

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

**Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
am Klinikum rechts der Isar**

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher)

**Kombination von COPROGs mit resorbierbaren
Arzneistoffträgern – Einfluss der Träger auf die Effizienz
der nicht-viralen Transfektion**

Barbara Anna Kersek

*Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten
Dissertation.*

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation:
1. apl. Prof. Dr. A. Stemberger
2. Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher

*Die Dissertation wurde am 25.05.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 23.09.2009 angenommen.*

In Erinnerung an
Lothar Bernhard Kersek

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG

1.1 Biomaterialien	7
1.1.1 Definition	7
1.1.2 Rückblick	7
1.1.3 Probleme der Biomaterialien.....	8
1.2 Polymere.....	9
1.2.1 Polyglykolsäure und Polymilchsäure	10
1.2.2 Poly-Desaminotyrosyl-Tyrosinethylester.....	11
1.3 Gentherapie	12
1.4 Genvektoren	13
1.4.1 Virale Genvektoren	14
1.4.2 Nicht-virale Genvektoren	15
1.4.2.1 Vektoren mit PEI.....	16
1.4.2.2 Entstehung der COPROGs	18
1.5 Tissue Engineering	19
1.5.1 Genaktivierte Biomaterialien	20
1.6 Zielsetzung	21

2 MATERIAL und METHODEN

2.1 Chemikalien und Reagenzien.....	23
2.2 Genvektoren	24
2.2.1 Formulierung geschützter Genvektoren (=COPROGs)	24
2.2.2 Nackte DNA	26
2.3 Zellkultur	26
2.3.1 Zelllinie	26
2.3.2 In vitro Transfektion.....	26
2.4 Polymerbeschichtungen	26
2.4.1 Oberflächen aus PDLLA	26
2.4.2 Oberflächen aus DTE5DT und DTE30DT.....	27
2.4.3 Oberflächen aus PDLLA mit pB-luc COPROGs	28

2.4.4 Oberflächen aus PLGA mit pB-luc COPROGs	30
2.4.5 Oberflächen aus DTE5DT und DTE30DT mit pB-luc COPROGs.....	32
2.4.6 Oberflächen aus PDLLA und PLGA mit nackter pDNA.....	33
2.4.7 Oberflächen aus PDLLA und PLGA mit pEGFP-N1 COPROGs	35
2.4.8 Oberflächen aus PDLLA und PLGA mit radioaktiv markierten pB-luc COPROGs.....	35
2.5 Integrität von pDNA nach Dispersion in Ethylacetat.....	36
2.6 Metabolische Aktivität	36
2.7 Luciferase Expression	37
2.8 Proteinkonzentration	38
2.9 Durchflusszytometrie (FACS).....	39
2.10 Freisetzung von pDNA und PEI 25.....	39
2.10.1 Messvorgang	39
2.10.2 Radioaktivmarkierung von pB-luc pDNA mit I ¹²⁵	40
2.10.3 Radioaktivmarkierung von PEI 25 mit I ¹³¹	40

3 ERGEBNISSE

3.1 Lösungsverhalten der Polymere	41
3.1.1 Poly (D/L lactic acid)	41
3.1.2 Poly (D/L lactic-co-glycolic acid).....	41
3.1.3 Poly-Deasaminotyrosyl-Tyrosinethylester.....	41
3.1.4 Löslichkeit.....	42
3.2 Integrität der pDNA	43
3.3 Einfluss des Lösungsmittels auf die metabolische Aktivität.....	44
3.3.1 Vergleich PDLLA in Ethylacetat versus PDLLA in Chloroform/Isopropanol.....	44
3.3.2 Vergleich PDLLA, DTE5DT und DTE30DT	46
3.3.3 Kontrollgruppen	46
3.4 Einfluss von COPROGs auf Oberflächen und Zellen.....	47
3.4.1 Strukturelle Unterschiede der Beschichtungen	47
3.4.2 Metabolische Aktivität	48
3.5 Luciferase Expression im zeitlichen Verlauf	50
3.6 Oberflächen aus PDLLA bzw. PLGA mit pB-luc COPROGs.....	51
3.6.1 Metabolische Aktivität	52
3.6.2 Luciferase Expression	52

3.6.3 Zusammenfassung	53
3.7 Oberflächen aus PDLLA bzw. PLGA mit nackter pDNA	54
3.7.1 Metabolische Aktivität	54
3.7.2 Luciferase Expression	54
3.8 Oberflächen aus DTE5DT bzw. DTE30DT mit COPROGs.....	55
3.8.1 Metabolische Aktivität	55
3.8.2 Luciferase Expression	56
3.9 Oberflächen aus PDLLA gelöst in Chloroform/Isopropanol	57
3.9.1 Metabolische Aktivität	57
3.9.2 Luciferase Expression	57
3.9.3 Zusammenfassung	58
3.10 Transfektionseffizienz	58
3.11 Freisetzung von pDNA und PEI 25.....	63
3.11.1 Freisetzung pDNA.....	63
3.11.2 Freisetzung von PEI 25	64

4 DISKUSSION

4.1 Tissue Engineering	70
4.2 Beschichtung medizinischer Implantate.....	71
4.3 Genaktivierte Biomaterialien	72
4.3.1 Auswahl der Polymere	72
4.3.2 Auswahl der Genvektoren	73
4.3.3 Beschichtungstechnologie	74
4.4 Toxizität genaktiverter Polymerbeschichtungen.....	75
4.4.1 Einfluss des Lösungsmittels	75
4.4.2 Einfluss der COPROGs.....	75
4.5 Optimierung des COPROGs-Polymer-Verhältnisses.....	76
4.5.1 Expression und metabolische Aktivität.....	76
4.5.2 Transfektionseffizienz	77
4.5.3 Freisetzung	77
4.6 Variation des Polymers	79
4.6.1 Formulierung der Oberflächen	79
4.6.2 Expression und metabolische Aktivität der Polytyrosincarbonate mit COPROGs.....	79

4.7 Kontrollgruppen	80
4.7.1 PDLLA mit Chloroform/Isopropanol.....	80
4.7.2 Beschichtungen mit nackter DNA.....	80
4.8 Ausblick und Praxisrelevanz	81
5 ZUSAMMENFASSUNG	82
6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	84
7 LITERATURVERZEICHNIS	86
8 DANKSAGUNG	94
9 VORTRÄGE.....	95
10 LEBENSLAUF	96
11 ROHDATEN (CD-ROM)	

1 Einleitung

1.1 Biomaterialien

1.1.1 Definition

Als Biomaterialien werden in der Medizin Stoffe bezeichnet, die sich durch eine gute Gewebeverträglichkeit auszeichnen, nicht toxisch wirken und die körpereigene Strukturen ersetzen. Man nutzt sie in vielfacher Weise zum Beispiel zur Herstellung von Implantaten, Prothesen oder ganzen Organen wie dem Kunstherz. Aber auch für so einfache Dinge wie den chirurgischen Faden werden sie benötigt, den selbstauflösenden sowie den permanent im Körper verbleibenden. Hier trifft man auf eine weitere Unterscheidungsmöglichkeit der Biomaterialien, nämlich in die biologisch abbaubaren, die als biodegradierbar bezeichnet werden, und die dauerhaft verbleibenden, die über eine bestimmte Stabilität verfügen müssen, um die definierte Funktion zu erfüllen.



1.1.2 Rückblick

Schon sehr früh in unserer Zeitrechnung begannen Menschen, körperfremdes Material als Ersatz für verlorene Gliedmaßen oder Zähne einzusetzen. Das belegt ein Fund aus dem zweiten Jahrhundert, bei dem Eisen als Zahnersatz in einem menschlichen Körper gefunden wurde. Funde aus der Mayakultur dagegen zeigen Perlmutter und Seemuscheln als gängigen Zahnersatz. Doch erst Anfang des 19. Jahrhunderts begann man Metallimplantate gezielt in Studien zu untersuchen. 1891 implantierte der deutsche Chirurg Themistocles Gluck den ersten Hüftersatz aus Elfenbein, der sich jedoch nicht durch langen Erfolg auszeichnete. Einen Durchbruch in der modernen Geschichte der Biomaterialien stellte 1952 der erste Einsatz einer Gefäßprothese dar, mit der ein Patient mehrere Jahre problemlos überlebte. 1939 wurden erstmals Kunststoffe als Biomaterialien untersucht, und bereits 1920 entwickelte Hermann Staudinger die heutige Strukturvorstellung von Polymeren, für die er 1953 den Nobelpreis erhielt. Auch heute noch werden Polymere vielfach als Biomaterialien in der Medizin angewendet.

1.1.3 Probleme der Biomaterialien

So lange die Biomaterialien auch existieren und so unersetzlich und hilfreich sie auch in der heutigen Medizin sind, so bringen sie nach wie vor zahlreiche Probleme und Komplikationen mit sich. Die häufigste Komplikationsart stellen immer noch Infektionen dar (De Lalla, F., 1999). Wie bereits Elek und Conen 1957 (Elek, S.D., Conen, P.E., 1957) nachweisen konnten, erhöhen Fremdkörper die Infektiosität bakterieller Erreger. Dadurch kommt es beim Einsetzen von Implantaten gehäuft zu Entzündungsprozessen sowohl im Weichteilgewebe, was ein gründliches chirurgisches Débridement notwendig macht, als auch beispielsweise im Knochen. Nicht selten macht eine solche Entzündungsreaktion eine Explantation unumgänglich, im schlimmsten Fall kann sogar eine Amputation der betroffenen Gliedmaße notwendig werden (Kramhoft, M., et al., 1994). Diesem Problem versuchte man bereits in zahlreichen Arbeiten Abhilfe durch lokalen Antibiotikaeinsatz zu schaffen (Gollwitzer, H., et al., 2003). Eine weitere schwerwiegende Komplikation stellen thromboembolische Reaktionen bei intravasalem Einsatz von Biomaterialien dar (Lersch, C., et al., 1999; David, M., Andrew, M., 1993), die schlimmstenfalls zum Tod des Patienten führen können. Auch hier versucht man bereits vielfach eine Verbesserung zu erzielen, indem man sich bemüht antithrombogene Polymere herzustellen (Kim, S.W., 1996; Pierce, C.M., et al., 2000). Zudem können Fremdmaterialien Allergien oder immunologische Reaktionen bis hin zu gravierenden Abstoßungsreaktionen induzieren. Dem versucht man vorzubeugen, indem man möglichst biokompatible Materialien verwendet. Ein weiteres Problem stellen die an das Implantat gestellten Anforderungen dar. Zum Einen muss es in Härte, Elastizität, Plastizität und Stabilität dem körpereigenen Gewebe möglichst ähnlich sein, zum Anderen soll es einen dauerhaften Ersatz liefern, so das beste Beispiel ein Kunstherz, welches idealerweise ein Leben lang währt. Eine mangelnde Gewebeintegration des Implantates kann die Lebensqualität eines Patienten erheblich reduzieren, so kann es zum Beispiel zu einer Lockerung des Implantates kommen, welche schlimmstenfalls zu einer Explantation und dem damit verbundenem Funktionsverlust der entsprechenden Gliedmaße führen kann. Um ein solches Risiko zu minimieren und ein besseres Einwachsen des Implantates in den Knochen zu ermöglichen, wurden Studien durchgeführt, bei denen in die Oberflächenbeschichtung eingebrachte Wachstumsfaktoren die Knochenneubildung unterstützen (Deppe, H., et al., 2003; Schmidmaier, G., et al., 2004; Wildemann, B., et al., 2004). In dieser Arbeit wird dieses Thema mit einem neuen Konzept aufgegriffen, um mittels nicht-viralen Gentransfers dem Implantat wachstumsfördernde Eigenschaften zu verleihen. (zu Biomaterialien s. auch Ratner, B., 2004; Anderson, J.M., 2001)

1.2 Polymere

Ein Polymer ist eine chemische Verbindung, ein sogenanntes Makromolekül, welches aus Ketten- bzw. verzweigten Molekülen gebildet wird, die aus gleichen oder gleichartigen Einheiten, den sogenannten Monomeren bestehen.

Polymere werden vielseitig in der Industrie verwendet, haben jedoch als Implantatwerkstoffe und Arzneimittelträger auch in der heutigen Medizin bereits einen hohen Stellenwert erlangt. Es gibt eine Vielzahl von Polymeren die sich durch die verschiedensten Eigenschaften auszeichnen, ein Unterscheidungsmerkmal ist dabei die Beständigkeit und Resorbierung. Je nach den Ansprüchen, die an das jeweilige Polymer gestellt werden, gibt es permanent verweilende Polymere, die man zum Beispiel zur Herstellung von Implantaten oder chirurgischen Fäden verwendet, oder biologisch abbaubare, biodegradierbare Polymere. Die letzteren Stoffklassen eignen sich gut für den Einsatz als Arzneistoffträger zur Bildung eines sogenannten *drug delivery system* (LaVan, D.A., et al., 2003; Rosen, H., Acribat, T., 2005). Hier ist eine weitere Unterscheidung wichtig, nämlich in die hydrolytisch und enzymatisch abbaubaren Polymere. Da Wasser überall im Körper vorkommt, werden die hydrolytisch abbaubaren Polymere ungerichtet überall im Körper abgebaut. Dagegen kann der enzymatische Abbau gezielt an definierten Wirkorten erfolgen, an denen das benötigte Enzym in ausreichender Konzentration vorhanden ist. Dieses Vorgehen bezeichnet man als *drug targeting*. Des weiteren unterscheidet man die Art des Abbaus eines Polymers: zum Einen den Abbau in der Masse – bezeichnet als *bulk degradation*, zum Anderen den Oberflächenabbau – bezeichnet als *surface erosion* (Lendlein, A., 1999). Zudem ist natürlich auch die Abbaugeschwindigkeit ein wichtiger Faktor. All diese Eigenschaften haben Einfluss auf die Wirkungsweise eines Arzneistoff-Träger-Systems. In einer perfekten Kombination und der Wahl des richtigen Polymers könnte ein ideales System geschaffen werden, angepasst an die jeweiligen Anforderungen. Vorteile eines solchen *drug delivery system* auf der Basis eines bioresorbierbaren Polymers sind unter anderem die lokale Anwendungsmöglichkeit und somit eine Minimierung der systemischen Belastung durch den Arzneistoff und bei Implantaten der Wegfall einer Zweitoperation zur Entfernung des Arzneistoffträgers (Baker, R.W., Lonsdale, H.K., 1974).

Langer und Peppas haben 1981 (Langer, R., Peppas, N.A., 1981) ein ideales Trägersystem folgendermaßen definiert:

- eine konstante Wirkstofffreisetzung
- Kompatibilität mit dem umgebenden Gewebe

- Gute Handhabbarkeit für den Anwender
- Ein hohes Wirkstoff-Träger-Verhältnis
- Eine einfache und kostengünstige Herstellung
- Eine sichere Anwendbarkeit
- Gute mechanische Stabilität
- Eine einfache Sterilisation.

Im Folgenden soll auf bestimmte Polymerklassen eingegangen werden, die speziell für diese Arbeit von Bedeutung sind.

1.2.1 Polyglykolsäure und Polymilchsäure

Polyglykolsäure (PGA = *poly (glycolic acid)*) und Polymilchsäure (PLA = *poly (lactic acid)*) sind beides Polymere, die bereits früh für die Anwendung in der Medizin entdeckt wurden. Sie zählen zu den α -Hydroxycarbonsäuren, da sie eine Hydroxylgruppe in der α -Position tragen. Ihre Grundstruktur wird in Abbildung 1.1 verdeutlicht.

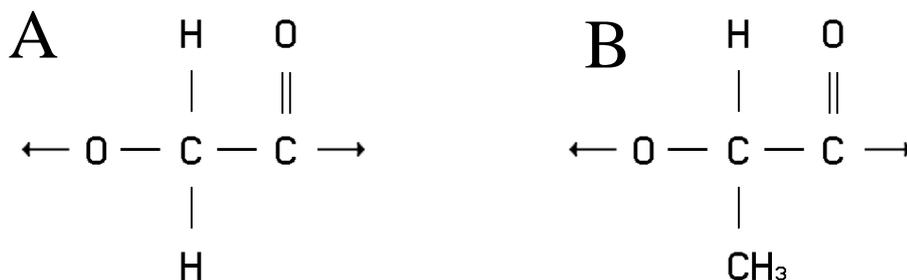


Abbildung 1.1 Chemische Struktur der Monomere der Polyglykolsäure (A) und Poly-L-Milchsäure (B)

Dabei ist zu beachten, dass PLA aufgrund seiner Chiralität in mehreren Formen vorliegen kann. Es kommt unter anderem vor als D-Enantiomer, Poly-D-Milchsäure (PDLA = *poly (D-lactic acid)*) genannt, als L-Enantiomer, als Poly-L-Milchsäure (PLLA = *poly (L-lactic acid)*) bezeichnet, oder als eine Mischung der beiden als sogenanntes Racemat, welches Poly-D,L-Milchsäure (PDLLA = *poly (D,L-lactic acid)*) genannt wird.

Auch eine Mischung aus PGA und PLA ist möglich, welche dann als Copolymer bezeichnet wird (PLGA = *poly (lactic-co-glycolic acid)*). Schon in den 50er Jahren wurde diese Kombination als resorbierbares Nahtmaterial eingesetzt. Dabei hat man sich die Eigenschaft zu Nutze gemacht, dass PLA wesentlich langsamer resorbiert wird als PGA, und so ein länger währendes Nahtmaterial geschaffen (Kohn, J., Langer, R., 1996). Beide Polymere

werden rein hydrolytisch gespalten, wobei man beobachtet hat, dass der Abbau *in vitro* kürzer dauert als *in vivo*, was auf die Ausbildung einer Pseudokapsel *in vivo* sowie die höhere Verfügbarkeit von Wasser *in vitro* zurückzuführen ist (Schakenraad, J.M., Dijkstra, P.J., 1991). Da sich alle hier aufgeführten Polymere durch gute Biokompatibilität im Sinne geringer Fremdkörperreaktionen, guter Gewebeverträglichkeit und eine vollständige Resorption auszeichnen (Heidemann, W., et al., 2001), entsprechen sie den von uns gestellten Ansprüchen an einen idealen Arzneimittelträger.

Sowohl PDLLA- als auch PLGA-Polymere werden von der Firma Boehringer Ingelheim hergestellt und werden uns in dieser Arbeit noch näher beschäftigen.

1.2.2 Poly-Desaminotyrosyl-Tyrosinethylester

Die Geschichte der Poly-Desaminotyrosyl-Tyrosinethylester begann in den 70er Jahren, als man versuchte Aminosäuren in Biomaterialien bzw. Polymere zu integrieren (Anderson, J.M., et al., 1974). Als nicht-toxische, enzymatisch abbaubare Substanzen mit mannigfaltig verzweigten Seitenketten eigneten sie sich potentiell gut für die Ankopplung von Wirkstoffen und den Einsatz im menschlichen Körper. Eine erschwerte Löslichkeit, Aufquellen in wässrigen Medien sowie mögliche Antigenitäten bei Kopplung mehrerer Aminosäuren waren jedoch die limitierenden Faktoren (Anderson, J.M., et al., 1985). So kamen Langer und Kohn auf die Idee, „Pseudo-Polyaminosäuren“ zu entwickeln (Kohn, J., Langer, R., 1996), die in ihrem Grundgerüst modifiziert den Ansprüchen der Biokompatibilität genügten (Ertel, S.I., Kohn, J., 1994). So entstanden die seit kurzem in der Orthopädie eingesetzten Poly-Desaminotyrosyl-Tyrosinethylester, welche biokompatibel, nicht toxisch sowie vollständig abbaubar sind und die erforderlichen mechanischen Eigenschaften mit sich bringen. Die Grundstruktur der von Tyrosin abgeleiteten Polyiminocarbonate wie Polycarbonate zeigt Abbildung 1.2.

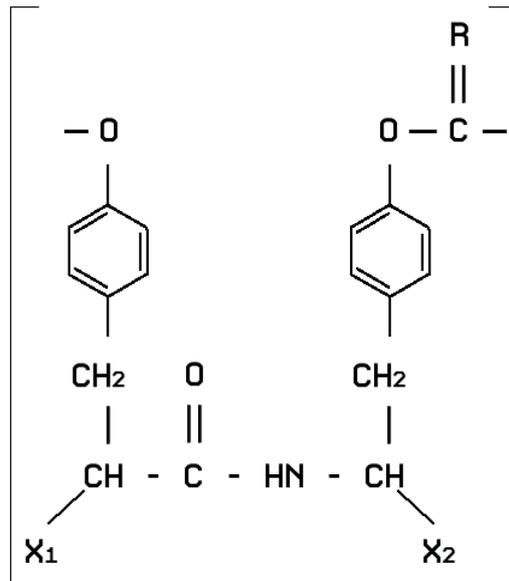


Abbildung 1.2 Grundgerüst der von Tyrosin abgeleiteten Polyiminocarbonate (R=NH) und Polycarbonate (R=O)

Dabei beeinflusst die Art der angehängten Gruppen (X1 und X2) die mechanischen Eigenschaften des Polymers (Pulapura, S., Kohn, J., 1992). Die Biodegradation dieser Polymere findet je nach Zusammensetzung während mehrerer Monate statt und ist in ihrer Kinetik den Polylaktiden gleichwertig. Die Biokompatibilität dagegen erscheint leicht vorteilhaft vor allem in Bezug auf die Wechselbeziehung zwischen Knochen und Polykarbonaten (Choueka, J., et al., 1996). Dieser Vorteil scheint auf der Ausbildung einer Chelatbindung zwischen Kalzium und der Oberfläche des Polymers zu beruhen (James, K., et al., 1999).

In dieser Arbeit haben wir uns mit den zwei Polymeren *poly (DTE-co-5% DT carbonate)* (=DTE5DT) und *poly (DTE-co-30% DT carbonate)* (=DTE30DT) näher auseinandergesetzt, die freundlicherweise von Prof. J. Kohn von der Rutgers State University of New Jersey zur Verfügung gestellt wurden.

1.3 Gentherapie

Die Gentherapie ist ein von jeher umstrittenes Forschungsgebiet, da sie einerseits ein sehr hohes Potential birgt und revolutionäre Heilungschancen verspricht, zum Anderen aber noch nicht ausreichend erforscht ist und daher hohe Risiken mit sich bringt. Man versteht darunter das Einbringen von Nukleinsäuren (DNA bzw. RNA) in Zielzellen von Patienten, um damit

Krankheiten oder genetische Defekte zu heilen. Ihr Grundstein wurde 1966 bei der Fachtagung „Reflections on Research and the Future of Medicine“ an der Columbia-Universität in New York bei einem Vortrag von Joshua Lederberg und Edward Tatum gelegt (Tatum, E.L., 1966). Das erste Mal vorgeschlagen und diskutiert wurde der Einsatz der Gentherapie 1972 von Friedmann und Roblin (Friedmann, T., Roblin, R., 1972). Nach einem anfänglich großen Aufschwung und der Erweckung großer Hoffnungen erlitt man aber noch in den 1990er Jahren herbe Rückschläge beim Einsatz der Therapie in klinischen Studien (Marshall, E., 1999; Assessment of adenoviral vector safety and toxicity, 2002; Raper, S.E., et al., 2003). Auch wenn seitdem das öffentliche Interesse an weiteren Studien verhallt ist, geht dennoch die aktuelle Forschung weiter. Bislang wurden ca. 1400 klinische Studien weltweit durchgeführt. Deutschland liegt dabei an dritter Stelle nach den USA und Großbritannien. Vor allem wird die Gentherapie in Zusammenhang mit Krebserkrankungen erforscht, gefolgt von kardiovaskulären und monogenetischen Erkrankungen. Aber auch auf dem Gebiet infektiöser Krankheiten und vielen weiteren Gebieten verspricht sie dauerhafte therapeutische Erfolge (Gene Therapy Clinical Trials Worldwide). Es werden dabei drei Therapieansätze zu Grunde gelegt, die man wie folgt definieren kann. Zum einen die Substitutionstherapie, bei der es sich um Ersatz bzw. Korrektur fehlerhafter oder fehlender Genfunktionen bei monogenetischen Erberkrankungen handelt, des weiteren die Additionstherapie bei der es um eine Verstärkung der physiologischen Genfunktion geht, zum Beispiel der Immunabwehr bei Krebserkrankungen, und zuletzt die Suppressionstherapie, bei der man versucht, pathogene Genaktivitäten auszuschalten (Interdisziplinäre Arbeitsgruppe „Gentechnologiebereich“, 2008). Für alle drei Therapieansätze sind suffiziente Transportmechanismen für die Gene in die Zelle bzw. den Zellkern von Nöten. Dabei bedient man sich sogenannter Genvektoren.

1.4 Genvektoren

Genvektoren könnte man auch als „Genfähren“ bezeichnen, die den Transport von Nukleinsäuren (DNA sowie RNA) in die Zielzelle bzw. den Zellkern ermöglichen. Hierbei werden bislang zwei Hauptgruppen unterschieden: zum Einen virale Genvektoren basierend auf dem physiologischen Eindringmechanismus der Viren in die Wirtszelle, dieser Vorgang wird Transduktion genannt, zum Anderen nicht-virale Genvektoren, also synthetisch

hergestellte „Genfähren“, welche mittels physikalischer aber auch chemischer Methoden in die Zelle gelangen. Diese Vorgänge werden als Transfektion bezeichnet.

1.4.1 Virale Genvektoren

Virale Genvektoren nahmen ihren Ursprung aus der Beobachtung physiologischer Vorgänge bei einer Virusinfektion und der Fähigkeit der Viren, in die Wirtszelle einzudringen sowie ihr eigenes Genom unter Verwendung zelleigener Mechanismen zu vervielfältigen. Somit hatte man ein natürliches Transportsystem für Nukleinsäuren gefunden, das zwar wie geschaffen war, eine Zelle zu infizieren und das gewünschte Genom zu replizieren, doch nicht unbedingt darauf ausgerichtet, die infizierte Zelle am Leben zu erhalten oder das exprimierte Gen zu bewahren. Dennoch waren replikationsunfähige Viren, deren Genom gegen ein therapeutisches ausgetauscht worden war, die ersten Genvektoren im klinischen Einsatz.

Retroviren und Adenoviren sind die derzeit meist genutzten Viren für klinische Studien (Gene Therapy Clinical Trials Worldwide). Es werden jedoch auch Adeno-assoziierte Viren, Herpesviren, Pockenviren, Lentiviren, Hepatitisviren und Vakziniaviren eingesetzt. Viren sind bei der Transduktion von Genen in den Zellkern hocheffizient, so benötigt man nur eine geringe Anzahl, um eine Zelle zu infizieren.

Der erste große Erfolg in der Geschichte der Gentherapie wurde bei der Behandlung der *severe combined immunodeficiency-X1* (=SCID-X1) erzielt (Cavazzana-Calvo, M., et al., 2000). Dabei wurden durch modifizierte Retroviren, genauer den *murine leukemia virus* (=MLV), *in vitro* Gene in das Genom hämatopoetischer Stammzellen eingebracht. Diese wurden später mittels einer autologen Stammzellentransplantation den Patienten zugeführt. Alle zehn der behandelten Kinder konnten geheilt werden, zwei davon jedoch erkrankten kurze Zeit später an Leukämie und mussten mit einer Chemotherapie behandelt werden (Hacein-Bey-Abina, S., et al., 2003). Man hat als Ursache dieser schwerwiegenden Erkrankung eine Spätfolge der Gentherapie identifiziert. Dadurch, dass Retroviren ihre Gene dauerhaft in das Genom von Zellen einbauen, kann dies - wie in dem genannten Fall - mutagene Folgen nach sich ziehen.

Adenoviren (McConnell, M.J., Imperiale, M.J., 2004) bergen dagegen kein so hohes Risiko der Mutagenität, da sie das Genom nicht dauerhaft verändern. Zudem können sie sowohl in sich teilende als auch in ruhende Zellen eindringen (Quantin, B., et al., 1992). Dennoch wird der klinische Einsatz durch eine natürliche Immunität des menschlichen Körpers gegen Adenoviren, die schwerwiegende immunologische Reaktionen hervorrufen kann, limitiert. Es wurden ernsthafte Nebeneffekte beobachtet wie Thrombozytopenie, intravasale Koagulation

bis hin zum multiplen Organversagen, das bereits einmal zum Tod eines Patienten geführt hat (Marshall, E., 1999; Assessment of adenoviral vector safety and toxicity, 2002; Raper, S.E., et al., 2003). Deswegen hat man im Gegensatz zu Adenoviren der *first generation*, bei denen nur ein Gensegment verändert wurde (Van Doren, K., et al., 1984), versucht, eine weitere Gefahrreduktion durch Ersatz aller viralen Gene zu erzielen (Kreppel, F., Kochanek, S., 2004; Morsy, M.A., et al., 1998). Diese neue Generation wurde als *gutless* Viren bezeichnet. Doch auch bei diesen kam es zu Entzündungsreaktionen sowie einer starken Immunantwort (Schiedner, G., et al., 2003; Niidome, T., Huang, L., 2002; Alba, R., et al., 2005). Somit ist diese wohl weniger abhängig vom Virentypus oder dessen Genom, sondern vielmehr durch den Transduktionsprozess selbst sowie die viralen Kapselproteine bedingt. Das Minimieren der Risiken einer Gentherapie ist das Ziel und die Herausforderung neuer gentherapeutischer Konzepte (Thomas, C.E., et al., 2003; Glover, D.J., et al., 2005).

1.4.2 Nicht-virale Genvektoren

Nicht-virale Genvektoren stellen die zweite große Gruppe der „Genfähren“ dar. Sie haben Vor- aber auch Nachteile gegenüber den viralen Vektoren. Zum einen sind sie leichter und kostengünstiger in der Herstellung. Zudem verfügt man über eine größere Flexibilität (Wang, R., et al., 2004), da sie durch chemische sowie physikalische Einflüsse einfacher veränderbar sind. Auch rufen sie weitaus weniger bis keine Immunreaktionen hervor, da sie sehr wenige oder keine immunogenen Proteine beinhalten, vielmehr auf chemisch hergestellten Lipiden bzw. Polykationen basieren. Der große Nachteil der nicht-viralen Genvektoren beruht bis heute auf ihrer geringen Transfektionseffizienz, die nur zum Teil durch das Einbringen großer Mengen DNA in den menschlichen Körper kompensiert werden kann. Diese geringen Transfektionsraten beruhen zum Einen auf dem Unvermögen der Vektoren, in die Zielzelle bzw. den Zellkern einzudringen. Um dieses zu steigern, wurden bereits mehrere chemische wie auch physikalische Methoden (Niidome, T., Huang, L., 2002) erprobt, wie zum Beispiel die *Particle gun*, durch welche kleine Goldkugeln in die Zelle geschossen werden, auf dessen Oberfläche die therapeutischen Gene haften. Ein weiteres Verfahren stellt die Elektroporation dar, bei der ein Stromstoß die Zellmembranen vorübergehend durchlässig macht, sodass die DNA-Partikel in die Zelle eindringen können. Auch andere Verfahren wurden bereits vielfach erprobt, ergaben bis jetzt aber kein hinreichend zufriedenstellendes Ergebnis (Mehier-Humbert, S., Guy, R.H., 2005). Ein weiteres Problem stellen Serumnukleasen dar, die durch vorzeitigen enzymatischen Abbau das Erreichen der Zielzelle verhindern. Um der DNA mehr Stabilität zu verleihen und ihr

einen Schutz vor dem enzymatischen Abbau zu bieten, wurden Gen-Komplexe mit kationischen Lipiden und Polymeren (Luo, D., Saltzmann, W.M., 2000), beruhend auf elektrostatischen Interaktionen, hergestellt, sogenannte Lipoplexe bzw. Polyplexe. Dabei handelt es sich um kleinste Partikel im Nanometerbereich. Zur Herstellung wurden dabei natürlich vorkommende Proteine wie die Histone oder Protamine genutzt sowie synthetisch hergestellte Polyaminosäuren, zum Beispiel Poly-Lysin oder Poly-Arginin (Eichman, J.D., et al., 2001; Zuber, G., et al., 2001). Hierbei hat sich Polyethylenimin (=PEI) als eines der effizientesten Reagenzien herauskristallisiert und stellt derzeit eine der effektivsten Trägersubstanzen für nicht-viralen Gentransfer dar (Boussif, O., et al., 1995).

1.4.2.1 Vektoren mit PEI

Eine erste erfolgreiche Verwendung von Polyethylenimin zur Beförderung von DNA ist Jean-Paul Behr et al. gelungen (Kichler, A. et al., 1999). In der heutigen Forschung wird PEI in zwei strukturellen Formen verwendet, sowohl linear als auch verzweigt, wie man Abb. 1.3 entnehmen kann. Auch besteht eine weite Streuung an verschiedenen Molmassen, in denen PEI verfügbar ist.

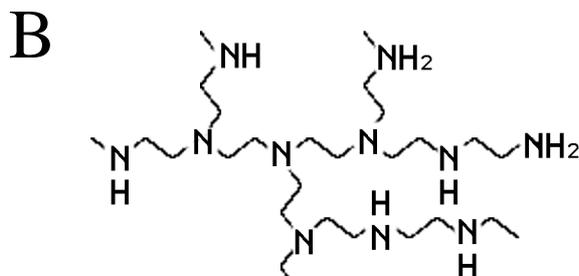


Abbildung 1.3 Darstellung der linearen (A) und der verzweigten (B) Strukturformel von PEI.

PEI ist ein organisches Makromolekül mit der höchsten Dichte protonierbarer Aminogruppen und somit wie geschaffen, um Nukleinsäuren in Nanopartikel zu komplexieren (Wagner, E., 2004). Die Größe der komplexierten DNA-PEI-Partikel hängt unter anderem von dem molaren Verhältnis der Aminogruppen (N) des PEI zu den negativ geladenen Phosphatgruppen (P) der DNA ab, welches durch die N/P-Ratio ausgedrückt wird. Zum Anderen wird es von der Salzkonzentration des umgebenden Bildungsmilieus entscheidend beeinflusst.

Unter physiologischen Bedingungen im Bereich pH 7 sind bei weitem nicht alle Aminogruppen des PEI vollständig protoniert. Dies bedingt eine gewisse Pufferkapazität, welche wiederum eine wichtige Voraussetzung für den Einsatz des PEI als „Genfähre“ im Körper ist. Nach einer unspezifischen Bindung der DNA-PEI-Partikel an negativ geladene Proteoglykane der Zellmembran (Mislick, K.A., Baldeschwieler, J.D., 1996; Kopatz, I., et al., 2004) werden sie durch Endozytose in die Zelle aufgenommen (Duncan, R., et al., 1979; Leonetti, J.P., et al., 1990; Tang, M.X., Szoka, F.C., 1997). Da dieser Vorgang ungerichtet erfolgt und eine Kontrolle bzw. zielgenaue Steuerung der Komplexe nicht möglich ist, ist bereits vielfach versucht worden, PEI-Polyplexe mit spezifischen Rezeptor-Liganden wie Peptiden (Erbacher, P., et al., 1999; Kircheis, R., et al., 2001; Kreppel, F., Kochanek, S., 2004), Wachstumsfaktoren (Blessing, T., et al., 2001), Kohlenhydraten (Zanta, M.A., et al., 1997; Diebold, S.S., et al., 1999) oder Antikörpern zu kombinieren, um dadurch das Eindringen in die Zielzelle zu erleichtern und das Ziel genauer zu definieren. Da diese Komplexe den viralen Transduktionsweg nachahmen, bezeichnet man sie auch als *artificial viruses* (Wightman, L., et al., 2001). Nach endosomaler Aufnahme in das Zellinnere verhindert die Pufferkapazität des PEI trotz endosomaler Ansäuerung durch Protonen einen pH-Abfall und schützt so die Komplexe vor lysosomalem Abbau. Dadurch bleibt ein Teil der DNA-PEI-Partikel erhalten und kann ins Zellinnere freigesetzt werden, wo der Weitertransport der Gene in den Zellkern erfolgt und dort eine Umsetzung der genetischen Information stattfindet (Godbey, W.T., et al., 1999; Medina-Kauwe, L.K., et al., 2005). Die Freisetzung aus den Endosomen erfolgt durch den sogenannten *proton-sponge-effect* (Dunlap, D.D., et al., 1997). Dabei folgt auf die Ansäuerung eine passive Diffusion von Chlorid-Ionen in das Innere des Endosomes, wodurch es zu einem Anstieg des osmotischen Drucks kommt und letztendlich zu einem Platzen des Vesikels (Legendre, J.Y., et al., 1997). Dennoch ist dies bei geringen Konzentrationen eine der Haupthürden für effizienten Gentransfer mit PEI-Polyplexen (Ogris, M., et al., 2001). Deswegen hat man den Versuch unternommen, inaktivierte Viren mit PEI-Polyplexen zu kombinieren (Bettinger, T., et al., 2001), um die Effizienz zu steigern. Hier jedoch stellt sich wiederum das Problem der körpereigenen Immunität gegenüber Viruspartikeln und der Entzündungsreaktionen, die sie hervorrufen. So ist man dazu übergegangen, membranaktive Substanzen in die Komplexe zu integrieren, welche von viralen Proteinen (Xu, L., et al., 1999) und Toxinen (Lukacs, G.L., et al., 2000; Suh, J., et al., 2003) abgeleitet oder künstlich synthetisiert wurden (Brunner, S., et al., 2000; Arigita, C., et al., 1999). Dabei hat sich die Substanz Melittin als eine der

effektivsten in Kombination mit PEI-Komplexen (Clamme, J.P., et al., 2003; Godbey, W.T., et al., 2001) oder auch Lipoplexen (Finsinger, D., et al., 2000) herausgestellt.

1.4.2.2 Entstehung der COPROGs

Ein weiteres Problem der PEI-Polyplexe stellte die Tatsache dar, dass sie zwar *in vitro* hohe Transfektionsraten aufwiesen, jedoch bei der *in vivo*-Applikation bei Mäusen als positiv geladene Teilchen sehr schnell aus dem Körperkreislauf eliminiert wurden und hauptsächlich in der Lunge kumulierten. Auch die Expressionsraten der transfizierten Gene waren in der Lunge weitaus höher als in anderen Organen (Plank, C., et al., 1992). Zudem war Gentransfer in therapeutisch wirksamen Dosen mit akuten Intoxikationen verbunden. Dies resultiert daraus, dass die positiv geladenen Polyplexe nicht nur zielgerichtet an Zielmembranen ankoppeln, sondern auch mit anderen Zellen und Blutbestandteilen interagieren. So hat man bei *ex vivo*-Versuchen beobachtet, dass Polyplexe Erythrozytenkonglomerate verursachen können. Man vermutet, dass sowohl die erhöhte Expression in der Lunge wie auch die Toxizität durch das Entstehen der Konglomerate aus Polyplexen und Blutbestandteilen und der Einbettung dieser in den Lungenkapillaren verursacht wurde. Deswegen versuchte man die positive Ladung der Teilchen durch die Anbindung eines weiteren Polymers abzuschirmen und benutzte hierzu das Polyethylenglykol (PEG). Durch diese „PEG-ylierung“ der PEI-Polyplexe wurden zwar die Nebeneffekte reduziert (Plank, C., et al., 1992; Kim, T., et al., 2004), aber auch die Transfektionsrate, da die Teilchen nun weder an Blutbestandteile noch an Zielzellen ankoppelten. So forschte man weiter und fand ein negativ geladenes Schutz-Polymer, ein sogenanntes *Protective Copolymer*, welches über elektrostatische Wechselwirkungen an die positiv geladenen PEI-Polyplexe angehängt werden kann. Dieses Copolymer (=P6YE5C) setzt sich zusammen aus einer negativ geladenen Peptidgruppe (YE5C) sowie einer PEG-Einheit (P6). Diese sind über ein entsprechendes Linker-Molekül miteinander verbunden. Die so entstandenen (siehe auch Abb. 1.4) Copolymer-geschützten PEI-Polyplexe werden als *Copolymer Protected Gene Vectors* (=COPROGs) bezeichnet (Finsinger, D., et al., 2000).

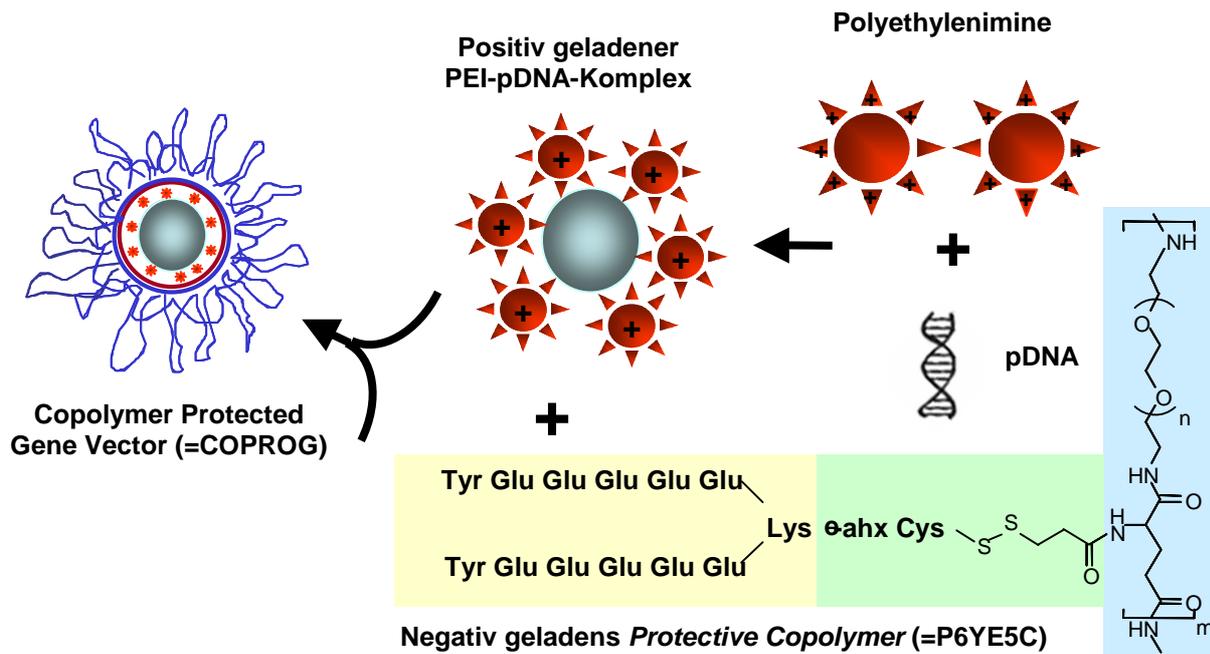


Abbildung 1.4 Bildung von *Copolymer Protected Gene Vectors* (=COPROGs) über elektrostatische Wechselwirkungen

COPROGs bieten eine Vielzahl positiver Eigenschaften, wie zum Beispiel eine Verringerung der Komplementaktivierung sowie durch die neutrale Ladung eine Reduzierung der Interaktionen zwischen Polyplexen und Serumproteinen und somit eine Herabsetzung der Toxizität. Ein weiterer Vorteil ist die reversible Bindung des Copolymers an PEI-Polyplexe. Dadurch ist eine Verdrängung der PEI-Polyplexe aus dieser Bindung durch geladene Proteinstrukturen, wie zum Beispiel die extrazelluläre Matrix, möglich und damit eine Ankopplung an Zellmembranen. Zudem sind COPROGs sehr einfach und kostengünstig in der Herstellung. Bei der Vielzahl an Einsatzmöglichkeiten bieten sie eine attraktive Alternative zur Optimierung nicht-viraler Transfersysteme und wurden bereits in zahlreichen Untersuchungen erfolgreich eingesetzt (Wagner, E., 2004).

1.5 Tissue Engineering

Tissue Engineering (Langer, R., Vacanti, J.P., 1993; Vacanti, J.P., Langer, R., 1999) ist der Versuch, natürliche Gewebe unter Laborbedingungen nachzuzüchten. Damit möchte man zum Einen Heilungsprozesse unterstützen (durch beispielsweise Abdeckung offener Wunden), aber auch funktionsuntauglich gewordenes oder zerstörtes Gewebe ersetzen (Griffith, L.G., Naughton, G. 2002). Ein Fernziel ist die Züchtung ganzer Organe vor dem

Hintergrund, dass das heutige Spenderangebot bei Weitem nicht den gestiegenen Bedarf an Ersatzgeweben und -organen decken kann.

Es handelt sich hierbei um ein interdisziplinäres Forschungsfeld an dem Materialwissenschaften, Zellbiologie und Medizin gemeinsam beteiligt sind. Eine der Herausforderungen besteht darin, ein geeignetes Gerüst zu entwickeln, an dem sich körpereigene Zellen orientieren und mehrschichtige Strukturen bilden können. Im Idealfall verwendet man hierfür selbstauflösende Biomaterialien, die vollständig resorbiert werden, sodass in der Folge lediglich das auf diese Weise geformte Organ bestehen bleibt. Zudem müssen entsprechende Bedingungen geschaffen werden, unter denen die Zellen wachsen, sich vermehren und in die verschiedenen Gewebetypen ausdifferenzieren können. Diese Zellen können autologer (vom Patienten selbst), allogener (vom Individuum gleicher Spezies) oder xenogener (von anderen Lebewesen, zum Beispiel Tieren) Herkunft sein. Dabei haben autologe Zellen den Vorteil, dass sie keine immunologischen Abstoßungsreaktionen induzieren. Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang multipotente Stammzellen, die in verschiedene Zelltypen ausdifferenzieren können (Bianco, P., Robey, P.G., 2001; Rahaman, M.N., Mao, J.J., 2005). Ein Vorteil hierbei ist, dass in relativ kurzer Zeit, große Mengen gleichartiger Zellen zur Verfügung stehen. Da jedoch der Einsatz embryonaler Stammzellen (Thomson, J.A., et al., 1998) aus vorwiegend ethischen Gründen strengen Kontrollen unterliegt, rücken adulte Stammzellen (Pittenger, M.F., et al., 1999) immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses (Conrad, C., Huss, R., 2005). Um die Ausdifferenzierung sowie das Wachstum dieser Zellen zu steuern, ist eine Vielzahl an Mediatoren notwendig, unter anderen Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Hormone (Pei, M., et al., 2002; Metcalfe, A.D., Ferguson, M.W., 2005). Durch die gentherapeutische Forschung ist es möglich geworden, in diese Regelmechanismen aktiv einzugreifen und so zielgerichtet Gewebe entstehen bzw. wachsen zu lassen.

1.5.1 Genaktivierte Biomaterialien

Auch genaktivierte Biomaterialien kann man weitestgehend dem *Tissue Engineering* zuschreiben. Man versteht darunter Biomaterialien, in die Gene eingearbeitet sind, welche beim Einsatz des Biomaterials im Körper freigesetzt werden und lokal auf die umgebenden Zellen wirken. Zwar handelt es sich dabei nicht um Gewebe- bzw. Organersatz im engeren Sinne, aber je nach Funktion, für welche die eingesetzten Gene kodieren, können sie zu Gewebeerneuerung bzw. –wachstum vor Ort beitragen und sich somit an den Heilungsprozessen im Körper beteiligen. Der Vorteil einer solchen lokal beschränkten

Gentherapie ist, dass sie gezielt an dem Ort eingesetzt werden kann, an welchem sich das erkrankte Gewebe befindet. Damit umgeht man eine systemische Belastung durch die Gentherapie und verringert das Risiko eventueller Nebenwirkungen oder der Beeinflussung gesunden Gewebes. Ein solches *drug delivery system* bietet vielerlei Einsatzmöglichkeiten und am richtigen Einsatzort eine vielversprechende neuartige Therapieoption. Zur Herstellung eignen sich vor allem biokompatible sowie biodegradierbare Polymere (s. auch Kap. 1.2), die man zum Beispiel zur Beschichtung von Implantaten verwendet oder auch zur Herstellung von Schrauben. Dort eingearbeitete Gene werden beim Abbau des Polymers langsam freigesetzt und fördern, zum Beispiel über die Stimulierung von Zellen zur Bildung von Wachstumsfaktoren, die Frakturheilung. Da nackte DNA sehr geringe Transfektionsraten aufweist, virale Genvektoren dagegen viele Nebenwirkungen sowie Immunreaktionen induzieren können, bieten nicht-virale Genvektoren ein zukunftsorientiertes Konzept (s. auch Kap. 1.4). In der vorliegenden Arbeit wird man sich vorwiegend mit einer speziellen Gruppe nicht-viraler Genvektoren befassen, nämlich den COPROGs.

1.6 Zielsetzung

Medizinische Implantate werden vielfach in der Orthopädie sowie auch Unfallchirurgie verwendet. Sie dienen dort hauptsächlich der mechanischen Stabilisierung von Knochenbrüchen bzw. -defekten. Die Hauptprobleme dabei sind die Infektanfälligkeit sowie die biologische (Un-)Verträglichkeit der künstlichen Stützgewebe. Deswegen hat man nach Beschichtungen bzw. Trägersubstanzen geforscht, welche sowohl biokompatibel als auch biodegradierbar und als Träger für Arzneistoffe geeignet sind – beispielsweise Antibiotika. Hierbei hat sich das *poly (D/L lactic acid)* (=PDLLA) als eine sehr vielversprechende Trägersubstanz herauskristallisiert und wurde bereits im Gebrauch mit Antibiotika umfassend getestet (Gollwitzer H., et al., 2003). Auch in Kombination mit rekombinanten Wachstumsfaktoren wie dem BMP-2, dem IGF und dem TGF- β 1 wurde das PDLLA bereits erprobt (Schmidmaier, G., et al., 2004; Wildemann, B., et al., 2004). Dabei hat man bei *in vivo*-Versuchen eine beschleunigte Callusbildung des Knochens beobachtet sowie eine daraus resultierende verbesserte Frakturheilung (Rahaman, M.N., Mao, J.J., 2005). Da jedoch der Einsatz rekombinanter Wachstumsfaktoren mit sehr hohen Kosten verbunden ist, hat man nach Alternativen gesucht und ist hierbei auf einen gentherapeutischen Ansatz gestoßen, nämlich den nicht-viralen Gentransfer. Die Idee ist, mittels nicht-viraler Genvektoren, im

Besonderen der COPROGs (Finsinger, D., et al., 2000), körpereigene Zellen zur Bildung von Wachstumsfaktoren anzuregen und so deren Wachstum zu fördern.

Ziel dieser Arbeit ist nun die Untersuchung dieser Methodik sowie deren Effizienz. Dabei will man zunächst das PDLLA als bereits erprobtes Trägermaterial einsetzen und versuchen ein optimales Polymer-COPROGs-Verhältnis zu finden, bei dem die Gen-Expression der Zellen, die Transfektionseffizienz und die Gen-Freisetzung möglichst hoch sind, gleichzeitig aber die Toxizität der Genvektoren bezogen auf die Zellen möglichst gering gehalten wird. Für diese Untersuchungen wurden folgende Plasmide eingesetzt: pB-luc zur Expression des Reportergens *photinus pyralis luciferase* und pEGFP-N1 zur Expression des Reportergens *enhanced green fluorescent protein*. Desweiteren will man vier verschiedene Polymere, das PDLLA, PLGA, DTE5DT und DTE30DT, und deren Eigenschaften als Trägersubstanzen gegeneinander testen und abwägen, um das so entstandene *drug delivery system* nochmals zu optimieren bzw. an die individuellen Anforderungen beim *in vivo*-Einsatz anzupassen.

2 Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Reagenzien

Als Grundsubstanz der durchgeführten Versuche dienten synthetische Polymere, zum Einen die Polymere *poly (D/L lactic acid)* (=PDLLA) mit dem Handelsnamen Resomer® R 203 S und *poly (D/L lactic-co-glycolic acid)* (=PLGA) mit dem Handelsnamen Resomer® RG 503 H, erworben von der Firma Boehringer Ingelheim Pharma (Ingelheim, Deutschland). Zum Anderen kamen die Polymere *poly (DTE-co-5% DT carbonate)* (=DTE5DT) und *poly (DTE-co-30% DT carbonate)* (=DTE30DT) zum Einsatz, die freundlicherweise von Professor J. Kohn (Rutgers State University of New Jersey, New Jersey Center for Biomaterials, Piscataway, NJ, USA) zur Verfügung gestellt wurden.

Als Lösungsmittel dienten Ethylacetat von der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland), Chloroform von der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) und Isopropanol aus der hauseigenen Apotheke des Klinikums Rechts der Isar. Chloroform und Isopropanol wurden zusammen in einem Mischverhältnis von 19:1 verwendet. Zudem wurden weitere Lösungsmittel von der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) wie Methanol, Aceton und 2-Butanol zu Lösungsversuchen herangezogen.

Zur Herstellung von Genvektoren wurden zwei unterschiedliche eukaryotische Expressionsplasmide verwendet. Das Plasmid pB-luc, erworben von der Firma Roche (Mannheim, Deutschland), zur Expression des Reportergens *photinus pyralis luciferase* unter der Kontrolle des CMV-Promotors und das Plasmid pEGFP-N1, erworben von der Firma Clontech (Palo Alto, CA, USA), zur Expression des Reportergens *enhanced green fluorescent protein* (=EGFP) unter Kontrolle des CMV-Promotors. Des Weiteren wurde verzweigtes Polyethylenimin mit einem mittleren Molekulargewicht von 25 kDa (=PEI 25) von der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. PEI 25 wurde in Wasser gelöst, mit HCl neutralisiert, gegen Wasser dialysiert und nach Sterilfiltration in einer Konzentration von 2,9 mg/ml verwendet. Das PEG (=Polyethylen glycol)-Copolymer P6YE5C wurde in der Arbeitsgruppe nach Finsinger et al. (Finsinger, D., et al., 2000) synthetisiert, aufgereinigt und das Reaktionsprodukt gegen Wasser dialysiert.

Für die Zellkultur wurde *Dublecco's Modified Eagle Medium* der Firma Biochrom AG (Berlin, Deutschland) verwendet, 10 % (v/v) fötales Kälberserum (=FCS) der Firma PAA (Linz, Österreich) sowie Penicillin und Streptomycin der Firma Biochrom AG (Berlin, Deutschland). Außerdem wurden Trypsin EDTA der Firma Invitrogen (Karlsruhe,

Deutschland) und *phosphate-buffered saline* (=PBS) der Firma Biochrom AG (Berlin, Deutschland) eingesetzt.

Zur Messung der Genexpression wurden ein Lyse-Puffer, bestehend aus 0,1 % Triton-X in 250 mM Tris pH 7.8, verwendet sowie ein Substrat-Puffer, hergestellt aus 60 mM Dithiothreitol, 10 mM Magnesiumsulfat, 1 mM ATP, 30 μ M(-)-Luciferin der Firma Boehringer (Mannheim, Deutschland) und 25 mM Glycyl-Glycin pH 7.8. Des Weiteren die Standardsubstanz rekombinante Luciferase der Firma Roche (Mannheim, Deutschland).

Für Proteinbestimmungen wurden das Bio-Rad Protein Assay Kit II der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) basierend auf der Methode von Bradford (Bradford, M.M., 1976) und Bovines Serum Albumin (= BSA) mit der Bezeichnung „Protein Standard II“ derselben Firma genutzt.

Zudem wurde das Zellproliferationsreagens WST®-1 der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) zur Messung der metabolischen Aktivität eingesetzt.

Das *fluorescence activated cell sorting* (=FACS) –Puffer, bestehend aus PBS, 1 % FCS und 0,02 % Na-Acid, wurde zur Messung der Transfektionseffizienz verwendet.

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

2.2 Genvektoren

2.2.1 Formulierung geschützter Genvektoren (=COPROGs)

Zur Herstellung der *Copolymer protected gene vectors* (=COPROGs) wurden drei Bestandteile herangezogen, eine Plasmid-DNA (=pDNA) mit der Konzentration 5 mg pro ml, das Polyethylenimin (=PEI 25) mit einer Konzentration von 2,9 mg pro ml und das PEG-Copolymer P6YE5C mit einer Konzentration von 114,6 mM. Nach Festlegen der benötigten pDNA-Menge wurden die Mengen der anderen beiden Bestandteile nach den folgenden Formeln definiert. Die Menge von PEI 25 wurde nach der Formel $N/P = (\mu\text{g PEI} / 43) * (330 / \mu\text{g pDNA})$ bestimmt, wobei die hierbei verwendete N/P Ratio 8 betrug. Das Schutzpolymer P6YE5C wurde nach der Formel $(\mu\text{l P6YE5C}) = 1000 * (\mu\text{g pDNA} / 330) * (\text{Ladungsäqu.} / c (\text{P6YE5C}) \text{ mM})$ mit 3 Ladungsäquivalenten entsprechend der negativen Ladung der eingesetzten pDNA berechnet. Alle drei Bestandteile wurden separat in sterilen Gefäßen vorgelegt und das Endvolumen mit Wasser angeglichen (siehe Abb. 2.1 a).

Wie in Abb. 2.1 b) schematisch dargestellt, wurde zuerst unter „Vortexen“ pDNA-Lösung der PEI-Lösung zugeführt und für einige Sekunden zusammen geschüttelt. Nach Einhalten einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur bildeten sich unter Kondensierung der beiden Komponenten positiv geladene DNA-Komplexe. Diese wässrige Lösung aus pDNA - PEI 25 - Komplexen wurde wiederum unter „Vortexen“ der P6YE5C-Lösung beigemischt und für einige Sekunden weiter geschüttelt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur formte sich das negativ geladene PEG-Copolymer um die positiv geladenen DNA-Komplexe. Die so entstandene wässrige COPROGs-Lösung, bestehend aus pDNA - PEI 25 - P6YE5C - Komplexen, wurde in einem sterilen zylindrischen Glashomogenisator/Potter (15 ml) der Firma Schütt Labortechnik (Göttingen, Deutschland) in einer Mischung aus Trockeneis und Ethylalkohol unter ständigem Rühren schockgefroren und über Nacht lyophilisiert. Die Endkonzentration der kondensierten pDNA betrug $0,04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

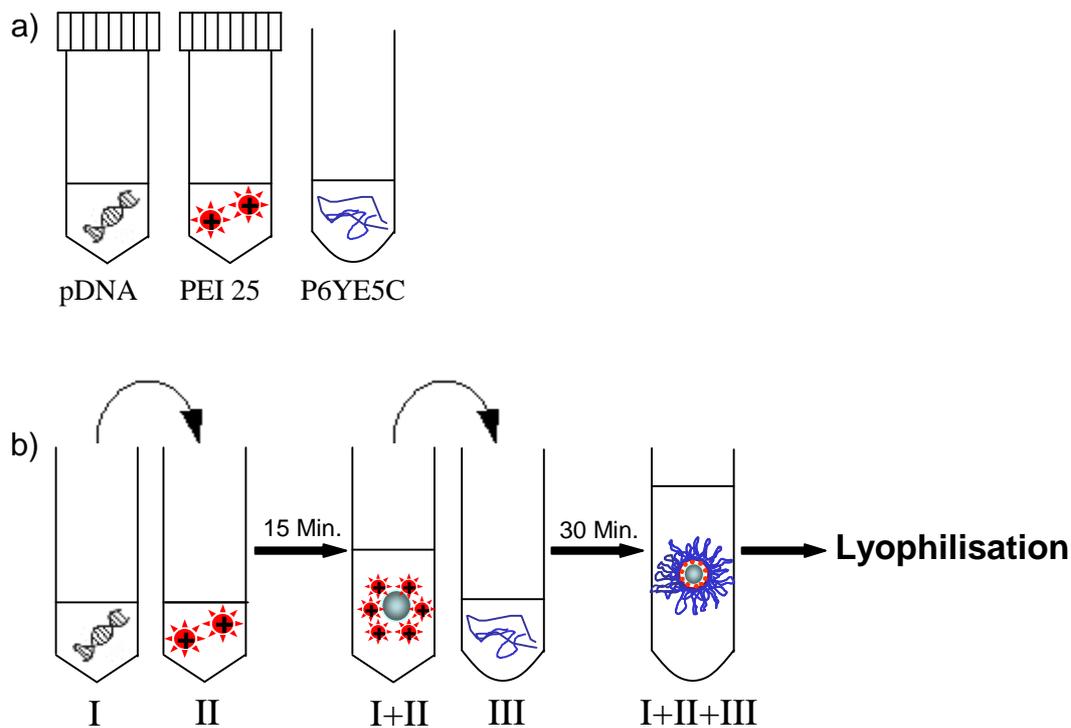


Abbildung 2.1 a) und b) Herstellung der COPROGs

2.2.2 Nackte DNA

Die entsprechende Menge nackter pB-luc pDNA mit der Konzentration 5 µg pro µl wurde am Vortag der Beschichtung in Wasser gelöst, in einem zylindrischen Glashomogenisator (15 ml) in einer Mischung aus Trockeneis und Ethylalkohol unter ständigem Rühren schockgefroren und über Nacht lyophilisiert.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Zelllinie

Alle Messungen wurden an NIH 3T3 Zellen (murine embryonale Fibroblasten) der Firma LGC Promochem (Wesel, Deutschland) durchgeführt. Die Zellen wurden in *Dublecco's Modified Eagle Medium*, welches mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum, 100 U Penicillin pro ml und 100 µg Streptomycin pro ml ergänzt wurde, kultiviert und unter Standardbedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank der Firma Thermo Quest (Egelsbach, Deutschland) inkubiert.

2.3.2 In vitro Transfektion

Es wurden je 7000 Zellen in 200 µl Zellkulturmedium pro *Well* auf einer 96-Well-Zellkulturschale aufgetragen und unter Standardbedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank der Firma Thermo Quest (Egelsbach, Deutschland) für den jeweiligen Zeitraum bis zur Messung inkubiert. Bei Inkubationszeiten größer als 48 Stunden wurde das Zellkulturmedium regelmäßig alle zwei Tage gewechselt um eine optimale Versorgung der Zellen zu gewährleisten.

2.4 Polymerbeschichtungen

2.4.1 Oberflächen aus PDLLA

Oberflächen aus PDLLA wurden mittels Ethylacetat bzw. Chloroform/Isopropanol (v/v = 9/1) als Lösungsmittel hergestellt. Das Polymer wurde hierbei in den Konzentrationen 50 und 100 mg pro ml verwendet. Die entsprechende Menge PDLLA wurde auf einer Präzisionswaage der Firma Sartorius AG (Göttingen, Deutschland) in einem sterilen Gefäß

abgewogen, anschließend wurde das Lösungsmittel hinzugefügt und das Gefäß bis zur vollständigen Lösung des Pulvers geschüttelt. Die Lösung wurde bis zur endgültigen Verwendung dicht verschlossen auf Trockeneis gelagert. Auf eine 96-Well-Zellkulturschale aus Polypropylen der Firma Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) wurden je 100 bzw. 50 μl pro *Well* aufgetragen, so dass nach Verdampfen des Lösungsmittels Beschichtungen von 5000 μg PDLLA pro Loch entstanden. Diese wurden nun mit je 7000 Zellen in 200 μl Zellkulturmedium besiedelt und nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden unter Standardbedingungen bei 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank zur Messung der metabolischen Aktivität verwendet (siehe Abb. 2.2).

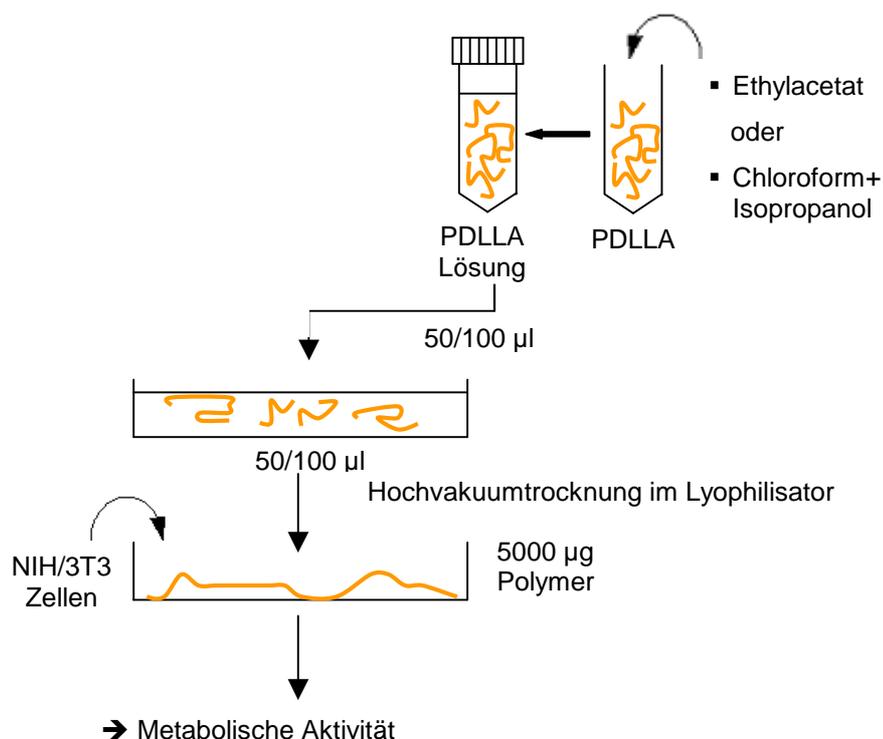


Abbildung 2.2. Schematische Darstellung der Herstellung von Oberflächen aus PDLLA und Testung der metabolischen Aktivität.

2.4.2 Oberflächen aus DTE5DT und DTE30DT

Oberflächen aus DTE5DT und DTE30DT konnten nach mehreren Lösungs- und Optimierungsversuchen nur mithilfe von Chloroform/Isopropanol ($v/v = 19/1$) als Lösungsmittel hergestellt werden. Die Polymere wurden in den Konzentrationen 50 und 100 mg pro ml verwendet. Die entsprechenden Mengen DTE5DT und DTE30DT wurden auf einer Präzisionswaage der Firma Sartorius AG (Göttingen, Deutschland) in einem sterilen

Gefäß abgewogen, anschließend wurde das Lösungsmittel hinzugefügt und das Gefäß bis zur vollständigen Lösung des Pulvers geschüttelt. Die Lösung wurde bis zur endgültigen Verwendung dicht verschlossen auf Trockeneis gelagert. Auf eine 96-Well-Zellkulturschale aus Polypropylen der Firma Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) wurden je 100 bzw. 50 μl pro *Well* aufgetragen, so dass nach Verdampfen des Lösungsmittels Beschichtungen von 5000 μg DTE5DT bzw. DTE30DT entstanden. Diese wurden nun mit je 7000 Zellen in 200 μl Zellkulturmedium besiedelt und nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden unter Standardbedingungen bei 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank zur Messung der metabolischen Aktivität verwendet (siehe Abb. 2.3).

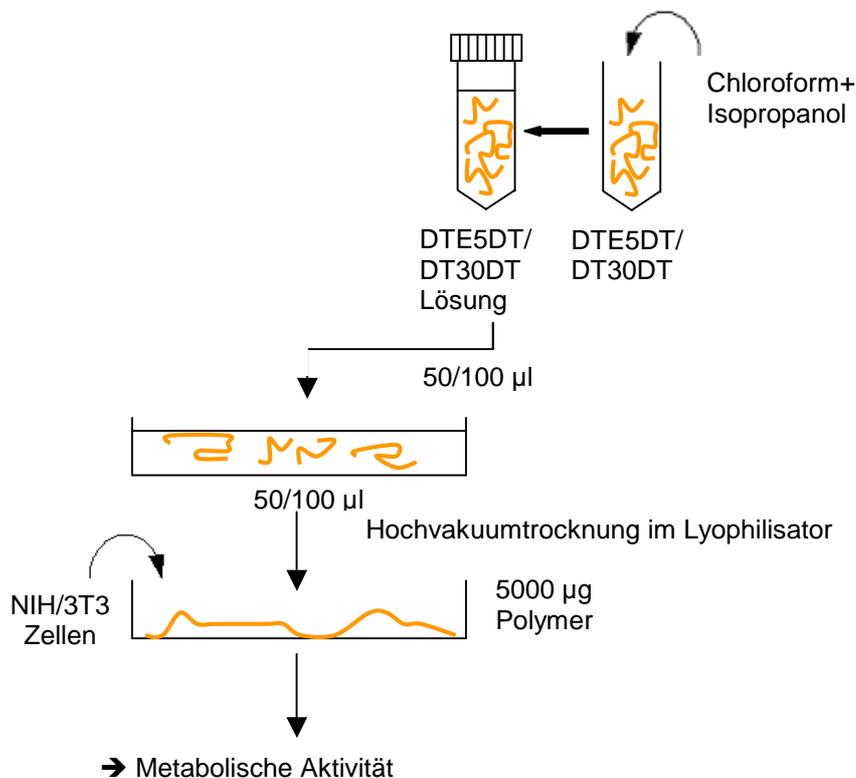


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung der Herstellung von Oberflächen aus DTE5DT bzw. DTE30DT und Testung der metabolischen Aktivität.

2.4.3 Oberflächen aus PDLA mit pB-luc COPROGs

Zunächst wurde das Polymer PDLA mit den Konzentrationen 20, 40, 80, 160 und 240 mg/ml in Ethylacetat bzw. Chloroform/Isopropanol ($v/v = 19/1$) gelöst und in sterilen Gefäßen dicht verschlossen auf Trockeneis gelagert. Hierauf wurden die im Glashomogenisator lyophilisierten COPROGs, bestehend aus der pDNA pB-luc, PEI 25 und

dem Schutzpolymer P6YE5C, mittels eines Teflon-Pistills der Firma Schütt Labortechnik (Göttingen, Deutschland) in Ethylacetat dispergiert. Diese Dispersion wurde auf die Plasmid-Konzentrationen 0,4; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125; 0,00625 und 0,003125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mit Ethylacetat verdünnt und ebenfalls in sterilen Gefäßen auf Trockeneis gelagert. Daraufhin wurden je 25 μl Polymerlösung und 25 μl COPROGs-Dispersion in einer 96-Well-Zellkulturschale aus Polypropylen der Firma Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) durch auf- und abpipettieren miteinander vermischt. Die COPROGs-Dispersion wurde jeweils vor dem Auftragen kurz geschüttelt, um die darin dispergierten COPROGs gleichmäßig zu verteilen. Nach Verdampfen des Lösungsmittels und anschließender Hochvakuumtrocknung/Lyophilisation verblieben Polymerfilme aus 500, 1000, 2000, 4000 und 6000 μg PDLLA, die COPROGs mit einer Plasmid-Menge von 0,078; 0,156; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5 und 10 μg pB-luc enthielten. Die genaktivierten Oberflächen wurden nun mit NIH 3T3 Zellen besiedelt. Dabei wurden je 7000 Zellen in 200 μl Zellkulturmedium auf die *Wells* pipettiert und über den direkten Kontakt mit COPROGs transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden unter Standardbedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank wurden Messungen der metabolischen Aktivität, der Luciferase-Expression und der Proteinkonzentration transfizierter Zellen durchgeführt (siehe Abb. 2.4).

gleichmäßig zu verteilen. Nach Verdampfen des Lösungsmittels und anschließender Hochvakuumtrocknung/Lyophilisation verblieben Polymerfilme aus 500, 1000, 2000, 4000 und 6000 μg PLGA, die COPROGs mit einer Plasmid-Menge von 0,078; 0,156; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5 und 10 μg pB-luc enthielten. Die genaktivierten Oberflächen wurden nun mit NIH 3T3 Zellen besiedelt. Dabei wurden je 7000 Zellen in 200 μl Zellkulturmedium auf die Wells pipettiert und über den direkten Kontakt mit COPROGs transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden unter Standardbedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank wurden Messungen der metabolischen Aktivität, der Luciferase-Expression und der Proteinkonzentration transfizierter Zellen durchgeführt (siehe Abb 2.5).

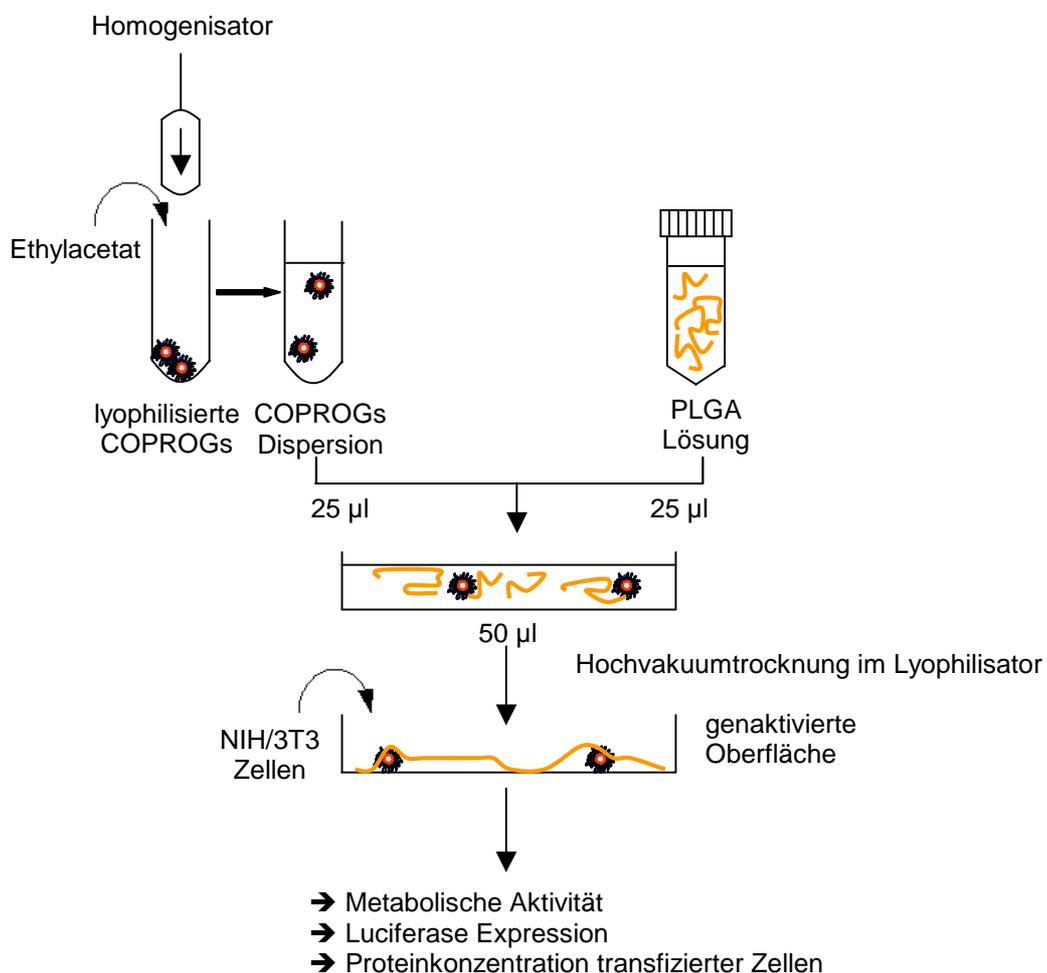


Abbildung 2.5 Schematische Darstellung der Herstellung von Oberflächen aus PLGA mit COPROGs und Testung der Transfektion.

2.4.5 Oberflächen aus DTE5DT und DTE30DT mit pB-luc COPROGs

Zunächst wurden die Polymere DTE5DT und DTE30DT mit den Konzentrationen 40 und 80 mg/ml in Chloroform/Isopropanol (v/v = 19/1) gelöst und in sterilen Gefäßen dicht verschlossen auf Trockeneis gelagert. Hierauf wurden die im Glashomogenisator lyophilisierten COPROGs, bestehend aus der pDNA pB-luc, PEI 25 und dem P6YE5C, mittels eines Teflon-Pistills der Firma Schütt Labortechnik (Göttingen, Deutschland) in Chloroform/Isopropanol (v/v = 19/1) dispergiert. Diese Dispersion wurde auf die Plasmid-Konzentrationen 0,4; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125; 0,00625 und 0,003125 µg/µl mit Chloroform/Isopropanol (v/v = 19/1) verdünnt und ebenfalls in sterilen Gefäßen auf Trockeneis gelagert. Lösungen von PDLLA in Chloroform/Isopropanol (v/v = 19/1) mit den Konzentrationen 40 und 80 mg/ml wurden als Kontrolle eingesetzt. Daraufhin wurden je 25 µl Polymerlösung und 25 µl COPROGs-Dispersion in einer 96-Loch-Zellkulturschale aus Polypropylen der Firma Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) durch auf- und abpipettieren miteinander vermischt. Die COPROGs-Dispersion wurde jeweils vor dem Auftragen kurz geschüttelt, um die darin dispergierten COPROGs gleichmäßig zu verteilen. Nach Verdampfen des Lösungsmittels und anschließender Hochvakuumtrocknung/Lyophilisation verblieben Polymerfilme aus 1000 und 2000 µg DTE5DT, DTE30DT bzw. PDLLA, die COPROGs mit einer Plasmid-Menge von 0,078; 0,156; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5 und 10 µg pB-luc enthielten. Die genaktivierten Oberflächen wurden nun mit NIH 3T3 Zellen besiedelt. Dabei wurden je 7000 Zellen in 200 µl Zellkulturmedium auf die *Wells* pipettiert und über den direkten Kontakt mit COPROGs transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden unter Standardbedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank wurden Messungen der metabolischen Aktivität, der Luciferase-Expression und der Proteinkonzentration transfizierter Zellen durchgeführt (siehe Abbildung 2.6).

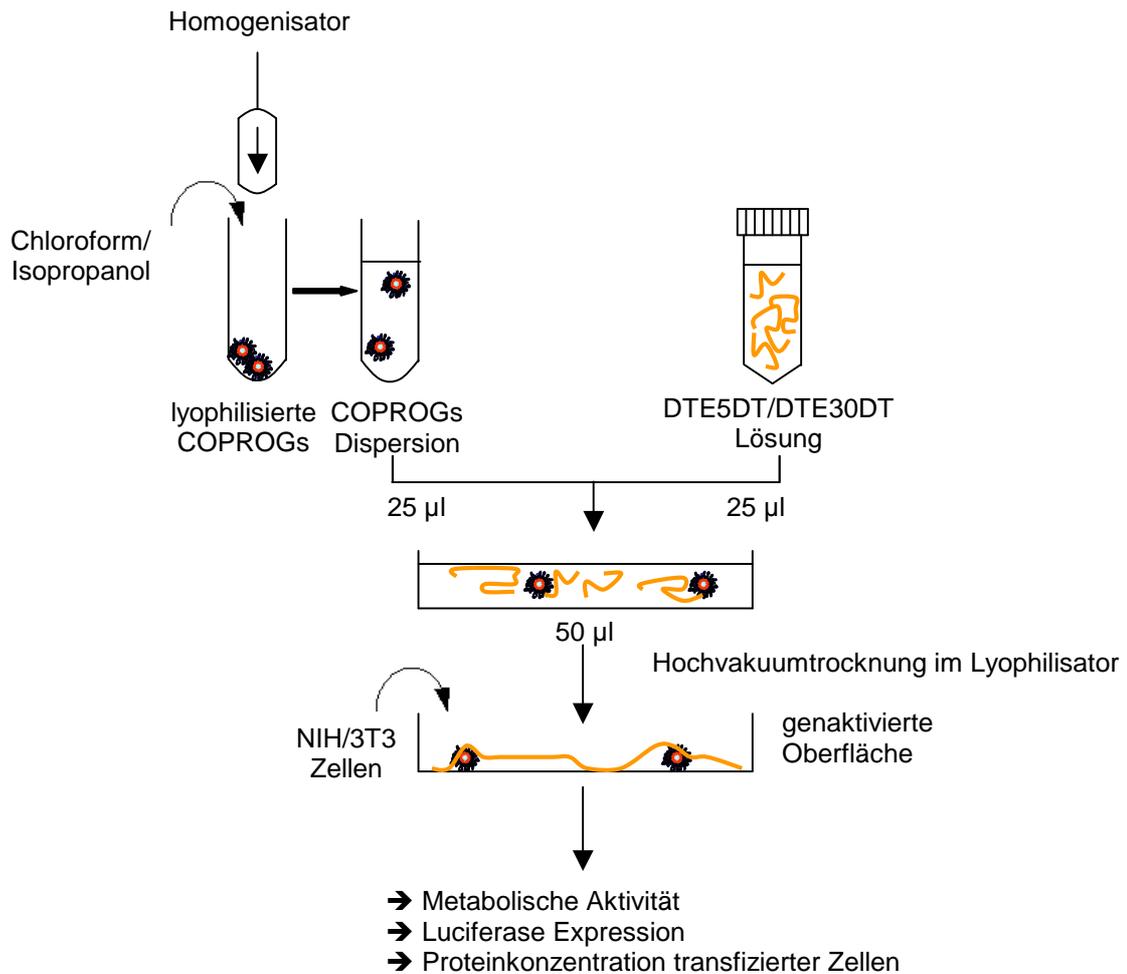


Abbildung 2.6 Schematische Darstellung der Herstellung von Oberflächen aus DTE5DT bzw. DTE30DT mit COPROGs und Testung der Transfektion.

2.4.6 Oberflächen aus PDLLA und PLGA mit nackter pDNA

Zunächst wurden die Polymere PDLLA und PLGA mit den Konzentrationen 20, 40, 80, 160 und 240 mg/ml in Ethylacetat gelöst und in sterilen Gefäßen dicht verschlossen auf Trockeneis gelagert. Hierauf wurde die im Glashomogenisator lyophilisierte nackte pDNA mittels eines Teflon-Pistills der Firma Schütt Labortechnik (Göttingen, Deutschland) in Ethylacetat dispergiert. Diese Dispersion wurde auf die Plasmid-Konzentrationen 0,4; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125; 0,00625 und 0,003125 µg/µl mit Ethylacetat verdünnt und ebenfalls in sterilen Gefäßen auf Trockeneis gelagert. Daraufhin wurden je 25 µl Polymerlösung und 25 µl pDNA-Dispersion in einer 96-Loch-Zellkulturschale aus Polypropylen der Firma Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) durch auf- und abpipettieren miteinander vermischt. Die pDNA-Dispersion wurde jeweils vor dem Auftragen kurz geschüttelt, um die darin befindliche pDNA gleichmäßig zu verteilen. Nach Verdampfen des Lösungsmittels und

anschließender Hochvakuumtrocknung/Lyophilisation verblieben Polymerfilme aus 500, 1000, 2000, 4000 und 6000 μg PDLLA bzw. PLGA, die nackte pDNA in den Mengen 0,078; 0,156; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5 und 10 μg pB-luc enthielten. Die genaktivierten Oberflächen wurden nun mit NIH 3T3 Zellen besiedelt. Dabei wurden je 7000 Zellen in 200 μl Zellkulturmedium auf die *Wells* pipettiert und über den direkten Kontakt mit nackter pDNA transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden unter Standardbedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank wurden Messungen der metabolischen Aktivität und der Luciferase-Expression transfizierter Zellen durchgeführt (siehe Abb. 2.7).

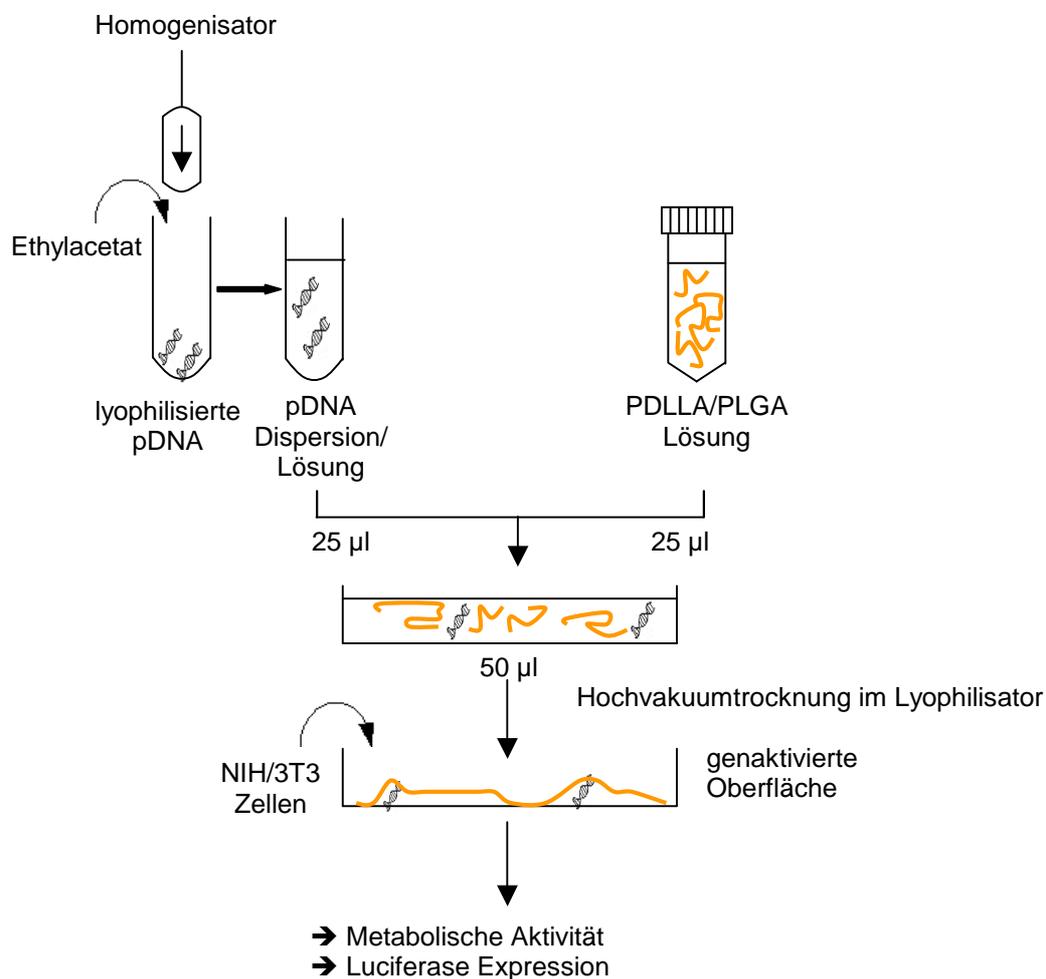


Abbildung 2.7 Schematische Darstellung der Herstellung von Oberflächen aus PDLLA und PLGA mit nackter pDNA und Testung der Transfektion.

2.4.7 Oberflächen aus PDLLA und PLGA mit pEGFP-N1 COPROGs

Zunächst wurden die Polymere PDLLA und PLGA mit den Konzentrationen 40 und 80 mg/ml in Ethylacetat gelöst und in sterilen Gefäßen dicht verschlossen auf Trockeneis gelagert. Hierauf wurden die im Glashomogenisator lyophilisierten COPROGs, bestehend aus der pDNA pEGFP-N1, PEI 25 und dem Schutzpolymer P6YE5C, mittels eines Teflon-Pistills der Firma Schütt Labortechnik (Göttingen, Deutschland) in Ethylacetat dispergiert. Diese Dispersion wurde auf die Plasmid-Konzentrationen 0,05; 0,025; 0,0125 und 0 µg/µl mit Ethylacetat verdünnt und ebenfalls in sterilen Gefäßen auf Trockeneis gelagert. Daraufhin wurden je 25 µl Polymerlösung und 25 µl COPROGs-Dispersion in einer 96-Loch-Zellkulturschale aus Polypropylen der Firma Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) durch auf- und abpipettieren miteinander vermischt. Die COPROGs-Dispersion wurde jeweils vor dem Auftragen kurz geschüttelt, um die darin dispergierten COPROGs gleichmäßig zu verteilen. Nach Verdampfen des Lösungsmittels und anschließender Hochvakuumtrocknung/Lyophilisation verblieben Polymerfilme aus 1000 und 2000 µg PDLLA bzw. PLGA, die COPROGs mit einer Plasmid-Menge von 0; 0,3125; 0,625 und 1,25 µg pB-luc enthielten. Die genaktivierten Oberflächen wurden nun mit NIH 3T3 Zellen besiedelt. Dabei wurden je 7000 Zellen in 200 µl Zellkulturmedium auf die *Wells* pipettiert und über den direkten Kontakt mit COPROGs transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden unter Standardbedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank wurde die Messung der Transfektionseffizienz transfizierter Zellen durchgeführt.

2.4.8 Oberflächen aus PDLLA und PLGA mit radioaktiv markierten pB-luc COPROGs

Zunächst wurden die Polymere PDLLA und PLGA mit den Konzentrationen 20, 40, 80 und 160 mg/ml in Ethylacetat gelöst und in sterilen Gefäßen dicht verschlossen auf Trockeneis gelagert. Hierauf wurden die im Glashomogenisator lyophilisierten, radioaktiv markierten COPROGs, bestehend aus der I¹²⁵-markierten pDNA pB-luc, I¹³¹-markiertem PEI 25 und dem Schutzpolymer P6YE5C, mittels eines Teflon-Pistills der Firma Schütt Labortechnik (Göttingen, Deutschland) in Ethylacetat dispergiert. Diese Dispersion wurde auf die Plasmid-Konzentrationen 0,2; 0,1; 0,05 und 0,025 µg/µl mit Ethylacetat verdünnt und ebenfalls in sterilen Gefäßen auf Trockeneis gelagert. Daraufhin wurden je 25 µl Polymerlösung und 25 µl COPROGs-Dispersion in einer 96-Loch-Zellkulturschale aus Polypropylen der Firma Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) durch auf- und abpipettieren miteinander vermischt. Die COPROGs-Dispersion wurde jeweils vor dem Auftragen kurz geschüttelt, um die darin dispergierten COPROGs gleichmäßig zu verteilen.

Nach Verdampfen des Lösungsmittels und anschließender Hochvakuumtrocknung/Lyophilisation verblieben Polymerfilme aus 500, 1000, 2000 und 4000 µg PDLLA bzw. PLGA, die radioaktiv markierte COPROGs mit einer Plasmid-Menge von 0,625; 1,25; 2,5 und 5 µg pB-luc enthielten. Die genaktivierten Oberflächen wurden mit 200 µl *Dublecco's Modified Eagle Medium* beschichtet, unter Standardbedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert und zur Messung der Freisetzung von pDNA und PEI 25, wie unter 2.10 beschrieben, verwendet.

2.5 Integrität von pDNA nach Dispersion in Ethylacetat

Im Glashomogenisator lyophilisierte COPROGs bestehend aus der pDNA pB-luc, PEI 25 und dem Schutzpolymer P6YE5C wurden mittels eines Teflon-Pistills in Ethylacetat dispergiert. So entstandene Dispersionen mit Plasmid-Konzentrationen von 40, 20 bzw. 7,5 µg pB-luc wurden bei geöffnetem Deckel gelagert und bis zur Trockene eingedampft. Daraufhin wurden sie mit jeweils 500 µl Wasser rehydratisiert. Es wurde ein Elektrophorese-Gel mit 0,6 % Agarose in 0,05 M NaOH und 1 mM EDTA hergestellt und mit den wässrigen Lösungen der COPROGs beladen. Dabei wurden COPROGs mit Plasmid-Mengen von 800, 400 und 150 ng pB-luc appliziert. Als Kontrollgruppe dienten frisch formulierte COPROGs ebenso bestehend aus der pDNA pB-luc, PEI 25 und Schutzpolymer P6YE5C mit Plasmid-Mengen von 400 und 200 ng pB-luc sowie 200 ng nackte pDNA. Zur Durchführung der Elektrophorese wurde die Elektrophoresekammer HE 33 Mini Submarine der Firma Hoefer Inc. (San Francisco, CA, USA) in Verbindung mit einer Stromquelle der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) verwendet. Nach einer Elektrophorese-Dauer von 30 Minuten bei 60 V in Gegenwart von Ethidiumbromid (EtBr) mit der Konzentration $c_{\text{EtBr}} = 0,5 \mu\text{g/ml}$, wurde die Integrität der pDNA nach Dispersion in Ethylacetat im UV-Licht untersucht.

2.6 Metabolische Aktivität

Zur Messung der metabolischen Aktivität wurde das Zellproliferationsreagens WST®-1 der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) verwendet. Dieses Reagens wurde direkt nach

Mediumwechsel in Mengen von 20 µl pro 200 µl Zellkulturmedium den auf den Oberflächen befindlichen Zellen zugeführt. Diese wurden hierauf unter Standardbedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank der Firma Thermo Quest (Egelsbach, Deutschland) bis zum Messzeitpunkt inkubiert. WST®-1 wird durch mitochondriale Dehydrogenasen aktiver Zellen gespalten, wobei dunkelrotes Formazan entsteht. Dessen Konzentration wurde nach Ablauf der Inkubationszeit durch Überführen des Mediumüberstands auf eine durchsichtige 96-Loch-Zellkulturplatte aus Polystyrychol der Firma TPP (Trasdingen, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 450 nm im Multilabel Counter Wallac Victor² 1420 der Firma Perkin Elmer (Boston, MA, USA) kolorimetrisch bestimmt. Gegen Referenzmessung bei einer Wellenlänge von 630 nm wurde die gemessene Formazan-Konzentration direkt mit der Zahl metabolisch aktiver Zellen ins Verhältnis gesetzt. In den graphischen Darstellungen spiegelt die Höhe der gemessenen Absorption die Höhe der metabolischen Aktivität transfizierter Zellen wider.

Bei fortlaufenden Messreihen betragen die Inkubationszeiten von einer halben bis zu drei Stunden ab Mediumwechsel, wobei die Ergebnisse regelmäßig alle 30 Minuten bestimmt und später in einem Liniendiagramm aufgetragen wurden. Bei punktuellen Messungen betrug die Inkubationszeit genau drei Stunden, die Ergebnisse wurden in Blockdiagrammen dargestellt.

2.7 Luciferase Expression

Zur Messung der Expression des pB-luc Plasmids wurde der Mediumüberstand nach entsprechender Inkubationszeit vorsichtig abgesogen und die Zellen, wie in Finsinger et al. (Finsinger, D., et al., 2000) beschrieben, mit 150 µl PBS gewaschen. Hierauf fand bei Raumtemperatur die Lyse der Zellen mit 100 µl 0,1 % Triton-X in 250 mM Tris bei einem pH-Wert von 7,8 statt. Nach 10 Minuten wurde der Lysevorgang durch Verlagerung der Zellkulturplatte auf Trockeneis gestoppt. 50 µl Zelllysate wurden zur Bestimmung der Biolumineszenz entnommen und auf eine schwarze 96-Loch-Zellkulturplatte der Firma Corning Incorporated (New York, USA) überführt. Es wurden 100 µl Substrat-Puffer Luciferase Assay System der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) hinzugefügt und die Lumineszenz der Proben unverzüglich im Microplate Scintillation & Luminescence Counter TopCount der Firma Canberra Packard (Dreieich, Deutschland) vermessen. Mithilfe der Standardsubstanz rekombinante Luciferase der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) wurde eine Eichgerade erstellt.

Luciferase-Expression wurde in Picogramm pro Milligramm Protein dargestellt. Die Inkubationszeit betrug bei Einzelmessungen 48 Stunden, bei fortlaufenden Messreihen über sieben Tage betragen die Inkubationszeiten 24, 48, 72, 96, 120, 144 und 168 Stunden.

2.8 Proteinkonzentration

Zur Messung der Proteinkonzentration wurde das Bio-Rad Protein Assay Kit II der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) eingesetzt, welches auf einer von Bradford 1976 (Bradford, M.M., 1976) entwickelten Methode basiert. Diese beruht auf der Beobachtung, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren Coomassie Brilliant Blue G-250 Lösung nach Bindung an Proteine von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Man richtete sich nach dem Protokoll des Herstellers.

Der Mediumüberstand wurde nach entsprechender Inkubationszeit vorsichtig abgesogen und die Zellen, wie in Finsinger et al. (Finsinger, D., et al., 2000) beschrieben, mit 150 µl PBS gewaschen. Hierauf fand bei Raumtemperatur die Lyse der Zellen mit 100 µl 0,1 % Triton-X in 250 mM Tris bei einem pH-Wert von 7,8 statt. Nach 10 Minuten wurde der Lysevorgang durch Verlagerung der Zellkulturplatte auf Trockeneis gestoppt. 10 µl des Zelllysats wurden zur Bestimmung der Proteingesamtmenge entnommen, in eine durchsichtige 96-Well-Zellkulturplatte aus Polystyrychol der Firma TPP (Trasdingen, Schweiz) überführt und mit 150 µl Wasser verdünnt. Es wurden 40 µl Bio-Rad Protein Assay Reagenz hinzugefügt und unter Schütteln für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 590 nm im Multilabel Counter Wallac Victor² 1420 der Firma Perkin Elmer (Boston, MA, USA) vermessen. Mithilfe des Bovinen Serum Albumins (= BSA) wurde eine Eichgerade erstellt.

Die Inkubationszeit betrug bei Einzelmessungen 48 Stunden, bei fortlaufenden Messreihen über sieben Tage betragen die Inkubationszeiten 24, 48, 72, 96, 120, 144 und 168 Stunden.

2.9 Durchflusszytometrie (FACS)

Zur Messung der Transfektionseffizienz des pEGFP-N1 Plasmids wurde der Mediumüberstand nach entsprechender Inkubationszeit vorsichtig abgesogen und die Zellen mit 150 µl PBS gewaschen. Hierauf wurden sie mit 50 µl Trypsin-EDTA von der genaktivierten Oberfläche gelöst. Dieser Ablösevorgang wurde kontrolliert unter einem Lichtmikroskop durchgeführt und mit 100 µl *Dublecco's Modified Eagle Medium* gestoppt. Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit einer FACS-Pufferlösung aus PBS, 1 % FCS und 0,02 % Na-Acid gewaschen und bis zum Messzeitpunkt auf Eis gelagert. Zur Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen wurde der Zellsuspension Propidiumjodid (PI) mit einer Endkonzentration von $c_{PI} = 1 - 0,1 \mu\text{g/ml}$ beigemischt, da nach Verlust der Zell-Integrität eine Anfärbung der DNA im Zellkern mit PI möglich ist. Der Prozentsatz an lebenden, transfizierten Zellen wurde mit dem Messgerät FACS Vantage der Firma BD Biosciences (San Jose, CA, USA) bestimmt. Dabei wurde die zu untersuchende Zellpopulation aus einem Streudiagramm (vorwärts/seitwärts) ausgewählt. PI-Fluoreszenz wurde als Maß für den Anteil toter Zellen bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 585 ± 42 nm detektiert, EGFP-Fluoreszenz als Maß für den Anteil transfizierter Zellen bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 ± 30 nm. Die Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde jeweils mit 5000 Zellen durchgeführt.

2.10 Freisetzung von pDNA und PEI 25

2.10.1 Messvorgang

Zur Messung der Freisetzung von pDNA und PEI 25 wurden beide Substanzen radioaktiv markiert (siehe unten) und wie unter 2.4.8 beschrieben zur Herstellung von Oberflächen verwendet. Diese wurden je mit 200 µl *Dublecco's Modified Eagle Medium* überschichtet und für die Gesamtinkubationszeit von 4 Wochen unter Standardbedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Die einzelnen Messzeitpunkte lagen bei 1, 2, 4, 24, 48, 72, 168, 240, 336, 504 und 672 Stunden, wobei die Mediumüberstände jeweils gesammelt und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt wurden. Die Radioaktivität der einzelnen Mediumüberstände wurde im Gamma Counter Wallac 1480 Wizard 3'' der Firma

Perkin Elmer (Boston, MA, USA) vermessen. Die kumulative Freisetzung von I¹²⁵-markierter pDNA und I¹³¹-markiertem PEI 25 wurde prozentual zur eingesetzten Menge an pDNA und PEI 25 dargestellt.

2.10.2 Radioaktivmarkierung von pB-luc pDNA mit I¹²⁵

Die Radioaktivmarkierung der pDNA pB-luc wurde mit radioaktivem I¹²⁵ anhand einer Vorschrift der Arbeitsgruppe entsprechend der Commerford-Methode durchgeführt, welche eine leichte Modifikation des von Terebesi et al. (Terebesi, J., et al., 1998) veröffentlichten Protokolls darstellt. Die Effizienz der I¹²⁵-Markierung von pDNA wurde 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) bestimmt. Über Gelelektrophorese und Autoradiographie wurde I¹²⁵-markierte pDNA analysiert, im Verhältnis 1:4 mit nicht-markierter pDNA gemischt und für die Herstellung von geschützten Genvektoren eingesetzt.

2.10.3 Radioaktivmarkierung von PEI 25 mit I¹³¹

Die Radioaktivmarkierung von PEI 25 wurde mit radioaktivem I¹³¹ 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 I¹³¹ 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 CuSO₄-Test ergab eine PEI-Endkonzentration von c = 1,49 mg/ml. Mittels Radioaktivmessung wurde eine spezifische Aktivität von 16898 CPM/µg ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Lösungsverhalten der Polymere

3.1.1 Poly (D/L lactic acid)

Das verwendete Polymer *poly (D/L lactic acid)* ist sowohl in Ethylacetat wie auch in Chloroform gut lösbar, jedoch entschied man sich aufgrund der bei Gollwitzer (Gollwitzer, H. 2001) beschriebenen Vorteile für die Verwendung von Ethylacetat als Lösungsmittel. Chloroform/Isopropanol wurde lediglich aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit mit den Poly-Desaminotyrosyl-Tyrosinethylestern DTE5DT und DTE30DT angewendet.

3.1.2 Poly (D/L lactic-co-glycolic acid)

Das Polymer *poly (D/L lactic-co-glycolic acid)* ließ sich ebenfalls gut in Ethylacetat auflösen, von weiteren Lösungsversuchen hat man bei diesem Polymer abgesehen.

3.1.3 Poly-Desaminotyrosyl-Tyrosinethylester

Da die Poly-Desaminotyrosyl-Tyrosinethylester, *poly (DTE-co-5% DT carbonate)* und *poly (DTE-co-30% DT carbonate)*, nicht in Ethylacetat lösbar waren, war man gezwungen nach einem anderen Lösungsmittel zu suchen. Für DTE5DT zeigte sich Chloroform als potentes Lösungsmittel, jedoch traf dies nicht für DTE30DT zu. Dieses Polymer ließ sich weder in reinem Chloroform, noch in Methanol, Aceton, 2-Buthanol oder Isopropanol alleine auflösen. Erst als man Chloroform zusammen mit Isopropanol bzw. 2-Buthanol verwendete, ließ sich eine Lösung des Polymers DTE30DT herstellen.

PDLLA	PLGA	DTE5DT	DTE30DT
Ethylacetat Chloroform mit Isopropanol (Chloroform)	Ethylacetat	Chloroform mit Isopropanol (Chloroform mit 2-Buthanol) (Chloroform)	Chloroform mit Isopropanol (Chloroform mit 2-Buthanol)

Tabelle 3.1 Löslichkeit der Polymere - Übersicht der verwendeten Lösungsmittel

Hierauf wurden verschiedene Mischverhältnisse dieser Lösungsmittel am Beispiel des Polymers DTE30DT untersucht und einige davon auch bei dem Polymer DTE5DT erprobt (s. Tab. 3.2).

DTE5DT	DTE30DT
Chloroform/Isopropanol	Chloroform/Isopropanol
1:0	1:1
4:1	4:1
	10:1
19:1	19:1
	24:1
49:1	49:1
	99:1
Chloroform/2-Buthanol	Chloroform/2-Buthanol
	19:1
49:1	49:1

Tabelle 3.2 Mischverhältnisse der Lösungsmittel zur Lösung von DTE5DT und DTE30DT

Man entschied sich wegen der besseren Beschichtungsergebnisse, die unter einem Lichtmikroskop ausgewertet wurden, gegen 2-Buthanol und für Isopropanol als Mischpartner. Die besten Ergebnisse, d.h. eine gleichmäßige Beschichtung über das ganze *Well* ohne Lücken und Risse, wurden dabei in einem Verhältnis Chloroform zu Isopropanol von 19:1 beobachtet.

3.1.4 Löslichkeit

Bei weiteren Versuchen wurde festgestellt, dass die Löslichkeit der beiden Polymere DTE5DT und DTE30DT bei gleichem Lösungsmittel geringer ist als die von PDLLA und PLGA. Wenngleich man mit PDLLA und PLGA ohne weiteres Konzentrationen von bis zu 320 mg pro ml herstellen konnte, waren mit DTE5DT und DTE30DT nur Lösungen bis zu 100 mg pro ml möglich. Die genauen Löslichkeiten wurden allerdings nicht bestimmt.

3.2 Integrität der pDNA

Die Prüfung der Integrität der pDNA wurde durchgeführt, um sicher zu stellen, dass die pDNA bei dem zur Herstellung von *Copolymer protected gene vectors* (=COPROGs) notwendigen Lyophilisationsvorgang, die spätere mechanische Behandlung im Glashomogenisator zur Herstellung einer Dispersion und zuletzt durch das Lösungsmittel Ethylacetat nicht beschädigt wurde. Dazu wurden COPROGs bestehend aus pB-luc, PEI 25 und dem Schutzpolymer P6YE5C vorbereitet, lyophilisiert und in Ethylacetat dispergiert. Hierauf wurden diese COPROGs, die 800, 400 und 150 ng pDNA enthielten, im Vergleich zu unbehandelten, nicht-dispergierten COPROGs mit 400 und 200 ng pDNA und im Vergleich zu 200 ng unkomplexierter pDNA (Ausgangsmaterial) mittels Gelelektrophorese untersucht. Abbildung 3.1 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung, welches keine herstellungsbedingten Schäden der pDNA erkennen lässt. Somit konnte bewiesen werden, dass die zu COPROGs verarbeitete und in genaktivierte Oberflächen eingehüllte pDNA dieselbe Qualität aufwies wie unbehandelte pDNA.

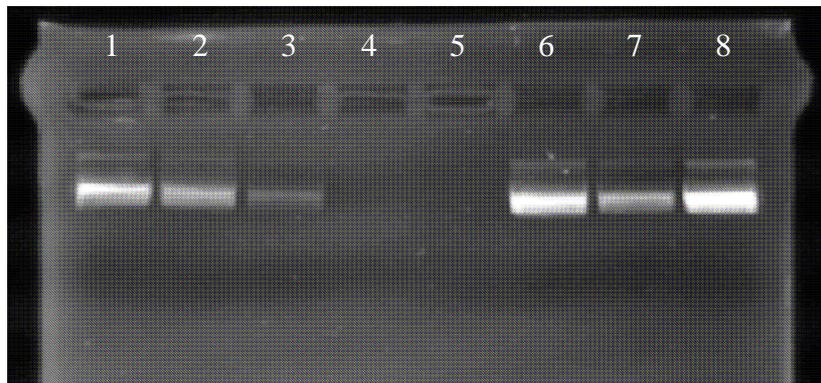


Abbildung 3.1 Überprüfung der DNA-Integrität; Foto der Gelelektrophorese: Geltaschen 1-3 dispergierte COPROGs; Geltaschen 4 und 5 unbeladen; Geltaschen 6 und 7 nicht-dispergierte COPROGs; 8 unkomplexierte pDNA (Ausgangsmaterial).

3.3 Einfluss des Lösungsmittels auf die metabolische Aktivität

Hierzu wurden Beschichtungen aus PDLLA gelöst in Ethylacetat bzw. Chloroform/Isopropanol (v/v = 19/1) sowie Beschichtungen aus DTE5DT bzw. DTE30DT gelöst in Chloroform/Isopropanol (v/v = 19/1) angefertigt, die jeweils 5000 µg Polymer pro *Well* enthielten. Diese Oberflächen wurden mit je 7000 NIH 3T3 Zellen pro *Well* besiedelt und anschließend für einen Gesamtzeitraum von drei Stunden unter Standardbedingungen im Brutschrank inkubiert. Messungen wurden alle 30 Minuten ab Zugabe des Zellproliferationsreagens WST®-1 im Multilabel Counter Wallac Victor² 1420 durchgeführt.

3.3.1 Vergleich PDLLA in Ethylacetat versus PDLLA in Chloroform/Isopropanol

Die Abbildung 3.2 zeigt einen direkten Vergleich der PDLLA-Beschichtungen gelöst in Chloroform/Isopropanol (A und B) bzw. Ethylacetat (C und D) betrachtet unter einem Durchlichtmikroskop bei 40- bzw. 100facher Vergrößerung. Man erkennt auf den Bildern zum Einen die darauf angesiedelten Zellen, deren gleichmäßige Verteilung und Beschichtungsdichte im *Well* sowie den sichtbaren Unterschied in der Oberflächenbeschaffenheit, bedingt durch die unterschiedlichen Lösungsmittel. Dabei zeigte das in Chloroform/Isopropanol gelöste PDLLA sehr einheitliche, klare, beinahe durchsichtige Oberflächen, das in Ethylacetat gelöste dagegen sehr fein strukturierte Oberflächen, die aber dennoch einheitlich waren und keine Verklumpungen aufwiesen.

Im Verlauf der Messungen zeigten die Zellen auf PDLLA gelöst in Chloroform/Isopropanol insgesamt eine schlechtere metabolische Aktivität als jene auf PDLLA gelöst in Ethylacetat (s. Abb. 3.3).

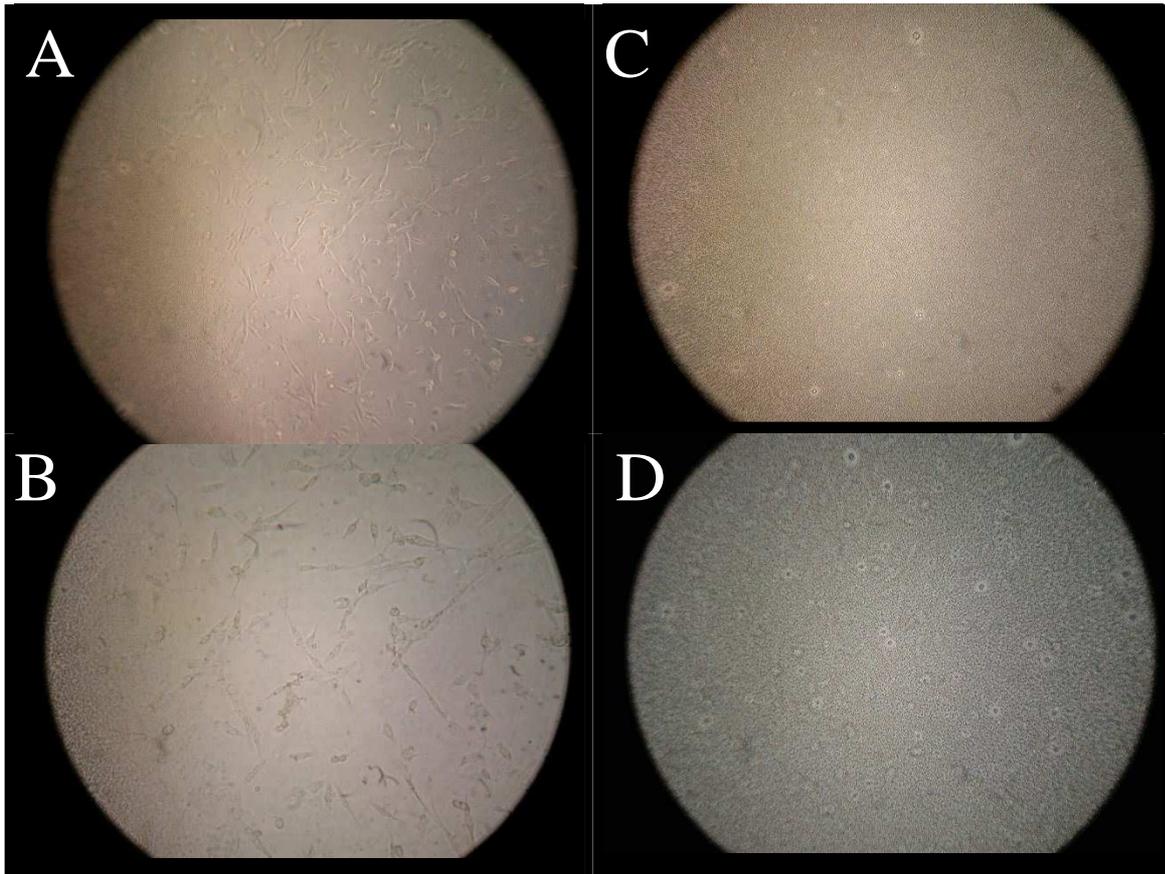


Abbildung 3.2 Bilder von Oberflächen aus PDLLA gelöst in Chloroform/Isopropanol (A und B) bzw. Ethylacetat (C und D) mit NIH 3T3 Zellen unter einem Durchlichtmikroskop (A und C x40); (B und D x100).

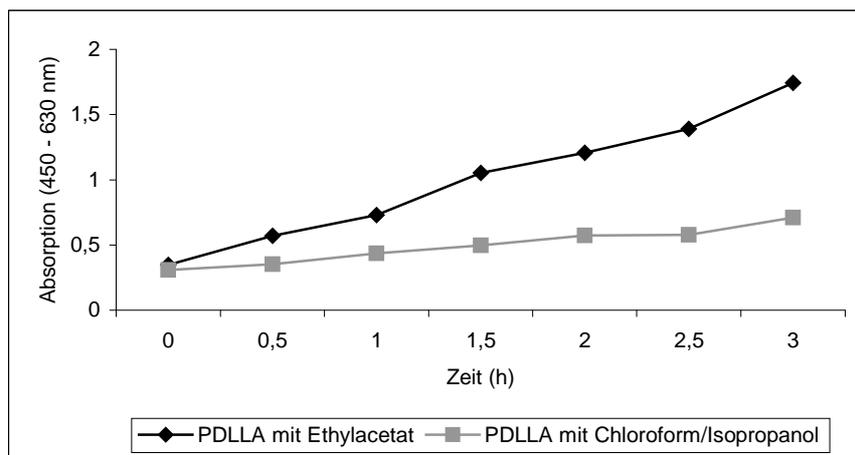


Abbildung 3.3 Metabolische Aktivität von NIH 3T3 Zellen auf PDLLA in Abhängigkeit vom Lösungsmittel

3.3.2 Vergleich PDLLA, DTE5DT und DTE30DT

Die NIH 3T3 Zellen auf Oberflächen aus DTE5DT bzw. DTE30DT gelöst in Chloroform/Isopropanol zeigten sich dagegen unbeeinflusst vom Lösungsmittel und boten unabhängig von Polymer und Lösungsmittel dieselbe metabolische Aktivität (s. Abb. 3.4)

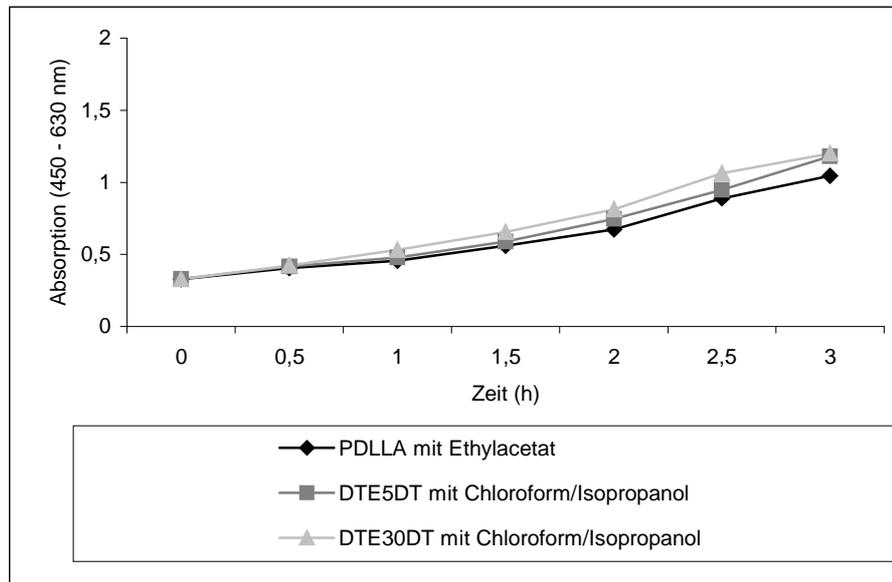


Abbildung 3.4 Metabolische Aktivität von NIH 3T3 Zellen auf PDLLA, DTE5DT und DTE30DT in Abhängigkeit vom Lösungsmittel

3.3.3 Kontrollgruppen

Als Kontrollgruppen wurden Medium, lebende wie tote Zellen in *Wells* ohne Beschichtungen herangezogen und deren metabolische Aktivität vermessen (s. Abb. 3.5). Weder im Medium noch bei toten Zellen wurde eine signifikante metabolische Aktivität beobachtet, diese Gruppen lieferten nahezu eine perfekte Nulllinie. Die Gruppe der lebenden Zellen dagegen zeigte Werte der metabolischen Aktivität vergleichbar mit Zellen auf PDLLA gelöst in Ethylacetat.

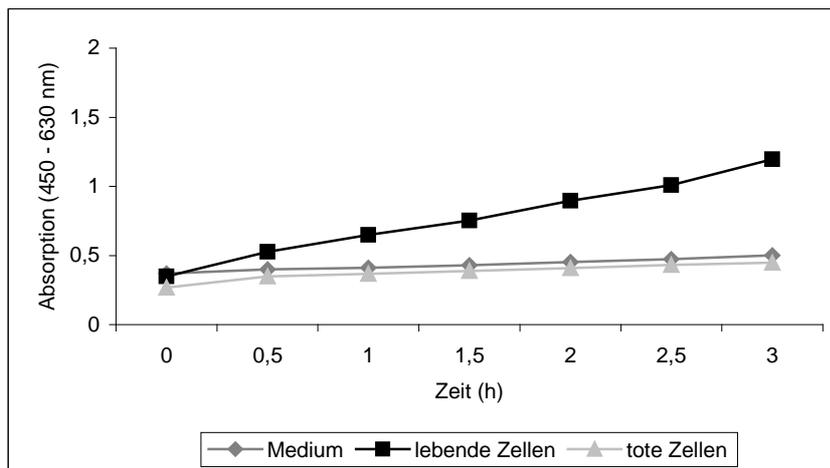


Abbildung 3.5 Metabolische Aktivität der Kontrollgruppen

3.4 Einfluss von COPROGs auf Oberflächen und Zellen

Hierzu wurden Beschichtungen aus PDLLA gelöst in Ethylacetat bzw. Chloroform/Isopropanol (v/v = 19/1) sowie Beschichtungen aus DTE5DT bzw. DTE30DT gelöst in Chloroform/Isopropanol (v/v = 19/1) angefertigt, die jeweils 5000 µg Polymer sowie je 10, 5 bzw. 2,5 µg pDNA pro *Well* in Form von COPROGs enthielten. Diese Oberflächen wurden mit 7000 NIH 3T3 Zellen pro *Well* besiedelt und anschließend für einen Gesamtzeitraum von drei Stunden unter Standardbedingungen im Brutschrank inkubiert. Messungen wurden alle 30 Minuten ab Zugabe des Zellproliferationsreagens WST®-1 im Multilabel Counter Wallac Victor² 1420 durchgeführt.

3.4.1 Strukturelle Unterschiede der Beschichtungen

Abbildung 3.6 zeigt Oberflächen aus DTE5DT und DTE30DT mit je 10 µg pDNA pro *Well* in COPROGs-Formulierungen vor der Besiedlung mit Zellen im direkten Vergleich unter einem Durchlichtmikroskop bei 200facher Vergrößerung. Obwohl man kleinere strukturelle Unterschiede erkennen kann, bildeten beide Polymere sehr einheitliche und klare Oberflächen. In keiner dieser Oberflächen war bei dieser Auflösung eine Beeinflussung der Oberfläche durch die COPROGs erkennbar.

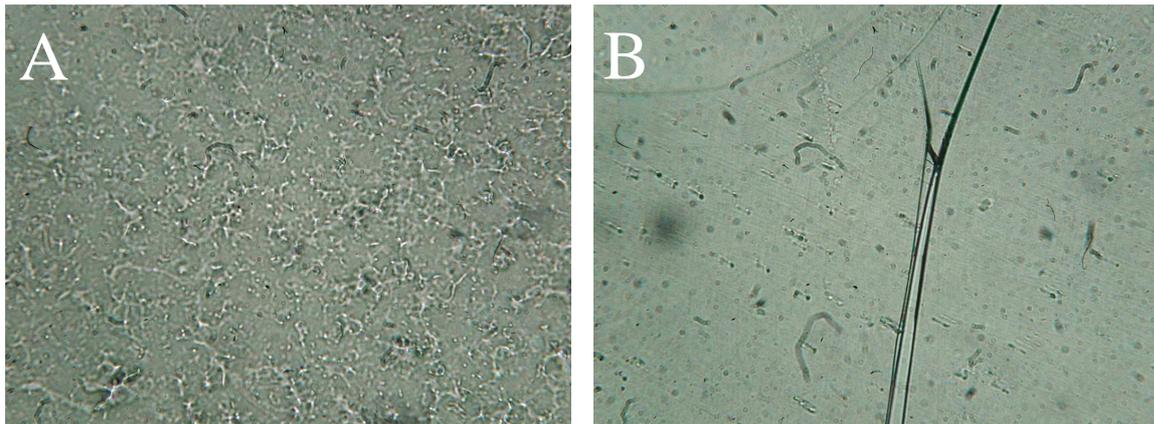


Abbildung 3.6 Bilder von Oberflächen aus DTE5DT (A) und DTE30DT (B) gelöst in Chloroform/Isopropanol mit pB-luc COPROGs (10 µg pDNA pro Well) unter einem Durchlichtmikroskop (x 200).

Abbildung 3.7 zeigt Oberflächen aus PDLLA in Ethylacetat mit 2,5 bzw. 10 µg pDNA pro Well vor der Besiedlung mit Zellen im direkten Vergleich unter einem Durchlichtmikroskop bei 200facher Vergrößerung. Hier erkennt man eine durch die Anwesenheit von COPROGs bedingte strukturelle Veränderung der Beschichtungen, welche umso ausgeprägter war je höher die zugegebene COPROGs-Konzentration.

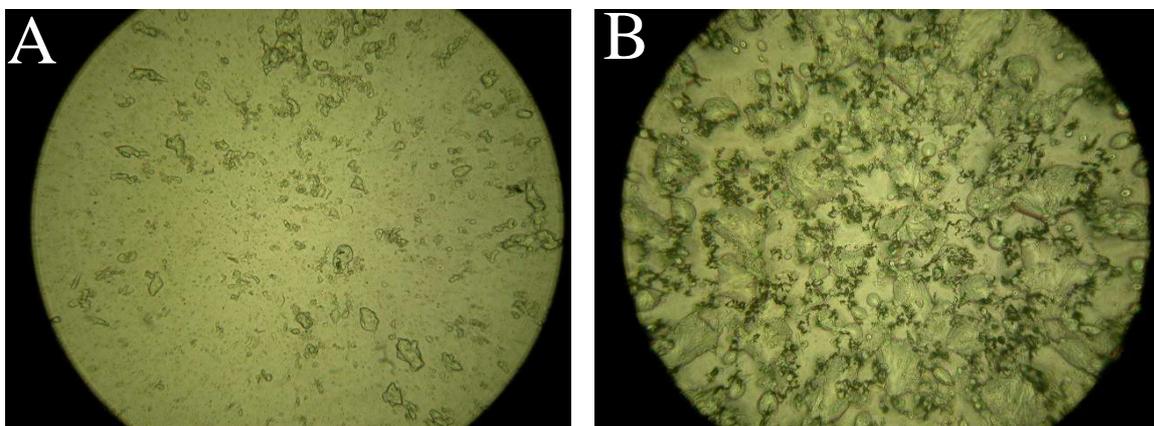


Abbildung 3.7 Bilder von Oberflächen aus PDLLA gelöst in Ethylacetat mit pB-luc COPROGs (2,5 µg pDNA (A) und 10 µg pDNA (B) pro Well) unter einem Durchlichtmikroskop (x 200).

3.4.2 Metabolische Aktivität

Im Verlauf der Messungen zeigten die NIH 3T3 Zellen bei aufsteigender COPROGs-Konzentration eine niedrigere metabolische Aktivität (s. Abb. 3.8). Dieses Verhalten war auf fast allen Oberflächen unabhängig von der Art des Beschichtungspolymeres erkennbar, am deutlichsten ausgeprägt bei DTE30DT. Bei DTE5DT konnte dagegen kein direkter Zusammenhang zwischen metabolischer Aktivität und COPROGs-Menge hergestellt werden.

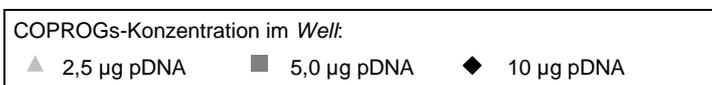
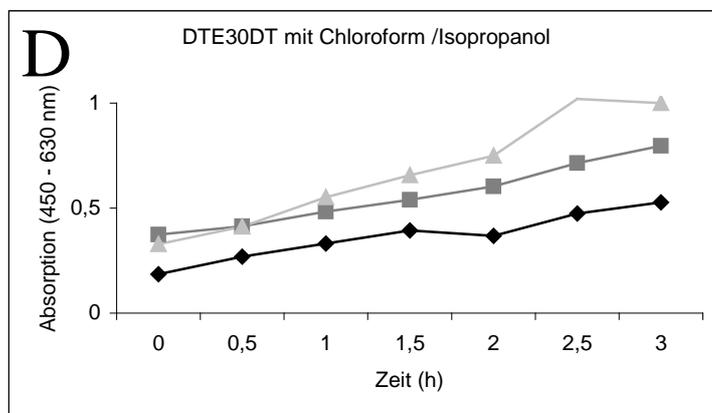
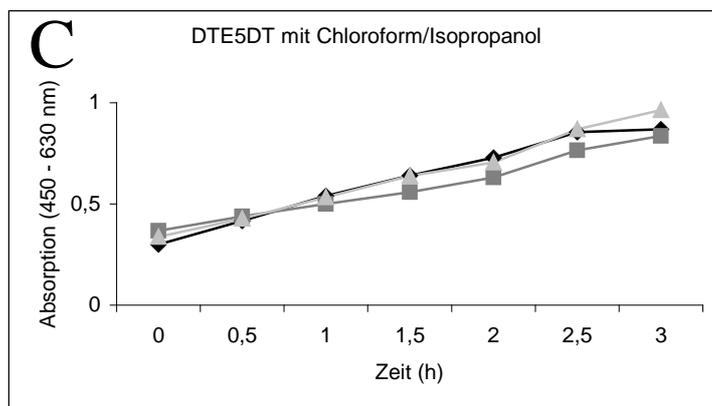
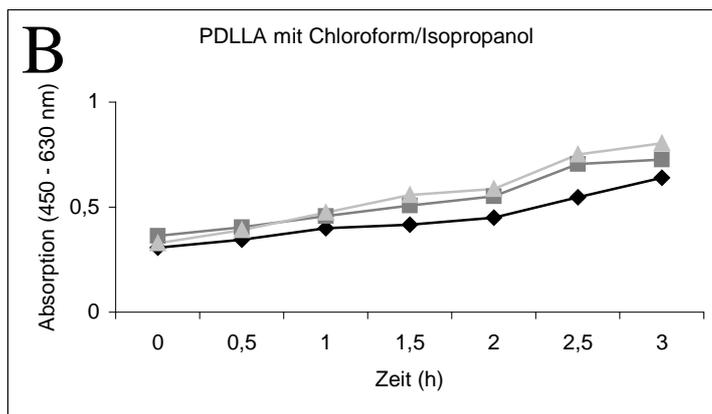
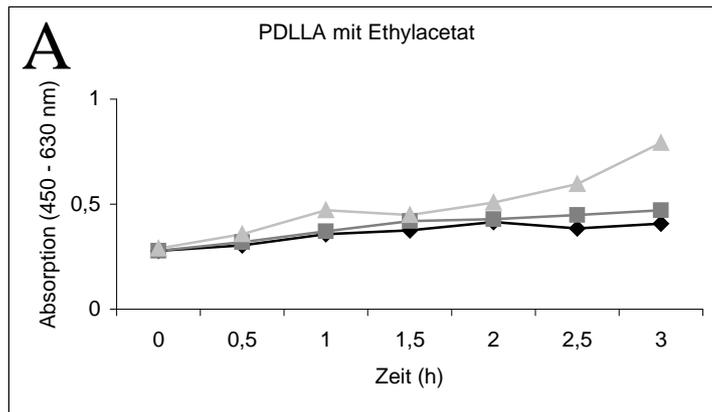
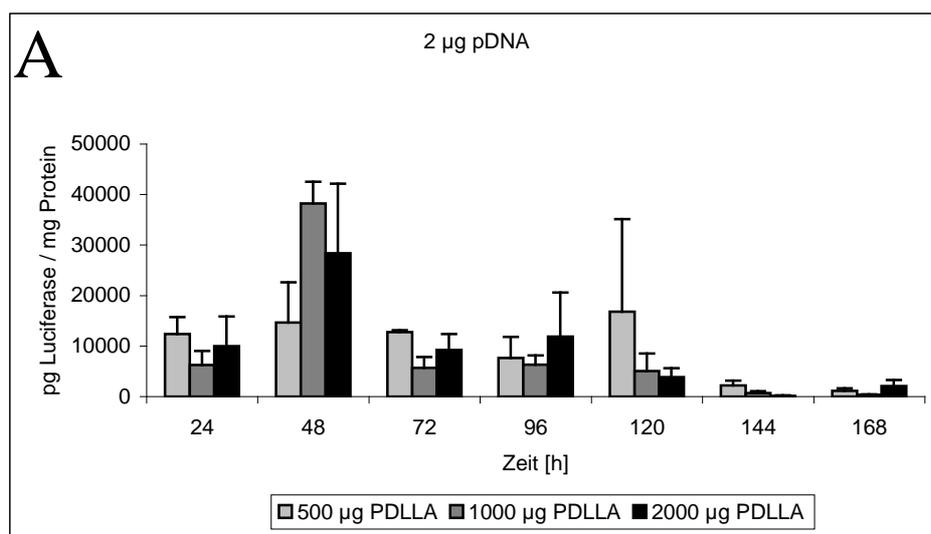


Abbildung 3.8 Metabolische Aktivität von NIH 3T3 Zellen auf verschiedenen Polymeroberflächen in Abhängigkeit von der COPROGs-Konzentration im Well.

3.5 Luciferase Expression im zeitlichen Verlauf

Hierzu wurden Oberflächen mit dem pDNA zu Polymer Verhältnis 1:1000, 1:500 und 1:250 eingesetzt. Es wurden genaktivierte Oberflächen aus PDLLA gelöst in Ethylacetat hergestellt, die 2000, 1000 bzw. 500 µg Polymer und 2 µg pDNA pro *Well* in Form von COPROGs enthielten, Oberflächen mit 1000, 500 bzw. 250 µg Polymer und 1 µg pDNA in den COPROGs-Formulierungen sowie Oberflächen mit 500, 250 bzw. 125 µg Polymer und 0,5 µg pDNA in den COPROGs-Formulierungen. Diese wurden mit 7000 NIH 3T3 Zellen pro *Well* besiedelt und für einen Gesamtzeitraum von sieben Tagen unter Standardbedingungen im Brutschrank inkubiert. Messungen wurden nach 24, 48, 72, 96, 120, 144 und 168 Stunden im Microplate Scintillation & Luminescence Counter TopCount durchgeführt.

Im Verlauf von sieben Tagen stieg die Luciferase Expression der NIH 3T3 Zellen auf einen Maximalwert am Tag zwei und fiel daraufhin bis zur letzten Messung am Tag sieben wieder kontinuierlich ab (vergl. Abb. 3.9). Dies geschah unabhängig von der Konzentration der eingesetzten pDNA wie auch des Polymers. Es wurde jedoch ein großer Unterschied hinsichtlich der Expression festgestellt, die abhängig ist von der Menge der applizierten COPROGs im Polymer. Messungen an Kontrollgruppen aus untransfizierten NIH 3T3 Zellen angesiedelt auf PDLLA-Oberflächen ohne COPROGs, ergaben keine messbaren Expressionswerte.



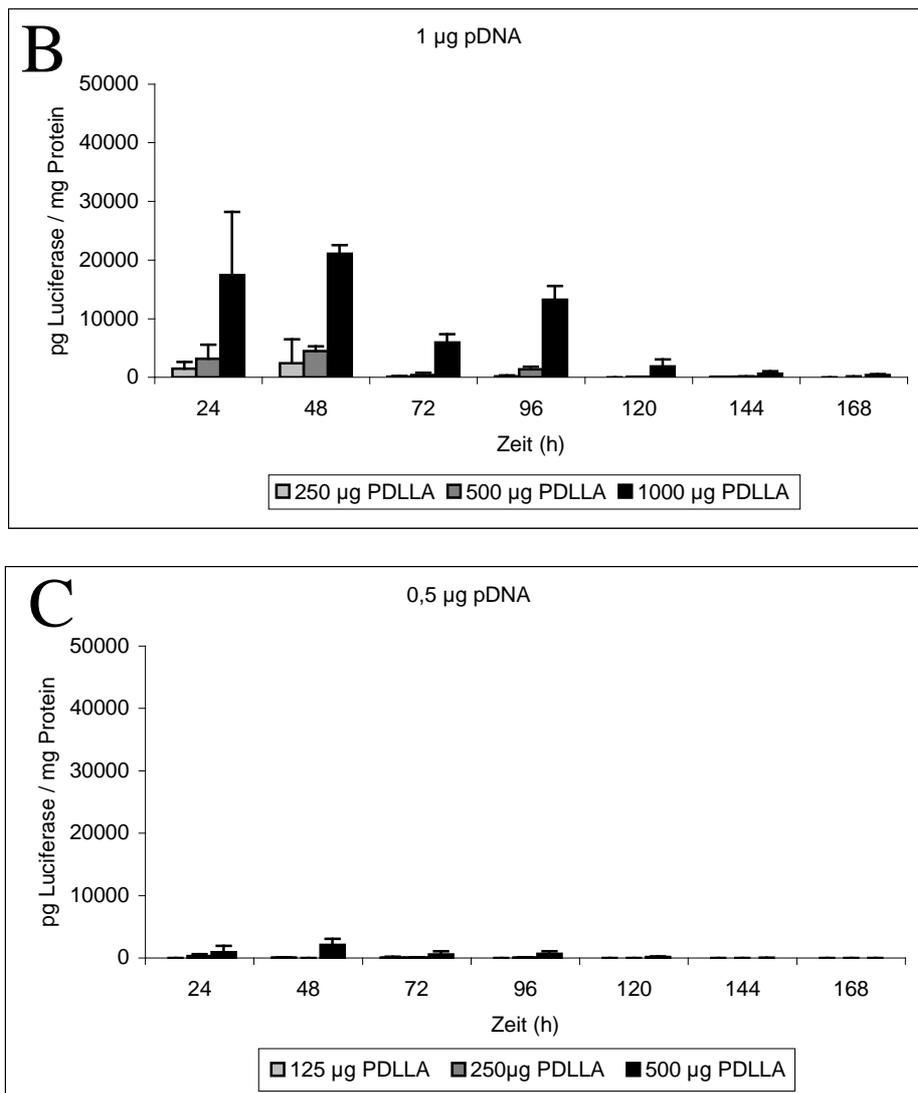


Abbildung 3.9 Luciferase Expression der NIH 3T3 Zellen im Verlauf 1 Woche auf genaktivierten Oberflächen aus PDLLA.

3.6 Oberflächen aus PDLLA bzw. PLGA mit pB-luc COPROGs

Diese Oberflächen aus 500, 1000, 2000, 4000 bzw. 6000 µg Polymer pro *Well* gelöst in Ethylacetat enthielten jeweils COPROGs mit pDNA-Mengen von 0,078; 0,156; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5 und 10 µg pB-luc. Darauf wurden je 7000 NIH 3T3 Zellen pro *Well* angesiedelt und über direkten Kontakt mit COPROGs transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden unter Standardbedingungen im Brutschrank wurden Messungen der metabolischen Aktivität, der Luciferase-Expression und der Proteinkonzentration transfizierter Zellen durchgeführt.

3.6.1 Metabolische Aktivität

Die metabolische Aktivität der Zellen wurde einmalig nach Einhalten der Inkubationszeit von 48 Stunden, drei Stunden nach Zugabe des Zellproliferationsreagens WST®-1 im Multilabel Counter Wallac Victor² 1420 vermessen (s. Abb. 3.10 A und B). Es wurde sowohl bei PDLLA als auch bei PLGA festgestellt, dass Zellen in Gegenwart der niedrigen COPROGs-Konzentrationen (pDNA-Mengen von 0,078; 0,156 und 0,3125 µg pro *Well*) sich völlig unbeeinflusst hinsichtlich des Zellwachstums verhielten. Ab einer pDNA-Konzentration von 0,625 µg pro *Well* allerdings beobachtet man eine stetige Abnahme der metabolischen Aktivität. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass beide Polymere eine Schutzfunktion ausübten: je höher die Polymermenge pro *Well* desto geringer der COPROGs-Einfluss auf die Zellen, wobei dieses Phänomen bei PDLLA ausgeprägter erkennbar war als bei PLGA. Wenngleich bei PDLLA-Mengen von 4000 bzw. 6000 µg pro *Well* die Zellen sogar bis zu einer pDNA-Konzentration von 10 µg pro *Well* von den COPROGs nahezu unbeeinflusst blieben, war bei vergleichbaren PLGA-Mengen doch ein deutlicher Abfall der metabolischen Aktivität zu verzeichnen.

3.6.2 Luciferase Expression

Die Messung der Luciferase Expression fand nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden im Microplate Scintillation & Luminescence Counter TopCount statt und wurde im Verhältnis zu der ebenfalls nach 48 Stunden im Multilabel Counter Wallac Victor² 1420 vermessenen Proteinkonzentration aufgetragen (s. Abb. 3.10 C und D). Hierbei konnte sowohl bei PDLLA als auch bei PLGA ein deutliches Expressionsmaximum bei einer pDNA-Konzentration von 0,625 µg pro *Well* ermittelt werden. Mit steigender Polymermenge, nämlich ab 4000 µg pro *Well*, verschob sich dieses gegen 1,25 µg pDNA in den COPROGs-Formulierungen, und bei PLGA-Mengen von 6000 µg pro *Well* lag es bei einer pDNA-Konzentration in den COPROGs von 2,5 µg .

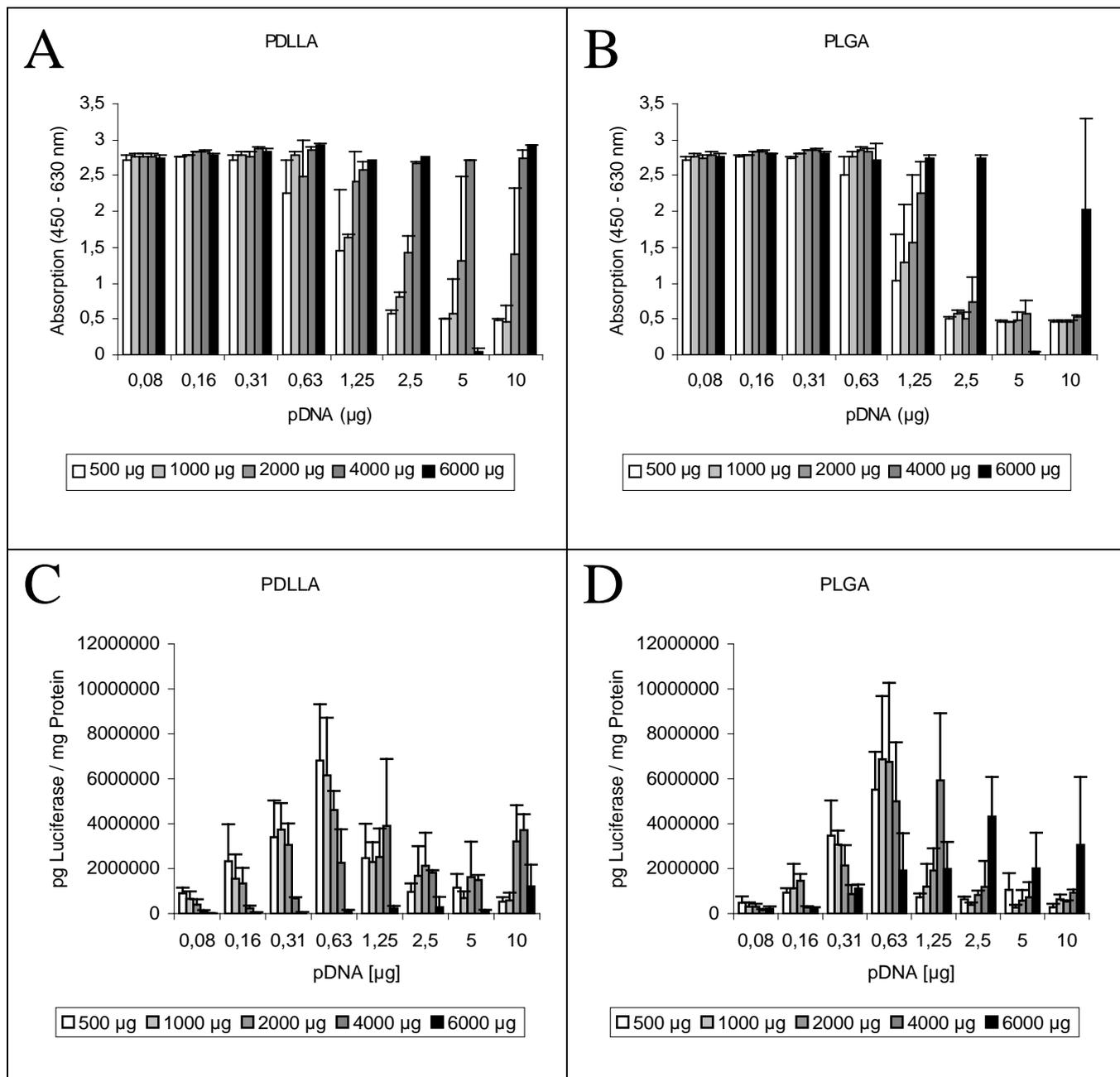


Abbildung 3.10 Metabolische Aktivität (A, B) und Luciferase Expression (C, D) zur Bestimmung der Abhängigkeit von COPROGs und des verwendeten Polymers nach Kontakt der NIH 3T3 Zellen mit COPROGs in PDLLA (A,C) und PLGA (B,D).

3.6.3 Zusammenfassung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit 0,625 µg pDNA in Form von COPROGs und der Polymermenge 2000 µg pro Well eine optimale COPROGs-Polymer-Kombination gefunden wurde. Bei dieser waren hohe Luciferase-Expressionen bei gleichzeitigem geringen Einfluss der COPROGs auf das Zellwachstum zu detektieren. Dieses Optimum sollte allerdings bei höheren Polymermengen neu definiert werden, so bei 4000 µg Polymer pro Well mit 1,25 µg pDNA in COPROGs-Formulierungen. Bei PLGA lag das Optimum von

6000 µg Polymer pro *Well* sogar bei 2,5 µg pDNA in Form von COPROGs – für PDLLA konnte dieser Wert nicht belegt werden.

3.7 Oberflächen aus PDLLA bzw. PLGA mit nackter pDNA

Diese Oberflächen aus 500, 1000, 2000, 4000 bzw. 6000 µg der entsprechenden Polymere pro *Well* gelöst in Ethylacetat enthielten jeweils nackte pDNA in Mengen von 0,078; 0,156; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5 und 10 µg pB-luc. Darauf wurden je 7000 NIH 3T3 Zellen pro *Well* angesiedelt und über den direkten Kontakt mit nackter pDNA transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden unter Standardbedingungen im Brutschrank wurden Messungen der metabolischen Aktivität und der Luciferase-Expression durchgeführt.

3.7.1 Metabolische Aktivität

Die metabolische Aktivität der Zellen wurde einmalig nach Einhalten der Inkubationszeit von 48 Stunden, drei Stunden nach Zugabe des Zellproliferationsreagens WST®-1 im Multilabel Counter Wallac Victor² 1420 vermessen (s. Abb. 3.11 A und B). Bei dieser Art von Oberflächen wurde anhand der metabolischen Aktivität festgestellt, dass unabhängig von Polymerart als auch von Polymer- und pDNA-Konzentration pro *Well* die nackte pDNA keinerlei zytotoxischen Einfluss auf die Zellen zeigte.

3.7.2 Luciferase Expression

Die Messung der Luciferase Expression wurde nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden im Microplate Scintillation & Luminescence Counter TopCount durchgeführt und hierbei keinerlei messbare Luciferase-Expression nachgewiesen. Aufgrund dieser Daten hat man auf eine zusätzliche Messung der Proteinkonzentration verzichtet.

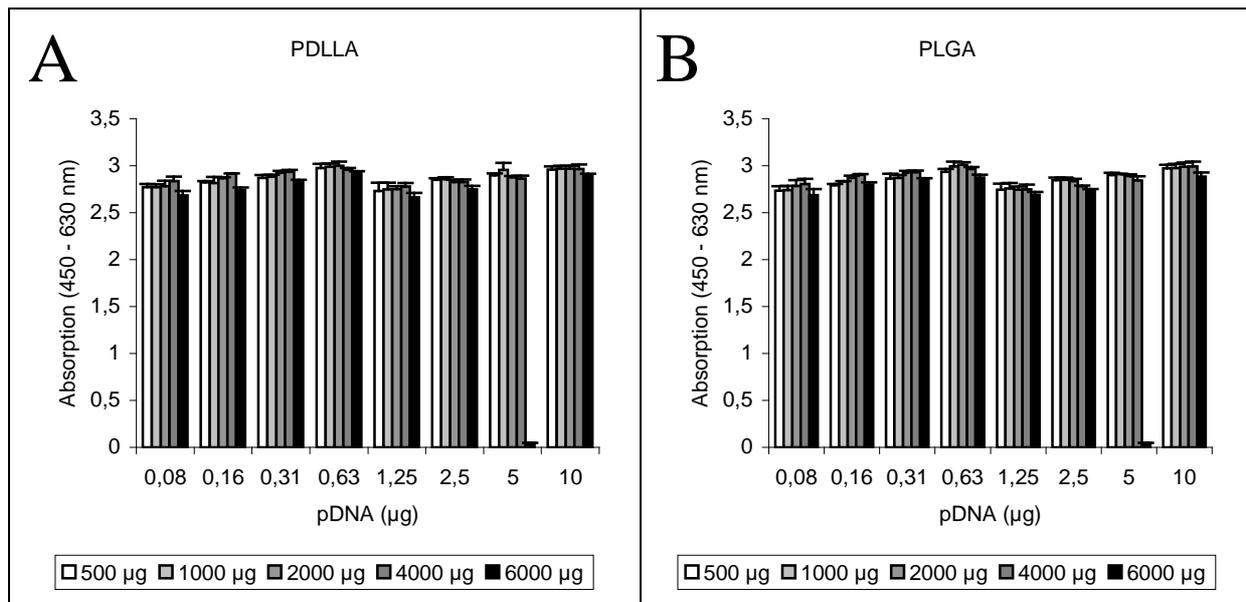


Abbildung 3.11 Metabolische Aktivität zur Bestimmung der Abhängigkeit von pDNA und des verwendeten Polymers nach Kontakt der NIH 3T3 Zellen mit nackter pDNA in PDLLA (A) und PLGA (B).

3.8 Oberflächen aus DTE5DT bzw. DTE30DT mit COPROGs

Diese Oberflächen aus 1000 bzw. 2000 µg Polymer pro *Well* gelöst in Chloroform/Isopropanol ($v/v = 19/1$) enthielten jeweils COPROGs mit pDNA-Konzentrationen von 0,078; 0,156; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5 und 10 µg pB-luc. Darauf wurden je 7000 NIH 3T3 Zellen pro *Well* angesiedelt und über den direkten Kontakt mit COPROGs transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden unter Standardbedingungen im Brutschrank wurden Messungen der metabolischen Aktivität, der Luciferase-Expression und der Proteinkonzentration transfizierter Zellen durchgeführt.

3.8.1 Metabolische Aktivität

Die metabolische Aktivität der Zellen wurde einmalig nach Einhalten der Inkubationszeit von 48 Stunden, drei Stunden nach Zugabe des Zellproliferationsreagens WST®-1 im Multilabel Counter Wallac Victor² 1420 vermessen (s. Abb. 3.12 A und B). Bei dieser Art von Oberflächen wurde anhand der metabolischen Aktivität festgestellt, dass unabhängig von Polymerart als auch von Polymer- und pDNA-Konzentration pro *Well*, die COPROGs keinerlei zytotoxischen Einfluss auf die Zellen zeigten.

3.8.2 Luciferase Expression

Die Messung der Luciferase Expression fand nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden im Microplate Scintillation & Luminescence Counter TopCount statt und wurde im Verhältnis zu der ebenfalls nach 48 Stunden im Multilabel Counter Wallac Victor² 1420 vermessenen Proteinkonzentration aufgetragen (s. Abb. 3.12 C und D). Die gemessenen Expressionswerte waren hierbei jedoch so vernachlässigbar klein, dass sie einer Nullexpression gleich gesetzt werden können.

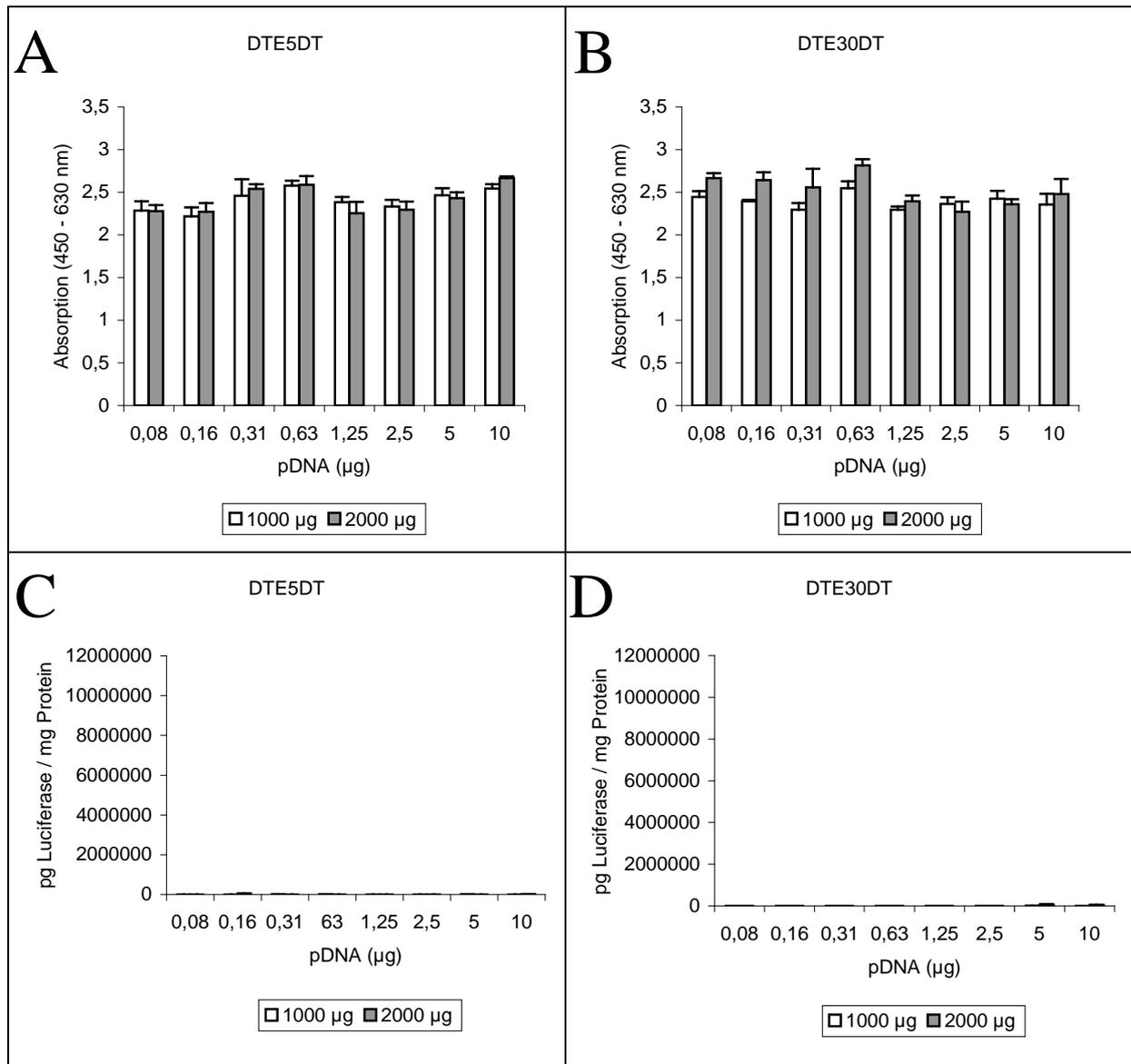


Abbildung 3.12 Metabolische Aktivität (A, B) und Luciferase Expression (C, D) zur Bestimmung der Abhängigkeit von COPROGs und des verwendeten Polymers nach Kontakt der NIH 3T3 Zellen mit COPROGs in DTE5DT (A, C) und DTE30DT (B, D).

3.9 Oberflächen aus PDLLA gelöst in Chloroform/Isopropanol

Diese Oberflächen aus 1000 bzw. 2000 µg Polymer pro *Well* gelöst in Chloroform/Isopropanol (v/v = 19/1) enthielten jeweils COPROGs mit pDNA-Konzentrationen von 0,078; 0,156; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5 und 10 µg pB-luc. Darauf wurden je 7000 NIH 3T3 Zellen pro *Well* angesiedelt und über den direkten Kontakt mit COPROGs transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden unter Standardbedingungen im Brutschrank wurden Messungen der metabolischen Aktivität, der Luciferase-Expression und der Proteinkonzentration transfizierter Zellen durchgeführt.

3.9.1 Metabolische Aktivität

Die metabolische Aktivität der Zellen wurde einmalig nach Einhalten der Inkubationszeit von 48 Stunden, drei Stunden nach Zugabe des Zellproliferationsreagens WST®-1 im Multilabel Counter Wallac Victor² 1420 vermessen (s. Abb. 3.13 A). Es wurde, ähnlich wie bei den Oberflächen aus PDLLA in Ethylacetat, beobachtet, dass Zellen in Gegenwart der niedrigen COPROGs-Konzentrationen (pDNA-Mengen von 0,078; 0,156; 0,3125 und 0,625 µg pro *Well*) sich völlig unbeeinflusst hinsichtlich des Zellwachstums verhielten. Ab einer pDNA-Menge von 1,25 µg pro *Well* allerdings beobachtet man eine stetige Abnahme der metabolischen Aktivität.

3.9.2 Luciferase Expression

Die Messung der Luciferase Expression fand nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden im Microplate Scintillation & Luminescence Counter TopCount statt und wurde im Verhältnis zu der ebenfalls nach 48 Stunden im Multilabel Counter Wallac Victor² 1420 vermessenen Proteinkonzentration aufgetragen (s. Abb. 3.13 B). Hierbei konnten zwei Expressionsmaxima verzeichnet werden, einmal bei 0,3125 µg pDNA in Form von COPROGs zusammen mit 1000 µg PDLLA pro *Well* und ein zweites bei 5 µg pDNA in den COPROGs-Formulierungen mit 2000 µg PDLLA pro *Well*.

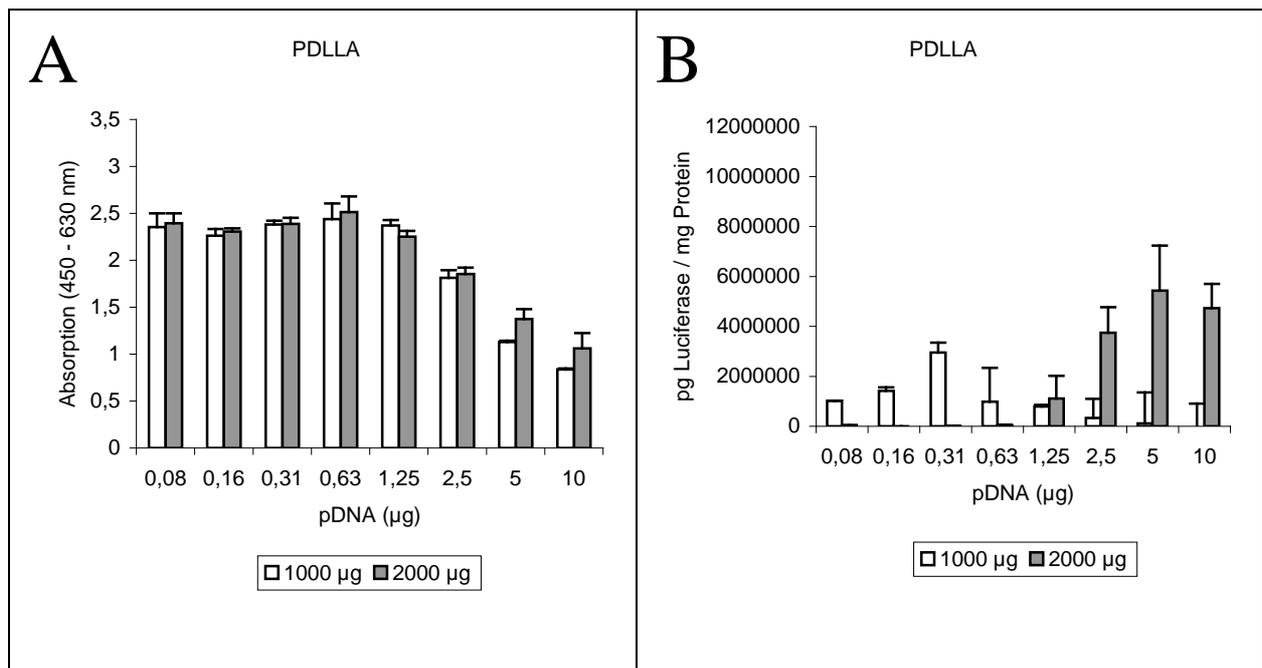


Abbildung 3.13 Metabolische Aktivität (A) und Luciferase Expression (B) zur Bestimmung der Abhängigkeit von COPROGs und des verwendeten Polymers nach Kontakt der NIH 3T3 Zellen mit COPROGs in PDLLA.

3.9.3 Zusammenfassung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Einfluss der COPROGs und das Wachstum der Zellen anhand der metabolischen Aktivität ähnlich zu beurteilen waren wie bei den Oberflächen aus PDLLA mit Ethylacetat (vergl. Kap. 3.6). Das Spektrum der Maximalexpression hatte sich jedoch wohl unter dem Einfluss des Lösungsmittels deutlich verschoben. Die Höhe der Expression jedoch, zumindest bei den Oberflächen aus 2000 μg PDLLA pro *Well*, war vergleichbar.

3.10 Transfektionseffizienz

Oberflächen aus 1000 und 2000 μg PDLLA bzw. PLGA pro *Well* gelöst in Ethylacetat enthielten jeweils COPROGs mit pDNA-Mengen von 0; 0,3125; 0,625 und 1,25 μg pEGFP-N1. Darauf wurden je 7000 NIH 3T3 Zellen pro *Well* angesiedelt und über den direkten Kontakt mit COPROGs transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden unter Standardbedingungen im Brutschrank wurde im FACS Vantage unter Zugabe von

Probidiumjodid die Messung der Transfektionseffizienz durchgeführt. Abbildung 3.14 zeigt eine Übersicht der an zwei verschiedenen Terminen bestimmten Ergebnisse.

Versuch 1

	PDLLA 1000	PDLLA 2000	PLGA 1000	PLGA 2000
ohne pDNA	0,03 %	0,21 %	0,09 %	0,08 %
0,3125 µg	10,61 %	13,97 %	4,59 %	5,47 %
0,625 µg	21,41 %	23,55 %	11,50 %	9,36 %
1,25 µg	?	21,8 %	27,56 %	18,46 %

Versuch 2

	PDLLA 1000	PDLLA 2000	PLGA 1000	PLGA 2000
ohne pDNA	0,08 %	0,00 %	0,05 %	0,00 %
0,3125 µg	4,27 %	1,85 %	4,38 %	1,88 %
0,625 µg	7,47 %	5,40 %	6,13 %	4,16 %
1,25 µg	22,13 %	19,43 %	14,08 %	10,11 %

Abbildung 3.14 Transfektionseffizienzen der pEGFP-N1 COPROGs gemessen an zwei verschiedenen Tagen.

Die Messwerte fielen, wie man Versuch 1 im Vergleich zu Versuch 2 entnehmen kann, an beiden Tagen sehr unterschiedlich aus. Die höchsten Transfektionseffizienzen für das mit 1000 bzw. 2000 µg Polymer und 0,625 µg pDNA pro *Well* definierte Transfektionsoptimum (vergl. Kap. 3.6), wurden dabei mit 21,41 % für 1000 µg und 23,55 % für 2000 µg PDLLA bestimmt. Für PLGA lagen die Ergebnisse etwas niedriger mit 11,5% für 1000 µg und 9,36 % für 2000 µg des Polymers. Leider konnten diese Werte in der zweiten Messung (Abb. 3.14; Versuch 2) nicht verifiziert werden. Dies kann auf Probleme bei der Validierung der Methode zurückgeführt werden. Aufgrund der Notwendigkeit größerer Zellzahlen zur Messung der Transfektionseffizienz wurden Zellen aus mehreren *Wells* in einem Behälter gesammelt. Daher kam es wohl zu Schwankungen in der Gesamtzahl und dadurch zu Ungenauigkeiten bei der Versuchsdurchführung. Somit muss die Reproduzierbarkeit der Versuchsbedingungen und dadurch die Anwendbarkeit der Methode als Standardverfahren in Frage gestellt werden. In Abbildung 3.15 und 3.16 wurden exemplarisch die Originalmessprotokolle der vier höchsten Werte zusammen mit den Kontrollgruppen, das bedeutet NIH 3T3 Zellen auf Oberflächen

ohne pDNA, abgebildet. Abbildung 3.17 und 3.18 zeigen Aufnahmen der dazugehörigen Oberflächen mit transfizierten NIH 3T3 Zellen unter einem Durchlicht- bzw. einem Fluoreszenzmikroskop. Diese Bilder wurden unmittelbar vor Ablösen der Zellen zur FACS-Messung aufgenommen.

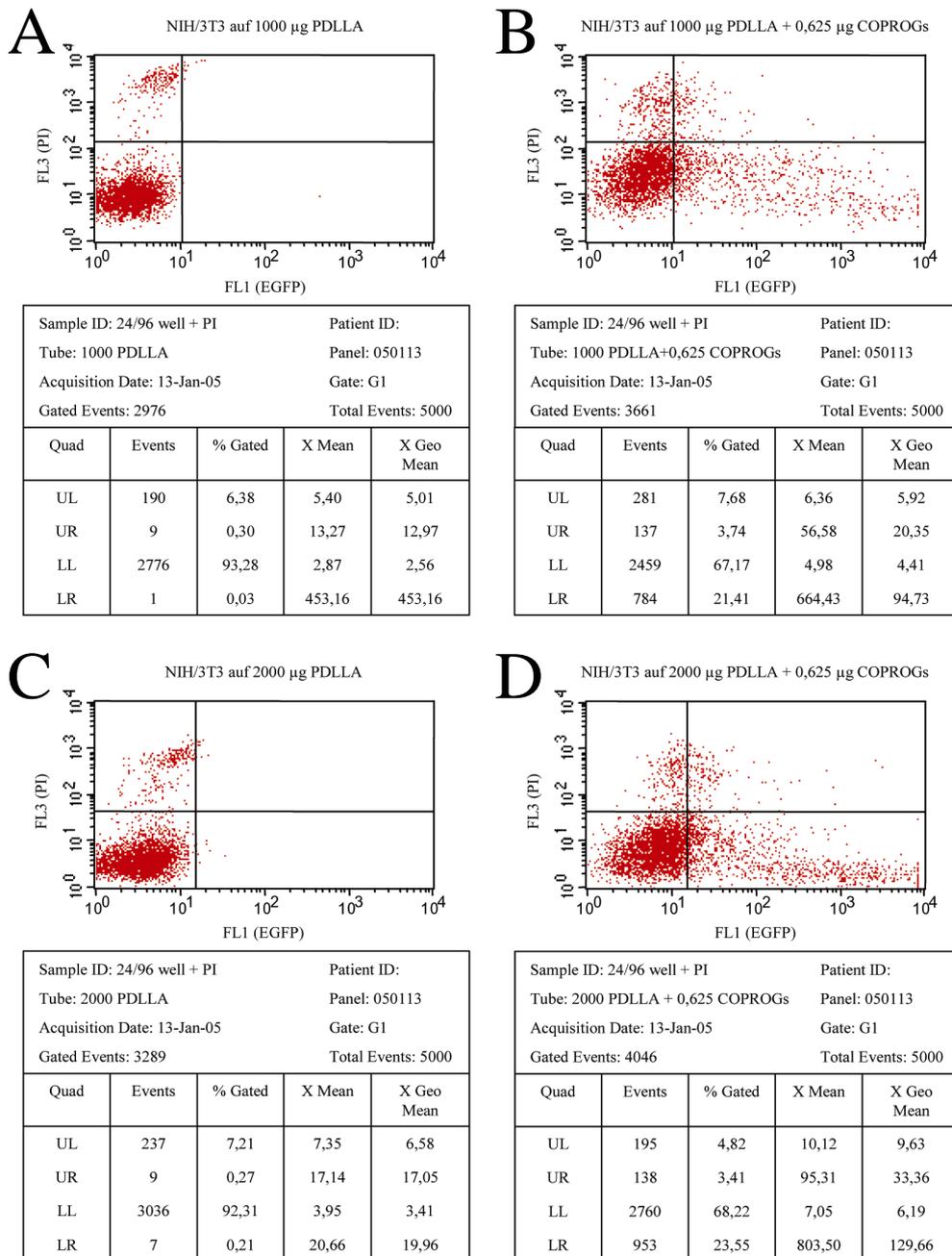


Abbildung 3.15 FACS-Messprotokolle der PDLLA-Oberflächen; A und C ohne pDNA; B und D mit 0,625µg pDNA pro Well.

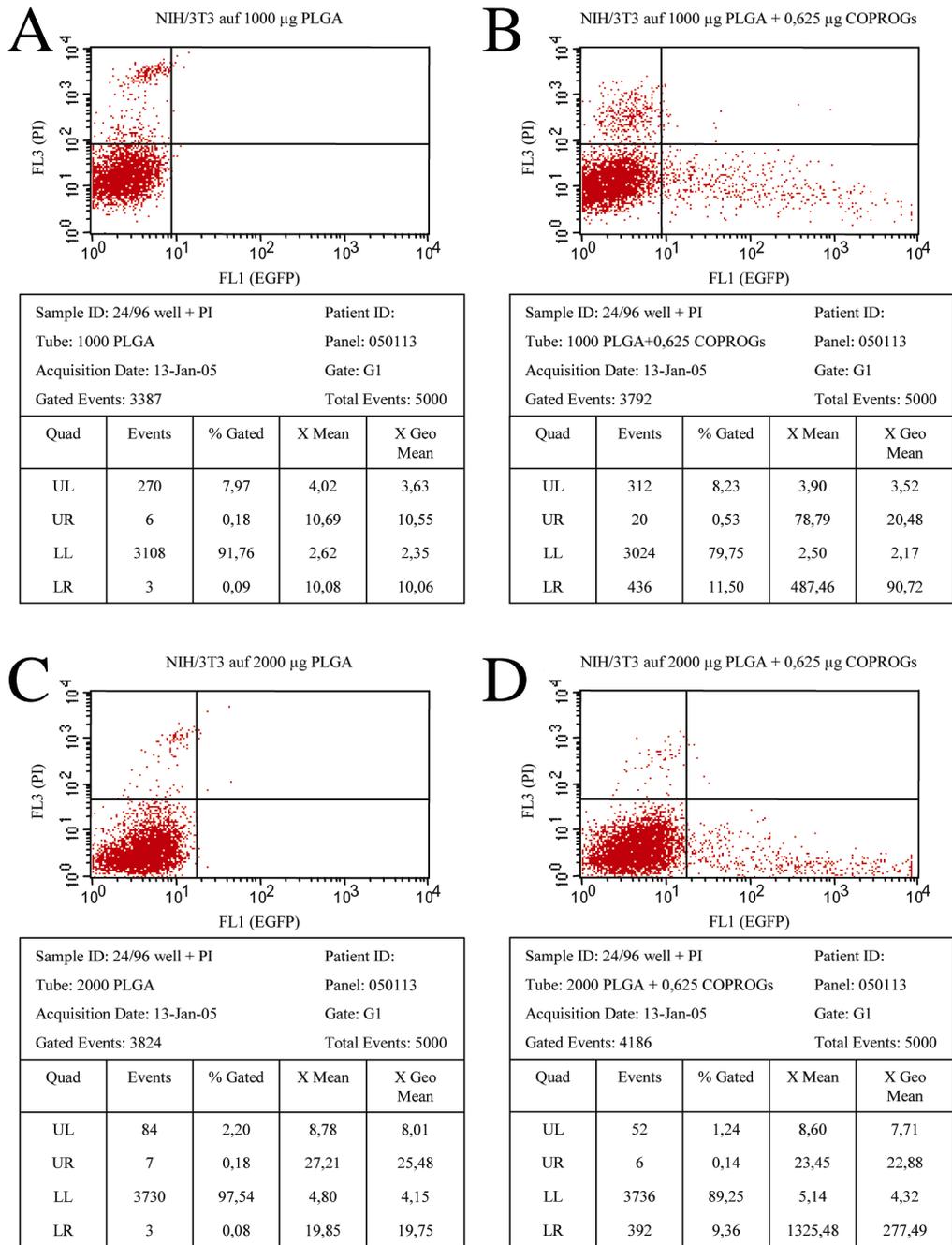


Abbildung 3.16 FACS-Messprotokolle der PLGA-Oberflächen; A und C ohne pDNA; B und D mit 0,625µg pDNA pro Well.

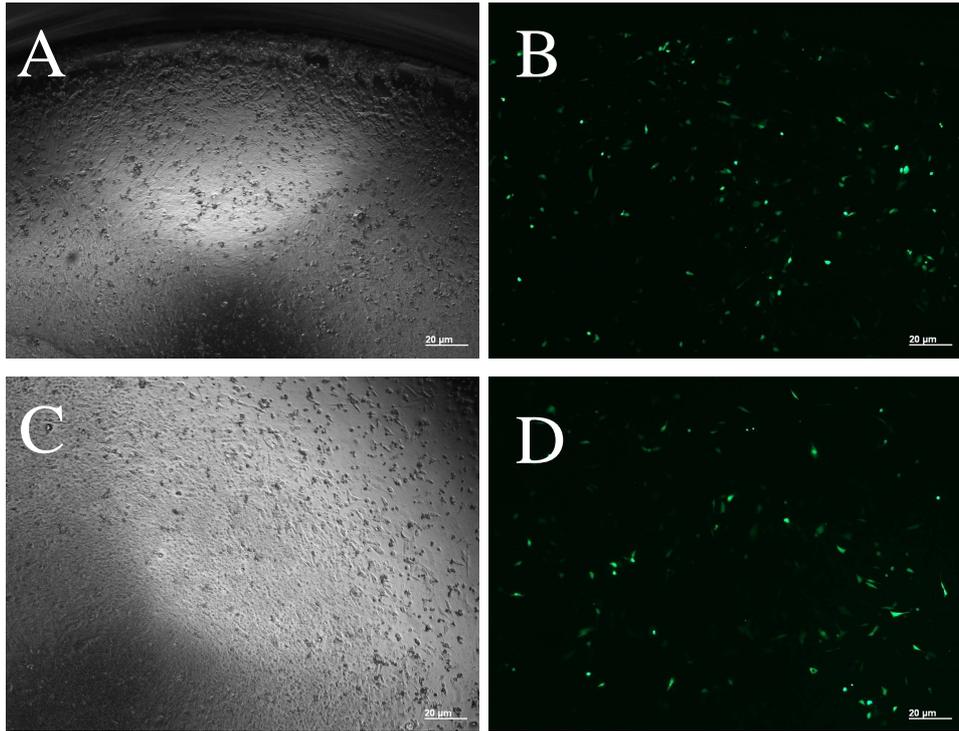


Abbildung 3.17 NIH 3T3 Zellen auf Oberflächen aus PDLLA mit $0,625 \mu\text{g}$ pDNA pro Well; A und B $1000 \mu\text{g}$ PDLLA; C und D $2000 \mu\text{g}$ PDLLA unter Durchlicht (A und C $\times 40$)- und Fluoreszenzmikroskop (B und D).

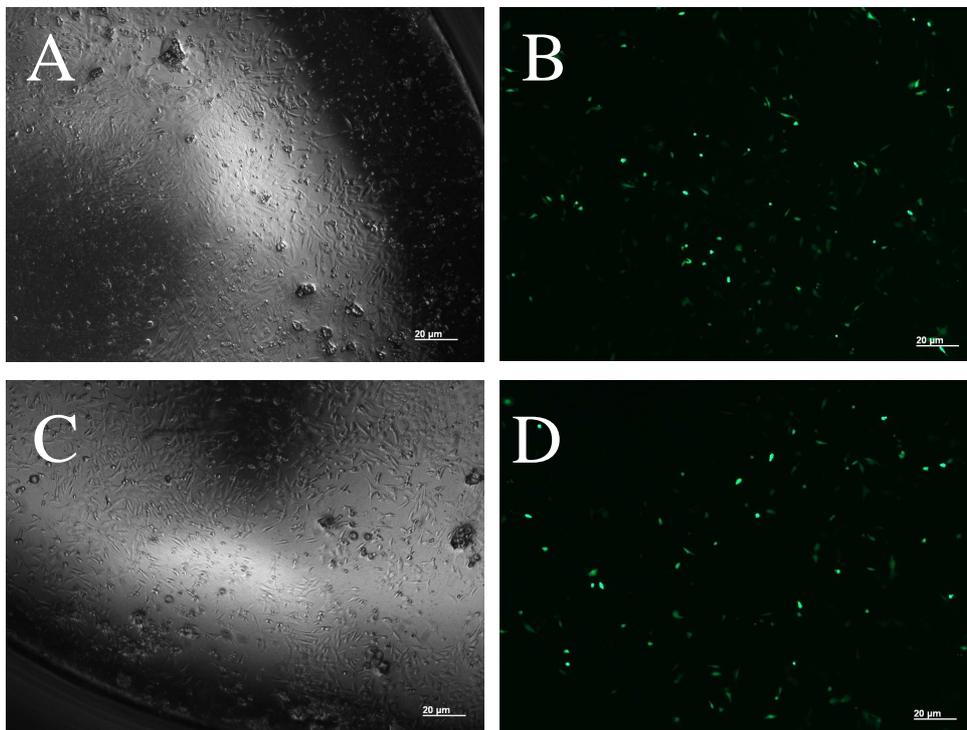


Abbildung 3.18 NIH 3T3 Zellen auf Oberflächen aus PLGA mit $0,625 \mu\text{g}$ pDNA pro Well; A und B $1000 \mu\text{g}$ PLGA; C und D $2000 \mu\text{g}$ PLGA unter Durchlicht (A und C $\times 40$)- und Fluoreszenzmikroskop (B und D).

3.11 Freisetzung von pDNA und PEI 25

Zur Durchführung dieser Messungen wurden Oberflächen aus PDLLA bzw. PLGA hergestellt, die COPROGs mit radioaktiv markierter pB-luc pDNA und radioaktiv markiertem PEI 25 enthielten. Diese Oberflächen bestanden aus je 500, 1000, 2000 bzw. 4000 μg Polymer und 0,625; 1,25; 2,5 und 5 μg pDNA pro *Well*, sie wurden mit *Dublecco's Modified Eagle Medium* beschichtet und für einen Gesamtzeitraum von 4 Wochen unter Standardbedingungen im Brutschrank inkubiert. Nach 1, 2, 4, 24, 48, 72, 168, 240, 336, 504 und 672 Stunden wurden die Mediumüberstände jeweils gesammelt, durch neue ersetzt und die Radioaktivität der darin befindlichen pDNA wie auch des PEI 25 im Gamma Counter Wallac 1480 Wizard 3'' gemessen. Daraus wurde die Freisetzung dieser beiden COPROGs-Bestandteile aus den Oberflächen ermittelt. Zudem wurde anhand der radioaktiv markierten pDNA die tatsächliche pDNA-Menge pro *Well* ermittelt. Dabei wurde festgestellt, dass der tatsächliche pDNA-Gehalt der Oberflächen niedriger war als der theoretisch angenommene Wert. Anstatt der veranschlagten 0,625; 1,25; 2,5 und 5 μg pDNA pro *Well*, fand man lediglich 0,36; 0,78; 1,59 und 3,30 μg pDNA. Diese tatsächlichen Werte wurden auch bei der graphischen Darstellung der pDNA-Freisetzung in den folgenden Abbildungen berücksichtigt.

3.11.1 Freisetzung der pDNA

Abbildung 3.19 zeigt die kumulativen Freisetzungskurven der pDNA aus PDLLA- und PLGA-Oberflächen prozentual zur eingesetzten Plasmid-Menge. Die Graphen sind jeweils von oben nach unten nach steigender Polymer-Menge geordnet. Sowohl bei PDLLA wie auch bei PLGA konnte man anfänglich einen sehr steilen Anstieg (*initial burst*) der Freisetzungskurven verzeichnen. Im weiteren Verlauf zeigte sich bei PDLLA ein stetiger Abfall der prozentualen pDNA-Freisetzung, bei PLGA dagegen konnte zwar zunächst ein Abfall, danach aber eher ein weiterer Anstieg verzeichnet werden. Zudem war die Freisetzung umso höher, je niedriger die eingesetzte pDNA-Menge und je niedriger auch die eingesetzte Polymer-Menge pro *Well* war. Dies bedeutet, die höchste prozentuale Freisetzung konnte durch die Kombination der niedrigsten pDNA- mit der niedrigsten Polymer-Menge erzielt werden. Dies gilt sowohl für die PDLLA- als auch PLGA-Oberflächen. Jedoch obgleich man diesen Effekt bei PDLLA durchgehend bei allen pDNA- und Polymer-Mengen beobachten konnte und lediglich die Kurve von 1,59 μg pDNA in Kombination mit 2000 μg Polymer eine Abweichung davon zeigte, indem sie höher ausfiel als erwartet, gilt dieser Grundsatz bei PLGA lediglich für die niedrigste pDNA- und Polymer-Menge. Bei PLGA-Mengen ab 2000

μg pro *Well* konnte keine Auswirkung der Polymermenge auf die Freisetzungskinetik mehr verzeichnet werden und alle Kurven verliefen beinahe auf gleicher Höhe (siehe Abbildung 3.20). Auch der Einfluss der pDNA-Menge schien nur auf der niedrigsten Stufe bei $0,36 \mu\text{g}$ pDNA pro *Well* relevant sowie bei $0,78 \mu\text{g}$ pDNA, allerdings nur in Kombination mit 500 bzw. $1000 \mu\text{g}$ PLGA. Bei höheren pDNA-Mengen wurden keine Unterschiede in der Freisetzungskinetik beobachtet. In Abbildung 3.21 wurden die direkt freigesetzten pDNA-Mengen an den jeweiligen Messzeitpunkten ebenfalls prozentual zur eingesetzten Plasmid-Menge dargestellt. Auch hier erkennt man die anfänglich im Vergleich stark erhöhte prozentuale Freisetzung (*initial burst*) und sieht bei PDLLA den Einfluss der Polymermenge auf die Höhe der prozentualen Freisetzung bestätigt, bei PLGA dagegen erkennt man diesen Einfluss nicht.

3.11.2 Freisetzung von PEI 25

Die Freisetzung von PEI 25 wurde prozentual zur eingesetzten Menge dargestellt, in Abbildung 3.22 kumulativ und in Abbildung 3.23 die direkt freigesetzten PEI-Mengen an den jeweiligen Messzeitpunkten. Da die Halbwertszeit von I^{131} sehr kurz ist, konnten bei Inkubationszeiten größer 168 Stunden keine verlässlichen Messwerte mehr erzielt werden, daher beschränken sich die Darstellungen auf die Werte, die bis 168 Stunden gemessen werden konnten. Grundsätzlich entspricht die Freisetzungskinetik des PEI 25 der prozentualen Freisetzung der pDNA mit anfänglich steilem Anstieg (*initial burst*) und im Verlauf stetigem Abfall der prozentualen Freisetzung. Allerdings wurde anhand der direkten Darstellung eine im Verhältnis anfangs höhere prozentuale Freisetzung des PEI 25 als der pDNA festgestellt. Dies wurde aber lediglich bei der ersten der Messungen nach einer Stunde beobachtet, im weiteren Verlauf glichen sich die Kurven wieder an und zeigten einen parallelen Verlauf. Somit kann davon ausgegangen werden, dass ganze COPROGs freigesetzt wurden und nicht nur deren Einzelbestandteile.

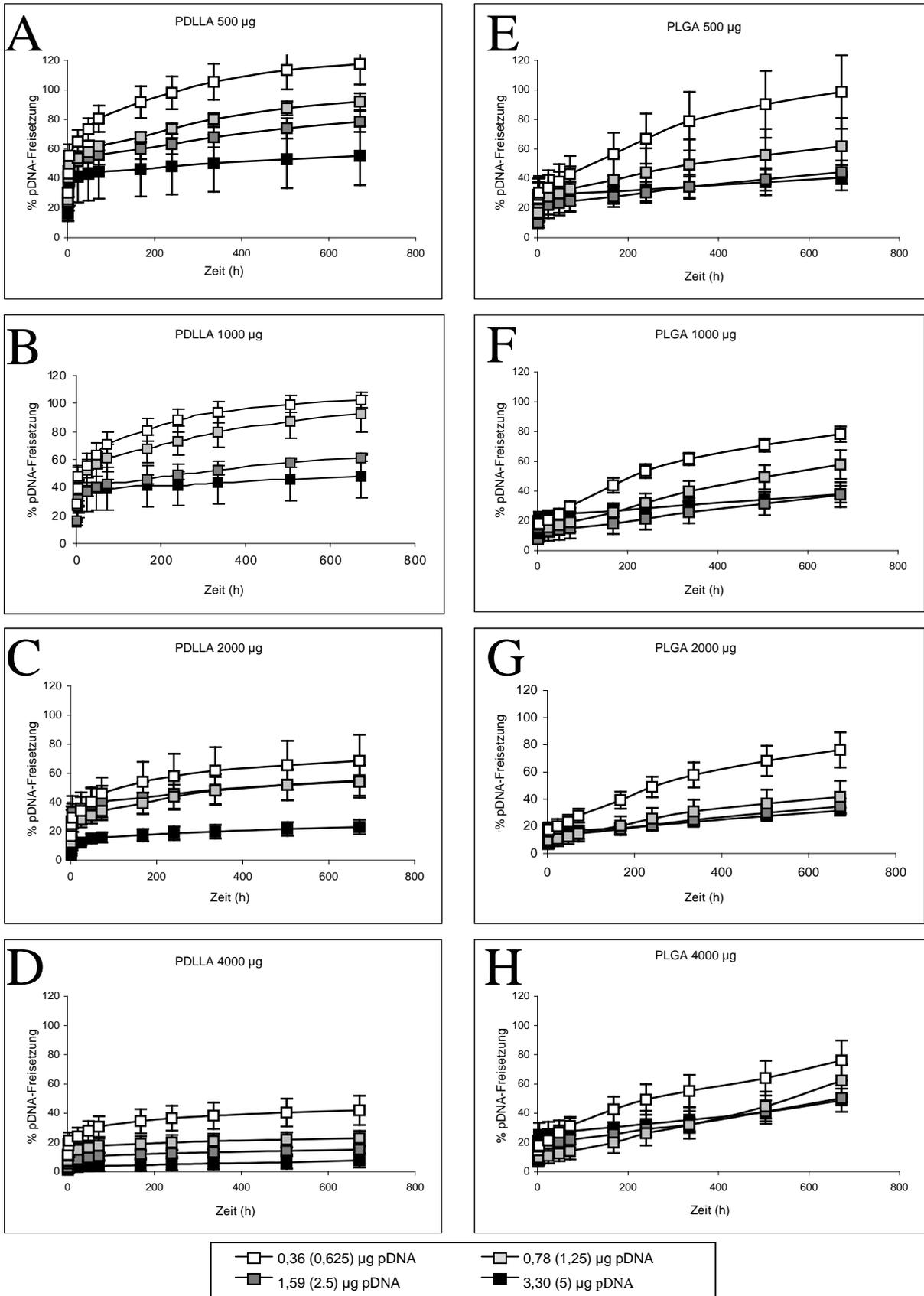


Abbildung 3.19 Kumulative Freisetzung von radioaktiv markierter pDNA aus PDLLA (A, B, C, D)- und PLGA (E, F, G, H)-Oberflächen

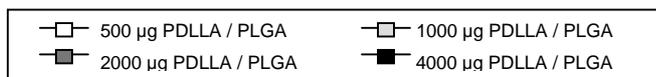
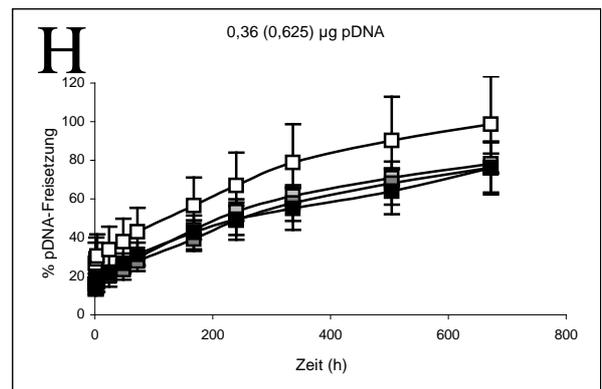
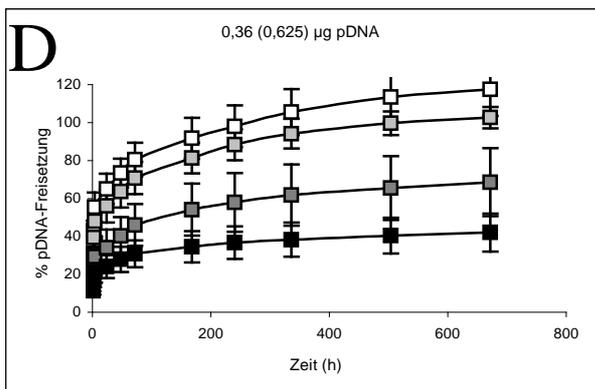
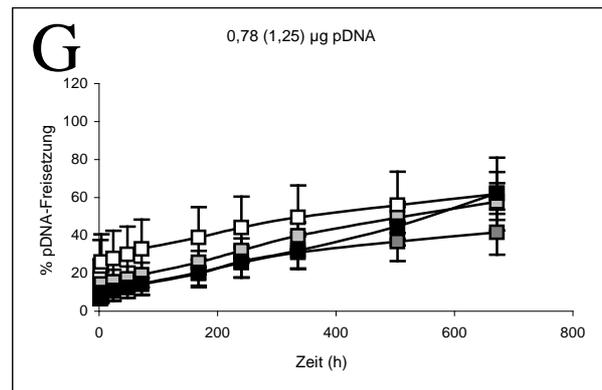
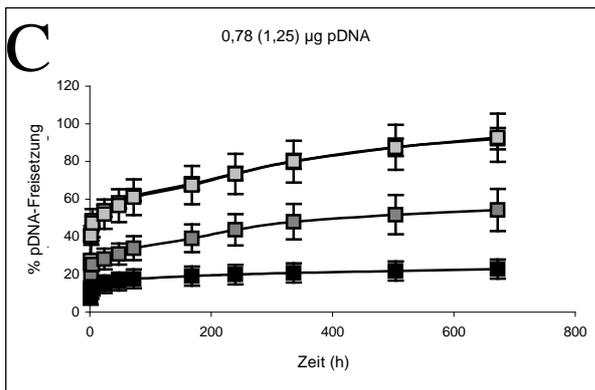
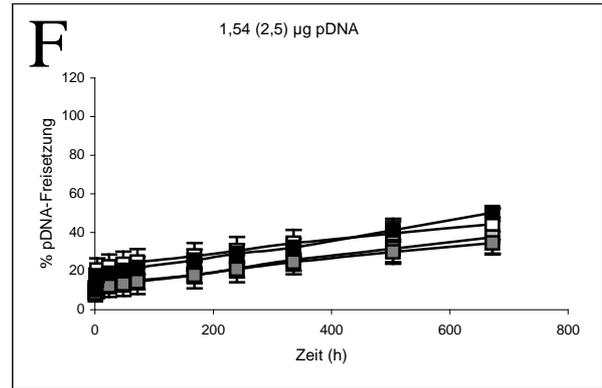
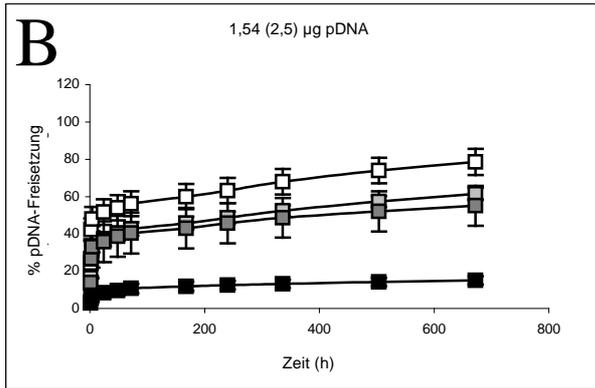
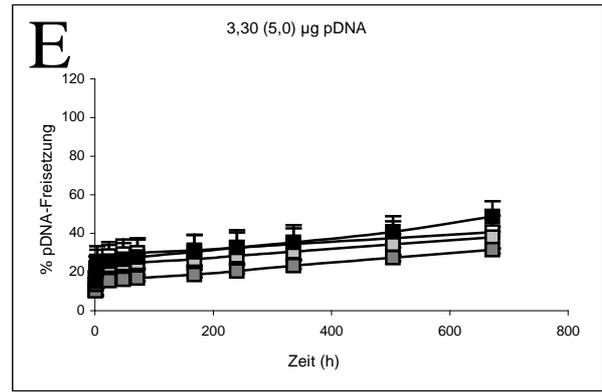
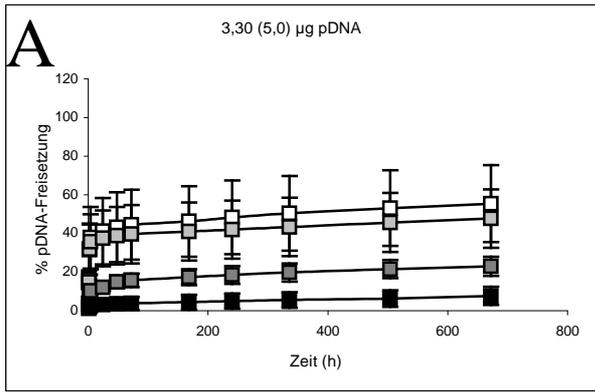


Abbildung 3.20 Kumulative Freisetzung von radioaktiv markierter pDNA aus PDLLA (A, B, C, D)- und PLGA (E, F, G, H)-Oberflächen

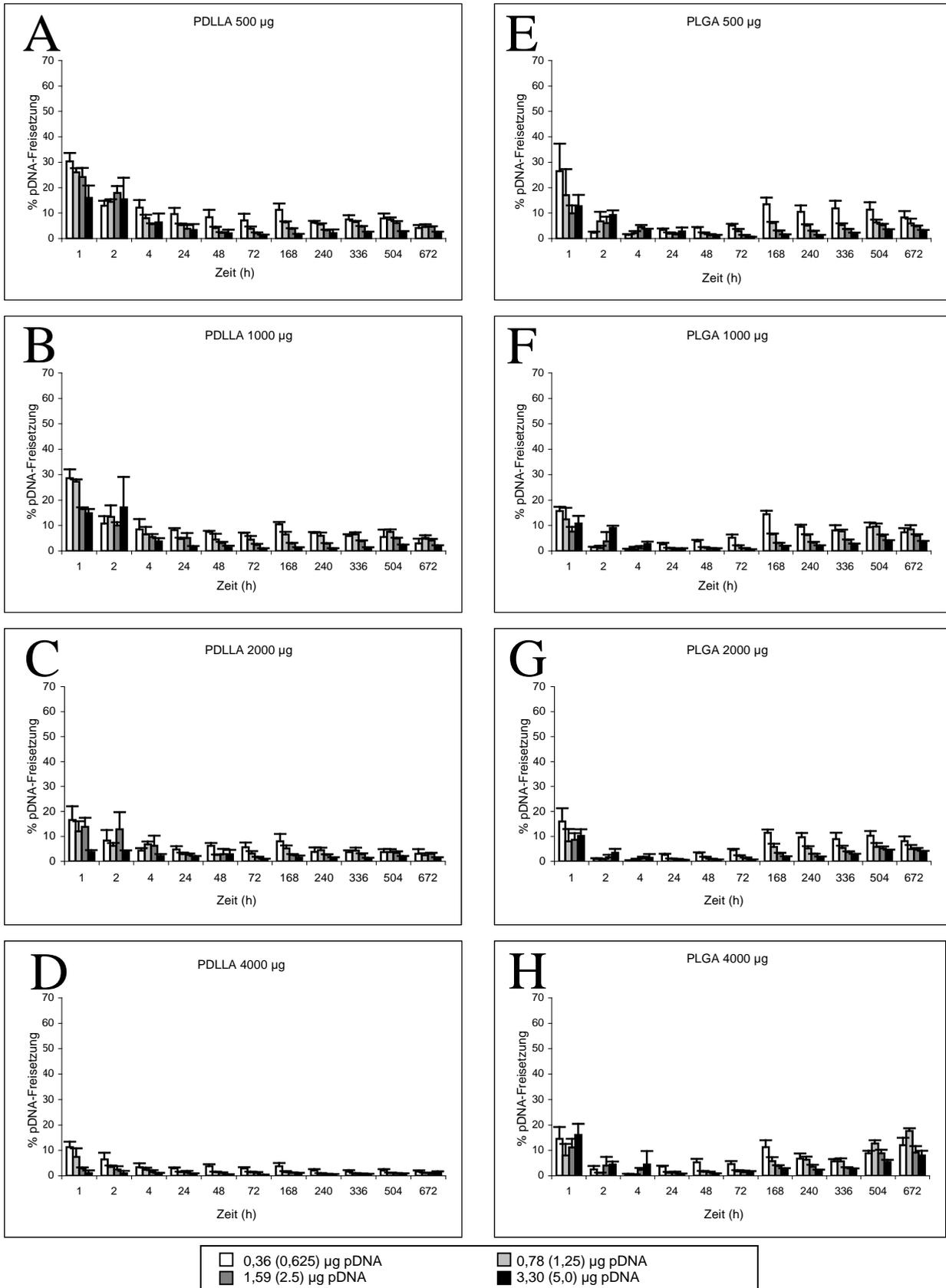


Abbildung 3.21 Freisetzung von radioaktiv markierter pDNA aus PDLLA (A, B, C, D)- und PLGA (E, F, G, H)-Oberflächen zu den einzelnen Messzeitpunkten.

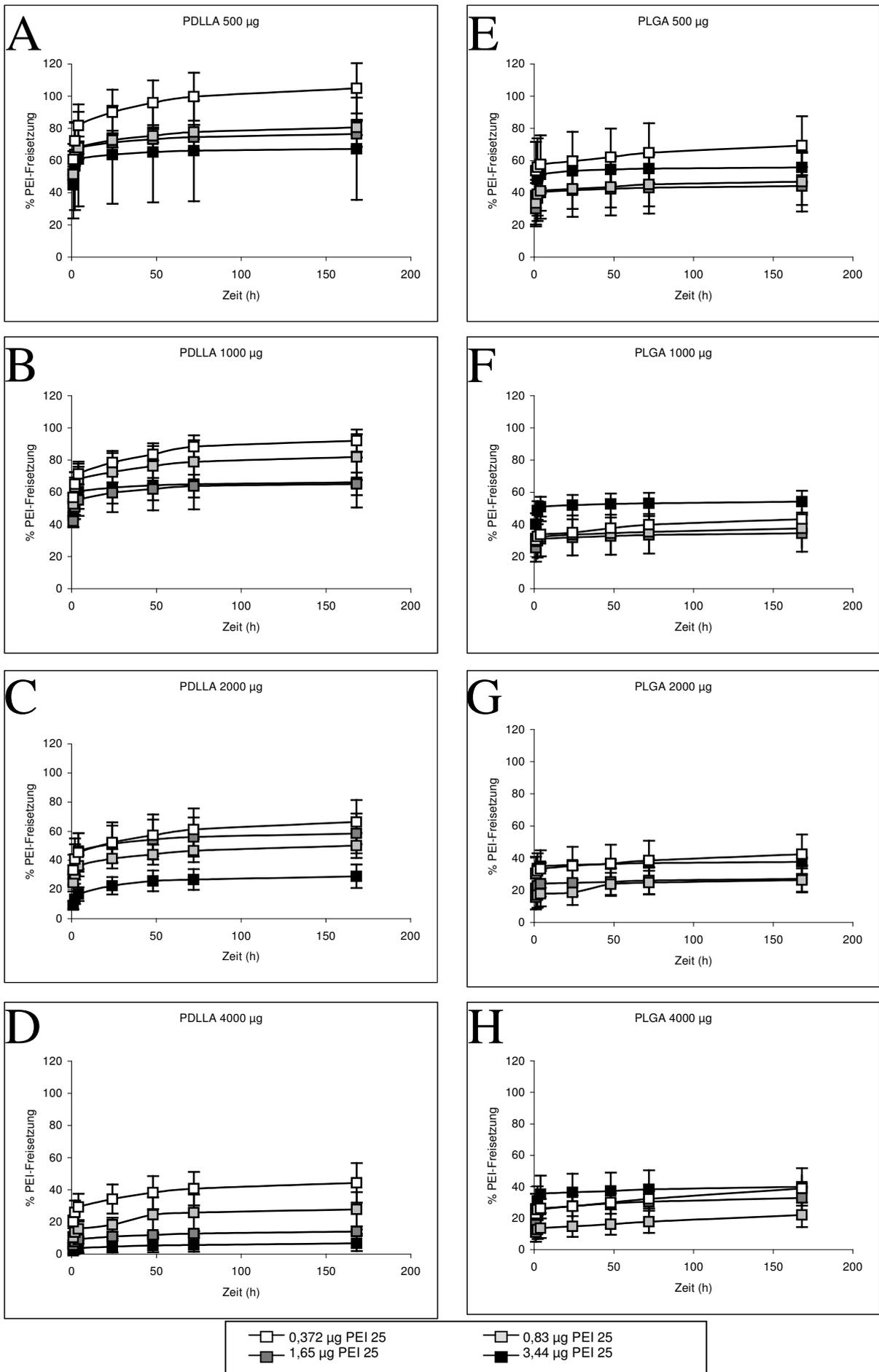


Abbildung 3.22 Kumulative Freisetzung von radioaktiv markierter PEI 25 aus PDLLA (A, B, C, D)- und PLGA (E, F, G, H)-Oberflächen

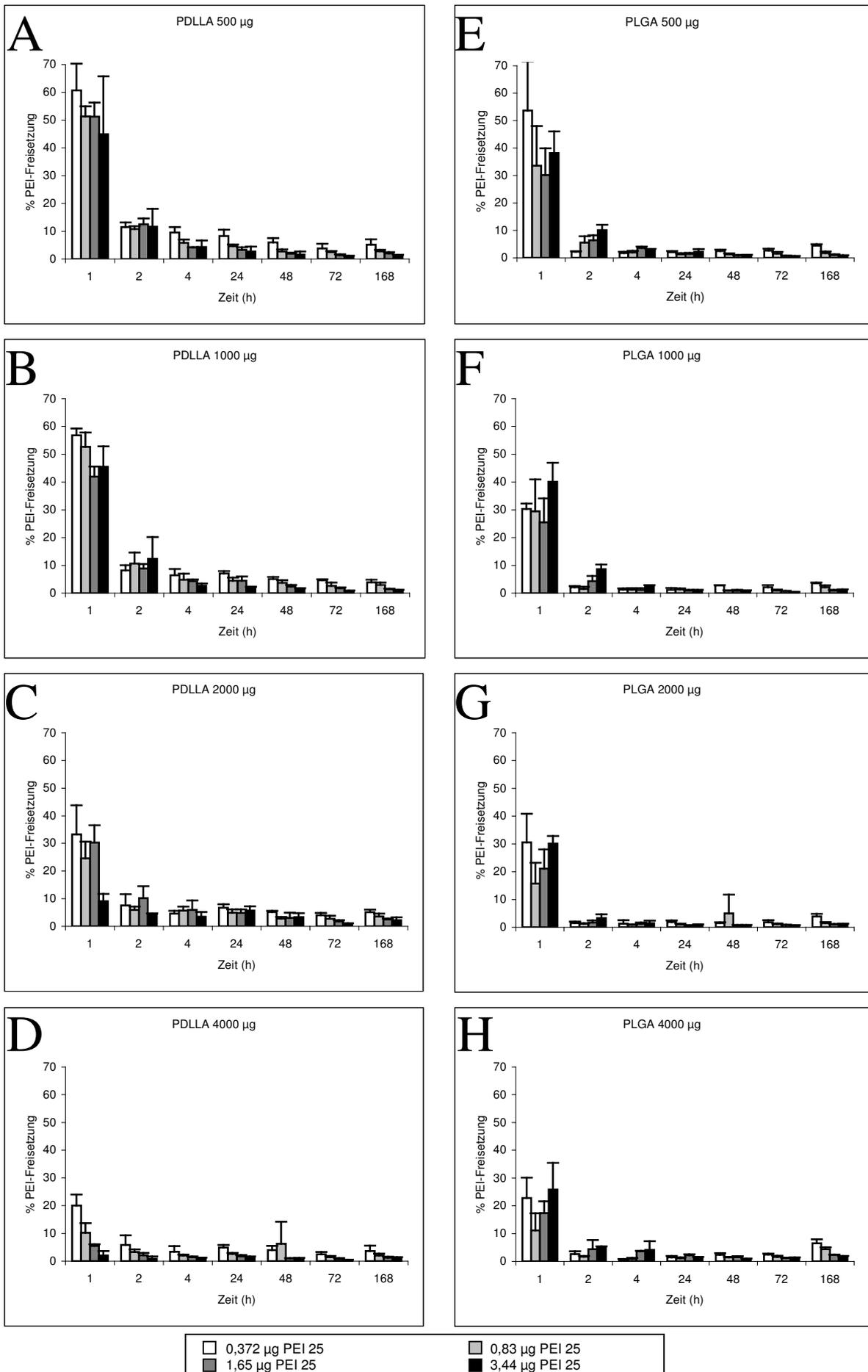


Abbildung 3.23 Freisetzung von radioaktiv markierter PEI 25 aus PDLLA (A, B, C, D)- und PLGA (E, F, G, H)-Oberflächen zu den einzelnen Messzeitpunkten.

4 Diskussion

Von je her ist es ein Traum der Menschen, den menschlichen Organismus zu entschlüsseln und die Geheimnisse seiner Funktionsweise zu lüften. Ob nun in der Genforschung versucht wird, die menschliche DNA zu entschlüsseln (Epping, B., 2008) oder im Bereich des *Tissue Engineering* Versuche unternommen werden, ganze Organe nachzubauen, das Ziel ist dasselbe. Andreas Hilfiker von der Hochschule Hannover formulierte es in einem Interview mit dem Spiegel folgendermaßen: „Tatsächlich wollen wir eine Maschine reparieren und neu zusammenbauen, die nicht wir gebaut haben und deren Bedienungsanleitung ebenfalls fehlt.“ (Blech, J., 2008, S.147).

4.1 Tissue Engineering

Tissue Engineering mit der zugrunde liegenden Idee, Organe im Reagenzglas heranzuzüchten, um so ein Ersatzteillager für den menschlichen Organismus zu schaffen, ist nach wie vor eine der innovativsten Richtungen in der modernen Medizin und beschäftigt immer wieder die aktuelle Medienberichterstattung (Fischman, J., 1999). Einer der durchschlagenden Erfolge war 1997 die „Ohrmaus“ von Dr. Charles Vacanti, welche ein neu gebildetes menschliches Ohr auf dem Rücken trug. Obwohl zur Heranzüchtung dieses Gebildes weder menschliche Zellen verwendet wurden, noch das Ohr die Funktion eines solchen erfüllte, ging das Foto um die ganze Welt und versetzte diese in Staunen. Dennoch steckt die heutige Entwicklung des *Tissue Engineering* immer noch in den Kinderschuhen. Da die Forschung zudem mit sehr hohen Kosten und die Isolierung entsprechender Stammzellen zur Organzüchtung mit sehr hohen Auflagen verbunden ist, hat man den heutigen Begriff des *Tissue Engineering* mit dem Term regenerative Medizin ausgeweitet. So definiert Williams *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“ (Williams, D.F., 2006, 4-8). Hierbei steht nicht der Aufbau ganzer Organe im Vordergrund, sondern die Stimulation körpereigener Zellen zur Selbstregeneration. Dabei kann man über entsprechende Mediatoren, zum Beispiel Wachstumsfaktoren oder entsprechende Gene, die Mechanismen der Wundheilung im Körper initiieren und stimulieren, sodass neue funktionsfähige Strukturen

von diesem selbst gebildet werden. Das zentrale Thema dieser Arbeit ist die körpereigene Produktion von Wachstumsfaktoren.

4.2 Beschichtung medizinischer Implantate

Implantate sind nach wie vor eine der wichtigsten Therapieoptionen in der Orthopädie und Unfallchirurgie. Dennoch bergen sie auch heute noch viele Risiken. Eine der häufigsten Komplikationen ist immer noch die erhöhte Infektionsrate. Die postoperative Infektion nach 3 Monaten liegt unter 1%. Implantatassoziierte Infekte sind mit 5% bedeutende unerwünschte Komplikationen, da es hierbei in der Regel notwendig ist, das Implantat vollständig zu entfernen. Dies kann ebenso notwendig sein, wenn das Implantat nicht richtig in den Knochen einwächst oder bei Lockerung. Als mögliche Ursache hierfür wird die schlechte Gewebeverträglichkeit des Materials diskutiert, eine dadurch verursachte Fremdkörperreaktion kann zu einer verzögerten Frakturheilung oder Lockerung führen. Bereits in zahlreichen Studien wurde versucht, diesen Komplikationen vorzubeugen. Neue Daten belegen, dass resorbierbare Beschichtungen, wie zum Beispiel das PDLLA, die Biokompatibilität des Implantates und somit die Frakturheilung begünstigen können (Schmidmaier, G., Raschke, M., 2001). Weiter hat man bereits erfolgreich versucht, das therapeutische Potential der Beschichtungen über den Einbau von Arzneistoffen sowie Wachstumsfaktoren nochmals zu steigern. Der klinische Einsatz von Gentamicin konnte die implantatassoziierte Infektionsrate deutlich senken (Lucke, M., et al., 2003). Die Formulierung einer PDLLA-Beschichtung mit Gentamicin ist zwischenzeitlich als Medizinprodukt zugelassen (Fa. Synthes GmbH & Co. KG, Umkirch, Deutschland). Mit dem Einbau von Wachstumsfaktoren konnte die Frakturheilung beschleunigt werden. Die Daten beziehen sich auf Wachstumsfaktoren wie IGF-I und TGF- β 1 (Schmidmaier, G., et al., 2004). Dabei konnte zum Einen die Frakturheilung durch eine beschleunigte Callusbildung, zum Anderen bei vorbestehenden Pseudoarthrosen die Heilungschance verbessert werden. Zudem konnte in weiteren histologisch gestützten Untersuchungen bewiesen werden, dass die Stimulation des Knochenwachstums über Wachstumsfaktoren keinerlei Veränderungen im Knochenaufbau bewirkt und somit nicht mutagen ist. Ein Problem bei der Anwendung dieses Verfahrens sind allerdings die sehr hohen Herstellungskosten. Unsere Arbeit soll ein alternatives und kostengünstigeres Verfahren aufzeigen.

4.3 Genaktivierte Biomaterialien

Genaktivierte Biomaterialien bestehen aus oder sind mit biokompatiblen sowie biodegradierbaren Polymeren beschichtet, die eingebautes Genmaterial enthalten, um dadurch bestimmte Funktionen im Körper anzuregen. Somit dienen diese Biomaterialien nicht nur als Aufbaumatrix und erfüllen bestimmte Stützfunktionen, sondern werden zu Trägern genetischen Materials. Dabei ist die Wahl der entsprechenden Transgene nahezu unbegrenzt, angepasst an die jeweilige Indikation. Zum Beispiel könnte dadurch die Bildung von Wachstumsfaktoren angeregt werden, was bei geeigneter Auswahl der Genvektoren eine kostengünstigere Alternative zu rekombinanten Wachstumsfaktoren bietet (s. Kap. 4.2). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Erstellung einer reproduzierbaren, kostengünstigen und leicht durchführbaren Technik zur lokalen Gentherapie mit dem Ziel der verbesserten Wundheilung. Die Entwicklung einer biodegradierbaren genaktivierten Polymerbeschichtung dient der lokalen Stimulation von Wachstumsfaktoren im Organismus wie zum Beispiel zur Förderung der Frakturheilung. Damit entspricht unsere Technik der modernen Definition des *Tissue Engineering* und stellt somit eine innovative und zukunftsorientierte neue Therapieoption dar.

4.3.1 Auswahl der Polymere

Bei der Wahl der Polymere hat man vor allem darauf geachtet, Polymere zu verwenden, die bereits ausreichend auf ihre Biokompatibilität hin getestet und im Körper abbaubar sind. Als Träger genetischen Materials können diese Polymere entscheidenden Einfluss auf den Transfektionserfolg ausüben. Dabei hat man sich zunächst für Formulierungen mit dem bereits in unserer Arbeitsgruppe bekannten und vielfach erprobten *poly (D,L-lactic acid)* (=PDLLA) entschieden. Dabei handelt es sich um ein aus der Familie der Milchsäurepolymere stammendes Polymer, das bereits vielfach Einzug in die moderne Medizin gefunden hat. Zum Beispiel wird es als bioresorbierbares Osteosynthesematerial in der Orthopädie verwendet (Athanasίου, K.A., et al., 1998) oder als Nahtanker für Bänder und Sehnen (Stähelin, A.C., et al., 1997). Zudem kann es als Gerüst zum Gewebeaufbau im Rahmen des *Tissue Engineerings* dienen, wie zur Regeneration von Knorpel (Gugula, Z., Gogolewski, S., 2000) oder Knochen und peripherer Nerven (Giardino, R., et al., 1999). Auch wurde es bereits zur verzögerten DNS-Freisetzung (Shea, L.D., et al., 1999) sowie als injizierbare Mikrosphären zur verlangsamten Wirkstofffreisetzung eingesetzt (Luo, D., et al., 1999). Die größte Verbreitung findet es jedoch als bioresorbierbares Nahtmaterial meist in

Kombination mit Polyglykolsäure. Dieses Copolymer, welches als *poly (lactic-co-glycolic acid)* (=PLGA) bekannt ist und sich im Vergleich zu PDLLA durch eine kürzere Halbwertszeit auszeichnet, wurde ebenfalls für unsere Versuche verwendet.

Als weitere Polymere dienten uns Poly-Desaminotyrosyl-Tyrosinethylester, im Speziellen das *poly (DTE-co-5% DT carbonate)* (=DTE5DT) und das *poly (DTE-co-30% DT carbonate)* (=DTE30DT). Diese Polymere gehören einer neuen Klasse biodegradierbarer Polymere an, die erst kürzlich Einzug in die Medizin gefunden haben. Sie zeichnen sich durch eine hervorragende Biokompatibilität aus (Choueka, J., et al., 1996), allerdings auch durch eine geringere mechanische Stabilität der Beschichtungen im Vergleich zu PDLLA (Gollwitzer, H., 2001).

4.3.2 Auswahl der Genvektoren

Hierbei entschied man sich für die Verwendung nicht-viraler Genvektoren. Zum Einen da unsere Arbeitsgruppe sich bereits lange mit dem nicht-viralen Gentransfer auseinandergesetzt und dabei viele positive Erfahrungen gesammelt hat, zum Anderen weil der nicht-virale Gentransfer viele Vorteile gegenüber den viralen Systemen bietet. Zum Einen werden weitaus weniger Immunreaktionen beobachtet, zum Anderen wird das entsprechende Gen nicht dauerhaft in das Genom eingebaut und kann somit nicht mutagen wirken. Auch sind nicht-virale Genvektoren flexibler und leichter zu handhaben, sowie kostengünstiger in der Herstellung. Dennoch sind mit dem nicht-viralen Gentransfer Komplikationen verbunden. Einer der limitierenden Faktoren beim *in vivo* Einsatz war bislang die ausgeprägte Interaktion der nicht-viralen Genvektoren mit Blutkomponenten wie dem Komplementsystem und Proteinen wie dem Albumin, welche oft thromboembolische Komplikationen nach sich zogen. Diese Komplikationen beruhen größtenteils auf der ausgeprägt positiven Ladung der Lipo- bzw. Polyplexe, wie es zum Beispiel auch bei den DNA-PEI-Komplexen der Fall ist. Dennoch ist Polyethylenimin (=PEI) nach wie vor eines der besten Reagenzien und stellt derzeit eine der effektivsten Trägersubstanzen für nicht-viralen Gentransfer dar (Boussif, O., et al., 1995). Über Einhüllung der DNA-PEI-Komplexe in ein schützendes PEG-Copolymer, konnten die oben genannten Nebenwirkungen massiv reduziert werden (Finsinger, D., et al., 2000). Die so neu entstandenen Copolymer-geschützten DNA-PEI-Komplexe werden auch als *Copolymer Protected Gene Vectors* (=COPROGs) bezeichnet. In Untersuchungen konnten durch COPROGs nicht nur die Fremdkörperreaktionen sowie die Toxizität gesenkt werden, auch sind diese Formulierungen stabiler. Die Transfektionsrate konnte sogar erhöht werden (Finsinger, D., et al., 2000). Somit erfüllen sie die optimalen Voraussetzungen für den Einsatz

als Genvektoren in unseren genaktivierten Polymerbeschichtungen. Es wurde hierbei das PEI 25 bei einer N/P-Ratio von 8 verwendet, da man damit in vorangehenden Untersuchungen die besten Ergebnisse bezogen auf die Toxizität erzielte. Als Copolymer diente das P6YE5C. Die für unsere Untersuchungen eingesetzten Modellplasmide waren pB-luc und pEGFP-N1.

4.3.3 Beschichtungstechnologie

Das Besondere an der in dieser Arbeit angewandten Beschichtungsmethode ist die Verwendung lyophilisierter Genvektoren. Bislang bestand das Problem, da Polymere nicht in Wasser lösbar sind, die wässrigen Genvektorformulierungen in die organische Polymerlösung einzuarbeiten. Bei der hier verwendeten Methode wurde die wässrige Genvektorformulierung zunächst schockgefroren und daraufhin über Nacht gefriergetrocknet. Danach konnte man das so entstandene COPROGs-Pulver in organischem Lösungsmittel dispergieren und problemfrei in die organische Polymerlösung integrieren. Die so entstandene Genvektor-Polymer-Suspension wurde zur Beschichtung weiterverarbeitet. Durch gezielte weitere Untersuchungen konnte bewiesen werden, dass COPROGs sowohl der Lyophilisation wie auch der Dispersion in organischen Lösungsmitteln unbeschädigt standhalten (s. dazu Kap. 3.2; Abb. 3.1). Das hierbei verwendete Lösungsmittel war je nach Polymer entweder Ethylacetat oder Chloroform mit Isopropanol. Man gab jedoch soweit möglich Ethylacetat den Vorzug, da es zum Einen von Natur aus eine deutlich geringere Toxizität verglichen mit Chloroform aufweist, zum Anderen die mittels Ethylacetat beschichteten Oberflächen signifikant stabilere Eigenschaften aufweisen (Gollwitzer, H., 2001). Weiter wurden nach Auftragen der Genvektor-Polymer-Suspension auf speziell lösungsmittelresistente Zellkulturplatten diese zunächst steril gelagert, damit das Lösungsmittel vollständig abdampfen konnte. Daraufhin wurden die so entstandenen genaktivierten Polymeroberflächen mit Zellen besiedelt, damit diese durch das entsprechende Transgen transfiziert werden konnten. Durch Variationen der Polymerart sowie des Lösungsmittels, aber auch der Polymer- bzw. COPROGs-Menge versuchte man die genaktivierten Beschichtungen zu optimieren, um die höchstmögliche Expressions-, Transfektions- sowie Freisetzungsrates bei niedrigster Toxizität für die Zellen zu erzielen. Zudem wurden Kontrollgruppen mit nackter DNA angefertigt, um den erheblichen Vorteil und die höhere Effizienz der COPROGs gegenüber dieser Formulierung aufzuzeigen.

4.4 Toxizität genaktivierter Polymerbeschichtungen

Um die Biokompatibilität genaktivierter Polymerbeschichtungen nochmals zu bestätigen, hat man das Ausmaß ihrer toxischen Wirkung auf die Zellen untersucht. Als Maß für die Toxizität galt hierbei die metabolische Aktivität der Zellen, die umso geringer ausfiel, je höher der toxische Einfluss war.

4.4.1 Einfluss des Lösungsmittels

Zunächst wurde der Einfluss des Lösungsmittels untersucht, wobei Beschichtungen aus PDLLA einmal mit Ethylacetat und einmal mit Chloroform/Isopropanol hergestellt wurden. Dabei zeigte sich, dass die Zellen auf der mit Chloroform/Isopropanol hergestellten Beschichtung, wie bereits erwartet, deutlich schlechter proliferierten als auf mit Ethylacetat präparierter Beschichtung (s. Abb. 3.2). Als man dagegen Beschichtungen aus DTE5DT sowie DTE30DT, hergestellt in Chloroform/Isopropanol, mit PDLLA-Beschichtungen, hergestellt mit Ethylacetat, verglich, zeigte sich keine negative Beeinflussung der Zellen durch das Lösungsmittel (s. Abb. 3.3). Dies könnte möglicherweise auf die höhere Biokompatibilität der Poly-Desaminotyrosyl-Tyrosinethylester zurückzuführen sein, die den negativen Einfluss des Restlösungsmittels überdeckt.

4.4.2 Einfluss der COPROGs

Als nächstes untersuchte man den Einfluss der Genvektoren auf die metabolische Aktivität der Zellen. Dabei arbeitete man drei verschiedene COPROGs-Konzentrationen jeweils in PDLLA-, DTE5DT- und DTE30DT-Beschichtungen ein und besiedelte diese mit Zellen. Das Ergebnis zeigte einen deutlichen Abfall der Aktivität bei steigender COPROGs-Menge. Am ausgeprägtesten war dieser Effekt bei der DTE30DT-Beschichtung zu beobachten. Bei der DTE5DT-Beschichtung konnte man dagegen keinen direkten Zusammenhang zwischen COPROGs-Menge und metabolischer Aktivität der Zellen erkennen (s. Abb. 3.7). Dies lässt den Schluss zu, dass bei dieser Art Beschichtung die Genvektoren so gut von dem Polymer ummantelt werden, dass diese nicht freigesetzt werden und keinen Einfluss auf die Zellen ausüben können.

4.5 Optimierung des COPROGs-Polymer-Verhältnisses

Bei diesem Experiment wurde versucht, durch Variation von Polymer- und COPROGs-Menge, ein ideales COPROGs-Polymer-Verhältnis zu bestimmen, um mit den genaktivierten Oberflächen eine möglichst effiziente Transfektion bei geringer Beeinträchtigung des Zellwachstums zu erzielen. Des Weiteren war das Ziel, die Zusammenhänge zwischen Toxizität, Expression, Transfektion und Freisetzung der Genvektoren aufzuzeigen.

4.5.1 Expression und metabolische Aktivität

Zunächst konnten wir beobachten, dass steigende COPROGs-Mengen bei gleichbleibender Polymermenge zu einem kontinuierlichen Anstieg der Expression führten. Dies jedoch nur zu einem bestimmten, von uns als Expressionsmaximum identifiziertem Punkt. Danach fiel die Expression wieder stetig ab. In Zusammenschau mit der Messung der metabolischen Aktivität der Zellen sah man, dass diese bis zu dem genannten Expressionsmaximum in Ihrer Proliferation völlig unbeeinträchtigt blieben, nach dem höchsten Punkt der Expression jedoch fiel auch die metabolische Aktivität. Allerdings konnte dieser Abfall mit einer Erhöhung der Polymermenge verzögert bzw. unterbunden werden. Eine Erhöhung der Polymer-Menge bei gleich bleibender COPROGs-Menge führte zwar nicht zu einem nochmaligen Expressionanstieg, doch zu einer geringeren Beeinflussung der Proliferation der Zellen. Dieser „Schutzeffekt“ war vor allem bei PDLLA sehr ausgeprägt zu beobachten. Beim Einsatz von PLGA konnte dieser Einfluss nur bei sehr hohen Mengen an PLGA nachvollzogen werden. Das Expressionsmaximum verschob sich bei Erhöhung der Polymermenge zu höheren COPROGs-Mengen hin. Allerdings waren die Expressionsmaxima bei geringeren Polymermengen und somit dünnerer Beschichtung deutlich höher.

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass eine hohe COPROGs-Konzentration eine toxische Wirkung auf die Zellen ausübt (vergl. Kap. 4.4.2). Diese toxische Wirkung kann aber durch eine Erhöhung der Polymermenge, wie des PDLLA, deutlich verringert werden und das Expressionsmaximum zu den höheren COPROGs-Mengen hin verschoben werden. Allerdings sind die Expressionsmaxima bei zu hoher Polymermenge und somit erhöhter Beschichtungsdicke deutlich geringer. Dies könnte darauf beruhen, dass die COPROGs bei geringeren Polymermengen und somit dünneren Beschichtungsdicken nicht eingemauert sind und an der Oberfläche liegen, wodurch eine größere Menge pDNA gleichzeitig freigesetzt werden kann (vergl. Kap. 4.5.3). Der beinahe fehlende „Schutzeffekt“ des PLGA könnte unter Umständen auf seiner schnelleren Resorbierbarkeit beruhen (Barbanti, S.H., et al., 2004;

Grayson, A.C., et al., 2004), sodass auch bei erhöhter Beschichtungsdicke die Zellen schneller hohen COPROGs-Mengen ausgesetzt werden. Das COPROGs-Polymer-Verhältnis, bei dem das Expressionsmaximum erreicht wurde, definierten wir als das Optimum.

4.5.2 Transfektionseffizienz

Über die Transfektionseffizienz kann keine reproduzierbare Aussage getroffen werden, da unsere Versuchsergebnisse bei den einzelnen Messreihen sehr unterschiedlich ausfielen. Dies könnte auf die sehr schwierige Versuchsdurchführung zurückzuführen sein, welche eine exakte Wiederholung der Bedingungen nahezu unmöglich macht. Dennoch konnten wir bestätigen, dass auch die Höhe der Transfektionseffizienz dem jeweiligen Expressionsmaximum entsprach. Das bedeutet, dass bei dem von uns als Optimum definiertem COPROGs-Polymer-Verhältnis auch die höchsten Transfektionsraten zu verzeichnen waren. Die höchste Transfektionsrate, die von uns gemessen wurde, betrug 23,55%. Dies ist im Vergleich zu den bisherigen Ergebnissen bei nicht-viralem Gentransfer als sehr hoch einzustufen.

4.5.3 Freisetzung

Zur Bestimmung der DNA-Freisetzung wurde sowohl diese wie auch das PEI radioaktiv markiert. Hierauf wurde über 4 Wochen zu bestimmten Messzeitpunkten die freigesetzte DNA sowie das freigesetzte PEI im Mediumüberstand bestimmt. Dabei konnte man zunächst bereits nach einer Stunde einen sehr hohen Anstieg der DNA-Freisetzung beobachten. Dieser Effekt wird auch als *initial burst* bezeichnet und ist bereits vielfach in der Literatur beschrieben worden (Wang, J., et al., 2002; Lee, J.W., et al., 2003; Luan, X., et al., 2006). Daraufhin konnte man einen prozentualen Abfall der Freisetzung, vor allem bei den PDLLA-Beschichtungen beobachten. Bei PLGA schien die Freisetzung zwar zunächst abzufallen, danach aber eher wieder weiter prozentual anzusteigen. Einen Grund hierfür könnte der schnellere Abbau dieses Polymers darstellen. Somit würden auch COPROGs aus den tieferen Polymerschichten schneller freigesetzt werden und dies wiederum einen weiteren Anstieg der prozentualen Freisetzung erklären. Des Weiteren zeigte sich, dass die Freisetzung der DNA umso höher war, je niedriger die zur Erstellung der Beschichtungen eingesetzte COPROGs- sowie Polymermenge. Dieser Effekt wurde vor allem bei den PDLLA-Beschichtungen beobachtet. Bei PLGA dagegen war die freigesetzte DNA-Menge nur bei der niedrigst eingesetzten COPROGs-Menge erhöht, sonst zeigte sich kein Einfluss der DNA- oder Polymermenge auf die Höhe der Freisetzung. Dieser beobachtete Effekt könnte ein Hinweis

dafür sein, dass bei höheren Polymermengen die COPROGs tiefer in die Beschichtung eingeschlossen sind, somit langsamer freigesetzt werden und damit die freigesetzte Initialkonzentration reduziert ist. Das wiederum lässt den Schluss zu, dass lediglich die sich an der Oberfläche befindenden COPROGs freigesetzt werden, dagegen die tiefer liegenden erst bei Abbau des Polymers zur Freisetzung an die Oberfläche gelangen. Bei steigender COPROGs-Menge könnte der Grund für eine Reduzierung der Freisetzung ein abweichendes Verteilungsmuster darstellen, sodass bei höheren COPROGs-Konzentrationen mehr COPROGs in den tieferen Schichten lagern und somit erst später zur Freisetzung bereitstehen. Der Grund dafür, dass man bei PLGA-Beschichtungen keine Reduzierung der Freisetzungsmenge durch Erhöhung der Polymer- oder COPROGs-Menge beobachten kann, könnte wiederum durch das unterschiedliche Hydrolyseverhalten, die ungleiche Resorptionsgeschwindigkeit sowie die abweichende Polymerstruktur erklärt werden (Barbanti, S.H., et al., 2004; Grayson, A.C., et al., 2004). Dadurch, dass PLGA schneller resorbiert wird, hat die gesteigerte Polymermenge auch keinen Einfluss auf die Freisetzung. Auch die erhöhte COPROGs-Menge und das somit veränderte Verteilungsmuster hat bei erniedrigter Resorptionszeit wohl keinen Einfluss auf die Freisetzung. Zudem könnte die unterschiedliche Polymerstruktur als Erklärung herangezogen werden. Die Tatsache, dass PLGA ein heterogenes Copolymer aus PLA und PGA darstellt, könnte zu einer poröseren Matrixstruktur dieses Polymers führen (Lu, L., et al., 1999; 2000), sodass die COPROGs gleichzeitig aus mehreren Schichten freigesetzt werden können. Das PDLLA dagegen, homogen aus Milchsäuremolekülen bestehend, scheint einem kontinuierlichen Resorptions- und somit auch DNA-Freisetzungsmuster zu folgen (Lu, L., et al., 2000; Tsuji, H., Ikarashi, K., 2004).

Des Weiteren haben wir bei unseren Messungen die Freisetzung des PEI im Vergleich zur Freisetzung der DNA aus den COPROGs beobachtet. Dabei zeigte sich, der DNA-Freisetzung entsprechend, ein anfänglicher Peak, welcher dem *initial burst*-Phänomen entspricht. In Zusammenschau der beiden Größen zeigte sich jedoch, dass die absolute Menge an freigesetztem PEI, die der DNA bei der ersten Messung bei Weitem überstieg. Bei den darauffolgenden Messungen war dies jedoch nicht mehr zu beobachten. Der anfängliche Überschuss kann ungebundenem, als Polykation vorliegendem PEI zugeordnet werden, was einem bekannten Phänomen bei der Genvektorformulierung nach Standardprotokoll entspricht (Boeckle, S., et al., 2004; Finsinger, D., et al., 2000). Somit kann angenommen werden, dass intakte COPROGs freigesetzt werden und nicht nur deren Einzelbestandteile.

4.6 Variation des Polymers

4.6.1 Formulierung der Oberflächen

Da auch die Poly-Desaminotyrosyl-Tyrosinethylester zu den biodegradierbaren Polymeren zählen und sich zudem durch sehr gute Biokompatibilität auszeichnen, hat man zwei deren Vertreter an unserem Modell untersucht. Dabei stellte sich zunächst das Problem, dass diese Polymere nicht in Ethylacetat lösbar sind. DTE5DT ließ sich daraufhin gut in Chloroform lösen, jedoch nicht DTE30DT. Für die Lösung dieses Polymers wurde eine andere Lösungsmittelmischung benötigt. Nach mehreren Versuchen konnte eine Lösungsmittelkombination gefunden werden, in der beide Polymere gut lösbar waren und Beschichtungen mit gleichmäßiger Oberfläche ohne Verklumpungen ergaben. Die hierbei verwendete Lösungsmittelkombination war Chloroform mit Isopropanol in einem Verhältnis von 19:1. Ein weiteres Problem stellte die geringere Löslichkeit der Poly-Desaminotyrosyl-Tyrosinethylester dar. Die mit diesen Polymeren erzielten Polymerkonzentrationen lagen deutlich unter denen von PDLA und PLGA. Somit waren auch die Versuchsbedingungen dieser unterschiedlichen Polymerklassen nur eingeschränkt miteinander vergleichbar.

4.6.2 Expression und metabolische Aktivität der Polytyrosincarbonate mit COPROGs

Die Messung der Expression ergab bei beiden Polymeren keine signifikanten Ergebnisse und ging gegen Null. Auch bei der Messung der metabolischen Aktivität konnte keinerlei Einfluss der genaktivierten Beschichtungen auf das Zellwachstum festgestellt werden. Sogar bei sehr hohen COPROGs-Mengen blieb die Zellproliferation unbeeinflusst. Dies lässt darauf schließen, dass diese Polymerklasse die COPROGs so gut ummantelt und in ihrer Struktur einschließt, dass sie keinerlei Einfluss auf die Zellen nehmen können. Dieses Ergebnis entspricht auf DTE5DT bezogen bereits unseren vorherigen Untersuchungen, jedoch nicht dem Ergebnis, welches wir bei DTE30DT beobachtet hatten (vergl. Kap. 4.4). Dies könnte damit erklärt werden, dass bei der früheren Messung, eine deutlich größere Menge an Polymer pro *Well* eingesetzt wurde. Somit könnte nach Abdampfen des Lösungsmittels ein anderes Polymergerüst entstanden sein, welches zwar mikroskopisch eine glatte Oberfläche bot, aber unter Umständen bei noch genauerer Untersuchung Verklumpungen oder Defekte aufweisen könnte, durch welche die COPROGs freigesetzt wurden und Einfluss auf die Zellen nehmen konnten. Da DTE5DT sowie DTE30DT eine längere Halbwertszeit gegenüber PDLA und PLGA besitzen, könnte die Freisetzung der COPROGs auch erst zu einem viel

späteren Zeitpunkt stattfinden und muss in einer entsprechenden Freisetzungsstudie genauer überprüft werden.

4.7 Kontrollgruppen

4.7.1 PDLLA mit Chloroform/Isopropanol

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen eine erhöhte Toxizität dieser Lösungsmittelkombination (vergl. Kap. 4.5). Um nun sicher zu stellen, dass nicht das Lösungsmittel die Ursache für die fehlende Expression bei den Poly-Desaminotyrosyl-Tyrosinethylestern darstellt, wurden Beschichtungen entsprechend unserem Versuchsmodell mit PDLLA gelöst in Chloroform/Isopropanol untersucht. Dabei konnte bei der Messung der metabolischen Aktivität dasselbe Toxizitätsmuster der COPROGs auf die Zellen beobachtet werden, wie es sich bei Beschichtungen mit PDLLA gelöst in Ethylacetat darstellte. Die Expressionsmessung zeigte dagegen eine Verschiebung des Expressionsmaximums zu höheren COPROGs-Mengen hin. Dies könnte auf eine veränderte Oberflächenbeschaffenheit der Beschichtungen unter dieser Lösungsmittelkombination hinweisen, zumal sich die Oberflächen auch mikroskopisch voneinander unterschieden (s. Abb. 3.2). Anzumerken ist, dass eine Veränderung der Struktur unter Chloroform bereits von Gollwitzer beschrieben wurde (Gollwitzer, H., 2001). Eine andere mögliche Erklärung wäre die Beeinflussung der COPROGs selbst durch das Lösungsmittel. Um dies zu klären müsste eine weitere Prüfung der Stabilität, wie im Kapitel 3.2 beschrieben, erfolgen.

4.7.2 Beschichtungen mit nackter DNA

Eine weitere Kontrollgruppe stellten unserem Modell entsprechende Formulierungen mit nackter DNA dar. Auch hier konnte keine Expression sowie keinerlei Beeinflussung der Zellen durch diese genaktivierten Beschichtungen gezeigt werden. Ursächlich dafür könnte entweder eine Beschädigung der DNA bei der Herstellung der Oberflächen sein, eine zu feste Ummauerung dieser durch das Polymer oder die geringere Transfektionseffizienz. Dadurch konnte jedoch eindeutig aufgezeigt werden, dass COPROGs nackter DNA in diesem Versuchsmodell weit überlegen sind.

4.8 Ausblick und Praxisrelevanz

Das von uns entwickelte Modell genaktivierter Polymerbeschichtungen entspricht derzeit nicht nur modernen Therapiekonzepten. Die Formulierung ist zudem einfach herstellbar, kostengünstig und bietet vielerlei Variationsmöglichkeiten. Man kann zum Einen über die Auswahl des entsprechenden Plasmids die Beschichtungen an die jeweiligen Anforderungen und Bedürfnisse der angestrebten Therapie anpassen. Die Auswahl des therapeutischen Plasmids ist nahezu unbeschränkt. Zum Anderen ist das Modell auch über die Variation des Polymers anpassungsfähig. Man kann zum Beispiel entscheiden, ob nur eine kurzzeitige Behandlung gewünscht ist und wählt dafür ein schnell resorbierbares Polymer oder ob eine Beeinflussung der Zellen über einen längeren Zeitraum benötigt wird, um dafür ein Polymer mit einer längeren Halbwertszeit einzusetzen. Allerdings ist das Modell, wie am Beispiel der Poly-Desaminotyrosyl-Tyrosinethylester sichtbar wurde, nicht uneingeschränkt auf alle Polymere übertragbar. Im Einzelnen müssen die Formulierungen individuell überprüft und für die jeweilige Therapie optimiert werden. Unsere Modellvorstellung entspricht einer innovativen Therapieoption und konnte bereits erfolgreich im Tiermodell eingesetzt werden. Die Arbeitsgruppe von PD Dr. G. Schmidmaier am Zentrum für Muskuloskeletale Chirurgie an der Charité Berlin konnte die genaktivierten Polymerbeschichtungen auf Folien aus Aluminiumlegierung sowie Kirschnerdrähte übertragen. Die eingesetzten Gene waren zum Einen das Reporter-gen Luciferase, zum Anderen das Gen des Wachstumsfaktors *bone morphogenic protein-2* (=BMP-2). PD Dr. A. Kolk verfolgte auf Folien aus Titan die Ergebnisse im Rahmen seiner Habilitationsschrift (Kolk, A., 2007) und testete den Einsatz genaktivierter PDLLA-Beschichtungen mit für BMP-2 kodierenden COPROGs im Vergleich zum rekombinanten Protein rh BMP-2. Dabei konnte tierexperimentell die Knochenneubildung bei *critical size* Mandibuladefekten in beiden Versuchsgruppen erfolgreich gefördert werden. Zwar war das durch rekombinantes Protein geförderte Knochenwachstum signifikant höher, doch kam es in dieser Gruppe zu einer unkontrollierten überschießenden Knochenneubildung, welche in der COPROGs-Gruppe nicht beobachtet wurde.

Somit bieten genaktivierte Polymerbeschichtungen mit COPROGs eine bessere, einfachere und kostengünstigere Alternative zur Beschleunigung der Frakturheilung mit rekombinanten Wachstumsfaktoren.

5 Zusammenfassung

Komplikationen bei der Frakturheilung, Lockerung orthopädischer Implantate und die damit verbundene Gefahr von Revisionseingriffen sind in der Orthopädie und Unfallchirurgie gefürchtete Komplikationen. Ein viel versprechendes neues Therapieverfahren zur Verbesserung der Knochenheilung ist der lokale Einsatz rekombinanter Wachstumsfaktoren wie BMP-2, IGF oder TGF- β 1. Da es sich hier um ein sehr aufwändiges und kostenintensives Verfahren handelt, wird in unserer Arbeitsgruppe an einer einfacheren und kostengünstigeren Alternative gearbeitet. Das Ziel ist die Entwicklung eines neuen lokalen gentherapeutischen Verfahrens für die Züchtung von Knochen entsprechend moderner Vorstellungen des *Tissue Engineering*, bei welchem die Zellen über für Wachstumsfaktoren kodierende Gene stimuliert werden. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Optimierung des bisher entwickelten Verfahrens und Testung der Effizienz des nicht-viralen gentherapeutischen Verfahrens.

Das vorliegende Modell basiert auf bioresorbierbaren und biokompatiblen Polymeren als Beschichtungsgrundlage, in die nicht-virale Genvektoren auf Basis der COPROGs, eingearbeitet wurden. Zur Formulierung dieser genaktivierten Polymeroberflächen wurden die Genvektoren zunächst schockgefroren, lyophilisiert, in organischem Lösungsmittel dispergiert und mit den in organischem Lösungsmittel gelösten Polymeren vermischt zur Beschichtung lösungsmittelresistenter Oberflächen eingesetzt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels konnten die beschichteten Oberflächen mit den eingearbeiteten Genen zur Transfektion mit Zellen besiedelt werden.

Über Variation der Polymer- sowie COPROGs-Menge wurde das System optimiert und dessen Einfluss auf die zu transfizierenden Zellen näher untersucht. Dabei konnte über Messungen der Expression, Transfektion sowie der metabolischen Aktivität ein optimales COPROGs-Polymer-Verhältnis identifiziert werden, mit hohen Transfektionsraten und geringen toxischen Einflüssen auf die Zellen. Weiter wurden über Radioaktivmarkierung der pDNA entsprechende Freisetzungskurven erstellt, um die Verfügbarkeit der COPROGs aus den genaktivierten Oberflächen zu charakterisieren. Dabei zeigte sich, dass sowohl die COPROGs- wie Polymermenge, aber auch die chemische Natur des Polymers das Freisetzungsverhalten beeinflusst.

Zur Optimierung unseres Modells wurden verschiedene degradierbare Polymere für Beschichtungen getestet. Geeignete Kandidaten sind PDLLA und PLGA mit unterschiedlichen Hydrolyse- sowie Resorptionseigenschaften mit der Möglichkeit zur individuellen Anpassung an die geforderten Therapiestrategien. Die gleichzeitig untersuchten

Polymere auf Basis von Poly-Deasaminotyrosyl-Tyrosinethylestern, DTE5DT und DTE30DT als Alternative, zeigten keine Genexpression.

Das erarbeitete Beschichtungsprinzip wurde bereits mit einem BMP2 Plasmid erfolgreich zur Beschichtung von Folien basierend auf einer Aluminiumlegierung, Kirschnerdrähten sowie Titanfolien eingesetzt und zeigte im Rattenmodell die Expression des Wachstumsfaktors BMP-2. Dabei konnte nicht nur das Knochenwachstum effektiv gefördert werden, auch war anhand der entstandenen Knochenstruktur im Vergleich zum Einsatz des rekombinanten Wachstumsfaktors eine physiologische Knochenheilung zu beobachten. Die erarbeiteten Daten zeigen eine neue reproduzierbare und kostengünstige Therapiestrategie, die sicherlich noch einer Feinabstimmung auf die individuellen Fragestellungen bedarf. Die Arbeiten werden fortgesetzt, um das innovative Konzept den rechtlichen Ansprüchen für die Medizin anzupassen.

6 Abkürzungsverzeichnis

BMP-2	bone morphogenic protein-2
BSA	Bovines Serum Albumin
COPROGs	Copolymer protected gene vectors
CMV	Cytomegalo-Virus
DNA	Desoxyribonucleic acid
DT	Desaminotyrosyl-L-tyrosine
DTE	Desaminotyrosyl-L-tyrosine ethylester
DTE5DT	poly (DTE-co-5% DT carbonate)
DTE30DT	poly (DTE-co-30% DT carbonate)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fötales Kälberserum
HCl	Salzsäure
I ¹²⁵	radioaktives Iod ¹²⁵
I ¹³¹	radioaktives Iod ¹³¹
IGF	insulin-like growth factor
KDa	Kilodalton
Luc	photinus pyralis luciferase
MLV	murine leukemia virus
N/P-Ratio	Molares Verhältnis positiv geladener PEI-Aminogruppen (N) und negativ geladener DNA-Phosphatgruppen (P)
P6YE5C	Co-Polymer aus PEG und YE5C
pB-luc	Plasmid kodierend für photinus pyralis luciferase unter Kontrolle des CMV-Promotors
PBS	phosphate-buffered saline
PDLLA	poly (D/L lactic acid)
PDNA	Plasmid-DNA
PEG	Polyethylen glycol

pEGFP-N1	Plasmid kodierend für enhanced green fluorescent protein unter Kontrolle des CMV-Promotors
PEI	Polyethylenimin
PEI 25	Verzweigtes PEI, 25 kDa
PGA	poly-glycolic acid
PI	Probidiumiodid
PLA	poly-lactic acid
PLGA	poly (D/L lactic-co-glycolic acid)
PLLA	poly (L-lactic acid)
RNA	ribonucleic acid
SCID-X1	severe combined immunodeficiency-X1
TGF-β1	transforming growth factor-β1
YE5C	Tyrosin(Y)/5x Glutaminsäure(E)/Cystein(C)-Peptid

7 Literaturverzeichnis

- Alba, R., Bosch, A., Chillon, M., *Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy*. Gene Ther., 12 Suppl 1 (2005), 18-27
- Anderson, J.M., *Biological Responses to Materials*. In: Annual Review of Materials Research, 31 (2001), 81–110
- Anderson, J.M., Gibbons, D.F., Martin, R.L., Hiltner, A., Woods, R., *The potential for poly-alpha-amino acids as biomaterials*. J Biomed Mater Res, 8 (1974), 197-207
- Anderson, J.M., Spilizewski, K.L., Hiltner, A., *Poly- α amino acids as biomedical polymers*. In: Biocompatibility of Tissue Analogs, Williams, D.F., ed CRC Press, Boca Raton, FL, (1985), 67-88
- Arigita, C., Zuidam, N.J., Crommelin, D.J., Hennik, W.E., *Association and dissociation characteristics of polymer/DNA complexes used for gene delivery*. Pharm Res, 16 (1999), 1534-1541
- Assessment of adenoviral vector safety and toxicity: report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee*. Hum Gene Ther, 13 (2002), 3-13
- Athanasίου, K.A., Agrawal, C.M., Barber, F.A., Burkhart, S.S., *Orthopedic applications for PLA-PGA biodegradable polymers*. Arthroscopy, 14 (1998), 726-737
- Baker, R.W., Lonsdale, H.K., *Controlled release: mechanism and rate*. Adv Exp Med Biol, 47 (1974), 15-71
- Barbanti, S.H., Santos, A.R. Jr., Zavaglia, C.A., Duek, E.A., *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, 15 (2004), 1315-1321
- Bettinger, T., Carlisle, R.C., Read, M.L., Ogris, M., Seymore, L.W., *Peptide mediated RNA delivery: a novel approach for enhanced transfection of primary and post-mitotic cells*. Nucleic Acids Res, 29 (2001), 3882-3891
- Bianco, P., Robey, P.G., *Stem cells in tissue engineering*. Nature, 414 (2001), 118-121
- Blech, J., *Elixir des Lebens*. Der Spiegel, 15 (2008), 146-148
- Blessing, T., Kursa, M., Holzhauser, R., Kircheis, R., Wagner, E., *Different strategies for formation of pegylated EGF-conjugated PEI/DNA complexes for targeted gene delivery*. Bioconj Chem, 12 (2001), 529-537
- Boeckle, S., von Gersdorff, K., van der Piepen, S., Culmsee, C., Wagner, E., Ogris, M., *Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer*. J Gene Med, 6 (2004), 1102-1111

Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J.P., *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 92 (1995), 7297-7301

Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. In: Anal. Biochem. 72 (1976), 248-254

Brunner, S., Sauer, T., Carotta, S., Cotton, M., Saltik, M., Wagner, E., *Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus*. Gene Ther, 7 (2000), 401-407

Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.L., Bousso, P., Deist, F.L., Fischer, A., *Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease*. Science, 288 (2000), 669-672

Choueka, J., Charvet, J.L., Koval, K.J., Alexander, H., James, K.S., Hooper, K.A., Kohn, J., *Caine bone response to tyrosine-derived polycarbonates and poly(L-lactic acid)*. J Biomed Mater Res, 31 (1996), 35-41

Clamme, J.P., Azoulay, J., Mely, Y., *Monitoring of the Formation and Dissociation of Polyethylenimine/DNA Complexes by Two Photon Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Biophys J, 84 (2003), 1960-1968

Conrad, C., Huss, R., *Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery*. J Surg Res, 124 (2005), 201-208

David, M., Andrew, M., *Venous thromboembolic complications in children*. J Pediatr, 123 (1993), 337-346

De Lalla, F., *Antimicrobial chemotherapy in the control of surgical infectious complications*. J Chemotherapy, 11 (1999), 440-445

Deppe, H., Stemberger, A., Hillemanns, M., *Effects of Osteopromotive and Anti-infective Membranes on Bone Regeneration: An Experimental Study in Rat Mandibular Defects*. The Int J Oral Maxillofac Implants, 18 (2003), 369-376

Diebold, S.S., Kurs, M., Wagner, E., Cotten, M., Zenke, M., *Mannose polyethylenimine conjugates for targeted DNA delivery into dendritic cells*. J Biol Chem, 274 (1999), 19087-19094

Duncan, R., Pratten, M.K., Lloyd, J.B., *Mechanism of polycation stimulation of pinocytosis*. Biochim Biophys Acta, 587 (1979), 463-475

Dunlap, D.D., Maggi, A., Soria, M.R., Monaco, L., *Nanosopic structure of DNA condensed for gene delivery*. Nucleic Acids Res, 25 (1997), 3095-30101

Eichman, J.D., Bielinska, A.U., Kukowska-Latallo, J.F., Donovan, B.W., Baker, J.R. Jr, *Bioapplications of PAMAM Dendrimers*. In: Dendrimers and Other Dendritic Polymers, Fréchet J.M.J., Tomalia D.A. (Hrsg.), J. Wiley & Sons Ltd. (2001)

Elek, S.D., Conen, P.E., *The virulence of Staphylococcus pyogenes for man: a study of the problems of wound infection*. Br J Exp Pathol, 38 (1957), 573-586

Epping, B., *Frankensteins Zeit ist gekommen*. Spiegel Online (2008), (<http://www.spiegel.de/wissenschaft/mensch/0,1518,596579,00.html>), Stand: 10.03.2009

Erbacher, P., Remy, J.S., Behr, J.P., *Gene transfer with synthetic virus-like particles via the integrin-mediated endocytosis pathway*. Gene Ther, 6 (1999), 138-145

Ertel, S.I., Kohn, J., *Evaluation of a series of tyrosine-derived polycarbonates for biomedical applications*. J Biomed Mater Res, 28 (1994), 919-930

Finsinger, D., Remy, J.S., Erbacher, P., Koch, C., Plank, C., *Protective copolymers for nonviral gene vectors: synthesis, vector characterization and application in gene delivery*. Gene Ther, 7 (2000), 1183-1192

Fischman, J., *How to Build a Body Part*. Time (1999), (<http://www.time.com/time/magazine/article/0,9171,990330,00.html>), Stand: 10.03.2009

Friedmann, T., Roblin, R., *Gene therapy for human genetic disease?* Science, 175 (1972), 949-955

Gene Therapy Clinical Trials Worldwide, Provided by the Journal of Gene Medicine (<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>), Stand: 24.02.2009

Giardino, R., Fini, M., Aldini, N.N., Giavaresi, G., Rocca, M., *Poly(lactide) bioabsorbable polymers for guided tissue regeneration*. J. Trauma: Injury, Infection and Critical Care. 47 (1999), 303-308

Glover, D.J., Lipps, H.J., Jans, D.A., *Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans*. Nat Rev Genet, 6 (2005), 299-310

Godbey, W.T., Wu, K.K., Mikos, A.G., *Poly(ethylenimin)-mediated gene delivery affects endothelial cell function and viability*. Biomaterials, 22 (2001), 471-480

Godbey, W.T., Wu, K.K., Mikos, A.G., *Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery*. Proc Natl Acad Sci U S A, 96 (1999), 5177-5181

Gollwitzer, H., *Eine resorbierbare Poly-D,L-Laktid Beschichtung zur Ausrüstung medizinischer Implantate: mit antithrombogenen Oberflächen in der Neonatologie und antiinfektiven Oberflächen in der Orthopädie*. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde der Medizinischen Fakultät der TU-München. 2001.

Gollwitzer, H., Ibrahim, K., Meyer, H., Mittelmeier, W., Busch, R., Stemberger, A., *Antibacterial poly (D,L-lactic acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology*. J Antimicrob Chemother, 51 (2003), 585-591

Grayson, A.C., Voskerician, G., Lynn, A., Anderson, J.M., Cima, M.J., Langer, R., *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, 15 (2004), 1281-1304

Griffith, L.G., Naughton, G., *Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities.* Science, 295 (2002), 1009-1014

Gugula, Z., Gogolewski, S., *In vitro growth and activity of primary chondrocytes on a resorbable polylactide three-dimensional scaffold.* J. Biomed. Mat. Res., 49 (2000), 183-191

Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M.P., Wulfraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C.S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, p., Cohen, J.I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L.E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbits, T.H., Le Deist, F., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M., *LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1.* Science, 302 (2003), 415-419

Heidemann, W., Jeschkeit, S., Ruffieux, K., Fischer, J.H., Wagner, M., Kruger, G., Wintermantel, E., Gerlach, K.L., *Degradation of poly(D,L)lactide implants with or without addition of calciumphosphates in vivo.* Biomaterials, 22 (2001), 2371-2381

Interdisziplinäre Arbeitsgruppe „Gentechnologiebericht“, Berlin-Brandenburgische Akademie der Wissenschaften (Hrsg.), *Gentherapie in Deutschland. Eine interdisziplinäre Bestandsaufnahme. Themenband des Gentechnologieberichtes. Zusammenfassung* (2008), (<http://www.dg-gt.de/docs/gtdeutschland.pdf>), Stand: 24.02.2009

James, K., Levene, H., Parsons, J.R., Kohn, J., *Small changes in polymer chemistry have a large effect on the bone-implant interface : evaluation of a series of degradable tyrosine-derived polycarbonates in bone defects.* Biomaterials, 20 (1999), 2203-2212

Kichler, A., Behr, J.P., Erbacher, P., *Polyethylenimines: A Family of Potent Polymers for Nucleic Acid Delivery.* In: Nonviral Vectors for Gene Delivery, Huang, L., Hung, M.C., Wagner, E., (Hrsg.), Academic Press, (1999).

Kim, S.W., *Nonthrombogenic treatments and strategies.* In: “Biomaterials Science”, Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E., (Hrsg.), Academic Press, San Diego-London-Boston-New York-Sydney-Tokyo-Toronto, (1996), 64-73

Kim, T., Kang, S.Y., Kang, J.H., Cho, M.Y., Kim, J.I., Kim, S.H., Kim, J.S., *Gene transfer into human hepatoma cells by receptor-associated protein/polylysine conjugates.* Bioconjug Chem, 15 (2004), 326-332

Kircheis, R., Wightman, L., Schreiber, A., Robitza, B., Rössler, V., Kursa, M., Wagner, E., *Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application.* Gene Ther, 8 (2001), 28-40

Kohn, J., Langer, R., *Bioresorbable and bioerodible materials.* In: „Biomaterials Science“, Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E. (Hrsg.), Academic Press, San Diego-London-Boston-New York-Sydney-Tokyo-Toronto, (1996), 64-73

- Kolk A., *Förderung des Knochenwachstums durch nicht-viralen BMP-2-Genstransfer aus PDLA-beschichteten Titanimplantatoberflächen – In Vitro und in Vivo Untersuchungen – im Vergleich zum rekombinanten Protein rh BMP-2*. Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi für das Fach Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie an der TU-München. 2007.
- Kopatz, I., Remy, J.S., Behr, J.P., *A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin*. J Gene Med, 6 (2004), 769-776
- Kramhoft, M., Bodtker, S., Carlsen, A., *Outcome of infected total knee arthroplasty*. J Arthroplasty, 9 (1994), 617-621
- Kreppel, F., Kochanek, S., *Long-term transgene expression in proliferating cells mediated by episomally maintained high-capacity adenovirus vectors*. J Virol, 78 (2004), 9-22
- Kunath, K., Merdan, T., Hegener, O., Häberlein, H., Kissel, T., *Integrin targeting using RGD-PEI conjugates for in vitro gene transfer*. J Gene Med, 5 (2003) 588-599
- Langer, R., Peppas, N.A., *Present and future applications of biomaterials in controlled delivery system*. Biomaterials, 2 (1981), 201-214
- Langer, R., Vacanti, J.P., *Tissue engineering*. Science, 260 (1993), 920-926
- LaVan, D.A., McGuire, T., Langer, R., *Small-scale systems for in vivo drug delivery*. Nat Biotechnol, 21 (2003), 1184-1191
- Lee, J.W., Gardella, J.A. Jr, Hicks, W. Jr, Hard, R., Bright, F.V., *Analysis of the initial burst of drug release coupled with polymer surface degradation*. Pharm Res, 20 (2003), 149-152
- Legendre, J.Y., Trzeciak, A., Bohrmann, B., Deuschle, U., Kitas, E., Supersaxo, A., *Dioleoylmelittin as a novel serum-insensitive reagent for efficient transfection of mammalian cells*. Bioconjug Chem, 8 (1997), 57-63
- Lendlein, A., *Polymere als Implantatwerkstoffe*. Chemie in unserer Zeit, 33 (1999), 279-295
- Leonetti, J.P., Degols, G., Lebleu, B., *Biological activity of oligonucleotide-poly(Llysine) conjugates: mechanism of cell uptake*. Bioconjug Chem, 1 (1990), 149-153
- Lersch, C., Paschalidis, M., Theiss, W., *Tiefe Venenthrombosen durch zentralvenöse Katheter*. Review VASA, 28 (1999), 71-78
- Luan, X., Skupin, M., Siepmann, J., Bodmeier, R., *Key parameters affecting the initial release (burst) and encapsulation efficiency of peptide-containing poly(lactide-co-glycolide) microparticles*. Int J Pharm, 2006, 324 (2006), 168-175
- Lucke, M., Schmidmaier, G., Sadoni, S., Wildemann, B., Schiller, R., Haas, N.P., Raschke, M., *Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats*. Bone, 32 (2003), 521-531
- Lukacs, G.L., Haggie, P., Seksek, O., Lechardeur, D., Freedman, N., Verkman, A.S., *Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus*. J Biol Chem, 275 (2000), 1625-1629

- Lu, L., Peter, S.J., Lyman, M.D., Lai, H.L., Leite, S.M., Tamada, J.A., Uyama, S., Vacanti, J.P., Langer, R., Mikos, A.G., *In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams*. *Biomaterials*, 21 (2000), 1837-1845
- Lu, L., Peter, S.J., Lyman, M.D., Lai, H.L., Leite, S.M., Tamada, J.A., Vacanti, J.P., *In vitro degradation of porous poly(L-lactic acid) foams*. *Biomaterials*, 21 (2000), 1595-1605
- Lu, L., Garcia, C.A., Mikos, A.G., *In vitro degradation of thin poly(DL-lactic-co-glycolic acid) films*. *J Biomed Mater Res*, 46 (1999), 236-244
- Luo, D., Saltzman, W.M., *Synthetic DNA delivery systems*. *Nat Biotechnol*, 18 (2000), 33-37
- Luo, D., Woodrow-Mumford, K., Belcheva, N., Saltzman, W.M., *Controlled DNA delivery systems*. *Pharm Res*, 16 (1999), 1300-1308
- Marshall, E., *Gene therapy death prompts review of adenovirus vector*. *Science*, 286 (1999), 2244-2245
- McConnell, M.J., Imperiale, M.J., *Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy*. *Hum Gene Ther*, 15 (2004), 1022-1033
- Medina-Kauwe, L.K., Xie, J., Hamm-Alvarez, S., *Intracellular trafficking of nonviral vectors*. *Gene Ther*, 12 (2005), 1734-1751
- Mehier-Humbert, S., Guy, R.H., *Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells*. *Adv Drug Deliv Rev*, 57 (2005), 733-753
- Metcalf, A.D., Ferguson, M.W., *Harnessing wound healing and regeneration for tissue engineering*. *Biochem Soc Trans*, 33 (2005), 413-417
- Mislick, K.A., Baldeschwieler, J.D., *Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (1996), 12349-12354
- Morsy, M.A., Gu, M., Motzel, S., Zhao, J., Lin, J., Su, Q., Allen, H., Franlin, L., Parks, R.J., Graham, F.L., Kochanek, S., Bett, A.J., Caskey, C.T., *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*, 95 (1998), 7866-7871
- Niidome, T., Huang, L., *Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors*. *Gene Ther*, 9 (2002), 1647-1652
- Ogris, M., Carlisle, R.C., Bettinger, T., Seymour, L.W., *Melittin enables efficient vesicular escape and enhanced nuclear access of nonviral gene delivery vectors*. *J Biol Chem*, 276 (2001), 47550-47555
- Pei, M., Seidel, J., Vunjak-Novakovic, G., Freed, L.E., *Growth factors for sequential cellular de- and re-differentiation in tissue engineering*. *Biochem Biophys Res Commun*, 294 (2002), 149-154
- Pierce, C.M., Wade, A., Mock, Q., *Heparin-bonded central venous lines reduce thrombotic and infective complications in critically ill children*. *Intensive Care Med*, 26 (2000), 967-972

- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Mooman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. *Science*, 284 (1999), 143-147
- Plank, C., Zatloukal, K., Cotton, M., Mechtler, K., Wagner, E., *Gene transfer into hepatocytes using asialoglycoprotein receptor mediated endocytosis of DNA complexed with an artificial tetra-antennary galactose ligand*. *Bioconj Chem*, 3 (1992), 533-539
- Pulapura, S., Kohn, J., *Tyrosine-Derived Polycarbonates: Backbone-Modified "Pseudo"-Poly(Amino Acids) Designed for Biomedical Applications*. *Biopolymers*, 32 (1992), 414-417
- Quantin, B., Perricaudet, L.D., Tajbakhsh, S., Mandel, J.L., *Adenovirus as an expression vector in muscle cells in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (1992), 2581-2584
- Rahaman, M.N., Mao, J.J., *Stem cell-based composite tissue constructs for regenerative medicine*. *Biotechnol Bioeng*, 91 (2005), 261-284
- Raper, S.E., Chirmule, N., Lee, F.S., Wivel, N.A., Bagg, A., Gao, G.P., Wilson, J.M., Batshaw, M.L., *Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer*. *Mol Gen Metab*, 80 (2003), 148-158
- Ratner, B., *Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine*. Elsevier, Amsterdam 2004
- Rosen, H., Aribat, T., *The rise and rise of drug delivery*. *Nat Rev Drug Discov*, 4 (2005), 381-385
- Schakenraad, J.M., Dijkstra, P.J., *Biokompatibility of Poly (DL-lactic acid/glycine) copolymers*. *Clin Mater*, 7 (1991) 253-269
- Schiedner, G., Hertel, S., Johnston, M., Dries, V., van Rooijen, N., Kochanek, S., *Selective depletion or blockade of Kupffer cells leads to enhanced and prolonged hepatic transgene expression using high-capacity adenoviral vectors*. *Mol Ther*, 7 (2003), 35-43
- Schmidmaier, G., Raschke, M., *Das Implantat als Arzneistoffträger: Lokal induzierte Knochenheilung*. *Biomaterialien*, 2 (2001), 106
- Schmidmaier, G., Wildemann, B., Ostapowicz, D., Kandziora, F., Stange, R., Haas, N.P., Raschke, M., *Long-term effects of local growth factor (IGF-I and TGF- β 1) treatment on fracture healing, A safety study for using growth factors*. *J Orthopaedic Res*, 22 (2004), 514-519
- Shea, L.D., Smiley, E., Bonadino, J., Mooney, D.J., *DNA delivery from polymer matrices for tissue engineering*. *Nat Biotechnol*, 17 (1999), 551-554
- Stähelin, A.C., Weiler, A., Rufenacht, H., Hoffmann, R., Geissmann, A., Feinstein, R., *Clinical degradation and biocompatibility of different bioabsorbable interference screws: a report of six cases*. *Arthroscopy*, 13 (1997), 238-244

Suh, J., Wirtz, D., Hanes, J., *Efficient active transport of gene nanocarriers to the cell nucleus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 100 (2003), 3878-3882

Tang, M.X., Szoka, F.C., *The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes*. Gene Ther, 4 (1997), 823-832

Tatum, E.L., *Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine*. Perspect Biol Med, 10 (1966), 19-32

Terebesi, J., Kwok, K. Y., Rice, K. G. *Iodinated plasmid DNA as a tool for studying gene delivery*. Anal. Biochem., 263 (1998), 120-123

Thomas, C.E., Ehrhardt, A., Kay, M.A., *Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy*. Nat Rev Genet, 4 (2003), 346-358

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 282 (1998), 1145-1147

Tsuji, H., Ikarashi, K., *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, 25 (2004), 5449-5455

Vacanti, J.P., Langer, R., *Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation*. Lancet, 354 Suppl 1 (1999), 32-34

Van Doren, K., Hanahan, D., Gluzman, Y., *Infection of eucaryotic cells by helperindependent recombinant adenoviruses: early region 1 is not obligatory for integration of viral DNA*. J Virol, 50 (1984), 606-614

Wagner, E., *Strategies to improve DNA polyplexes for in vivo gene transfer – will “artificial viruses” be the answer?* Pharm Res, 21 (2004), 8-14

Wang, J., Wang, B.M., Schwendeman, S.P., *Characterization of the initial burst release of a model peptide from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres*. J Control Release, 82 (2002), 289-307

Wang, R., Epstein, J., Charoenvit, Y., Baraceros, F.M., Rahardjo, N., Gay, T., Banania, J.G., Chattopadhyay, R., Richi, T.L., Tornieporth, N., Doolan, D.L., Kester, K.E., Heppner, D.G., Norman, J., Carucci, D.J., Cohen, J.D., Hoffman, S.L., *Induction in humans of CD8+ and CD4+ T cell and antibody responses by sequential immunization with malaria DNA and recombinant protein*. J Immunol, 172 (2004), 5561-5569

Wightman, L., Kircheis, R., Rossler, V., Carotta, S., Ruzicka, R., Kursa, M., Wagner, E., *Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo*. J Gene Med, 3 (2001), 362-372

Wildemann, B., Lübberstedt, M., Haas, N.P., Raschke, M., Schmidmaier, G., *IGF-I and TGF-beta 1 incorporated in a poly(D,L-lactide) implant coating maintain their activity over long-term storage – cell culture studies on primary human osteoblast-like cells.* Biomaterials, 25 (2004), 3639-3644

Williams, D.F., *To engineer is to create: the link between engineering and regeneration.* Trends Biotechnol, 24 (2006), 4-8

Xu, L., Pirollo, K.F., Tang, W.H., Rait, A., Chang, E.H., *Transferrin-liposome-mediated systemic p53 gene therapy in combination with radiation results in regression of human head and neck cancer xenografts.* Hum Gene Ther, 10 (1999), 2941-2952

Zanta, M.A., Boussif, O., Adib, A., Behr, J.P., *In vitro gene delivery to hepatocytes with galactosylated polyethylenimine.* Bioconjug Chem, 8 (1997), 839-844

Zuber, G., Dauty, E., Nthisen, M., Belguise, P., Behr, J.P., *Towards synthetic viruses.* Adv Drug Deliv Rev, 52 (2001), 245-253

8 Danksagung

Danken möchte ich Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher, dass ich meine Arbeit am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München durchführen durfte.

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Axel W. Stemberger, meinem Doktorvater, der mir diese Arbeit ermöglicht, mich immer wieder darin bekräftigt und mich mit unendlicher Geduld, seinem großen Wissensreichtum und vielen weisen Ratschlägen bis ans Ende geleitet hat.

Ein großer Dank gilt PD Dr. Christian Plank, für die wissenschaftliche sowie auch tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente. Ebenso danke ich Martin Kullmer für die Betreuung, gemeinsame Arbeit, Unterstützung sowie die vielen Erklärungen und Hilfestellungen, ohne welche diese Arbeit nie das heutige Ausmaß angenommen hätte.

Auch möchte ich Ursula Putz danken, die immer eine Zellkultur für mich bereitstehen hatte, Christian Koch für den unerschöpflichen Vorrat an P6YE5C sowie das kleine bisschen Arbeitsfläche und Burgl Hammerschmidt für die tatkräftige Unterstützung bei der FACS-Analyse.

Meinen Eltern, ganz besonders meiner Mutter, danke ich für die Unterstützung, ohne die weder mein Studium noch diese Arbeit möglich gewesen wären.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem besten Freund, Martin Keck, für die seelisch-moralische wie auch tatkräftige Unterstützung, für die Geduld und die guten Ratschläge wie für das Korrekturlesen und all die vielen kleinen und großen Hilfestellungen, immer wenn ich mal wieder an einem technischen Problem zu verzweifeln drohte.

Zuletzt auch ein Dank an meine Freunde und all diejenigen, die mich in dieser Zeit unterstützt und an mich geglaubt haben.

Danke!

9 Vorträge

M. Kullmer, B. Kersek, C. Plank, C. Koch, A. Stemberger

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, München, Deutschland

01 September 2005

B. Kersek, M. Kullmer, C. Plank, C. Koch, A. Stemberger

Einfluss resorbierbarer Polymere auf oberflächenvermittelten nicht-viralen Gentransfer

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V., Würzburg, Deutschland

07 Oktober 2005

10 Lebenslauf

Persönliche Informationen

- Name: Barbara Kersek
- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Geburtsdatum: 01.01.1980
- Geburtsort: Breslau

Ausbildung

1991 - 2000	König-Karlmann-Gymnasium <i>Abschluss: Abitur</i>	Altötting
2001 - 2003	Ludwig-Maximilians-Universität <i>Humanmedizin, vorklinischer Studienabschnitt</i> <i>Abschluss: ärztliche Vorprüfung</i>	München
2003 - 2007	Technische Universität <i>Humanmedizin, klinischer Studienabschnitt</i> <i>Abschluss: Staatsexamen nach neuer ÄAppO</i>	München

Praktika

Sep - Okt 2000	Kreiskrankenhaus <i>Pflegepraktikum</i>	Altötting
Feb - Mär 2002	„Szpital specjalistyczny im Ludwika Rydygiera“ <i>Allgemeinchirurgie</i>	Breslau

Famulaturen

Jul - Aug 2003	„Repatriation Hospital“ <i>Rehabilitation</i>	Adelaide
Sep - Okt 2003	Praxis Dr. med. Adam Konieczny <i>Gynäkologie</i>	Burghausen
Mär - Apr 2004	Klinikum Rechts der Isar <i>Viszeralchirurgie</i>	München
Aug - Sep 2004	„Akademia Medyczna im Piastow Slaskich“ <i>Gefäß- und Transplantationschirurgie</i>	Breslau
Sep - Okt 2004	Institut für Pathologie der TU <i>Pathologie</i>	München
März 2006	Klinikum Rechts der Isar <i>Gynäkologie und Geburtshilfe</i>	München

Praktisches Jahr

Aug - Okt 2006	„Pomorska Akademia Medyczna“ <i>Gynäkologie und Geburtshilfe</i>	Stettin
Okt - Dez 2006	Klinikum rechts der Isar <i>Gynäkologie und Geburtshilfe</i>	München
Dez - Feb 2007	„Hospital Clinico J.J. Aguirre“ <i>Chirurgie</i>	Santiago de Chile
Feb - Apr 2007	Klinikum rechts der Isar <i>Chirurgie</i>	München
Apr - Jul 2007	Rotkreuzklinikum <i>Innere Medizin</i>	München

Berufliche Tätigkeit

Seit Mai 2008	Donau-Ries-Klinik <i>Assistenzärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe</i>	Donauwörth
---------------	--	------------

Sprachkenntnisse

Polnisch, Englisch, Spanisch, Latein (großes Latinum)

München, den 18.05.2009