (2005), Bioactive poly-D/L-lactic acid and poly-lactic-co-glycolic acid coatings for surface mediated gene transfer and local gene expression, 4th Annual Meeting of the European Tissue Engineering Society (ETES), München, Deutschland

6.2.2. Poster-Präsentationen

M. Kullmer, C. Andree, C. Plank, A. Stemberger, E. Wagner, G. B. Stark (2003), Fibrin als Dreidimensionales Transfektionsmilieu für Non-Viralen Gentransfer in Humane Keratinozyten, 34. Jahrestagung der Vereinigung der Deutschen Plastischen Chirurgen (VDPC) und 8. Jahrestagung der Vereinigung der Deutschen Ästhetischen Plastischen Chirurgen (VDÄPC) Freiburg, Deutschland

7. Literatur

1. Tatum, E.L., *Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine*. Perspect Biol Med, 1966. **10**(1): p. 19-32.
2. Friedmann, T. and R. Roblin, *Gene therapy for human genetic disease?* Science, 1972. **175**(25): p. 949-55.
3. *Health Department of the United Kingdom Gene Therapy Advisory Committee. Guidance on making proposals to conduct gene therapy research on human subjects*. Hum Gene Ther, 2001. **12**(6): p. 711-20.
4. Roemer, K. and T. Friedmann, *Concepts and strategies for human gene therapy*. Eur J Biochem, 1992. **208**(2): p. 211-25.
5. Gewirtz, A.M., D.L. Sokol, and M.Z. Ratajczak, *Nucleic acid therapeutics: state of the art and future prospects*. Blood, 1998. **92**(3): p. 712-36.
6. Lee, L.K. and C.M. Roth, *Antisense technology in molecular and cellular bioengineering*. Curr Opin Biotechnol, 2003. **14**(5): p. 505-11.
7. www.wiley.co.uk/genmed/clinical.
8. Springett, G.M., et al., *Infection efficiency of T lymphocytes with amphotropic retroviral vectors is cell cycle dependent*. J Virol, 1989. **63**(9): p. 3865-9.
9. Miller, D.G., M.A. Adam, and A.D. Miller, *Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(8): p. 4239-42.
10. Naldini, L., et al., *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector*. Science, 1996. **272**(5259): p. 263-7.
11. Reiser, J., et al., *Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(26): p. 15266-71.
12. Cavazzana-Calvo, M., et al., *Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease*. Science, 2000. **288**(5466): p. 669-72.
13. Hacein-Bey-Abina, S., et al., *LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1*. Science, 2003. **302**(5644): p. 415-9.
14. Wu, X., et al., *Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration*. Science, 2003. **300**(5626): p. 1749-51.
15. McConnell, M.J. and M.J. Imperiale, *Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy*. Hum Gene Ther, 2004. **15**(11): p. 1022-33.
16. Quantin, B., et al., *Adenovirus as an expression vector in muscle cells in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(7): p. 2581-4.
17. Marshall, E., *Gene therapy death prompts review of adenovirus vector*. Science, 1999. **286**(5448): p. 2244-5.
18. *Assessment of adenoviral vector safety and toxicity: report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee*. Hum Gene Ther, 2002. **13**(1): p. 3-13.
19. Raper, S.E., et al., *Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer*. Mol Genet Metab, 2003. **80**(1-2): p. 148-58.
20. Van Doren, K., D. Hanahan, and Y. Gluzman, *Infection of eucaryotic cells by helper-independent recombinant adenoviruses: early region 1 is not obligatory for integration of viral DNA*. J Virol, 1984. **50**(2): p. 606-14.

21. Morsy, M.A., et al., *An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 7866-71.
22. Kreppel, F. and S. Kochanek, *Long-term transgene expression in proliferating cells mediated by episomally maintained high-capacity adenovirus vectors*. J Virol, 2004. **78**(1): p. 9-22.
23. Alba, R., A. Bosch, and M. Chillon, *Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy*. Gene Ther, 2005. **12 Suppl 1**: p. S18-27.
24. Thomas, C.E., A. Ehrhardt, and M.A. Kay, *Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy*. Nat Rev Genet, 2003. **4**(5): p. 346-58.
25. Glover, D.J., H.J. Lipps, and D.A. Jans, *Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(4): p. 299-310.
26. Herweijer, H. and J.A. Wolff, *Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy*. Gene Ther, 2003. **10**(6): p. 453-8.
27. Niidome, T. and L. Huang, *Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors*. Gene Ther, 2002. **9**(24): p. 1647-52.
28. Mehier-Humbert, S. and R.H. Guy, *Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells*. Adv Drug Deliv Rev, 2005. **57**(5): p. 733-53.
29. Luo, D. and W.M. Saltzman, *Synthetic DNA delivery systems*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(1): p. 33-7.
30. Adami, R.C., et al., *Stability of peptide-condensed plasmid DNA formulations*. J Pharm Sci, 1998. **87**(6): p. 678-83.
31. Godbey, W.T., et al., *Poly(ethylenimine)-mediated transfection: a new paradigm for gene delivery*. J Biomed Mater Res, 2000. **51**(3): p. 321-8.
32. Pedroso de Lima, M.C., et al., *Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. **47**(2-3): p. 277-94.
33. De Smedt, S.C., J. Demeester, and W.E. Hennink, *Cationic polymer based gene delivery systems*. Pharm Res, 2000. **17**(2): p. 113-26.
34. Han, S., et al., *Development of biomaterials for gene therapy*. Mol Ther, 2000. **2**(4): p. 302-17.
35. Godbey, W.T. and A.G. Mikos, *Recent progress in gene delivery using non-viral transfer complexes*. J Control Release, 2001. **72**(1-3): p. 115-25.
36. Anderson, D.G., D.M. Lynn, and R. Langer, *Semi-automated synthesis and screening of a large library of degradable cationic polymers for gene delivery*. Angew Chem Int Ed Engl, 2003. **42**(27): p. 3153-8.
37. Demeneix, B. and J.P. Behr, *Polyethylenimine (PEI)*. Adv Genet, 2005. **53**: p. 217-30.
38. Boussif, O., et al., *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7297-301.
39. Dunlap, D.D., et al., *Nanoscope structure of DNA condensed for gene delivery*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(15): p. 3095-101.
40. Ogris, M., et al., *The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells*. Gene Ther, 1998. **5**(10): p. 1425-33.
41. Godbey, W.T., et al., *Improved packing of poly(ethylenimine)/DNA complexes increases transfection efficiency*. Gene Ther, 1999. **6**(8): p. 1380-8.
42. Wightman, L., et al., *Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo*. J Gene Med, 2001. **3**(4): p. 362-72.
43. Mislick, K.A. and J.D. Baldeschwieler, *Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(22): p. 12349-54.

44. Kopatz, I., J.S. Remy, and J.P. Behr, *A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin*. J Gene Med, 2004. **6**(7): p. 769-76.
45. Duncan, R., M.K. Pratten, and J.B. Lloyd, *Mechanism of polycation stimulation of pinocytosis*. Biochim Biophys Acta, 1979. **587**(3): p. 463-75.
46. Leonetti, J.P., G. Degols, and B. Lebleu, *Biological activity of oligonucleotide-poly(L-lysine) conjugates: mechanism of cell uptake*. Bioconjug Chem, 1990. **1**(2): p. 149-53.
47. Tang, M.X. and F.C. Szoka, *The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes*. Gene Ther, 1997. **4**(8): p. 823-32.
48. Sonawane, N.D., F.C. Szoka, Jr., and A.S. Verkman, *Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes*. J Biol Chem, 2003. **278**(45): p. 44826-31.
49. Akinc, A., et al., *Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis*. J Gene Med, 2005. **7**(5): p. 657-63.
50. Godbey, W.T., K.K. Wu, and A.G. Mikos, *Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(9): p. 5177-81.
51. Medina-Kauwe, L.K., J. Xie, and S. Hamm-Alvarez, *Intracellular trafficking of nonviral vectors*. Gene Ther, 2005. **12**(24): p. 1734-51.
52. Godbey, W.T., K.K. Wu, and A.G. Mikos, *Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle*. J Biomed Mater Res, 1999. **45**(3): p. 268-75.
53. Kunath, K., et al., *Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine*. J Control Release, 2003. **89**(1): p. 113-25.
54. Forrest, M.L., J.T. Koerber, and D.W. Pack, *A degradable polyethylenimine derivative with low toxicity for highly efficient gene delivery*. Bioconjug Chem, 2003. **14**(5): p. 934-40.
55. Forrest, M.L., et al., *Partial acetylation of polyethylenimine enhances in vitro gene delivery*. Pharm Res, 2004. **21**(2): p. 365-71.
56. Boeckle, S., et al., *Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer*. J Gene Med, 2004. **6**(10): p. 1102-11.
57. Moghimi, S.M., et al., *A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy*. Mol Ther, 2005. **11**(6): p. 990-5.
58. Kircheis, R., L. Wightman, and E. Wagner, *Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. **53**(3): p. 341-58.
59. Erbacher, P., J.S. Remy, and J.P. Behr, *Gene transfer with synthetic virus-like particles via the integrin-mediated endocytosis pathway*. Gene Ther, 1999. **6**(1): p. 138-45.
60. Kircheis, R., et al., *Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application*. Gene Ther, 2001. **8**(1): p. 28-40.
61. Kunath, K., et al., *Integrin targeting using RGD-PEI conjugates for in vitro gene transfer*. J Gene Med, 2003. **5**(7): p. 588-99.
62. Blessing, T., et al., *Different strategies for formation of pegylated EGF-conjugated PEI/DNA complexes for targeted gene delivery*. Bioconjug Chem, 2001. **12**(4): p. 529-37.
63. Zanta, M.A., et al., *In vitro gene delivery to hepatocytes with galactosylated polyethylenimine*. Bioconjug Chem, 1997. **8**(6): p. 839-44.

64. Diebold, S.S., et al., *Mannose polyethylenimine conjugates for targeted DNA delivery into dendritic cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(27): p. 19087-94.
65. Kircheis, R., et al., *Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery*. Gene Ther, 1997. **4**(5): p. 409-18.
66. O'Neill, M.M., et al., *Receptor-mediated gene delivery to human peripheral blood mononuclear cells using anti-CD3 antibody coupled to polyethylenimine*. Gene Ther, 2001. **8**(5): p. 362-8.
67. Wagner, E., *Effects of membrane-active agents in gene delivery*. J Control Release, 1998. **53**(1-3): p. 155-8.
68. Ogris, M., et al., *Melittin enables efficient vesicular escape and enhanced nuclear access of nonviral gene delivery vectors*. J Biol Chem, 2001. **276**(50): p. 47550-5.
69. Boeckle, S., E. Wagner, and M. Ogris, *C- versus N-terminally linked melittin-polyethylenimine conjugates: the site of linkage strongly influences activity of DNA polyplexes*. J Gene Med, 2005. **7**(10): p. 1335-47.
70. Plank, C., et al., *Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery*. Hum Gene Ther, 1996. **7**(12): p. 1437-46.
71. Ogris, M., et al., *PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery*. Gene Ther, 1999. **6**(4): p. 595-605.
72. Chollet, P., et al., *Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes*. J Gene Med, 2002. **4**(1): p. 84-91.
73. Petersen, H., et al., *Polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) copolymers: influence of copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system*. Bioconjug Chem, 2002. **13**(4): p. 845-54.
74. Kim, E.M., et al., *Monitoring the effect of PEGylation on polyethylenimine in vivo using nuclear imaging technique*. Nucl Med Biol, 2004. **31**(6): p. 781-4.
75. Finsinger, D., et al., *Protective copolymers for nonviral gene vectors: synthesis, vector characterization and application in gene delivery*. Gene Ther, 2000. **7**(14): p. 1183-92.
76. Kichler, A., *Gene transfer with modified polyethylenimines*. J Gene Med, 2004. **6 Suppl 1**: p. S3-10.
77. Wagner, E., *Strategies to improve DNA polyplexes for in vivo gene transfer: will "artificial viruses" be the answer?* Pharm Res, 2004. **21**(1): p. 8-14.
78. Read, M.L., A. Logan, and L.W. Seymour, *Barriers to gene delivery using synthetic vectors*. Adv Genet, 2005. **53**: p. 19-46.
79. Luo, D. and W.M. Saltzman, *Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at the cell surface*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(8): p. 893-5.
80. Andree, C., et al., *In vivo transfer and expression of a human epidermal growth factor gene accelerates wound repair*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(25): p. 12188-92.
81. Dujardin, N., P. Van Der Smissen, and V. Preat, *Topical gene transfer into rat skin using electroporation*. Pharm Res, 2001. **18**(1): p. 61-6.
82. Dujardin, N. and V. Preat, *Delivery of DNA to skin by electroporation*. Methods Mol Biol, 2004. **245**: p. 215-26.
83. Wolff, J.A., et al., *Direct gene transfer into mouse muscle in vivo*. Science, 1990. **247**(4949 Pt 1): p. 1465-8.
84. Widera, G., et al., *Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation in vivo*. J Immunol, 2000. **164**(9): p. 4635-40.
85. Rudolph, C., et al., *Aerosolized nanogram quantities of plasmid DNA mediate highly efficient gene delivery to mouse airway epithelium*. Mol Ther, 2005. **12**(3): p. 493-501.

86. Scherer, F., et al., *Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo*. *Gene Ther*, 2002. **9**(2): p. 102-9.
87. Krotz, F., et al., *Magnetofection potentiates gene delivery to cultured endothelial cells*. *J Vasc Res*, 2003. **40**(5): p. 425-34.
88. LaVan, D.A., T. McGuire, and R. Langer, *Small-scale systems for in vivo drug delivery*. *Nat Biotechnol*, 2003. **21**(10): p. 1184-91.
89. Rosen, H. and T. Aribat, *The rise and rise of drug delivery*. *Nat Rev Drug Discov*, 2005. **4**(5): p. 381-5.
90. Pannier, A.K. and L.D. Shea, *Controlled release systems for DNA delivery*. *Mol Ther*, 2004. **10**(1): p. 19-26.
91. Quick, D.J. and K.S. Anseth, *DNA delivery from photocrosslinked PEG hydrogels: encapsulation efficiency, release profiles, and DNA quality*. *J Control Release*, 2004. **96**(2): p. 341-51.
92. Jang, J.H., T.L. Houchin, and L.D. Shea, *Gene delivery from polymer scaffolds for tissue engineering*. *Expert Rev Med Devices*, 2004. **1**(1): p. 127-38.
93. Trentin, D., J. Hubbell, and H. Hall, *Non-viral gene delivery for local and controlled DNA release*. *J Control Release*, 2005. **102**(1): p. 263-75.
94. Cohen, H., et al., *Sustained delivery and expression of DNA encapsulated in polymeric nanoparticles*. *Gene Ther*, 2000. **7**(22): p. 1896-905.
95. Perez, C., et al., *Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA*. *J Control Release*, 2001. **75**(1-2): p. 211-24.
96. Prabha, S. and V. Labhasetwar, *Critical determinants in PLGA/PLA nanoparticle-mediated gene expression*. *Pharm Res*, 2004. **21**(2): p. 354-64.
97. Kim, I.S., et al., *Physicochemical characterization of poly(L-lactic acid) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles with polyethylenimine as gene delivery carrier*. *Int J Pharm*, 2005. **298**(1): p. 255-62.
98. Capan, Y., et al., *Preparation and characterization of poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for controlled release of poly(L-lysine) complexed plasmid DNA*. *Pharm Res*, 1999. **16**(4): p. 509-13.
99. Luo, D., et al., *Controlled DNA delivery systems*. *Pharm Res*, 1999. **16**(8): p. 1300-8.
100. Gebrekidan, S., B.H. Woo, and P.P. DeLuca, *Formulation and in vitro transfection efficiency of poly (D, L-lactide-co-glycolide) microspheres containing plasmid DNA for gene delivery*. *AAPS PharmSciTech*, 2000. **1**(4): p. E28.
101. Jang, J.H. and L.D. Shea, *Controllable delivery of non-viral DNA from porous scaffolds*. *J Control Release*, 2003. **86**(1): p. 157-68.
102. del Barrio, G.G., F.J. Novo, and J.M. Irache, *Loading of plasmid DNA into PLGA microparticles using TROMS (Total Recirculation One-Machine System): evaluation of its integrity and controlled release properties*. *J Control Release*, 2003. **86**(1): p. 123-30.
103. Scherer, F., et al., *Nonviral vector loaded collagen sponges for sustained gene delivery in vitro and in vivo*. *J Gene Med*, 2002. **4**(6): p. 634-43.
104. Huang, Y.C., et al., *Fabrication and in vitro testing of polymeric delivery system for condensed DNA*. *J Biomed Mater Res A*, 2003. **67**(4): p. 1384-92.
105. Cohen-Sacks, H., et al., *Delivery and expression of pDNA embedded in collagen matrices*. *J Control Release*, 2004. **95**(2): p. 309-20.
106. Quick, D.J., K.K. Macdonald, and K.S. Anseth, *Delivering DNA from photocrosslinked, surface eroding polyanhydrides*. *J Control Release*, 2004. **97**(2): p. 333-43.
107. Labhasetwar, V., et al., *A DNA controlled-release coating for gene transfer: transfection in skeletal and cardiac muscle*. *J Pharm Sci*, 1998. **87**(11): p. 1347-50.

108. Klugherz, B.D., et al., *Gene delivery from a DNA controlled-release stent in porcine coronary arteries*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(11): p. 1181-4.
109. Nakayama, Y., et al., *Development of high-performance stent: gelatinous photogel-coated stent that permits drug delivery and gene transfer*. J Biomed Mater Res, 2001. **57**(4): p. 559-66.
110. Shen, H., J. Tan, and W.M. Saltzman, *Surface-mediated gene transfer from nanocomposites of controlled texture*. Nat Mater, 2004. **3**(8): p. 569-74.
111. Oster, C.G., et al., *Design of amine-modified graft polyesters for effective gene delivery using DNA-loaded nanoparticles*. Pharm Res, 2004. **21**(6): p. 927-31.
112. O'Hagan, D.T., M. Singh, and J.B. Ulmer, *Microparticles for the delivery of DNA vaccines*. Immunol Rev, 2004. **199**: p. 191-200.
113. Little, S.R., et al., *Poly-beta amino ester-containing microparticles enhance the activity of nonviral genetic vaccines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(26): p. 9534-9.
114. Howard, K.A., et al., *Formulation of a microparticle carrier for oral polyplex-based DNA vaccines*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1674**(2): p. 149-57.
115. Jilek, S., H.P. Merkle, and E. Walter, *DNA-loaded biodegradable microparticles as vaccine delivery systems and their interaction with dendritic cells*. Adv Drug Deliv Rev, 2005. **57**(3): p. 377-90.
116. Shea, L.D., et al., *DNA delivery from polymer matrices for tissue engineering*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(6): p. 551-4.
117. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. Science, 1993. **260**(5110): p. 920-6.
118. Vacanti, J.P. and R. Langer, *Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation*. Lancet, 1999. **354** Suppl 1: p. SI32-4.
119. Griffith, L.G. and G. Naughton, *Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities*. Science, 2002. **295**(5557): p. 1009-14.
120. Williams, D.F., *To engineer is to create: the link between engineering and regeneration*. Trends Biotechnol, 2006. **24**(1): p. 4-8.
121. Bianco, P. and P.G. Robey, *Stem cells in tissue engineering*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 118-21.
122. Rahaman, M.N. and J.J. Mao, *Stem cell-based composite tissue constructs for regenerative medicine*. Biotechnol Bioeng, 2005. **91**(3): p. 261-84.
123. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
124. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
125. Conrad, C. and R. Huss, *Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery*. J Surg Res, 2005. **124**(2): p. 201-8.
126. Pei, M., et al., *Growth factors for sequential cellular de- and re-differentiation in tissue engineering*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **294**(1): p. 149-54.
127. Metcalfe, A.D. and M.W. Ferguson, *Harnessing wound healing and regeneration for tissue engineering*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 2): p. 413-7.
128. Yla-Herttuala, S. and K. Alitalo, *Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 694-701.
129. Andreadis, S.T., *Gene transfer to epidermal stem cells: implications for tissue engineering*. Expert Opin Biol Ther, 2004. **4**(6): p. 783-800.
130. Partridge, K.A. and R.O. Oreffo, *Gene delivery in bone tissue engineering: progress and prospects using viral and nonviral strategies*. Tissue Eng, 2004. **10**(1-2): p. 295-307.

131. Luo, J., et al., *Gene therapy for bone regeneration*. *Curr Gene Ther*, 2005. **5**(2): p. 167-79.
132. Hutmacher, D.W. and A.J. Garcia, *Scaffold-based bone engineering by using genetically modified cells*. *Gene*, 2005. **347**(1): p. 1-10.
133. Roman, S., et al., *Gene therapy in plastic and reconstructive surgery*. *Curr Gene Ther*, 2005. **5**(1): p. 81-99.
134. Hench, L.L., *Biomaterials*. *Science*, 1980. **208**(4446): p. 826-31.
135. Hench, L.L. and J. Wilson, *Surface-active biomaterials*. *Science*, 1984. **226**(4675): p. 630-6.
136. Parsons, J.R., *Resorbable materials and composites. New concepts in orthopedic biomaterials*. *Orthopedics*, 1985. **8**(7): p. 907-15.
137. Hench, L.L. and J.M. Polak, *Third-generation biomedical materials*. *Science*, 2002. **295**(5557): p. 1014-7.
138. Streuli, C., *Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation*. *Curr Opin Cell Biol*, 1999. **11**(5): p. 634-40.
139. Kleinman, H.K., D. Philp, and M.P. Hoffman, *Role of the extracellular matrix in morphogenesis*. *Curr Opin Biotechnol*, 2003. **14**(5): p. 526-32.
140. Hubbell, J.A., *Materials as morphogenetic guides in tissue engineering*. *Curr Opin Biotechnol*, 2003. **14**(5): p. 551-8.
141. Silva, E.A. and D.J. Mooney, *Synthetic extracellular matrices for tissue engineering and regeneration*. *Curr Top Dev Biol*, 2004. **64**: p. 181-205.
142. Hollister, S.J., *Porous scaffold design for tissue engineering*. *Nat Mater*, 2005. **4**(7): p. 518-24.
143. Lutolf, M.P., et al., *Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices*. *Nat Biotechnol*, 2003. **21**(5): p. 513-8.
144. Langer, R. and D.A. Tirrell, *Designing materials for biology and medicine*. *Nature*, 2004. **428**(6982): p. 487-92.
145. Bonadio, J., *Tissue engineering via local gene delivery: update and future prospects for enhancing the technology*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2000. **44**(2-3): p. 185-94.
146. Fang, J., et al., *Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(12): p. 5753-8.
147. Bonadio, J., et al., *Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration*. *Nat Med*, 1999. **5**(7): p. 753-9.
148. Andree, C., et al., *Plasmid gene delivery to human keratinocytes through a fibrin-mediated transfection system*. *Tissue Eng*, 2001. **7**(6): p. 757-66.
149. Lee, P.Y., Z. Li, and L. Huang, *Thermosensitive hydrogel as a Tgf-beta1 gene delivery vehicle enhances diabetic wound healing*. *Pharm Res*, 2003. **20**(12): p. 1995-2000.
150. Jozkowicz, A., et al., *Delivery of high dose VEGF plasmid using fibrin carrier does not influence its angiogenic potency*. *Int J Artif Organs*, 2003. **26**(2): p. 161-9.
151. Kasahara, H., et al., *Biodegradable gelatin hydrogel potentiates the angiogenic effect of fibroblast growth factor 4 plasmid in rabbit hindlimb ischemia*. *J Am Coll Cardiol*, 2003. **41**(6): p. 1056-62.
152. Christman, K.L., et al., *Enhanced neovasculation formation in ischemic myocardium following delivery of pleiotrophin plasmid in a biopolymer*. *Biomaterials*, 2005. **26**(10): p. 1139-44.
153. Huang, Y.C., et al., *Bone regeneration in a rat cranial defect with delivery of PEI-condensed plasmid DNA encoding for bone morphogenetic protein-4 (BMP-4)*. *Gene Ther*, 2005. **12**(5): p. 418-26.
154. Bannasch, H., et al., *Skin tissue engineering*. *Clin Plast Surg*, 2003. **30**(4): p. 573-9.
155. Bannasch, H., et al., *Tissue engineering of skin substitutes*. *Panminerva Med*, 2005. **47**(1): p. 53-60.

156. Horch, R.E., et al., *Tissue engineering of cultured skin substitutes*. J Cell Mol Med, 2005. **9**(3): p. 592-608.
157. Horch, R.E., H. Bannasch, and G.B. Stark, *Transplantation of cultured autologous keratinocytes in fibrin sealant biomatrix to resurface chronic wounds*. Transplant Proc, 2001. **33**(1-2): p. 642-4.
158. Gollwitzer, H., et al., *Biomechanical and allergological characteristics of a biodegradable poly(D,L-lactic acid) coating for orthopaedic implants*. J Orthop Res, 2005. **23**(4): p. 802-9.
159. Lucke, M., et al., *Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats*. Bone, 2003. **32**(5): p. 521-31.
160. Schmidmaier, G., et al., *Local application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1) from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats*. Bone, 2001. **28**(4): p. 341-50.
161. Schmidmaier, G., et al., *Bone morphogenetic protein-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodeling in fracture treatment: a biomechanical and histological study in rats*. Bone, 2002. **30**(6): p. 816-22.
162. Plank, C., et al., *Gene transfer into hepatocytes using asialoglycoprotein receptor mediated endocytosis of DNA complexed with an artificial tetra-antennary galactose ligand*. Bioconjug Chem, 1992. **3**(6): p. 533-9.
163. Marx, G., et al., *Fibrinogen C-terminal peptidic sequences (Haptides) modulate fibrin polymerization*. Thromb Haemost, 2004. **91**(1): p. 43-51.
164. Merrifield, R.B., *Solid-phase peptide synthesis*. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1969. **32**: p. 221-96.
165. Terebesi, J., K.Y. Kwok, and K.G. Rice, *Iodinated plasmid DNA as a tool for studying gene delivery*. Anal Biochem, 1998. **263**(1): p. 120-3.
166. Commerford, S.L., *Iodination of nucleic acids in vitro*. Biochemistry, 1971. **10**(11): p. 1993-2000.
167. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol, 1977. **36**(1): p. 59-74.
168. Bourke, S.L. and J. Kohn, *Polymers derived from the amino acid L-tyrosine: polycarbonates, polyarylates and copolymers with poly(ethylene glycol)*. Adv Drug Deliv Rev, 2003. **55**(4): p. 447-66.
169. *Special report. The hottest jobs of the future*. Time, 2000.
170. Lysaght, M.J. and A.L. Hazlehurst, *Tissue engineering: the end of the beginning*. Tissue Eng, 2004. **10**(1-2): p. 309-20.
171. Bouchie, A., *Tissue engineering firms go under*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(12): p. 1178-9.
172. Yannas, I.V., *Facts and theories of induced organ regeneration*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2005. **93**: p. 1-38.
173. Kong, H.J., et al., *Non-viral gene delivery regulated by stiffness of cell adhesion substrates*. Nat Mater, 2005. **4**(6): p. 460-4.
174. Singer, A.J. and R.A. Clark, *Cutaneous wound healing*. N Engl J Med, 1999. **341**(10): p. 738-46.
175. Kursa, M., et al., *Novel shielded transferrin-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes for systemic tumor-targeted gene transfer*. Bioconjug Chem, 2003. **14**(1): p. 222-31.
176. Boeckle, S., et al., *Melittin analogs with high lytic activity at endosomal pH enhance transfection with purified targeted PEI polyplexes*. J Control Release, 2006. **112**(2): p. 240-8.

177. Tandia, B.M., et al., *Identification of human plasma proteins that bind to cationic lipid/DNA complex and analysis of their effects on transfection efficiency: implications for intravenous gene transfer*. Mol Ther, 2003. **8**(2): p. 264-73.
178. Chu, A.J., et al., *Novel anticoagulant polyethylenimine: inhibition of thrombin-catalyzed fibrin formation*. Arch Biochem Biophys, 2003. **415**(1): p. 101-8.
179. Duncan, C.O., et al., *In vitro transfer of keratinocytes: comparison of transfer from fibrin membrane and delivery by aerosol spray*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2005. **73**(2): p. 221-8.
180. Riedel, K., et al., *Current status of genetic modulation of growth factors in wound repair*. Int J Mol Med, 2006. **17**(2): p. 183-93.
181. Gwak, S.J., et al., *Synergistic effect of keratinocyte transplantation and epidermal growth factor delivery on epidermal regeneration*. Cell Transplant, 2005. **14**(10): p. 809-17.
182. Eriksson, E., et al., *In vivo gene transfer to skin and wound by microseeding*. J Surg Res, 1998. **78**(2): p. 85-91.
183. Jeschke, M.G., et al., *Non-viral liposomal keratinocyte growth factor (KGF) cDNA gene transfer improves dermal and epidermal regeneration through stimulation of epithelial and mesenchymal factors*. Gene Ther, 2002. **9**(16): p. 1065-74.
184. Kopp, J., et al., *Accelerated wound healing by in vivo application of keratinocytes overexpressing KGF*. Mol Ther, 2004. **10**(1): p. 86-96.
185. Erdag, G., et al., *FGF-7 expression enhances the performance of bioengineered skin*. Mol Ther, 2004. **10**(1): p. 76-85.
186. Lee, P.Y., S. Chesnoy, and L. Huang, *Electroporatic delivery of TGF-beta1 gene works synergistically with electric therapy to enhance diabetic wound healing in db/db mice*. J Invest Dermatol, 2004. **123**(4): p. 791-8.
187. Philipp, K., et al., *Targeting TGF-beta in human keratinocytes and its potential role in wound healing*. Int J Mol Med, 2004. **14**(4): p. 589-93.
188. Petrie, N.C., et al., *Gene delivery of PDGF for wound healing therapy*. J Tissue Viability, 2005. **15**(4): p. 16-21.
189. Trentin, D., et al., *Peptide-matrix-mediated gene transfer of an oxygen-insensitive hypoxia-inducible factor-1alpha variant for local induction of angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(8): p. 2506-11.
190. Lucke, M., et al., *A new model of implant-related osteomyelitis in rats*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2003. **67**(1): p. 593-602.
191. Gollwitzer, H., et al., *Antibacterial poly(D,L-lactic acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology*. J Antimicrob Chemother, 2003. **51**(3): p. 585-91.
192. Wildemann, B., et al., *Local delivery of growth factors from coated titanium plates increases osteotomy healing in rats*. Bone, 2004. **34**(5): p. 862-8.
193. Takahashi, A., et al., *Transgene delivery of plasmid DNA to smooth muscle cells and macrophages from a biostable polymer-coated stent*. Gene Ther, 2003. **10**(17): p. 1471-8.
194. Wang, J., B.M. Wang, and S.P. Schwendeman, *Characterization of the initial burst release of a model peptide from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres*. J Control Release, 2002. **82**(2-3): p. 289-307.
195. Lee, J.W., et al., *Analysis of the initial burst of drug release coupled with polymer surface degradation*. Pharm Res, 2003. **20**(2): p. 149-52.
196. Luan, X., et al., *Key parameters affecting the initial release (burst) and encapsulation efficiency of peptide-containing poly(lactide-co-glycolide) microparticles*. Int J Pharm, 2006.

197. Barbanti, S.H., et al., *Porous and dense poly(L-lactic acid) and poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds: in vitro degradation in culture medium and osteoblasts culture*. J Mater Sci Mater Med, 2004. **15**(12): p. 1315-21.
198. Grayson, A.C., et al., *Differential degradation rates in vivo and in vitro of biocompatible poly(lactic acid) and poly(glycolic acid) homo- and co-polymers for a polymeric drug-delivery microchip*. J Biomater Sci Polym Ed, 2004. **15**(10): p. 1281-304.
199. Lu, L., et al., *In vitro degradation of porous poly(L-lactic acid) foams*. Biomaterials, 2000. **21**(15): p. 1595-605.
200. Tsuji, H. and K. Ikarashi, *In vitro hydrolysis of poly(L-lactide) crystalline residues as extended-chain crystallites. Part I: long-term hydrolysis in phosphate-buffered solution at 37 degrees C*. Biomaterials, 2004. **25**(24): p. 5449-55.
201. Lu, L., C.A. Garcia, and A.G. Mikos, *In vitro degradation of thin poly(DL-lactic-co-glycolic acid) films*. J Biomed Mater Res, 1999. **46**(2): p. 236-44.
202. Lu, L., et al., *In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams*. Biomaterials, 2000. **21**(18): p. 1837-45.
203. Katz, J.M., C.M. Roth, and M.G. Dunn, *Factors that influence transgene expression and cell viability on DNA-PEI-seeded collagen films*. Tissue Eng, 2005. **11**(9-10): p. 1398-406.
204. Perlstein, I., et al., *DNA delivery from an intravascular stent with a denatured collagen-poly(lactic-polyglycolic acid)-controlled release coating: mechanisms of enhanced transfection*. Gene Ther, 2003. **10**(17): p. 1420-8.
205. Radke, P.W., et al., *Vascular oligonucleotide transfer facilitated by a polymer-coated stent*. Hum Gene Ther, 2005. **16**(6): p. 734-40.
206. Ren, K., J. Ji, and J. Shen, *Construction and enzymatic degradation of multilayered poly-L-lysine/DNA films*. Biomaterials, 2006. **27**(7): p. 1152-9.
207. Jessel, N., et al., *Multiple and time-scheduled in situ DNA delivery mediated by beta-cyclodextrin embedded in a polyelectrolyte multilayer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(23): p. 8618-21.
208. Jewell, C.M., et al., *Multilayered polyelectrolyte films promote the direct and localized delivery of DNA to cells*. J Control Release, 2005. **106**(1-2): p. 214-23.

8. Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Fachvertreter Herrn Professor Dr. Ernst Wagner bedanken. Seine wissenschaftliche Unterstützung sowie seine professionelle Führung in den entscheidenden Momenten meiner wissenschaftlichen Tätigkeit haben grundlegend zur Realisierung der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Für die Möglichkeit, meine wissenschaftliche Arbeit durchführen zu können, bedanke mich bei Herrn Professor Dr. Bernd Gänsbacher, Direktor des Institutes für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München, sowie bei Herrn Professor Dr. G. Björn Stark, Ärztlicher Direktor der Abteilung Plastische und Handchirurgie der Universitätsklinik Freiburg. Ganz persönlich möchte ich mich bei Herrn Professor Stark für sein langjähriges Vertrauen und seinen prägenden Einfluss in einer intensiven Zeit meiner Ausbildung bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn PD Dr. Christian Plank vom Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung. Die Präzision und Konsequenz seiner Analysen, Planungen und Visionen stellten die zentralen Grundpfeiler meiner wissenschaftlichen Arbeiten dar und hielten mich jederzeit auf Kurs. Seine Professionalität und Freude an der Wissenschaft haben mich sehr beeindruckt und begeistert. In gleicher Weise gilt mein Dank Herrn Professor Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Axel W. Stemberger der sich mit großem wissenschaftlichem und persönlichem Engagement für die Realisierung meiner Arbeit eingesetzt hat. Zu jeder Zeit bekam ich die Möglichkeit, von seiner großen Erfahrung und Begeisterung in der Entwicklung und Erprobung neuer Therapiekonzepte zu profitieren.

Speziell möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Christoph Andree der Abteilung Plastische und Handchirurgie der Universitätsklinik Freiburg für eine tolle Freiburger Zeit voller neuer Horizonte, Vertrauen und Freundschaft bedanken. Einen herzlichen Dank dafür an die ganze Abteilung, insbesondere an Mine Jahrendt und Dr. Andreas Wenger.

Ich bedanke mich bei den Verantwortlichen der Firma Baxter (Heidelberg, Deutschland), die durch ihre Fördermittel das finanzielle Gerüst meiner Arbeit geschaffen haben. Insbesondere danke ich dabei Frau Dr. Katharina Bittner, die mir immer die nötige Standfestigkeit gegeben hat, diese Aufgabe zu bewältigen.

Im Einzelnen möchte ich mich ganz besonders bei Christian Koch bedanken, der sich unermüdlich um die Synthese und Bereitstellung essentieller Peptide und Polymere gekümmert hat. Die gemeinsamen Aktionen der „1.39-Truppe“ haben mir eine unvergessliche Zeit in München beschert. Weiter möchte ich mich bei Mary Follo (Laser Scanning Mikroskopie) und Burgl Hammerschmidt (Durchflusszytometrie) für ihre Unterstützung bedanken.

Vielen Dank an alle Kollegen in München und in Freiburg, die sich für mich eingesetzt haben. Ohne Eure Unterstützung wäre meine Arbeit niemals zustande gekommen.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden und vor allem bei Lena Aigner für die Geduld, das Verständnis und die Mühe bedanken, die sie bereit waren in mich zu investieren und dafür, dass sie mir die Energie gegeben haben, diese wissenschaftliche Arbeit durchzuführen.

9. Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Martin Kullmer
Geburtstag: 21.02.1975
Geburtsort: Freiburg im Breisgau
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Ausbildung

1981 – 1985 Grundschule in Eichstetten am Kaiserstuhl
1985 – 1994 Gymnasium in Breisach am Rhein
08/1994 – 10/1995 Zivildienst im Zentral-OP der Universitätsklinik Freiburg im Breisgau
10/1995 – 05/2000 Studium der Pharmazie an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau
07/2001 Approbation als Apotheker

Berufliche Tätigkeiten

03/1996 – 04/1996 Famulatur in der Kaiserstuhl-Apotheke Eichstetten am Kaiserstuhl
08/1996 – 09/1996 Famulatur in der Rats-Apotheke Bötzingen am Kaiserstuhl
03/1999 19-tägiges Praktikum als wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau (AG Prof. Dr. A. W. Frahm)
09/1999 19-tägiges Praktikum als wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau (AG Prof. Dr. B. Wunsch)
05/2000 – 11/2000 Pharmaziepraktikant im ersten Halbjahr in der Kloster-Apotheke München
11/2000 – 04/2001 Pharmaziepraktikant im zweiten Halbjahr in der Firma Klinge Pharma Fujisawa Group München

06/2001 – 12/2005 Extern betreute Doktorarbeit am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie – Biotechnologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Fachvertretung: Prof. Dr. Ernst Wagner

Betreuung: PD Dr. Christian Plank (TU München)

Seit 01/2006 Apotheker in der Rats-Apotheke in Bötzingen am Kaiserstuhl