

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher)

Implantatbeschichtungen zur lokalen Gentherapie –
ein polymerbasiertes Controlled-Release-System zur Freisetzung nicht-viraler
Genvektoren

Valentin Riedl

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. Dr. A. Stemberger

2. Univ.- Prof.. Dr. K.-L. Laugwitz

Die Dissertation wurde am 30.12.2008 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die **Fakultät für Medizin** am 22.07.2009 angenommen.

1 Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	3
ZUSAMMENFASSUNG	4
1 EINLEITUNG	6
1.1 Nicht-virale Gentherapie	6
1.2 Controlled Release Systems (CRS)	9
1.3 CRS für die Gentherapie.....	15
1.4 Aufgabenstellung	17
2 MATERIAL & METHODEN	18
2.1 Zellkultur	18
2.2 Plasmid-DNA und Reportergene	19
2.3 Nicht-virale Genvektorkomplexe.....	20
2.4 Polymere für das Controlled-Release-System	22
2.5 Biomaterialien.....	23
2.6 Massenbestimmung	24
2.7 Mikroskopie	24
2.8 Gelelektrophorese	25
2.9 Einarbeiten von Genvektorkomplexen in Polymerlösungen.....	25
2.10 Beschichtungsverfahren	27
2.11 DNA Extraktion aus einer DNA-Polymerlösung.....	27
2.12 Bestimmung der Kinetik von Freisetzung und Transfektion	28
2.13 Darstellung der Transfektion mittels GFP.....	30
2.14 Datenauswertung	31
3 ERGEBNISSE	32
3.1 Herstellung einer Genvektor-Polymerbeschichtung	32
3.2 Beschichtung verschiedener Trägermaterialien.....	34
3.3 Physikalische und biologische Eigenschaften der Genvektor- Polymerbeschichtung	35
3.4 Transfektionsfähigkeit von Genvektor-Polymerbeschichtungen	40
3.5 Nachweis der Effektivität eines Controlled-Release-Systems für Genvektorkomplexe	43
4 DISKUSSION	50
Bibliographie	57
Wissenschaftlicher Werdegang	66
Danksagung	68

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

3T3	Mausfibroblastenstamm des National Institute of Health, USA
BMP	bone morphogenic protein
BDNF	brain derived neurotrophic factor
COPROG	Copolymer protected genvector
CRS	Controlled release system
DNA	Desoxyribonucleinacid
DOTAP	2,3-dioleyloxypropyltrimethylammonium chlorid
DTE05DT	synthetisches Polymer aus Desaminotyrosyl-L-Tyrosin-Ethylester (DTE) - und Desaminotyrosyl-L-Tyrosin (DT) Einheiten
FACS	fluorescent activated cell sorter
FGF	fibroblast growth factor
GAM	gen-activated matrix
GFP	green fluorescent protein
HSA	humanes Serumalbumin
I-125	radioaktiv markiertes Iod
IGF	insulin-like growth factor
Luc	Luciferase DNA
NIH	National Institute of Health, USA
PDGF	platelet derived growth factor
PEI	Polyethylenimin
PEG	Polyethylenglykol
PGA	Poly (glycolic acid)
PDLLA	Poly-D,L-(lactid acid)
PLGA	Poly (lactic-co-glycolic acid)
PP	Polypropylen
PROCOP	Protective Copolymers
PS	Polystyrol
PTH	parathyroid Hormon
R203	Resomer 203
SCID	severe combined immunodeficiency disorder
TGF	transforming growth factor
VEGF	vascular endothelial growth factor

ZUSAMMENFASSUNG

Die Wund- und Knochenheilung wird durch die Gabe von Wachstumsfaktoren gesteuert und erheblich beschleunigt. Trotz der erwiesenen Wirksamkeit verbleiben zwei Herausforderungen für die klinische Anwendung. Arzneimittel werden zum Großteil systemisch verabreicht und deren Wirkstoffe erreichen über Diffusion aus dem venösen System die Zielregion. Deshalb wird entweder das zu therapierende Gewebe unzureichend mit Arzneimitteln versorgt oder eine höhere Dosis führt zu unverhältnismäßig starker Belastung des Organismus. Eine weitere Herausforderung ist die Compliance des Patienten bei häufiger Verabreichung der Arzneimittel. Die fragile Molekülstruktur bedeutet eine komplexe Formulierung und anspruchsvolle Lagerung dieser Stoffklasse. Außerdem verstoffwechseln körpereigene Mechanismen die Proteinstruktur dieser Wirkstoffe sehr schnell, was die kurzen Wirkzeiten im menschlichen Organismus erklärt.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung und Charakterisierung eines genaktivierten Polymerfilms zur Beschichtung medizinischer Implantate. Mit einem derartigen Controlled-Release-System (CRS) werden therapeutische Gene mit Hilfe nicht-viraler Genvektoren temporär in Zellen eingeschleust und diese zur Produktion der Wirkstoffe angeregt. Vorteile dieser Methode sind die höhere Stabilität und gezielte Wirksamkeit der im Organismus produzierten Wirkstoffe.

Das Modell umfasst nicht-virale Genvektoren (COPROGs), die nach Lyophilisierung in einer Polymerlösung suspendiert werden. Zunächst werden verschiedene Implantatwerkstoffe und adäquate Beschichtungsverfahren evaluiert. Anschließend werden PDLLA und PLGA Polymere als Beschichtungsmedien getestet. Nach Auswahl beider Komponenten für das CRS wird ein genaktivierter Polymerfilm aus Poly-D,L-Laktid zur Beschichtung entwickelt und charakterisiert. Die eingearbeiteten DNA-Plasmide sind strukturell intakt und das genaktivierte CRS erweist sich als biokompatibel. Die Effektivität des Modells wird schließlich durch Variation der Polymer- und Genvektormenge optimiert. Bisherige Ansätze genaktivierter CRS beruhen auf der Freisetzung unkomplexierter, nackter DNA. Diese Studien verdeutlichen bereits die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der lokalen Genterapie, niedrige Transfektionsraten verhindern jedoch bislang den therapeutischen Einsatz. Die Freisetzungskinetik der hier beschriebenen, resorbierbaren Polymerbeschichtung entspricht dagegen den Anforderungen an ein effektives CRS mit initial hoher

Freisetzungsrates und anschließender Depotfunktion zur verlängerten therapeutischen Wirksamkeit. Zusätzlich erreichen die COPROGs erheblich bessere Transfektionsraten als vergleichbare Systeme. In der Umgebung der beschichteten Träger werden innerhalb 72 Stunden ca. 30% aller Zellen mit den Genvektoren transfiziert. Von diesen exprimieren ca. 75%, also insgesamt 20% aller Zellen, das gewünschte Protein.

Mit dem hier beschriebenen Ansatz wird das erste genaktivierte CRS zur Beschichtung medizinischer Implantate beschrieben, das bezüglich seiner Freisetzungskinetik und Transfektionseffizienz eine in-vivo Anwendung erlaubt. Erste Erfolge hierzu können zwischenzeitlich eindrucksvoll durch Daten der Arbeitsgruppe im Tiermodell belegt werden.

2 EINLEITUNG

2.1 Nicht-virale Gentherapie

Die Steuerung zellulärer Prozesse zur Prävention und Therapie von Krankheiten ist das gemeinsame Ziel vieler Ärzte und Wissenschaftler. Die somatische Gentherapie ist ein Verfahren, bei dem Gene für einen begrenzten Zeitraum in differenzierte Körperzellen eingeschleust werden um die Produktion eines Proteins zu steigern oder auch zu drosseln. Im Vergleich zur Gentherapie von Keimbahnzellen wird bei der somatischen Gentherapie das Erbgut nicht dauerhaft verändert und das therapeutische Gen wird mit der Erneuerung der behandelten Zellen wieder abgebaut. Für Erbkrankheiten wie zystische Fibrose und Hämophilie, aber auch für Tumor-, und Infektionskrankheiten werden vielversprechende Forschungsergebnisse berichtet [1, 41, 68, 89, 102]. Die ersten therapeutischen Anwendungen am Menschen waren ebenfalls erfolgreich. Seit 1990 werden mehrere Patienten mit der Immunschwächekrankheit SCID in klinischen Gentherapiestudien behandelt [9].

Für den Erfolg eines Gentherapieansatzes ist ein effizienter aber zugleich sicherer Transportmechanismus zum Einschleusen des genetischen Materials von größter Bedeutung [69, 117]. Für die beschriebene SCID-Therapie werden Viren als Genvektoren konstruiert und damit Leukozyten der Patienten außerhalb des Körpers, also *ex vivo*, transfiziert. Jedoch verursacht der virale Vektor in einigen Fällen starke immunologische Nebenwirkungen [85] und sogar leukämieähnliche Syndrome in den Jahren nach der Therapie [60, 94]. Obwohl mit Viren hohe Transfektionsraten erreicht werden, verhindert somit die mangelnde Sicherheit noch immer die breite Anwendung [101].

Nicht-virale Vektoren auf Lipid-, oder Polymerbasis sind eine vielversprechende Alternative zu Viren [45, 68, 102, 117]. Die damit erreichbare Transfektion ist geringer und nur vorübergehend, weshalb sie sich bisher nicht in der langwierigen Behandlung chronischer Krankheiten etablieren konnten: „*render nonviral-mediated gene transfer not particularly suitable for the treatment of pathological conditions that require long-term transgene expression...*“ (S.227) [102]. Der entscheidende Vorteil ist jedoch die bessere Steuerbarkeit und höhere Sicherheit nicht-viraler Genvektorkomplexe [3, 18, 24, 81]. Die physiochemischen Aspekte beider Systeme sind seit mehreren Jahren erforscht [18, 113] und ihre jeweiligen Vorzüge und Nachteile gut beschrieben [12, 134]. Beide Stoffklassen

interagieren elektrostatisch mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA und kondensieren diese so zu Gen-Vektor-Komplexen, oder kurz **Lipoplexen** bzw. **Polyplexen**. In der vorliegenden Arbeit werden die wichtigsten Vertreter beider Klassen verwendet.

Lipoplexe

Aufgrund ihrer einfachen Herstellungsweise, fehlender Immunogenität und der Kapazität, DNA von fast unbegrenzter Größe zu komplexieren, genießen kationische Liposom-DNA Komplexe hohe Beliebtheit in der Gentherapieforchung [27, 38, 129]. Bisher wurde eine Vielzahl von kationischen Lipiden mit unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften entwickelt [17]. Eines der am häufigsten verwendeten Lipide ist das kationische Lipid 2,3-dioleoyloxypropyltrimethylammonium chlorid (DOTAP). Die biophysikalischen, strukturellen und biologischen Mechanismen, die bei der Transfektion mit DNA-DOTAP Komplexen auftreten, sind äusserst genau beschrieben [114] und deshalb wird dieses Lipid auch in dieser Arbeit verwendet.

Polyplexe

Für den Großteil polymerbasierter Genvektorkomplexe wird das synthetische Poly(ethylenimin) (PEI) verwendet [11, 57, 70, 71]. PEI ist ein hoch kationisches Polymer, das in linearer oder verzweigter Form existiert. In Lösung mit DNA kondensiert es diese zu Komplexen, die von einer Vielzahl von Zelltypen leicht endozytiert werden [34]. Trotz dieser positiven Eigenschaften berichten einige Arbeiten von toxischen Reaktionen in vivo [29, 33]. Diese stehen in Zusammenhang mit der stark positiven Ladung der Komplexe, welche zu Aggregationen und Interaktionen mit Plasmaproteinen führen [88]. Deshalb werden die Komplexe mit ladungsneutralisierendem Poly(ethylenglykol) (PEG) konjugiert, was die toxischen Nebenwirkungen reduziert und zu höheren Transfektionsraten führt [88]. In der vorliegenden Arbeit wird ein verbessertes Copolymer, protective copolymer (PROCOP) auf Basis von PEG verwendet [28].

Nicht-virale Genvektorkomplexe sind aufgrund der sicheren und gut steuerbaren Anwendbarkeit für den kurzfristigen Einsatz, wie z.B. in der Immunotherapie infektiöser Erkrankungen oder der Wundheilung prädestiniert. Hier bietet sich neben dem ex vivo Ansatz auch eine direkte Anwendung im menschlichen Körper, also in vivo an [102]. In der Wund- und Knochenheilung würde eine zeitlich und räumlich begrenzte Gentherapie die chirurgische

und pharmazeutische Behandlung wirksam ergänzen. Denn Antibiotika und Wachstumsfaktoren erleichtern und beschleunigen die Heilung deutlich [22, 32, 36, 51, 61, 76, 93, 107]. Jedoch sind diese Arzneimittel relativ teuer herzustellen, schwer zu lagern und nur begrenzte Zeit haltbar. Die komplexe Molekülstruktur der Wirkstoffe ist im Milieu des Körpers sehr instabil und der Abbau durch Zellen des Immunsystems verkürzt die therapeutische Halbwertszeit noch weiter [21, 64, 92]. Eine fokale Applikation der Gene für diese Arzneimittel wäre also in vieler Hinsicht die bessere Methode. Die Herstellung, Lagerung und Qualitätskontrolle von Genvektoren ist günstiger und einfacher. Zusätzlich weisen körpereigene Proteine einen höheren therapeutischen Wirkungsgrad auf als synthetisch produzierte Arzneimittel (REFs) [47]. Nicht-virale Genvektoren schirmen körpereigene Immunzellen ab, erleichtern die Kopplung an die zu transfizierenden Körperzellen und schleusen das genetische Material in den Zellkern, das dort in die gewünschten Proteine übersetzt, also translatiert wird [3, 18, 24, 45, 68, 81, 102, 117].

Eine Herausforderung, sowohl in der Arzneimittel- als auch der Gentherapie, ist die gezielte Versorgung eines Gewebes mit Wirkstoff bei gleichzeitig geringer Belastung für den gesamten Organismus. Gerade in der Wund- und Knochenheilung werden Arzneimittel oft systemisch appliziert, obwohl die Wirkung nur in örtlich begrenztem Umfang notwendig wäre. Dies belastet einerseits den Metabolismus und reduziert aufgrund der Verstoffwechselung und des Verdünnungseffektes den Wirkungsgrad im Zielgebiet. **Controlled Release Systems (CRS)** sind Trägersysteme für Arzneimittel, die diese über einen kontrollierten Zeitraum im Zielgewebe freisetzen. Die Freisetzung eines effektiven Gen-Vektor-Komplexes aus einem CRS wäre eine ideale Kombination zur kurzfristigen, lokal hochdosierten Versorgung eines umschriebenen Gewebes mit Wirkstoffen, die vor Ort von körpereigenen Zellen produziert werden. CRS werden bereits seit Jahrzehnten zur Freisetzung niedermolekularer Arzneistoffe eingesetzt und werden in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal für nicht-virale Genvektorkomplexe erprobt.

2.2 Controlled Release Systems (CRS)

Controlled Release Systems (CRS) für die kontrollierte Applikation von Arzneistoffen werden seit mehreren Jahrzehnten entwickelt. Ein erstes Anwendungsfeld für bioresorbierbare CRS waren Verhütungsmittel für Frauen [2, 46, 133]: „Work is now progressing on erodible delivery systems which would allow the device to self-destruct after use. This could be applied to IUD [intra-uterin device] in underdeveloped countries where return of the patient for device removal cannot be assured“ (S.668) [5]. CRS werden auch zur Behandlung von Betäubungsmittelabhängigkeit erforscht [111, 119, 132]. Bei dieser ersten Generation von CRS handelte es sich meist um Mikrokapseln. Mittlerweile findet man CRS in Ausführungen jeglicher Größe, von Nanopartikeln bis zu zentimetergroßen Pumpen [65, 84]. Die verwendeten Materialien sind natürlichen oder synthetischen Ursprungs und bleiben nach Applikation im Körper entweder stabil oder werden vollständig abgebaut. Je nach Zusammensetzung und Aufbau des Trägers ist eine Freisetzung über mehrere Monate mit verschiedensten Freisetzungskinetiken möglich.

2.2.1 Vor- und Nachteile von CRS gegenüber einer systemischen Arzneimittelgabe

Im Gegensatz zur systemischen Therapie haben CRS zahlreiche **Vorteile** [45, 54, 84, 117]. Bei der systemischen Gabe eines Wirkstoffes tritt aufgrund der Verteilung im gesamten Organismus ein hoher Verdünnungseffekt auf. Meist wird die Therapie jedoch für ein spezifisches Organ oder umschriebenes Gewebe angedacht. Somit muß zwischen geringer lokaler Konzentration und steigender Gefahr von systemischen Nebenwirkungen bei höherer Dosis abgewogen werden. Mittels eines lokal eingesetzten CRS wird dieser Nachteil behoben, da freigesetzte Wirkstoffe nur in der Umgebung des CRS wirksam sind. Dies erlaubt lokal höhere Konzentrationen, ohne den gesamten Organismus zu belasten. Umgekehrt können schlecht durchblutete Gewebe wie z.B. Knochen mit systemischen Ansätzen nur mangelhaft therapiert werden. Hierfür sind örtlich eingesetzte Drug-Depots prädestiniert, da der Wirkstoff nur langsam aus dem Gewebe abtransportiert wird.

Ein weiteres Problem systemischer Applikationsformen sind stark schwankende Plasmaspiegel. Nach i.v.-Verabreichung können Konzentrationsspitzen zu Nebenwirkungen führen, während nach Abklingen des initialen Bolus in den sogenannten *through levels* die Wirkung wegen zu geringer Konzentration ausbleibt. Selbst regelmäßige Gaben garantieren deshalb nur für begrenzte Zeit ein therapeutisch wirksames Zeitfenster. Bei Verwendung

eines CRS werden diese Probleme vermieden. Das System bedarf einer einmaligen Intervention zur Plazierung des Trägers und steigert so die Compliance des Patienten durch den Wegfall wiederholter Einnahmen. Außerdem werden aufgrund der Kinetik eines CRS kontinuierlich Plasmalevel auf wirksamen Niveau gewährleistet [65, 84, 131].

Schliesslich haben viele Wirkstoffe im Organismus eine begrenzte Lebensdauer. Sie werden von Zellen des Immunsystems phagozytiert oder durch Enzyme inaktiviert und erfordern deshalb regelmäßige Auffrischungen. Die mangelnde Stabilität mancher Wirkstoffe ist eine Herausforderung und das entscheidende Kriterium für die Entwicklung von CRS für Genvektorkomplexe. Durch Applikation der für den Wirkstoff kodierenden Gene wird dieser im Organismus an der richtigen Stelle *just in time* produziert, wodurch sich die Verfügbarkeit des Wirkstoffes verlängert.

CRS dienen jedoch nicht allein als Reservoir für Arzneistoffe, sondern können zusätzlich die Heilung des geschädigten Gewebes verbessern. In der regenerativen Medizin erfüllen dreidimensionale, im Organismus abbaubare Träger Stütz- und Leitfunktion für Zellen bei der Wundheilung, wie z.B. nach Knochenbrüchen. Als abbaubare Träger haben sich Kollagen, Fibrin(ogen) und Hyaluronsäure bewährt. Diese tissue engineering Implantate sind nicht nur biokompatibel, sondern zusätzlich bioaktiv und verbessern aufgrund ihrer Matrixstruktur Zellmigration und –adhäsion [45, 54, 117].

Trotz der überwiegenden Vorteile der Controlled Release Systeme gegenüber einer systemischen Therapie sind einige **Nachteile** zu berücksichtigen. Bereits während des Herstellungsprozesses eines CRS kann die Struktur des einzubringenden Wirkstoffes beschädigt werden. Aufgrund ihrer komplexen, dreidimensionalen Faltung sind Proteine bei Kontakt mit organischen Lösungsmitteln besonders anfällig [31]. DNA ist hier robuster, da allein die Nukleinsäureabfolge über die Wirksamkeit entscheidet. Intakte Plasmid-DNA liegt in der supercoiled Konformation vor. Eine gelockerte oder linear Form ist hingegen Ausdruck einer Schädigung der DNA, die durch Scherkräfte, Kontakt mit Lösungsmitteln und in saurer Umgebung auftreten kann [7, 40, 122]. Die Kondensierung der DNA durch Bildung von kationischen Polyplexen wirkt hier protektiv. Die Belastungen während der weiteren Verarbeitung zu Genvektorkomplexen und in Hinblick auf das endosomale, saure Milieu nach Aufbruch der Mikropartikeln werden hierdurch reduziert [16].

Nach Verabreichung des CRS muss die Integrität des Trägers gewährleistet bleiben, um einer Überdosierung mit dem Wirkstoff vorzubeugen. Diese Gefahr tritt jedoch nur bei Reservoirsystemen der ersten Generation auf, die den gesamten Wirkstoff allein mit einer

einfachen Membran umschlossen halten und diesen bei Zerreißen der Membran freisetzen würden.

Ein CRS kann nicht oral verabreicht werden, sondern wird mit Hilfe einer chirurgische Intervention oder mittels Kanüle appliziert. Dies kann mit allen möglichen Komplikationen eines chirurgischen Eingriffes und Schmerzen an der Implantatstelle einhergehen.

Nach Einbringung von CRS in den Körper muß mit immunogenen und toxischen Reaktionen gerechnet werden. Diese konnten bei synthetischen, bioabbaubaren Polymersystemen erheblich reduziert werden, da der Anwendung am Menschen eine umfassende Biokompatibilitätsprüfung gemäß geltenden ISO/DIN Vorschriften voraus geht. Zusätzlich werden bei bioabbaubaren CRS alle Abbauprodukte auf Reaktionen im Organismus überprüft.

2.2.2 CRS aus Polymer

In der Biomedizin kommen Polymere seit den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts zum Einsatz. 1970 wurde das erste resorbierbare Nahtmaterial Dexon® zugelassen, das im Körper durch hydrolytische Spaltung der Polyglykolsäure vollständig verstoffwechselt wird [30, 110]. Seit dieser Zeit werden resorbierbare Polymere in verschiedenen chirurgischen Fachgebieten als Naht- und Verbandsmaterial, als Rekonstruktionsmaterial für Bänder, Trachea und Gefäße, sowie als Schrauben oder Platten bei Knochenreparaturen verwendet [74, 130]. In der Arzneimitteltherapie werden Polymere als CRS für Wirkstoffe eingesetzt. In der Regenerativen Medizin dienen sie als konduktive, die einwachsenden Zellen leitende Strukturen oder als induktive Träger, die zusätzlich regenerationsfördernde Stoffe freisetzen.

Nach geltenden DIN/ISO-Normen für Biomaterialien muß ein neuentwickeltes Polymer mehrere toxikologische und immunologische Tests bestehen, bevor es als biokompatibel eingestuft wird [14, 15, 26, 66, 112]: Ein nicht resorbierbares Implantat respektive Polymer muß im Kontakt mit Körperflüssigkeiten mechanisch und chemisch stabil sowie hypoallergisch sein und darf weder karzinogene noch toxische Wirkung entfalten. Für biologisch abbaubare Polymere bedeutet das zusätzlich, dass alle entstehenden Abbauprodukte die o.g. Bedingungen erfüllen und verstoffwechselt werden müssen [44]. Außerdem muß der Träger mit gleichbleibenden physikochemischen Eigenschaften synthetisierbar sein [98].

Als Biomaterialien kommen sowohl natürlich auftretende als auch synthetisch hergestellte Polymere zum Einsatz [52]. Zu den natürlichen Polymeren zählen z.B. humanes

Serumalbumin (HSA), Fibrinogen, Kollagen und Gelatine. Zur Gruppe der synthetischen Polymere rechnet man Poly(amide), Poly(aminosäuren), Poly(alkyl- α -cyano-acrylate), Poly(ester), Poly(orthoester), Poly(urethane), Poly(acrylamide). Unter diesen genießen die bioabbaubaren aliphatischen Poly(ester) Poly(laktidsäure) (PLA), Poly(glykolsäure) (PGA) und Copolymere dieser beiden (PLGA) das höchste Interesse für die Entwicklung von CRS [4, 6, 19, 23, 42-44, 53, 58, 74, 121, 130, 135]. Das Polymer PLA existiert in optisch aktiver Form (L- bzw. D-PLA) und als optisch inaktives Racemat (D,L-PLA) [53, 74]. Aufgrund der regulären Struktur ist L-PLA semikristallin, während D,L-PLA wegen Irregularitäten in seiner Kettenstruktur ein amorphes Polymer ist. Letzteres erlaubt eine homogenere Verteilung von Medikamenten in der Polymermatrix und ist deshalb zu bevorzugen. PGA dagegen ist hoch kristallin, da ihm die Methyl-Seitengruppen des PLA fehlen [19, 53, 130]. Die Resorptionsdauer von Poly(D,L)-Testkörpern beträgt nach Pitt et al. [95] bei einer molaren Masse von 14000 ca. 28 Wochen, bei einer Molmasse von 49000 dagegen 60 Wochen. Ab einer kritischen Molmasse von 10000 wird das Polymer in H₂O löslich [105]. Generell werden die freigesetzten Komponenten Glycol und Milchsäure vollständig vom Organismus metabolisiert [67].

Die Freisetzung eines Wirkstoffes aus Polymer-CRS erfolgt über verschiedene physikochemische Mechanismen: Diffusionbasierte, Lösungsmittel gesteuerte, magnetisch kontrollierte und chemisch kontrollierte Freisetzung [65]. Letztere erlaubt in neueren Systemen die Steuerung der Freisetzungskinetik durch chemische Erosion. Der größte Vorteil dieser Systeme ist die biologischen Abbaubarkeit der Träger, die keine Entfernung aus dem Körper mehr notwendig macht. Je nach Konstruktion des Polymer-CRS resultiert die Hydrolyse in verschiedenen Freisetzungskinetiken: i) Die Hydrolyse tritt homogen über die gesamte Struktur hinweg mit gleichbleibender Geschwindigkeit auf. Man spricht dann von *bulk* Erosion. Hier bleibt die Matrix in essentiellen Teilen intakt und das entsprechende Implantat stabil, bis ein kritischer Punkt überschritten ist und das CRS in sich zusammenfällt. Nach diesem Prinzip wird Nahtmaterial auf Polymerbasis hergestellt, sowie neuere Polymergerüste im tissue engineering, die eine Stützfunktion für einwachsende Zellen erfüllen [44]. ii) Die Hydrolyse verläuft heterogen und beschränkt sich auf die Oberfläche, was als *surface* Erosion bezeichnet wird. Oberflächenerosion wird durch den Einsatz hydrophober Polymere erreicht, die das Eindringen von Wasser in das Implantat erschweren. Dies resultiert in einem gleichmässigen Abbau des CRS Implantats und einer kontinuierlichen, linearen Wirkstofffreisetzung.

2.2.3 Anwendungen von Polymer-CRS für Arzneimittel

CRS auf Basis bioabbaubarer Polymere werden in verschiedensten Ausführungen und Größen hergestellt, die größtenteils zur Freisetzung von Arzneistoffen zugelassen sind [64, 92, 127]. Neben der losen Verpackung in Mikro- und Nanopartikel lassen sich daraus fest implantierbare Depots und Beschichtungen für medizinische Implantate herstellen. Nanopartikel, Mikrosphären und Mikrokapseln werden mit einer Kanüle injiziert. Depotformulierungen werden in der regenerativen Medizin als 3D-Matrices (tissue engineering Implantate) zur Unterstützung einwachsender Zellen implantiert, oder als arzneistoffaktivierte Oberflächenbeschichtungen auf Implantate aufgebracht.

Mikropartikel

CRS als Mikropartikel machen seit Beginn der CRS Forschung den Großteil der Arbeiten aus [55, 78, 90]. Mikropartikel haben einen Durchmesser von bis zu 250µm, idealerweise ca. 125µm. Abhängig vom Polymer, dem Arzneistoff und der Kinetik wurden mehrere Herstellungsprozesse entwickelt: Öl-in-Wasser Emulgierung, Phasenseparation (Koazervation) und Sprühtrocknung [52]. Mikropartikel können oral verabreicht und über die Schleimhäute aufgenommen werden [80] oder sie werden nachträglich zu Implantaten für das tissue engineering kondensiert [86].

Nanopartikel

Nanopartikel mit einem Durchmesser von weniger als 500nm gelangen nach oraler oder systemischer Gabe leichter über die Mukosa- und Kapillarmembranen in den Blutkreislauf als Mikropartikel [13]. Befinden sich die Partikel einmal im venösen System wird die Effektivität jedoch geschmälert, da Zellen des Mononuklearen Phagozytosesystems in der Leber und Makrophagen in der Milz die Partikel abfangen [39]. Ein vielversprechender Versuch zur Umgehung der körpereigenen Abwehrmechanismen ist die zusätzliche Ummantelung der Nanopartikel mit PEG [100, 116]. Prinzipiell werden Nanopartikel jedoch mit denselben Methoden wie Mikropartikel hergestellt.

Arzneimittel-aktivierte Polymergerüste

Neben der Formulierung der CRS als lose Mikro- und Nanopartikel wird an der Entwicklung von arzneimittelaktivierten Implantaten und Beschichtungen gearbeitet. Diese bieten neben der örtlich präzisen Verankerung mit hoher Wirkstoffdichte noch den Vorteil, dass die

Zellmigration und -regeneration durch die dreidimensionalen Struktur und Oberflächeneigenschaften des Polymerkörpers unterstützt wird. Durch Kompression [124], teilweise unter Hitze, oder im Schmelz-Extrusionsprozess [72] entstehen Kügelchen, Nägel, Platten oder Zylinder, die z.B. zur konzentrierten, lokalen Infektionsbehandlung mit Antibiotika versetzt werden [72, 75, 79]. Mittels Lyophilisation lassen sich auch porösere Strukturen wie Gitter, Schäume und 3-D-Matrizes herstellen [26, 49, 52, 54, 58, 84, 86, 113, 117]. Diese bieten optimale Leitstrukturen für das Einwachsen von Zellen und werden im Bereich der regenerativen Medizin als wirkstoffaktivierte tissue engineering Implantate verwendet [48, 126].

Arzneimittel-aktivierte Polymerbeschichtungen

Medizinische Implantate werden zur Wiederherstellung zerstörter Gewebestrukturen eingesetzt. Dabei spielen metallische Implantate in Form von Drähten, Schrauben oder Platten bei der Stabilisierung von Knochenfrakturen eine wichtige Rolle. Trotzdem führen diese Fremdkörper im Organismus nicht selten zu Infektionen und weiteren Komplikationen [76]. Durch biokompatible Polymerüberzüge werden neue Grenzflächen zwischen Implantat und umliegendem Gewebe geschaffen, die diese Nebenwirkungen reduzieren [35-37]. Diese Filme entstehen durch solvent-casting Verfahren oder Kompression des Polymers auf den Träger [76, 106, 107]. In der Arbeitsgruppe wird seit einigen Jahren das PLA-Polymer Poly-D,L-Laktid R203 zu diesem Zweck weiterentwickelt. Untersuchungen belegen eine hohe mechanische Stabilität der Beschichtung auf metallischen Implantaten [35, 109]. Des Weiteren konnten in Vorarbeiten sowohl antibakterielle wie auch die Knochenheilung fördernde Effekte der Polymer-Beschichtung nachgewiesen werden [35, 106]. Darüberhinaus steigern bioaktive Zusätze, wie z.B. Antibiotika oder Wachstumsfaktoren das therapeutische Potential der Polymerfilme. Das Polymer R203 wurde bereits erfolgreich als CRS zur Freisetzung von Antibiotika und Wachstumsfaktoren von metallischen Osteosynthesematerialien konzipiert [35, 106]. Hierdurch werden Implantat-assoziierte Infektionen reduziert [76] und rekombinate Wachstumsfaktoren beschleunigen die Knochenheilung [128]. Die Formulierung mit Gentamicin in einem Polymerfilm aus Poly-D,L-Laktid wurde unlängst als Medizinprodukt zugelassen (Fa. Synthes GmbH & Co. KG, Umkirch, D). Ziel der vorliegenden Arbeit ist nun, die Polymerbeschichtung als CRS zur Freisetzung von Gen-Vektor-Komplexen zu etablieren um eingangs beschriebene Nachteile und Hindernisse bei der Applikation des synthetischen Arzneimittels zu beheben.

2.3 CRS für die Gentherapie

Das erste genaktivierte CRS wurde 1996 von Fang et al [25] beschrieben. Hier, wie in folgenden Arbeiten wird jedoch die Freisetzung reiner Plasmid-DNA beschrieben, die den therapeutischen Einsatz als nicht-virale Gentherapie aufgrund mangelnder Transfektionseffizienz erschwert. Ähnlich der zuvor beschriebenen Anwendungen von CRS für Arzneimittel werden im Folgenden erste Beispiele zur Freisetzung von DNA beschrieben.

Genaktivierte **Mikropartikel** werden zur Transfektion von Epithel der Atemwege [115], z.B. zu Immunisierungszwecken [123] beschrieben. Ebenfalls zur Immunisierung [103] und speziell als Aerosole [104], oder zur magnetfeldinduzierten Transfektion [96] werden **Nanopartikel** entworfen. Ein Vorteil der Nanostrukturen ist ihre höhere Stabilität im Vergleich zu Mikropartikeln [77, 91]. Eines der ersten Anwendungsbeispiele von **genaktivierten Polymergerüsten** zur lokalen Freisetzung von DNA ist die sogenannte gene activated matrix (GAM) aus Kollagen I. Diese Matrix wird mit Plasmiden, die für Wachstumsfaktoren (hier bone morphogenic protein 4, BMP) kodieren, versetzt und damit Femurdefekte in Ratten über einen Zeitraum von neun Wochen geheilt [25]. Jedoch sind hier und in einer Folgestudie mit Parathormon (PTH1-34) sehr hohe DNA Mengen (100mg) notwendig, die starke Nebenwirkungen verursachen [10]. Schliesslich zeichnen sich auch erste Einsatzmöglichkeiten von **Polymerbeschichtungen** als Gen-CRS ab und werden mit der vorliegenden Arbeit konkretisiert. In einer initialen Studie wird chromic-gut Nahtmaterial aus Kollagen mit einer DNA-Polymerbeschichtung versehen [63]. Die erste Beschichtung eines metallischen Implantats ist in einer Arbeit von Klugherz [59] beschrieben. Hier wird GFP Plasmid DNA in einem PLGA Film auf die Oberfläche von Koronarstents aufgebracht und die Transfektion in vitro und in vivo charakterisiert. Die Freisetzung der DNA-Partikel geht mit einem initialen Schub einher und klingt in der Folge rasch ab. Das größte Hindernis beider Arbeiten für eine routinemäßige Anwendung ist die hohe Menge eingesetzter DNA, die erstens die Gefahr von toxischen Reaktionen erhöht und trotzdem keine zufriedenstellenden Transfektionsraten hervorbringt.

Denkbare klinische **Anwendungsgebiete** von CRS für Gene sind die therapeutische Angiogenese, Haut-, Nervenzell-, sowie die Knochenregeneration. Periphere Ischämien führen aufgrund des reduzierten Blutflusses zu Zellnekrosen. Deshalb werden Versuche durchgeführt, die Angiogenese durch die Verabreichung von Wachstumsfaktoren (hier: vascular endothelial growth factor VEGF), in Form von Proteinen oder DNA zu initiieren. Jedoch ist eine systemische Applikation nicht möglich, da dies zu Gefäßneubildungen auch an nicht erwünschten Stellen führt [20]. Deshalb sind CRS mit Genen für FGF, VEGF oder PDGF hier eine Alternative zur lokalen Applikation [54, 113]. Auf dem Gebiet der Hautregeneration stellen Haut ulzera in Folge von Diabetes eine grosse Herausforderung an den behandelnden Arzt. Hier könnten lokal applizierte Wachstumsfaktoren die Geweberegeneration begünstigen. Mittlerweile werden einige Modelle zur kontrollierten Freisetzung von PDGF- [83, 120] und FGF4 (fibroblast growth factor)-Genen [87] erfolgreich getestet. Mit dem Ziel der Nervenzellregeneration wird kürzlich ein PLGA Gitter mit FGF, BDNF und neurotrophin3 vorgestellt, das die Regeneration von retinalen Ganglionzellen im Vergleich zur Einzeltherapie erheblich beschleunigt [8].

Schliesslich profitiert Knochengewebe, wie eingangs erwähnt, aufgrund der schwachen Durchblutung und des hohen Regenerationspotentials in der Heilungsphase von lokal hochdosierten Antibiotika und Wachstumsfaktoren [22, 36, 51, 61, 76, 93, 107]. Oben beschriebene Ergebnisse zur Beschleunigung der Knochenregeneration [10, 25] weisen das Potential von Gen-CRS für dieses Gewebe. Jedoch mangelt es an effektiven Transfektionsraten, die sich durch die Verwendung unkomplexierter DNA erklären lässt, sowie an der geeigneten Kombination von Gen-Vektor-Komplexen mit einem für das Knochengewebe optimierten CRS.

2.4 Aufgabenstellung

Ziel der hier vorgestellten Arbeit ist die Etablierung einer Implantatbeschichtung als Controlled-Release-System zur steuerbaren Freisetzung von Genvektoren. Damit stünde ein für den Einsatz in Gefäßen, Weichteil- und Knochengewebe optimiertes CRS zur Verfügung, das Gene für therapeutisch relevante Arzneimittel, wie z.B. Antibiotika oder Wachstumsfaktoren, zur körpereigenen Produktion zur Verfügung stellt. Hierzu werden zwei in der Arbeitsgruppe optimierte Verfahren kombiniert. Das erprobte Polymer R203 wird anderen Beschichtungen gegenübergestellt und eine Methode zur Aktivierung mit DNA entwickelt. Mit neueren Genvektoren soll die bisher unzureichende Transfektionsrate von genaktivierten CRS auf eine therapeutisch sinnvolle Rate für den in vivo Einsatz gehoben werden.

Im Detail sind hierfür folgende Nachweise und Zwischenschritte notwendig:

- Charakterisierung der physikalische Eigenschaften von Polymerbeschichtungen
- Evaluierung verschiedener Implantate oder Trägersysteme
- Strukturprüfung von DNA nach Einarbeitung in Polymer
- Testung der Biokompatibilität der Genvektor-Polymerbeschichtung
- Nachweis der Transfektionsfähigkeit von Genvektor-Polymersystemen
- Bestimmung der Freisetzungskinetik von Genvektor-Polymersystemen
- Nachweis der Transfektionseffizienz eines Gen-CRS
- Nachweis der Proteinexpression nach Transfektion mit einem Gen-CRS

3 MATERIAL & METHODEN

3.1 Zellkultur

Material	Bezeichnung	Bezugsquelle
12-Loch Zellkultur Platten	Zellkultur Multiwellplatte, 12Loch, PS	Fa. Greiner Bio-one, Frickenhausen
96-Lochplatten	Microplatte, 96 well, PP, F-Boden	Fa. Greiner Bio-one, Frickenhausen
Mäusefibroblastenzellen	NIH 3T3	Fa. LGC Promochem, Wesel
DMEM-Medium	DMEM (Dulecco´s Modified Eagles Medium)	Fa. Biochrom, Berlin
fötales Kälberserum	fetal bovine serum	Fa. PAA, Linz, Österreich
Penicillin	Penicillin	Fa. Biochrom, Berlin
Streptomycin	Streptomycin	Fa. Biochrom, Berlin
Phosphat-Pufferlösung	PBS(1x) Dulbecco	Fa. Biochrom, Berlin
Lysepuffer	Trypsin EDTA	Fa. Biochrom, Berlin
Brutschrank	Brutschrank	Fa. Thermo Quest, Egelsbach
Lyophilisator	Hetosicc CD4	Fa. Heto, Camberley, England

Tabelle 1: Materialien und Geräte für Zellkulturversuche

3.1.1 Zelllinie

Die Zellen der Mäusefibroblastenlinie NIH 3T3 werden in DMEM-Medium, unter Zugabe von Antibiotika (500 Einheiten Penicillin, 50mg Streptomycin/500ml) sowie 10%-igem fötalen Kälberserum und 1,028g/l N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit gehalten und alle 3-4 Tage passagiert.

3.1.2 In vitro Transfektion

Zur Verwendung für Transfektionsexperimente wird die Nährlösung aus der Zellkulturflasche abgesaugt, der Zellrasen zweimalig mit einer Phosphat-Pufferlösung gewaschen, mit Lysepuffer behandelt und die abgelösten Zellen anschließend wieder in Medium aufgenommen. Die Böden der 96-Lochplatten werden mit 3×10^3 Zellen, gelöst in 200µl Medium, die Böden der 12-Lochplatten mit 4×10^4 Zellen in 2ml Medium ausgesät. Die 96-Lochplatten werden am Tag zuvor beschichtet (siehe 3.10.2) und für die Dauer von 24 Stunden lyophilisiert bevor die Zellen direkt auf die beschichteten Böden ausgesät werden. Für Zellkulturversuche mit beschichteten Titanplättchen, Siebgitter und Stahlstiften werden 12-Loch Zellkulturplatten einen Tag vor Zugabe der Materialien mit den Zellen ausgesät, so dass eine Konfluenz von 60-70% erreicht ist. Je ein beschichteter Träger wird nun auf die Zellen einer Vertiefung gelegt.

3.2 Plasmid-DNA und Reportergene

Material	Bezeichnung	Bezugsquelle
Reportergen: Luciferase (luc)	p55pCMV-IVS-luc+	Fa. Bayer Corp., Emery Ville, USA
Reportergen: Green fluorescent protein (GFP)	pEGFP	Fa. Clontech, Palo Alto, USA
DNA Präparationskit	Plasmid Maxi Kit 100	Fa. Qiagen GmbH, Hilden
UV-Spektrometer	Beckmann DU-600	Fa. Beckmann Instruments, Fullerton, USA

Tabelle 2: Materialien zur Herstellung und Selektionierung von Plasmid-DNA

3.2.1 Präparation der Plasmid DNA

Die Plasmid-DNA (Plasmid DNA) wird unter Benutzung des Qiagen® Plasmid Maxi Kits 100 präpariert. Nach Auftauen eines tiefgefrorenen Aliquots kompetenter E.coli Bakterien erfolgt die Transformation mit dem gewünschten Plasmid. Nach Selektion transformierter Bakterien und Reinigung der Plasmide wird die Konzentration der DNA im UV-Spektrometer durch Messung der Absorption bei 260nm ermittelt. Bis zur weiteren Verwendung wird die Plasmid DNA bei -20°C gelagert.

3.2.2 Luciferase Plasmid (luc-DNA)

Falls nicht anderweitig vermerkt, wird für Beschichtungs- und Freisetzungsversuche das Luciferase-Plasmid der Fa. Bayer Corp., Emery Ville, USA verwendet.

3.2.3 Green-Fluorescent-Protein Plasmid (GFP-DNA)

Die Expression des Green Fluorescent Protein (GFP)-Gen der Fa. Clontech, Palo Alto, USA wird qualitativ im Fluoreszenzmikroskop und quantitativ im Durchflußzytometer dargestellt.

3.3 Nicht-virale Genvektorkomplexe

Material	Bezeichnung	Bezugsquelle
Polykation	hTf-PEI	Im eigenen Labor synthetisiert; s. FINSINGER et al.
Hüllpolymer PROCOP „protective copolymer“	P3YE5C P6YE5C	Im eigenen Labor synthetisiert; s. FINSINGER et al.
DOTAP	1,2-dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan	Fa. Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Chol	Cholesterin	Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-ethansulfonsäure 20mM HEPES pH 7,4	
Vortexer	MS 2 Minishaker IKA®	Fa. IKA Works, Wilmington, USA
Lyophilisator	Hetosicc CD4	Fa. Heto, Camberley, England
Rotationsverdampfer	Rotavapor-R	Fa. Büchli, Flawil, Schweiz
Ultraschallbad	Sonifikator: Sonorex RK 510H	Fa. Bandelin, Berlin
silanisieretes Reagenzglas	silanisieretes Reagenzglas, 15ml, mit Schraubverschluß	Fa. Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

Tabelle 3: Materialien zur Herstellung der Genvektorkomplexe

3.3.1 Kationische Liposomen aus DOTAP-Cholesterin

Es wird jeweils eine 5mM Lösung DOTAP und Cholesterin in Chloroform hergestellt. Von diesen werden anschließend gleiche Teile (2,5ml) in einem silanisierten Reagenzglas (15ml) mit Schraubverschluß vereinigt. Mit einem Rotationsverdampfer wird das Chloroform abgedampft, bis ein gleichmässiger Lipidfilm an der Gefässinnenwand verbleibt. Währenddessen wird der Rotationsverdampfer mit Argon-Gas belüftet um Sauerstoff zu entfernen. Anschließend wird der Lipidfilm über Nacht im Lyophilisator getrocknet. Am nächsten Tag wird die Schicht mit 5ml einer 5%igen Glucoselösung rehydriert. Dazu wird das Gefäß zunächst 30 Sekunden „gevortext“ und sofort 30 Minuten mit Ultraschall behandelt, um eine stabile Liposomensuspension zu erhalten. In den Lipoplexen beträgt das optimale Ladungsverhältnis zwischen dem positiv geladenen DOTAP und der negativ geladenen DNA 5:1. Die benötigte Menge DOTAP/Cholesterin errechnet sich aus Gleichung 1 [28].

$$DOTAP/Chol[\mu l] = \frac{DNA[\mu g] \times 1000 \times 5}{330 \mu g / \mu l \times 5 mM}$$

Gleichung 1: Berechnung der benötigten Menge DOTAP/Cholesterin anhand des Ladungsverhältnisses DOTAP/DNA = 5:1

Die so hergestellten Lipoplexe werden im Schritt 3.9 in das Polymer eingearbeitet.

3.3.2 DNA-PEI-PROCOPs

Zunächst werden DNA-PEI-Komplexe hergestellt und diese in einem zweiten Schritt mit den protective copolymers (PROCOPs) umhüllt. Daraus entstehen geschützte Genvektoren, sogenannte copolymer protected gene vectors (COPROGs). Die Stabilität der DNA-PEI-Komplexe wird durch das molare Verhältnis der Stickstoff-Atome (N) im PEI und den Phosphatengruppen (P) in den DNA-Nukleotiden bestimmt. Ein N/P-Verhältnis von 8 hat sich in der Vergangenheit als optimal erwiesen und errechnet sich aus Gleichung 2 [28].

$$N/P = \frac{PEI[\mu g]}{43} \times \frac{330}{DNA[\mu g]}$$

Gleichung 2: Berechnung des Stickstoff/Phosphat-Verhältnis
 43=MW der sich wiederholenden Grundeinheit von PEI [g/mol]
 330=mittleres MW eines Nukleotids [g/mol]

Die gewünschte Menge DNA, gelöst in HEPES, wird der errechneten Menge PEI, ebenfalls gelöst in HEPES, mit einer Pipette zugegeben, durch rasches Auf- und Abpipettieren durchmischt und kurz gevortext. Anschliessend erfolgt eine Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Zur Herstellung von COPROGs werden gleiche Volumina von DNA-, PEI- und PROCOP-Lösungen benötigt. Die Menge des benötigten PROCOPs errechnet sich aus Gleichung 3.

$$PROCOP[ml] = \frac{DNA[\mu g] \times 1000 \times 3}{330 \mu g / \mu l \times PROCOP[mM]}$$

Gleichung 3: Berechnung der benötigten Menge PROCOP [ml]
 3=Ladungsäquivalent aus dem Quotienten negativer Ladung in PROCOP und DNA

Die vorformulierte Vektorsuspension aus DNA und PEI wird zur errechneten Menge PROCOP, ebenfalls gelöst in HEPES, mit einer Pipette zugegeben, durch rasches Auf- und Abpipettieren durchmischt und kurz gevortext. Nach abschliessender Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten werden die Polyplexe im Schritt 3.1.1 in das Polymer eingearbeitet.

3.4 Polymere für das Controlled-Release-System

Material	Bezeichnung	Bezugsquelle
R203	Poly-D,L-Laktid Resomer® R203	Fa. Boehringer, Ingelheim
DTE05DT	poly(DTE-co-5% DT carbonate)	Prof. Kohn, Rutgers State University of New Jersey, Piscataway, NJ, USA

Tabelle 4: Polymere zur Beschichtung von Biomaterialien und Verwendung als CRS

3.4.1 R203

Das synthetische PLA Polymer Poly-D,L-Laktid mit dem Handelsnamen Resomer® R203 wird in Pulverform bezogen. Es hat ein Molekulargewicht von 29.500 Dalton und die chemischen Strukturformel $(C_2H_4O_2)_n$. Um einem hydrolytischen Abbau des Polymergerüsts in der Umgebungsluft vorzubeugen, erfolgt die Lagerung kühl und trocken im Exsikkator. Das Polymer wird in Konzentrationen von 2, 4, 8, 33 und 67 mg/ml in Ethylacetat eingesetzt.

3.4.2 DTE05DT

Das synthetische Polymer Poly(DTE-co-5% DT carbonate) (DTE05DT) wurde von Prof. Kohn, Rutgers State University, USA zur Verfügung gestellt. Es ist ein Poly(Carbonate) bestehend aus Desaminotyrosyl-L-Tyrosin-Ethylester-Einheiten (DTE) mit einem Anteil von 5% freiem Desaminotyrosyl-L-Tyrosin (DT). Das Polymer wird in Konzentrationen von 8 und 17mg/ml in Chloroform/Aceton (v/v=1/1) eingesetzt.

Um ein unbeabsichtigtes Aufkonzentrieren des Polymers wegen Verdampfens des Lösungsmittels zu verhindern, werden alle Herstellungs- und Beschichtungsvorgänge auf Eis durchgeführt und das Gefäss bei längeren Pausen mit einem Glasstopfen verschlossen. Bei Aufbewahrung über Nacht wird der Stopfen zusätzlich mit elastischer Kunststoffolie umwickelt und das Gefäss bei $-5^{\circ}C$ gelagert.

3.4.3 farbliche Kontrastierung des Polymers

Zur optischen Darstellung der farblosen Polymerbeschichtung wird der in organischem Lösungsmittel lösliche Farbstoff Methylviolett in 0,1%iger Konzentration beigemischt.

3.5 Biomaterialien

Material	Bezeichnung	Bezugsquelle
Hydroxylapatit	Endobon	Fa. Biomet, Dresden
96-Lochplatten	Microplatte, 96 well, PP, F-Boden	Fa. Greiner Bio-one, Frickenhausen
Stahl	V2A-Stahl	
Titan	Titanfolie	
PVDF	PVDF Siebgitter (Stärke: 500MY; 250x250mm)	Fa. Reichelt Chemietechnik, Heidelberg

Tabelle 5: Verwendete Biomaterialien zur Polymerbeschichtung

Alle in Tabelle 5 gelisteten Träger werden nach jeweiliger Größenanpassung für Zellkulturversuche zu je 10 Stück in Sterilisationstüchen verschweißt und vor der Beschichtung gassterilisiert.

3.5.1 Endobon (Hydroxylapatit)

Die natürliche Hydroxylapatitkeramik Endobon® wird als Knochenersatzmaterial in Form von Blöcken, Zylindern und als Granulat vertrieben. Für Beschichtungsversuche werden die Zylinder mit einem Durchmesser von 1cm mit einer handelsüblichen Laubsäge zu Scheiben mit einer Stärke von 5mm geschnitten.

3.5.2 96-PP-Lochplattenböden

Die 96-Lochplatten aus Polypropylen werden steril verschweißt mit passendem Deckel geliefert. Deshalb entfällt hier der Sterilisationsschritt und die Böden der Lochplatten können direkt beschichtet werden.

3.5.3 Stahlstifte

Bei den Stahlstiftchen handelte es sich um handelsübliche Stahlstäbe (V2A-Stahl nach ISO 5832-1) mit einem Durchmesser von 1mm, die auf eine Länge von 1cm geschnitten werden. Die Oberfläche betrug somit $A = 0,33\text{cm}^2$.

3.5.4 Titanplättchen

Aus einer handelsüblichen Titanfolie werden Plättchen mit einem Durchmesser von 0,8cm gestanzt. Die Oberfläche betrug somit $A = 0,51\text{cm}^2$.

3.5.5 Siebgewebe

Die Siebgewebe aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) mit einer Stärke von 500MY werden als 250x250mm grosse Gitter geliefert. Aus diesen werden quadratische Stückchen mit 1cm Kantenlänge geschnitten und ebenfalls gassterilisiert.

3.6 Massenbestimmung

Material	Bezeichnung	Bezugsquelle
Präzisionswaage	Analysenwaage 1602MP	Fa. Sartorius, Göttingen

Tabelle 6: Materialliste zur Massenbestimmung

Vor jedem Meßvorgang wird die Präzisionswaage auf das jeweilige Aufbewahrungsgefäß geeicht. Hierzu wird ein Eppendorf-Cup in einem Glasgefäß als Träger auf die Waage gestellt und die Eichtaste betätigt. Anschließend werden jeweils sechs Stück eines Trägers in das Behältnis gegeben und das Gewicht ermittelt. Bei Wiederholungsmessungen mit beschichteten Trägermaterialien wird auf dieselbe Weise verfahren.

3.7 Mikroskopie

Material	Bezeichnung	Bezugsquelle
Lichtmikroskop	Axiovert 135 ink. Fluoreszenzaufsatz	Fa. Zeiss, Jena
Digitalkamera	Coolpix E-990	Fa. Nikon

Tabelle 7: Materialliste zur Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

3.7.1 Lichtmikroskopie

Die Darstellung des markierten Beschichtungsfilmes erfolgt unter dem Lichtmikroskop bei 10- und 20-facher Vergrößerung und mittlerer Beleuchtungsstärke. Das Ergebnis wird mit einer Digitalkamera, angeschlossen über einen Konverter, fotografiert.

3.7.2 Fluoreszenzmikroskopie

Nach Expression des Gens für GFP in der Zelle wird seine Eigenfluoreszenz qualitativ durch Fluoreszenz-Mikroskopie mit langwelligem Ultraviolett (UV)-Licht dargestellt. Der Hauptabsorptionspeak liegt bei 395nm (UV-Licht), ein Nebenmaximum findet sich bei 475nm (blaues Licht).

3.8 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wird eine Elektrophorese in Agarosegelen durchgeführt. Die Position der Fragmente wird durch Anfärben des Gels mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA-Doppelhelix und macht diese aufgrund seiner Fluoreszenz unter UV-Licht sichtbar. 30µl einer DNA Probe ($c_{\text{Prob}}=80\text{ng}/\mu\text{l}$) werden mit 6µl Bromphenolblau versetzt und auf drei Kammern eines 1xTBE-Gels (1% Agarose, 25µg Ethidiumbromid) aufgetragen. Drei weitere Taschen enthalten je 10µl einer Referenzlösung (2µl unbehandelte Plasmid DNA, 4µl Bromphenolblau, 4µl TE-Puffer). Für die Dauer von 45 Minuten wird nun eine Spannung von 80V angelegt. Die negativ geladene DNA wandert dabei in Richtung Anode, wobei die Laufgeschwindigkeit umgekehrt proportional zum \log_{10} der Zahl der Basenpaare des Fragmentes ist. Unter UV-Licht (254nm) werden die angefärbten DNA-Banden sichtbar gemacht. Die Fragmente der Probenlösung werden dann mit Hilfe der Banden aus der Referenzlösung identifiziert und das Ergebnis fotografisch dokumentiert.

3.9 Einarbeiten von Genvektorkomplexen in Polymerlösungen

Material	Bezeichnung	Bezugsquelle
komplexierte DNA		siehe 3.3
Polymer		siehe 3.4
Pistill	Teflon Pistill	Fa. Schütt Labortechnik, Göttingen
Homogenisatorgefäß	Glashomogenisator (10ml)	Fa. Schütt Labortechnik, Göttingen
Sterilfilter (hydrophil)	0,23µm	Fa. Peske oHG, Aindling-Pichl
Sterilfilter (hydrophob)	Minisart SRP 25 (0,2 µm)	Fa. Sartorius
Lyophilisator	Hetosicc CD4	Fa. Heto, Camberley, England

Tabelle 8: Materialliste zur Einarbeitung von Genvektoren in Polymerlösungen. Alle wiederverwertbaren Instrumente werden dampfsterilisiert.

Die Herstellung einer Genvektor-Polymer-Dispersion erfolgt in zwei Schritten an zwei aufeinanderfolgenden Tagen unter laminar-flow. Beide Schritte sind für jede Kombination aus Genvektor und Polymerlösung obligatorisch.

Schritt 1 (Tag 1): Trocknung der Genvektorkomplexe

Die Komplexe aus Plasmid-DNA und Vektorsystem werden zunächst nach Anleitung in Kapitel 3.3 hergestellt

- Die benötigte Menge an Genvektorkomplexen wird anteilig am Trockengewicht des Polymers berechnet. Mit einer handelsüblichen Spritze (5ml) und Kanüle, zwischen die ein hydrophilen Sterilfilter (0,23µm) gesteckt wird, werden die in wässriger Lösung vorliegenden Komplexe in ein sterilisiertes Homogenisatorgefäß gespritzt. Hierzu wird die Alufolie, mit welcher das Gefäß vor dem Sterilisationsprozess verschlossen wurde, mit der Nadel durchstoßen und anschließend wieder mit Klebeband verschlossen.
- Die Genvektorkomplex-Lösung wird unter Einsatz von flüssigem Stickstoff tiefgefroren.
- Anschließend verbleibt das Gefäß zur Gefriertrocknung über Nacht in der Vakuumkammer des Lyophilisators.

Schritt 2 (Tag 2): Suspension in Polymerlösung

Die Polymerlösung wird zunächst nach Anleitung in Kapitel 3.4 hergestellt. Alle folgenden Schritte werden unter laminar-flow Bedingung durchgeführt.

- Das Homogenisatorgefäß wird zur Kühlung in ein Gefäß mit Eiswasser gestellt, um der Verdampfung des Ethylacetats der Polymerlösung vorzubeugen.
- Die Polymerlösung wird durch einen hydrophoben Sterilfilter in das Homogenisatorgefäß gespritzt.
- Mit einem Pistill werden die lyophilisierten Genvektorkomplexe für fünf Minuten dispergiert. Hier sorgen langsame Dreh-, mit gleichzeitigen Auf-/Abbewegungen dafür, daß auch am Gefäßboden verbleibende Komplexe in die Polymerlösung suspendieren.
- Während des folgenden Beschichtungsvorgangs verbleibt das Gefäß auf Eis und wird während längerer Pausen mit einem Glasstopfen verschlossen.

3.10 Beschichtungsverfahren

Die Beschichtung der Trägermaterialien erfordert verschiedene Techniken. Nach Beschichtung verbleiben die Träger zur Lufttrocknung für zwei Stunden in je einem Eppendorfcup und werden darin im Anschluß über Nacht lyophilisiert.

3.10.1 Endobon

Die Scheiben aus Hydroxylapatit werden auf zwei Arten beschichtet. a) In Anlehnung an das von Gollwitzer [35] beschriebene Tauch-Beschichtungsverfahren wird die Endobon-Scheibe mit Hilfe einer Pinzette in die Genvektor-Polymer-Suspension getaucht und anschließend für einige Sekunden an der Luft getrocknet. Nach Umgreifen erfolgt ein zweiter Tauchvorgang. b) Die gewünschte Menge Polymer wird mit einer Pipette aufgenommen und schrittweise auf den Träger getreufelt.

3.10.2 96-PP-Lochplatten

Zur Beschichtung der Böden von 96-PP-Lochplatten wird die zur Erreichung der gewünschten Schichtdicke benötigte Menge an Polymer mit Hilfe einer Pipette aufgetragen. Die Platte wird dann für zwei Stunden unter laminar-flow zur Lufttrocknung belassen und anschliessend über Nacht lyophilisiert.

3.10.3 Stahlstifte, Titanplättchen, Siebgewebe

Zur Beschichtung dieser Trägermaterialien wird das Tauch-Beschichtungsverfahren angewandt.

3.11 DNA Extraktion aus einer DNA-Polymerlösung

Material	Bezeichnung	Bezugsquelle
Vakuum Konzentrator	SpeedVac SVC 100H	Fa. Savant Instr., Farmingdale, USA

Tabelle 9: Materialliste zur Extraktion von Plasmid DNA aus einer DNA-Polymerlösung

Die DNA-Polymerlösung wird nach dem zweistufigen Herstellungsverfahren bereitgestellt. Zur Extraktion und weiteren Kontrolle der eingearbeiteten Plasmide werden 15µl aus dem Ansatz entnommen und mit 185µl Ethylacetat sowie 200µl TE-Puffer versetzt. Nach dreimaligem Schütteln für jeweils 30 Sekunden wird kurz anzentrifugiert. Die obere, organische Phase wird über eine Vakuumpumpe abgesaugt. Aus der unteren, wässrigen Phase

werden 20µl in ein Eppendorf-Cup überführt. In einem Vakuum Konzentrator wird die Flüssigkeit verflüchtigt und die zurückgebliebene DNA in 20µl aqua dest. resuspendiert. Die Plasmid DNA wird anschliessend in der Gelelektrophorese dargestellt.

3.12 Bestimmung der Kinetik von Freisetzung und Transfektion

Material	Bezeichnung	Bezugsquelle
Markierung mit I-125	Nick-Labeling-Kit I-125	Fa. Amersham Life Science, Buckinghamshire, England
γ-Zähler	1480 Wizard TM 3	Fa. Wallac, Turku, Finnland
UV-Spektrometer	Beckmann DU-600	Fa. Beckmann Instr., Fullerton, USA

Tabelle 10: Materialliste zur Bestimmung der Kinetik von Freisetzung und Transfektion mit I-125 markierter Plasmid-DNA

3.12.1 Markierung der DNA mit I-125

Die Plasmid DNA wird gemäß der Methode nach Prenskey [97], unter Verwendung des Nick-Labeling-Kits, mit I-125 markiert. Die Konzentration der DNA wird anschließend im UV-Spektrometer bei 260nm bestimmt und die Radioaktivität der Lösung im γ-Zähler ermittelt.

3.12.2 Herstellung der Beschichtung

Der Ansatz zur Tauchbeschichtung wird aus einer Mischung radioaktiv markierter ($c_{\text{rad}}=64\mu\text{g/ml}$) und unmarkierter Plasmide ($c_{\text{Plasmid DNA}}=5,1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) im Verhältnis 1:10 hergestellt. Das Gemisch wird unter Einhaltung der Strahlenschutzvorschriften in COPROG-Vektoren eingearbeitet. Die I-125 markierten Genvektorkomplexe ($c_{\text{Vek}}=170\mu\text{g/ml}$) werden anschliessend in das Polymer R203 ($c_{\text{R203}}=17\text{mg/ml}$ Ethylacetat) eingebracht und die Träger nach dem Tauchbeschichtungsverfahren damit überzogen.

3.12.3 Arbeitsprotokoll zur Bestimmung der Freisetzungskinetik

Zur Ermittlung der Freisetzungskinetik werden Stahlstifte und Siebgewebegitter als Trägermaterialien verwendet. Diese werden mit I-125 markierten Genvektoren in der R203-Beschichtung überzogen. Für die Probenmessungen im γ-Zähler werden die hierfür vorgesehenen verschraubbaren Becher und Messstände zur automatisierten Messung verwendet. Nach Beschichtung und Trocknung der Stäbe und Gitter wird die Aktivität eines jeden Trägers als Ausgangswert bestimmt. Als Referenz dient eine Probe der Beschichtungslösung zu drei Entnahmezeitpunkten – zu Beginn, während und am Ende des

Beschichtungsvorganges. Die Träger werden anschliessend in die Vertiefungen der 12-Loch Kulturplatten gegeben und der Versuch mit Zugabe von 2ml Nährmedium gestartet. Die Platten werden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 4h, 24h, 4 und 8 Tagen wird jeweils das gesamte Medium zur Bestimmung der Radioaktivität entnommen und dem Träger frisches Medium zugesetzt. Nach Ablauf der 8 Tage wird das Trägermaterial entnommen und dessen Radioaktivität im γ -Zähler gemessen.

3.12.4 Arbeitsprotokoll zur Bestimmung der Transfektionskinetik

Zur Ermittlung der Verteilung von freigesetzten Genvektorkomplexen auf die Kompartimente Träger, Nährmedium und Zellen über die Zeit werden beschichtete Kunststoffgitter verwendet. Diese werden mit I-125 markierten Genvektoren in der R203-Beschichtung überzogen. Für die Probenmessungen im γ -Zähler werden die hierfür vorgesehenen verschraubbaren Becher und Messstände zur automatisierten Messung verwendet. Nach Beschichtung und Trocknung der Stäbe und Gitter wird die Aktivität der einzelnen Träger bestimmt. Es werden nur solche mit einer CPM-Aktivität zwischen 15.000 und 21.000 weiterverwendet und diese zu Triplets mit ähnlicher Gesamtcountzahl zusammengefasst. Als Referenz dient erneut eine Probe der Beschichtungslösung der drei Zeitpunkte: Beginn, während und Ende des Beschichtungsvorganges. Die Triplette werden einzeln auf die Vertiefungen von 12-Loch Zellkulturplatten verteilt, in denen Zellen der NIH 3T3 Linie in 2ml Nährmedium am Vortag ausgesät worden sind. Die Platten werden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zu fünf Meßzeitpunkten - 4 Std, 24 Std, 2, 3 und 4 Tage – wird sowohl das gesamte Medium als auch das Gitter in je ein Meßgefäß des γ -Zählers überführt. Die Zellen werden trypsinisiert, mit Nährmedium umspült und ebenfalls in einen separaten Meßbecher gegeben. Die Vollständigkeit der abgelösten Zellen wird durch Kontrolle der Lochplatte unter dem Lichtmikroskop gewährleistet und eventuell noch anhaftende Zellen durch erneutes trypsinieren abgelöst. Anschliessend wird die Aktivität der drei Kompartimente Träger, Nährmedium und Zellen bestimmt.

3.13 Darstellung der Transfektion mittels GFP

Material	Bezeichnung	Bezugsquelle
FACS	FACS Vantage	Fa. Becton Dickinson, England
Zentrifuge	EBA 12R	Fa. Hettich, Tuttlingen

Tabelle 11: Materialliste zur Darstellung von GFP-transfizierten Zellen

Nach Expression des Gens für GFP in der Zelle wird seine Eigenfluoreszenz qualitativ durch Fluoreszenz-Mikroskopie mit langwelligem Ultraviolett (UV)-Licht und quantitativ mit dem Verfahren der Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting, FACS) dargestellt. Der Hauptabsorptionspeak liegt bei 395nm (UV-Licht), ein Nebenmaximum findet sich bei 475nm (blaues Licht).

3.13.1 Durchflusszytometrie (FACS)

GFP kodierende Plasmide werden mit PEI/PROCOP umhüllt und mit einem Gewichtsanteil von 1% in eine Polymerlösung aus 17mg R203/ml Ethylacetat eingearbeitet. Damit werden Kunststoffgitter in einem einmaligen Tauchvorgang beschichtet. Nach Trocknung der Träger werden diese auf die Vertiefungen von 12-Loch Zellkulturplatten verteilt. Die Böden werden am Vortag mit 4×10^4 Zellen der NIH 3T3 Linie in 2ml Nährmedium versetzt, so daß bei Zugabe der beschichteten Träger eine Konfluenz von ca. 60% erreicht ist. Als Positivkontrolle dienen Träger, deren GFP-DNA durch luc-DNA ersetzt wird.

Nach jeweils zwei und drei Tagen werden ein GFP- und ein Kontroll-Triplett im Durchflußzytometer gemessen. Zunächst wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit 500µl PBS gespült. Anschliessend wird das Gitter mit Hilfe einer Pinzette aus dem well entfernt. Die Zellen werden mit 100µl Trypsin vom Lochplattenboden gelöst und der Vorgang bei Beklopfen der Platte unter dem Lichtmikroskop beobachtet. Nach Abkuglung der Zellen wird der Vorgang mit 2ml Nährmedium gestoppt. Die gelösten Zellen werden zweimal mit 1ml Flow-Lösung (PBS, 1% FCS und 0,002% Na-Azid) gewaschen, durch einen hydrophilen Filter in ein FACS-Röhrchen zentrifugiert (300g, 3min) und bis zur Messung auf Eis gelagert. Der Prozentsatz an lebenden, transfizierten Zellen wird im Durchflußzytometer bestimmt. Die zu untersuchende Zellpopulation wird aus einem Streudiagramm (vorwärts/seitwärts) ausgewählt. Vorwärtsstreulicht korreliert mit der Größe der Zellkerne, während Seitwärtsstreulicht mit der Granularität der Untersuchungsobjekte korreliert. GFP-

Fluoreszenz, als Maß für den Anteil transfizierter Zellen wird bei einer Anregungswellenlänge von 488nm und einer Emissionswellenlänge von 530 ± 30 nm detektiert. Die Bestimmung der Transfektionseffizienz wird mit jeweils 10.000 Zellen durchgeführt.

3.14 Datenauswertung

Beschichtungs- und Transfektionsexperimente werden dreimalig ausgeführt und jeweils als Triplette gemessen. Messergebnisse werden als signifikant unterschiedlich angesehen, wenn $p < .05$ (zweiseitig). Signifikanzen werden für unabhängige Stichproben mittels Mann-Whitney-Test und Kruskal-Wallis-Test (2+ unabh. Stichproben) untersucht. Für abhängige Stichproben werden Wilcoxon-Test und Friedman-Test (2+ abh. Stichproben) verwendet. Die statistischen Tests werden mit SPSS (Chicago, Illinois, USA, www.spss.com) v.11 für Mac durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

In einem ersten Schritt wird ein Herstellungsverfahren etabliert, um Genvektoren in eine Polymerlösung zur Beschichtung von Biomaterialien einzuarbeiten. Zusätzlich werden die physikalischen und biologischen Eigenschaften der so entstandenen Genvektor-Polymerbeschichtung charakterisiert. Als Träger für das CRS werden klinisch verwendete Biomaterialien, wie z.B. Knochenersatzstoffe und Titandrähte, ausgewählt und dafür jeweils angepasste Beschichtungsverfahren getestet. In einer Reihe von Vorversuchen werden beschichtete Träger bezüglich ihrer Oberflächenstruktur, in-vitro Tauglichkeit und Biokompatibilität überprüft und ein Modellsystem entwickelt. Abschließend wird die genaktivierte Polymerbeschichtung optimiert. Hierzu wird die Kinetik der Freisetzung, die Transfektionsleistung und die Proteinexpressionsrate der transfizierten Zellen in vitro ermittelt. Zusammenfassend beschreibt die vorliegende Arbeit ein biokompatibles, genaktiviertes CRS zur Beschichtung von biomedizinischen Implantaten, das aufgrund der hohen Transfektionsraten zur in vivo Anwendung empfohlen wird und diesbezüglich auch erste Erfolge aufweisen kann [61].

4.1 Herstellung einer Genvektor-Polymerbeschichtung

Im Folgenden wird ein Herstellungsverfahren beschrieben, um die Genvektorkomplexe in das zur Beschichtung verwendete Polymer einzuarbeiten. Die DNA und die Bestandteile zur Komplexierung werden steril hergestellt und liegen anschließend in wässriger Lösung vor. Die Polymerverbindungen sind aufgrund ihrer chemischen Zusammensetzung nur in organischen Lösungsmitteln lösbar. Ein zweistufiges Herstellungsverfahren ermöglicht die Mischung der in unterschiedlichen Phasen vorliegenden Komponenten: Die Gen-Vektor-Komplexe werden nach der Herstellung lyophilisiert. Durch mechanische Homogenisation werden die Komplexe dann in der organischen Polymerlösung suspendiert und das Gemisch sofort auf das Trägermaterial aufgebracht. Nach Verdunstung des organischen Lösungsmittels in einem weiteren Lyophilisationsschritt können die beschichteten Träger in der Zellkultur verwendet werden.

Schritt 1

Die Genvektorkomplex-Lösungen liegen nach ihrer Herstellung als klare Lösungen vor und werden über einen Sterilfilter in das vorab sterilisierte Homogenisatorgefäß gespritzt. Alle weiteren Schritte erfolgen unter aseptischen Bedingungen. Nach der Gefriergetrocknung verbleiben die Genvektorkomplexe als weiße, spinnwebartige Fäden an den Gefäßwänden.

Schritt 2

Polymer R203

Das Polymer R203 wird in Konzentrationen von 2, 4, 8, 33 und 67 mg/ml in Ethylacetat gelöst. In allen Konzentrationen wird eine vollständige Lösung des Polymers erreicht und es sind keine Unterschiede in der Viskosität festzustellen. Nach Zugabe des gelösten Polymers zu den getrockneten Genvektorkomplexen ist ein Quellen, jedoch keine vollständige Lösung der DNA-Fäden zu beobachten. Aus diesem Grund werden die Vektorkomplexe in dem Homogenisatorgefäß mit Hilfe eines Feinschliffpistills suspendiert. Nach fünfminütiger Behandlung ist eine milchige Suspension erreicht, die mit bloßem Auge keine Schwebstoffe mehr erkennen lässt. Aufgrund der anschließend einsetzenden Sedimentation sind nach 20 Minuten erste Ablagerungen auf dem Gefäßboden zu beobachten. Dies hat mehrere Auswirkungen auf den Beschichtungsvorgang. Die Träger werden nach Herstellung der Suspensionslösung sofort beschichtet und die Suspension wird während des Beschichtungsvorganges auf Eis gelagert und das Gefäß mit einem Glasstopfen verschlossen, um dem Aufkonzentrieren der Lösung, bedingt durch Verdunstung des Ethylacetats vorzubeugen.

DTE05DT

Das Polymer DTE05DT wird in einem Gemisch aus Chloroform/Aceton (1:1) gelöst. Bei einer Konzentrationen von $c_{DTE}=17\text{mg/ml}$ ist dieses Polymer erheblich zähflüssiger als R203. Dies führt zu Problemen bei der Herstellung der Genvektor-Polymerlösung. Nach Einbringen des Polymers in das Homogenisatorgefäß verhindert die zähe Konsistenz des Polymers eine Dispersion der Genvektoren. Zusätzlich verbleibt nach der Behandlung ein Polymerfilm auf dem Pistill und im Gefäß.

4.2 Beschichtung verschiedener Trägermaterialien

Die Homogenität der Beschichtungssuspension kann nur für wenige Minuten gewährleistet werden. Deshalb wird im Anschluß an die Herstellung der Suspension sofort beschichtet. Für längere Beschichtungsvorgänge müssen Polymer und Vektoren nach entsprechender Zeit mit Hilfe des Pistills resuspendiert werden.

4.2.1 Endobon

Die Scheiben aus Hydroxylapatit werden sowohl im Tauchbeschichtungsverfahren beschichtet als auch durch Aufbringen der gewünschten Menge Polymer mit Hilfe einer Pipette. Im Anschluß an den Tauchvorgang ist der Träger mit einer feinen Schicht überzogen, die teilweise in die Poren eindringt, bzw. diese verschliesst. Durch das Auftropfen fließt ein Teil der Suspension durch den Träger hindurch und geht somit verloren. Die Quantifizierung der aufgetragenen Polymermenge wird dadurch erschwert.

4.2.2 96-PP-Lochplatten

Als weiterer Träger werden die Böden von 96-Lochplatten aus Polypropylen (PP) verwendet. Nach Gabe der in 100µl Ethylacetat gelösten Vektorkomplexsuspension in die Vertiefung entsteht auf dem Lochplattenboden aufgrund des langsamen Verdunstungsvorganges eine homogene Beschichtung. Hierfür verbleiben die Platten für etwa zwei Stunden unter laminar-flow. Zur restlosen Beseitigung des organischen Lösungsmittels werden die beschichteten Platten über Nacht im Exsikkator getrocknet. Die beschichteten Lochplattenböden werden zur Untersuchung der physikalischen Eigenschaften und der Biokompatibilität der Vektorkomplexbeschichtung verwendet.

4.2.3 Titanplättchen, Stahlstifte, Siebgewebe

Diese Träger werden nach dem zweistufigen Tauchbeschichtungsverfahren beschichtet. Es folgt eine zweistündige Lufttrocknung unter laminar-flow mit anschließender Lyophilisation der Träger im Aufbewahrungsgefäß. Mit bloßem Auge läßt sich auf den Trägern ein schimmernder Film ausmachen, der sich unter dem Lichtmikroskop als feine Polymerschicht darstellt. Es folgen weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der Vektorkomplexschicht hinsichtlich ihrer Integrität und zur Massenzunahme der Biomaterialien nach Beschichtung. Die Stahlstifte und Siebgewebegitter werden anschließend zur Charakterisierung der Freisetzungskinetik und Transfektionsrate verwendet.

4.3 Physikalische und biologische Eigenschaften der Genvektor-Polymerbeschichtung

4.3.1 Untersuchung der DNA auf Schäden nach Einarbeiten in die Polymerlösung

Mit diesem Versuch wird die Integrität der Plasmid DNA nach Kontakt mit organischem Lösungsmittel und mechanischer Belastung durch den Homogenisationsvorgang kontrolliert. Zunächst wird Plasmid DNA nach dem zweistufigen Herstellungsverfahren mit einem Gewichtsanteil von 1% (667 μ g) in 1ml Polymerlösung ($c_{R203}=66,7\text{mg/ml}$) eingearbeitet. Nach erneuter Extraktion wird die Plasmid DNA in der Gelelektrophorese nach Fragmenten aufgetrennt und mit der unbehandelten DNA verglichen.

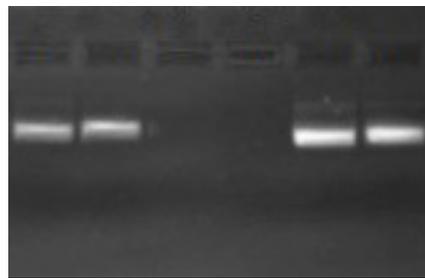


Abbildung 1: Keine herstellungsbedingten Defekte an der Plasmid DNA nach Komplexierung mit Genvektoren und mechanischer Dispersion in der Polymerlösung (li) im Vergleich zu unbehandelter Plasmid DNA (re).

Abbildung 1 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese mit Plasmid DNA, die nach Komplexierung und Einarbeitung in Polymerlösung wieder extrahiert wird (li). Im Vergleich dazu finden sich rechts die Banden der unbehandelten Plasmid DNA. Die Strukturanalyse zeigt keine herstellungsbedingten Veränderungen der Plasmid-DNA nach Lyophilisation, Lösung in Ethylacetat und mechanischer Dispersion.

4.3.2 Optische Darstellung der Beschichtung bei aufsteigend konzentrierten Polymerlösungen

Mit diesem Versuch werden die Möglichkeiten zur Beschichtung verschiedener Biomaterialien verdeutlicht und es können Aussagen zur Minimalkonzentration für eine lückenlose Beschichtung gemacht werden. Zur Darstellung der beschichteten Träger im Lichtmikroskop werden die transparenten Materialien Lochplattenboden und Siebgitter ausgewählt. Vor der Beschichtung der Materialien wird das farblose Polymer mittels Methylviolett optisch markiert. Anschließend werden die beiden Träger entsprechend der Verdünnungsreihe aus Tabelle 12 mit dem Polymer R203 beschichtet.

Trägersystem	Polymer	Probe								
		1	2	3	4	5	6	7	8	
Siebgitter	R203									
	mg/ml Tauchlösung (1x getaucht)	67	33	17	8	4	2	1	0,5	
Lochplattenboden	mg /Vertiefung (in 100 μ l)	6,7	3,3	1,7	0,8	0,4	0,2	0	0	
	mg/cm ²	23,7	11,7	5,6	2,8	1,4	0,7	0	0	

Tabelle 12: Verdünnungsreihe mit Polymer R203 (kontrastiert durch Methylviolett) zur Beschichtung von Lochplattenböden und Siebgewebegittern. Probe 1-8: Jeweils verwendete Menge an Polymer in der Beschichtungslösung (für Siebgitter) bzw. pro Vertiefung (für Lochplattenböden) und errechnete Menge (mg/cm²) Polymer auf der Oberfläche der Träger.

Die Begutachtung der farblich kontrastierten Beschichtung erfolgt unter dem Lichtmikroskop bei 10-facher Vergrößerung und mittlerer Beleuchtungsstärke. Das Ergebnis wird fotografisch festgehalten und ist in Abbildung 2 dargestellt.

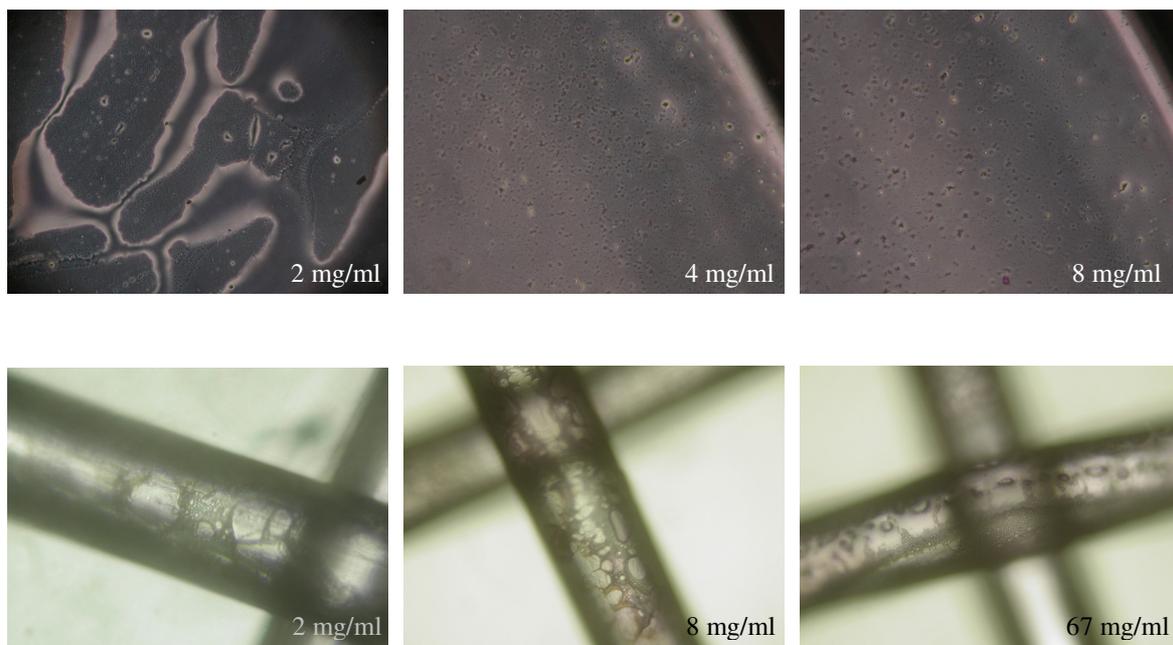


Abbildung 2: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Polymerbeschichtungen auf Lochplattenböden (Reihe oben, mit Polymer-Konzentrationen von $c_{R203}=2, 4$ und 8 mg/ml) und Siebgewebegittern (Reihe unten, $c_{R203}=2, 8$ und 67 mg/ml). Die violette Kontrastierung wird durch Methylviolett erreicht.

Wie den Fotografien aus Abbildung 2 zu entnehmen ist, sind die Lochplattenböden ab einer Konzentration von $c_{R203}=4$ mg/ml lückenlos bedeckt. Bei den Gittern lässt sich aufgrund der verwobenen Struktur und der glatten Oberfläche des Materials eine geschlossene Beschichtung erst mit Konzentrationen über $c_{R203}=67$ mg/ml erzielen. Die weiteren Versuche werden mit Beschichtungen von $c_{R203}=17$ mg und 67 mg/ml durchgeführt, die jeweils DNA mit Gewichtsanteilen von 1%, 5% und 10% enthalten.

4.3.3 Massenbestimmung nach Beschichtung von Biomaterialien

Zur Ermittlung der Masse von Polymerbeschichtungen werden Stahlstifte und Siebgewebegitter zu Gruppen von jeweils sechs Stück zusammengefasst und deren Gewicht vor und nach der Beschichtung mit Hilfe einer Präzisionswaage ermittelt. Als Aufbewahrungsgefäße werden Eppendorf-Cups verwendet. Die Präzisionswaage wird auf das jeweilige Cup geeicht, die Träger hinzugegeben und ihr Gewicht in unbeschichtetem Zustand bestimmt. Die Materialien verbleiben bis zur Beschichtung in den Behältern. Die Beschichtungslösung wird nach oben beschriebener 2-Schritt-Methode mit einer Konzentration von $c_{R203}=17\text{mg}$ angesetzt. Nach Trocknung und Lyophilisation über Nacht wird der Messvorgang wiederholt und so die Massezunahme durch die Beschichtung ermittelt.

N = 6	Vor Beschichtung [mg]	Nach Beschichtung [mg]	Aufgebrachtes Polymer [μg]	Massenzunahme 2. Beschichtung [%]	Polymer/Träger [μg]
Stahlstifte					
1x getaucht	296,20 ± 0,44	296,31 ± 0,28			
2x getaucht	296,03 ± 0,28	296,22 ± 0,33 *	190,0		32,0
Siebgitter					
1x getaucht	106,18 ± 0,23	106,95 ± 0,30 *	770,0 *		128,0
2x getaucht	106,24 ± 0,35	107,51 ± 0,55 *	1270,0 *	60,6 *	212,0

Tabelle 13: Massenzunahme durch eine R203-Beschichtung ($c_{R203}=17\text{mg/ml}$) auf Stahlstiften und Siebgittern mit durchschnittlich errechneter Polymermenge [μg]/Träger. Stahlstifte und Siebgewebegitter werden jeweils 1x und 2x im Tauchverfahren beschichtet. * = Signifikante Zunahmen zeigen sich für Stahlstifte (2x) und Siebgitter (1x u. 2x).

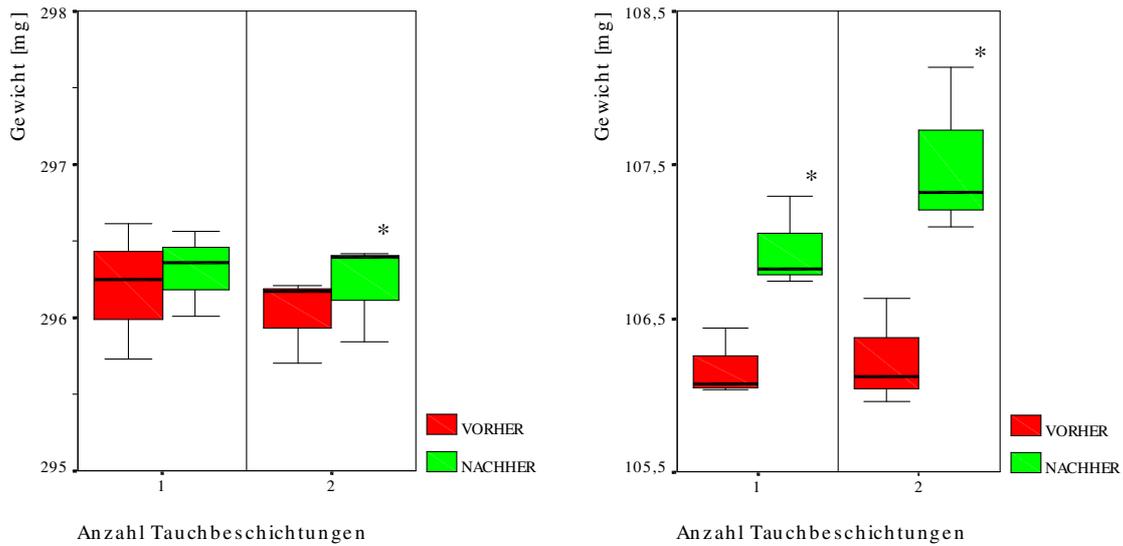


Abbildung 3: Grafische Darstellung der Massenzunahme nach 1- und 2-maliger (grün) Tauchbeschichtung mit R203 ($c_{R203}=17\text{mg/ml}$) im Vergleich zu unbeschichteten Trägern (rot). Grafik links: Massenzunahme für Stahlstifte. Grafik rechts: Massenzunahme für Siebgewebegitter. *=Signifikante Massenzunahme bei Stahlstiften (2x beschichtet) und Siebgittern (1x und 2x beschichtet).

Es zeigt sich eine signifikant höhere Aufnahmekapazität ($p < .05$) der Siebgewebegitter im Vergleich zu den Stahlstiften. Sowohl für zweimal getauchte Stäbe, als auch für beide Ansätze mit Gittern ist ein signifikanter Massenzuwachs gegenüber der jeweils unbeschichteten Vergleichsgruppe zu beobachten ($p < .05$). Der zusätzliche Massengewinn durch den zweiten Tauchvorgang ist nur bei Siebgittern mit 60,6% signifikant ($p < .05$). Bezüglich der einmal beschichteten Stahlstifte lässt sich keine signifikante Massenzunahme feststellen.

4.3.4 Biokompatibilität der DNA-Polymer-Beschichtung

Nach verfahrens- und verarbeitungstechnischen Untersuchungen wird hier die Biokompatibilität der genaktivierten Beschichtung überprüft. Die 96-PP-Lochplattenböden (Microplatten, Fa. Greiner) werden mit dem Polymer R203 in einer Konzentration von $c_{R203}=4\text{mg/ml}$ ($=400\mu\text{g/Lochplattenboden}$) beschichtet. Anhand der Verdünnungsreihe aus Tabelle 14 wird unter aseptischen Bedingungen Plasmid DNA in absteigender Konzentration auf Triplets der Lochplattenböden verteilt.

Polymer	Probe					Kontrolle
R203 (4mg/ml)	1	2	3	4	5	6
Plasmid DNA (μg)	50	40	30	20	10	0

Tabelle 14: Verdünnungsreihe für die Beschichtung von Lochplattenböden mit dem Polymer R203 ($c_{R203}=4\text{mg/ml}$). Dies entspricht $400\mu\text{g}$ Polymer pro Vertiefung. Probe 1-6: In absteigender Konzentration wird Plasmid DNA in der Polymerlösung suspendiert und anschließend die biologische Verträglichkeit der genaktivierten Beschichtung getestet.

Die Schicht wird für zwei Stunden bei Raumtemperatur angetrocknet und anschliessend über Nacht lyophilisiert. Am nächsten Tag werden 15.000 Zellen der NIH 3T3 Linie in jede Vertiefung gegeben und das Wachstum über die folgenden vier Tage fotografisch dokumentiert.

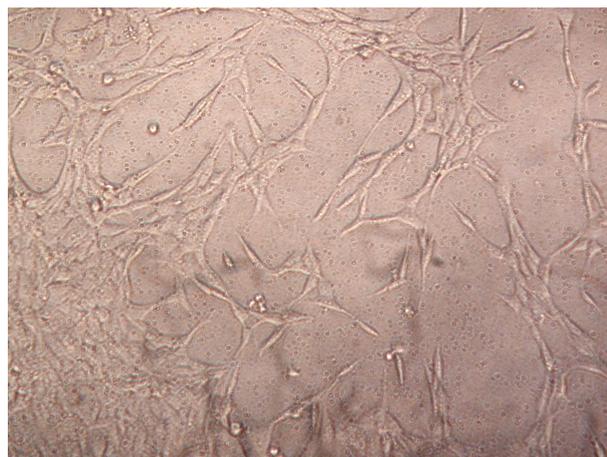


Abbildung 4: Lichtmikroskopische Aufnahme von vitalem Zellwachstum (NIH 3T3 Linie) auf einer genaktivierten Polymerbeschichtung in PP-Lochplattenböden ($c_{R203}=4\text{mg/ml}$, Plasmid DNA= $50\mu\text{g}$) am vierten Tag.

In Abbildung 4 ist das Wachstumsverhalten der Zellen auf der Polymerbeschichtung ($c_{R203}=4\text{mg/ml}$) dokumentiert. Dies entspricht der höchst verwendeten R203 Menge von $400\mu\text{g}$ und $50\mu\text{g}$ Plasmid DNA. Die Zellen sind auch bei dieser Konzentration vital und zeigen keinerlei toxische Reaktionen.

4.4 Transfektionsfähigkeit von Genvektor-Polymerbeschichtungen

In diesem Versuch wird die Transfektionsfähigkeit mehrerer Genvektor-Polymer-Formulierungen in vitro getestet. Der Formulierung mit reiner Plasmid DNA werden Polymerbeschichtungen mit Lipoplexen (DOTAP/Cholesterin) und Polyplexen (PEI/PROCOP) gegenübergestellt. Des Weiteren werden verschiedene Trägerkonzepte verglichen. Als Nachweismethode dient die qualitative Darstellung von GFP-transfizierten Zellen im Fluoreszenzmikroskop. Die Trägermaterialien werden mit genaktiviertem Polymer R203 entsprechend den Werten aus Tabelle 15 beschichtet. Um zusätzlich den Einfluss der Schichtdicke auf die Transfektionsfähigkeit überprüfen zu können, werden neben einmal getauchten auch zweimal beschichtete Materialien vorbereitet.

Trägersystem	Polymer	Genvektor		
		nackte DNA (3.3.1)	Chol/DOTAP (3.3.2)	PEI-PROCOPs (3.3.3)
Lochplattenboden	4mg/ml (in 100 μl)	10%, 5% und 1% DNA		
Stahlstifte	17mg/ml (1x getaucht)	5% DNA		
Siebgewebe	17mg/ml (1x getaucht) (2x getaucht)	5% DNA	5% DNA und 1% DNA	

Tabelle 15: Kombinationen aus Trägersystem und Genvektorkomplexen, jeweils eingearbeitet in das Polymer R203, für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen. Für die drei Genvektoren (nackte DNA, Chol/DOTAP und PEI-PROCOP) werden unterschiedliche Plasmid DNA Mengen verwendet. Prozentuale Angabe (1%, 5%, 10%) der DNA-Menge am Trockengewicht des Polymers.

Im Anschluß an die Gefriertrocknung über Nacht wird je ein beschichteter Träger in die Vertiefungen der 12-Lochplatten gegeben. Diese werden bereits am Vortag mit Zellen versetzt und zusammen mit den Trägern für 3 Tage in Kultur gehalten. Die Ergebnisse werden bei 4-, 10- und 20-facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop dokumentiert.

4.4.1 Daten mit nackter DNA

Der Ansatz mit nackter Plasmid-DNA liefert kein positives Ergebnis. Weder beschichtete Lochplattenböden noch beschichtete Stahlstifte oder Gitter führen zur Transfektion von Zellen. Der Ansatz wird deshalb mit neupassagierten Zellen bis auf zwölf Tage ausgedehnt. Auch nach dieser Zeitspanne finden sich in keinem der Ansätze transfizierte Zellen. Aufgrund der negativen Ergebnisse trotz hoher DNA-Konzentration wird auf weitere Versuche mit nackter DNA verzichtet.

4.4.2 Daten mit Chol/DOTAP Lipoplexen

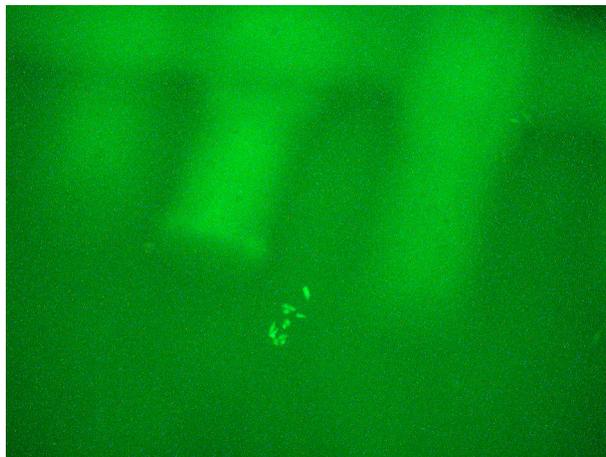


Abbildung 5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der GFP-Transfektion einzelner Zellgruppen durch Chol/DOTAP Lipoplexe in der näheren Umgebung beschichteter Siebgewebegitter (10-fache Vergrößerung). Für den Ansatz werden 5% DNA in Form von Lipoplexen in das Polymer R203 ($c_{R203}=17\text{mg/ml}$) eingearbeitet und die Träger zweimal damit beschichtet.

Die mit Lipoplexen beschichteten Plattenböden und Stahlstifte zeigen im Zeitraum von drei Tagen keine Transfektion. Bei zweimal beschichteten Gittern (5% Plasmid DNA Anteil) zeigen sich einzeln transfizierte Zellgruppen. Diese befinden sich vornehmlich in näherer Umgebung zu den Trägermaterialien (siehe Abbildung 5).

4.4.3 Daten mit COPROG Polyplexen

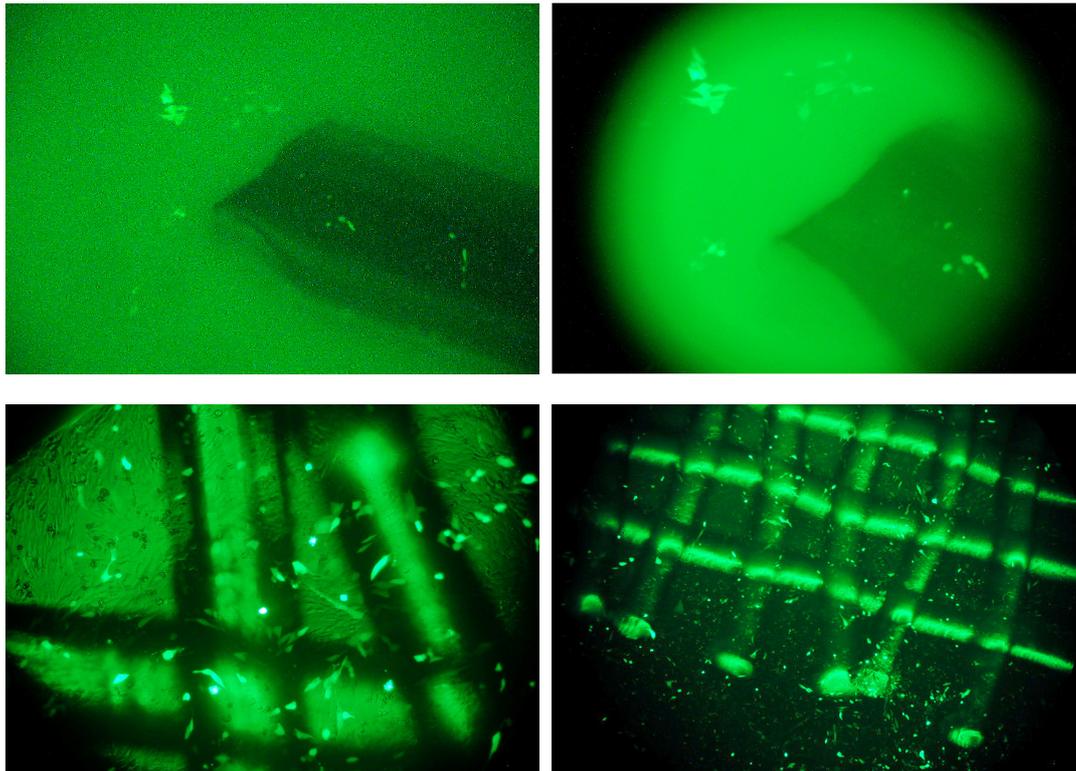


Abbildung 6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Transfektion mit COPROG-Vektoren und GFP-Plasmid aus einer R203-Polymerbeschichtung am dritten Tag. Reihe oben: Genaktivierte Stahlstifte (10-fache (li) und 20-fache (re) Vergrößerung). Reihe unten: Siebgewebegitter (10-fache (li) und 4-fache (re) Vergrößerung). Für den Ansatz werden 1% DNA ($c_{\text{Plasmid DNA}}=170\mu\text{g/ml}$) in Form von Polyplexen in das Polymer R203 ($c_{\text{R203}}=17\text{mg/ml}$) eingearbeitet und die Träger damit einmal beschichtet.

Auf den mit Polyplexen aus PEI/PROCOP beschichteten Lochplattenböden ($400\mu\text{g}$ R203, 10, 20 und $40\mu\text{g}$ Plasmid DNA) werden keine Zellen transfiziert. Der Ansatz mit beschichteten Metallstiften ($c_{\text{R203}}=17\text{mg/ml}$, $c_{\text{Plasmid DNA}}=170\mu\text{g/ml}$) führt bereits bei einmal getauchten Trägern zu transfizierten Zellnestern mit 10-20 Zellen in der näheren Umgebung des Trägers. Die deutlichsten Ergebnisse liefern die beschichteten Gitter. Hier werden bereits mit dem geringst dosiertesten Ansatz ($c_{\text{R203}}=17\text{mg/ml}$, $c_{\text{Plasmid DNA}}=170\mu\text{g/ml}$, einmal beschichtet) Zellen über den gesamten Boden verteilt sehr gut transfiziert. Die dichtesten Ansammlungen finden sich erneut in nächster Umgebung zu dem Träger. Auch der zweite Tauchvorgang führt zu einer weiteren Zunahme transfizierter Zellen.

4.5 Nachweis der Effektivität eines Controlled-Release-Systems für Genvektorkomplexe

Trägersystem	Polymer	Nachweistechnik		
		J-125	J-125	FACS
Stahlstifte	17mg/ml <i>1x getaucht</i>	1%DNA PEI/PROCOP (C _{Plasmid DNA} =170µg/ml)	1%DNA PEI/PROCOP (C _{Plasmid DNA} =170µg/ml)	1%DNA PEI/PROCOP (C _{Plasmid DNA} =170µg/ml)
Siebgewebe		Release vom Träger	Transfektion	Translation

Tabelle 16: Stufenweiser Nachweis der Effektivität eines Controlled-Release-Systems mit PEI/PROCOP-komplexierter DNA für verschiedene Trägersysteme. Zunächst wird die Freisetzungskinetik von Stahlstiften und Siebgittern ermittelt. Anschließend erfolgt die Quantifizierung der jeweiligen Transfektions- und Translationsrate. Als Polymer kommt R203 mit einer Konzentration von 17mg/ml zum Einsatz. Plasmid DNA wird mit einer Konzentration von 170µg/ml eingearbeitet.

Anhand der vorangehenden Untersuchungen wird ein Modellsystem aus Trägermaterial, Polymerbeschichtung und Genvektorkomplexen entwickelt. Mit einem Gewichtsanteil von 1% (C_{Plasmid DNA}=170µg/ml) werden PEI/PROCOP-Vektoren in das Polymer R203 zur Beschichtung von Stahlstiften und Siebgewebegittern eingearbeitet. Anhand verschiedener Nachweistechniken (siehe Tabelle 16) wird die Effektivität des CRS auf mehreren Ebene quantifiziert. Die Freisetzungskinetik der beiden Trägersysteme wird mittels I-125 radioaktiv markierter DNA bestimmt. Anschließend wird die Aufnahmegeschwindigkeit, also Transfektionsrate, der eluierten Genvektoren in die 3T3 Zellen mit derselben Methode gemessen. Um den Anteil der tatsächlich transkribierten DNA an der in die Zellen aufgenommenen Menge DNA zu erhalten, wird abschliessend die Translationsrate derselben Formulierung mit der Durchflusszytometrie (FACS) ermittelt.

4.5.1 Freisetzungskinetik

Die Plasmid DNA wird für diesen Versuch mit radioaktivem I-125 markiert und in COPROG-Vektoren eingearbeitet. Die Trägermaterialien werden anschliessend durch Tauchbeschichtung mit der Genvektor-Polymerlösung überzogen. Nach Trocknung der Stäbe und Gitter wird die Aktivität eines jeden Trägers als Ausgangswert bestimmt. Als Referenz dient eine Probe der Beschichtungslösung. Die Träger werden anschliessend in die Vertiefung von 12-Loch Kulturplatten gegeben und der Versuch durch Zugabe von 2ml Nährmedium gestartet. Nach 4h, 24h, 4 und 8 Tagen wird jeweils das gesamte Medium zur Bestimmung der Radioaktivität entnommen und dem Träger frisches Medium zugesetzt. Nach Ablauf der 8 Tage wird auch das Trägermaterial entnommen und dessen Zerfallsrate im γ -Zähler gemessen. Die zu jedem Meßzeitpunkt in das Medium abgegebene kumulative Menge an I-125 markierten Genvektoren von 1- und 2-mal beschichteten Stahlstiften und Siebgittern ist in Abbildung 7 dargestellt. Abbildung 8 verdeutlicht besonders die Freisetzungskinetik der Gitter mit initial hoher Freisetzungsrate und gleichzeitiger Depotwirkung mit weniger als 50% freigesetzter Genvektoren nach acht Tagen.

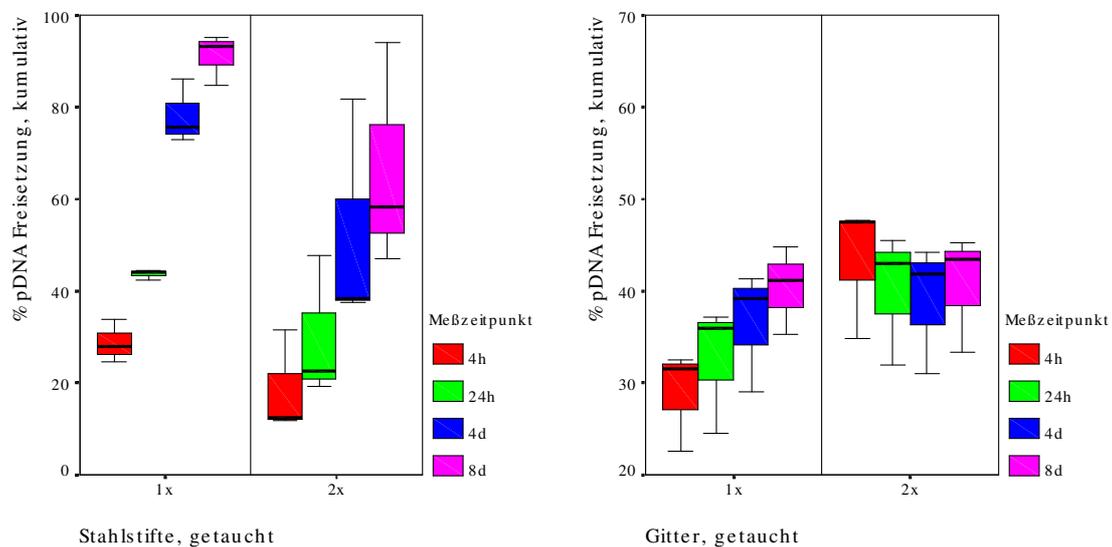


Abbildung 7: kumulative Freisetzungsmenge von I-125 markierter Plasmid DNA in COPROG-Vektoren ($c_{\text{Plasmid DNA}}=170\mu\text{g/ml}$) aus einer Beschichtung mit Polymer R203 ($c_{\text{R203}}=17\text{mg/ml}$). Meßzeitpunkte: 4h, 24h, 4d und 8d. Abb. links: Stahlstifte, 1x und 2x getaucht. Abb. rechts: Siebgewebegitter, 1x und 2x getaucht.

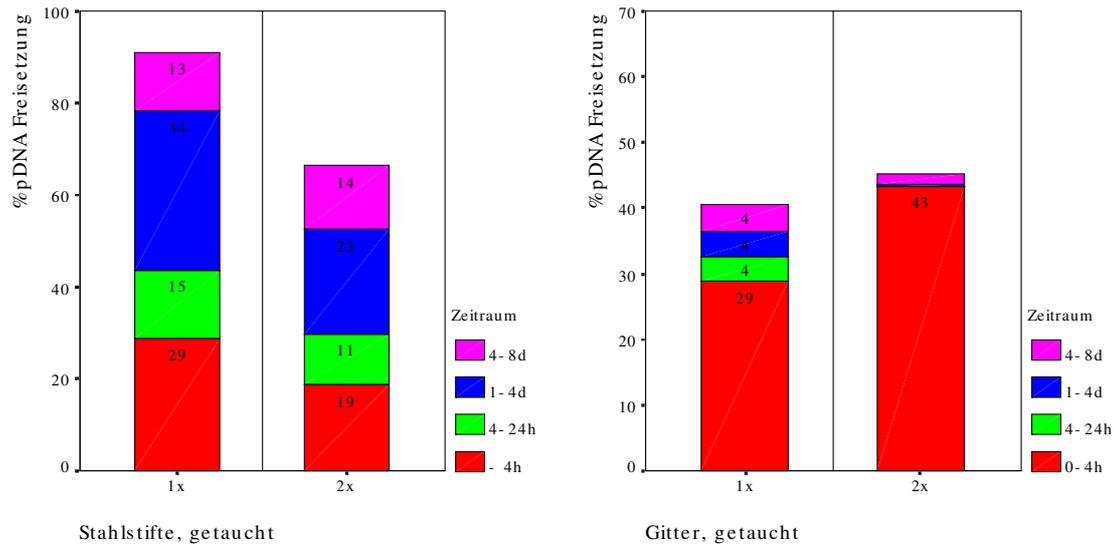


Abbildung 8: Freisetzungskinetik von I-125 markierter Plasmid DNA in COPROG-Vektoren ($C_{\text{Plasmid DNA}}=170\mu\text{g/ml}$) aus einer Beschichtung mit Polymer R203 ($C_{\text{R203}}=17\text{mg/ml}$) zu den einzelnen Meßzeitpunkten (4h, 24h, 4d und 8d). Abb. links: Stahlstifte, 1x und 2x getaucht. Abb. rechts: Siebwebegitter, 1x und 2x getaucht.

Zwischen den vier Ansätzen ist ein deutlicher Unterschied im Freisetzungsverhalten festzustellen. Abbildung 7 zeigt die signifikante Zunahme der freigesetzten Genvektorkomplexe über acht Tage ($p<.05$) von beschichteten Stahlstiften und einmal getauchten Siebwebegittern. Diese drei Ansätze lassen sich bezüglich der Kinetik noch weiter differenzieren (siehe Abbildung 8). Aus den einmal beschichteten Stiften werden während der acht Tage nahezu die gesamten Vektorkomplexe freigesetzt. Dieser Anteil der Gesamtmenge geht bei den zweimal getauchten Stäben auf ca. 60%, bei den einmal beschichteten Gittern sogar bis auf 40% zurück. Nach acht Tagen befinden sich somit noch mehr als die Hälfte der aufgetragenen Vektorkomplexe in der Polymerbeschichtung der Siebgitter. Die zweimal getauchten Gitter zeigen keine Kontinuität dieses Verhaltens. Bereits nach vier Stunden ist ein Maximum von knapp 50% der Gesamtmenge freigesetzt, das sich über die folgenden acht Tage nicht mehr steigern lässt. Allen Ansätzen gleich ist die initial rasche Freisetzung (*initial burst*), die bei den beschichteten Gittern dem Maximum der vier Zeitpunkte entspricht. Auch hier lässt sich die Freisetzungskurve der vier Ansätze weiter differenzieren. Bei den Stäben kann nach dem „initial burst“ eine annähernd gleich starke Freisetzung über die folgenden Tage bis fast zur Erschöpfung des Depots beobachtet werden. Bei den Gittern verläuft die Freisetzung nach dem „initial burst“ nur geringfügig asymptotischer.

4.5.2 Transfektion

Zur Bestimmung der Transfektionsraten, also der Aufnahmegeschwindigkeit von Genvektoren in die Zellen, werden Siebgewebegitter mit einer Polymerschicht aus R203 ($c_{R203}=17\text{mg/ml}$) überzogen. In die Polymerlösung werden zuvor COPROG-Vektoren mit I-125 markierter Plasmid DNA ($c_{\text{Plasmid DNA}}=170\mu\text{g/ml}$) eingearbeitet. Nach Beschichtung und Trocknung der Gitter wird die Aktivität eines jeden Trägers bestimmt. Als Referenz dient erneut eine Probe der Beschichtungslösung. Die Träger werden einzeln auf die Vertiefungen von 12-Loch Zellkulturplatten verteilt, in die am Vortag Zellen der NIH 3T3 Linie in 2ml Nährmedium ausgesät werden. Zu fünf Meßzeitpunkten - 4 Std, 24 Std, 2, 3 und 4 Tage – wird sowohl das gesamte Medium als auch das Gitter in je ein Meßgefäß des γ -Zählers überführt. Die gelösten Zellen werden ebenfalls in einen separaten Meßbecher gegeben. Anschliessend wird jeweils die Aktivität von Träger, Nährmedium und Zellen bestimmt.

Abbildung 9, links zeigt die kumulative Menge I-125 markierter Genvektoren in den Zellen, dem Medium und auf dem Gitter zu den Meßzeitpunkten. Auf der rechten Seite der Abbildung ist zusätzlich die Kinetik der Transfektion im Verhältnis zur Gesamtmenge an verfügbarer DNA dargestellt.

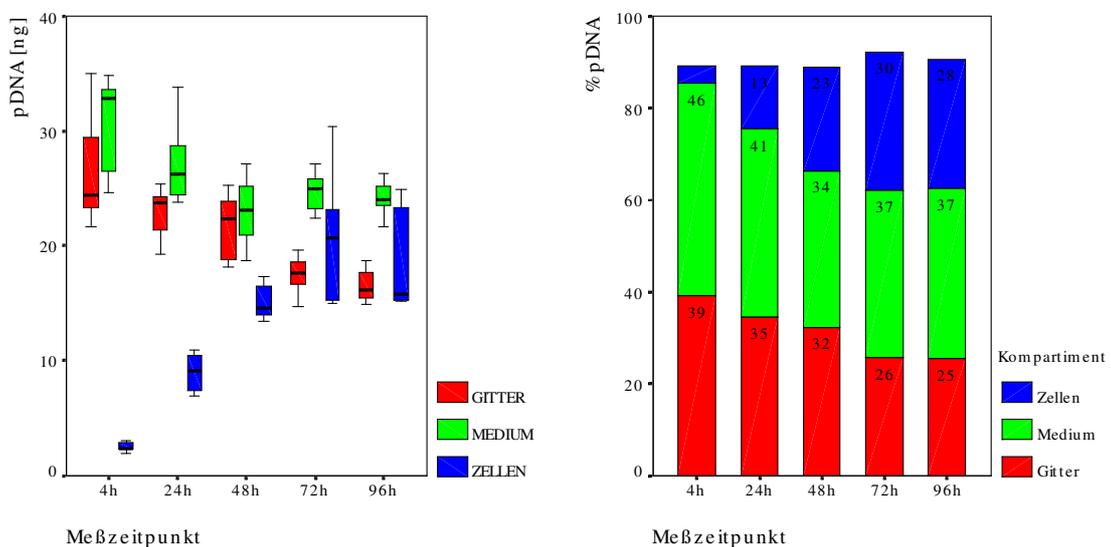


Abbildung 9: Verteilung von I-125 markierter Plasmid DNA ($c_{\text{Plasmid DNA}}=170\mu\text{g/ml}$), freigesetzt mit COPROG-Vektoren aus einer Beschichtung mit Polymer R203 ($c_{R203}=17\text{mg/ml}$), auf transfizierte Zellen (blau), Gitter (rot) und Medium (grün). Meßzeitpunkte: 4h, 24h, 2d, 3d und 4d. Abbildung links: kumulative Menge Plasmid DNA [ng] in den 3 Kompartimenten Gitter, Medium und Zellen. Abbildung rechts: Kinetik der Transfektion (blau) unter Angabe der prozentualen Verteilung. Fehlende Aktivitäten zu 100%iger Verteilung sind bedingt durch Meßfehler bei der Analyse der einzelnen Ansätze.

Die Freisetzungskinetik des Gitters entspricht in ihrem Verlauf zunächst den Ergebnissen des Elutionsversuches (siehe Abbildung 7). Nach einem „initial burst“ werden die Komplexe kontinuierlich aus der Polymerschicht freigesetzt, so daß bis zum vierten Tag noch 25% der Ausgangsaktivität auf dem Träger verbleibt. Entsprechend der hohen Freisetzungsrate zu Versuchsbeginn erreicht die im Medium vorhandene Aktivität nach vier Stunden ebenfalls den Maximalwert. Die Aktivität sinkt parallel mit der Elutionskinetik und erreicht am zweiten Tag ein Plateau. Das Ergebnis von Abbildung 9, rechts am vierten Tag ist Ausdruck eines sehr effektiven CRS. 75% der eingesetzten Vektorkomplexe werden in diesem Zeitraum freigesetzt, während 25% auf dem Träger verbleiben und weiterhin für die retardierte Freisetzung zur Verfügung stehen. Von den im Medium verfügbaren Vektorkomplexen werden im selben Zeitraum bereits fast 50% von den Zellen aufgenommen.

4.5.3 Translation

Um die tatsächliche Proteinexpression in transfizierten Zellen zu berechnen, wird ein identischer Ansatz zu den vorausgegangenen Versuchen zur Freisetzungskinetik und zur Transfektionrate hergestellt. Als Reportergen wird GFP-kodierendes Plasmid verwendet und die Proteinexpression der Zellen mittels FACS-Analyse berechnet. GFP kodierende Plasmide werden mit PEI/PROCOP umhüllt und mit einem Gewichtsanteil von 1% ($C_{\text{Plasmid DNA}}=170\mu\text{g/ml}$) in eine Polymerlösung aus 17mg R203/ml Ethylacetat eingearbeitet. Damit werden Kunststoffgitter in einem einmaligen Tauchvorgang beschichtet. Nach Trocknung der Träger werden diese auf die Vertiefungen von 12-Loch Zellkulturplatten verteilt. Die Böden werden am Vortag mit 4×10^4 Zellen der NIH 3T3 Linie in 2ml Nährmedium versetzt. Als Positivkontrolle dienen Träger, deren GFP-DNA durch luc-DNA ersetzt wird. Nach jeweils zwei und drei Tagen wird der Prozentsatz GFP exprimierender Zellen (R2) im Durchflußzytometer bestimmt.

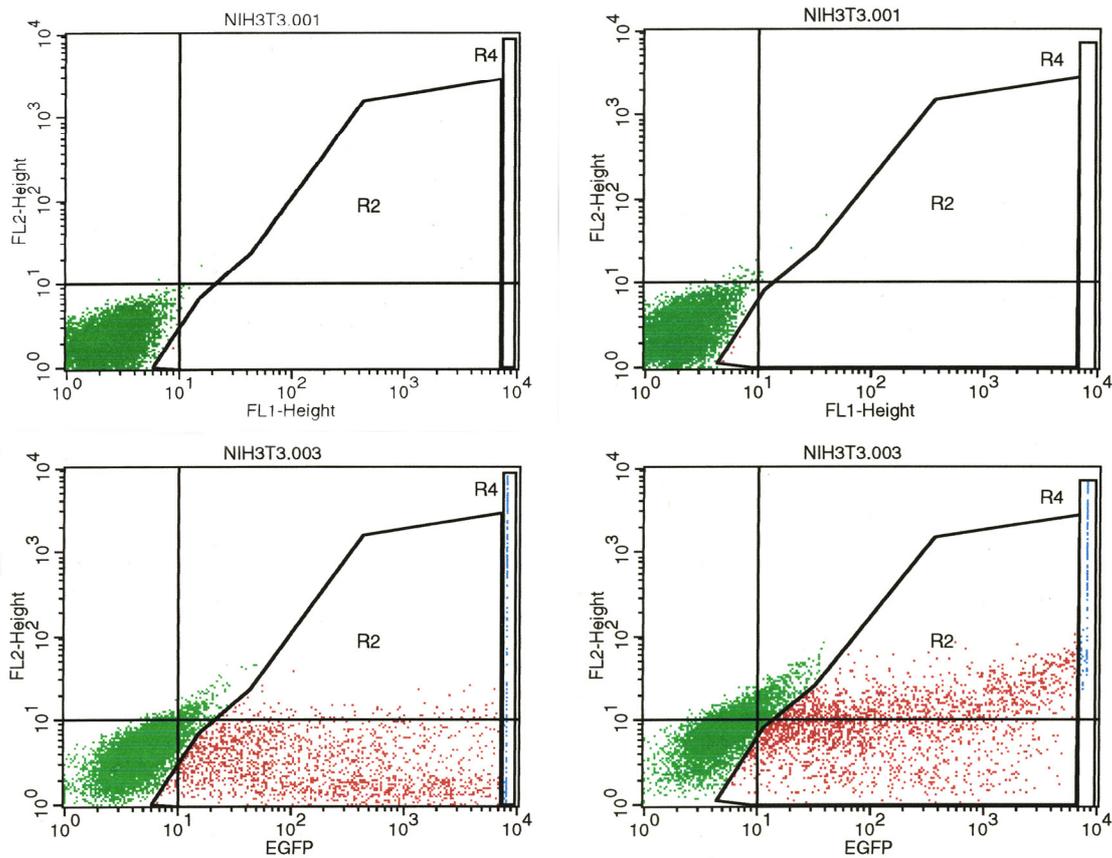


Abbildung 10: GFP produzierende Zellen (R2, rot) nach Genexpression von COPROG-geschütztem GFP-Plasmid ($c_{\text{Plasmid DNA}}=170\mu\text{g/ml}$) aus einer Beschichtung mit Polymer R203 ($c_{\text{R203}}=17\text{mg/ml}$) als Anteil lebender Zellen (grün). Abb. oben: Kontrollansatz ohne GFP-Plasmid nach 48h (links) und 72h (rechts). Abb. unten: Probe mit GFP-Plasmid nach 48h (links) und 72h (rechts). Anzahl emessener Zellen: jeweils 10.000

	48 h			72 h		
Kontrolle	events	% gated	% total	events	% gated	% total
lebende Z. (R1)	9172 ± 87,7	100,0	91,7	9032 ± 113,2	100,0	90,3
transfizierte Z. (R2)	2 ± 0,7	0,02	0,02	6 ± 1,3	0,07	0,06
tote Z. (R4)	0	0,0	0,0	0	0,0	0,0
GFP						
lebende Z. (R1)	8941,3 ± 97,2	100,0	89,4	8559,7 ± 216,9	100,0	85,6
transfizierte Z. (R2)	1725,3 ± 124,0	19,3	17,3	1789,0 ± 417,9	20,9	17,9
tote Z. (R4)	163,7 ± 19,3	1,8	1,6	129,3 ± 48,0	1,5	1,3

Tabelle 17: Numerische Darstellung der Genexpression (R2) von COPROG-geschütztem GFP-Plasmid ($c_{\text{Plasmid DNA}}=170\mu\text{g/ml}$) aus einer Beschichtung mit Polymer R203 ($c_{\text{R203}}=17\text{mg/ml}$) als Anteil an lebenden Zellen (R1). Anzahl gemessener Zellen: jeweils 10.000

In Abbildung 10 ist das Ergebnis der Durchflußzytometrie mit GFP exprimierenden Zellen (Reihe unten, li: nach 48h, re: nach 72h) und Kontrollen (Reihe oben) dargestellt. Es werden jeweils 10.000 Zellen einzeln durch das Streulicht des Durchflußzytometers geleitet und als lebende Zellen und lebende, das Protein produzierende Zellen erkannt. Die grüne Wolke im linken unteren Quadranten der Abbildung umfasst alle lebenden Zellen (R1), während GFP exprimierende Zellen (R2) entlang der x-Achse in rot dargestellt sind. Die GFP produzierenden Zellen (R2) werden in Tabelle 17 quantifiziert. Es bestätigt sich das Ergebnis aus den Transfektionsversuchen (Abbildung 9, rechts (blau)): Bereits nach 48h haben nahezu 20% aller Zellen die Genvektoren nicht nur aufgenommen, sondern das Gen auch exprimiert und das GFP produziert. Bis zum dritten Tag wird ein Plateau erreicht (+ 1,6%), das ebenfalls der bereits gezeigten Transfektionskinetik dieses CRS entspricht. In den Kontrollansätzen findet sich erwartungsgemäß keine GFP-Aktivität.

5 DISKUSSION

Mit der vorliegenden Arbeit wird eine Implantatbeschichtung als *Controlled-Release-System* zur steuerbaren Freisetzung von therapeutisch wirksamen Genvektoren etabliert. Ein derartiges System könnte den Heilungsprozess von Gefäßen, Weichteil- und Knochengewebe durch die körpereigene Produktion von Arzneistoffen, wie z.B. Antibiotika oder Wachstumsfaktoren unterstützen. Einige genaktivierte CRS zeigen bereits in erfolgreicher Weise die Möglichkeiten lokaler Gentherapie [45, 59, 63, 113, 117, 131]. Mit dem hier vorgestellten Modell einer Polymerbeschichtung, ausgestattet mit nicht-viralen Genvektorkomplexen, werden erstmals therapeutisch sinnvolle Genexpressionsraten erzielt. Die genaktivierte Polymerbeschichtung wird in der Zwischenzeit auch bereits erfolgreich in vivo angewendet [61].

Zur Herstellung eines genbasierten CRS sind zwei Qualitätskriterien zu erfüllen. Die Struktur und Effektivität der Genvektoren muss nach Einschluss in das Polymer erhalten bleiben. Zusätzlich dürfen die physikalischen und biologischen Eigenschaften der Polymerbeschichtung durch den Herstellungsprozess nicht verändert werden. Zur Wahrung der Biokompatibilität des gesamten Systems sind beide Anforderungen unabdingbar und werden mit dem hier beschriebenen zweistufigen Herstellungsverfahren erfüllt. Zunächst besteht die Gefahr der Inaktivierung wasserlöslicher Moleküle bei Kontakt mit organischem Lösungsmittel [19]. Außerdem verursachen organische Lösungsmittelrückstände toxische Reaktion in vitro und in vivo. Anstatt eine Emulsion aus wässriger und organischer Phase zu verwenden [19, 59, 118] stellt in dieser Arbeit die Suspension gefriergetrockneter Genvektoren in der Polymerlösung das zentrale Element der Formulierung dar. Zur Genaktivierung werden nackte DNA, DOTAP und PEI/PROCOPs (siehe 3.3) gegenübergestellt. Nach Gefriertrocknung und Dispersion in organischer Polymerlösung bleibt die Plasmid DNA strukturell und funktionell intakt (siehe Abbildung 1).

Wie die vorliegende Arbeit zeigt, eignet sich das Polymer R203 aus der Klasse der Poly-D,L-Laktide hervorragend zur Aktivierung mit Genvektorkomplexen. Basierend auf den Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe in der Formulierung von Poly-D,L-Beschichtungen und deren Aktivierung mit Arzneistoffen wird hier das Modell einer genaktivierten Polymerbeschichtung entwickelt. Antithrombogene und antiinfektive Eigenschaften des Polymers R203 wurden bereits in der Arbeitsgruppe belegt [35, 82]. Auch die

biomechanischen und allergologischen Eigenschaften der Beschichtung sind im Tiermodell beschrieben [37]. Anschliessend wurde das Polymer erfolgreich zur Freisetzung von Arzneistoffen eingesetzt. Hierbei behält es seine mechanische Stabilität [109], weist osteoinduktive Eigenschaften auf [106], und erfüllt die Biokompatibilitätskriterien [106]. In vivo wurde die wirksame Freisetzung von Antibiotika [76], als auch von Wachstumsfaktoren (BMP2, IGFbeta, TGFbeta1) für eine beschleunigte Knochenheilung [56, 99, 107, 108] gezeigt. Zwischenzeitlich wurde die Formulierung mit Gentamicin in einem Polymerfilm aus Poly-D,L-Laktid als Medizinprodukt zugelassen (Fa. Synthes GmbH & Co. KG, Umkirch, D). Als alternativer Filmbildner wird das synthetische Polymer Poly(DTE-co-5% DT carbonate) (DTE05DT) getestet. Dieses Polymer ist jedoch für das hier beschriebene Tauchbeschichtungsverfahren nicht geeignet. Bereits in geringer Konzentration ist die Polymerlösung erheblich zähflüssiger als das Polymer R203 und lässt sich nicht mit den Genvektorkomplexen homogenisieren. Dieses Ergebnis wurde in einer weiteren Analyse der Arbeitsgruppe bestätigt. Eine geringer konzentrierte Formulierung zeigt wiederum schlechtere Transfektionsergebnisse als PLA-basierte Ansätze [62].

Als Träger für die genaktivierte Polymerbeschichtung werden verschiedene Oberflächen von Kunststoffen, metallischen Implantaten und Knochenersatzstoffen erprobt. Hydroxylapatit hat eine knochenähnliche, poröse Struktur und wird im Sinne eines osteokonduktiven, also die Zellen in der Regeneration leitenden, tissue-engineering Implantates ausgewählt. Das Material ist jedoch zur kontrollierten Beschichtung ungeeignet. Die poröse, zerbrechliche Struktur erlaubt es nicht, einheitliche Probenstücke für in vitro Versuche herzustellen. Ebenso kommen die Vorteile der dreidimensionalen Matrix in vivo bei eindimensionalen Zellschichten in der Zellkultur nicht zum Tragen. Vielmehr lässt sich keine Aussage über die effektiv genutzte Oberfläche machen.

Unter Verwendung von Lochplattenböden aus Polypropylen wird das genaktivierte Polymer einer Biokompatibilitätsprüfung unterzogen. In einer Reihe von in vivo Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe wurde die Biokompatibilität der Beschichtung allein, sowie derer mit eingearbeiteten Arzneimitteln erwiesen [22]. Nach lückenloser Beschichtung der Lochplattenböden (siehe Abbildung 2) wird hier das Wachstum auf genaktiviertem Polymer getestet. Für Zellkulturversuche werden generell Microplatten aus Polystyrol verwendet. Deren Böden sind für ein optimales Wachstum von Zellen beschichtet, wohingegen auf Polypropylen kein Zellwachstum stattfindet. Zudem verursacht die direkte Gabe hoher

Konzentrationen Plasmid DNA toxische Reaktionen in den Zellen [54, 73]. Der Ansatz erlaubt somit die Beschreibung des Zellverhaltens in Reaktion auf den Kontakt mit der genaktivierten Oberfläche sowie die Testung der Depotwirkung des CRS. Die Zellen zeigen vitales Wachstum auf dem beschichteten Polypropylen (Abbildung 4) und belegen somit die Biokompatibilität der genaktivierten Schicht. In keiner Probe der Verdünnungsreihe aus Tabelle 13 sind zudem toxische Reaktionen wie z.B. Abkugeln der Zellen zu beobachten. Das Wachstum auf der Schicht mit hoher Plasmidkonzentration lässt darauf schließen, daß die eingeschlossene DNA in verträglicher, sowie retardierter Weise freigesetzt wird. Neben der Biokompatibilität wird somit gleichzeitig die Depotwirkung der genaktivierten Oberfläche belegt.

In Anlehnung an medizinische Implantate unterschiedlicher Materialklassen werden Titanplättchen, Stahlstifte und Siebgewebe aus Kunststoff zur Beschichtung erprobt. Titanplättchen werden in der Arbeitsgruppe zu Freisetzungsversuchen bei in vivo Experimenten verwendet [22], aufgrund fehlender Transparenz unter dem Mikroskop jedoch in dieser Studie wieder abgesetzt. Stahlstifte und Siebgewebegitter unterscheiden sich hinsichtlich Zusammensetzung, Oberflächenbeschaffenheit und in ihrer Aufnahmekapazität. Die Untersuchungen ergeben für die Siebgewebegitter eine vier- (1x getaucht) bis siebenfach (2x getaucht) höhere Aufnahmekapazität an Polymer im Vergleich zu zweimal getauchten Stäben. Der Beschichtungszuwachs bei zwei- gegenüber einmal getauchten Gittern ist ebenfalls signifikant (siehe Tabelle 13). Dies lässt sich mit der größeren Oberfläche und verwobenen Struktur des Kunststoffes erklären.

In einem anschließenden Schritt wird das CRS durch Variation der Genvektoren und der Polymermenge für die quantitative Analyse optimiert. Dabei stellt sich die Wahl der Polyplexe aus PEI/PROCOP zur Komplexierung der Plasmid DNA als Schlüsselgröße für eine erfolgreiche Transfektion heraus. Mit nackter DNA bei Konzentrationen bis zu 10% der Polymermenge ist keine Transfektion zu erzielen. Dieses Ergebnis deckt sich zunächst nicht mit den Ergebnissen der Arbeiten anderer Forschergruppen zu genaktivierten Polymeroberflächen, die mit reiner Plasmid DNA in vitro bis zu 10% der umliegenden Zellen transfizieren konnten [59, 63]. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass bei diesen Versuchen die Zellen einer bis zu 10-fach höheren DNA-Konzentration ausgesetzt werden (ca 200µg). Entsprechend den Gewichtsanalysen (Tabelle 13) werden in der hier vorgestellten Arbeit nur maximal 20µg Plasmid DNA pro Ansatz verwendet. Der Ansatz mit Lipoplexen, basierend

auf Cholesterin/DOTAP und GFP Plasmid, liefert nur marginal bessere Ergebnisse. Die hiermit beschichteten Plattenböden und Stahlstifte bewirken keine Transfektion. Einzig in der Umgebung zweimal getauchter Siebgitter finden sich einzelne fluoreszierende Zellnester (siehe Abbildung 5). Dieses Ergebnis lässt sich anhand der Vorversuche zur Beschichtungskapazität mit der erheblich höheren Aufnahmefähigkeit der Gitter erklären. Generell liefern Lipoplexe in dieser Konfiguration jedoch keine vielversprechenden Hinweise auf eine effektive Transfektionsfähigkeit aus Polymerbeschichtungen.

Die höchste Transfektion lässt sich mit der Freisetzung von Polyplexen aus PEI/PROCOP erzielen. Auch hier zeigt sich eine Zunahme transfizierter Zellen von dem Ansatz mit Stahlstiften hin zu Siebgittern, die sich erneut mit der höheren Aufnahmekapazität der Gitter erklären lässt. Die Motivation zur Quantifizierung der Transfektionsraten ist die Tatsache, dass bereits die Formulierung mit 1% Plasmid DNA Gewichtsanteil bemerkenswerte Ergebnisse liefert (Abbildung 6). Einzig die beschichteten Lochplattenböden bewirken erneut keine Transfektion. Unter Ausschluss toxischer Nebenwirkungen (siehe Abbildung 4) lässt sich dieses Ergebnis mit der erheblich dickeren Schicht Polymer auf den Böden im Vergleich zu tauchbeschichteten Trägern erklären. So reicht der Quellvorgang in den ersten Tagen nicht aus, die in der Polymerschicht verpackten Polyplexe freizusetzen. Aufgrund der lückenhaften Beschichtung bei geringerer Konzentration (Abbildung 2) und dem damit einhergehenden mangelnden Wachstum der Zellen auf den unbehandelten Lochplattenböden ist mit diesem Verfahren keine sinnvolle Beschichtung herzustellen.

Die schwache Akzeptanz von genbasierten Therapieansätzen mit nicht-viralen Formulierungen wird zum Großteil mit der geringen Transfektionleistung begründet [50, 68, 102, 131]. Diese wird in bisherigen Gentherapie-Modellen mit hohen Mengen DNA kompensiert, die jedoch nicht praxistauglich sind. Labhasetwar et al. [63] versetzt Nahtmaterial mit 3mg Plasmid DNA, bei Klugherz et al. [59] beträgt die Gesamtmenge DNA 1,1mg. Dies entspricht in beiden Ansätzen einem Gewichtsanteil von ca. 10% im Verhältnis zur Polymermenge und beide Forschungsgruppen verwenden nackte Plasmid DNA als Genvektoren. Die Versuche zur Transfektionsfähigkeit verschiedener Gen-Vektor-Polymer Kombinationen in der vorliegenden Arbeit liefern ein optimales Modell aus Träger, Genvektor und Polymerbeschichtung. Bereits der COPROG Ansatz mit 1% Gewichtsanteil DNA liefert in der quantitativen Analyse vielversprechende Ergebnisse. Zur Charakterisierung der Freisetzungs-, Transfektions- und Proteinexpressionsrate des

Controlled-Release-Systems werden im folgenden Stahlstifte und Siebgewebegitter mit dieser Kombination beschichtet. Aufgrund der noch steigerungsfähigen Plasmidkonzentration besteht für den Einsatz im lebenden Gewebe weiteres Potential.

Die Freisetzungskinetik des CRS kann wie folgt beschrieben werden. Durch mehrfache Beschichtung der Träger wird über einen Zeitraum von acht Tagen eine kontrollierbare Depotwirkung erzeugt. Während die Vektoren der einfach beschichteten Stäbe fast vollständig freigesetzt werden, bleiben auf den zweimal getauchten Stäben über 40%, auf den einmal beschichteten Gittern noch über 60% der Genvektoren nach Abschluss der Messung auf dem Träger (Abbildung 8). Das Ergebnis der zweimal getauchten Gitter deutet bereits auf eine Überladung des Trägers hin. Innerhalb der ersten vier Stunden werden über 40% des Materials freigesetzt, das sich in der Folge nur geringfügig steigert. Eine Depotwirkung ist hier nicht mehr zu beobachten. Diese Daten decken sich mit den Ergebnissen von Labhasetwar et al. und Klugherz et al. [59, 63]. Labhasetwar et al. beobachten eine kumulative Freisetzung von 10% der DNA während der ersten 24 Stunden, die sich über 26 Tage auf 84% erhöht. Klugherz et al. beschreibt eine Freisetzung von 50% innerhalb der ersten Stunde, die sich über die folgenden 72 Stunden linear fortsetzt. Dies beschreibt bereits das zweite, über alle Träger dieser Arbeit hinweg zu beobachtende Phänomen einer anfangs (< 4h) hohen Freisetzung von Genvektoren, die als *initial burst* bezeichnet wird. Während dieser Phase werden ca. 30% der Genvektoren bereitgestellt. Sowohl oben genannte Arbeiten zu genbasierten Beschichtungen, als auch Arbeiten zu anderen polymerbasierten CRS bestätigen unsere Beobachtung [54, 86, 117]. Des Weiteren zeigen Daten der eigenen Arbeitsgruppe zur Freisetzung von Arzneimitteln aus einer R203 Beschichtung ebenfalls einen initialen Peak von 30-40% innerhalb der ersten Stunde [36, 51]. Insgesamt entspricht das Freisetzungsverhalten dieser genaktivierten Polymeroberfläche den Anforderungen in Hinblick auf in vivo stattfindende Gewebsregeneration. In der Anfangsphase ist eine hohe Wirkstoffkonzentration für die sich teilenden Zellen erwünscht, die in der Folge abklingt [10].

Die initial hohe Verfügbarkeit der Genvektoren im Medium belegt die Effektivität des CRS, noch nicht jedoch die der Genvektoren selbst. Umliegende Zellen müssen erst transfiziert und das genetische Material translatiert werden. Somit erlaubt die Analyse nicht nur des Mediums, sondern auch der Zellen eine Aussage über die Aufnahmerate der freigesetzten Genvektoren. Das Ergebnis zur Transfektion belegt die zügige Aufnahme der Polyplexe in die Zellen. In den ersten vier Stunden finden sich einige Genvektoren im Zell-Kompartiment der Analyse.

Nach 24 Stunden ist bereits das Maximum des zellulären Anteils erreicht. Für die potentielle Anwendung bei Zellregenerationsvorgängen bedeutet dies eine initial hohe Verfügbarkeit von Genen für Wachstumsfaktoren oder Antibiotika, die den Reparaturvorgang unterstützen. Im Gegensatz zur direkten Applikation der Wirkstoffe mag dies eine gewisse Verzögerung in der Anfangsphase bedeuten. Trotzdem spricht die konstante und weitaus längere Verfügbarkeit der im Organismus selbst produzierten Wirkstoffe im Vergleich zu lokal bzw. systemisch applizierten Wirkstoffen für den genbasierten Ansatz. Eine Formulierung, die sowohl die Wirkstoffe selbst für die initiale Versorgung als auch entsprechende Gene für die Langzeitwirkung enthält, wäre eine sich ergänzende Alternative. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit verfolgt diesen Ansatz mit viralen Vektoren und Arzneistoffen die gleichzeitig über Nanopartikel verabreicht werden [125].

Im abschließenden Versuch zur Proteinexpressionsrate wird der effektive Anteil transfizierter Zellen anhand der GFP-vermittelten Fluoreszenz im Durchflußzytometer ermittelt. Im vorangehenden Versuch wird eine Transfektionsrate von bis zu 30% erreicht. Dieses Ergebnis wird mit einer effektiven Genexpression von 19,3% am zweiten und 20,9% am dritten Tag spezifiziert. Der *initial burst* führt dazu, dass bereits nach 48 Stunden der Großteil der insgesamt zu transfizierenden Zellen infiziert ist. Dies entspricht den Ergebnissen einer kürzlich veröffentlichten Arbeit zur Freisetzung komplexierter DNA aus einem Polymergerüst [50]. Das hier vorgestellte, genaktivierte CRS zur Beschichtung von Implantaten erfüllt somit nicht nur Kriterien der Biokompatibilität, sondern erreicht neben hohen Transfektionsraten auch erstmals eine ausreichend hohe Ausbeute bei der Proteinexpression. Zwei Drittel aller transfizierten Zellen transkribieren die für das gewünschte Protein kodierende Plasmid DNA

Erst wenige Arbeiten haben sich ebenfalls mit genaktivierten Beschichtungen beschäftigt. Labhasetwar et al. [63] berichtet eine mit nackter Plasmid DNA aktivierte Polymerbeschichtung von Nahtmaterial. Die Implantation in Kaninchen führt zur Transfektion des Myokards mit einem Reporter gen. Aufgrund der Verwendung nicht komplexierter DNA treten bei dieser Arbeit mehrere Probleme auf: Ein Teil des Plasmids geht nach Freisetzung von der intakten, supercoiled Formation in eine offene, zirkuläre Form über. Dies ist Ausdruck eines DNA-Defektes, der sich durch den Kontakt mit organischem Lösungsmittel und mechanischer Belastung erklären lässt [54, 73]. In der hier vorliegenden Arbeit wird dieses Phänomen nicht beobachtet (siehe Abbildung 1), was sich zum Teil durch die schützende Komplexierung erklärt. Ein weiteres Problem stellen die bereits oben

beschriebenen hohen Mengen an benötigter DNA dar. Im Mittel werden 770µg nackte DNA pro Faden verwendet. Dies stellt für den Organismus an der Implantatstelle eine hohe Belastung dar und könnte Ursache für die ebenfalls beschriebenen inflammatorischen Reaktionen sein [54, 73]. Die erste Beschichtung eines metallischen Implantats ist in einer Arbeit von Klugherz [59] beschrieben. Hier wird GFP-Plasmid-DNA in einem PLGA Film auf die Oberfläche von Koronarstents aufgebracht. Dieser Ansatz beschreibt dieselben Probleme aufgrund der verwendeten nackten DNA. Trotz 1,1% transfizierter Intimazellen in der Nähe des Implantats werden sowohl im Ratten-, als auch im Schweinemodell inflammatorische Reaktionen beobachtet. Dies kann neben der nackten DNA auch erneut an der hohen Plasmid DNA Menge von 1mg pro stent liegen. In einer vergleichbaren Arbeit zeigen Takahashi et al. zudem, dass innerhalb von sieben Tagen nur Zellen in der nächsten Umgebung transfiziert werden und sich die Proteinexpression durch eine direkte Dosis-Expressionsbeziehung auszeichnet. Sie schlagen vor „*that effective clinical application of this method will require the use of therapeutic genes that demonstrate a bystander effect...*“ (S.1474)[118]. Das Verhältnis von bis zu 15% Gewichtsanteil der DNA in oben beschriebenen Gen-CRS Arbeiten wird in der vorliegenden Arbeit auf 1% reduziert (siehe 4.5). Polyplexe weisen somit eine anteilig höhere Genexpression auf und könnten zusätzlich das Problem inflammatorischer Reaktionen begrenzen.

Mit dieser Arbeit ist es zum ersten Mal gelungen, ein Controlled-Release-System mit nicht-viralen Genvektoren zur Beschichtung medizinischer Implantate zu formulieren. Im Vergleich zu bisherigen Ansätzen mit nackter DNA erreichen die Expressionsraten therapeutisch sinnvolle Werte. Nach Beschichtung von Implantaten werden mit diesem Ansatz die Regenerationsvorgänge in Gefäßen, Weichteil- und Knochengewebe durch die lokale Versorgung mit Genen für Arzneimittel unterstützt. In einem Folgeprojekt der Arbeitsgruppe wurde kürzlich die in vivo Tauglichkeit des hier entwickelten Gen-CRS erwiesen [61].

Bibliographie

1. Adachi, Y., N. Yoshio-Hoshino, and N. Nishimoto, *Gene therapy for multiple myeloma*. *Curr Gene Ther*, 2008. **8**(4): p. 247-55.
2. Anderson, L.C., D.L. Wise, and J.F. Howes, *An injectable sustained release fertility control system*. *Contraception*, 1976. **13**(3): p. 375-84.
3. Anderson, W.F., *Human gene therapy*. *Nature*, 1998. **392**(6679 Suppl): p. 25-30.
4. Arshady, R., *Preparation of microspheres and microcapsules by interfacial polycondensation techniques*. *J Microencapsul*, 1989. **6**(1): p. 13-28.
5. Baker, R.W. and H.K. Lonsdale, *Controlled delivery -- an emerging use for membranes*. *Chemtech*, 1975. **5**(11): p. 668-74.
6. Beck, L.R., V.Z. Pope, T.R. Tice, and R.M. Gilley, *Long-acting injectable microsphere formulation for the parenteral administration of levonorgestrel*. *Adv Contracept*, 1985. **1**(2): p. 119-29.
7. Bergstrom, D.E., P. Zhang, and N. Paul, *dsDNA stability dependence on pH and salt concentration*. *Biotechniques*, 1998. **24**(6): p. 992-4.
8. Berry, M., A.M. Gonzalez, W. Clarke, L. Greenlees, L. Barrett, W. Tsang, L. Seymour, J. Bonadio, A. Logan, and A. Baird, *Sustained effects of gene-activated matrices after CNS injury*. *Mol Cell Neurosci*, 2001. **17**(4): p. 706-16.
9. Blaese, R.M., K.W. Culver, A.D. Miller, C.S. Carter, T. Fleisher, M. Clerici, G. Shearer, L. Chang, Y. Chiang, P. Tolstoshev, J.J. Greenblatt, S.A. Rosenberg, H. Klein, M. Berger, C.A. Mullen, W.J. Ramsey, L. Muul, R.A. Morgan, and W.F. Anderson, *T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years*. *Science*, 1995. **270**(5235): p. 475-80.
10. Bonadio, J., E. Smiley, P. Patil, and S. Goldstein, *Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration*. *Nat Med*, 1999. **5**(7): p. 753-9.
11. Boussif, O., M.A. Zanta, and J.P. Behr, *Optimized galenics improve in vitro gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold*. *Gene Ther*, 1996. **3**(12): p. 1074-80.
12. Bragonzi, A., A. Boletta, A. Biffi, A. Muggia, G. Sersale, S.H. Cheng, C. Bordignon, B.M. Assael, and M. Conese, *Comparison between cationic polymers and lipids in mediating systemic gene delivery to the lungs*. *Gene Ther*, 1999. **6**(12): p. 1995-2004.
13. Brannon-Peppas, L. and J.O. Blanchette, *Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004. **56**(11): p. 1649-59.
14. Bruck, S.D., *Problems and artefacts in the evaluation of polymeric materials for medical uses*. *Biomaterials*, 1980. **1**(2): p. 103-7.
15. Bruck, S.D., *Properties of biomaterials in the physiological environment*. 1980, Boca Raton, Florida: CRC Press.
16. Capan, Y., B.H. Woo, S. Gebrekidan, S. Ahmed, and P.P. DeLuca, *Influence of formulation parameters on the characteristics of poly(D, L-lactide-co-glycolide) microspheres containing poly(L-lysine) complexed plasmid DNA*. *J Control Release*, 1999. **60**(2-3): p. 279-86.

17. Chesnoy, S. and L. Huang, *Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery*. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2000. **29**: p. 27-47.
18. Cohen, H., R.J. Levy, J. Gao, I. Fishbein, V. Kousaev, S. Sosnowski, S. Slomkowski, and G. Golomb, *Sustained delivery and expression of DNA encapsulated in polymeric nanoparticles*. *Gene Ther*, 2000. **7**(22): p. 1896-905.
19. Cohen, S., M.J. Alonso, and R. Langer, *Novel approaches to controlled-release antigen delivery*. *Int J Technol Assess Health Care*, 1994. **10**(1): p. 121-30.
20. D'Amore, P.A., *Mechanisms of retinal and choroidal neovascularization*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994. **35**(12): p. 3974-9.
21. Dash, A.K. and G.C. Cudworth, 2nd, *Therapeutic applications of implantable drug delivery systems*. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 1998. **40**(1): p. 1-12.
22. Deppe, H., A. Stemberger, and M. Hillemanns, *Effects of osteopromotive and anti-infective membranes on bone regeneration: an experimental study in rat mandibular defects*. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2003. **18**(3): p. 369-76.
23. Eldridge, J.H., J.K. Staas, D. Chen, P.A. Marx, T.R. Tice, and R.M. Gilley, *New advances in vaccine delivery systems*. *Semin Hematol*, 1993. **30**(4 Suppl 4): p. 16-24; discussion 25.
24. Eliaz, R.E. and F.C. Szoka, Jr., *Robust and prolonged gene expression from injectable polymeric implants*. *Gene Ther*, 2002. **9**(18): p. 1230-7.
25. Fang, J., Y.Y. Zhu, E. Smiley, J. Bonadio, J.P. Rouleau, S.A. Goldstein, L.K. McCauley, B.L. Davidson, and B.J. Roessler, *Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(12): p. 5753-8.
26. Fassihi, R.A. and W.A. Ritschel, *Multiple-layer, direct-compression, controlled-release system: in vitro and in vivo evaluation*. *J Pharm Sci*, 1993. **82**(7): p. 750-4.
27. Felgner, P.L., *Nonviral strategies for gene therapy*. *Sci Am*, 1997. **276**(6): p. 102-6.
28. Finsinger, D., J.S. Remy, P. Erbacher, C. Koch, and C. Plank, *Protective copolymers for nonviral gene vectors: synthesis, vector characterization and application in gene delivery*. *Gene Ther*, 2000. **7**(14): p. 1183-92.
29. Fischer, D., T. Bieber, Y. Li, H.P. Elsasser, and T. Kissel, *A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity*. *Pharm Res*, 1999. **16**(8): p. 1273-9.
30. Frazza, E.J. and E.E. Schmitt, *A new absorbable suture*. *J Biomed Mater Res*, 1971. **5**(2): p. 43-58.
31. Fu, K., A.M. Klibanov, and R. Langer, *Protein stability in controlled-release systems*. *Nat Biotechnol*, 2000. **18**(1): p. 24-5.
32. Garcia-Garcia, H.M., S. Vaina, K. Tsuchida, and P.W. Serruys, *Drug-eluting stents*. *Arch Cardiol Mex*, 2006. **76**(3): p. 297-319.
33. Godbey, W.T., K.K. Wu, and A.G. Mikos, *Poly(ethylenimine)-mediated gene delivery affects endothelial cell function and viability*. *Biomaterials*, 2001. **22**(5): p. 471-80.
34. Godbey, W.T., K.K. Wu, and A.G. Mikos, *Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery*. *J Control Release*, 1999. **60**(2-3): p. 149-60.

35. 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*. 2002, TU München.
36. Gollwitzer, H., K. Ibrahim, H. Meyer, W. Mittelmeier, R. Busch, and A. Stemberger, *Antibacterial poly(D,L-lactic acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology*. *J Antimicrob Chemother*, 2003. **51**(3): p. 585-91.
37. Gollwitzer, H., P. Thomas, P. Diehl, E. Steinhauser, B. Summer, S. Barnstorf, L. Gerdesmeyer, W. Mittelmeier, and A. Stemberger, *Biomechanical and allergological characteristics of a biodegradable poly(D,L-lactic acid) coating for orthopaedic implants*. *J Orthop Res*, 2005. **23**(4): p. 802-9.
38. Gottschalk, S., J.T. Sparrow, J. Hauer, M.P. Mims, F.E. Leland, S.L. Woo, and L.C. Smith, *A novel DNA-peptide complex for efficient gene transfer and expression in mammalian cells*. *Gene Ther*, 1996. **3**(5): p. 448-57.
39. Gref, R., Y. Minamitake, M.T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin, and R. Langer, *Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres*. *Science*, 1994. **263**(5153): p. 1600-3.
40. Hao, T., U. McKeever, and M.L. Hedley, *Biological potency of microsphere encapsulated plasmid DNA*. *J Control Release*, 2000. **69**(2): p. 249-59.
41. Hasbrouck, N.C. and K.A. High, *AAV-mediated gene transfer for the treatment of hemophilia B: problems and prospects*. *Gene Ther*, 2008. **15**(11): p. 870-5.
42. Heller, J., *Biodegradable polymers in controlled drug delivery*. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1984. **1**(1): p. 39-90.
43. Heller, J., *Controlled drug release from poly(ortho esters)*. *Ann N Y Acad Sci*, 1985. **446**: p. 51-66.
44. Heller, J., *Controlled release of biologically active compounds from bioerodible polymers*. *Biomaterials*, 1980. **1**(1): p. 51-7.
45. Heyde, M., K.A. Partridge, R.O. Oreffo, S.M. Howdle, K.M. Shakesheff, and M.C. Garnett, *Gene therapy used for tissue engineering applications*. *J Pharm Pharmacol*, 2007. **59**(3): p. 329-50.
46. Hillier, S.G., P. Jha, K. Griffiths, and K.R. Laumas, *Long-term contraception by steroid releasing implants. VI. Serum concentrations of norethindrone in women bearing a single silastic implant releasing norethindrone acetate*. *Contraception*, 1977. **15**(4): p. 473-88.
47. Horn, N.A., J.A. Meek, G. Budahazi, and M. Marquet, *Cancer gene therapy using plasmid DNA: purification of DNA for human clinical trials*. *Hum Gene Ther*, 1995. **6**(5): p. 565-73.
48. Hsu, Y.Y., J.D. Gresser, R.R. Stewart, D.J. Trantolo, C.M. Lyons, G.A. Simons, P.R. Gangadharam, and D.L. Wise, *Mechanisms of isoniazid release from poly(d,l-lactide-co-glycolide) matrices prepared by dry-mixing and low density polymeric foam methods*. *J Pharm Sci*, 1996. **85**(7): p. 706-13.
49. Huang, Y.C., K. Riddle, K.G. Rice, and D.J. Mooney, *Long-term in vivo gene expression via delivery of PEI-DNA condensates from porous polymer scaffolds*. *Hum Gene Ther*, 2005. **16**(5): p. 609-17.
50. Huang, Y.C., C. Simmons, D. Kaigler, K.G. Rice, and D.J. Mooney, *Bone regeneration in a rat cranial defect with delivery of PEI-condensed plasmid DNA*

- encoding for bone morphogenetic protein-4 (BMP-4)*. *Gene Ther*, 2005. **12**(5): p. 418-26.
51. Ibrahim, K., *Die Entwicklung eines "drug delivery system" auf Basis einer Poly-D,L-Laktatbeschichtung für den Einsatz an Biomaterialien in der Medizin*, in *Institut für Exp. Onkologie und Therapieforschung*. 2005, Technische Universität: München.
 52. Jain, R.A., *The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices*. *Biomaterials*, 2000. **21**(23): p. 2475-90.
 53. Jalil, R. and J.R. Nixon, *Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties*. *J Microencapsul*, 1990. **7**(3): p. 297-325.
 54. Jang, J.H., C.B. Rives, and L.D. Shea, *Plasmid delivery in vivo from porous tissue-engineering scaffolds: transgene expression and cellular transfection*. *Mol Ther*, 2005. **12**(3): p. 475-83.
 55. Kabanov, A.V., *Taking polycation gene delivery systems from in vitro to in vivo*. *Pharm Sci Technolo Today*, 1999. **2**(9): p. 365-372.
 56. Kandziora, F., H. Bail, G. Schmidmaier, G. Schollmeier, M. Scholz, C. Knispel, T. Hiller, R. Pflugmacher, T. Mittlmeier, M. Raschke, and N.P. Haas, *Bone morphogenetic protein-2 application by a poly(D,L-lactide)-coated interbody cage: in vivo results of a new carrier for growth factors*. *J Neurosurg*, 2002. **97**(1 Suppl): p. 40-8.
 57. Kircheis, R., A. Kichler, G. Wallner, M. Kursa, M. Ogris, T. Felzmann, M. Buchberger, and E. Wagner, *Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery*. *Gene Ther*, 1997. **4**(5): p. 409-18.
 58. Kitchell, J.P. and D.L. Wise, *Poly(lactic/glycolic acid) biodegradable drug-polymer matrix systems*. *Methods Enzymol*, 1985. **112**: p. 436-48.
 59. Klugherz, B.D., P.L. Jones, X. Cui, W. Chen, N.F. Meneveau, S. DeFelice, J. Connolly, R.L. Wilensky, and R.J. Levy, *Gene delivery from a DNA controlled-release stent in porcine coronary arteries*. *Nat Biotechnol*, 2000. **18**(11): p. 1181-4.
 60. Kohn, D.B., M. Sadelain, and J.C. Glorioso, *Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(7): p. 477-88.
 61. Kolk, A., C. Pautke, C. Haczek, H. Deppe, A. Neff, A. Stemberger, and C. Plank, *Non-viral BMP-2 gene transfer--A novel vector release out of a pdlla-coating of metallic surfaces to enhance the bone-implant interface*. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2005. **34**: p. 73.
 62. Kullmer, M., *Lokaler Gentransfer mit implantierbaren Arzneistoffträgern. Neue Wege zur Rekonstruktion von Haut- und Knochengewebe*, in *Fakultät für Chemie und Pharmazie*. 2006, Ludwig-Maximilians-Universität München.
 63. Labhasetwar, V., J. Bonadio, S. Goldstein, W. Chen, and R.J. Levy, *A DNA controlled-release coating for gene transfer: transfection in skeletal and cardiac muscle*. *J Pharm Sci*, 1998. **87**(11): p. 1347-50.
 64. Langer, R., *Drug delivery and targeting*. *Nature*, 1998. **392**(6679 Suppl): p. 5-10.
 65. Langer, R., *Implantable controlled release systems*. *Pharmacol Ther*, 1983. **21**(1): p. 35-51.

66. Langer, R.S. and N.A. Peppas, *Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems*. *Biomaterials*, 1981. **2**(4): p. 201-14.
67. Laurencin, C. and J.M. Lane, *Poly(lactid acid) and Poly(glycolic acid): orthopaedic surgery applications*, in *Bone formation and repair*, C. Brighton, G. Friedlaender, and J.M. Lane, Editors. 1994, Am Acad Orthop Surg: Rosemont.
68. Lavigne, M.D. and D.C. Gorecki, *Emerging vectors and targeting methods for nonviral gene therapy*. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2006. **11**(3): p. 541-57.
69. Ledley, F.D., *Pharmaceutical approach to somatic gene therapy*. *Pharm Res*, 1996. **13**(11): p. 1595-614.
70. Lee, H., J.H. Jeong, and T.G. Park, *A new gene delivery formulation of polyethylenimine/DNA complexes coated with PEG conjugated fusogenic peptide*. *J Control Release*, 2001. **76**(1-2): p. 183-92.
71. Lemkine, G.F. and B.A. Demeneix, *Polyethylenimines for in vivo gene delivery*. *Curr Opin Mol Ther*, 2001. **3**(2): p. 178-82.
72. Lemmouchi, Y., E. Schacht, P. Kageruka, R. De Deken, B. Diarra, O. Diall, and S. Geerts, *Biodegradable polyesters for controlled release of trypanocidal drugs: in vitro and in vivo studies*. *Biomaterials*, 1998. **19**(20): p. 1827-37.
73. Leroux, J.C., P. Gravel, L. Balant, B. Volet, B.M. Anner, E. Allemann, E. Doelker, and R. Gurny, *Internalization of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by isolated human leukocytes and analysis of plasma proteins adsorbed onto the particles*. *J Biomed Mater Res*, 1994. **28**(4): p. 471-81.
74. Lewis, D., *Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers*, in *Biodegradable polymers as drug delivery systems*, M. Chasin and R. Langer, Editors. 1990, Marcel Dekker: New York. p. 1-41.
75. Lin, S.S., S.W. Ueng, S.J. Liu, E.C. Chan, E.K. Chao, C.H. Tsai, K.T. Chen, F.C. Wei, and C.H. Shih, *Development of a biodegradable antibiotic delivery system*. *Clin Orthop Relat Res*, 1999(362): p. 240-50.
76. Lucke, M., G. Schmidmaier, S. Sadoni, B. Wildemann, R. Schiller, N.P. Haas, and M. Raschke, *Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats*. *Bone*, 2003. **32**(5): p. 521-31.
77. Luo, D., E. Han, N. Belcheva, and W.M. Saltzman, *A self-assembled, modular DNA delivery system mediated by silica nanoparticles*. *J Control Release*, 2004. **95**(2): p. 333-41.
78. Luo, D., K. Woodrow-Mumford, N. Belcheva, and W.M. Saltzman, *Controlled DNA delivery systems*. *Pharm Res*, 1999. **16**(8): p. 1300-8.
79. Mandal, T.K., A. Lopez-Anaya, E. Onyebueke, and M. Shekleton, *Preparation of biodegradable microcapsules containing zidovudine (AZT) using solvent evaporation technique*. *J Microencapsul*, 1996. **13**(3): p. 257-67.
80. Mathiowitz, E., J.S. Jacob, Y.S. Jong, G.P. Carino, D.E. Chickering, P. Chaturvedi, C.A. Santos, K. Vijayaraghavan, S. Montgomery, M. Bassett, and C. Morrell, *Biologically erodable microspheres as potential oral drug delivery systems*. *Nature*, 1997. **386**(6623): p. 410-4.
81. McLachlan, G., B.J. Stevenson, D.J. Davidson, and D.J. Porteous, *Bacterial DNA is implicated in the inflammatory response to delivery of DNA/DOTAP to mouse lungs*. *Gene Ther*, 2000. **7**(5): p. 384-92.

82. Mebus, S., *Polylaktidbeschichtung zur antithrombogenen Ausrüstung von Biomaterialien - ein Beitrag zur Freisetzung der eingearbeiteten Arzneistoffe und Nachweis der antiinfektiven Eigenschaften*, in *Institut für experimentelle Onkologie und Therapieforschung*. 2000, Fakultät für Medizin der Technische Universität: München. p. 69.
83. Meilander-Lin, N.J., P.J. Cheung, D.L. Wilson, and R.V. Bellamkonda, *Sustained in vivo gene delivery from agarose hydrogel prolongs nonviral gene expression in skin*. *Tissue Eng*, 2005. **11**(3-4): p. 546-55.
84. Nair, L.S. and C.T. Laurencin, *Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2006. **102**: p. 47-90.
85. Nazir, S.A. and J.P. Metcalf, *Innate immune response to adenovirus*. *J Investig Med*, 2005. **53**(6): p. 292-304.
86. Nof, M. and L.D. Shea, *Drug-releasing scaffolds fabricated from drug-loaded microspheres*. *J Biomed Mater Res*, 2002. **59**(2): p. 349-56.
87. Ochiya, T., S. Nagahara, A. Sano, H. Itoh, and M. Terada, *Biomaterials for gene delivery: atelocollagen-mediated controlled release of molecular medicines*. *Curr Gene Ther*, 2001. **1**(1): p. 31-52.
88. Ogris, M., S. Brunner, S. Schuller, R. Kircheis, and E. Wagner, *PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery*. *Gene Ther*, 1999. **6**(4): p. 595-605.
89. Ohlfest, J.R., A.B. Freese, and D.A. Largaespada, *Nonviral vectors for cancer gene therapy: prospects for integrating vectors and combination therapies*. *Curr Gene Ther*, 2005. **5**(6): p. 629-41.
90. Okada, H. and H. Toguchi, *Biodegradable microspheres in drug delivery*. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1995. **12**(1): p. 1-99.
91. Panyam, J. and V. Labhasetwar, *Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003. **55**(3): p. 329-47.
92. Park, K., ed. *Controlled Drug Delivery: Challenges and Strategies*. 1997, American Chemical Society: Washington, DC.
93. Partridge, K.A. and R.O. Oreffo, *Gene delivery in bone tissue engineering: progress and prospects using viral and nonviral strategies*. *Tissue Eng*, 2004. **10**(1-2): p. 295-307.
94. Pike-Overzet, K., M. van der Burg, G. Wagemaker, J.J. van Dongen, and F.J. Staal, *New insights and unresolved issues regarding insertional mutagenesis in X-linked SCID gene therapy*. *Mol Ther*, 2007. **15**(11): p. 1910-6.
95. Pitt, C.G., M.M. Gratzl, G.L. Kimmel, J. Surles, and A. Schindler, *Aliphatic polyesters II. The degradation of poly (DL-lactide), poly (epsilon-caprolactone), and their copolymers in vivo*. *Biomaterials*, 1981. **2**(4): p. 215-20.
96. Plank, C., F. Scherer, U. Schillinger, C. Bergemann, and M. Anton, *Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery with superparamagnetic nanoparticles and magnetic fields*. *J Liposome Res*, 2003. **13**(1): p. 29-32.
97. Prensly, W., *The radioiodination of RNA and DNA to high specific activities*. *Methods Cell Biol*, 1976. **13**: p. 121-52.

98. Rabek, J., *Experimental methods in polymer chemistry*. 1983, New York: John Wiley & Sons.
99. Raschke, M., B. Wildemann, P. Inden, H. Bail, A. Flyvbjerg, J. Hoffmann, N.P. Haas, and G. Schmidmaier, *Insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 accelerates osteotomy healing using polylactide-coated implants as a delivery system: a biomechanical and histological study in minipigs*. *Bone*, 2002. **30**(1): p. 144-51.
100. Ravi Kumar, M., G. Hellermann, R.F. Lockey, and S.S. Mohapatra, *Nanoparticle-mediated gene delivery: state of the art*. *Expert Opin Biol Ther*, 2004. **4**(8): p. 1213-24.
101. Romano, G., *The controversial role of adenoviral-derived vectors in gene therapy programs: where do we stand?* *Drug News Perspect*, 2006. **19**(2): p. 99-106.
102. Romano, G., *Current development of nonviral-mediated gene transfer*. *Drug News Perspect*, 2007. **20**(4): p. 227-31.
103. Roy, K., H.Q. Mao, S.K. Huang, and K.W. Leong, *Oral gene delivery with chitosan--DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy*. *Nat Med*, 1999. **5**(4): p. 387-91.
104. Rudolph, C., U. Schillinger, A. Ortiz, C. Plank, M.M. Golas, B. Sander, H. Stark, and J. Rosenecker, *Aerosolized nanogram quantities of plasmid DNA mediate highly efficient gene delivery to mouse airway epithelium*. *Mol Ther*, 2005. **12**(3): p. 493-501.
105. Schakenraad, J.M. and P.J. Dijkstra, *Biocompatibility of poly (DL-lactic acid/glycine) copolymers*. *Clin Mater*, 1991. **7**(3): p. 253-69.
106. Schmidmaier, G., B. Wildemann, H. Bail, M. Lucke, T. Fuchs, A. Stemberger, A. Flyvbjerg, N.P. Haas, and M. Raschke, *Local application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1) from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats*. *Bone*, 2001. **28**(4): p. 341-50.
107. Schmidmaier, G., B. Wildemann, F. Cromme, F. Kandziora, N.P. Haas, and M. Raschke, *Bone morphogenetic protein-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodeling in fracture treatment: a biomechanical and histological study in rats*. *Bone*, 2002. **30**(6): p. 816-22.
108. Schmidmaier, G., B. Wildemann, M. Lubberstedt, N.P. Haas, and M. Raschke, *IGF-I and TGF-beta 1 incorporated in a poly(D,L-lactide) implant coating stimulates osteoblast differentiation and collagen-1 production but reduces osteoblast proliferation in cell culture*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2003. **65**(1): p. 157-62.
109. Schmidmaier, G., B. Wildemann, A. Stemberger, N.P. Haas, and M. Raschke, *Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors*. *J Biomed Mater Res*, 2001. **58**(4): p. 449-55.
110. Schmitt, E.E. and A.A. Polistina, *Surgical sutures*. 1967.
111. Schwope, A.D., D.L. Wise, and J.F. Howes, *Development of polylactic/glycolic acid delivery systems for use in treatment of narcotic addiction*. *Natl Inst Drug Abuse Res Monogr Ser*, 1975(4): p. 13-8.

112. Shah, Z., J.A. Lehman, Jr., and G. Stevenson, *Capsular contracture around silicone implants: the role of intraluminal antibiotics*. *Plast Reconstr Surg*, 1982. **69**(5): p. 809-14.
113. Shea, L.D., E. Smiley, J. Bonadio, and D.J. Mooney, *DNA delivery from polymer matrices for tissue engineering*. *Nat Biotechnol*, 1999. **17**(6): p. 551-4.
114. Simberg, D., S. Weisman, Y. Talmon, and Y. Barenholz, *DOTAP (and other cationic lipids): chemistry, biophysics, and transfection*. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2004. **21**(4): p. 257-317.
115. Stern, M., K. Ulrich, D.M. Geddes, and E.W. Alton, *Poly (D, L-lactide-co-glycolide)/DNA microspheres to facilitate prolonged transgene expression in airway epithelium in vitro, ex vivo and in vivo*. *Gene Ther*, 2003. **10**(16): p. 1282-8.
116. Stolnik, S., S.E. Dunn, M.C. Garnett, M.C. Davies, A.G. Coombes, D.C. Taylor, M.P. Irving, S.C. Purkiss, T.F. Tadros, S.S. Davis, and et al., *Surface modification of poly(lactide-co-glycolide) nanospheres by biodegradable poly(lactide)-poly(ethylene glycol) copolymers*. *Pharm Res*, 1994. **11**(12): p. 1800-8.
117. Storrie, H. and D.J. Mooney, *Sustained delivery of plasmid DNA from polymeric scaffolds for tissue engineering*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006. **58**(4): p. 500-14.
118. Takahashi, A., M. Palmer-Opolski, R.C. Smith, and K. Walsh, *Transgene delivery of plasmid DNA to smooth muscle cells and macrophages from a biostable polymer-coated stent*. *Gene Ther*, 2003. **10**(17): p. 1471-8.
119. Thies, C., *Development of injectable microcapsules for use in the treatment of narcotic addiction*. *Natl Inst Drug Abuse Res Monogr Ser*, 1975(4): p. 19-20.
120. Tyrone, J.W., J.E. Mogford, L.A. Chandler, C. Ma, Y. Xia, G.F. Pierce, and T.A. Mustoe, *Collagen-embedded platelet-derived growth factor DNA plasmid promotes wound healing in a dermal ulcer model*. *J Surg Res*, 2000. **93**(2): p. 230-6.
121. Vert, M., J. Mauduit, and S. Li, *Biodegradation of PLA/GA polymers: increasing complexity*. *Biomaterials*, 1994. **15**(15): p. 1209-13.
122. Walter, E., K. Moelling, J. Pavlovic, and H.P. Merkle, *Microencapsulation of DNA using poly(DL-lactide-co-glycolide): stability issues and release characteristics*. *J Control Release*, 1999. **61**(3): p. 361-74.
123. Wang, D., D.R. Robinson, G.S. Kwon, and J. Samuel, *Encapsulation of plasmid DNA in biodegradable poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres as a novel approach for immunogene delivery*. *J Control Release*, 1999. **57**(1): p. 9-18.
124. Wang, G., I.G. Tucker, M.S. Roberts, and L.W. Hirst, *In vitro and in vivo evaluation in rabbits of a controlled release 5-fluorouracil subconjunctival implant based on poly(D,L-lactide-co-glycolide)*. *Pharm Res*, 1996. **13**(7): p. 1059-64.
125. Wang, Y., S. Gao, W.H. Ye, H.S. Yoon, and Y.Y. Yang, *Co-delivery of drugs and DNA from cationic core-shell nanoparticles self-assembled from a biodegradable copolymer*. *Nat Mater*, 2006. **5**(10): p. 791-6.
126. Whang, K., D.C. Tsai, E.K. Nam, M. Aitken, S.M. Sprague, P.K. Patel, and K.E. Healy, *Ectopic bone formation via rhBMP-2 delivery from porous bioabsorbable polymer scaffolds*. *J Biomed Mater Res*, 1998. **42**(4): p. 491-9.
127. Whittlesey, K.J. and L.D. Shea, *Delivery systems for small molecule drugs, proteins, and DNA: the neuroscience/biomaterial interface*. *Exp Neurol*, 2004. **190**(1): p. 1-16.

128. Wildemann, B., P. Bamdad, C. Holmer, N.P. Haas, M. Raschke, and G. Schmidmaier, *Local delivery of growth factors from coated titanium plates increases osteotomy healing in rats*. Bone, 2004. **34**(5): p. 862-8.
129. Willard, H.F., *Genomics and gene therapy. Artificial chromosomes coming to life*. Science, 2000. **290**(5495): p. 1308-9.
130. Wu, X., *Synthesis and properties of biodegradable lactic/glycolic acid polymers*, in *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*, D.L. Wise, Editor. 1995, Marcel Dekker: New York. p. 1015-54.
131. Yamamoto, M. and Y. Tabata, *Tissue engineering by modulated gene delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 2006. **58**(4): p. 535-54.
132. Yolles, S., T.D. Leafe, J.H. Woodland, and F.J. Meyer, *Long acting delivery systems for narcotic antagonists II: release rates of naltrexone from poly(lactic acid) composites*. J Pharm Sci, 1975. **64**(2): p. 348-9.
133. Yolles, S., T. Leaffe, L. Ward, and F. Boettner, *Controlled release of biologically active drugs*. Bull Parenter Drug Assoc, 1976. **30**(6): p. 306-12.
134. Zauner, W., S. Brunner, M. Buschle, M. Ogris, and E. Wagner, *Differential behaviour of lipid based and polycation based gene transfer systems in transfecting primary human fibroblasts: a potential role of polylysine in nuclear transport*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1428**(1): p. 57-67.
135. Zhao, Z. and K.W. Leong, *Controlled delivery of antigens and adjuvants in vaccine development*. J Pharm Sci, 1996. **85**(12): p. 1261-70.

Wissenschaftlicher Werdegang

Valentin Riedl
valentin.riedl@mytum.de

geb. am 27.03.1977
in Erlangen
Nationalität: Deutsch

Preise & Stipendien

(2008)	Pilot Research Grant (PI:Riedl) Alzheimer Forschung Initiative
Postgraduierten-Stipendien	
(2007)	Weiterbildungs-Stipendium für Marie-Curie European School in Neuroscience
(2005)	Carlo-Schmid Fellow des DAAD und der Studienstiftung des deutschen Volkes
Graduierten-Stipendien	
(2004)	Max-von-Bauernfeind, Erasmus Stipendien

Ausbildung & Forschung

Post-Doc (seit 2005)	in funktioneller Neurobiologie zur Erforschung von intrinsischen Hirnnetzwerken bei verschiedenen Pathologien Neurologische Klinik und Poliklinik, Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität, München
MD/PhD Studium (seit 2007)	Graduate School of Systemic Neurosciences LMUexcellent, Ludwig-Maximilians-Universität München
Fellow (2005)	Abt. für Ethics, Trade, Health Law & Human Rights Weltgesundheitsorganisation (WHO) Genf, Schweiz
Studium der Humanmedizin (1997-2004)	Technische Universität München Jagiellonian University Krakau, Polen Université Pierre et Marie Curie Paris, Frankreich Universität Regensburg

Forschungsaufenthalte

2 Monate	Institute of Neurology, Queen Square	London, UK
4 Monate	Department of Neurosurgery, Pitié-Salpêtrière	Paris
1 Monat	Klinische funkt. Neurobiologie, Universität	Bonn
3 Monate	Deltamed, Software for Neurophysiology	Paris

Veröffentlichungen & Vorträge

Riedl V, Honey CJ

Alzheimer's disease: a search for broken links

J Neurosci. 2008 Aug 13;28(33):8148-9.

Sorg C, Riedl V (equal contribution), Mühlau M, Calhoun VD, Eichele T, Läger L, Drzezga A, Förstl H, Kurz A, Zimmer C, Wohlschläger AM.

Selective changes of resting-state networks in individuals at risk for Alzheimer's disease.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Nov 20;104(47):18760-5.

Carpentier A, Galanaud D, Puybasset L, Muller JC, Lescot T, Boch AL, Riedl V, Cornu P, Coriat P, Dormont D, van Effenterre R.

Early morphologic and spectroscopic magnetic resonance in severe traumatic brain injuries can detect "invisible brain stem damage" and predict "vegetative states".

J Neurotrauma. 2006 May;23(5):674-85.

Vortrag

„The default brain at rest, at work, failing and learning“

Human Brain Mapping Conference, San Francisco 2009

Curriculumsbeitrag

„GIFT – independent component analysis of neuroimaging data“

Richard-Jung Kolleg, Dt. Gesellschaft für klinische Neurophysiologie, München, 2009

Symposiumsbeitrag

„Der ‚Hirnruhezustand‘ und seine Implikationen für die Psychiatrie“

Dt. Gesellschaft für Psychiatrie, Berlin 2008

Vortrag

„Plasticity of intrinsic brain networks“

International Conference on Cognitive Neurosciences, Bodrum 2008

Danksagung

Im Moment scheint es so, als würde ich die längste Zeit meines Lebens mit wissenschaftlicher Forschung füllen. Diese Perspektive erfreut mich zusehends und ich möchte hier den Personen danken, die mich auf diesen Weg gebracht haben.

Unter Anleitung der Forschungsgruppe aus „1.39“ am Institut von Prof. Gänsbacher habe ich das Arbeiten im Labor erlernt. Besonders möchte ich mich hierfür beim Leiter der Arbeitsgruppe, Christian Plank, bedanken, sowie bei seinen Mitarbeitern Sabine Schwank, Franz Scherer, Ursula Putz und Burgl Hammerschmidt. Sie haben mich angeleitet und mir im Labor ihre Zeit bereitwillig zur Verfügung gestellt. Bei Herrn Axel Stemberger hatte ich den einzigen Kurs während meines Studiums mit 1:1 Betreuung und habe den intensiven wissenschaftlichen Austausch und gleichzeitig herzlichen Umgang in seinem Büro sehr genossen.

Bei allen Genannten habe ich ein ständiges Bohren nach Lösungen für wissenschaftliche Probleme, das konsequente Weiterverfolgen von Ideen und einen freundlichen Umgangston erlebt und werde versuchen, dies ebenfalls umzusetzen.

Schließen möchte ich mit einem nicht zu bemessenden Lob an euch, Jutta und Stefan, die ihr jede Abzweigung auf dem Weg hierher verständnisvoll mitgegangen seid.