

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

Fibrin(ogen) - ein neuer Träger für nicht virale Genvektoren

Christian Hacker

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen
Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. A. Stemberger

2. Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher

Die Dissertation wurde am 04.06.2008 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 24.09.2008
angenommen.

In Dankbarkeit meinen Eltern.

Teile der Arbeit wurden auf der 18. Jahrestagung der Internationalen Gesellschaft für Thrombose und Hämostasiologie in Innsbruck im Rahmen eines Vortrages vorgestellt und mit dem „**Best Abstract**“ – **Preis 2003** ausgezeichnet und der Abstract in folgendem Journal veröffentlicht:

Hacker C, Brandt S, Plank C, Stemberger A (2003) **Fibrin – a new tool for gene delivery**. AnnHematol.;82: S. 33.

Teile der Arbeit wurden in Vorträgen vorgestellt und in folgenden Abstracts/Zeitschriften veröffentlicht:

Schillinger U, Wexel G, Hacker C, Kullmer M, Stemberger A Plank C (2004) **Copolymer-protected vector mediated BMP-2 gene delivery to articular chondrocytes in a 3-dimensional injectable fibrin matrix for tissue engineering**. Mol Ther; 9:S.321.

Plank C, Schillinger U, Hacker C, Brill T, Rudolph C, Krotz F, Hirschberger J, Stemberger A, Gansbacher B (2004) **Localized nucleic acid delivery to living cells using nanobiotechnology approaches**. Nanotechnology 4th IEEE Conference on; S. 242-244.

Schillinger U, Wexel G, Hacker C, Kullmer M, Koch C, Gerg M, Vogt S, Ueblacker P, Tischer T, Hensler D, Wilisch J, Aigner J, Walch A, Stemberger A, Plank C (2008) **A Fibrin Glue Composition as Carrier for Nucleic Acid Vectors**. Pharm Res; Epub.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen

I. Einleitung	1
1. Gentherapie – von der Idee zur Gegenwart	1
2. Virale Genvektoren	4
3. Nicht virale Genvektoren	6
4. Regenerative Medizin (Tissue Engineering)	11
5. Matrixvermittelter, lokaler Gentransfer zur Geweberegeneration	12
6. Fibrinogen und Fibrin	13
7. Der Fibrinkleber und das Prinzip der Fibrinklebung	16
8. Problemstellung der Arbeit	17
II. Material und Methoden	19
1. Statistik	19
2. Formulierung einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix	19
2.1. Material und Geräte	19
2.2. Formulierung der Genvektoren	20
2.3. Der Fibrinkleber	22
2.4. Formulierungen des Fibrinogen-Vektor-Gemisches	24
2.5. Die Gen-aktivierte Fibrin-Matrix	26
3. Analyse der Fibrinbildung bei Herstellung einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix	27
3.1. Material und Geräte	27
3.2. Verhalten der roTEG-Parameter Coagulation Time (CT), Clot Formation Time (CFT) und Maximum Clot Firmness (MCF) in Abhängigkeit von der Herstellung der Gen-aktivierten Fibrin-Matrix	27
3.2.1. Analyse eines Fibrinogen-Vektor-Gemisches nach Formulierung A: Mischen der Komponenten	27
3.2.2. Doppelt lyophilisierte Fibrinogenkomponente im Vergleich zu unbehandelter Fibrinogenkomponente	29
3.2.3. Analyse eines Fibrinogen-Vektor-Gemisches nach Formulierung B: gleichzeitiges Gefriertrocknen von Genvektoren und Fibrinogen	30

Inhaltsverzeichnis

4.	Freisetzung von als „nackte pDNA“ und „Hüllpolymer-PEI-pDNA“ formulierte, radioaktiv markierte pDNA aus der Gen-aktivierten Fibrin-Matrix in Abhängigkeit von der Formulierung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches	33
4.1.	Material und Geräte	33
4.2.	Markierung des Thymidinkinaseplasmides mit ¹²⁵ J	33
4.3.	Freisetzung der *pDNA aus einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix aus einem Fibrinogen-Vektor-Gemisch nach Formulierung B (gemeinsames Gefriertrocknen der Fibrinogenkomponente und der Genvektorformulierungen)	35
4.4.	Freisetzung der *pDNA aus einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix aus einem Fibrinogen-Vektor-Gemisch nach Formulierung C (Lösen lyophilisierter Genvektorformulierungen mit der Fibrinogenkomponente)	37
5.	Erprobung einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix in der Zellkultur	38
5.1.	Material und Geräte	38
5.2.	Zellkulturmethoden	38
5.3.	Puffer für den Luciferasetest	40
5.4.	Transfektion primärer Kaninchenchondrozyten durch eine mit einem GFP-Plasmid beladene Gen-aktivierte Fibrin-Matrix	41
5.5.	Transfektion primärer, humaner Keratinozyten durch eine mit Luciferaseplasmid beladene Gen-aktivierte Fibrin-Matrix	42
5.6.	Transfektion primärer, humaner Keratinozyten durch eine mit Luciferaseplasmid beladene Gen-aktivierte Fibrin-Matrix mit optimiertem Herstellungsverfahren	45
III.	Ergebnisse	48
1.	Analyse der Fibrinbildung unter Einfluss von nicht viralen Genvektoren bei unterschiedlicher Formulierung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches	48
1.1.	Fibrinbildung der doppelt lyophilisierten Fibrinogenkomponente im Vergleich zur unbehandelten Fibrinogenkomponente des Fibrinklebers	50
1.2.	RoTEG-Analyse der Fibrinbildung in Abhängigkeit unterschiedlich formulierter Fibrinogen-Vektor-Gemische	51
2.	Freisetzung von nackter pDNA und Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexen aus einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix	57
2.1.	Das ¹²⁵ Jod markierte Thymidinkinaseplamid	57

Inhaltsverzeichnis

2.2.	Versuchsaufbau und Auswertung der Messdaten	57
2.3.	Freisetzung von als nackte pDNA formulierte *pDNA aus einer Gen-aktivierte Fibrin-Matrix (Abb. 13)	59
2.4.	Gen-aktivierte Fibrin-Matrix und Freisetzung der *pDNA aus Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexen (Abb. 14)	62
3.	Erprobung einer Gen-aktivierte Fibrin-Matrix in der Zellkultur	64
3.1.	Transfektion von Kaninchenchondrozyten	64
3.2.	Transfektion von humanen Keratinozyten	67
IV.	Diskussion	74
1.	Zielsetzung der Arbeit	74
1.1.	Das Prinzip der Gen-aktivierte Matrix	74
1.2.	Fibrin als Träger in einer Gen-aktivierte Fibrin-Matrix	76
1.3.	Nicht virale Genvektoren	76
1.4.	Ziele der Arbeit	77
2.	Einfluss von nicht viralen Genvektoren auf die Fibrinpolymerisation	78
3.	Freisetzung nicht viraler Genvektoren aus einer Gen-aktivierte Fibrin-Matrix	82
4.	In-vitro Versuche	86
4.1.	Humane Keratinozyten als Ziel einer lokalen Gentherapie	86
4.2.	Chondrozyten als Ziel einer lokalen Gentherapie	87
4.3.	Transfektion primärer Zellen mit einer nicht viralen Gen-aktivierte Fibrin-Matrix	88
5.	Empfehlungen zur Formulierung einer Gen-aktivierte Fibrin-Matrix	92
6.	Klinische Relevanz einer Gen-aktivierte Fibrin-Matrix	94
V.	Zusammenfassung	96
VI.	Literaturverzeichnis	97
VII.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	112
VIII.	Danksagung	114
IX.	Lebenslauf	115

Verzeichnis der Abkürzungen

%	Prozent
*pDNA	radioaktiv markierte Plasmiddesoxyribonukleinsäure
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
c	Konzentration
CaCl ₂	Calciumchlorid
CFT	Gerinnselformierungszeit
cm	Zentimeter
COPROG	Copolymer-Protected-Gene-Vector
CT	Gerinnungszeit
d	Tage
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
EGF	Epidermal Growth Factor
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
g	Gramm
GAM	Gen-aktivierte Matrix
GFP	Green Fluorescent Protein
IE	Internationale Einheiten
J	Jod
kD	Kilodalton
KSFM	Keratinocyte Serum Free Medium
l	Liter
M	Molar
MCF	Maximale Gerinnselfestigkeit
mg	Milligramm
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minuten

Verzeichnis der Abkürzungen

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
PBS	Phosphate Buffered Saline
pDNA	Plasmiddesoxyribonukleinsäure
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin
pg	Pikogramm
PROCOP	Protective Copolymer
roTEG	Rotationsthrombelastograph
s	Sekunden
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TEG	Thrombelastographie
UpM	Umdrehungen pro Minute

I. Einleitung

1. Gentherapie - von der Idee zur Gegenwart

„Wir können bezüglich der weitreichenden Möglichkeit einer Therapie durch Isolation oder Entwicklung, Synthese und Einbau von neuen Genen in defekte Zellen einzelner Organe sogar ein bisschen optimistisch sein. Die Entwicklung einer kurativen Therapie [...] wird durch Veränderung und Regulation von Genaktivitäten oder durch die Reparatur oder den Ersatz von Genen geschehen.“ So skizzierte Edward Tatum 1966 die künftige Aussicht auf eine kurative Gentherapie (beim Menschen) anlässlich eines Vortrags über die Zukunft der Medizin an der Columbia University in New York (Tatum 1966). Heute, vierzig Jahre später, zählen neben den angeborenen Erbkranken erworbene maligne und vaskuläre Erkrankungen, sowie Infektionskrankheiten zu den häufigsten Indikationen klinischer Gentherapiestudien. Mittlerweile wurden weltweit über 1300 klinische Studien genehmigt, davon 358 alleine in Europa. Über 80 % davon sind noch Phase-I und Phase-I/II-Studien, rund 200 Studien haben jedoch Phase II, 32 bereits sogar Phase III erreicht (The Journal of Gene Medicine, Gene Therapy Trials Worldwide, 2007). Im Oktober 2003 wurde in China erstmals „Gendicine“ als Arzneimittel zur Behandlung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf und Halsbereich zugelassen. Es handelt sich dabei um einen nicht replikationsfähigen Adenovirus-Vektor, der das Wildtyp p53-Tumorsuppressorgen enthält (Peng 2005). Die Zulassung stieß allerdings auf heftige internationale Kritik, da sie ohne abgeschlossene Phase-III-Studie erfolgte und die meisten Studiendaten bislang nur in chinesischen Fachmagazinen publiziert wurden (Xin 2006, Guo und Xin 2006).

Der Grundstein für die heutige molekulare Medizin wurde Mitte des 20. Jahrhunderts gelegt, als Avery 1944 erkannte, dass Nukleinsäure und nicht Protein der Träger der genetischen Information ist, und Watson und Crick 1953 die Darstellung der DNA-Struktur gelang (Avery et al. 1944, Watson und Crick et al. 1953). In den darauf folgenden Jahren stand die Entschlüsselung des genetischen Codes im

I. Einleitung

Vordergrund, dessen Kenntnis eine Voraussetzung für jede Gentherapie darstellt. Die Pathogenese von immer mehr Krankheiten konnte auf einzelne, defekte Gene oder eine Serie von Gendefekten zurückgeführt werden. Basierend auf diesen Erkenntnissen versuchte Rodgers 1970 erstmals zwei Patientinnen, die an Arginämie litten, durch Verabreichung eines Shope-Papilloma-Virus, der das Gen für das Enzym Arginase enthielt, zu therapieren (Rogers 1976). Der erhoffte Erfolg der Behandlung blieb aber aus. Anstatt dessen wurden die ethischen Bedenken gegenüber einer Gentherapie am Menschen immer lauter. In dem renommierten Wissenschaftsmagazin Science sprachen sich T. Friedmann und R. Roblin 1972 zwar für die weitere Erforschung von Gentherapietechniken, gleichzeitig aber gegen die weitere Anwendung am Menschen aus. „Das Wissen über Genregulation und –rekombination, Beziehung zwischen molekularem Defekt und Krankheitsstadium sowie direkte und langfristige Nebenwirkungen sei derzeit noch inadäquat und rudimentär“ (Friedmann und Roblin 1972). Als Reaktion auf die Bedenken in Wissenschaft und Gesellschaft wurde 1974 das „Recombinant DNA Advisory Committee“ in den USA zur Verbesserung der Sicherheit und Transparenz der klinischen Forschung mit rekombinatem Material gegründet (Recombinant DNA Advisory Committee, 2007). Die erste genehmigte, klinische Gentherapiestudie wurde am 14. September 1990 durchgeführt. Der damals vier Jahre alten Ashanthi DeSilva, die aufgrund eines Adenosindesaminase (ADA)-Mangels an einer angeborenen Immunschwäche litt, wurden ihre eigenen, genetisch modifizierten T-Lymphozyten reimplantiert. Das gesunde ADA-Gen wurde zuvor ex vivo mittels eines Retrovirus in die Immunzellen eingeschleust (Blaese et al. 1995). Allerdings erhielt die Patientin zusätzlich das Enzym in geringen Mengen, weshalb der Erfolg der Gentherapie in der Fachwelt immer noch umstritten ist. Die erste klinische nicht virale Gentherapiestudie erfolgte 1992 an fünf HLA-B7-negativen Patienten mit fortgeschrittenem Melanom. Ihnen wurden DNA-Liposomen-Komplexe eines für HLA-B7 codierenden Genes in befallene Lymphknoten injiziert, um eine Immunreaktion gegen die Tumorzellen auszulösen. Die Methode erwies sich als sicher. Zusätzlich zeigte sich bei einem Patienten eine Rückbildung des behandelten Lymphknotens begleitet von der Regression entfernt liegender Knoten (Nabel et al. 1993). Weitere Heilungserfolge durch eine Gentherapie wurden im Jahr 2000 von der Arbeitsgruppe um A. Fischer berichtet. Kinder, die an SCID-X1, einer X-chromosomal vererbten, schweren, kombinierten Immunschwäche, litten, zeigten

I. Einleitung

nach Behandlung nahezu eine Normalisierung ihrer Immunzellzahl (Cavazzana-Calvo et al. 2000). Ihnen wurden $CD34^+$ hämatopoetische Stammzellen reinfundiert, in die zuvor ex vivo mit Hilfe eines vom Moloney Retrovirus abstammenden, defekten Virus das für den gamma-c-Zytokinrezeptor codierende Gen eingeschleust wurde. Heilung gelang bislang nur durch eine Knochenmarkstransplantation, deren Mortalität bei über 30 % liegen kann (Trent und Alexander 2004). Bisher wurden 14 SCID-X1 Patienten mittels Gentherapie behandelt (Hacein-Bey-Abina et al. 2002, Gaspar et al. 2004). Überschattet wurde diese Erfolgsmeldung durch das Auftreten eines leukämieähnlichen Syndroms in 4 der behandelten Patienten einige Jahre nach Therapie (Kohn et al. 2003, Pike-Overzet et al. 2007). Das therapeutische Gen wurde bei 2 der Patienten durch das Retrovirus in der Nähe des Onkogens LMO2 eingebaut und führte so zur unkontrollierten Proliferation der T-Zellen (Hacein-Bey-Abina et al. 2003, McCormack und Rabbitts 2004). Diese Ergebnisse verdeutlichen, welche Herausforderungen und therapeutischen Möglichkeiten die Gentherapie mit sich bringt. Sie zeigen aber auch den dringenden Bedarf an verbesserten und vor allem sicheren Methoden für den Gentransfer in menschliche Zellen (Berns 2004).

Grundlage der Gentherapie ist der Gentransfer. Hierunter versteht man das gezielte Einbringen von Genen oder Polynukleotiden in Zellen. Gentherapie selbst ist definiert als Gentransfer in menschliche Zellen oder Gewebe mit therapeutischer Zielsetzung. Handelt es sich hierbei um menschliche Körperzellen, so spricht man von somatischem Gentransfer bzw. somatischer Gentherapie. Diese Begrifflichkeit soll der Abgrenzung zum Gentransfer in Zellen der Keimbahn Ausdruck verleihen. Aufgrund ethischer Bedenken ist eine intensive Diskussion zwischen Wissenschaft, Politik und Gesellschaft, auch im Hinblick auf die embryonale Stammzellforschung voll entbrannt. Wie eingangs beschrieben, kann ein somatischer Gentransfer eingesetzt werden, defekte Gene bei Erblichen zu ersetzen. Er kann aber auch benutzt werden, um physiologische Genfunktionen zu verstärken oder eine pathogene Genexpression zu unterdrücken. Eine Gentherapie kann in vivo und ex vivo durchgeführt werden. Bei der in-vivo-Gentherapie wird das genetische Material direkt in den Organismus eingebracht, während der Gentransfer bei der ex-vivo-Gentherapie außerhalb des Körpers erfolgt. Dem Organismus werden dabei zunächst Körperzellen entnommen und nach Einbringen des genetischen Materials wieder reimplantiert (Bundesärztekammer, 1995). Als Vehikel für den Transfer des genetischen Materials in Körperzellen verwendeten 67 % aller klinischen Studien

I. Einleitung

Viren, allen voran Adeno- und Retroviren. In rund einem Viertel der Studien wurden nicht virale Gentransfermethoden eingesetzt, hier in erster Linie nackte Plasmid-DNA mit 18 % und die Lipofektion mit 7,6 % (The Journal of Gene Medicine, Gene Therapy Trials Worldwide, Stand 2007).

2. Virale Genvektoren

Im Zuge der Evolution haben sich Viren angepasst, um die natürlichen Barrieren von Organismen zum Schutz der genetischen Information zu umgehen. Ihrer Virulenz beraubt, stellen Viren damit ideale Vehikel für den Transfer von Genen dar. Am häufigsten werden Adenoviren, Retroviren, Vacciniaviren, Pockenviren und Adeno-assoziierte Viren eingesetzt (The Journal of Gene Medicine, Gene Therapy Trials Worldwide, 2007). Jeder virale Vektor hat dabei seine eigenen Vor- und Nachteile. Retrovirale Vektoren werden seit mehr als 20 Jahren für den Transfer von Genen in Wirtszellen verwendet. Sie stammen von Retroviren ab, welche zur Gruppe der RNS-Viren gehören. Ihr Viruskapsid ist zusätzlich von einer Lipidhülle umgeben und enthält 2 identische Kopien einer linearen Einfachstrang-RNA, sowie reverse Transkriptasen, Integrasen und Proteasen. Die beliebtesten retroviralen Vektoren basieren auf dem „moloney murine leukaemia (MoMuL)“-Virus. Diese Viren können die Kernmembran nicht überschreiten und damit nur Zellen transduzieren, die sich in Teilung befinden (Miller et al. 1990). Dies ist vor allem bei der Therapie von Tumoren interessant, da proliferierende Tumorzellen infiziert, gesunde, vermehrt ruhende Zellen aber eher von einer Transduktion ausgespart werden können (Barquintero et al. 2004). Trotz viel versprechender Ergebnisse im Tiermodell, konnte durch eine adjuvante Genthherapie mit intratumoral applizierten, Virusproduzierenden Zellen im Rahmen einer klinischen Phase III-Studie bei Patienten mit Glioblastoma multiforme, einem schnell wachsenden Gehirntumor, keine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit erzielt werden (Culver et al. 1992, Rainov 2000). Neben dem MoMuL-Virus kommen auch andere retrovirale Genvektoren zum Einsatz, hierunter beispielsweise Lentiviren. Sie sind in der Lage, ruhende Zellen zu transduzieren. Bekanntester Vertreter ist das HI-Virus Typ I. Retrovirale Genvektoren integrieren ihr genetisches Material in jenes der Wirtszelle und führen zu einer lang anhaltenden, stabilen Genexpression (Cone und Mulligan

I. Einleitung

1984). Sie eignen sich deshalb besonders zur Gentherapie monogener Erblichen. Die Integration birgt jedoch die Gefahr einer Schädigung des Wirtsgenoms in sich. Sie hat im Falle der SCID-X1 Patienten zur Onkogenese geführt. Gamma-retrovirale Vektoren zeigen *in vitro* eine gehäufte Integration im Bereich von Protoonkogenen und wachstumsregulierenden Genen in CD34⁺ Zellen (Cattoglio et al. 2007). Um den Gentransfer mit Retroviren also sicherer zu gestalten, müsste der ideale Vektor so konstruiert werden, dass die Integration seines Gens an einer spezifischen Stelle im Genom der Wirtszelle erfolgt (Yi et al. 2005). Eine andere Möglichkeit, die Sicherheit von Retroviren zu erhöhen, stellt der parallele Transfer eines Suizidgens mit induzierbarem Promoter dar. Im Falle einer ungewollten Proliferation kann der Bestand transduzierter Zellen über eine medikamentös induzierte Expression des Suizidgens reguliert werden (Uchiyama et al. 2006).

Im Gegensatz zu Retroviren integrieren Adenoviren das Transgen nicht in das Genom der Wirtszelle. Sie können sowohl ruhende als auch teilende Zellen transduzieren und lassen sich in hohen Titern produzieren (Bangari und Mittal 2006). Sie bewirken eine transiente Genexpression (Young et al. 2006). Die Immunreaktion, die Adenoviren im menschlichen Organismus auslösen, ist jedoch ein schwerwiegendes Problem für die klinische Anwendung. An der Applikationsstelle kommt es innerhalb von Stunden zur Ausschüttung von Chemokinen und Cytokinen, gefolgt von einer spezifischen Immunantwort (Bessis et al. 2004). Eine überschießende Immunreaktion verlief bei einem Patienten im Rahmen einer klinischen Gentherapiestudie 1999 tödlich (Raper et al. 2003). Ihm wurde eine sehr hohe Virusdosis des humanen Adenoviruses, mit dem Ornithin-Transcarbamylase-Gen injiziert. Die hohe Virusdosis erwies sich als hepatotoxisch. Unspezifische und spezifische Immunreaktion vermindern zudem die Effizienz der Transduktion und die Dauer der Expression des Transgens (Bangari und Mittal 2006). Die dritte Generation von Adenoviren, sogenannte „high capacity“ – Adenoviren (auch als „gutless“ – oder „helper dependent“ – Adenoviren bezeichnet), bei denen der größte Teil des viralen Genoms entfernt wurde, schienen zunächst sicherer als Adenoviren der ersten Generation zu wirken (Morral et al. 1998, Schiedner et al. 1998). Doch hohe systemische Dosen wirkten toxisch und letal (Brunetti-Pierri et al. 2004). Immunsuppression, Immunmodulation oder Veränderungen des Viruskapsids sind nur einige von verschiedenen weiteren Ansätzen mit dem Ziel, den Gentransfer mit Adenoviren zu verbessern (Bangari und Mittal 2006).

I. Einleitung

Die Rückschläge der klinischen Gentherapiestudien der letzten Jahre machen deutlich, wie wichtig die Entwicklung von sicheren Systemen für den Gentransfer ist. Neben rekombinanten Viren sind nicht virale Genvektoren eine effektive, attraktive und sicherere Alternative (Glover et al. 2005).

3. Nicht virale Genvektoren

Im Vergleich zu rekombinanten Viren besitzen nicht virale Genvektoren eine einfachere Struktur. Sie lassen sich dadurch leicht anwenden und in großer Menge bei niedrigeren Kosten produzieren. Das Fassungsvermögen an Nukleinsäure ist bei nicht viralen Genvektoren im Gegensatz zu viralen nicht durch ein Viruskapsid beschränkt. Die Gewebespezifität nicht viraler Genvektoren kann durch Kopplung an Liganden erhöht werden (Niidome und Huang 2002). Bei all diesen Vorteilen ist die Transfektionseffizienz der nicht viralen Genvektoren jedoch geringer als jene rekombinanter Viren. Wird Plasmid-DNA, als einfachster nicht viraler Genvektor, in vivo intravenös injiziert, liegt ihre Halbwertszeit unter 10 Minuten, da sie rasch von Serumnukleasen abgebaut wird (Kawabata et al. 1995). Als Liposom-pDNA formuliert, erreichen in vitro von 10^6 Plasmiden pro Zelle rund 300 intakte Plasmide den Zellkern (Felgner und Ringold 1989). Auf dem Weg von der Verabreichung nicht viraler Genvektoren hin zu einer effektiven Expression des Transgens sind eine Reihe von extra- und intrazellulären Barrieren zu überwinden: Diese sind (1) im Extrazellularraum die chemische Stabilität der pDNA und physikalische Stabilität des verwendeten Vehikels, (2) im Bereich der Zellmembran die Interaktion mit der Zelloberfläche und die Aufnahme des nicht viralen Genvektors in die Zelle durch Endozytose, (3) im Endosom die rechtzeitige Freisetzung in das Zytoplasma, bevor es zur Wiederfreisetzung an die Zelloberfläche oder zum Abbau im Lysosom kommt, (4) im Zytoplasma der Transport zum Zellkern und der drohende Abbau durch zytosolständige Enzyme, (5) im Bereich der Zellkernmembran deren aktive oder passive Durchquerung (Wiethoff und Middaugh 2002, Lechardeur und Lukacs 2006). Während sich der Eintritt nicht viraler Genvektoren in Zytoplasma und Zellkern mit physikalischen Methoden erleichtern lässt, können chemische Verfahren dazu beitragen, nicht virale Genvektoren vor intravasalen Interaktionen und extra- und intrazellulärem Abbau zu schützen. Arbeiten der letzten Jahre zeigen, dass eine

I. Einleitung

effiziente Transfektion und eine lang anhaltende Genexpression auch mit nicht viralen Genvektoren erzielt werden können (Glover et al. 2005).

Physikalische Methoden üben eine physikalische Kraft auf Zell- und Kernmembran aus, um pDNA in die Zielzelle einzuschleusen (Gao et al. 2007). Mikroinjektion, hydrodynamische Injektion, „Gene Gun“, Elektroporation, Sonoporation, Laserbestrahlung und Magnetofektion sind hierbei gängige Verfahren (Wells 2004). Die Mikroinjektion, bei der pDNA direkt in eine Zelle oder den Zellkern injiziert wird, ist zwar einfach und sicher, allerdings aufgrund der geringen transfizierten Zellzahl nicht praktikabel (Mehier-Humbert und Guy 2004). Magnetofektion und das Prinzip der „Gene Gun“ hingegen führen in vitro und in vivo zu einer hohen, lokalen Genexpression (Krotz et al. 2003, Plank et al. 2003, Dileo et al. 2003). Mittels Magnetofektion werden an Eisenoxid gebundene Genvektoren durch ein magnetisches Feld in Zellen eingeschleust (Scherer et al. 2002). Bei dem Verfahren der „Gene Gun“ werden Zellen mit pDNA-umhüllten Mikropartikeln beschossen (Yang et al. 1990). Die „Gene Gun“ wird derzeit in 5 klinischen Studien zur genetischen Immunisierung gegen Hauttumoren erprobt (The Journal of Gene Medicine, Gene Therapy Trials Worldwide, 2007). Physikalische Methoden können zur Steigerung der Effizienz mit chemischen Verfahren kombiniert werden (Mehier-Humbert und Guy 2004).

Chemische Verfahren zur Steigerung der Transfektionseffizienz nackter pDNA können in Lipid- und Polymer-vermittelte Systeme eingeteilt werden. Lipid-vermittelte Gentransfersysteme basieren auf neutralen, anionischen oder kationischen Lipiden, wobei letztere unter den Lipiden am häufigsten verwendet werden. Sie formen aufgrund ihrer positiven Ladung mit der negativ geladenen pDNA die Lipid-pDNA-Komplexe (Li und Ma 2001). Während die Lipid-pDNA-Komplexe in vitro zu einer effizienten Genexpression führen, fällt dieser Effekt in vivo deutlich schwächer aus (Li und Huang 1997). Wurde ihre Toxizität anfangs noch als gering eingestuft, so zeigte sich im Verlauf, dass Lipid-pDNA-Komplexe in Abhängigkeit von ihrer Struktur und Formulierung Zellen unterschiedlich stark schädigen und eine Immunreaktion auslösen können (Stewart et al. 1992, Li et al. 1999, Lv et al. 2006). Dies kann bis zur Aktivierung von Apoptosegenen reichen (Nguyen et al. 2007). Eine Immunreaktion geht wiederum mit einer verminderten Transgenexpression einher (Sellins et al. 2005). Zudem aktivieren bestimmte Formulierungen das Komplementsystem, gleichzeitig kann durch Lipid-pDNA-

I. Einleitung

Komplexe die Produktion proinflammatorischer Mediatoren reduziert werden (Plank et al. 1996, Filion und Phillips 1997). Erste klinische Studien mit Lipid-pDNA-Komplexen wiesen an erwachsenen Patienten mit zystischer Fibrose eine Genexpression in den Atemwegen nach, allerdings zeigte ein Großteil dieser Patienten nach Applikation der Genvektoren eine grippe-ähnliche Erkrankung (Alton et al. 1999, Ruiz 2001). Nach lokaler Applikation im Bereich des nasalen Epithels, erwies sich nackte pDNA zudem als gleich effizient wie Lipid-pDNA-Komplexe (Zabner et al. 1997). Bei den derzeit genehmigten klinischen Studien werden die Lipid-pDNA-Komplexe ausschließlich lokal, entweder ex vivo, subkutan oder intratumoral appliziert (The Journal of Gene Medicine, Gene Therapy Trials Worldwide, 2007).

Kationische Polymere lassen sich in synthetische Polymere wie Polyethylenimin (PEI), Poly(beta-Amino-Ester), PDMAEMA oder Dendrimere und natürliche vorkommende wie Poly-L-lysin (PLL), Chitosan oder Dextran unterteilen. Sie sind aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen mit der negativ geladenen pDNA in der Lage, diese zu Nanopartikel, den sogenannten Polyplexen, zu verdichten (Tiera et al. 2006). Deren Durchmesser liegt mit 80 - 100 nm in der Größenordnung zahlreicher Viren (Wagner et al. 1991). Der entscheidende Schritt nach Aufnahme in die Zelle besteht in der erfolgreichen Freisetzung der Polyplexe aus dem Endosom in das Zytoplasma. Viele der kationischen Polymere haben sich gerade hier als insuffizient erwiesen (Garnett 1999). Die Transfektionseffizienz lässt sich durch Kopplung mit Peptiden, die zu einer Ruptur der Endosomenmembran führen, deutlich verbessern (Wagner et al. 1992, Plank et al. 1994). Im Gegensatz zu den meisten anderen kationischen Polymeren bewirkt PEI aufgrund des „proton sponge“-Effektes eine Ruptur der endosomalen Membran, ohne dass zusätzliche Hilfssubstanzen benötigt werden. Da jedes dritte Atom des PEIs ein Aminostickstoff ist, stehen zahlreiche Stickstoffgruppen für eine Protonierung zur Verfügung. Dadurch kann PEI die in das Endosom gepumpten Protonen wie ein Schwamm aufnehmen, was zum Anschwellen der Polyplexe führt. Zum Ladungsausgleich einströmende Chloridionen, gefolgt von Wasser führen zusammen mit den anschwellenden Polyplexen zu einer Volumenzunahme des Endosoms und damit letztlich zur Ruptur seiner Membran (Boussif et al. 1995, Sonawane et al. 2003). Allerdings erwiesen sich PEI und PEI-basierende Polyplexe als zytotoxisch (Godbey et al. 2001). Daneben binden intravasal injizierte PEI-pDNA-Komplexe aufgrund

I. Einleitung

ihrer positiven Ladung zahlreiche Plasmaproteine, aktivieren das Komplementsystem und bewirken eine Erythrozytenaggregation (Plank et al. 1996, Ogris et al. 1999). Um sich weiter der Vorteile des PEIs bei der Entwicklung von nicht viralen Genvektoren bedienen zu können, bedarf es neuer Strategien, die diese Interaktionen minimieren und den Gentransfer mit PEI-basierenden Vektoren damit sicherer gestalten.

Zu diesem Zweck koppelten Ogris und Mitarbeiter Polyethylenglykol (PEG) kovalent an PEI-pDNA-Komplexe und konnten so die positive Oberflächenladung der PEI-pDNA-Komplexe reduzieren. Daraus resultierte in vivo eine deutlich herabgesetzte Bindung von Plasmaproteinen, sowie eine verminderte Erythrozytenaggregation. Gleichzeitig verlängerte sich die Zirkulationszeit der Komplexe im Blutkreislauf (Ogris et al. 1999). Finsinger und Mitarbeiter aus der eigenen Arbeitsgruppe entwickelten ein anionisches Copolymer, das sich alleine durch elektrostatische Wechselwirkung um formierte Polyplexe lagert. Es basiert auf einem PEG-Peptid-Copolymer mit negativ geladenen Seitenketten. Diese treten mit der positiv geladenen Oberfläche der PEI-pDNA-Komplexe in Interaktion, so dass nach außen eine neutrale Oberflächenschicht aus PEG-Schleifen entsteht. Dadurch sind die Polyplexe in vivo gegen Interaktionen mit Blutbestandteilen abgeschirmt. In die Zelle aufgenommen, kommt es aufgrund des saueren pH-Wertes im Endosom zur Protonierung der Glutaminsäuren in den Peptidseitenketten. Dies führt zur Aufhebung der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen dem Copolymer und den Polyplexen, wodurch die Polyplexe in das Endosom freigesetzt werden (Finsinger et al. 2000). Nach intravenöser Injektion zeigten die Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe im Vergleich zu ungeschützten PEI-pDNA-Komplexen eine deutlich erhöhte Genexpression.

I. Einleitung

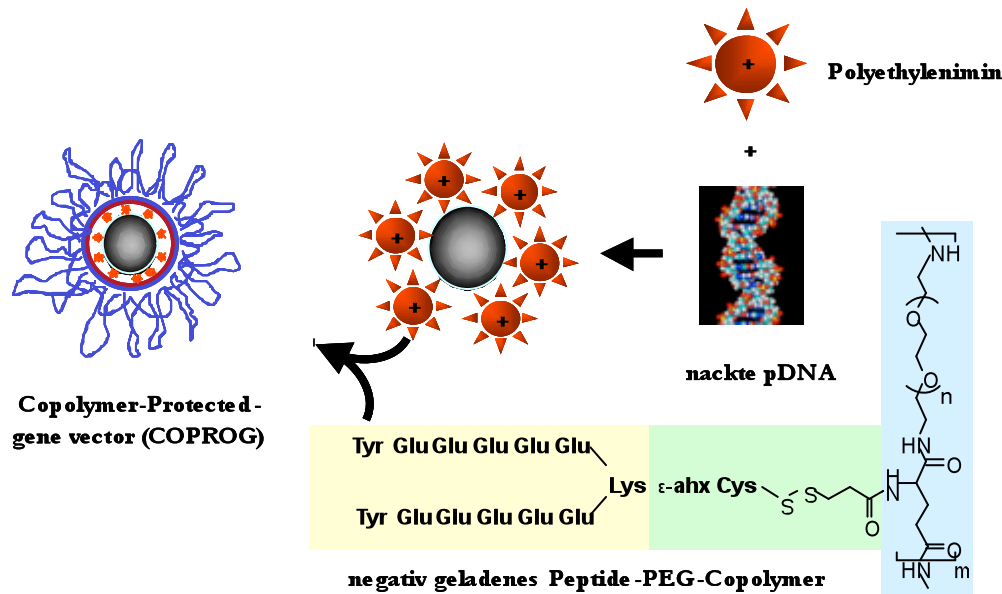


Abb. 1: Synthese und Aufbau der in der Arbeitsgruppe hergestellten Copolymer-geschützten Genvektoren (COPROG's) nach Finsinger und Mitarbeiter.

In Abhängigkeit vom Molekulargewicht des PEGs konnte vor allem in Lunge und Leber die höchste Genexpression erzielt werden (Rudolph et al. 2002). PEG-Polymerbasierte Nanopartikel reichern sich nach systemischer Injektion in stark vaskularisiertem Gewebe an. Dies ist vor allem hinsichtlich einer Tumorthherapie ein interessanter Aspekt (Brannon-Peppas und Blanchette 2004). Aufgrund der zahlreichen Variationsmöglichkeiten, die auf PEG-Polymeren basierende Nanopartikel bieten, sind sie derzeit die vielversprechendsten nicht viralen Gentransfersysteme für eine systemische Anwendung (Li und Huang 2006). Zur Erhöhung der Gewebespezifität lassen sich ungeschützte wie Copolymer-geschützte Polyplexe mit Liganden kovalent koppeln. Die Bindung von Transferrin an Polyplexe führte zu einer erhöhten Genexpression in subkutanen Neuro2a-Tumoren bei Mäusen im Vergleich zu Polyplexen ohne Ligand (Kircheis et al. 2001). Auch die Kopplung mit dem Wachstumsfaktor EGF bewirkt im Tiermodell eine erhöhte Genexpression im Tumor (Walker et al. 2005). Eine Alternative, eine hohe Genexpression im Zielgewebe zu erreichen, eröffnet sich mit den Techniken des lokalen Gentransfers. Der lokale Gentransfer mit nicht viralen Genvektoren bietet den Vorteil, dass unerwünschte systemische Wirkungen reduziert werden (Pannier und Shea 2004). Einfachster Ansatz sind hierbei physikalische Gentransfersysteme wie zum Beispiel die „Gene Gun“ oder die Magnetofektion. Sie bewirken durch

I. Einleitung

physikalische Konzentration der Genvektoren im Zielgewebe eine lokale Genexpression, sind allerdings auf Organoberflächen beschränkt (Wells 2004). Um eine lang anhaltende, lokale Genexpression in einem Gewebe zu erzielen, sind mit Genvektoren beladene Polymergerüste attraktive Alternativen. Vor allem Therapieansätze im Bereich der regenerativen Medizin greifen dabei häufig auf dieses Konzept zurück (Jang et al. 2004).

4. Regenerative Medizin (Tissue Engineering)

„Tissue Engineering“ ist eine fächerübergreifende Disziplin der Biologie, Materialwissenschaften, Physik, Chemie und Mathematik. Wesentliche Ziele sind die Wiederherstellung, der Erhalt oder die Verbesserung von Organ- oder Gewebefunktionen durch Bereitstellung von Zellen oder ganzen Geweben im Patienten (Langer und Vacanti 1993, Vacanti und Langer 1999, Stock und Vacanti 2001). Die zur Regeneration eines Gewebedefektes eingesetzten Zellen sind dabei autologen, allogenen oder xenogenen Ursprungs, wobei entweder auf ausdifferenzierte, organspezifische Zellen zurückgegriffen werden kann, oder pluripotente Stammzellen. Die Gewinnung von ausdifferenzierten Zellen kann allerdings im Falle mancher Gewebe, wie zum Beispiel Herzklappen nicht oder nicht in ausreichendem Umfang erfolgen (Stock und Vacanti 2001). Zwar lassen sich mit autologen, ausdifferenzierten Zellen immunologische Probleme umgehen, jedoch zeigen sie ein niedriges Wachstumspotential bei gleichzeitig vorangeschrittener Zellreife (Polak und Hench 2005). Stammzellen hingegen haben die Eigenschaft, dass sie sich über zahlreiche Generationen hin vermehren und in Abhängigkeit der Wachstumsbedingungen in verschiedene Zelltypen ausdifferenzieren können. Während in embryonale Stammzellen große Erwartungen gesetzt werden, ist ihre Anwendung aus ethischen, immunologischen und onkologischen Aspekten sehr bedenklich (Thomson et al. 1998, Polak und Hench 2005). Eine attraktive Alternative sind hier adulte Stammzellen. Ob Knochenmark, Haut, Fettgewebe oder Plazenta, mittlerweile können adulte Stammzellen aus den unterschiedlichsten Geweben gewonnen werden (Alison et al. 2002, Bianco und Robey 2001, Gimble et al. 2007, Yen et al. 2005). Die im Rahmen des Heilungsvorganges nötige Zelldifferenzierung in ein spezifisches Gewebe stellt einen komplexen, von zahlreichen Faktoren

I. Einleitung

abhängigen und beeinflussbaren Vorgang dar, in dem Zytokine, Wachstumsfaktoren, Zell-Zell-Interaktionen, sowie der Kontakt mit der extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle spielen (Gillitzer und Goebeler 2001, Blanpain et al. 2007). Getherapeutische Ansätze können bei der Geweberegeneration durch lokale Expression des Transgens in Form von Wachstumsfaktoren, Zelloberflächenrezeptoren, oder Transkriptionsfaktoren unterstützend eingreifen (Jang 2004, Bonadio 2000, Bleiziffer et al. 2007). Um der Geweberegeneration Raum zu bieten, werden die Zellen in Kombination mit natürlichen oder synthetischen Gewebegerüsten implantiert (Griffith und Naughton 2002). Neben dieser rein physikalischen Funktion lassen sich die Gewebegerüste als Trägermaterial für Proteine (Wachstumsfaktoren, Zytokine) und Nukleinsäuren einsetzen, um stimulierend und regulierend auf Gewebeneubildung einzuwirken (Murphy und Mooney 1999).

5. Matrixvermittelter, lokaler Gentransfer zur Geweberegeneration

Fang und Mitarbeiter stellten 1996 erstmals das Prinzip der sogenannten „Genaktivierten Matrix“ vor (Fang et al. 1996). Kollagenschwämme wurden mit zwei unterschiedlichen Plasmiden beladen, die jeweils für einen Wachstumsfaktor (Bone Morphogenetic Protein 4, Parathyroidhormon-Fragment) codierten. Nach Implantation in einen Knochendefekt bei Ratten zeigte sich eine über Wochen anhaltende, lokale Genexpression, sowie eine vermehrte Knochenneubildung (Fang et al. 1996). Nachfolgende Arbeiten unterschiedlicher Arbeitsgruppen demonstrierten, dass durch Kombination von Trägermaterialien und Genvektoren das Ausmaß und die Dauer der Expression des Transgens im Vergleich zu herkömmlichen, lokalen Gentransfermethoden, wie die direkte Injektion, erhöht werden kann. Durch die lokale Anwendung Matrix-basierter Gentransfersysteme lässt sich die Verteilung der Genvektoren in vom Zielgewebe entfernte Organe reduzieren, was gleichzeitig unerwünschte systemische Wirkungen minimiert (Panier und Shea 2004). Die eingesetzten Trägermaterialien unterstützen hierbei zusätzlich Zelladhäsion und -migration. Durch Kopplung mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix wie zum Beispiel Adhäsionsmolekülen, können die Zell-Matrix-Interaktionen weiter verstärkt werden (Hubbell 1999). Matrix-basierte Gentransfersysteme können so konstruiert werden, dass die Genvektoren entweder in das umliegende Gewebe

I. Einleitung

freigesetzt werden, oder fest an des Polymergerüst gebunden sind. In diesem Fall kommt es erst im Rahmen des Abbaus der Trägersubstanz durch die einwandernden Zellen zur Freisetzung der Genvektoren (Jang et al. 2004). Hyaluronsäure, Kollagen, Polylaktidsäure, Polyglykolsäure und Polyethylenglykol (PEG) werden beispielsweise als Trägermaterialien für den lokalen Gentransfer zur Geweberegeneration verwendet (Pannier und Shea 2004, Jang et al. 2004). Ein weiteres, in der Medizin vielseitig angewandtes Biomaterial ist Fibrin(ogen). Als Gerinnungsfaktor und aufgrund seiner Bedeutung in der Wundheilung, des breiten klinischen Einsatzes als Kleber in der Wundversorgung und seiner Polymerstruktur bietet sich Fibrin(ogen) auch als Trägermaterial für den lokalen Gentransfer im Rahmen der regenerativen Medizin an.

6. Fibrinogen und Fibrin

Fibrinogen ist ein 340 kD schweres Glykoprotein. Es setzt sich aus zwei identischen Untereinheiten zusammen, die wiederum aus je einer alpha-, einer beta- und einer gamma-Kette bestehen. Fibrinogen vereint in sich sowohl Eigenschaften eines globulären als auch eine fibrillären Proteins. Es wird in den Hepatozyten der Leber synthetisiert und ist ein „acute phase protein“. Die Expression aller drei Gene, die für Fibrinogen codieren, wird durch proinflammatorische Reize über Interleukin 6 gesteigert (Standeven et al. 2005). Fibrin als Monomer entsteht in der Endphase der plasmatischen Blutgerinnung bei der proteolytischen Abspaltung der Fibrinopeptide A und B durch die Serinprotease Thrombin (siehe Abb. 2, Seite 14). Die Monomere aggregieren aufgrund neu freigelegter, hydrophober Bezirke zu einem instabilen Fibrinpolymer. Gleichzeitig wird durch Thrombin die Transglutaminase Faktor XIII aktiviert. Der auf diesem Wege entstandene Faktor XIIIa bewirkt nun durch kovalente Quervernetzungen zwischen Lysyl- und Glutaminylresten die Ausbildung des stabilen Fibrinpolymers (Mosesson et al. 2001).

Fibrinogen und Fibrin besitzen eine Reihe unterschiedlicher Bindungsstellen, über die sie mit zahlreichen anderen Proteinen interagieren können (siehe Tabelle 1, Seite 16). Auf diese Weise besitzen Fibrinogen und Fibrin zahlreiche überschneidende Funktionen in der Hämostase und Fibrinolyse, der Interaktion von zellulärer und

I. Einleitung

extrazellulärer Matrix, bei Entzündungsreaktionen, sowie bei der Wundheilung und bei Neoplasien (siehe Abb. 3, S. 15).

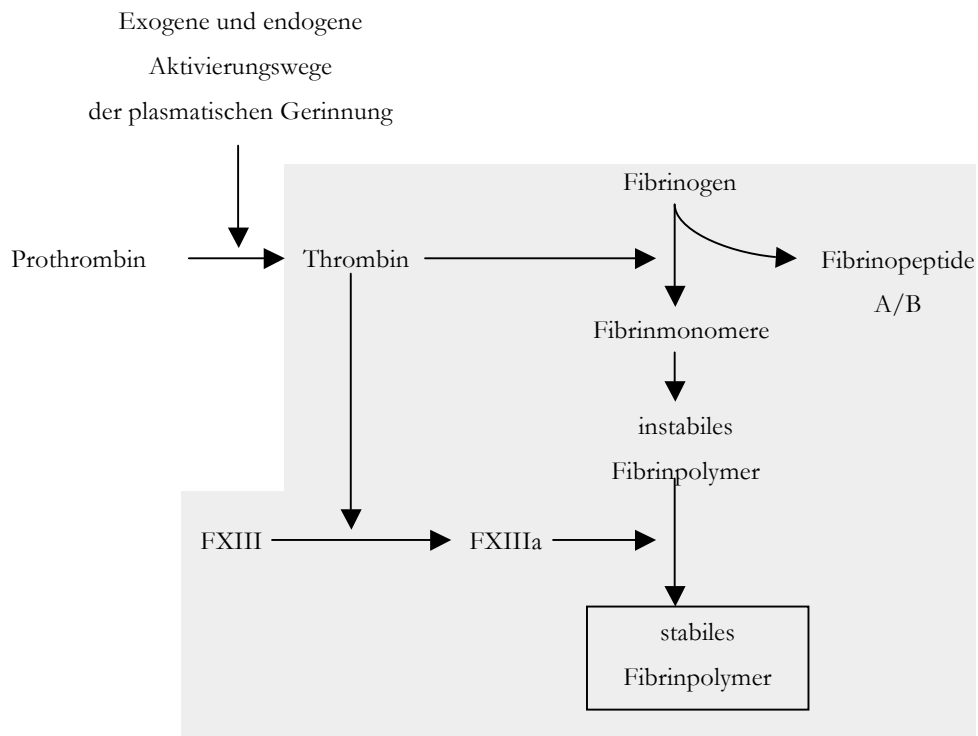


Abb. 2: Letzte Schritte der Blutgerinnung. Schritte, die auch bei der Fibrinklebung ablaufen, sind grau unterlegt.

Die vielseitige funktionelle Bedeutung von Fibrin(ogen) im Rahmen der Wundheilung ist von großer Bedeutung. Nach einer Gewebeerletzung übernimmt das entstandene Fibringerinnsel die Blutstillung im Wundbereich und bildet gleichzeitig ein vorläufiges Gerüst, über das Gewebszellen in den Wundbereich einwandern können. Fibrin stellt eine Leitschiene für die einwandernden Zellen dar und fördert diesen Vorgang in Verbindung mit weiteren Proteinen wie beispielsweise Fibronectin. Durch Interaktion mit den Proteinen des Fibrinolyse-Systems wie Plasminogen, sowie Inhibitoren des Plasminogens, greift Fibrin teilweise regulierend in seinen eigenen Abbauprozess ein. Die Abbauprodukte sind wiederum chemotaktische Reize für neutrophile Granulozyten und Monozyten. So ist die Reepithelialisierung abhängig von dem Gehalt an Fibrinogen/Fibrin im Wundspalt. Fibrin stimuliert die Proliferation und Migration von Fibroblasten und fördert auf diesem Wege die Ausbildung eines Granulationsgewebes. Auch an der Neubildung

I. Einleitung

von Gefäßen und der Kapillaraussprossung im Rahmen der Wundheilung ist es aktiv beteiligt (Clark 2001, Laurens et al. 2006).

S. Bergel erkannte die physiologische Bedeutung des Fibrins und empfahl bereits im Jahre 1909 seine Anwendung in der Humanmedizin. Es „ist [...] ein physiologisches Mittel, mit dem es gelingt, dem Endziele einer rationellen, physiologischen Wundbehandlung nahezukommen, insofern als man mit ihm dieselben physiologischen Wirkungen und Heilungsvorgänge nachzuahmen bzw. zu erzeugen vermag, mit Hilfe derer der reaktionsfähige Körper selbst die Heilung zustande bringt.“ (Bergel 1909). Grey und Harvey setzten 1915 bzw. 1916 Fibrin zur Hämostase bei Blutungen parenchymatöser Organe ein (Grey 1915, Harvey 1916). Im Jahre 1944 verwendeten Cronkite und Mitarbeiter Fibrin im Rahmen von Hauttransplantationen an Verbrennungswunden bei Verletzten im II. Weltkrieg (Cronkite et al. 1944). Zahlreich auftretende Hepatitisinfektionen hatten die Technik jedoch in Verruf gebracht. Erst nach fast 30 Jahren wurde die Anwendung von Fibrin zur Wundheilung wiederentdeckt. Matras und Mitarbeiter verwendeten eine hochkonzentrierte Fibrinogenlösung in Verbindung mit einer Thrombinlösung zur Klebung von Nerven Anastomosen (Matras et al. 1972). Mitte der siebziger Jahre erschienen die ersten Ergebnisse über den klinischen Einsatz der Fibrinklebung. (Spängler et al. 1976). Seither nahm die Zahl der klinischen Anwendungen und somit der Publikationen exponentiell zu. Letztere beläuft sich derzeit auf über 3000 Veröffentlichungen.

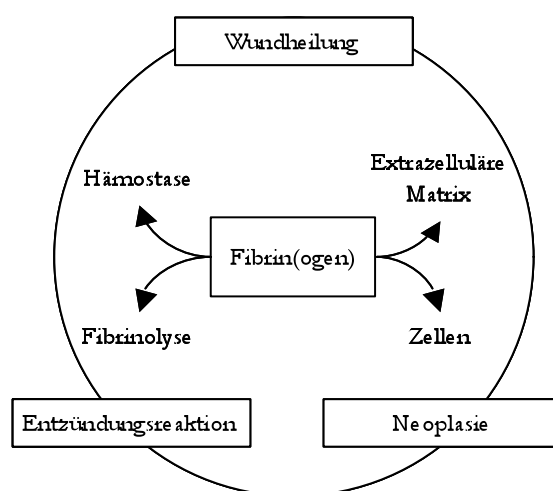


Abb. 3: Fibrin(ogen) spielt aufgrund seiner vielschichtigen, physiologischen Interaktionen mit der zellulären und extrazellulären Matrix eine zentrale Rolle bei Wundheilung, Entzündungsreaktion und bei Neoplasien (nach Mosesson 2005, Simpson et al. 2001).

I. Einleitung

Tabelle 1: Interaktion von Fibrin(ogen) durch Bindung von Proteinen und deren physiologische Funktion (nach Mosesson 2005).

Bindung von	Funktion
Antithrombin 1	Verminderung der Thrombinbildung in einem Blutgerinnsel
Faktor XIII A2B2-Komplex	Abnahme der Quervernetzungen durch Faktor XIII
Plättchen- α IIBb3-Rezeptor	Integration von Thrombozyten in einen Thrombus
tPA-Plasminogen-Fibrin-Komplex	Aktivierung von Plasminogen
α 2-Antiplasmin PAI-2 Lipoprotein(a)	Inhibierung von Plasminogen
Heparin	Thrombozytenausschüttung, Fibroblastenproliferation, Endothelzellausbreitung, Kapillaraussprossung
VE-Cadherin FGF-2, VEGF, IL-1	Gefäßneubildung, Kapillaraussprossung
Fibronectin	Interaktion mit extrazellulärer Matrix
MAC-1	Interaktion mit Monozyten und neutrophilen Granulozyten

7. Der Fibrinkleber und das Prinzip der Fibrinklebung

Bei der Fibrinklebung werden die letzten Schritte der plasmatischen Gerinnung nachgeahmt: hochkonzentriertes Fibrinogen wird durch Thrombin zur Gerinnung gebracht und das Fibringerinnsel zusätzlich durch Kalzium und Faktor XIII stabilisiert. Vom Paul-Ehrlich-Institut ist der Fibrinkleber in Deutschland seit 1982 als Arzneimittel zugelassen (Paul-Ehrlich-Institut, 1982). Die sogenannte Fibrinklebung spielt heutzutage in operativen Disziplinen eine bedeutende Rolle: so wird Fibrinkleber zur Blutstillung eingesetzt oder zur Wundadaption bei Haut- oder Nervenläsionen, um nur einige Anwendungsgebiete zu nennen. Darüber hinaus kann Fibrin als Träger für unterschiedliche Arzneimittel verwendet werden. Kabuto und Mitarbeiter versetzten Fibrinkleber mit einem Chemotherapeutikum zur lokalen, intraoperativen Chemotherapie von malignen Gliomen bei Ratten (Kabuto et al. 1995). Andere Arbeitsgruppen entwickelten aus Fibrin ein Depot für die lokale Freisetzung von Antibiotika (Kumar et al. 2004). Woolverton und Mitarbeiter verhinderten durch vorangehende Implantation Tetrazyklin-beladener Fibringerinnsel eine peritoneale Infektion im Tiermodell (Woolverton et al. 2001).

I. Einleitung

Eine Fibrinmatrix kann als Depot für Wachstumsfaktoren genutzt werden. Bhang und Mitarbeiter konnten *in vitro* die Freisetzung des NGF (nerve growth factor) aus einer mit Heparin modifizierten Fibrinmatrix über 14 Tage nachweisen (Bhang et al. 2007). Taylor und Mitarbeiter implantierten ein auf Fibrin basierendes Depotsystem, in das der Wachstumsfaktor Neurotrophin-3 (NT-3) eingearbeitet war, am Modell einer akuten Rückenmarksschädigung bei Ratten. Es ließ sich zwar nach einer Woche ein vermehrtes Wachstum neuronaler Fasern beobachten. Nach 12 Wochen zeigte sich jedoch keine funktionelle Verbesserung der motorischen Funktion im Vergleich zur Kontrollgruppe (Taylor et al. 2006).

Um eine verzögerte Freisetzung der eingesetzten Wachstumsfaktoren zu erreichen, wird die Fibrinmatrix meist modifiziert. Sakiyama-Elbert und Hubbell verwendeten hierzu beispielsweise Peptide, die zum einen Substrat für die Transglutaminase Faktor XIII sind, zum anderen eine Domäne zur Bindung von Heparin aufweisen. Durch Faktor XIII wurden diese Peptide in die Fibrinmatrix eingebaut und konnten ihrerseits Heparin-bindende Wachstumsfaktoren binden (Sakiyama-Elbert und Hubbell 2000). Um derartige Systeme zu verbessern, ist man auf der Suche nach weiteren Peptiden, die durch vergleichbare Mechanismen Wachstumsfaktoren an der Fibrinmatrix fixieren können (Willerth et al. 2007). Nach dem gleichen Prinzip gelang es Trentin und Mitarbeitern, nackte pDNA an die Fibrinmatrix zu binden (Trentin et al. 2005).

8. Problemstellung der Arbeit

Die Therapie von chronischen Wunden oder Knorpeldefekten stellt für die Medizin eine wachsende Herausforderung dar. Dies bedeutet neben der Verbesserung bisheriger Behandlungsstrategien gleichzeitig die Erforschung und Entwicklung neuer Systeme zur Geweberegeneration. Der lokale, Matrix-vermittelte Gentransfer mit nicht viralen Genvektoren ist eine sichere und akzeptierte Alternative zur systemischen Gentherapie. Daten auf dem Gebiet der Geweberegeneration belegen die vielversprechenden Ergebnisse. Fibrin als Gerüstbaustein der Wundheilung wird seit langem in der Behandlung von akuten und chronischen Wunden oder Knorpeldefekten in Gestalt des Fibrinklebers eingesetzt. Ziel vorliegender Arbeit war die Entwicklung eines Matrix-vermittelten Gentransfersystems auf der Basis nicht

I. Einleitung

viraler Genvektoren und Fibrin(ogen). Die unproblematische Handhabung im Hinblick auf Lagerungsfähigkeit und klinische Anwendung sind das Ziel der vorliegenden Entwicklung zur Formulierung der Gen-aktivierten Fibrin-Matrix. Die Arbeitsschritte bei der Herstellung der Fibrinmatrix sollten sich an jenen eines kommerziellen Fibrinklebers orientieren. Aufgrund bereits erhobener Daten für nackte pDNA, PEI-pDNA-Komplexe und Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe in Kombination mit Kollagenschwämmen, sollten entsprechende Genvektorkonstrukte im Rahmen der vorliegenden Arbeit formuliert werden. Die intakte Fibrinpolymerisation und die Freisetzung der Genvektoren aus der Fibrinmatrix wurden in Abhängigkeit der entwickelten Herstellungsmethode der Gen-aktivierten Fibrin-Matrix untersucht. Auf der Grundlage dieser Daten sollte die Formulierung für die Gen-aktivierte Fibrin-Matrix weiter optimiert werden und in der Zellkultur im Hinblick auf eine lang anhaltende Genexpression am Modell primärer Chondrozyten und Keratinozyten der klinisch relevante Einsatz untersucht werden.

II. Material und Methoden

1. Statistik

Die statistischen Auswertungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Frau Huber vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München. Für verbundene Stichproben wurde der Willcoxon-Test, für zwei unverbundene der Mann-Whitney-Test durchgeführt. Alle Tests erfolgten zweiseitig mit $p < 0,05$ als statistisch signifikant. Für die statistischen Berechnungen wurden SPSS Version 13 (SPSS Ing., Chicago, IL, USA) und Microsoft Excel (Microsoft Co., USA) verwendet. Vertikale Striche in den Diagrammen geben die einfache Standardabweichung wieder.

2. Formulierung einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix

2.1. Material und Geräte

Tabelle 2: Material und Geräte zur Formulierung einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix.

Material/Gerät	Bezeichnung/Bezugsquelle
Fibrinkleber:	TISSUCOL®-Kit Immuno Fa. Baxter, Wien, Österreich
Fibrinogenkomponente	Tissucol®, lyophilisiert
Thrombinkomponente	Thrombin human, lyophilisiert
Aprotininlösung	3000 KIE/ml
Calciumchloridlösung	40 mM
Verdünnungspuffer Fibrinogen	TISSUCOL® dilution buffer
Verdünnungspuffer Thrombin	Thrombin dilution buffer
GFP-Plasmid	PEGFP vector, Fa. Clontech, Palo Alto, USA
Hüllpolymer (protective copolymer, PROCOP)	P6YE5C, Herstellung im eigenen Labor nach Finsinger et al. 2000
Luciferaseplasmid	P55-pCMV-IVS-luc+, Fa. Bayer Corp., Emery Ville, USA
Lyophilisator (Gefriertrocknung)	Hetosicc CD4, Fa. Heto, Camberley, England

Polykation	Verzweigtes Polyethylenimin (PEI), 25 kD, Fa. Sigma Aldrich, Deisenhofen
Thymidinkinaseplasmid	P55-pCMV-JVS-HSV-tk, Fa. Clontech, Palo Alto, USA
Vortexer (Schüttelgerät)	MS Minishaker IKA, Fa. IAK Works, Wilmington, USA
Wasserbad	WB/OB 7-45, Mennert GmbH+Co KG, Schwabach, Deutschland
Alle weiteren Chemikalien und Reagenzien	Fa Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

2.2. Formulierung der Genvektoren

Es wurden die drei Genvektorformulierungen nackte pDNA, PEI-pDNA-Komplexe und Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe verwendet. Die Formulierung dieser Vektoren erfolgte in destilliertem Wasser. Die Endkonzentration an pDNA belief sich in der fertigen Vektorlösung auf 40 µg/ml, sofern nicht anders angegeben. Ausgehend von der Endkonzentration und der eingesetzten Menge an pDNA ergab sich das Gesamtvolumen für die Vektorformulierungen.

Nackte pDNA

Die Stammlösung von pDNA wurde mit destilliertem Wasser auf das entsprechende Gesamtvolumen verdünnt.

PEI-pDNA-Komplexe

Die zur Formulierung der PEI-pDNA-Komplexe benötigte Menge an PEI richtete sich neben der eingesetzten pDNA-Menge nach dem Stickstoff-Phosphatverhältnis, kurz N/P Verhältnis. Dieses wurde aufgrund der vorherigen Erfahrungen in der Arbeitsgruppe gleich 8 : 1 gesetzt und stellt das molare Verhältnis von Stickstoff-Atomen im PEI zu den Phosphaten der Nukleotide dar. Die benötigte Menge an PEI wurde anhand Formel (1) berechnet.

Formel (1):

$$N / P = \frac{\mu\text{gPEI}}{MW(\text{kationElement})} \cdot \frac{MW(\text{DNA} - \text{Baustein})}{\mu\text{gDNA}}$$

$MW(\text{kationElement})$ = mittleres MW eines Nukleotids in g/mol = 330

$MW(\text{DNA-Baustein})$ = mittleres MW der sich wiederholenden Grundeinheit von PEI unter Berücksichtigung der primären Amine in g/mol = 43

Daraus folgt:

$$8 = \frac{\mu\text{gPEI}}{43} \cdot \frac{330}{\mu\text{gDNA}} \quad \rightarrow \quad \mu\text{gPEI} = \frac{172}{165} \cdot \mu\text{gDNA}$$

Beispielsweise wurde zur Formulierung von PEI-pDNA-Komplexen aus 50 μg pDNA bei einem N/P-Verhältnis von 8 :1 folgende Menge an PEI in [μg] benötigt:

$$\mu\text{gPEI} = \frac{172}{165} \cdot 50 \approx 52,12$$

Formulierung von PEI-pDNA-Komplexen:

1. Vorlegen eines Volumenäquivalents der Suspensionen von pDNA und der von PEI in zwei separaten Eppendorfgläsern.
2. Zugabe der pDNA-Suspension zur PEI-Suspension mittels Pipette.
3. Mischen der beiden Suspensionen unter mehrmaligem, raschem Auf- und Abpipettieren und kurzem Vortexen.
4. 15-minütige Inkubation der PEI-pDNA-Mischung bei Raumtemperatur.
5. Nach Zugabe eines weiteren Volumenäquivalents destillierten Wassers und anschließendem Mischen waren die PEI-pDNA-Komplexe gebrauchsfertig.

Hüllpolymer-PEI-pDNA- Komplexe

Das Hüllpolymer „P6YE5C“ wurde in der eigenen Arbeitsgruppe wie in Finsinger et al. beschrieben synthetisiert (Finsinger et al. 2000). Basierend auf Vorerfahrungen der Arbeitsgruppe wurden für alle durchgeführten Versuche 3 Ladungsäquivalente des Hüllpolymers „P6YE5C“ verwendet. Die Ladungsäquivalente drücken den Quotienten aus negativer Ladung im Hüllpolymer und negativer Ladung der DNA aus. Das Volumen an benötigtem Hüllpolymer errechnete sich aus der eingesetzten Menge an pDNA nach Formel (2). Die hierzu nötige Konzentration des Hüllpolymers in [mM] wurde anhand der Anzahl der negativen Ladungen des Peptids im Polymer angegeben. Diese konnte photometrisch durch Bestimmung der Peptidkonzentration ermittelt werden.

Formel (2):

$$\mu\text{Hüllpolymer} = 1000 \cdot \frac{\mu\text{gDNA}}{330} \cdot \frac{\text{Ladungsäquivalente}}{c(\text{Hüllpolymer}[mM])}$$

Beispielsweise wurde unter Verwendung von 3 Ladungsäquivalenten und einer Hüllpolymerkonzentration von 5,38 mM zur Formulierung der Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe für 50 µg pDNA folgendes Volumen in [µl] an Hüllpolymer benötigt:

$$\mu\text{Hüllpolymer} = 1000 \cdot \frac{50\mu\text{g}}{330} \cdot \frac{3}{5,38mM} \approx 84,49$$

Formulierung von Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexen:

1. Vorlegen eines Volumenäquivalents des Hüllpolymers P6YE5C in Lösung in einem Eppendorfgefäß.
2. Formulierung der PEI-pDNA-Komplexe entsprechend den Arbeitsschritt 1 bis 4 wie oben unter Formulierung von PEI-pDNA-Komplexe beschrieben.
3. Zugabe der PEI-pDNA-Suspension mittels Pipette zur P6YE5C-Lösung.
4. Mischen der beiden Komponenten unter mehrmaligem, raschem Auf- und Abpipettieren und kurzem Vortexen.
5. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur waren die Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe gebrauchsfertig.

2.3. Der Fibrinkleber

Um das Risiko einer bakteriellen Kontamination der verwendeten Lösungen zu verringern, wurden die Gummistopfen aller Präparatflaschen vor dem Durchstechen mit Ethanol (80 %) desinfiziert. Zum Entnehmen und Zugeben von Lösungen zu den Präparatflaschen wurden sterile Einwegspritzen verwendet.

Die fertig gelösten Kleberkomponenten wurden aus den Durchstechflaschen entnommen und in separate, sterile Reaktionsgefäße überführt. Aus diesen Gefäßen konnte anschließend das exakte Volumen mit einer Pipette entnommen werden. Solange die gelösten Kleberkomponenten nicht gebraucht wurden, wurden sie im

Wasserbad bei 37 °C aufbewahrt. Nach Angaben von Baxter waren die Komponenten innerhalb von 4 Stunden zu verbrauchen.

Lösen der Fibrinogenkomponente

Nach Herstellerangaben hatte die fertige Fibrinogenlösung eine Konzentration von 66,30 mg/ml, wenn sie wie folgt gelöst wurde:

1. Erwärmen der lyophilisierten Fibrinogenkomponente und der von Baxter gelieferten Aprotinin-Lösung für 10 bis 15 Minuten in einem Wasserbad bei 37 °C.
2. Lösen der lyophilisierten Fibrinogenkomponente in der Präparateflasche durch Zugabe von 2 ml Aprotinin-Lösung (3000 KIE/ml).
3. Inkubation des Gemisches für eine weitere 10 bis 15 Minuten im Wasserbad bei 37 °C. Zwischendurch wurde die Flasche leicht, unter Vermeidung von Schaumbildung, geschüttelt.
4. Der Lösungsvorgang war abgeschlossen, wenn in der entstandenen Fibrinogenlösung unter durchscheinendem Licht keine ungelösten Partikel mehr zu sehen waren.

Lösen der Thrombinkomponente

Die Konzentration der fertigen Thrombinlösung lag nach Herstellerangaben bei 500 IE/ml, wenn sie wie folgt gelöst wurde:

1. Lösen des lyophilisierten Thrombins in der Präparateflasche durch Zugabe von 1 ml der von Baxter mitgelieferten 40 mM Calciumchlorid-Lösung unter leichtem Schütteln.
2. Inkubation der Thrombinlösung in einem Wasserbad für 10 Minuten, 37 °C.
3. Der Lösungsvorgang war abgeschlossen, wenn in der entstandenen Thrombinlösung unter durchscheinendem Licht keine ungelösten Partikel mehr zu sehen waren.

Verdünnung der Kleberkomponenten

Um die Fibrinogenkomponente zu verdünnen, wurde der von Baxter gelieferte TISSUCOL®-dilution-Puffer eingesetzt. Zur Verdünnung der Thrombinkomponente der Thrombin-dilution-Puffer.

Vorbereitung der Pufferlösungen und Verdünnung der jeweiligen Kleberkomponente:

1. Sterilfiltration der Pufferlösung mit einem Spritzenfilter (Porengröße 0,2 µm).
2. Inkubation der Puffer im Wasserbad bei 37 °C für 10 bis 15 Minuten.
3. Zugabe des entsprechenden Puffers zur jeweiligen Kleberkomponente.
4. Lösung auf dem Vortexer gut mischen.

2.4. Formulierungen des Fibrinogen-Vektor-Gemisches

Gefriertrocknung

Die Gefriertrocknung war bei der Formulierung der Fibrinogen-Vektor-Gemische je nach Formulierung ein nötiger Zwischenschritt. Sie wurde folgendermaßen durchgeführt:

1. Kurzes Eintauchen der Röhrchen, die die zu gefrierenden Lösungen enthalten, in flüssigen Stickstoff unter Schütteln, bis die Flüssigkeit vollständig tiefgefroren war.
2. Sofortiges Verbringen der Röhrchen mit leicht angedrehtem Verschlussdeckel in die Vakuumkammer des Gefriertrockners Hetosicc CD4.
3. Die Dauer des Trocknungsprozesses war abhängig vom Volumen der eingesetzten Lösung. Diese Zeitperiode wurde meist so gewählt, das die Proben über Nacht getrocknet waren.

Formulierung A: Mischen der Komponenten (Abb. 4):

1. Zugabe der Genvektor-Suspension zur Fibrinogenkomponente.
2. Mischen des entstandenen Fibrinogen-Vektor-Gemisches auf dem Vortexer.

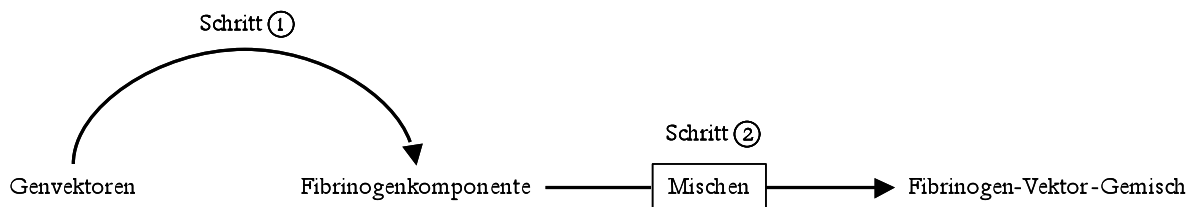


Abb. 4: Herstellung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches nach Formulierung A in den Schritten 1 und 2.

Formulierung B: gleichzeitiges Lyophilisieren von Genvektoren und Fibrinogen

(Abb. 5):

1. Zugabe der Genvektor-Suspension zur Fibrinogenkomponente.
2. Kurzes Mischen des Ansatzes auf dem Vortexer.
3. Lyophilisation des Fibrinogen-Vektor-Gemisches über Nacht.
4. Auflösen des gewonnenen Lyophilisates mit destilliertem Wasser. Das eingesetzte Volumen an Wasser war dem der gelösten Fibrinogenkomponente vor der Lyophilisation äquivalent.
5. Kurzes Mischen des Ansatzes auf dem Vortexer.

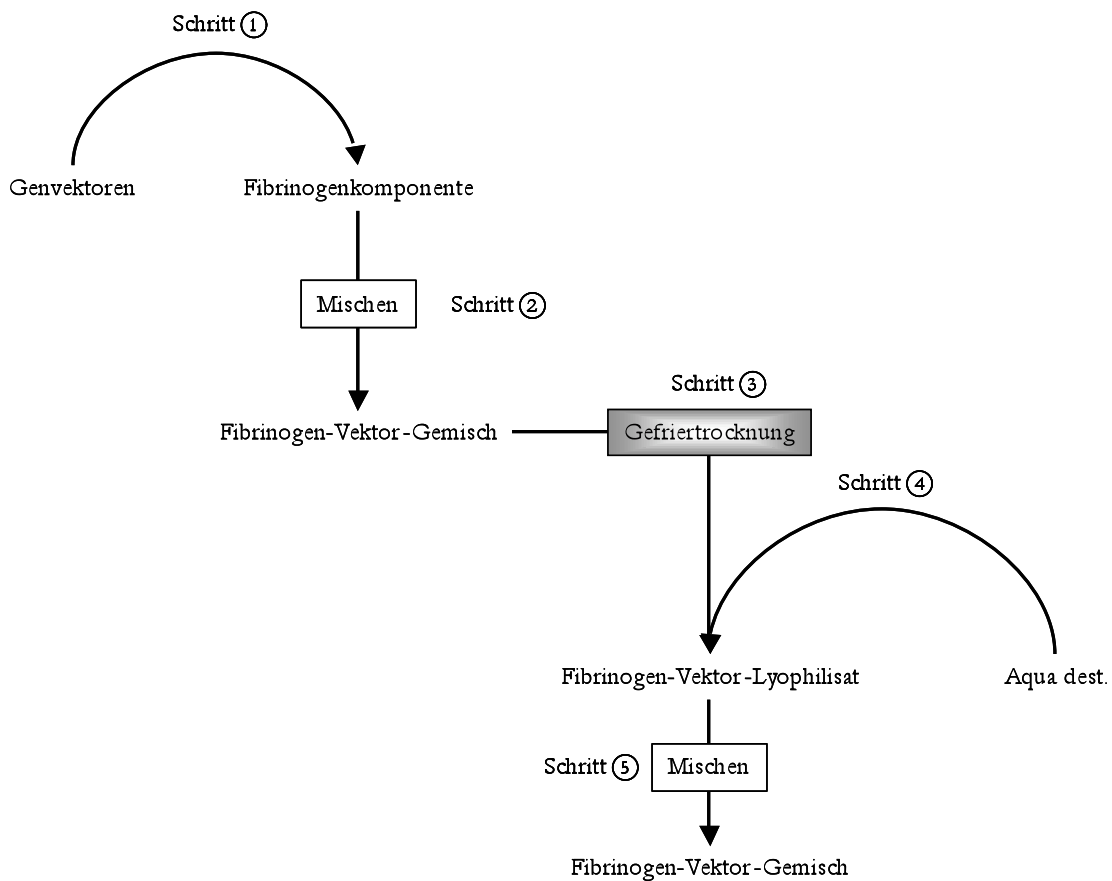


Abb. 5: Herstellung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches nach Formulierung B in den Schritten 1 bis 5.

Formulierung C: Lösen lyophilisierter Genvektoren in Fibrinogen (Abb. 6):

1. Lyophilisation der Genvektor-Suspension über Nacht.
2. Lösen des gewonnenen Lyophilisates mit der gelösten Fibrinogenkomponente.
3. Kurzes Mischen des Ansatzes auf dem Vortexer.

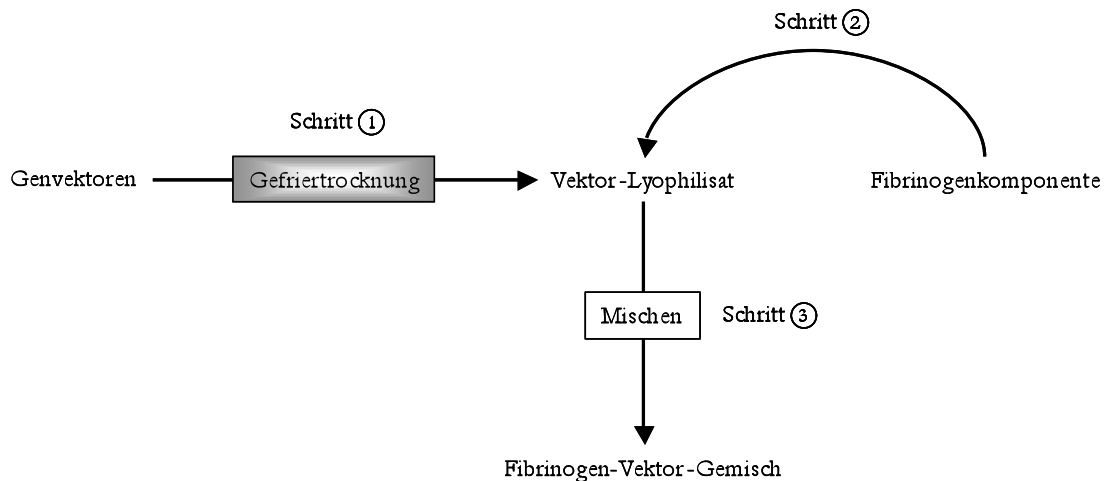


Abb. 6: Herstellung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches nach Formulierung C in den Schritten 1 bis 3.

2.5. Die Gen-aktivierte Fibrin-Matrix

1. Formulierung der Genvektoren
2. Lösen der Fibrinkleberkomponenten Fibrinogen und Thrombin
3. Herstellung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches nach Formulierung A, B oder C
4. Vorlegen des Thrombins in die Vertiefung einer Kulturplatte.
5. Hinzupipettieren einer entsprechenden Menge des Fibrinogen-Vektor-Gemisches.
6. Mischen der beiden Komponenten durch rasches Rühren mit der Pipettenspitze.
7. Alternativ zu 5. wurde eine entsprechende Menge an Fibrinogen-Vektor-Gemisch vorgelegt und die Thrombinkomponente mittels Pipette unter kurzem, raschem Rühren zugegeben.
8. Inkubation der fertigen Matrix bei Raumtemperatur. Die unterschiedlichen Inkubationszeiten sind unter den einzelnen Versuchen angegeben.

3. Analyse der Fibrinbildung bei Herstellung einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix

3.1. Material und Geräte

Tabelle 3: Material und Geräte zur Analyse der Fibrinbildung.

Material/Gerät	Bezeichnung/Bezugsquelle
Luciferaseplasmid	P55-pCMV-IVS-luc+, Fa. Bayer Corp., Emery Ville, USA
Rotationsthrombelastograph	RoTEG, Pentapharm, München, Deutschland
Thymidinkinaseplasmid	P55-pCMV-JVS-HSV-tk, Fa. Clontech, Palo Alto, USA
Vektorformulierungen	nackte pDNA, PEI-pDNA-Komplexe, Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe, Formulierung im eigenen Labor
Alle weiteren Chemikalien und Reagenzien	Fa Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

3.2. Verhalten der roTEG-Parameter Coagulation Time (CT), Clot Formation Time (CFT) und Maximum Clot Firmness (MCF) in Abhängigkeit von der Herstellung einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix

3.2.1. Analyse eines Fibrinogen-Vektor-Gemisches nach Formulierung A: Mischen der Komponenten

Herstellen der Kleberkomponenten

1. Herstellen der Fibrinogenlösung: Einwiegen von 40 mg der lyophilisierten Fibrinogenkomponente, Lösen dieses Proteingemisches in 5 ml NaCl 0,9 %.
2. Herstellen von 350 µl Thrombinlösung mit einer Konzentration von 20 IE/ml.

Nackte pDNA

1. Lösen von 10 µg pDNA (Luciferaseplasmid) in 312,5 µl NaCl 0,9 % in einem Eppendorf-Tube.
2. Einsetzen der roTEG-Messküvetten in die auf 37 °C vorgeheizten Messblöcke.
3. Vorlegen von 150 µl der Fibrinogenkomponente pro Messküvette.
4. Zugabe von 150 µl der Genvektorsuspension und Vermischen der beiden Komponenten durch mehrmaliges auf- und abpipettieren.

5. Inkubation des Gemisches bei Raumtemperatur für 10 Minuten.
6. Zugabe von 10 µl Thrombinlösung, Vermischen beider Komponenten durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren und einmaliges Rühren mit der Pipettenspitze.
7. Einsetzen des Messblockes mit der Küvette in die vorgesehene Messvorrichtung und starten der Messung am roTEG.
8. Beendigung der Messung sobald sich die Amplitude des Graphen nicht mehr verändert.
9. Insgesamt wurden 2 Aliquote gemessen.
10. Die Schritte 1 bis 9 wurden anschließend für 20, 40 und 60 µg pDNA bei gleichem Lösungsvolumen von 312,5 µl NaCl 0,9 % wiederholt.

PEI-pDNA-Komplexe und Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe

PEI-pDNA-Komplexe und Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe wurden für 10, 20, 40 und 60 µg pDNA (Luciferaseplasmid) in 312,5 µl NaCl 0,9% hergestellt. Die weitere Verarbeitung entspricht den Schritten 2 bis 10 für nackte pDNA.

Kontrolle

Als Kontrolle wurden die Schritte 1 bis 8 mit 312,5 µl NaCl 0,9 % anstelle einer Genvektorsuspension durchgeführt. Es wurden 7 Aliquote am roTEg gemessen.

Tabelle 4: Inhalt einer Messküvette bei Analyse von Formulierung A.

	Fibrinogenkomponente	Genvektorsuspension	Thrombinkomponente
Volumen	150 µl	150 µl	10 µl
Menge bzw. Konzentration	1,2 mg Fibrinogen	0/4,8/9,6/19,2/28,8 µg pDNA	20 IE/ml
entsprechend	0, 4, 8, 16, 24 µg pDNA / 1 mg Fibrinogen		

3.2.2. Doppelt lyophilisierte Fibrinogenkomponente im Vergleich zu unbehandelter Fibrinogenkomponente

1. Herstellen von 2880 µl Fibrinogenlösung (3,32 mg/ml) in einem 50 ml-Falcon-Röhrchen.
2. Lyophilisation der Fibrinogenlösung über Nacht und Aufnahme des Lyophilisates am Messtag in 2880 µl destilliertem Wasser.
3. Herstellen einer identischen Fibrinogenlösung wie unter Schritt 1 am Messtag, ohne diese jedoch zu lyophilisieren. Diese Lösung diene als Kontrolle.
4. Herstellen von 400 µl Thrombinlösung mit einer Konzentration von 4 IE/ml.
5. Einsetzen der Messküvetten in die auf 37 °C vorgeheizten Messblöcke.
6. Zugabe von 300 µl Fibrinogenlösung pro Messküvette.
7. Zugabe von 20 µl der Thrombinlösung, Vermischen beider Komponenten durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren und einmaliges Rühren mit der Pipettenspitze.
8. Einsetzen des Messblockes mit der Küvette in die vorgesehene Messvorrichtung und starten der Messung am Computer.
9. Beendigung der Messung sobald sich die Amplitude des Graphen nicht mehr verändert.
10. Von jeder der beiden Fibrinogenlösungen wurden neun Aliquote am roTEG gemessen.

Tabelle 5: Inhalt einer Messküvette bei Analyse einer erneut gefriergetrockneten Fibrinogenkomponente.

	Fibrinogenkomponente	Thrombinkomponente
Volumen	300 µl	20 µl
Menge bzw. Konzentration	1 mg Fibrinogen	4 IE/ml

3.2.3. Analyse eines Fibrinogen-Vektor-Gemisches nach Formulierung B: gleichzeitiges Gefriertrocknen von Genvektoren und Fibrinogen

Nackte pDNA:

1. Herstellen von 8 ml Fibrinogenlösung (c = 3,315 mg/ml).
2. Lösen von 42 µg pDNA (Thymidinkinaseplasmid) in 1050 µl destilliertem Wasser in einem 50 ml-Falcon-Röhrchen.
3. Zugabe von 2520 µl der Fibrinogenlösung (c = 3,315 mg/ml).
4. Lyophilisieren des Fibrinogen-Vektor-Gemisches über Nacht.
5. Aufnehmen des Lyophilisates in 2520 µl destilliertem Wasser.
6. Herstellen einer Thrombinlösung mit 4 IE/ml.
7. Einsetzen der roTEG-Messküvetten in die auf 37 °C vorgeheizten Messblöcke.
8. Vorlegen von 300 µl des Fibrinogen-Vektor-Gemisches in eine Messküvette.
9. Zugabe von 20 µl der Thrombinlösung, Vermischen beider Komponenten durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren und einmaliges Rühren mit der Pipettenspitze.
10. Einsetzen des Messblockes mit der Küvette in die vorgesehene Messvorrichtung und starten der Messung am Computer.
11. Beenden der Messung sobald sich die Amplitude des Graphen nicht mehr verändert.
12. Messung von sieben Aliquoten des Fibrinogen-Vektor-Gemisches
13. Schritte 2 bis 13 wurden für 84 µg pDNA und 168 µg pDNA gelöst in 2100 µl bzw. 4200 µl destilliertem Wasser durchgeführt.

Als Kontrolle wurden die Messergebnisse für doppelt lyophilisierten Fibrinkleber unter 3.2.2. herangezogen.

Tabelle 6: Inhalt einer Messküvette bei Analyse von Formulierung B (nackte pDNA).

	Fibrinogen-Vektor-Gemisch	Thrombinkomponente
Volumen	300 µl	20 µl
Menge bzw. Konzentration	1 mg Fibrinogen 5/10/20 µg pDNA	4 IE/ml
entsprechend	5, 10, 20 µg pDNA / mg Fibrinogen	

PEI-pDNA-Komplexe:

1. Formulierung der PEI-pDNA-Komplexe für 360 µg pDNA (Thymidinkinaseplasmid) in 12 ml destilliertem Wasser.
2. Portionierung der Vektorformulierung zu 48, 96 und 192 µg pDNA in drei 50-ml-Falcon-Röhrchen.
3. Herstellen von 12 ml Fibrinogenlösung (c = 3,315 mg/ml).
4. Zugabe von 2880 µl Fibrinogenlösung (c = 3,315 mg/ml) zu jedem Falcon-Röhrchen.
5. Zusätzlich wurde ein leeres Falcon-Röhrchen mit 2880 µl Fibrinogenlösung (c= 3,315 mg/ml) befüllt, es diente als Kontrolle.
6. Lyophilisation der drei Fibrinogen-Vektor-Gemische und der Kontrolle über Nacht.
7. Aufnehmen des Lyophilisates der Vektorformulierung mit 48 µg pDNA in 2880 µl destilliertem Wasser.
8. Herstellen einer Thrombinlösung mit einer Konzentration von 5 IE/ml.
9. Einsetzen der roTEG-Messküvetten in die auf 37 °C vorgeheizten Messblöcke.
10. Vorlegen von 300 µl des Fibrinogen-Vektor-Gemisches in eine Messküvette.
11. Zugabe von 20 µl der Thrombinlösung, Vermischen beider Komponenten durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren und einmaliges Rühren mit der Pipettenspitze.
12. Einsetzen des Messblocks mit der Küvette in die vorgesehene Messvorrichtung und starten der Messung am Computer.
13. Beenden der Messung sobald sich die Amplitude des Graphen nicht mehr verändert.
14. Messung von sieben Aliquoten des Fibrinogen-Vektor-Gemisches am roTEG.
15. Schritte 7 bis 14 werden für die Lyophilisate mit 96 µg, 192 µg pDNA und für die Kontrolle entsprechend durchgeführt.

Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe:

Die Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe wurden für 360 µg pDNA (Thymidinkinaseplasmid) in 18 ml Wasser formuliert. Die weitere Verarbeitung entspricht den Schritte 2 bis 15 der PEI-pDNA-Komplexe, außer dass in Schritt 14 acht Aliquote gemessen wurden.

Tabelle 7: Inhalt einer Messküvette bei Analyse von Formulierung B (PEI-pDNA und Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe).

	Fibrinogen-Vektor-Gemisch (entweder PEI-pDNA-Komplexe oder Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe)	Thrombinkomponente
Volumen	300 µl	20 µl
Menge bzw. Konzentration	0, 5, 10, 20 µg pDNA/1 mg Fibrinogen	5 IE/ml

4. Freisetzung von als „nackte pDNA“ und „Hüllpolymer-PEI-pDNA“ formulierte, radioaktiv markierte pDNA aus der Genaktivierten Fibrin-Matrix in Abhängigkeit von der Formulierung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches

4.1. Material und Geräte

Tabelle 8: Material und Geräte zur Untersuchung der Freisetzung.

Material/Gerät	Bezeichnung/Bezugsquelle
Gamma Counter	Wallac 1480 Wizard 3", PerkinElmer Wallac, Freiburg, Deutschland
Gelelektrophoreseeinheit	Bio-Rad Laboratories Inc., München, Deutschland
Geltrockner	Model 583 Gel Dryer, Bio-Rad Laboratories Inc., München, Deutschland
Natrium- ¹²⁵ J	I-RB-31, 37 MBq, HARTMANN ANALYTIC GmbH, Braunschweig, Deutschland
Phosphor Imager und Filmkassette	FLA2000 FUJIFILM, BAS cassette 2040 FUJIFILM
Photometer	Beckman(-Coulter) DU 640 Spectrophotometer Beckman Instruments Inc., USA
Thymidinkinaseplasmid	P55-pCMV-JVS-HSV-tk, Fa. Clontech, Palo Alto, USA
Alle weiteren Chemikalien und Reagenzien	Fa Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

4.2. Markierung des Thymidinkinaseplasmides mit ¹²⁵J

Die Markierung des Thymidinkinaseplasmides erfolgte nach einem Protokoll der Arbeitsgruppe Terebesi et. al. (Terebesi et al. 1999). Als Bezeichnung für radioaktiv markierte pDNA wird *pDNA verwendet.

Jodierung der pDNA:

1. Lösen von 100 µg pDNA in 100 µl 0,1 M Ammoniumacetat, pH 5, in einem Eppendorftube.
2. Vorlegen von 50 µl 250 µM Kaliumjodid, 50 µl 30 mM Thalliumtrichlorid und 40 µl Natrium-125-J (500 µCi) in 0,1 M Natriumhydroxid in einem zweiten Eppendorftube.

3. Starten der Reaktion durch Zugabe der pDNA-Lösung zu dem Gemisch des zweiten Eppendorftubes.
4. Inkubation des Reaktionsansatzes in einem Hitzeblock für 45 Minuten bei 60°C, anschließendes Abkühlen auf Eis.
5. Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 25 µl 0,1 M Natriumsulfit.
6. Anheben des pH-Wertes auf 7 durch Hinzufügen von 100 µl 1 M Ammoniumacetat, pH 7.
7. Lagerung des Reaktionsansatzes für 60 Minuten auf Eis und anschließende Inkubation für eine weitere Stunde im Hitzeblock bei 60 °C, um die instabilen Jodaddukte von der pDNA zu lösen.
8. Lagerung des Ansatzes auf Eis.

Reinigung, Konzentrations- und Aktivitätsmessung der jodierten pDNA:

Die Trennung der mit ^{125}Jod markierten pDNA (*pDNA) von dem Anteil an ungebundenem ^{125}Jod erfolgte mit einer PD10-Gelfiltrationssäule und destilliertem Wasser als Eluat. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 0,5 ml in Eppendorfgläsern gesammelt und die Aktivität jeder Fraktion entsprechend der Elution mit einem Geigerzähler bestimmt. Im Verlauf der Elution zeigten sich zwei Aktivitätsmaxima, hervorgerufen durch *pDNA und das ungebundene ^{125}Jod . Fraktionen des ersten Aktivitätsmaximums, welche die *pDNA enthielten, wurden in einem Eppendorfglas vereint. Die Konzentration der *pDNA wurde mittels Photometers bestimmt. Die Aktivität der *pDNA wurde anhand zweier Proben von je 20 µl im Gamma Counter gemessen.

Gelelektrophorese und Autoradiographie:

1. Auftragen von 0,5 µg *pDNA und 0,5 µg der unmarkierten pDNA als Kontrolle auf ein 1%iges TBE-Agarosegel mit Ethidiumbromid in TBE-Puffer.
2. Auftrennung der Proben im Gel bei einer Spannung von 90 Volt und einer Laufzeit von 60 Minuten.
3. Trocknen des Gels über Nacht unter Vakuum im Gelrockner.
4. Inkubation des trockenen Gels für 100 Minuten in einer Filmkassette mit Filmplatte und Entwicklung der Filmplatte im Phosphor Imager.

4.3. Freisetzung der *pDNA aus einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix aus einem Fibrinogen-Vektor-Gemisch nach Formulierung B (gemeinsames Gefriertrocknen der Fibrinogenkomponente und der Genvektorformulierungen)

1. Mischen von *pDNA mit unmarkierter pDNA im Verhältnis 1:4.
2. Lösen von 54 µg dieses Gemisches in 1350 µl destilliertem Wasser.
3. Formulierung der Hüllpolymer-PEI-*pDNA-Komplexe für weitere 54 µg des pDNA/*pDNA -Gemisches aus Schritt 1 in einem Gesamtvolumen von 1350 µl.
4. Herstellung dreier Verdünnungen der Fibrinogenkomponente mit einer Fibrinogenkonzentration von 66,30 mg/ml, 49,79 mg/ml und 33,15 mg/ml.
5. Herstellung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches nach Formulierung B nach folgendem Schema (Tabelle 9):

Tabelle 9: Schema zur Herstellung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches nach Formulierung B.

Arbeits-schritt	➔ 5.1	➔ 5.2		➔ 5.3	➔ 5.4	➔ 5.5
	Vorlegen von	Zugabe von			Zugabe von	Entnahme von
Gefäß Nr.	180 µl Fibrinogen- lösung	450 µl pDNA/ *pDNA	450 µl Hüllpolymer- PEI-*pDNA	Gefriertrocknung über Nacht	180 µl destilliertem Wasser	3 x 50 µl Fibrinogen-Vektor- Gemisch
1	66,30 mg/ml	X			X	je Gefäß
2	49,73 mg/ml	X			X	
3	33,15 mg/ml	X			X	
4	66,30 mg/ml		X		X	
5	49,73 mg/ml		X		X	
6	33,15 mg/ml		X		X	

6. Lösen der gefriergetrockneten Thrombinkomponente, Verdünnung von 20 µl der Thrombinstammlösung (500 IE/ml) mit 230 µl Thrombin-dilution-Puffer.
7. Vorlegen von 5 µl verdünnter Thrombinlösung aus Schritt 6 in je eine Vertiefung der 96-Loch-Platte.

8. Zugabe von 50 μ l des Fibrinogen-Vektor-Gemisches in jede der mit Thrombin befüllten Vertiefungen und Vermischen beider Komponenten unter kurzem, raschem Rühren mit der Pipettenspitze. Je Fibrinogenkonzentration erfolgte eine 3fach-Bestimmung.
9. Inkubation 96-Loch-Platte für 2 Stunden unter dem Abzug bei Raumtemperatur.
10. Zugabe des Eluats: Befüllung der Vertiefungen aus Schritt 8 mit je 200 μ l DMEM-Zellkulturmedium (+ 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin)
11. Inkubation der Platte im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 99 % relativer Luftfeuchtigkeit.
12. Probengewinnung:
 - a. Entnahme des kompletten Überstandes einer Vertiefung mit einer Pipette nach einer Stunde, einem Tag, sowie 4, 7, 11, 14 und 20 Tagen.
 - b. Überstand und Pipette selbst wurden zusammen in ein Gamma-Counter-Messröhrchen überführt.
13. Befüllung der Vertiefungen mit 200 μ l frischem DMEM-Zellkulturmedium direkt nach Entnahme des Überstandes in Schritt 12.
14. Messung der Aktivität der Proben und des Standards:
 - a. Messung der Aktivität der Proben am Gamma-Counter
 - b. Parallel zu jedem Messzeitpunkt wurden 2 Röhrchen mit je 20 μ l der Stammlösung der *pDNA mitgemessen. Der Mittelwert der hierbei gemessenen Aktivitäten wurde zur Berechnung der kumulativen Freisetzung als Standard verwendet.
 - c. Die kumulative Freisetzung wurde aus dem Anteil von freigesetzter *pDNA zur Dosis an eingesetzter *pDNA je Fibringerinnsel errechnet.

4.4. Freisetzung der *pDNA aus einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix aus einem Fibrinogen-Vektor-Gemisch nach Formulierung C (Lösen lyophilisierter Genvektorformulierungen mit der Fibrinogenkomponente)

1. Durchführung der Arbeitsschritte 1 bis 4 wie unter 4.3. auf S. 35 bei Herstellung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches nach Formulierung B beschrieben.
2. Herstellung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches nach Formulierung C nach folgendem Schema (Tabelle 10):

Tabelle 10: Schema zur Herstellung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches nach Formulierung C.

Arbeits-schritt	➔2.1		➔2.2	➔2.3		➔2.4
	Zugabe von			Zugabe von		
Gefäß Nr.	450 µl pDNA/ *pDNA	450 µl Hüllpolymer- PEI-pDNA	Gefriertrocknung über Nacht	180 µl Fibrinogenlösung		3 x 50 µl Fibrinogen- vektorgemisch
1	X			66,30 mg/ml		je Gefäß
2	X			49,73 mg/ml		
3	X			33,15 mg/ml		
4		X		66,30 mg/ml		
5		X		49,73 mg/ml		
6		X		33,15 mg/ml		

3. Durchführung der unter 4.3. auf S. 35 - 36 beschriebenen Arbeitsschritte 6 bis 14. Die Messzeitpunkte waren hier nach einer Stunde, einem Tag, sowie 4, 7, 12, und 19 Tagen.

Tabelle 11: Zusammensetzung eines Fibringerinnsels aus 4.3 und 4.4. S.35 - 37

Fibrinogen	Volumen	50 µl
	Menge	3,32 mg / 2,49 mg / 1,66 mg
Thrombin	Volumen	5 µl
	Konzentration	40 IE/ml
Plasmid	Menge	5 µg
	µg pDNA / mg Fibrinogen	1,5 / 2,0 / 3,0

5. Erprobung einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix in der Zellkultur

5.1. Material und Geräte

Tabelle 12: Material und Geräte für Zellkulturversuche.

Material/Gerät	Bezeichnung/Bezugsquelle
Costar 96-Loch-Platte	Opaque Plate-solid black 96 well, Fa. Corning Costar Corporation, Cambridge, USA
Durchlichtmikroskop	Axiovert135, Zeiss, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert25, Zeiss, Deutschland
GFP-Plasmid	PEGFP vector, Fa. Clontech, Palo Alto, USA
Homogenisierer	Mini Bead Beater™ Biospec Products, Bartlesville, USA
Homogenisierungskugeln	Zirconia beads, 2,5 mm Dia, Biospec Products Inc., Bartlesville, USA
Homogenisierröhrchen	2,0 ml Screw Cap Tube with cap, VWR Scientific Products, West Chester USA
Kollagenase	Collagenase A, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Kühlzentrifuge	EBA12R, Hettrich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Luciferaseplasmid	P55-pCMV-IVS-luc+, Fa. Bayer Corp., Emery Ville, USA
Luciferasepuffer	Promega Luciferase Assay System, FA Promega Corporation, Madison, USA
Luciferasestandard	Reine Luciferase, Roche, Penzberg, Deutschland
Microplate Scintillation & Luminescence counter	Microplate Scintillation & Luminescence counter „Top Count“, Fa. Canberra-Packard, Dreieich, Deutschland
Schüttler	Thermomixer 5436, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	Megafuge 2.0R, Kendro Laboratory Products, Deutschland
Alle weiteren Chemikalien und Reagenzien	Fa Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

5.2. Zellkulturmethoden

Die Lagerung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 99 % relativer Luftfeuchtigkeit.

Isolierung von primären Kaninchenchondrozyten aus Knorpelbiopsien

Aus den Kondylen der Kniegelenke von Weißen Neuseeländer Kaninchen wurden mehrere Knorpelbiopsien entnommen, die anschließend in DMEM-Medium (10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin) aufbewahrt wurden. Zu Beginn der Isolierung wurden sie mit PBS gewaschen und anschließend in einer mit 10 ml PBS gefüllten

Petrischale mittels Skalpell in kleine Stückchen von circa 1 x 1 mm geschnitten. Der Inhalt der Petrischale wurde daraufhin in ein 50-ml-Röhrchen pipettiert, dem anschließend 10 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,25 % / 0,02 %) zugegeben wurden. Das Röhrchen wurde nun auf einem Schüttler bei 120 UpM im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂ und 99 % relativer Luftfeuchtigkeit) geschüttelt. Anschließend wurden 10 ml DMEM-Medium (10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin) zu dem Ansatz pipettiert. Der Inhalt des Röhrchens wurde nun für 5 Minuten bei 3500 UpM und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand danach vorsichtig abpipettiert. 30 mg Kollagenase wurden in 20 ml DMEM-Medium gelöst und sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm). Diese Lösung wurde anschließend zu dem Ansatz pipettiert. Nun wurde das Röhrchen für 12 bis 14 Stunden auf dem Schüttler bei 120 UpM geschüttelt. Anschließend wurde es für 3 Minuten bei 3500 UpM und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand danach vorsichtig abpipettiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 12 ml DMEM-Medium (10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin) aufgenommen. Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubaur Kammer bestimmt.

Isolierung und Kultivierung von primären, humanen Keratinozyten

Die Keratinozyten wurden aus menschlichen Vorhäuten gemäß dem Protokoll nach Leigh und Watt (Leigh und Watt 1994) von der Arbeitsgruppe Braun-Falco des Zentrums für Allergie und Umwelt der Technischen Universität München isoliert. Die fertig präparierten Keratinozyten wurden in mit KFSM – Medium plus Supplement (humanes EGF, Rinderhypophysenextrakt, 1 % Penicillin / Streptomycin) befüllten Kulturflaschen (75 cm²) in Passage 2 zur Verfügung gestellt. Alle 2 bis 3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Um eine Wachstumsreduzierung zu vermeiden, wurden die Keratinozyten bei einer Konfluenz von ca. 80 % wie unten angegeben für die Versuche präpariert.

Präparation der Keratinozyten vor Versuchsdurchführung

1. Absaugen des Zellkulturmediums und kurzes Waschen der Zellen mit 10 ml PBS bei leichtem Schwenken der Kulturflasche, anschließend Absaugen des PBS-Puffers.

2. Lösen der Zellen vom Boden der Kulturflasche durch Zugabe von 4 ml Trypsin /EDTA-Lösung (0,25 % / 0,02 %) und Inkubation der Kulturflasche für 6 Minuten im Brutschrank.
3. Abpipettieren der in Trypsin gelösten Zellen in ein 50 ml - Röhrchen. Diese Zellsuspension wurde anschließend mit 4 ml serumhaltigem DMEM-Medium (10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin) gut vermischt. Dadurch wurde die Trypsinwirkung gestoppt.
4. Zentrifugation der Zellsuspension bei 1200 UpM und 23 °C für 3 Minuten. Der Überstand wurde anschließend abgesaugt.
5. Aufnahme des Zellpellets in 10 ml KSFM-Medium (plus Supplement).
6. Bestimmung der Zellzahl mittels Neubaur-Zählkammer. Die Zellsuspension enthielt $6,3 \times 10^6$ Zellen.

5.3. Puffer für den Luciferasetest

Lysepuffer (Ansatz für 500 ml):

Tabelle 13: Lysepuffer (Ansatz für 500 ml).

10 % Triton	5 ml
1 M Tris-Puffer pH 7,8	125 ml
Aqua dest.	370 ml

Der fertige Lysepuffer wurde im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Luciferinpuffer (Ansatz für 500 ml):

1. Abwiegen von 460 mg Dithiothreitol und Lösen in 25 mM Glycyl-Glycin.
2. Überführen der Lösung in einen sterilen Messzylinder und Zugabe von 500 µl 1 M MgSO₄.
3. Zugeben von 1 ml 50 mM ATP.
4. Zugeben von 30 µM Luciferin.
5. Auffüllen mit Glycyl-Glycin auf 50 ml.
6. Überführen des Puffers in ein steriles, zum Schutz vor Licht mit Alufolie umwickeltes Schraubglas. Der fertige Puffer konnte bei 4 °C mehrere Wochen aufbewahrt werden.

5.4. Transfektion primärer Kaninchenchondrozyten durch eine mit einem GFP-Plasmid beladene Gen-aktivierte Fibrin-Matrix

Herstellung einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix aus einem Fibrinogen-Vektor-Gemisch nach Formulierung A (Mischen von Fibrinogen und Genvektoren)

1. Lösen von 40 µg pDNA (GFP-Plasmid) in 175,41 µl 0,9 % Natriumchlorid.
2. Formulierung der Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe für 40 µg pDNA (GFP-Plasmid) in insgesamt 170 µl Aqua dest., wobei für pDNA und PEI ein Lösungsvolumen von je 60 µl, für das Hüllpolymer eines von 50 µl verwendet wurde.
3. Zugabe von 5,41 µl 5 M Natriumchlorid zu der fertigen Suspension der Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe.
4. Lösen der gefriergetrockneten Fibrinogenkomponente. Zugabe von je 200 µl der Fibrinogenstammlösung (c = 66,30 mg/ml) zu jeder Vektorformulierung. Kurzes Mischen auf dem Vortexer.
5. Lösen der gefriergetrockneten Thrombinkomponente. Verdünnung von 10 µl der Stammlösung (500 IE/ml) mit 179 µl Thrombin Dilution Puffer. Endvolumen 189 µl.
6. Pro Vektorformulierung Vorlegen von je 37,5 µl Fibrinogen-Vektor-Gemisch in je 10 Vertiefungen einer 96-Loch-Platte.
7. Zugabe von 5 µl der Thrombinlösung unter kurzem, raschem Rühren mit der Pipettenspitze.
8. Inkubation der Platte bei Raumtemperatur für 1,5 Stunden unter der Sterilbank.

Zugabe der Zellen:

Jede Vertiefung der Versuchsplatte mit Fibringerinnsel erhielt ca. 20.000 der frisch präparierten Kaninchenchondrozyten entsprechend 200 µl der oben hergestellten Zellsuspension in DMEM-Medium (10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin). Alle 3 Tage wurde das Zellkulturmedium gewechselt.

Tabelle 14: Zusammensetzung der Gen-aktivierten Fibrin-Matrix (Angaben pro Fibringerinnsel).

Fibrinogen	Volumen	37,5 µl
	Menge	1,32 mg
Thrombin	Volumen	5 µl
	Konzentration	0,03 IE/ml
Plasmid (formuliert als nackte pDNA oder mit Hüllpolymer-PEI)	codiert für	GFP
	Menge	4,0 µg
	Verhältnis µg pDNA / mg Fibrinogen	3,0
Zellen	Zahl	20.000
	Zellart	Primäre Kaninchenchondrozyten
	Wachstum	auf der Gen-aktivierten Fibrin-Matrix

Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskopie:

Die GFP-Expression wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen, die GFP-positiven Zellen manuell an den Tagen 2, 3, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16 und 17 gezählt. Mittels Durchlichtmikroskopie wurde das Wachstumsverhalten beobachtet.

5.5. Transfektion primärer, humaner Keratinozyten durch eine mit Luciferaseplasmid beladene Gen-aktivierte Fibrin-Matrix

Herstellung einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix aus einem Fibrinogen-Vektor-Gemisch nach Formulierung B (gemeinsames Lyophilisieren von Fibrinogen und Genvektoren)

1. Lösen von 90 µg pDNA (Luciferaseplasmid) in 2250 µl destilliertem Wasser.
2. Formulierung der Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe für 90 µg pDNA (Luciferaseplasmid) in 2250 µl destilliertem Wasser.
3. Lösen der gefriergetrockneten Fibrinogenkomponente und Verdünnung von 900 µl der Stammlösung (66,30 mg/ml) mit 900 µl TISSUCOL® Dilution Puffer.

4. Zugabe von je 900 µl der Fibrinogenlösung (33,15 mg/ml) aus Schritt 3 zur pDNA-Suspension und zur Suspension der Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe, kurzes Mischen auf dem Vortexer.
5. Lyophilisation beider Gemische.
6. Resuspension jedes der beiden Lyophilisate mit je 900 µl destillierten Wasser, kurzes Mischen auf dem Vortexer.

Einbetten der Keratinozyten in die Gen-aktivierten Fibrin-Matrix:

1. Präparation von Keratinozyten zweiter Passage bei einer Konfluenz von 80 % wie oben beschrieben.
2. Verteilen von 10 ml der Zellsuspension (6.3×10^6 Zellen) zu 2 Portionen je 5 ml auf zwei Röhrchen, Zentrifugation (1200 UpM für 3 Minuten bei 23 °C).
3. Absaugen des Überstandes über beiden entstandenen Zellpellets.
4. Resuspendieren des einen Zellpellets mit 900 µl Fibrinogen-Vektor-Gemisch mit nackter pDNA, Resuspendieren des anderen Zellpellets mit 900 µl Fibrinogen-Vektor-Gemisch mit Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexen.
5. Lösen des gefriergetrockneten Thrombins. Die Thrombinstammlösung wurde unverdünnt (500 IE/ml) zu je 5 µl in das Zentrum der Vertiefungen einer 24-Loch-Platte vorgelegt.
6. Vermischen von 50 µl eines Fibrinogen-Genvektor-Zell-Gemisches mit dem vorgelegten Thrombin durch kurzes, rasches Rühren mit der Pipettenspitze.
7. Inkubation der Kulturplatte für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter der Sterilbank.
8. Zugabe von 2 ml KSFM (humanes EGF, Rinderhypophysenextrakt, 1 % Penicillin / Streptomycin). Das Medium wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt.

Probengewinnung:

Je Messtag wurden Triplikate pro Vektorformulierung gemessen. Der Konus von Homogenisierröhrchen mit Schraubverschluss wurde mit kleinen Homogenisierkugeln (Durchmesser 2,5 mm) aufgefüllt. Die zellbewachsenen Fibrinclots wurden jeweils mit 500 µl PBS kurz gewaschen, der PBS-Puffers anschließend wieder abgesaugt. Da die Fibrinclots im Verlauf durch einen Zellrasen mit Fibrinresten ersetzt waren, mussten zwei Methoden zur Gewinnung der Proben angewandt werden:

- Methode 1: Die mit den Homogenisierkugeln befüllten Homogenisierröhrchen wurden mit 500 µl Lysepuffer befüllt. Die Entnahme der Fibrinclots erfolgte mit einem Spatel aus der Vertiefung in je ein separates Homogenisierröhrchen.
- Methode 2: Zu jeder Vertiefung wurden jeweils 500 µl Lysepuffer pipettiert. Die Zellen und die Fibrinreste wurden vom Boden der Vertiefung mit einem Spatel abgeschabt und anschließend, im Lysepuffer suspendiert, in ein separates mit Homogenisierkugeln befülltes Homogenisierröhrchen abpipettiert.

Probengewinnung an Tag 1 und 4 nach Methode 1, Probengewinnung Tag 6, 8 sowie 13 nach Methode 2. Die weitere Verarbeitung der Proben erfolgte unabhängig von der Probengewinnung:

1. Lagerung der Proben auf Eis 10 Minuten nach Entnahme der Fibrinclots bzw. nach Zugabe des Lysepuffers in die Vertiefungen.
2. Mechanisches Homogenisieren der zwischendurch ständig auf Eis zu haltenden Proben mit Hilfe des Mini Bead BeatersTM in zwei Durchgängen für jeweils 20 Sekunden.
3. Zentrifugieren der Proben mit 14000 UpM für 10 Minuten bei 4 °C (EBA12R-Kühlzentrifuge).
4. Lagerung der Proben auf Eis ohne Unterbrechung.

Luciferasetest:

1. Luciferase-Standard: Herstellen einer Verdünnungsreihe von 200, 100, 50, 25, ..., 0,048, 0,024, 0,012 ng reiner Luciferase in 50 µl Lysepuffer in einer schwarzen Costar-96 Loch-Platte. In eine Vertiefung wird keine Luciferase zugegeben.
2. Vorlegen von 50 µl der Proben in separate Vertiefungen dieser Platte.
3. Zugabe von je 100 µl des Luciferasepuffers zu jede der in Schritt 1 und 2 befüllten Vertiefungen.
4. Die Messung der Luciferase-Aktivität von Standard und Proben erfolgte unter gleichen Bedingungen bei 23 °C im „Top Count“ Microplate Scintillation & Luminescence Counter. Die Messzeit betrug 12 Sekunden, die

Messverzögerung 1 Minute. Hintergrundwerte wurden automatisch abgezogen. Aus den Standardwerten wurde bei jeder Messung eine Eichkurve erstellt. Anhand dieser Daten wurde die in den Proben enthaltene Menge an Luciferase berechnet.

Tabelle 15: Zusammensetzung der Gen-aktivierten Fibrin-Matrix (Angaben pro Fibringerinnsel).

Fibrinogen	Volumen	50 µl
	Menge	1,66 mg
Thrombin	Volumen	5 µl
	Konzentration	500 IE/ml
Plasmid (formuliert als nackte pDNA oder Hüllpolymer-PEI-pDNA)	codiert für	Luciferase
	Menge	5 µg
	Verhältnis µg pDNA / mg Fibrinogen	3,0
Zellen	Zahl	175.000
	Zellart	Primäre, humane Keratinozyten
	Wachstum	eingebettet in die Fibrinmatrix

5.6. Transfektion primärer, humaner Keratinozyten durch eine mit Luciferaseplasmid beladene Gen-aktivierte Fibrin-Matrix mit optimiertem Herstellungsverfahren

Herstellung einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix aus einem Fibrinogen-Vektor-Gemisch nach Formulierung B (gemeinsames Lyophilisieren von Fibrinogen und Genvektoren)

1. Formulierung der Hüllpolymer-PEI-pDNA Komplexe für 420 µg pDNA (Luciferaseplasmid) in 3500 µl destilliertem Wasser.
2. Lösen der gefriergetrockneten Fibrinogenkomponente und Zugabe zu dem Ansatz aus Arbeitsschritt 1 von 2100 µl unverdünnter Fibrinogenlösung (c = 66,30 mg/ml).
3. Mischen des Ansatzes und Portionierung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches zu Aliquoten a 1600 µl entsprechend 120 µg pDNA.

4. Lyophilisation der 3 Röhren über Nacht. Die Röhren konnten bei 4 °C gelagert werden und standen nun für mehrere Versuche zu unterschiedlichen Zeitpunkten zur Verfügung.
5. Zugabe von 600 µl destilliertem Wasser zu einem Röhren aus Schritt 4 und Mischen aus dem Vortexer.
6. Formulierung von PEI-pDNA-Komplexen für 120 µg pDNA (Luciferaseplasmid) mit 25 kD PEI in insgesamt 3000 µl destilliertem Wasser.
7. Lösen von weiteren 120 µg nackter pDNA (Luciferaseplasmid) in 3000 µl destilliertem Wasser.
8. Zugabe von je 600 µl unverdünnter Fibrinogenlösung zu jedem Ansatz aus Schritt 6 sowie 7 und Mischen der beiden Ansätze.
9. Lyophilisation der Röhren beider Gemische aus Schritt 6 und 7 über Nacht.
10. Zugabe von je 600 µl destilliertem Wasser zu diesen beiden Ansätzen.

Einbetten von primären, humanen Keratinozyten in die Fibrinmatrix:

1. Präparation von Keratinozyten zweiter Passage bei einer Konfluenz von 80 % wie oben beschrieben. Das Zellpellet wurde in 20 ml KFSM-Medium (plus Supplement) aufgenommen.
2. Entnahme von je 1900 µl aus der Zellsuspension in je 3 Röhren (Röhren 1-3) und Zentrifugation bei 1200 UpM für 3 Minuten bei 20 °C.
3. Lösen der Zellpellets mit 408 µl KFSM-Medium (plus Supplement)
4. Zugabe von 600 µl des Fibrinogen-Vektor-Gemisches je Röhren und Mischen auf dem Vortexer wie folgt:
 - Röhren 1 + 600 µl Fibrinogen-Vektor-Gemisch mit nackter pDNA
 - Röhren 2 + 600 µl Fibrinogen-Vektor-Gemisch mit PEI-pDNA-Komplexen
 - Röhren 3 + 600 µl Fibrinogen-Vektor-Gemisch mit Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexen
5. Vorlegen von 8 µl unverdünnter Thrombinlösung (500 IE/ml) in die Vertiefungen einer 24-Lochplatte.
6. Zugabe 42 µl des Fibrinogen-Genvektor-Zell-Gemisches je Vertiefung und kurzes Mischen der mit der Pipettenspitze.

7. Inkubation der Versuchsplatte für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter der Sterilbank.
8. Zugabe von 2 ml KFSM-Medium (plus Supplement). Das Medium wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt.

Tabelle 16: Zusammensetzung einer optimierten Gen-aktivierten Fibrin-Matrix (Angaben pro Fibringerinnsel).

Fibrinogen	Volumen	42 µl
	Menge	1,66 mg
Thrombin	Volumen	8 µl
	Konzentration	500 IE/ml
Plasmid (formuliert als nackte pDNA, PEI-pDNA-Komplexe und Hüllpolymer-PEI-pDNA)	codiert für	Luciferase
	Menge	5 µg
	Verhältnis µg pDNA / mg Fibrinogen	3,0
Zellen	Zahl	100.000
	Zellart	Primäre, humane Keratinozyten
	Wachstum	eingebettet in die Fibrinmatrix

Probengewinnung und Luciferasetest:

Je Messtag wurden Triplikate pro Vektorformulierung gemessen. Gewinnung und Verarbeitung der Proben erfolgte an den Messtagen 1, 3 und 8 nach Methode 1, an Tagen 14, 21 und 28 nach Methode 2 (siehe S. 44). Der Luciferasetest wurde an den Tagen 1, 3, und 8 wie oben beschrieben mit dem selbst hergestellten Luciferasepuffer durchgeführt. An den Tagen 14, 21 und 28 wurde aufgrund der zu erwartenden niedrigeren Genexpression der sensiblere Luciferasepuffer von Promega verwendet.

III. Ergebnisse

1. Analyse der Fibrinbildung unter Einfluss von nicht viralen Genvektoren bei unterschiedlicher Formulierung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches

Gerinnungsanalysen mittels „Rotationsthrombelastography Coagulation Analyser“

Im Rahmen des letzten Herstellungsschrittes einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix soll es zur Ausbildung eines Fibrinnetzwerkes kommen. Die Analyse dieser Fibrinbildung erfolgte mittels Thrombelastographie (TEG) am sogenannten Rotationsthrombelastography Coagulation Analyser (roTEG). Bei der TEG handelt es sich ursprünglich um eine bereits 1948 durch Hartert vorgestellte Methode der kontinuierlichen Messung des Gerinnungsvorganges. Eine technisch modifizierte Methode der TEG-Messung stellt die Rotationsthrombelestographie dar. Hierbei taucht ein Stift in eine mit der Probe befüllte Küvette. Während die Küvette fest in einer auf 37 °C vorgewärmten Halterung verankert ist, wird der Stempel, geführt durch ein Kugellager, von einer Feder um je 5 Grad nach links und rechts rotiert. Sobald sich ein Fibrinnetzwerk bildet wird die Rotation des Stiftes dadurch reduziert. Dies wird optisch registriert und in die sogenannte TEG-Amplitude umgerechnet.

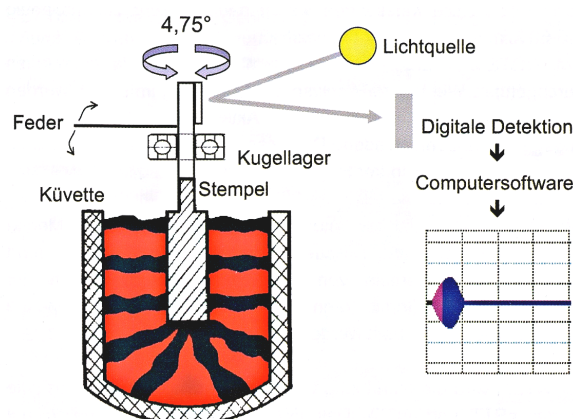


Abb. 7: Darstellung der Detektionsmethode des roTEGs (Rotationsthrombelastography Coagulation Analyser). Durch die Ausbildung eines Fibrinnetzwerkes wird der Stempel in seiner Rotation eingeschränkt. Dies wird optisch registriert und digital ausgewertet (Pentapharm, München).

Die Messung am roTEG erfasst die drei folgenden Parameter:

1. „Gerinnungszeit“ – *Coagulation Time (CT)*, diese wird in Sekunden angegeben und entspricht der Zeit von Beginn der Messung bis zum Einsatz der Gerinnung
2. „Gerinnselformungszeit“ – *Clot Formation Time (CFT)*, diese wird in Sekunden angegeben und entspricht der Zeit ab dem Beginn der Gerinnung bis eine Gerinnselfestigkeit von 20 mm erreicht ist. (Fibrinpolymerisation, Verfestigung des Gerinnsels durch Faktor XIIIa)
3. „Maximale Gerinnselfestigkeit“ – *Maximum Clot Firmness (MCF)*, diese wird aus historischen Gründen in Millimeter registriert und ist ein Maß für die mechanische Ausprägung des entstandenen Gerinnsels (Zunehmende Verfestigung des Gerinnsels durch das polymerisierte Fibrin).

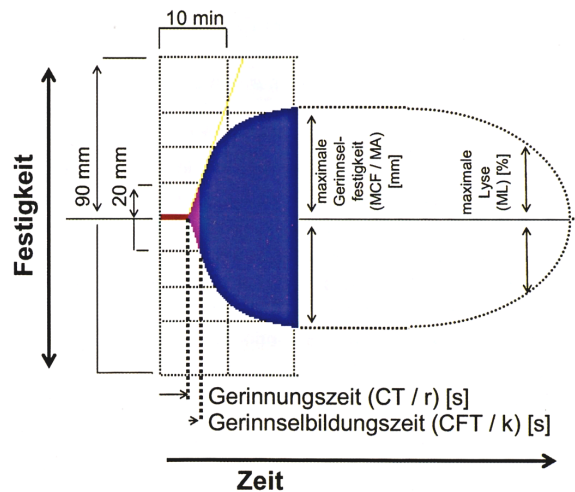


Abb. 8: Darstellung der für die Beurteilung der Fibrinbildung gemessenen Parameter Gerinnungszeit (CT) in Sekunden, Gerinnselformungszeit (CFT) in Sekunden und maximaler Gerinnselfestigkeit (MCF) in Millimeter. Die Angabe der MCF in Millimeter ist historisch bedingt (Pentapharm, München).

1.1. Fibrinbildung der doppelt lyophilisierten Fibrinogenkomponente im Vergleich zur unbehandelten Fibrinogenkomponente des Fibrinklebers

Die Herstellung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches nach Formulierung B beinhaltete die Gefriertrocknung des Gemisches aus Genvektorformulierungen und gelöster Fibrinogenkomponente. Dies bedeutete, dass die vom Hersteller lyophilisiert zur Verfügung gestellte Fibrinogenkomponente des Fibrinklebers zunächst gelöst und anschließend erneut gefriergetrocknet werden musste. Um den Einfluss dieser doppelten Gefriertrocknung hinsichtlich der Fibrinbildung zu untersuchen, wurde die lyophilisierte Fibrinogenkomponente des TISSUCOL® Fibrinklebers in Aprotinin gelöst und erneut gefriergetrocknet. Wieder in destilliertem Wasser aufgenommen und mit Thrombin versetzt, wurden die roTEG-Parameter Gerinnungszeit (CT), Gerinnselbildungszeit (CFT) und maximale Gerinnselhaftigkeit (MCF) bestimmt. Die Mittelwerte aus neun Ansätzen wurden hinsichtlich eines statistisch signifikanten Unterschiedes ($p < 0,05$) gegeneinander verglichen. Es zeigte sich, dass die doppelte Gefriertrocknung der Fibrinogenkomponente keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Fibrinbildung hatte.

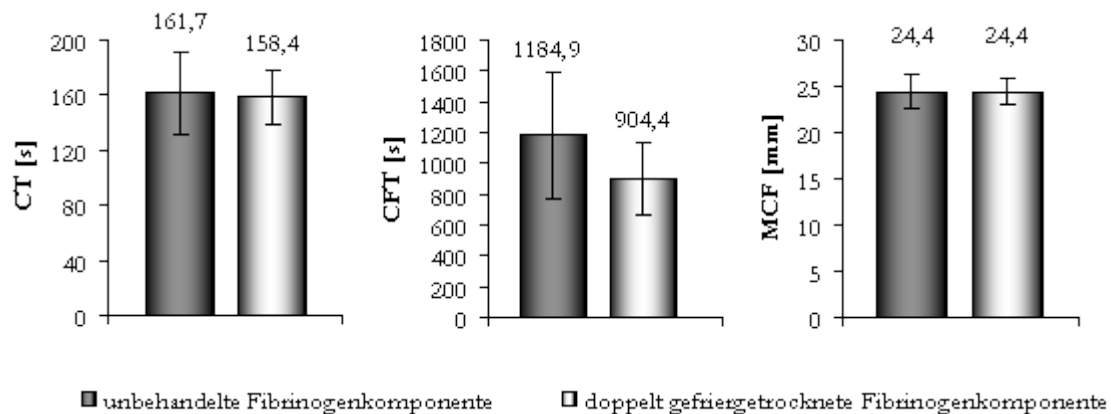


Abb. 9: roTEG-Analyse der Fibrinbildung aus der Fibrinogenkomponente des handelsüblichem Fibrinkleber (dunkelgrau) und der Fibrinbildung aus der doppelt gefriergetrockneten Fibrinogenkomponente (hellgrau). Es wurden jeweils die drei Parameter Gerinnungszeit (CT), Gerinnselbildungszeit (CFT) sowie maximale Gerinnselhaftigkeit (MCF) von 9 Ansätzen gemessen und daraus Mittelwerte sowie Standardabweichungen berechnet.

1.2. RoTEG-Analyse der Fibrinbildung in Abhängigkeit unterschiedlich formulierter Fibrinogen-Vektor-Gemische

Die Fibrinbildung bei Herstellung einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix wurde am roTEG anhand der oben beschriebenen roTEG-Parameter Gerinnungszeit (CT), Gerinnselbildungszeit (CFT) und maximaler Gerinnselhaftigkeit (MCF) untersucht. Zur Herstellung der Gen-aktivierten Fibrin-Matrix wurden die drei Genvektorformulierungen nackte pDNA, PEI-pDNA-Komplexe und Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe verwendet. Der Einfluss der Genvektorformulierungen auf die Fibrinbildung bei Herstellung einer Gen-aktivierten Fibrinmatrix wurde für steigende Mengen pDNA bei konstanter Fibrinogenmenge für folgende zwei Formulierungen des Fibrinogen-Vektor-Gemisches untersucht:

Formulierung A - Mischen von Genvektoren und Fibrinogen.

Formulierung B - Gleichzeitiges Lyophilisieren von Genvektoren und Fibrinogen.

Fibrinogen-Vektor-Gemisch nach Formulierung A (Abb.10, S. 53)

Um das Fibrinogen-Vektor-Gemisch nach Formulierung A herzustellen, wurden die in isotonischer Kochsalzlösung gelösten Genvektorformulierungen mit der in isotonischer Kochsalzlösung gelösten Fibrinogenkomponente vermischt und die Bildung der Gen-aktivierten Fibrin-Matrix durch Zugabe der gelösten Thrombinkomponente gestartet. Als Kontrolle wurde die gelöste Fibrinogenkomponente anstelle der Genvektorformulierungen mit isotonischer Kochsalzlösung alleine vermischt und anschließend mit Thrombin versetzt.

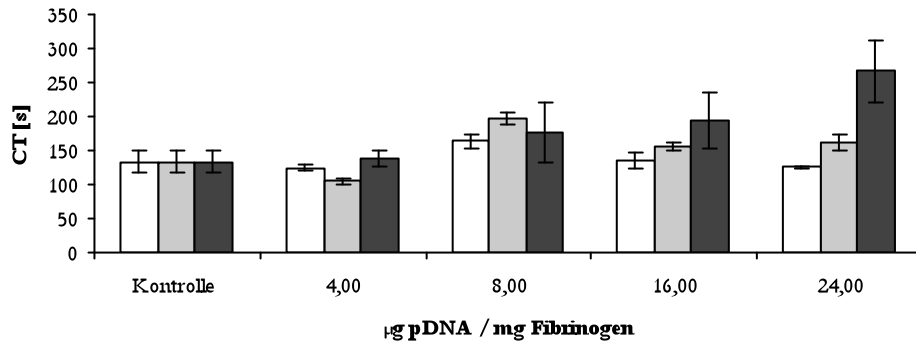
Die Genvektorformulierung der nackten pDNA führte zu keiner Verschlechterung der Fibrinbildung. Die Gerinnungszeit (CT) entsprach in etwa den Messwerten der Kontrolle. Bei höheren pDNA-Konzentrationen ergab sich eine geringe Tendenz zu einer Zunahme der maximalen Gerinnselhaftigkeit (MCF) bei gleichzeitiger Abnahme der Gerinnselbildungszeit (CFT). Wurden die gleichen Mengen an pDNA als PEI-pDNA-Komplexe oder Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe formuliert, so kam es bei beiden Genvektorformulierungen zu einer dosisabhängigen Verlängerung der Gerinnungszeit (CT). Gleichzeitig zeigte sich ein Rückgang der maximalen Gerinnselhaftigkeit (MCF), am stärksten bei den PEI-pDNA-Komplexen. Beide Genvektorformulierungen beeinträchtigten die Gerinnselbildungszeit (CFT) mit steigender Menge an pDNA. PEI-pDNA-Komplexe verlängerten die

Gerinnselfestigungszeit bereits ab 8 µg pDNA / mg Fibrinogen so stark, dass diese nicht mehr messbar war (d.h. nach Definition des roTEG wurde eine maximale Gerinnselfestigkeit von 20 mm nicht mehr erreicht). In geringerem Umfang neigten auch Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe zu einer dosisabhängigen Verlängerung der Gerinnselfestigungszeit (CFT). Diese war bei 24 µg pDNA / mg Fibrinogen in nur mehr einer Probe messbar.

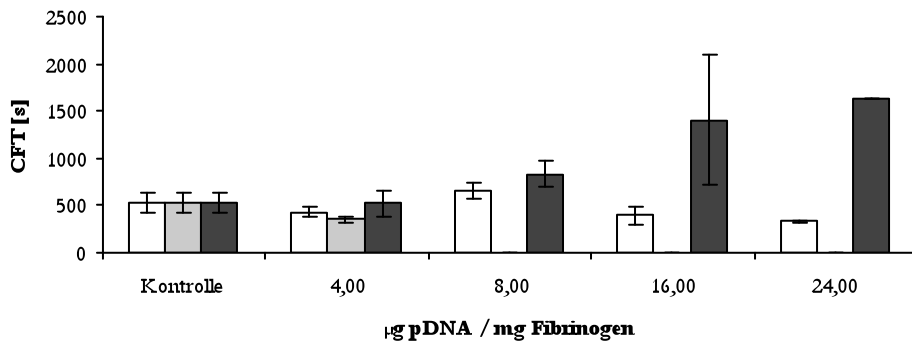
Wurde das Fibrinogen-Vektor-Gemisch nach Formulierung A hergestellt, zeigte die Genvektorformulierung nackte pDNA in Abhängigkeit der pDNA-Konzentrationen keinen negativen Einfluss auf die Fibrinbildung. Die gleichen Mengen pDNA als PEI-pDNA-Komplexe oder Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe formuliert beeinträchtigten die Fibrinbildung mit steigender pDNA-Menge. Dieser Einfluss fiel bei PEI-pDNA-Komplexen am stärksten aus.

roTEG-Analyse der Fibrinbildung bei Herstellung einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix aus einem nach Formulierung A hergestellten Fibrinogen-Vektor-Gemisch

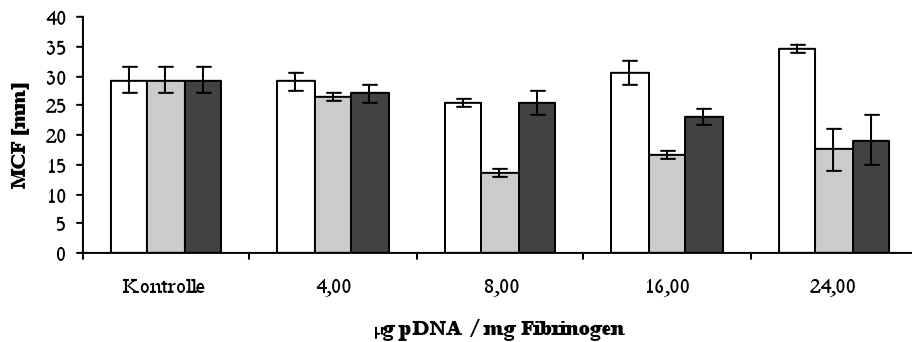
Gerinnungszeit (CT)



Gerinnselbildungszeit (CFT)



Maximale Gerinnselhaftigkeit (MCF)



Nackte pDNA □ PEI-pDNA-Komplexe Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe ■

Abb. 10: Fibrinogen-Vektor-Gemisch nach Formulierung A mit steigenden Dosen an Genvektoren (nackte pDNA, PEI-pDNA-Komplexe und Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe) und Einfluss auf die RoTEG-Parameter Gerinnungszeit (CT), Gerinnselbildungszeit (CFT) und maximale Gerinnselhaftigkeit (MCF). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung (n=2).

Fibrinogen-Vektor-Gemisch nach Formulierung B (Abb. 11, S. 56)

Bei Herstellung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches nach Formulierung B wurden die in destilliertem Wasser gelösten Genvektorformulierungen mit der in Aprotinin gelösten Fibrinogenkomponente zunächst vermischt und das entstandene Fibrinogen-Vektor-Gemisch anschließend über Nacht gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde wieder in destilliertem Wasser aufgenommen und die Bildung der Gen-aktivierten Fibrin-Matrix, durch Zugabe der gelösten Thrombinkomponente gestartet. Bei der Genvektorformulierung der nackten pDNA wurden die Messwerte für doppelt lyophilisierten Fibrinkleber als Kontrolle herangezogen. Bei den Genvektorformulierungen PEI-pDNA-Komplexe und Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe diente jeweils eine doppelt lyophilisierte, nicht mit Genvektorformulierungen versetzte Fibrinogenlösung als Kontrolle.

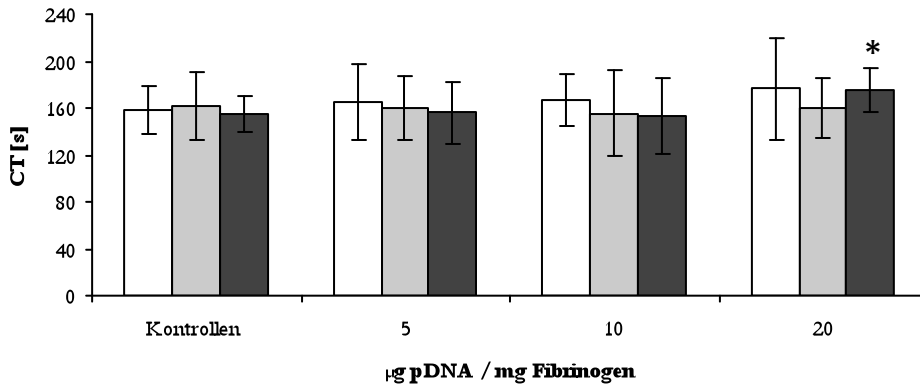
Die Fibrinbildung wurde durch die Genvektorformulierung der nackten pDNA nicht verschlechtert. Die Gerinnungszeiten (CT) der untersuchten pDNA-Konzentrationen unterschieden sich nicht statistisch signifikant von der Kontrolle. Die Gerinnselbildungszeit (CFT) war für 10 µg pDNA / mg Fibrinogen zur Kontrolle statistisch signifikant verkürzt, die Gerinnselbildungszeiten für die übrigen Mengen an pDNA wichen jedoch nicht signifikant von der Kontrolle ab. Die maximale Gerinnselhaftigkeit (MCF) war für alle untersuchten Mengen an pDNA im Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikant erhöht. Das Fibrinogen-Vektor-Gemisch mit der Genvektorformulierung der nackten pDNA bewirkte für die untersuchten pDNA-Mengen ein etwas stabileres Fibringerinnsel als Fibrinogen allein. Wurden die gleichen Mengen pDNA als PEI-pDNA-Komplexe formuliert, ergab sich hinsichtlich der roTEG-Parameter Gerinnungszeit (CT), Gerinnselbildungszeit (CFT) und maximaler Gerinnselhaftigkeit (MCF) kein statistisch signifikanter Unterschied zu den Kontrollen. Auch als Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe formulierte pDNA hatte auf die Gerinnselbildungszeit (CFT) und die maximale Gerinnselhaftigkeit (MCF) keinen signifikanten Einfluss. Hinsichtlich der Gerinnungszeit (CT) zeigte sich erst bei einer Konzentration von 20 µg pDNA / mg Fibrinogen eine geringe, aber statistisch signifikante Verlängerung, geringere pDNA-Mengen hatten keine signifikante Auswirkung auf die Gerinnungszeit (CT). Wurde das Fibrinogen-Vektor-Gemisch nach Formulierung B hergestellt, zeigten die Genvektorformulierungen der nackten pDNA und der PEI-pDNA-Komplexe für die untersuchten pDNA-Mengen keine negativen Einflüsse auf die Fibrinbildung.

III. Ergebnisse

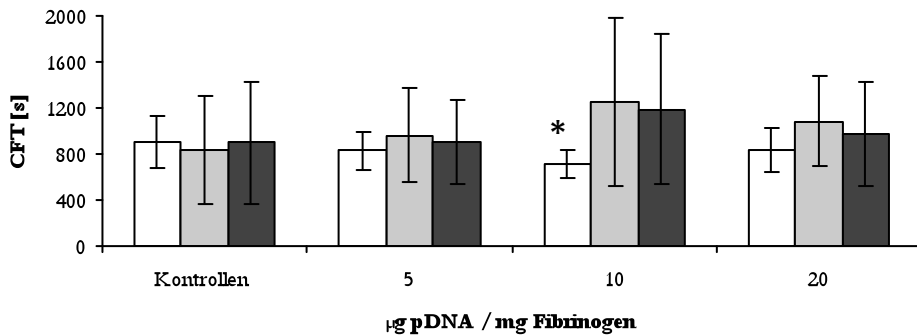
Gleiches zeigte sich für die Genvektorformulierung der Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe hinsichtlich maximaler Gerinnselfestigkeit und Gerinnselbildungszeit. Nur die Gerinnungszeit war ab einer Konzentration von 20 µg pDNA/mg Fibrinogen leichtgradig verlängert.

roTEG-Analyse der Fibrinbildung bei Herstellung einer Gen-aktivierten Fibrinmatrix aus einem nach Formulierung B hergestellten Fibrinogen-Vektor-Gemisch

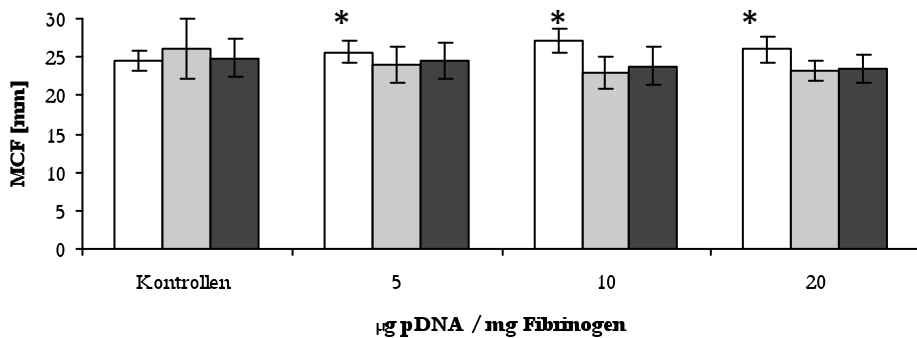
Gerinnungszeit (CT)



Gerinnselbildungszeit (CFT)



Maximale Gerinnselfestigkeit (MCF)



Nackte pDNA □ PEI-pDNA-Komplexe Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe ■

Abb. 11: Fibrinogen-Vektor-Gemisch nach Formulierung B mit steigenden Dosen an Genvektoren (nackte pDNA, PEI-pDNA-Komplexe und Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe) und Einfluss auf die RoTEG-Parameter Gerinnungszeit (CT), Gerinnselbildungszeit (CFT) und maximale Gerinnselfestigkeit (MCF). pDNA (n= 7), PEI-pDNA-Komplexe und Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe (n= 8). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung. * bedeutet p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

2. Freisetzung von nackter pDNA und Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexen aus einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix

2.1. Das ¹²⁵Jod markierte Thymidinkinaseplasmid

Um die Freisetzung eines Plasmides aus der Gen-aktivierten Fibrin-Matrix darstellen zu können, wurde ein Thymidinkinaseplasmid mit ¹²⁵Jod markiert ($c = 0,053 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). Die unter Material und Methoden auf S. 34 gemessenen Proben von je 20 μl hatten im Mittel eine Aktivität von $4702 \pm 63 \text{ s}^{-1}$. Aus beiden Werten lies sich eine spezifische Aktivität von $4436 \pm 59 \text{ s}^{-1}$ pro μg pDNA errechnen. Die Gelelektrophorese ergab für das markierte wie für das unmarkierten Plasmid das gleiche Bandenmuster. Die Autoradiographie der *pDNA zeigte eine erfolgreiche Markierung. Beide Nachweisverfahren belegten, dass das Plasmid durch die Jodierung nicht fragmentiert wurde.

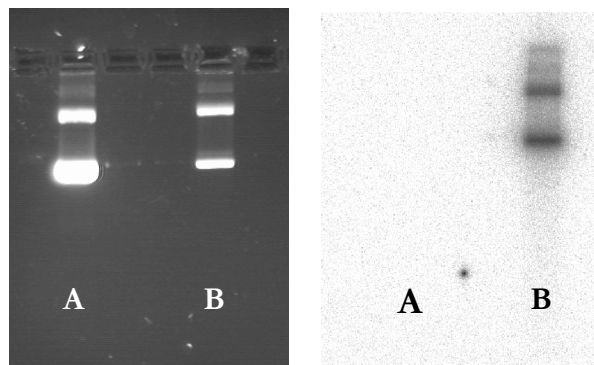


Abb. 12: links: Gelelektrophorese (90 Volt, 60 Minuten, 1%iges TBE-Agarose-Gel); rechts: Autoradiographie des gleichen Gels (100 Minuten Expositionszeit); A = Bande mit unmarkierte pDNA, B = Bande mit ¹²⁵Jod-pDNA.

2.2. Versuchsaufbau und Auswertung der Messdaten

Das mit ¹²⁵Jod markierte Thymidinkinaseplasmid (*pDNA) wurde als nackte pDNA und als Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplex formuliert. Das Fibrinogen-Vektor-Gemisch wurde bei konstanter Menge an Genvektorformulierungen für drei Fibrinogenkonzentrationen (66,30 mg/ml, 49,73 mg/ml, 33,15 mg/ml) auf zwei

unterschiedliche Weisen formuliert: Formulierung B (gemeinsame Gefriertrocknung von Genvektoren und gelöstem Fibrinogen) und Formulierung C (Lösen lyophilisierter Genvektoren in Fibrinogen). Mit Thrombin vermischt, entstanden aus dem jeweiligen Fibrinogen-Vektor-Gemisch feste Fibringerinnsel in Form eines Tropfens, der den Boden der Plattenvertiefungen (96-Lochplatte) komplett ausfüllte. Die festen Fibringerinnsel wurden mit Zellkulturmedium bedeckt, um die Bedingungen eines Zellkulturversuches nachzuahmen. Die Fibringerinnsel ließen sich deutlich leichter herstellen, wenn man hierfür ein Fibrinogen-Vektor-Gemisch nach Formulierung B verwendete, also die Genvektoren und Fibrinogenlösung zunächst vermischt, lyophilisiert und anschließend wieder in destilliertem Wasser löst. Bei Formulierung C erwies es sich als schwierig, die lyophilisierten Genvektoren innerhalb der Vertiefungen der 96-Lochplatte mit der Fibrinogenlösung zu vermischen. Sie waren aber in beiden Fällen bis Tag 18 morphologisch stabil, anschließend zunehmend porös.

Die Aktivität der aus der Fibrin-Matrix in das Kulturmedium freigesetzten *pDNA wurde mittels Gamma-Counter bestimmt. Die relative, kumulative Freisetzung wurde folgendermaßen berechnet: Anhand von Formel 1 wurde die Spezifische Aktivität der beiden Standardproben in CPM (counts per minute)/µg pDNA berechnet. Als Standardproben dienten hierbei 2 Proben der *pDNA-Stammlösung mit je 1,06 µg *pDNA. Die Aktivität dieser beiden Standardproben wurde an jedem Messtag zusätzlich zu den eigentlichen Proben gemessen, um daraus die Aktivität der pro Fibringerinnsel eingesetzten Menge an *pDNA von 1 µg für den jeweiligen Messtag berechnen zu können (Formel 2). Um die % an freigesetztem Plasmid zu berechnen, wurde die gemessene Aktivität einer Probe durch die pro Fibringerinnsel eingesetzte Aktivität dividiert und das Ergebnis mit dem Faktor 100 multipliziert (Formel 3).

Formel(1)

$$\text{Spez. Aktivität d. Standardproben [CPM/}\mu\text{g]} = \frac{\text{gemessene Aktivität d. Standards [CPM]}}{\text{pDNA-Menge d. Standards [}\mu\text{g]}}$$

Formel (2)

$$\text{eingesetzte Aktivität je Fibringerinnsel [CPM]} = \text{Spez. Aktivität d. Standardproben [CPM/}\mu\text{g]} \cdot \text{*pDNA-Menge je Fibringerinnsel [}\mu\text{g]}$$

Formel (3)

$$\% \text{ freigesetztes Plasmid} = \frac{\text{Aktivität d. Probe [CPM]}}{\text{eingesetzte Aktivität je Fibrinclot [CPM]}} \cdot 100$$

Durch Addition der % freigesetzten Plasmids des jeweiligen Messtages ergab sich die kumulative Freisetzung in % für ein Fibringerinnsel. Aus den so berechneten Werten von 3 Fibringerinnseln der gleichen Zusammensetzung wurde der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet. Hieraus ergaben sich die Freisetzungskurven von Abb. 13 und 14 (S. 61 und 63).

2.3. Freisetzung von als nackte pDNA formulierte *pDNA aus einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix (Abb. 13, S. 61)

Wurde die *pDNA als nackte pDNA formuliert und entsprechend Formulierung B gemeinsam mit einer Fibrinogenlösung einer Konzentration von 66,30 mg/ml Fibrinogen lyophilisiert, so wurden innerhalb der ersten 4 Tage bereits 53 % der *pDNA freigesetzt. Eine Verdünnung der Fibrinogenlösung auf 49,73 mg/ml bzw. 33,15 mg/ml bewirkte am gleichen Messtag eine Steigerung der relativen, freigesetzten Menge an *pDNA auf 69 % bzw. 70%. Sie hing damit von der Konzentration der Fibrinogenlösung ab, aus der die Gen-aktivierte Fibrin-Matrix hergestellt wurde. Nach 20 Tagen setzte ein Fibringerinnsel, das aus einer Fibrinogenlösung mit 66,30 mg/ml Fibrinogen hergestellt wurde, insgesamt 83 % der radioaktiven *pDNA frei. Die Verdünnung der Fibrinogenlösung auf 49,73 mg/ml bzw. 33,15 mg/ml ergab eine Steigerung der relativen, freigesetzten Menge an *pDNA auf 92 % bzw. 91 %. Vergleicht man die Freisetzungskurven der Fibringerinnsel, die aus Fibrinogen einer Konzentration von 49,73 mg/ml hergestellt wurden, mit jenen, die aus Fibrinogen mit einer Konzentration von 33,15 mg/ml hergestellt wurden, so zeigte sich, dass der zusätzliche Verdünnungsschritt von 49,73 mg/ml auf 33,15 mg/ml keine relevante Steigerung der *pDNA-Freisetzung bewirkte.

Um das Fibrinogen-Vektor-Gemisch nach Formulierung C herzustellen, wurde die als nackte pDNA formulierte *pDNA zunächst lyophilisiert, um anschließend in der

Fibrinogenlösung aufgenommen zu werden. Wurde das Fibrinogen-Vektor-Gemisch auf diese Weise mit einer Fibrinogenlösung einer Konzentration von 66,30 mg/ml hergestellt, so wurden aus dem Fibringerinnsel nach 4 Tagen 38 % der *pDNA freigesetzt. Verdünnungen der Fibrinogenlösung von 49,73 mg/ml und 33,15 mg/ml bewirkten am gleichen Tag eine Steigerung der relativen, freigesetzten Menge der radioaktiven *pDNA auf 42 % bzw. 56 %. Nach 19 Tagen setzte ein mit nackter pDNA formuliertes Fibringerinnsel mehr als 91 % der *pDNA frei. Dies galt für alle untersuchten Konzentrationen der Fibrinogenlösung, wobei die Verdünnungen von 49,73 mg/ml und 33,15 mg/ml eine leichte Steigerung bewirkten im Vergleich zur konzentrierten Fibrinogenlösung mit 66,30 mg/ml (33,15 mg/ml: 96 %; 49,73 mg/ml: 97 %; 66,30 mg/ml: 91 %).

In beiden Versuchen konnte damit gezeigt werden, dass der größte Anteil einer als nackte pDNA formulierten *pDNA in den ersten Tagen nach Ausbildung der Fibrinmatrix freigesetzt wurde. Dieser anfängliche Freisetzungsschub fiel bei einem Fibrinogen-Vektor-Gemisch nach Formulierung C geringer aus als bei Formulierung B. Zu Versuchsende war die in der Fibrin-Matrix verbliebene Menge an *pDNA bei Formulierung B um wenige Prozent höher als bei Formulierung C. Für beide Formulierungen ließ sich eine Steigerung der relativen Menge an freigesetzter *pDNA durch Verdünnung der Fibrinogenlösung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches nachweisen. Dieser Effekt zeigte sich deutlich für die Verdünnung von 49,73 mg/ml und war bei weiterer Verdünnung auf 33,15 mg/ml nur mehr gering ausgeprägt (Abb. 13, S. 61).

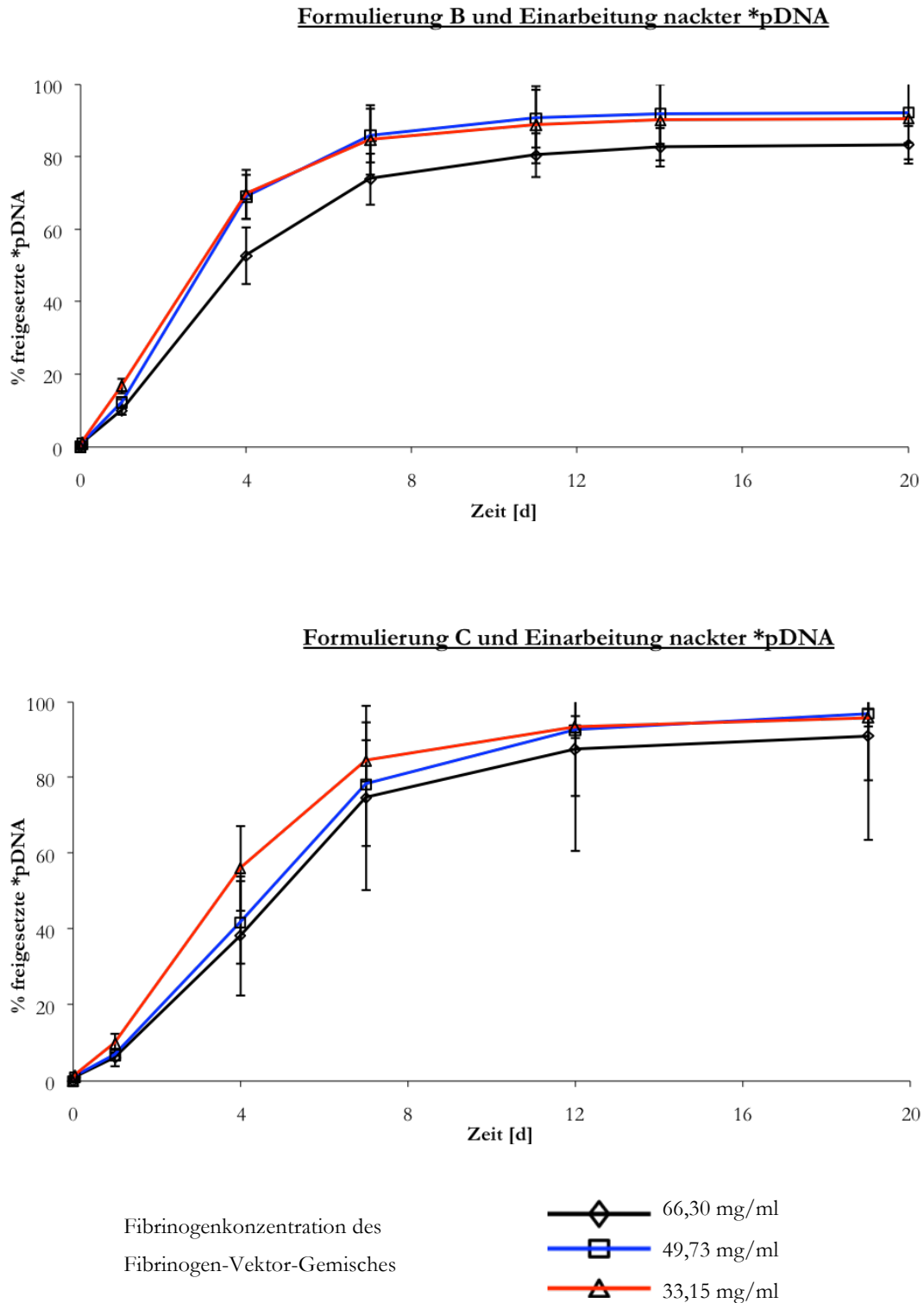


Abb. 13: Kumulative, relative Freisetzung von nackter radioaktiver *pDNA. Die pDNA-Dosis betrug 1,5/2,0/3,0 µg pDNA/mg Fibrinogen bei Fibrinogenkonzentrationen 33,15/49,73/66,30 mg/ml. Das Fibrinogen-Vektor-Gemisch wurde sowohl nach Formulierung B (gemeinsames Lyophilisieren von Genvektoren und Fibrinogen) und Formulierung C (Lösen der lyophilisierten Genvektoren in Fibrinogen) hergestellt und mit Thrombin zur Gerinnung gebracht. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung (n=3).

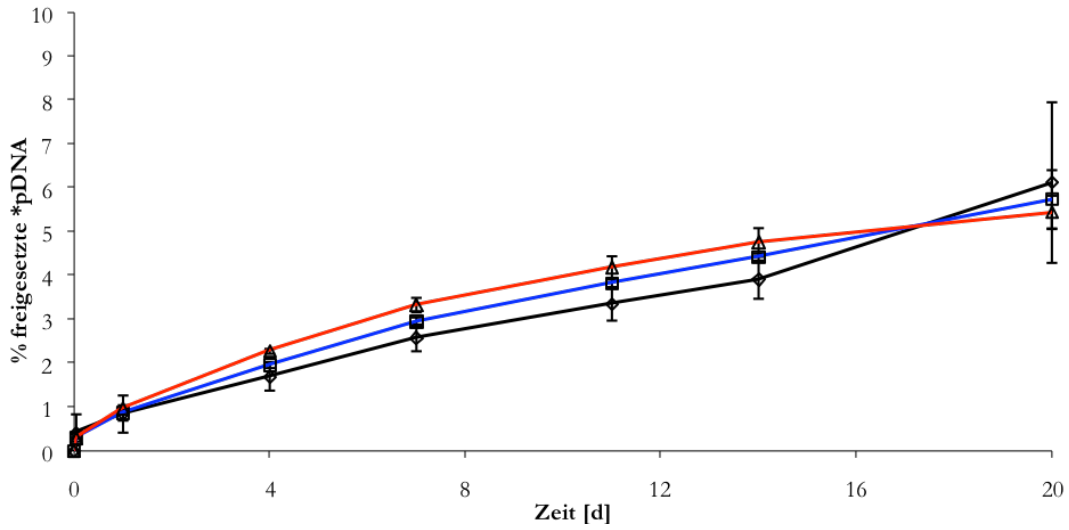
2.4. Gen-aktivierten Fibrin-Matrix und Freisetzung der *pDNA aus Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexen (Abb. 14, S. 63)

Die Freisetzung des mit Hüllpolymer-PEI formulierten radioaktiven Plasmids verlief annähernd linear, unabhängig von der Formulierung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches (Abb.14, S. 63). Der Korrelationskoeffizient aller Kurven lag bei 0,88. Unabhängig von der Formulierungen des Fibrinogen-Vektor-Gemisches beeinträchtigte die Fibrinogenkonzentration des Fibrinogen-Vektor-Gemisches die Freisetzung der *pDNA nicht.

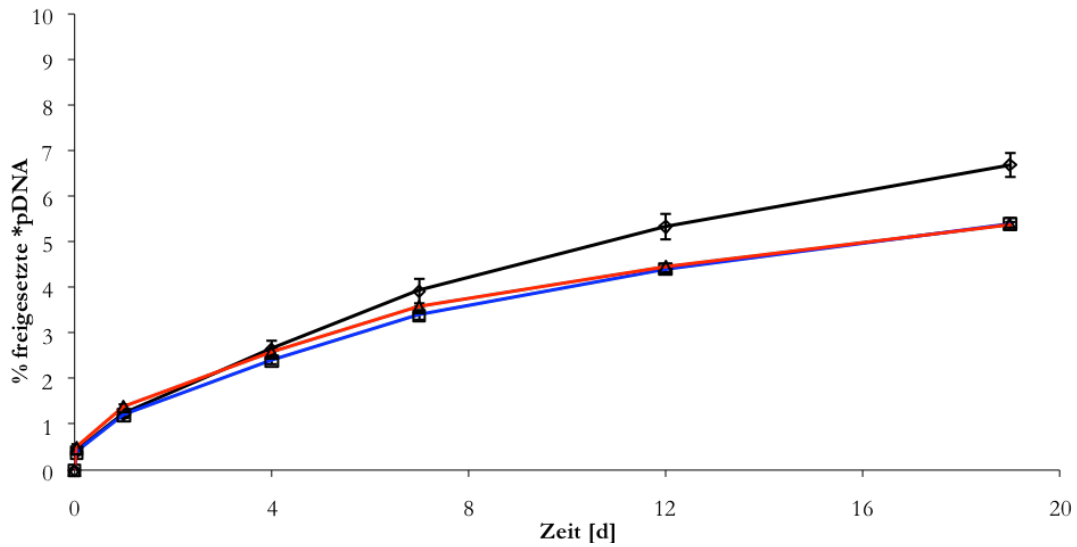
Fibringerinnsel aus einem Fibrinogen-Vektor-Gemisch nach Formulierung B setzten nach 20 Tagen durchschnittlich $5,8 \pm 0,3$ % der *pDNA frei (66,30 mg/ml: 6,1 %; 49,73 mg/ml: 5,7 %; 33,15 mg/ml: 5,4 %). Fibringerinnsel aus einem Fibrinogen-Vektor-Gemisch nach Formulierung C setzten nach 19 Tagen durchschnittlich $5,8 \pm 0,7$ % *pDNA frei (66,30 mg/ml: 6,7 %, 49,73 mg/ml: 5,4 %, 33,15 mg/ml: 5,4 %). Die relative Gesamtmenge an freigesetzter *pDNA aus einem Fibringerinnsel war damit unabhängig von der Formulierung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches. Nach fast 3 Wochen verblieben in beiden Ansätzen mehr als 94 Prozent der mit Hüllpolymer-PEI formulierten *pDNA in der Gen-aktivierten Fibrin-Matrix.

Insgesamt zeigte sich, dass die mit Hüllpolymer-PEI formulierte *pDNA über den gesamten Versuchszeitraum in der Fibrinmatrix verblieb, in nur geringer Menge kontinuierlich freigesetzt wurde und dies unabhängig von der Konzentration bzw. der Formulierung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches. Nackte pDNA wird nach einem anfänglichen Freisetzungsschub im Verlauf des Experimentes nahezu komplett in das umliegende Nährmedium freigesetzt, abhängig von der Fibrinogenkonzentration und Formulierung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches (Abb. 13 und 14, S. 61 und 63).

Formulierung B und Einarbeitung von Hüllpolymer-PEI-*pDNA



Formulierung C und Einarbeitung von Hüllpolymer-PEI-*pDNA



Fibrinogenkonzentration des
Fibrinogen-Vektor-Gemisches

- ◇— 66,30 mg/ml
- 49,73 mg/ml
- △— 33,15 mg/ml

Abb. 14: Kumulative, relative Freisetzung von mit Hüllpolymer-PEI formulierter *pDNA. Die pDNA-Dosis betrug 1,5/2,0/3,0 µg pDNA/mg Fibrinogen bei Fibrinogenkonzentrationen 33,15/49,73/66,30 mg/ml. Das Fibrinogen-Vektor-Gemisch wurde sowohl nach Formulierung B (gemeinsames Lyophilisieren von Genvektoren und Fibrinogen) und Formulierung C (Lösen der lyophilisierten Genvektoren in Fibrinogen) hergestellt und mit Thrombin zur Gerinnung gebracht. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung (n=3).

3. Erprobung einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix in der Zellkultur

Um die Transfektionseffizienz der Gen-aktivierten Fibrin-Matrix in der Zellkultur zu testen, wurden 3 Versuche durchgeführt. In Hinblick auf die Anwendung in lebenden Organismen wurden primäre Zellen verwendet wie Kaninchenchondrozyten bzw. humane Keratinozyten.

3.1. Transfektion von Kaninchenchondrozyten

Bedingungen zum Nachweis der Transfektionseffizienz

Ein für GFP (Green Fluorescent Protein) codierendes Plasmid wurde als nackte pDNA sowie mit Hüllpolymer-PEI-pDNA entsprechend Formulierung A mit der Fibrinogenlösung vermischt und mit Thrombin zur Gerinnung gebracht. Die polymerisierten Fibringerinnsel wurden dann jeweils mit einer Zellsuspension von 20.000 Kaninchenchondrozyten bedeckt.

Die Formulierung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches erwies sich hierbei als technisch aufwendig: Durch Zugabe der Genvektoren in Lösung wurde die Fibrinogenkomponente verdünnt. Um Fibringerinnsel mit definierten Fibrinogen- und pDNA-Konzentrationen herzustellen, konnten die Genvektoren nicht in der geforderten Endkonzentration von 40 µg/ml formuliert werden. Eine Verdünnung der isotonen Kochsalzlösung in der Fibrinogenkomponente musste durch Formulierung der Genvektoren in Kochsalzlösung höherer Konzentration verhindert werden. Die Komponenten ließen sich gut mischen. Anderthalb Stunden nach Zugabe der Thrombinlösung bildeten sich stabile Fibringerinnsel, die jeweils den gesamten Boden einer Vertiefung der 96-Loch-Platte bedeckten. Im Zentrum der Fibringerinnsel zeigten sich aufgrund der Oberflächenspannung Areale, die nicht oder nur sehr dünn mit Fibrin bedeckt waren. Dagegen nahmen die Fibringerinnsel zum Rand der Vertiefung an Dicke zu. Dies hatte eine verminderte Lichtdurchlässigkeit im Randbereich des Fibringerinnsels zur Folge. Damit war hier das Erkennen von GFP-exprimierenden, fluoreszierenden Chondrozyten stellenweise erschwert. Ab dem 14. Versuchstag erschienen die Fibringerinnsel zunehmend porös und zum Teil von zellulärem Abbau in ihrer Ausdehnung

vermindert. Je Versuchstag wurden die GFP-exprimierenden Zellen in den zehn Vertiefungen gezählt und jeweils Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

Biokompatibilität: Wachstum von primären Kaninchenchondrozyten auf einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix

Die Präparation der Kaninchenkondylen ergab eine Zellsuspension mit 100 Zellen pro μl . Morphologisch erwiesen sich die Chondrozyten unter dem Durchlichtmikroskop als vital. Diese Zellen wurden nach Polymerisation der Fibrinmatrix auf die Fibringerinnsel ausgesät. Die Zellen sedimentierten innerhalb der ersten Stunde und wuchsen fortan adhärent auf der Gen-aktivierten Fibrin-Matrix. Im Zentrum der Fibringerinnsel zeigten sich Areale, die nicht oder nur sehr dünn mit Fibrin bedeckt waren. Hier wuchsen die Chondrozyten in verminderter Dichte, teilweise waren diese Areale vollständig frei von Zellen. Nach 17 Tagen erreichten die Knorpelzellen eine Konfluenz von ca. 70 % bis 80 %. Das Fibrin schien zu diesem Zeitpunkt stellenweise abgebaut. Im Zentrum der Fibringerinnsel fanden sich auch nach 17 Tagen weiterhin nur wenige Zellen. 10 Tage nach Versuchsbeginn traten vereinzelt phänotypisch veränderte Zellen mit abgeflachtem Zellkern und spindelförmigen Ausläufern auf der gesamten Oberfläche des Fibringerinnsels auf. Morphologisch ähnelten sie Fibroblasten. Ihr Anteil unter den phänotypisch unveränderten Chondrozyten stieg in den folgenden Tagen weiter an und wurde am Ende der Versuchszeit auf durchschnittlich rund 20 Prozent geschätzt.

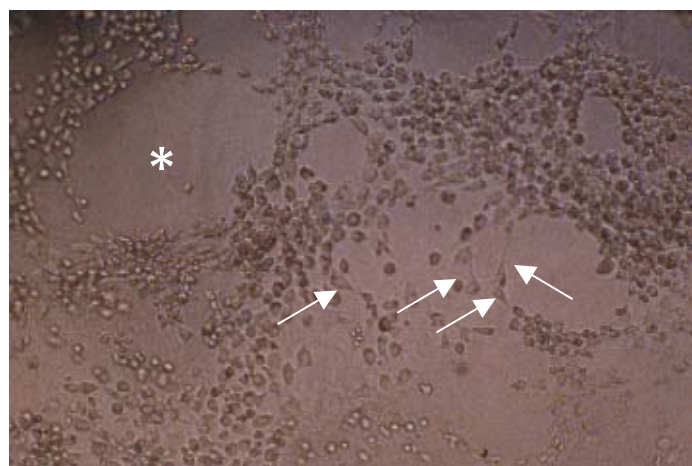


Abb. 15: Mikroskopische Durchlichtaufnahme einer mit Kaninchenchondrozyten bewachsenen Gen-aktivierten Fibrin-Matrix nach 10 Versuchstagen. Areale des Bodens der Vertiefung, die nicht mit Fibrin bedeckt waren wurden nur spärlich mit Zellen besiedelt (*). Nach 10 Tagen traten in allen Vertiefungen Fibroblasten-ähnliche Zellen auf (Pfeile). Ihr Anteil stieg während des Versuches und lag nach 17 Tagen bei rund 20 %.

GFP-Expression in primären Kaninchenchondrozyten

Unter den Kaninchenchondrozyten, die auf einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix mit nackter pDNA wuchsen, traten in einem Zeitraum von 7 bis 13 Tagen nach Versuchsbeginn nur in 2 Vertiefungen vereinzelt grün fluoreszierende Zellen auf. Diese ließen sich im weiteren Verlauf nicht mehr beobachten. In 8 von 10 Vertiefungen zeigten sich über die gesamte Versuchsdauer keine GFP-exprimierenden Zellen.

Wurden die Chondrozyten auf einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix mit Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexen kultiviert, zeigten sich bereits nach 48 Stunden die ersten grün fluoreszierenden Zellen. Weitere sechs Tage später fanden sich in allen zehn Vertiefungen grün fluoreszierende Zellen, deren durchschnittliche Anzahl am achten Tag um das Vierfache anstieg. Von diesem Zeitpunkt an schwankte die mittlere, absolute Zahl der GFP-exprimierenden Zellen zwischen 34 und 46 je Vertiefung.

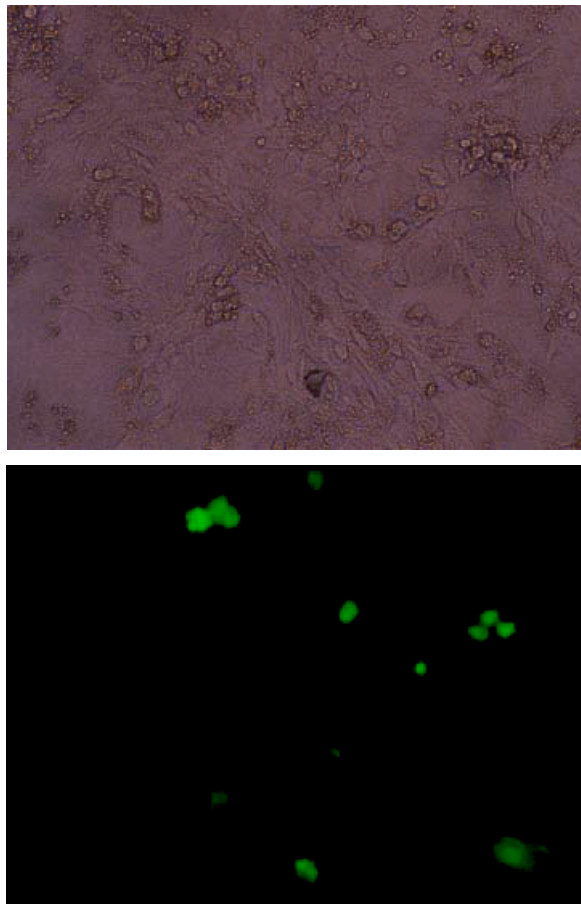


Abb. 16: Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahme von Kaninchenchondrozyten (20.000 Zellen pro Vertiefung) in 100facher Vergrößerung an Tag 8, die auf einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix mit Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexen wuchsen. (Zusammensetzung eines Fibringerinnsels siehe Tabelle 14, S. 42)

Expression von GFP in primären Kaninchenchondrozyten durch Einsatz einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix aus einem Fibrinogen-Vektor-Gemisch nach Formulierung A

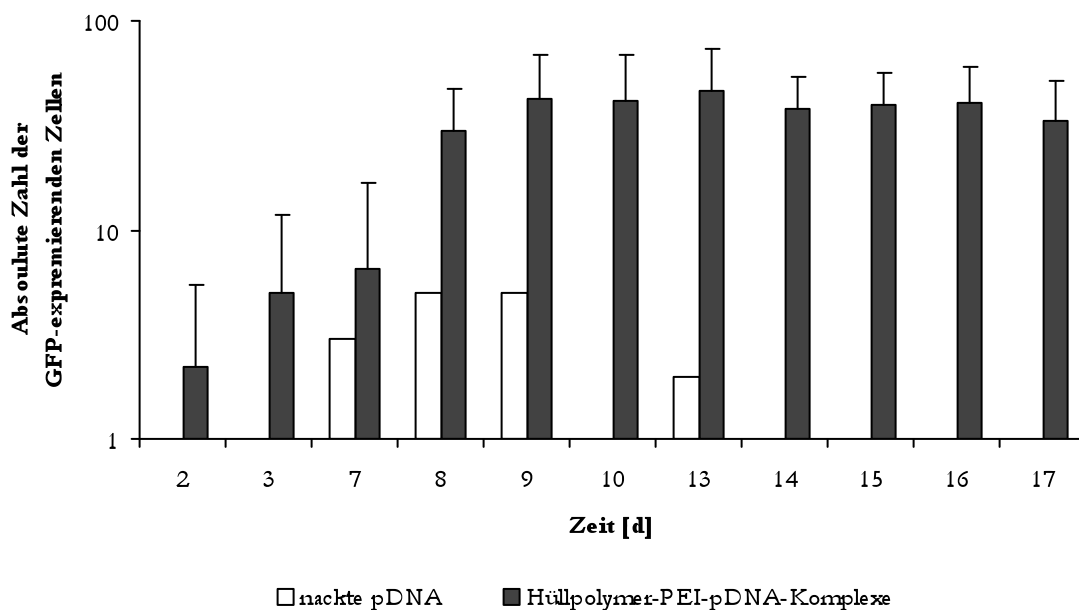


Abb. 17: Dargestellt ist die absolute Anzahl GFP-exprimierender Kaninchenchondrozyten (20.000 / Fibringerinnsel) über einen Zeitraum von 17 Tagen, die auf einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix wuchsen, in Abhängigkeit von den eingearbeiteten Genvektorformulierungen nackte pDNA (helle Balken) und Hüllpolymer-PEI-pDNA (dunkle Balken). Die Herstellung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches erfolgte nach Formulierung A.

3.2. Transfektion von humanen Keratinozyten

Bedingungen zum Nachweis der Transfektionseffizienz

Ein für Luciferase codierendes Plasmid wurde in einem ersten Versuch als nackte pDNA und als Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplex formuliert, in einem zweiten Versuch zusätzlich als PEI-pDNA-Komplex. Entsprechend Formulierung B wurden die Genvektorformulierungen in beiden Versuchen mit der Fibrinogenkomponente vermischt und das entstandene Fibrinogen-Vektor-Gemisch lyophilisiert und wieder in Aqua dest. gelöst. Um eine optimale Transfektion zu erreichen, sollten die Keratinozyten in die Fibrinmatrix eingebettet werden. Dazu wurde im ersten Versuch Formulierung B um die Arbeitsschritte 6 bis 8 erweitert (s. Abb. 18, S. 68).

Die Keratinozyten wurden im Fibrinogen-Vektor-Gemisch suspendiert und das Fibrinogen-Vektor-Zell-Gemisch mit Thrombin zur Gerinnung gebracht.

Die Herstellung der Gen-aktivierten Fibrin-Matrix aus einem Fibrinogen-Vektor-Gemisch nach Formulierung B gestaltete sich dabei ohne technische Schwierigkeiten. Die Fibrinogenlösung mit einer Konzentration von 33,15 mg/ml lies sich bei geringer Viskosität gut pipettieren. Nach erfolgreicher Lyophilisation konnte das entstandene Pulver vollständig in destilliertem Wasser resuspendiert werden. Das Zellpellet konnte restlos in dem Fibrinogen-Vektor-Gemisch aufgenommen werden, die Viskosität der Lösung erschwerte dies allerdings zu Beginn. Zudem dauerte es, bis die Zellen vollständig in dem Fibrinogen-Vektor-Gemisch suspendiert waren.

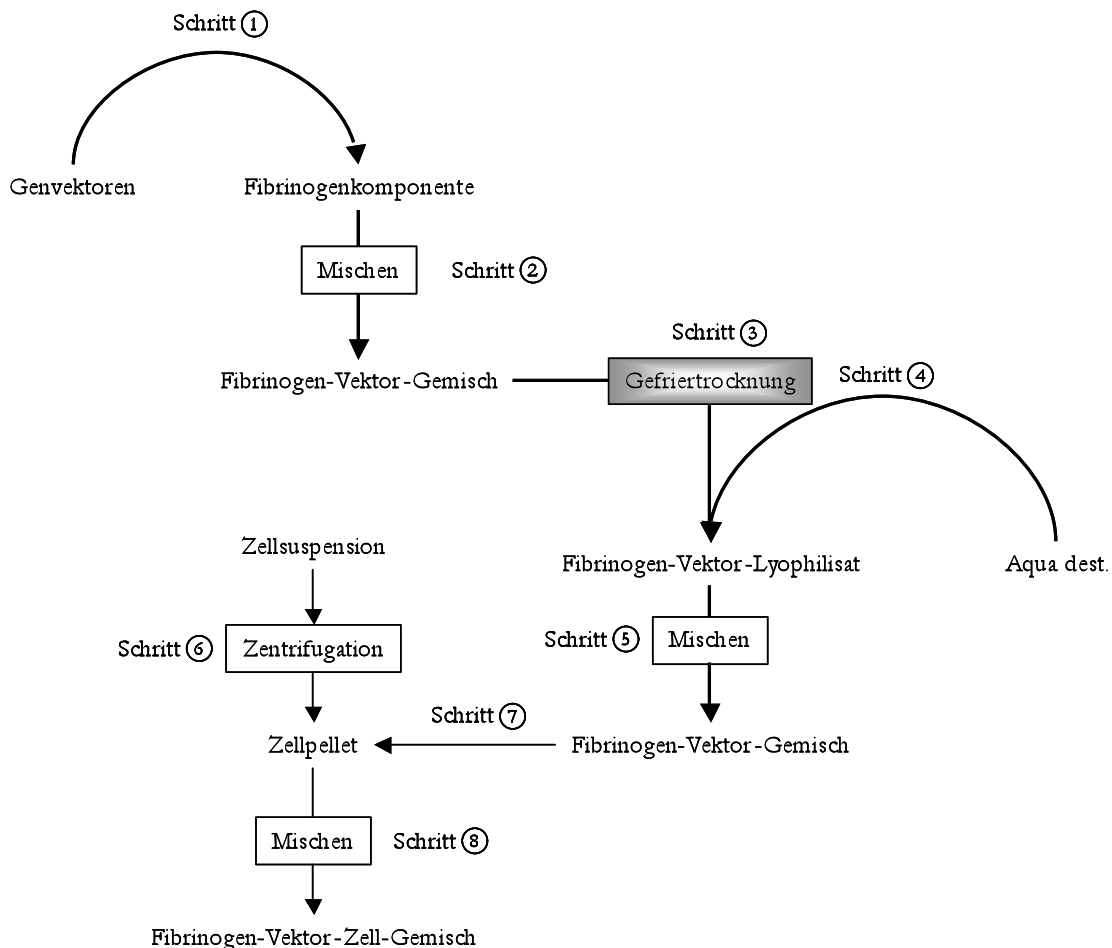


Abb. 18: Erweiterung des Schemas zur Herstellung eines Fibrinogen-Vektor-Gemisches nach Formulierung B um Zellen in eine Fibrinmatrix einzubetten.

Um das Einbetten der Keratinozyten in die Fibrin-Matrix zu erleichtern, wurde das in Abb. 18 dargestellte Protokoll modifiziert entsprechend Abb. 19, wobei die ersten 5 Arbeitsschritte identisch waren. Das Zellpellet wurde hier aber zunächst in einem geringen Volumen Kulturmedium gelöst und diese Zellsuspension mit dem flüssigen Fibrinogen-Vektor-Gemisch gemischt. Die Zellsuspension ließ sich so leicht und schnell mit dem Fibrinogen-Vektor-Gemisch vermischen.

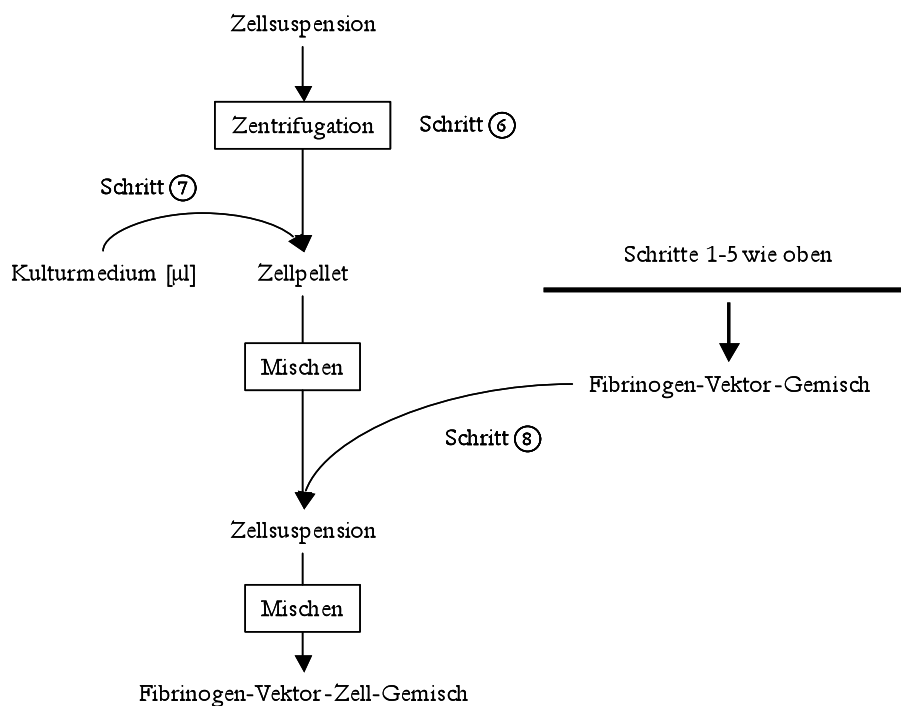


Abb. 19: Optimiertes Schema zur Einbettung von Zellen in eine Gen-aktivierte Fibrin-Matrix. Schritte 1-5 siehe Abb. 18.

Die beiden unterschiedlich hergestellten Fibrinogen-Vektor-Zell-Gemische wurde mit Thrombin zur Gerinnung gebracht. Es zeigte sich, dass die Verwendung von 8 µl Thrombin (500 IE) gegenüber 5 µl (500 IE) schneller zu einem Fibringerinnsel führt. Da sich in den Fibringerinnseln, die nach optimiertem Schema (Abb. 19) hergestellt wurden auch ein geringer Anteil Zellkulturmedium befand, konnten hier die fertigen Fibringerinnsel länger inkubiert werden, bevor das eigentliche Medium zugegeben wurde. Beide Versuche zeigten, dass die Verwendung einer 24-Loch-Platte gegenüber

einer 96-Lochplatte die Ausbildung gleichmäßiger, tropfenförmiger Fibringerinnsel ermöglichte.

Biokompatibilität: Wachstum von primären, humanen Keratinozyten in einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix

Die Keratinozyten zeigten eine normale Proliferation in der Kulturflasche und wurden bei einer Konfluenz von 80 % bzw. 90 % in Passage 2 für die Versuche präpariert. Die Keratinozyten waren nach ausplattieren der Gen-aktivierten Fibrin-Zell-Matrix gleichmäßig in der Matrix suspendiert (s. Abb. 20). Die anfangs noch sphärisch aussehenden Zellen bildeten etwa innerhalb eines Tag spindelförmige Ausläufer. Wurden 175.000 Zellen je Fibringerinnsel eingesetzt, so waren die zu Beginn festen Fibringerinnsel innerhalb von 5 Tagen lysiert und durch einen an ihrer Stelle befindlichen dichten, adhärenen Zellrasen ersetzt. Dieser breitete sich anschließend weiter in den Vertiefungen der Kulturplatten aus. Wurden 100.000 Keratinozyten in ein Fibringerinnsel eingebettet, so waren bis Tag 8 noch feste Gerinnsel nachweisbar. Diese wurden dann zwischen Tag 8 und Tag 14 abgebaut. In beiden Versuchen erreichten die Keratinozyten in der 24-Lochplatte innerhalb von zwei Wochen eine Konfluenz von 100 % (175.000 Zellen: Tag 8 bis 13, 100.000 Zellen: Tag 8 bis 14). Bis Versuchsende waren mikroskopische Fibrinreste zu erkennen, die teilweise an den Zellen klebten. An Stellen, an denen keine Reste des Fibrins sichtbar waren, wuchsen die Zellen in einem kopfsteinpflasterartigen Zellrasen.

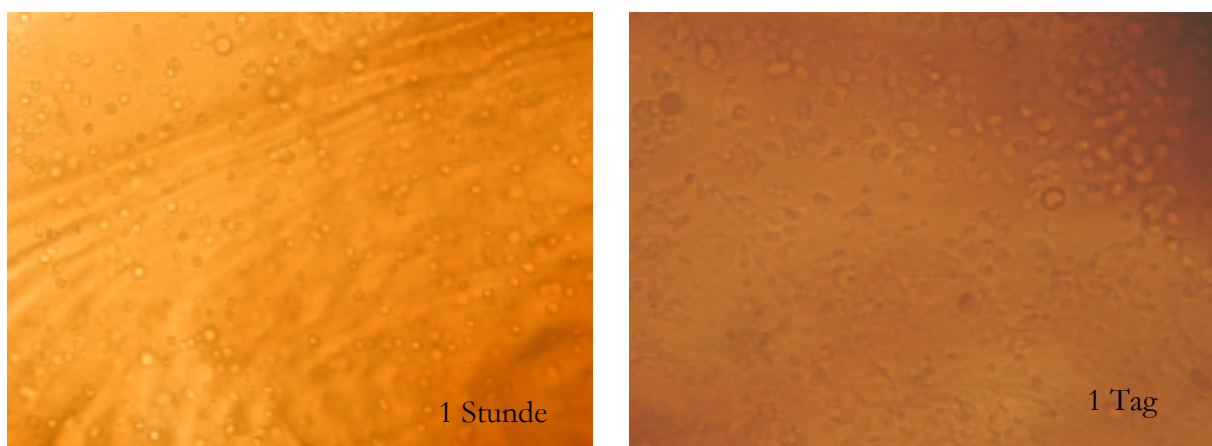


Abb. 20: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix mit in diese eingebettet wachsende humane Keratinozyten (Fibrinogen-Vektor-Gemisches nach Formulierung B, pro Fibringerinnsel: 3,0 µg pDNA/mg Fibrinogen, 175.000 Zellen). Eine Stunde nach ausplattieren des Fibringerinnsels zeigten sich darin gleichmäßig verteilt kugelförmige Zellen (linkes Bild, 1 Stunde). Bereits nach einem Tag lies sich eine deutliche Zunahme der Zelldichte im Lichtmikroskop erkennen. Nun zeigten die Keratinozyten spindelförmige Fortsätze (rechtes Bild, 1 Tag).

Probengewinnung und Luciferasetest

Die Fibringerinnsel ließen sich anfangs in beiden Versuchen problemlos mit einem Spatel vom Boden der Kulturplatte lösen. Da an den Tagen 6, 8 und 13 bzw. 14, 21 und 28 nur mehr ein adhärenter Zellrasen mit Fibrinresten anstelle der festen Fibringerinnsel vorhanden war, mussten Zellrasen und Fibrinreste mittels Spatel aus der Vertiefung geschabt werden. Zellen und Fibrinreste konnten leicht gelöst und vollständig im Lysepuffer suspendiert werden. Die mechanische Zerkleinerung ergab stets eine optisch homogene Flüssigkeit zur Durchführung des Luciferasetestes. Da ab Tag 14 eine nur mehr geringe Expression zu erwarten war, wurde ab diesem Messtag ein sensiblerer Luciferasepuffer verwendet. Damit lies sich bis Versuchsende eine Expression des Luciferasegens nachweisen. Je Genvektorformulierung wurden an einem Messtag 3 Ansätze verarbeitet und die expremierte Luciferase gemessen.

Die Expression von Luciferase in Keratinozyten, die eingebettet in eine Gen-aktivierte Fibrin-Matrix mit Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexen wuchsen, erreichte an Tag 1 nach Versuchsbeginn ihren höchsten Wert (175.000 Zellen: 3152 pg, s. Abb. 21, S. 72; 100.000 Zellen: 324 pg, s. Abb. 22, S. 73). Bei 175.000 Zellen sank die von den Keratinozyten produzierte Menge an Luciferase an Tag 4 und 6 auf 781 bzw. 83 pg ab, blieb aber anschließend bis Versuchsende an Tag 13 mit durchschnittlich 168 pg Luciferase auf annähernd gleichbleibenden Niveau (Abb. 21, S. 72). Bei 100.000 Zellen sank die Luciferase-Expression in den ersten 2 Wochen ab Tag 3 rasch ab. Mit Hilfe des sensibleren Luciferasepuffers konnte an Tag 14 noch eine Luciferase-Expression von 19 pg Luciferase pro Fibringerinnsel nachgewiesen werden. Im Verlauf nahm die Menge an produzierter Luciferase wieder zu und stieg bis Tag 28 auf 260 pg Luciferase an (s. Abb. 22, S. 73).

PEI-pDNA-Komplexe führten zu Beginn zu einer niedrigeren Luciferase-Expression als Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe, wobei die Expression in der ersten zwei Wochen an Tag 3 mit 56 pg Luciferase pro Fibringerinnsel am höchsten war. Ähnlich wie bei den Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexen kam es ab Tag 14 zu einem Anstieg der Luciferase-Expression. Diese übersteigt an den Tagen 21 und 28 die der Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe (s. Abb. 22, S. 73).

Nackte pDNA führte in den ersten zwei Wochen sowohl bei 175.000 als auch bei 100.000 Zellen in nur jeweils einer Probe zu einer geringen Luciferase-Expression (175.000 Zellen: 33 pg, 100.000 Zellen <1 pg). Unter Verwendung des sensibleren Luciferasepuffers konnte an den Tagen 14, 21 und 28 eine im Vergleich zu den

beiden anderen Genvektorformulierungen sehr geringe Luciferase-Expression < 1 pg Luciferase gemessen werden (s. Abb. 22, S. 73).

Expression von Luciferase in humanen Keratinozyten durch Einsatz einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix aus einem Fibrinogen-Vektor-Gemisch nach Formulierung B

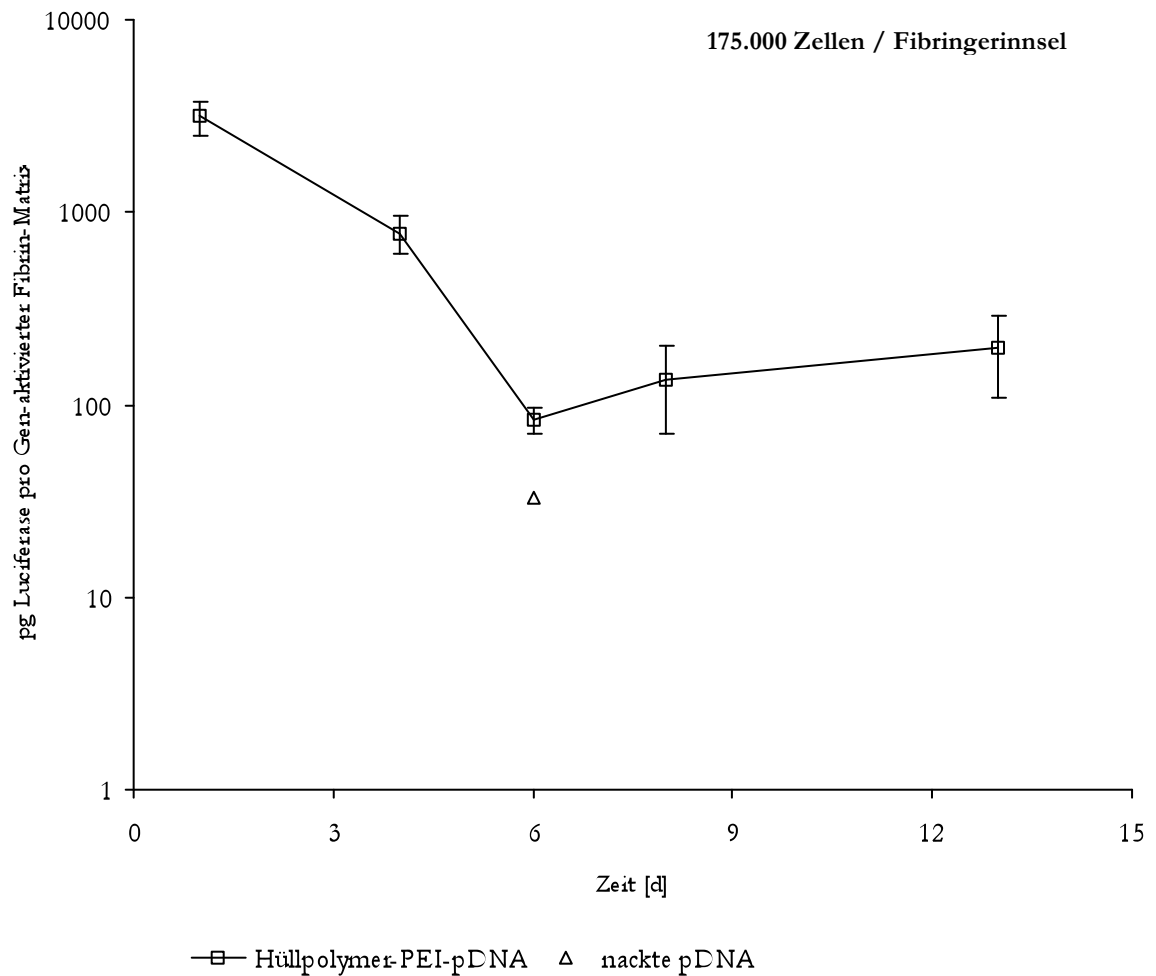


Abb. 21: Dargestellt ist die Menge an von humanen Keratinozyten (175.000/Fibringerinnsel) produzierter Luciferase in pg pro Fibringerinnsel. Die humanen Keratinozyten wuchsen eingebettet in die Gen-aktivierte Fibrin-Matrix aus einem Fibrinogen-Vektor-Gemisch nach Formulierung B. Mit Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexen zeigte sich nach einem anfänglichen Gipfel eine über den ganzen Versuchszeitraum anhaltende Luciferase-Expression. Nackte pDNA führte in nur einer Probe an Tag 6 zu einer geringen Luciferase-Expression. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung ($n = 3$).

Expression von Luciferase in humanen Keratinozyten durch Einsatz einer optimierten Gen-aktivierten Fibrin-Matrix aus einem Fibrinogen-Vektor-Gemisch nach Formulierung B

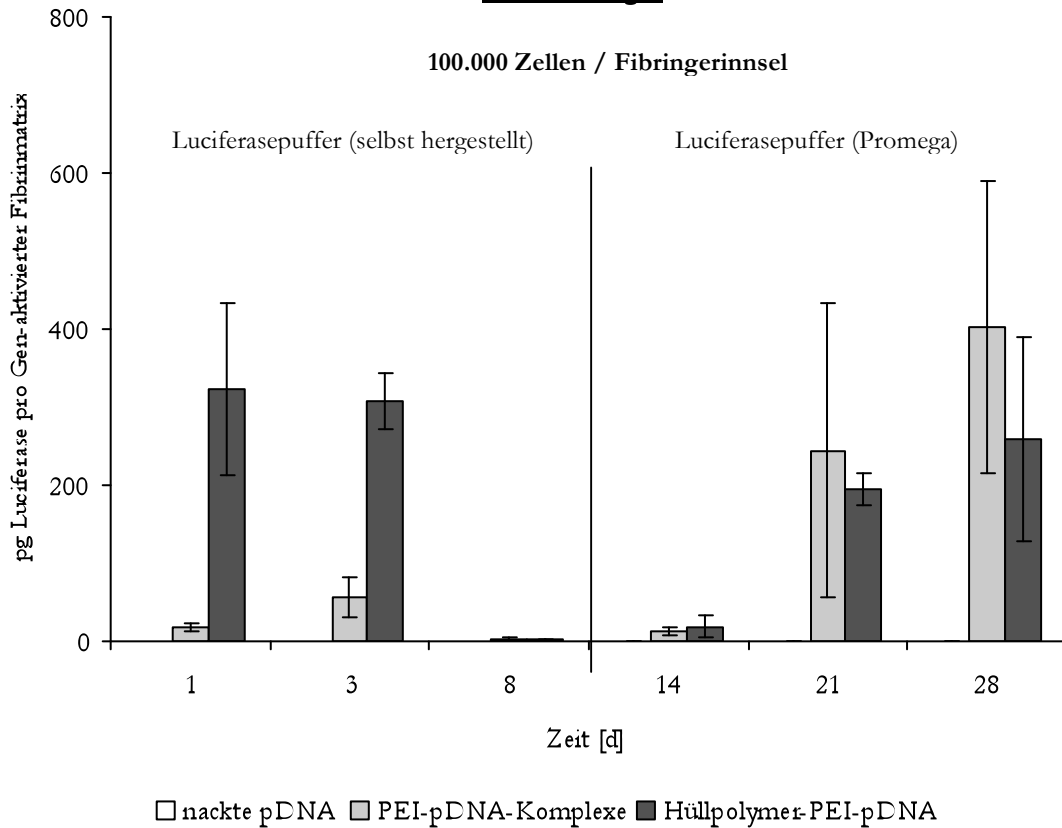


Abb. 22: Luciferase-Expression von primären, humanen Keratinozyten der Passage 2 (100.000/Fibringerinnsel), die eingebettet in eine Gen-aktivierte Fibrin-Matrix wuchsen. Das Fibrinogen-Vektor-Gemisch wurde nach Formulierung B durch gemeinsames Lyophilisieren von Fibrinogen und Genvektoren hergestellt. An den Tagen 14, 21 und 28 wurde eine sensiblerer Luciferasepuffer verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung (n = 3).

IV. Diskussion

1. Zielsetzung der Arbeit

1.1. Das Prinzip der Gen-aktivierten Matrix

Rekombinante Wachstumsfaktoren werden auf dem Gebiet der Geweberegeneration („tissue engineering“) seit langem in vitro und in vivo erfolgreich eingesetzt (Nimni 1997). Hinsichtlich der Verfügbarkeit dieser rekombinanten Wachstumsfaktoren ergeben sich allerdings zwei entscheidende Probleme. Zum einen ist die Herstellung von bioaktiven, hochangereicherten Wachstumsfaktoren mit den natürlichen posttranslationalen Modifikationen aufwendig, sowie kostspielig, zum anderen ist die biologische Wirkung in vivo aufgrund des raschen enzymatischen Abbaus eingeschränkt (Bonadio et al. 1999). Eine Optimierung der Bioverfügbarkeit konnte durch Einarbeitung der rekombinanten Wachstumsfaktoren in resorbierbare bzw. nicht resorbierbare Biomaterialien erzielt werden. Im Sinne eines „drug delivery systems“ werden die Wachstumsfaktoren aus einer Trägersubstanz in das umliegende Gewebe freigesetzt und damit die lokale Verfügbarkeit erhöht (Lee et al. 2000). Die verschiedenen rekombinanten Wachstumsfaktoren sind Arzneimittel, die entsprechend geltendem Recht der Zulassung bedürfen. Da mittlerweile die genetische Sequenz zahlreicher, teils in ihrem Aufbau auch komplexer Wachstumsfaktoren zur Verfügung steht, stellt die Verwendung von Genen, die für Wachstumsfaktoren codieren, eine attraktive Alternative zu den rekombinanten Proteinen dar. Die entsprechenden Gene lassen sich in Plasmide klonieren. Diese können mit geringem technischen und finanziellen Aufwand in größerer Menge produziert werden. Hinsichtlich der Verträglichkeit besteht der Vorteil darin, dass genetisch modifizierte Zellen die Wachstumsfaktoren im Organismus nun am Zielort in körpereigener Form bilden. Um die Wachstumsfaktoren in situ produzieren zu lassen, wurden ex vivo transfizierte Zellen entweder direkt (Vogt et al. 1994, Bonadio et al. 1999) oder an einem Biomaterial gebunden am gewünschten Ort implantiert (Saltzman 1999). Als Erweiterung dieses Konzeptes stellten Fang et al. 1996 das Prinzip der sogenannten „Gen-aktivierten Matrix“ (GAM) vor. Sie setzt sich aus

Genvektoren und einem resorbierbarem Biomaterial, beispielsweise Schwämmen oder Gels, zusammen. Kollagenschwämme wurden hierbei erfolgreich als Träger von Genvektoren *in vitro* und *in vivo* eingesetzt. (Fang et al. 1996, Bonadio et al. 2002). Auch die eigene Arbeitsgruppe konnte Kollagenschwämme als Träger für nicht virale Genvektorkomplexe erfolgreich einsetzen (Scherer et al. 2002). Das Kollagen dient den einwachsenden Zellen zusätzlich als Leitschiene. Die in die dreidimensionale Matrix einwachsenden Zellen werden durch die in der Matrix immobilisierten oder von ihr freigesetzten Genvektoren transfiziert und exprimieren das entsprechende (Wachstumsfaktor-)Gen lokal am gewünschten Zielort. Auf der GAM können nun entweder Zellen *in vitro* kultiviert und anschließend mit dem genbeladenen Träger transplantiert werden, oder eleganter, die GAM wird direkt in die gewünschte Zielregion wie beispielsweise Haut- oder Knorpeldefekte implantiert und *in situ* von Zellen bewachsen. Selbst wenn Proteine wie Wachstumsfaktoren von einem Retardsystem freigesetzt werden, geschieht dies sehr schnell. Initial werden teils hohe Wirkspiegel erreicht, die dann leider rasch unter den therapeutisch wirksamen Bereich fallen. Der Einsatz von Plasmiden in solchen Retardsystemen hilft, toxische Wirkspiegel zu vermeiden und ermöglicht über einen längeren Zeitraum im therapeutischen Bereich liegende Konzentrationen der Wachstumsfaktoren (Bonadio et al. 1999). Dies ist für einen effektiven und sicheren Einsatz solcher Systeme entscheidend. Die Kombination von Genvektoren mit Trägermaterialien hat zudem den Vorteil, dass der Träger an sich als Gerüst für die einwachsenden Zellen in Defekten genutzt werden kann. Geschieht dies beispielsweise im Rahmen der Wundheilung, fördern resorbierbare Trägermaterialien wie Kollagen zusätzlich den Heilungsvorgang (Fang et al. 1996). Zudem schützt die Trägermatrix die Genvektoren vor einem vorzeitigen enzymatischen Abbau und kann die systemische Wirkung durch Bindung der Genvektoren an die gewünschte Zielregion vermindern. Damit vereint das Prinzip der GAM eine Reihe von Vorteilen für den lokalen Gentransfer und war Ziel dieser Arbeit.

1.2. Fibrin als Träger in einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix

Fibrinogen steht im zentralen Mittelpunkt der Gerinnungskaskade mit der Bildung des Fibrinnetzwerkes durch Thrombin. Aufgrund der langjährigen Erfahrung mit dem Arzneistoff Fibrinogen existieren bereits zahlreiche Daten zur Gewebeverträglichkeit und müssen nicht erst erhoben werden.

Bei Fibrin(ogen) handelt es sich um ein vielseitig in der Medizin einsetzbares resorbierbares Biomaterial. Seit 1982 ist es in Form des Fibrinklebers in Deutschland als Arzneistoff zugelassen (Paul-Ehrlich-Institut) und findet beispielsweise im Bereich der Hämostase oder der Gewebeklebung seither vielseitigen Einsatz. Als Trägermaterial für ein „drug delivery system“ eignet sich dieses Polymer besonders, da es eine Reihe von Vorteilen in sich vereint. Fibrin(ogen) stellt in einer Wunde kein Fremdmaterial dar, da es dort bereits physiologisch auftritt. Da es zudem, wie eingangs gezeigt, das zentrale Moment der Wundheilung ist, eignet es sich besonders für den Einsatz im Bereich der Geweberegeneration. Das Fibrinnetzwerk fördert und reguliert nicht nur die Wundheilung, es dient einwachsenden Zellen auch als Leitschiene. Zum anderen lassen sich mit ihm auch Zellen in Wundgebiete transplantieren. In Form des Fibrinklebers stellt Fibrin(ogen) ein einfach zu handhabendes 2-Komponentensystem dar, dass sich in der Chirurgie bewährt hat. Auf Fibrin(ogen) basierende „delivery“-Systeme lassen sich bei minimal invasiven Verfahren wie Arthroskopien oder Endoskopien, welchen heutzutage immer mehr Bedeutung zu kommt, bequem einsetzen. Arbeiten, die Fibrin(ogen) als „delivery“-System einsetzen, existieren seit einigen Jahren. Sakiyama et al. setzten Fibrin beispielsweise als „delivery system“ für Wachstumsfaktoren ein, Trentin et al. verwendeten es als GAM, um Zellen zu tranfizieren (Sakiyama et al. 2000, Trentin et al. 2005).

1.3. Nicht virale Genvektoren

Nicht-virale Genvektoren stellen zunehmend eine attraktive Alternative für den Gentransfer dar. Sie zeichnen sich aus durch

- eine geringere Immunogenität, da sie keine spezifische Immunreaktion auslösen;
- eine einfache Handhabung;
- die Möglichkeit zur Produktion in großer Menge;

- niedrige Produktionskosten;
- ein flexibleres Fassungsvermögen an Nukleinsäure;
- die Möglichkeit des Liganden-vermittelten Gentransfers in spezifische Gewebe.

Einfachster nicht viraler Genvektor ist die sogenannte nackte pDNA. Sie wurde in vitro und in vivo alleine oder in Kombination mit Kollagen oder Fibrin als Genvektor im Sinne einer GAM eingesetzt (Bonadio et al. 1999, Andree et al. 2001). In einem kritischen Knochendefektmodell erwies sich die GAM aus Kollagen und nackter pDNA zwar als wirksam, allerdings zeigte sich, dass hierzu enorme Mengen an pDNA nötig waren. In der eigenen Arbeitsgruppe entwickelte, durch ein Copolymer geschützte Genvektoren (COPROG's) erwiesen sich im Gegensatz dazu als deutlich effizienter als nackte pDNA, wenn Kollagenschwämme als implantierbare Träger dienten (Scherer et al. 2002). Vorteil der COPROG's ist, dass sie gegenüber einer Opsonisierung weitestgehend resistent und damit vor allem in vivo effektiver einsetzbar sind als nackte pDNA (Finsinger et al. 2000, Rudolph et al. 2002). Sie sollten neben nackter pDNA im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt werden. Da oben genannte Arbeiten auch PEI-pDNA-Komplexe einsetzten, sollten diese auch im Rahmen vorliegender Arbeit verwendet werden.

1.4. Ziele der Arbeit

Mit vorliegender Arbeit sollte das Prinzip der GAM für den lokalen Gentransfer aus den Komponenten Fibrinogen und nicht viralen Genvektoren verwirklicht werden. Ziel war es hierbei ein System für den lokalen Gentransfer basierend auf Fibrin(ogen) als Träger und nicht viralen Genvektoren zu entwickeln. Dieses System sollte in seiner Herstellung nicht aufwendig sein und in seiner Anwendung und Handlichkeit jener des handelsüblichen Fibrinklebers entsprechen. Hierzu sollten nicht virale Genvektoren und Fibrin(ogen) miteinander kombiniert werden. Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche Formulierungsweisen für ein Gemisch aus Fibrinogen und Genvektoren erarbeitet. Anhand von Analysen der Gerinnungsfestigkeit sollte untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß Genvektoren und einzelne Formulierungen des Fibrinogen-Vektor-Gemisches die Fibrinpolymerisation beeinträchtigen. Mittels radioaktiv markierter pDNA galt es nachzuweisen, ob und

wie die Genvektoren aus der Fibrinmatrix in Abhängigkeit von der Formulierung freigesetzt werden und welche Formulierungen als Retardsystem eingesetzt werden können. Anhand der Markergene GFP und Luciferase sollte die Transfektionseffizienz einzelner Formulierungen an tierischen und humanen Zellen im zeitlichen Verlauf nachgewiesen werden. Dabei galt es, ein geeignetes Nachweisverfahren zu finden und zu etablieren. Als nicht virale Genvektoren wurden nackte pDNA, PEI-pDNA-Komplexe und Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe eingesetzt und hinsichtlich ihres Einflusses auf Fibrinpolymerisation, Freisetzung aus der Fibrinmatrix und Transfektionseffizienz untersucht.

2. Einfluss von nicht viralen Genvektoren auf die Fibrinpolymerisation

Um eine GAM basierend auf Fibrin(ogen) und nicht viralen Genvektoren herzustellen, mussten Fibrinogenkomponente und Genvektoren kombiniert werden. Das einfachste Verfahren ein Fibrinogen-Vektor-Gemisch herzustellen, ist Formulierung A: hier werden Fibrinogen und Genvektoren direkt miteinander gemischt. Die Analysen der Thrombelastographie zur Gerinnselfestigkeit konnten zeigen, dass nackte pDNA bis zu einer Dosis von 24 µg pDNA/mg Fibrinogen keinen negativen Einfluss auf die Fibrinpolymerisation hatte. Eine höhere Dosis an pDNA schien sogar schneller zu einer stärkeren Gerinnselfestigkeit zu führen. PEI-pDNA-Komplexe hingegen beeinträchtigten dosisabhängig die Fibrinbildung: die geforderte Gerinnselfestigkeit von 20 mm wurde ab einer Konzentration von 8 µg pDNA/mg Fibrinogen nicht mehr erreicht. Dieser negative Einfluss konnte reduziert werden, in dem die PEI-pDNA-Komplexe zusätzlich mit dem Hüllpolymer geschützt wurden. Die maximale, einsetzbare Dosis an Hüllpolymer-PEI-pDNA lag dann zwischen 16 und 24 µg pDNA/mg Fibrinogen.

Mit Formulierung B wurde eine weitere Variante geprüft, das Fibrinogen-Vektor-Gemisch herzustellen. Hierbei wurde die Fibrinogenkomponente zusammen mit den Genvektoren erneut gefriergetrocknet. Da die doppelte Gefriertrocknung die Gerinnungseigenschaften des Fibrinklebers nicht beeinträchtigte, konnten Veränderungen auf den Zusatz der Genvektoren zurückgeführt werden. Alle

Genvektorformulierungen (nackte pDNA, PEI-pDNA-Komplexe und Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe) zeigten hierbei im untersuchten Dosisbereich bis 20 µg pDNA/mg Fibrinogen weitestgehend keinen Einfluss auf die Fibrinbildung. Der zuvor bei Formulierung A sich abzeichnende Effekt, dass nackte pDNA mit steigender Dosis zu einer höheren maximalen Gerinnselfestigkeit führt, konnte für Formulierung B ebenfalls nachgewiesen werden und war statistisch signifikant (s. Abb. 10 S. 53, Abb. 11 S. 56).

Die Fibrinbildung ist ein komplexer Vorgang, der *in vitro* und *in vivo* von zahlreichen Faktoren beeinflusst werden kann (Standeven et al. 2005). Bei Herstellung der Gen-aktivierten Fibrin-Matrix im Reagenzglas können die Genvektoren mit Fibrinogen, anderen Bestandteilen der Fibrinogenkomponente des Fibrinklebers, sowie mit Thrombin interagieren (s. Abb. 23).

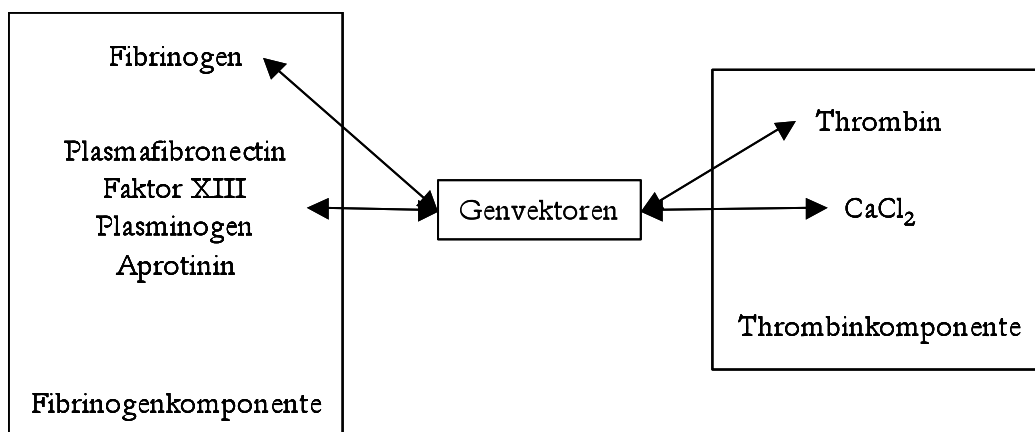


Abb. 23: Interaktionen zwischen Genvektoren und den Bestandteilen der beiden Komponenten des Fibrinklebers.

In vivo wirkt bakterielle pDNA proinflammatorisch und durch Ineinandergreifen von Immunsystem und Gerinnungssystem auch prokoagulatorisch (Amoureux et al. 2005, Levi et al. 2005). *In-vitro*-Untersuchung deuten auf eine direkte prokoagulatorische Wirkung von DNA-Fragmenten hin. So konnten Pavlov et al. beispielsweise zeigen, dass Einfachstrang-DNA durch Interaktion mit Faktor XII die Blutgerinnung beschleunigt (Pavlov et al. 2006). Auch für extrazelluläre RNA sind prokoagulatorische Effekte beschrieben (Kannemeier et al. 2007). Der Einfluss auf

die Gerinnselfestigkeit allein ist von anderen Substanzen *in vitro* und *in vivo* bekannt.

PEI befindet sich nicht nur an der Oberfläche der PEI-pDNA-Komplexe, sondern liegt in der Vektorsuspension auch als freies PEI vor (Finsinger et al. 2000). Es kann so Thrombin binden und die von Thrombin katalysierte Fibrinbildung hemmen (Chu et al. 2003). Aufgrund der positiven Oberflächenladung binden ungeschützte Polyplexe zahlreiche Plasmaproteine, darunter auch Fibrinogen (Rudolph et al. 2002). Dies ist vor allem interessant, da Fibrinogen im Vergleich zu PEI im Überschuss vorliegt und damit die gerinnungshemmende Wirkung der Polyplexe eigentlich reduzieren könnte. Da aber die gerinnungshemmenden Wirkungen bereits bei niedriger Vektordosis auftreten, scheint dieser Einfluss eher gering auszufallen.

Der antikoagulatorische Effekt der Polyplexe lässt sich erkennbar reduzieren, wenn diese zusätzlich mit einem Hüllpolymer umgeben werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit vorherigen Daten, die zeigen, dass geschützte Polyplexe deutlich weniger mit Plasmaproteinen interagieren als ungeschützte (Ogris et al. 1999, Finsinger et al. 2000, Rudolph et al. 2002). Anscheinend blockt das Hüllpolymer größtenteils die zuvor beschriebene antikoagulatorischen Wirkungen des Polyethylenimins.

Der gerinnungshemmende Effekt der ungeschützten Polyplexe wurde aufgehoben, wenn das Gemisch aus Fibrinogen und Genvektoren entsprechend Formulierung B zunächst gefriergetrocknet und anschließend wieder in destilliertem Wasser gelöst wurde. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass das im Überschuss vorhandene Fibrinogen (oder ein anderes Protein des Fibrinklebers) das PEI der Polyplexe und freies PEI ähnlich wie ein Hüllpolymer fest umhüllt. Damit scheint das PEI seine gerinnungshemmenden Eigenschaften zu verlieren. Für diese Annahme spricht, dass bei Präparation von Genvektor-beladenen Kollagenschwämmen PEI-pDNA-Komplexe erst durch Lyophilisation fest an das Kollagen gebunden werden (Scherer et al. 2002). Der geringe prokoagulatorische Effekt von nackter pDNA wird durch den Lyophilisationsschritt nicht aufgehoben.

Die Rotationsthrombelastographie ist ein etabliertes Verfahren zum Nachweis von Störungen der Blutgerinnung. Sie basiert auf der TEG-Analyse und wurde von Gibben und Mitarbeiter bereits zur Messung rheologischer Parameter von Fibrinkleber angewandt (Gibben et al. 2000). Somit konnte das Prinzip der roTEG-Messung eingesetzt werden, um Auswirkungen der verschiedenen Herstellungsschritte auf die Fibrinbildung zu untersuchen. Ein Problem stellten

hierbei die vom Gerät vorgeschriebenen Messvolumina von ca. 300 ml dar. Sie erforderten den Einsatz großer Mengen an pDNA, PEI, Hüllpolymer, und Fibrinkleber, vor allem wenn höhere Genvektordosen untersucht werden sollten. Da pDNA und Hüllpolymer im Labor selbst hergestellt werden mussten, limitierte der große Materialbedarf leider die Anzahl der Tests je Versuch. Die zu untersuchenden Formulierungen der Fibrinogen-Vektor-Gemische wurden deshalb auf Formulierung A und B beschränkt. Bei der Untersuchung von Formulierung A erschwerten die vom Gerät vorgegebenen Messvolumina das Bereitstellen der Komponenten hinsichtlich Menge und Konzentration. Die Messung wurde stets manuell durch Zugabe von Thrombin gestartet. Dabei hatte bereits das initiale Mischen der beiden Kleberkomponenten Einfluss auf das Messergebnis. Durch Einhaltung eines strengen Pipettierschemas konnte dieser Effekt jedoch minimiert werden.

Von den 3 untersuchten Genvektortypen zeigte sich nackte pDNA mit der Fibrinbildung am verträglichsten, unabhängig von der Formulierungsweise des Fibrinogen-Vektor-Gemisches. Der entdeckte prokoagulatorische Effekt konnte mit diesen Untersuchungen nicht eindeutig geklärt werden. In Hinblick auf spätere Formulierungen sind hier weitere Versuche angebracht. Auch im Hinblick auf in-vivo-Versuche: wird beispielsweise pDNA intramuskulär injiziert, so kann eine gerinnungsfördernde Wirkung vorteilhaft sein, da damit die durch die Verletzung entstehende Einblutung in das umliegende Gewebe reduziert werden könnte. Anders sieht es aus, wenn pDNA direkt in die Blutbahn injiziert wird. Hier sollten gerinnungsverändernde Einflüsse so gering wie möglich sein. Die in der Literatur beschriebenen Interaktionen von ungeschützten Polyplexen (PEI-pDNA-Komplexen) spiegeln sich in der Thrombelastographie wieder. Durch das Hüllpolymer wurde der antikoagulatorische Effekt deutlich abgeschwächt und erst ab höheren Vektordosen beobachtet. Eine gemeinsame Lyophilisation der Genvektoren mit der Fibrinogenkomponente hebt die gerinnungshemmenden Einflüsse von PEI bei ungeschützten und geschützten Polyplexen sogar auf. Deshalb ist Formulierung B bei Herstellung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches Formulierung A vorzuziehen. Zudem ist ein Fibrinogen-Vektor-Gemisch nach Formulierung B leichter in der gewünschten Konzentration herzustellen. Dies ist sowohl für eine Herstellung in großer Menge, als auch hinsichtlich der Handlichkeit ein entscheidender Vorteil. Der protektive Effekt des Fibrinogens nach Lyophilisation auf die Polyplexe könnte eingesetzt werden, um Fibrin-geschützte Polyplexe herzustellen.

3. Freisetzung nicht viraler Genvektoren aus einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix

Um mit einer GAM eine optimale Transfektion von Zellen zu erreichen, ist es wichtig, das Freisetzungsprofil der Genvektoren zu kennen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mehr als 90 % der Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe über einen Zeitraum von fast 3 Wochen in der Fibrinmatrix verblieben. Die verwendete Fibrinogenkonzentration des Fibrinogen-Vektor-Gemisches sowie die Technik der Formulierung hatten keinen Einfluss. Hingegen wurden bis zu 70 % der nackten pDNA innerhalb der ersten 4 Tage freigesetzt, abhängig von der Fibrinogenkonzentration und Formulierungsart des Fibrinogen-Vektor-Gemisches (Abb. 13 S. 61, Abb. 14 S. 63). Dieser anfängliche Freisetzungsschub (Burst) nackter pDNA wird auch bei anderen Trägermaterialien, wie beispielsweise Chitosan-Gelatine (Guo et al. 2006) oder bei Kollagenschwämmen beobachtet. Die Kollagenschwämme wurden hierzu mit einer Suspension nackter pDNA getränkt und anschließend lyophilisiert. In wässriges Medium verbracht, wurden innerhalb der ersten 3 Tage mehr als 70 % der pDNA freigesetzt (Scherer et al. 2002). Dies entspricht annähernd den Werten, die in vorliegender Arbeit für die Fibrinmatrix mit dem Fibrinogen-Vektor-Gemisch nach Formulierung B erarbeitet wurden. Durch Einsatz einer höheren Fibrinogenkonzentration bei Formulierung B oder durch Verwendung von Formulierung C für das Fibrinogen-Vektor-Gemisch konnte dieser anfängliche Freisetzungsschub deutlich reduziert werden. Dies bedeutete für Formulierung B eine Reduktion auf 53 % bei 66,30 mg/ml Fibrinogen, bei Formulierung C eine Reduktion auf 38 % bei 66,30 mg/ml und auf 42 % bei 49,73 mg/ml, sowie auf 56 % bei 33,15 mg/ml Fibrinogen. Im Verlauf der Freisetzung wird nach 3 Wochen bei Formulierung B und C nahezu die gesamte Menge an nackter pDNA freigesetzt. Dies weist darauf hin, dass der größte Anteil der nackten pDNA anscheinend nur sehr schwach in die Fibrinmatrix eingebettet ist. Dies passt zu den Ergebnissen der Thrombelastographie, die zeigen, dass eine Interaktion von nackter pDNA mit den Kleberkomponenten im Vergleich zu den anderen untersuchten Genvektoren sehr gering ist. Die Abhängigkeit der freigesetzten Menge an pDNA von der Fibrinogenkonzentration spricht ebenfalls für eine geringe

Bindung an die Fibrinmatrix. Dieser Effekt kann zusätzlich auf eine Abhängigkeit der Freisetzung von der Dichte des Fibrinnetzwerkes hinweisen. Bei niedrigen Fibrinogenkonzentrationen steht weniger Material zur Verfügung, weshalb die Fibrinmatrix aus einer geringeren Anzahl aus Fibrinfibrillen besteht (Weisel et al. 1992). Bei einer eingeschränkten Interaktion mit der Fibrinmatrix wird aus dem weniger dichten Fibrinnetzwerk daher pDNA freigesetzt. Dies konnte für beide Formulierungen der Fibrinogen-Vektor-Gemische im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Breen und Mitarbeiter beobachteten für unterschiedliche Fibrinogenkonzentrationen ebenfalls unterschiedliche Freisetzungsraten der eingearbeiteten Adenoviren, bei dem Versuch die Fibrinmatrix für die verzögerte Freisetzung zu optimieren. Basierend auf Analysen der Mikroarchitektur der Fibrinmatrix wurde die von der Fibrinogenkonzentration abhängige unterschiedliche Porengröße für die verschiedenen Freisetzungsraten herangezogen (Breen et al. 2006).

Wenn nackte pDNA nur schwach an die Trägermatrix bindet und rasch freigesetzt wird, ist diese nur eingeschränkt vor enzymatischem Abbau geschützt. Dies erklärt, weshalb selbst in einem GAM-System hohe Mengen an nackter pDNA nötig sind, um eine ausreichende Transfektion zu erreichen (Scherer et al. 2002). Eine Lösungsmöglichkeit, nackte pDNA in der Fibrinmatrix zu immobilisieren, stellten Trentin et al. vor. Diese Arbeitsgruppe entwickelte Peptide, die zum einen an pDNA binden konnten und zum anderen eine Bindungsstelle für eine Transglutaminase besaßen. Dadurch wurden die Peptid-DNA-Partikel durch Faktor XIII kovalent an die Fibrinmatrix gebunden. Damit war die Freisetzung der pDNA aus Fibrin abhängig vom proteolytischen Abbau (Trentin et al. 2005).

Hüllpolymer-geschützte Polyplexe und Fibrin(ogen) stellen eine ideale Kombination für eine GAM dar, da mehr als 90 % der Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe über 3 Wochen in der Fibrinmatrix verblieben. Die Hüllpolymer geschützten Polyplexe scheinen im Gegensatz zu nackter pDNA fest in die Fibrinmatrix eingebettet zu sein. Hierfür spricht, dass Änderungen der Fibrinogenkonzentration im untersuchten Bereich von 33,15 mg/ml bis 66,30 mg/ml keine größeren Auswirkungen auf das Freisetzungsprofil der geschützten Polyplexe hatten. Da die maximale, eingesetzte pDNA-Dosis nur 3,0 µg pDNA/mg Fibrinogen betrug, war eine negative Beeinträchtigung der Fibrinbildung durch die Genvektoren anhand der Thrombelastographie nicht zu erwarten. Dies ist eine mögliche Erklärung für die

Beobachtung, dass die Formulierungstechniken B und C der Fibrinogen-Vektor-Gemische keine Auswirkung auf das Freisetzungsprofil hatten. Verglichen mit Kollagenschwämmen, die mit Hüllpolymer-geschützten Polyplexen beladen waren, werden aus einer Fibrinmatrix anfangs deutlich weniger Genvektoren freigesetzt (Kollagen 27 % bis Tag 3; Fibrin max. 2,3 % bis Tag 4). Scherer und Mitarbeiter konnten für Kollagenschwämme über 40 Tage eine kontinuierliche Freisetzung von Hüllpolymer geschützten Polyplexen nachweisen. Die über einen Zeitraum über 20 Tagen durchgeführten Untersuchungen mit der Fibrinmatrix zeigten nur eine geringe Freisetzung. Grund für die eingeschränkte Versuchsdauer war die Tatsache, dass die Fibringerinnsel ab Tag 18 zunehmend porös wurden. Es ist davon auszugehen, dass dadurch bei Entnahme des Überstandes auch kleine Stückchen der Fibrinmatrix abgetrennt und letztlich im Gamma-Counter gemessen wurden. Dies erklärt die höheren Standardabweichungen gegen Versuchsende.

Der Nachweis radioaktiv markierter pDNA ist eine sehr elegante Methode, die Freisetzung von Genvektoren aus einer Trägermatrix zu analysieren. Dieses Verfahren konnte in der Arbeitsgruppe erfolgreich eingesetzt werden. Von den beiden Techniken ein Fibrinogen-Vektor-Gemisch zu erhalten, erwies sich Formulierung B gegenüber Formulierung C als vorteilhaft. In den Arbeitsschritten von Formulierung B ließen sich die einzelnen Komponenten leicht mischen, während sich bei Formulierung C das Lösen der lyophilisierten Genvektoren in der Fibrinogenkomponente schwierig gestaltete. Aufgrund der geringen pDNA-Menge entstanden Lyophilisate mit geringem Gewicht, die nur schwer in der viskösen Fibrinogenlösung zu suspendieren waren. Dies kann eine zusätzliche Erklärung der höheren Standardabweichungen für die Messwerte der Formulierung C bieten. Um dies zu vermeiden, empfiehlt es sich für weitere Versuche mit Formulierung C, den Plamidansatz in größerer Menge herzustellen. Auch vom Standpunkt der Arbeitssicherheit ist Formulierung B geeigneter, da es aufgrund des erhöhten Gewichtes des lyophilisierten Fibrinogen-Vektor-Gemisches das Lyophilisat nicht so leicht durch einen Luftzug verwehen kann. Dies ist besonders beim Arbeiten mit radioaktiven Substanzen zu beachten. Ein zu geringes Gewicht des Lyophilisates stellt auch beim Gefriertrocknen ein Problem dar, da in der Kammer des Gefriertrockners ein Vakuum herrscht und das Lyophilisat aufgrund seiner geringen Masse leicht aus den Röhren gesogen werden kann. Dies wurde durch einen kleinen Trick verhindert, indem Röhren mit nicht komplett angedrehtem

Schraubverschluss zur Lyophilisation verwendet wurden. Zusätzlich wurden die Röhrchen sicherheitshalber in eine belüftete Plexigaskammer gestellt und erst so in die Vakuumkammer des Gefriertrockners verbracht. Da sich die Komponenten Genvektoren und Fibrinogen bei Formulierung B zunächst beide in Lösung befinden, lassen sie sich gut mischen und problemlos gefrierdörren. Das entstandene Lyophilisat ist durch das Fibrinogen von deutlich höherem Gewicht und kann leicht in destilliertem Wasser gelöst werden. Somit ergibt sich ein homogenes Fibrinogen-Vektor-Gemisch. Damit ist ein Fibrinogen-Vektor-Gemisch nach Formulierung B nicht nur, wie bei den roTEG-Analysen bereits dargestellt, einfacher in der Herstellung, sondern auch sicherer. Dies gilt vor allem dann, wenn mit radioaktiven Substanzen gearbeitet wird.

Fibrin(ogen) als Trägermaterial für nackte pDNA bietet die Möglichkeit, alleine durch Änderung der Fibrinogenkonzentration, Einfluss auf das Freisetzungsverhalten von nackter pDNA zu nehmen. Die untersuchten Fibrinogenkonzentrationen konnten jedoch nicht verhindern, dass der größte Teil der pDNA bereits in den ersten Tagen freigesetzt wird. Damit ließe sich eine Gen-aktivierte Fibrin-Matrix mit nackter pDNA allenfalls mit dem Ziel einer kurzfristigen Transfektion einsetzen. Denn einmal in die Umgebung freigesetzt, wird diese durch Diffusion verdünnt, abtransportiert und sehr rasch von Enzymen abgebaut. Dem eigentlichen Konzept einer GAM mit gezielter lokaler Wirkung wird der Genvektor nackte pDNA in Kombination mit einer Fibrinmatrix damit also leider nicht gerecht. Die Möglichkeiten, die Fibrinbildung und damit das Freisetzungsverhalten von nackter pDNA zu beeinflussen, sind aber damit noch nicht ausgeschöpft. Thrombinkonzentration, Ionen und pH-Wert haben Einfluss auf die Beschaffenheit des Fibrinnetzwerkes. Beispielsweise führen niedrige Thrombinkonzentrationen zu dickeren Fibrinfasern (Rowe et al. 2007, Shah et al. 1985). Blombäck und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Fibrin (im Plasma) bei niedrigen Thrombinkonzentrationen verzweigter, fester, und damit weniger porös ist, als bei hohen Thrombinkonzentrationen (Blombäck et al. 1994). Hierbei sei angemerkt, dass Fibrinfasern im Plasma dicker sind als bei Fibrinogenpräparaten (Carr 1988). Um die Gen-aktivierte Fibrinmatrix weiter zu optimieren, wäre es sinnvoll, die Auswirkungen dieser Faktoren auf die Freisetzung von nackter pDNA und anderer nicht viraler Genvektoren zu untersuchen. Im Gegensatz dazu erfüllt das Freisetzungsprofil der Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe aus einer Fibrinmatrix die Anforderungen einer

GAM. Diese bleiben über einen langen Zeitraum in der Matrix und können somit einwachsende Zellen über einen längeren Zeitraum transfizieren.

4. In-vitro Versuche

4.1. Humane Keratinozyten als Ziel einer lokalen Gentherapie

Die Haut stellt das größte Organ des menschlichen Körpers dar. Sie bildet die Barriere zur Außenwelt, schützt den Organismus vor Umwelteinflüssen und Austrocknung und regelt gleichzeitig den Stoffaustausch mit der Umgebung. Seit mehr als 20 Jahren werden Methoden zur Hautgentherapie erforscht (Jensen 2007). Die Haut eignet sie sich für eine Gentherapie besonders, da sie im Gegensatz zu anderen Organen leicht zugänglich ist. Dadurch bedarf das Einbringen der Genvektoren keines größeren, invasiven Aufwandes. Das behandelte Areal ist sichtbar und kann bei Komplikationen notfalls exzediert werden. Die Einsatzbereiche der Gentherapie an der Haut sind vielfältig (Trainer et al. 1997). Als Grenze zur Umgebung, finden sich in der Haut zahlreiche Zellen des Immunsystems (Salmon et al. 1994, Miller et al. 2007). Nicht virale Genvektoren lassen sich deshalb beispielsweise zur genetischen Immunisierung einsetzen. Hierbei werden Gene eines infektiösen Organismus eingeschleust, um eine Immunreaktion auszulösen (Vogel 2000, Walker et al. 1999). Nicht virale Genvektoren werden im Bereich der Haut auch zur Tumorbehandlung eingesetzt: Ziel können hierbei sowohl Hauttumoren (Heinzerling et al. 2005), als auch Tumoren anderer Organe sein (Irvine et al. 1996). Derartige Systeme werden bereits in Phase I und I/II Studien an Patienten erforscht (Gene Therapy Clinical Trails Worldwide 2007). Hautgentherapie mit nicht viralen Genvektoren kann auch verwendet werden, um vorübergehend Substanzen von der Haut bilden zu lassen, die von dort aus den gesamten Organismus erreichen können (Cao et al. 2002). Ein weiteres, großes Anwendungsgebiet stellt die Behandlung chronischer Wunden dar. Diese sind sowohl im ambulanten als auch im stationärem Bereich eine bedeutende Herausforderung (Harding et al. 2002). Die hohe Prävalenz von chronisch venöser Insuffizienz, peripherer arterieller Verschlusskrankheit und Diabetes mellitus – Erkrankungen, die häufig mit chronischen Wunden assoziiert sind – macht die Entwicklung neuer, effektiver Therapiekonzepte dringend

notwendig. Keratinozyten können leicht durch eine kleine Hautbiopsie oder sogar aus Haarfollikeln gewonnen werden (Limat und Hunziker 1996). Sie lassen sich mittlerweile effizient ex vivo vermehren (Holzmann et al. 1994) und anschließend wieder zum Zwecke der Wundheilung transplantieren (Navsaria et al. 1995, Bello et al. 2001). Bannasch und Mitarbeiter konnten mit in Fibrinkleber suspendierten autologen Keratinozyten chronische Wunden in 8 Patienten erfolgreich decken (Bannasch et al. 2000). Mit dem Versuch, die Wundheilung in einem solchen System zu fördern, versetzten Andree und Mitarbeiter den Fibrinkleber zusätzlich mit Plasmid-DNA, die für den Wachstumsfaktor EGF (Epidermal Growth Factor) codierte. Dessen Expression konnte in vivo im Tierversuch erfolgreich in Vollhautwunden nachgewiesen werden (Andree et al. 2001).

4.2. Chondrozyten als Ziel einer lokalen Gentherapie

Im Hinblick auf die vermehrte Belastung des Bewegungsapparates durch zunehmende sportliche Aktivität in der Freizeit bis in das höhere Lebensalter und vor dem Hintergrund der demographischen Entwicklung kommt der Schädigung des Gelenkknorpels in der Gesundheitsversorgung eine immer wichtigere Bedeutung zu (Curl et al. 1997). Unbehandelt führen Knorpelschäden zu Spätfolgen wie Arthrose und Kniegelenksersatz, was für den Patienten letztlich zu einem hohen Verlust an Lebensqualität führt. Da Knorpel ein sehr stoffwechsellarmes Gewebe ist, verläuft die Heilung von Schäden hier nur sehr langsam. Es stehen zwar mittlerweile verschiedene operative Möglichkeiten zur Verfügung, Gelenkknorpeldefekte zu beheben, diese sehen sich aber immer noch der langsamen Heilungstendenz von Knorpelgewebe konfrontiert. Zudem entspricht die Qualität des rekonstruierten Knorpels nicht jener natürlichen Knorpels (Braun et al. 2007). Um diesen beiden Problemen entgegen zu wirken, wird seit Jahren versucht, die Heilung im Bereich des Gelenkknorpels zu optimieren. Die autologe Knorpelzelltransplantation bietet hier einen möglichen Weg (Steinwachs et al. 1999). Hierbei können die in einem ersten Eingriff gewonnen Chondrozyten ex vivo auf einer Trägermatrix kultiviert und im Rahmen der zweiten Sitzung mit ihr reimplantiert werden (Marlovits S et al. 2006). Fibrinkleber wird als Bestandteil einer solchen Trägermatrix in Kombination mit verschiedenen Substanzen eingesetzt, aber auch um Knorpeltransplantate zu fixieren oder zu decken. Fibrin bildet eine ideale Grundlage, Chondrozyten zu kultivieren (Kirilak et al. 2006). Gentherapeutische Ansätze zur Knorpelregeneration sind

vielversprechend (Trippel et al. 2004). Gelse und Mitarbeiter transfizierten beispielsweise mesenchymale Zellen mit einem Adenovirus ex vivo und transplantierten sie in einen Fibrinkleber eingebettet in Knorpeldefekte in Ratten. Die verwendeten Wachstumsfaktoren IGF-1 und BMP-2 führten zur Ausbildung Hyalin-ähnlichen Knorpels (Gelse et al. 2003). Übelacker und Mitarbeiter transfizierten Kaninchenchondrozyten ex vivo mit einem Retrovirus und implantierten die genetisch modifizierten Zellen auf einer Kollagenmatrix in osteochondrale Defekte im Kniegelenk der Kaninchen. Es zeigte sich eine anhaltende Genexpression über 15 Wochen (Übelacker et al. 2007). Um eine ideale Knorpelheilung zu erzielen, ist vor allem der direkte, lokale Gentransfer wünschenswert (Cucchiaroni und Madry 2005). Gerade deshalb gilt es, hier neue Systeme zu entwickeln.

4.3. Transfektion primärer Zellen mit einer nicht viralen Gen-aktivierten

Fibrin-Matrix

Eine Herausforderung war die Frage, ob sich mit einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix eine verlängerte Genexpression in primären Zellen herbeiführen lässt. Chondrozyten und Keratinozyten vermehrten sich ungehindert auf bzw. in der Gen-aktivierten Fibrin-Matrix, unabhängig des verwendeten Genvektors. Nackte pDNA führte in der untersuchten Dosierung von 3 µg pDNA/mg Fibrinogen in keinem der 3 in vitro Versuche zu einer zufriedenstellenden Genexpression. Im Gegensatz hierzu erwiesen sich Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe bereits in der niedrigen Dosis von 3,0 µg pDNA/mg Fibrinogen als sehr effizient. Eine Genexpression war bis über 28 Tage nachweisbar. Es konnte zudem gezeigt werden, dass sich mit ungeschützten Polyplexen (PEI-pDNA-Komplexen) in Kombination mit einer Fibrinmatrix in gleicher Dosierung eine im zeitlichen Verlauf gleich hohe Genexpression wie bei Hüllpolymer geschützten Polyplexen erzielen lässt (Abb. 21 S.72, Abb. 22 S. 73). Der extreme Unterschied zwischen nackter pDNA und Hüllpolymer geschützten Polyplexen hinsichtlich der Transfektionseffizienz lässt sich aus Freisetzungprofilen dieser Genvektoren erklären. Wie mit radioaktiv markierter pDNA dargestellt werden konnte, wird nackte pDNA bereits in den ersten Tagen zum größten Teil aus der Fibrinmatrix freigesetzt. Sie steht den Zellen damit im weiteren Verlauf nur mehr in geringer Menge zur Verfügung. Freigesetzte nackte pDNA wird schnell von den ubiquitär vorkommenden Enzymen abgebaut. Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe

sind gut durch das Hüllpolymer geschützt. Hinzu kommt, dass mit Hüllpolymer geschützte Polyplexe über 3 Wochen in der Fibrinmatrix verbleiben und Zellen damit beim Abbau der Fibrinmatrix über einen langen Zeitraum von 28 Tagen transfiziert werden. Die anfänglich hohe Luciferaseexpression, lässt sich folgendermaßen erklären: die Zellen werden bei Herstellung der Gen-aktivierten Fibrin-Matrix im Fibrinogen-Vektor-Zell-Gemisch mit den Genvektoren inkubiert, wodurch ein intensiver Kontakt zwischen Zellen und Genvektoren möglich ist. Im zeitlichen Verlauf nimmt die Genexpression in den auf diese Weise transfizierten Zellen ab, übrig bleibt jene der neu durch die Gen-aktivierte Fibrin-Matrix transfizierten Zellen. Weshalb die Genexpression in den Keratinozyten gegen Versuchsende wieder anzusteigen scheint, konnte in den Versuchen nicht geklärt werden. Lichtmikroskopisch zeigen sich auch nach 28 Tagen noch Fibrinreste, die den Zellen zum Teil anhaften. Da die Hüllpolymer geschützten Polyplexe, wie in den Freisetzungsversuchen gezeigt, fest an die Fibrinmatrix gebunden sind, ist eine Transfektion der Zellen aus diesen Fibrinbruchstücken denkbar, erklärt allerdings den Anstieg nicht. Eine Erklärung kann die hohe Zellzahl gegen Versuchsende sein. Um einen dadurch möglichen Fehler zu korrigieren, empfiehlt es sich für künftige Versuche, die Genexpression mit der entsprechenden vitalen Zellmasse zu korrelieren, beispielsweise durch einen Protein- und Zellvitabilitätstest. Wie die vorliegenden Beobachtungen belegen, muss allerdings das zusätzliche Fibrin berücksichtigt werden. Ziel der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche war es, zunächst festzustellen, ob sich eine Transfektion über einen langen Zeitraum erreichen lässt und deren Nachweis. Deshalb wurde auf einen zusätzlichen Test verzichtet.

Überraschend führten PEI-pDNA-Komplexe in Kombination mit der Fibrinmatrix in einer Dosis von 3,0 µg pDNA/mg Fibrinogen ebenfalls zu einer über 28 Tage andauernden Luciferaseexpression. Dabei wurde erst nach 3 Tagen das anfängliche Expressionsmaximum erreicht. Dieses ist im Vergleich zu den Hüllpolymer-geschützten Polyplexen um 2 Tage versetzt. Dies könnte darin liegen, dass die Zellen zunächst genau so wie bei den Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexen mit den Genvektoren im Fibrinogen-Vektor-Gemisch suspendiert sind und bereits hier transfiziert werden können. Da die Genvektoren noch nicht in der Fibrinmatrix immobilisiert sind, zeigt sich hier die bereits bekannte höhere Transfektionseffizienz der Hüllpolymer-geschützten Vektoren. Die Genexpression lag gegen Versuchsende

bei ungeschützten Polyplexen über jener bei Hüllpolymer geschützten Polyplexen. Bislang zeigten sich Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe im zeitlichen Verlauf als effizienter (Scherer et al. 2002). Dies scheint nicht der Fall zu sein, wenn PEI-pDNA mit Fibrin kombiniert wird. Eine Dosierung von 3,0 µg pDNA zeigte bei den Gerinnungsanalysen weder bei Formulierung A noch B eine Beeinflussung der Fibrinbildung durch die beiden Vektortypen. Der Einfluss höherer Dosen an pDNA konnte durch die gemeinsame Lyophilisation von PEI-pDNA-Komplexen und Fibrinogen aufgehoben werden. Auch die langanhaltende Luciferaseexpression spricht für die Vermutung, dass PEI-pDNA-Komplexe im Rahmen der Gefriertrocknung fest an Fibrinogen binden und sich dadurch ein Schutzmantel aus Fibrinogen ausbildet. Diese Umhüllung scheint sich positiv auf die Transfektionseffizienz auszuwirken. In weiterführenden Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe bestätigte sich mittlerweile die hier gemachte Beobachtung, dass PEI-pDNA-Komplexe in Verbindung mit Fibrin(ogen) zu einer höheren Genexpression führen als Hüllpolymer-geschützte Polyplexe. PEI-pDNA-Komplexe ohne Fibrin zeigen eine geringere Genexpression als mit Fibrin. Dieser Effekt wurde auf eine Verminderung der Toxizität der PEI-pDNA-Komplexe zurückgeführt, erklärt jedoch die gegenüber den Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexen erhöhte Genexpression nur zum Teil. Es zeigte sich zudem, dass sich die Transfektionseffizienz von ungeschützten Polyplexen durch Inkubation mit Fibrinogen alleine jener der Hüllpolymer-geschützten Polyplexe angleichen lässt. Die Ergebnisse der roTEG-Analysen belegen, dass PEI durch die Gefriertrocknung stark an Fibrinogen gebunden wird. Dies scheint neben der Reduktion der Toxizität ein zusätzlicher positiver Faktor zu sein. Diese Fibrinogen-ummantelten PEI-pDNA-Komplexe entsprechen den Hüllpolymer-geschützten Genvektoren hinsichtlich der Transfektionseffizienz. Aufgrund der vorliegenden Arbeit könnte sich damit die Möglichkeit eröffnen, einen neuen nicht viralen Genvektor aus PEI-pDNA und Fibrinogen herzustellen. Die eigenen Ergebnisse decken sich auch mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen. So konnten Tandia und Mitarbeiter die Transfektionseffizienz von kationischen Lipiden durch Fibrinogen erhöhen (Tandia et al. 2003).

Bei Herstellung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches erwies sich Formulierung A als nicht praktikabel. Dabei stellt der Verdünnungseffekt, der beim Mischen der Fibrinogenkomponente und der Genvektoren entsteht, mit Auswirkung auf die

Salzkonzentration das größte Problem dar. Um dies auszugleichen mussten die Genvektoren nicht in destilliertem Wasser sondern in einer konzentrierten Salzlösung hergestellt werden. Damit entstehen weitere Einflussfaktoren auf die Gen-aktivierte Fibrin-Matrix: erstens wird durch Formulierung der Genvektoren in einer Salzlösung die Partikelgröße der Genvektoren verändert, zweitens kann die Salzkonzentration die Fibrinpolymerisation erheblich beeinträchtigen. Formulierung B erwies sich wie in den anderen Versuchen dargestellt am praktikabelsten. Zum Lösen des Zellpellets nach Präparation der Keratinozyten war das entstandene Fibrinogen-Vektor-Gemisch zu viskös. Die Zellen ließen sich erst nach einiger Zeit vollständig suspendieren. Das in Abb. 19 auf Seite 69 dargestellte modifizierte Protokoll zur Einbettung der Zellen in die Fibrinmatrix, in dem das Zellpellet zuerst in einer geringen Menge an Kulturmedium suspendiert und anschließend mit dem Fibrinogen-Vektor-Gemisch hergestellt wurde, erleichterte das Lösen der Zellen deutlich. Zudem konnte mit der Zugabe des eigentlichen Zellkulturmediums länger gewartet werden. Da damit mehr Zeit für die Fibrinpolymerisation bleibt, können für künftige Versuche niedrige Thrombinkonzentrationen verwendet und damit stabilere Fibringerinnsel hergestellt werden. Hierbei gilt es jedoch noch, den Einfluss des zugesetzten Kulturmediums auf die Fibrinbildung zu untersuchen.

GFP als Reporter gen eignet sich in der eingesetzten Weise zwar gut zum qualitativen Nachweis einer erfolgten Transfektion. Da die Fibrinmatrix in den kleinen Vertiefungen einer 96-Lochplatte vor allem am Rand aufgrund der Oberflächenspannung zu dick war, um die auf der Oberfläche wachsenden, fluoreszierenden Zellen zu sehen, ist ein quantitativer Nachweis nicht möglich. Dies war auch nicht Ziel des Versuches. Mit dieser Technik sollte gezeigt werden, ob eine Transfektion von Zellen mit einer bestimmten Formulierung möglich ist und wie sich die Genvektoren unterscheiden. Wachsen die Zellen eingebettet in der Fibrinmatrix, erübrigt sich eine visuelle Auswertung am Mikroskop. Eine Lösung bietet die FACS-Analyse. Nach enzymatischem Abbau der Fibringerinnsel, beispielsweise mit Trypsin, kann die exakte Genexpression gemessen werden. Ein weiteres elegantes Verfahren, die Genexpression quantitativ zu erfassen, ist der Luciferasetest. Das zuvor entworfene Protokoll zur Probengewinnung ließ sich einfach durchführen und kann für weitere Versuche empfohlen werden. Der Luciferasepuffer hat einen großen Einfluss und wurde im letzten Experiment vom selbst hergestellten auf den kommerziellen Puffer umgestellt, welcher sensibler im

Nachweis der Luciferaseexpression ist. Es empfiehlt sich die Dosis an pDNA so zu modifizieren, dass der Versuch über den Zeitraum von 4 Wochen mit nur einem Puffer durchgeführt werden kann.

5. Empfehlungen zur Formulierung einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix

Die natürliche Bedeutung von Fibrin(ogen) bei der Wundheilung und der breite klinische Einsatz der Fibrinklebung, sowie die dringende Notwendigkeit neuer Therapieverfahren in der Versorgung von Haut- oder Knorpeldefekten machen eine Gen-aktivierte Fibrin-Matrix, die sich wie ein kommerzieller Fibrinkleber anwenden lässt sehr attraktiv. Bisherige Konzepte zur Herstellung einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix, wie das Mischen der Genvektoren mit der Fibrinogenkomponente, stellten sich hierbei als kompliziert und für den praktischen Gebrauch als nicht sinnvoll dar. Grundlegendes Ziel dieser Arbeit war es deshalb, ein neues Herstellungsverfahren für eine Gen-aktivierte Fibrin-Matrix im Hinblick auf eine kommerzielle Anwendung zu entwerfen und zu optimieren. Zu diesem Zwecke wurden 3 Formulierungsstrategien entwickelt und evaluiert, wobei Formulierung B die besten Resultate erbrachte. Wie in Abb. 5 auf Seite 25 gezeigt, werden bei Formulierung B Genvektoren und Fibrinogenkomponente zunächst vermischt, in einem nächsten Schritt lyophilisiert, um anschließend wieder mit destilliertem Wasser in gewünschter Konzentration gelöst zu werden. In einem letzten Schritt wird das Fibrinogen-Vektor-Gemisch mit Thrombin zur Gerinnung gebracht, so dass nun eine Gen-aktivierte Fibrin-Matrix entsteht. Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen, dass diese Formulierung wesentliche Vorteile bietet: zum einen sind die Herstellungsschritte einfach und sicher, so dass die Handhabung letztlich der eines kommerziell erhältlichen Fibrinklebers entspricht; zudem kann der Einfluss der Genvektoren auf die Fibrinpolymerisation durch Formulierung B deutlich reduziert werden. Dies ermöglicht den Einsatz höherer Dosen an Genvektoren, weiter kann das Spektrum der anwendbaren Genvektoren um PEI-pDNA-Komplexe erweitert werden. Ohne den Lyophilisationsschritt ist der Einfluss der ungeschützten Polyplexe auf die Fibrinbildung bereits in geringer Dosierung nachzuweisen. Durch eine Formulierung mit Fibrinogen, kann die Transfektionseffizienz der PEI-pDNA-Komplexe deutlich

gesteigert werden. In Anbetracht der Freisetzungsprofile empfiehlt sich eine Fibrinogenkonzentration von 66,30 mg/ml für das Fibrinogen-Vektor-Gemisch. Diese Konzentration ermöglicht die Ausbildung eines dichten Fibrinnetzwerkes und hilft zusätzliche Einflüsse durch eine Verdünnung zu vermeiden.

Um einen intensiven Kontakt zwischen Zellen und Fibrinmatrix herzustellen, empfiehlt es sich die Zellen in die Fibrinmatrix eingebettet wachsen zu lassen. Für eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in der Fibrinmatrix, ist das in Abb. 19 auf Seite 69 dargestellte, auf Formulierung B basierende Protokoll sinnvoll. Durch die Zugabe einer geringen Menge Zellkulturmedium lassen sich die Zellen gleichmäßig im Fibrinogen-Vektor-Zell-Gemisch suspendieren. Dem Fibrinogen ist damit mehr Zeit gegeben, zu polymerisieren. Der Einfluss dieser geringen Menge Zellkulturmedium auf die Fibrinpolymerisation ist noch nicht vollständig geklärt.

Um das Fibrinogen-Vektor-Gemisch bzw. Fibrinogen-Vektor-Zell-Gemisch zur Polymerisation zu bringen, sollte eine niedrige Thrombinkonzentration verwendet werden. Verbesserungen können durch Einsatz von 4 IE Thrombin erreicht werden. Dies ermöglicht die Ausbildung stabilerer Fibringerinnsel – ein im Hinblick auf lange zeitliche Verfügbarkeit der Genvektoren im Sinne einer GAM wichtiger Aspekt.

Die untersuchten 3 Genvektoren können mittels Formulierung B bis zu einer Dosis von 20 µg pDNA/mg Fibrinogen eingesetzt werden. Um eine möglichst lang anhaltende Genexpression zu erreichen, eignen sich Hüllpolmer-PEI-pDNA- und PEI-pDNA-Komplexe bereits in einer Dosis von 3 µg pDNA/mg Fibrinogen. Nackte pDNA ist, wie gezeigt, nicht effizient. Mit der eingesetzten pDNA-Dosis wird die Fibrinpolymerisation kaum beeinträchtigt und kann daher noch weiter gesteigert werden. Der limitierende Faktor ist die Zelltoxizität der Genvektoren. Dies muss bei weiterführenden Versuchen geklärt werden.

Das beschriebene Protokoll zur Probengewinnung für den Luciferasetest ist einfach durchzuführen. Mit den auf diese Weise gewonnen Proben kann der Luciferasetest problemlos durchgeführt werden. Eine Verbesserung der Daten zur Genexpression kann durch Korrelation der Zellmasse mit der Genexpression erreicht werden. FACS-Analysen können als alternative Methoden eingesetzt werden. Hierbei ist zu beachten, dass die Zellen beim enzymatischen Abbau des Fibrins nicht in Mitleidenschaft gezogen werden, um das Ergebnis nicht zu verfälschen.

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Konzept zur einfachen Formulierung einer Gen-aktivierte Fibrin-Matrix mittels Lyophilisation konnte

erfreulicherweise in der Arbeitsgruppe erfolgreich für den lokalen Gentransfer eingesetzt werden (Kullmer 2007). Die in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Gen-aktivierte Fibrin-Matrix findet derzeit an einem Verbrennungsmodell am Schwein bei Vollhautwunden Anwendung.

6. Klinische Relevanz einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix

Im Hinblick auf einen späteren klinischen Einsatz dieser Formulierung ist von großem Vorteil, dass Fibrinogen-Vektor-Lyophilisate über längere Zeit bei 4 °C gelagert werden können. Die Technik entspricht dem in der klinischen Routine bewährten Fibrinkleber, die durch Zugabe von destilliertem Wasser ein gebrauchsfähiges Produkt ergibt.

Die Behandlung chronischer Wunden und Knorpeldefekte stellt nach wie vor eine große Herausforderung für die heutige Medizin dar. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind im Detail noch nicht aufgeklärt und gelten derzeit als spannende und zugleich komplexe Kapitel der Medizin. Das Zusammenspiel der verschiedensten Wachstumsfaktoren und Chemokine zu unterschiedlichen Stadien des natürlichen Heilungsvorganges ist bislang nur in Ansätzen verstanden (Gillitzer und Göbeler 2001, Li et al. 2007). In chronischen Wunden sehen die molekularen Mechanismen nochmals anders aus (Blakytyn und Jude 2006). Gerade aber im Verständnis dieses komplexen Zusammenspiels aus Wachstumsfaktoren, Chemokinen, extrazellulärer Matrix und Zellen liegt der Schlüssel zum Erfolg der individuell angepassten Wundbehandlung. Eine genauere Identifizierung systemischer, lokaler und molekularer Faktoren der Wundheilung im Individuum kann die Therapie in Zukunft entscheidend verbessern (Harding et al. 2002). Dabei darf die Behandlung der eigentlichen Ursache nicht aus den Augen verloren werden. Volkskrankheiten, die zu offenen, chronischen Wunden führen wie Diabetes mellitus Typ II bedürfen der frühzeitigen Prävention und sind in vielen Fällen behandelbare, wie auch vermeidbare Erkrankungen. Eine chronische Wunde lässt sich nur erfolgreich therapieren, wenn die Grunderkrankung in die Therapie miteinbezogen wird. Um den Verlust an Lebensqualität, der mit chronischen Wunden einhergeht und die damit verbundenen Kosten für die Allgemeinheit zu reduzieren, sind effektive, individuelle Behandlungsstrategien von enormer Wichtigkeit. Die letzten

Jahre haben gezeigt, dass die lokale Gentherapie in Zukunft einen wichtigen Beitrag zur Behandlung chronischer Wunden und Knorpeldefekte leisten könnte (Hirsch et al. 2007, Trippel et al. 2005). Die in unserem Labor entwickelte Gen-aktivierten Fibrin-Matrix könnte bereits etablierte, klinische Verfahren unterstützen. Die unterschiedlichen Freisetzungsprofile für nackte pDNA und Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe könnten mit Erfolg eingesetzt werden, um unterschiedliche Wachstumsfaktoren zu verschiedenen Zeitpunkten in unterschiedlicher Menge zur Unterstützung der Wundheilung produzieren zu lassen. Dies ist ein sehr attraktives Konzept zur Verbesserung der Wundheilung, da Wachstumsfaktoren lokal am Wirkort in der Wunde gezielt exprimiert werden. Limitiert werden klinische Studien derzeit noch durch rigide Zulassungsbeschränkungen von Gen-aktivierten Biomaterialien als Arzneimittel. Die Vorteile und Notwendigkeit dieser neuen „drug delivery-Systeme“ wurden aber bereits erkannt. Gerade deshalb sind weiterführende Studien dringend notwendig, auch um die Sicherheit nicht viraler Genvektoren zu beweisen. Diskussionen über den Einsatz dieser Technologie dürfen aber gerade vor dem Hintergrund jüngster Rückschläge der Gentherapie mit viralen Konzepten am Menschen nicht ausschließlich in Expertengremien geführt werden, sondern müssen der Bevölkerung verständlich kommuniziert werden. Nur so können die nach erstem Enthusiasmus erstarkten Ängste wieder abgebaut und neue Therapiekonzepte unter Einbezug der nicht viralen Gentherapie erfolgreich realisiert werden.

V. Zusammenfassung

Lokaler, Matrix-vermittelter Gentransfer mit Fibrinogen als Arzneistoffträger bietet gegenüber dem alleinigen Einsatz rekombinanter Wachstumsfaktoren für die Wundheilung wesentliche Vorteile. Fibrin(ogen) ist ein zentraler Faktor der Wundheilung und natürlicher Gerüstbilder für einwachsende Zellen.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass sich Fibrin(ogen) zur Formulierung einer Gen-aktivierten Matrix mit nicht viralen Genvektoren auf der Basis von COPROG's eignet. Durch Lyophilisation der Fibrinogenkomponente eines handelsüblichen Fibrinklebers zusammen mit COPROG's kann der Einfluss letzterer auf die Fibrinpolymerisation deutlich reduziert werden. Die Formulierung ist einfach durchzuführen und die Präparate lagerstabil. Freisetzungsanalysen konnten nachweisen, dass COPROG's, also die Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe über einen langen Zeitraum in der Gen-aktivierten Fibrin-Matrix verbleiben, während nackte pDNA rasch freigesetzt wird. Eine Gen-aktivierte Fibrin-Matrix formuliert mit Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexen oder PEI-pDNA-Komplexen führt über mehrere Wochen zu einer effektiven Transfektion von z. B. humanen Keratinozyten. Die Daten vorliegender Arbeit belegen, dass sich Fibrinogen formuliert mit PEI-pDNA-Komplexen oder Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexen effektiv für den lokalen, nicht viralen Matrix-vermittelten Gentransfer einsetzen lässt.

VI. Literaturverzeichnis

1. Alison MR, Poulson R, Forbes S, Wright NA (2002) An introduction to stem cells. *J Pathol*; 197:419-423.
2. Alton EW, Stern M, Farley R, Jaffe A, Chadwick SL, Phillips J, Davies J, Smith SN, Browning J, Davies MG, Hodson ME, Durham SR, Li D, Jeffery PK, Scallan M, Balfour R, Eastman SJ, Cheng SH, Smith AE, Meeker D, Geddes DM (1999) Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: a double-blind placebo-controlled trial. *Lancet*; 353:947-954.
3. Amoureux MC, Rajapaske N, Stipkovits L, Szathmary S (2005) Peptidoglycan and bacterial DNA induce inflammation and coagulation markers in surgery. *Mediators Inflamm*; 2:118-120.
4. Andree C, Voigt M, Wenger A, Erichsen T, Bittner K, Schäfer D, Walgenbach KJ, Borges J, Horch RE, Eriksson E, Stark GB (2001) Plasmid gene delivery to human keratinocytes through a fibrin-mediated transfection system. *Tissue Eng* ;7:757-766.
5. Avery OT, MacLeod CM, McCarty M (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *The Journal of Experimental Medicine*; 79:137-158.
6. Bangari DS, Mittal SK (2006) Current strategies and future directions for eluding adenoviral vector immunity. *Curr Gene Ther*; 6:215-226.
7. Bannasch H, Horch RE, Tanczos E, Stark GB (2000) [Treatment of chronic wounds with cultured autologous keratinocytes as suspension in fibrin glue]. *Zentralbl Chir*;125 Suppl 1:79-81.
8. Barquinero J, Eixarch H, Pérez-Melgosa (2004) Retroviral vectors: new application for an old tool. *Gene Ther*; 11, Suppl 1:3-9.
9. Bello YM, Falabella AF, Eaglstein WH (2001) Tissue-engineered skin. Current status in wound healing. *Am J Clin Dermatol*;2(5):305-313.
10. Bergel S (1909) Ueber die Wirkungen des Fibrins. *Dtsch Med Wochenschr*; 35:663-665.
11. Berns A (2004) Good news for gene therapy. *N Engl J Med*; 350:1679-1680.

VI. Literaturverzeichnis

12. Bessis N, GarciaCozar FJ, Boissier MC (2004) Immune response to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther*; 11 Suppl 1:10-17.
13. Bhang SH, Jeon O, Choi CY, Kwon YH, Kim BS (2007) Controlled release of nerve growth factor from fibrin gel. *J Biomed Mater Res A*; 80:998-1002.
14. Bianco P, Robey PG (2001) Stem cells in tissue engineering. *Nature*; 414:118-121.
15. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P, Greenblatt JJ, Rosenberg SA, Klein H, Berger M, Mullen CA, Ramsey WJ, Muul L, Morgan RA, Anderson WF (1995) T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science*; 270:475-480.
16. Blakytyn R, Jude E (2006) The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet Med*; 23:594-608.
17. Blanpain C, Horsley V, Fuchs E (2007) Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell*; 128:445-458.
18. Bleiziffer O, Eriksson E, Yao F, Horch RE, Kneser U (2007) Gene transfer strategies in tissue engineering. *J Cell Mol Med*; 11:206-223.
19. Blombäck B, Carlsson K, Fatha K (1994) Fibrin in human plasma: gel architectures governed by rate and nature of fibrinogen activation. *Thromb Res*; 75:521-538.
20. Bonadio J (2000) Tissue engineering via local gene delivery. *J Mol Med*; 78:303-311.
21. Bonadio J (2002) Genetic Approaches to Tissue Repair. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*; 961:58-60.
22. Bonadio J, Smiley E, Patil P, Goldstein S (1999) Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. *Nature Med*; 5:753-759.
23. Boussif O, Lezouac'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 92:7297-7301.
24. Brannon-Peppas L, Blanchette JO (2004) Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*; 56:1649-1659.

VI. Literaturverzeichnis

25. Braun S, Vogt S, Imhoff AB (2007) Stage oriented surgical therapy: Current situation. *Orthopade*;36:589-600.
26. Breen A, Strappe P, Kumar A, O'Brien T, Pandit A (2006) Optimization of a fibrin scaffold for sustained release of an adenoviral gene vector. *J Biochem Mater Res A*; 78:702-708.
27. Brunetti-Pierri N, Palmer DJ, Beaudet AL, Carey KD, Finegold M, Ng P (2004) Acute toxicity after high-dose systemic injection of helper-dependent adenoviral vectors into nonhuman primates. *Hum Gene Ther*; 15:35-46.
28. Bundesärztekammer 1995, Richtlinien zum Gentransfer in menschliche Körperzellen. (<http://www.bundesaerztekammer.de>), Stand 21.08. 2007
29. Cao T, Tsai SY, O'Malley BW, Wang XJ, Roop DR (2002) The epidermis as a bioreactor. Topically regulated cutaneous delivery into the circulation. *Hum Gene Ther*;13:1075-1080.
30. Carr ME (1988) Fibrin formed in plasma is composed of fibers more massive than those formed from purified fibrinogen. *Thromb Haemost*; 59:535-539.
31. Cattoglio C, Facchini G, Sartori D, Antonelli A, Miccio A, Cassani B, Schmidt M, von Kalle C, Howe S, Thrasher AJ, Aiuti A, Ferrari G, Recchia A, Mavilio F (2007) Hot spots of retroviral integration in human CD34+ hematopoietic cells. *Blood*; 110:1770-1778.
32. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, Deist FL, Fischer A (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*; 288:669-672.
33. Chu AJ, Beydoun S, Mathews ST, Hoang J (2003) Novel anticoagulant polyethylenimine: inhibition of thrombin-catalized fibrin formation. *Arch Biochem Biophys*; 415:101-108.
34. Clark RAF (2001) Fibrin and wound healing. *Ann N Y Acad Sci*;963:335-67.
35. Clover DJ, Lipps HJ, Jans DA (2005) Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat Rev Genet*; 6:299-310.
36. Cone RD, Mulligan RC (1984) High-efficiency gene transfer into mammalian cells: generation of helper-free recombinant retrovirus with broad mammalian host range. *Proc Natl Acad Sci USA*; 81:6349-6353.

VI. Literaturverzeichnis

37. Cronkite EP, Lozner EL, Eaver JM (1944) Use of thrombin and fibrinogen in skin grafting. *JAMA*; 124:976.
38. Cucchiaroni M, Madry H (2005) Gene therapy for cartilage defects. *J Gene Med*;7:1495-1509.
39. Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH, Blaese RM (1992) In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science*; 256:1550-1552.
40. Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG (1997) Cartilage injuries: a review of 31.516 knee arthroscopies. *Arthroscopy*;13:456-460.
41. Dileo J, Miller TE Jr, Chesnoy S, Huang L (2003) Gene transfer to subdermal tissues via a new gene gun design. *Hum Gene Ther*; 14:79-87.
42. Dissertation Scherer F (1998): Einsatz von Kollagen zur kontinuierlichen Freisetzung von Genvektoren- Grundlagen für eine neue Gentransfer-Technologie. Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg Universität Mainz.
43. Fang J, Zhu YY, Smiley E, Bonadio J, Rouleau JP, Goldstein SA, McCauley LK, Davidson BL, Roessler BJ (1996) Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 93:5753-5758.
44. Felgner PL, Ringold GM (1989) Cationic liposome-mediated transfection. *Nature*; 337:387-388.
45. Fillion MC, Phillips NC (1997) Anti-inflammatory activity of cationic lipids. *Br J Pharmacol*; 122:551-557.
46. Finsinger D, Remy JS, Erbacher P, Koch C, Plank C (2000) Protective copolymers for nonviral gene vectors: synthesis, vector characterization and application in gene delivery. *Gene Ther*;7:1183-1192.
47. Friedmann T, Roblin R (1972) Gene therapy for human genetic disease. *Science*; 175:949-955.
48. Gao X, Kim KS, Liu D (2007) Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *AAPS*; 9:E92-104.
49. Garnett MC (1999) Gene-delivery systems using cationic polymers. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*; 16:147-207.
50. Gaspar HB, Parsley KL, Howe S, King D, Gilmour KC, Sinclair J, Brouns G, Schmidt M, Von Kalle C, Barington T, Jakobsen MA, Christensen HO,

VI. Literaturverzeichnis

- Al Ghonaïum A, White HN, Smith JL, Levinsky RJ, Ali RR, Kinnon C, Thrasher AJ (2004) Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet*; 364:2181-2187.
51. Gelse K, von der Mark K, Aigner T, Park J, Schneider H (2003) Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells. *Arthritis Rheum*;48:430-441.
52. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide, www.wiley.co.uk/genmed/clinical
53. Gibben PF, Malaska C, Herring SW (2000) Thromboelastograph assay for measuring the mechanical strength of fibrin sealant clots. *Clin Appl Thromb Hemost*;6:226-233.
54. Gillitzer R, Göbeler M (2001) Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol*;69:513-521.
55. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA (2007) Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*; 100:1249-1260.
56. Godbey WT, Wu KK, Mikos AG (2001) Poly(ethylenimine)-mediated gene delivery affects endothelial cell function and viability. *Biomaterials*; 22:471-480.
57. Grey EC (1915) Fibrin as a hemostatic in cerebral surgery. *Surg Gynec Obstet*; 21:452-454.
58. Griffith LG, Naughton G (2002) Tissue engineering – current challenges and expanding opportunities. *Science*; 295:1009-1014.
59. Guo T, Zhao J, Chang J, Ding Z, Hong H, Chen J, Zhang J (2006) Porous chitosan-gelatin scaffold containing plasmid DNA encoding transforming growth factor-beta1 for chondrocytes proliferation. *Biomaterials*; 27:1095-1103.
60. Haccin-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay JP, Thrasher AJ, Wulffraat N, Sorensen R, Dupuis-Girod S, Fischer A, Davies EG, Kuis W, Leiva L, Cavazzana-Calvo M (2002) Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med*; 346:1185-1193.
61. Haccin-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst

VI. Literaturverzeichnis

- U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M (2003) LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*; 302:415-419.
62. Harding KG, Morris HL, Patel GK (2002) Healing chronic wounds. *BMJ*;324:160-163.
63. Harvey SC (1916) The use of fibrin paper and forms in surgery. *Boston Med Surg J*; 174:658-659.
64. Heinzerling L, Burg G, Dummer R, Maier T, Oberholzer PA, Schultz J, Elzaouk L, Pavlovic J, Mölling K (2005) Intratumoral injection of DNA encoding human interleukin 12 into patients with metastatic melanoma: clinical efficacy. *Hum Gene Ther*;16:35-48.
65. Hirsch T, Spielmann M, Yao F, Eriksson E (2007) Gene therapy in cutaneous wound healing. *Front Biosci*;12:2507-2518.
66. Holzmann H, Kippenberger S, Ramirez-Bosca A, Bereiter-Hahn J, Bernd A (1994) [Cell and tissue culture models in dermatology. The Frankfurt Center of Dermatology establishes models]. *Hautarzt*;45:304-312.
67. Hubbell JA (1999) Bioactive biomaterials. *Curr Opin Biotechnol*; 10:123-129.
68. Irvine KR, Rao JB, Rosenberg SA Restifo NP (1996) Cytokine enhancement of DNA immunization leads to effective treatment of established pulmonary metastases. *J Immunol*;156:238-245.
69. Jang JH, Houchin TL, Shea LD (2004) Gene delivery from polymer scaffolds for tissue engineering. *Expert Rev Med Devices*; 1:127-138.
70. Jensen TG (2007) Cutaneous gene therapy. *Ann Med*;39:108-115.
71. Kabuto M, Kubota T, Kobayashi H, Nakagawa T, Arai Y, Kitai R (1995) Experimental study of intraoperative local chemotherapy with fibrin glue containing nitrosourea for malignant gliomas. *Surg Neurol*; 44:151-156.
72. Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, Markart P, Song Y, Tzima E, Kennerknecht E, Niepmann M, von Bruehl ML, Sedding D, Massberg S, Günther A, Engelmann B, Preissner KT (2007) Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA*; 104:6388-6393.

VI. Literaturverzeichnis

73. Kawabata K, Takakura Y, Hashida M (1995) The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. *Pharm Res*; 12:825-830.
74. Kircheis R, Blessing T, Brunner S, Wightman L, Wagner E (2001) Tumor targeting with surface-shielded ligand-polycation DNA complexes. *J Control Release*; 72:165-170.
75. Kirilak Y, Pavlos NJ, Willwea CR, Han R, Feng H, Xu J, Askananthan N, Stewart GA, Henry P, Wood D, Zheng MH (2006) Fibrin sealant promotes migration and proliferation of human articular chondrocytes: possible involvement of thrombin and protease-activated receptors. *Int J Mol Med*;17:551-558.
76. Kohn DB, Sadelain M, Glorioso JC (2003) Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID. *Nat Rev Cancer*, 3:477-488.
77. Krotz F, de Wit C, Sohn HY, Zahler S, Gloe T, Pohl U, Plank C (2003) Magnetofection- a highly efficient tool for antisense oligonucleotide delivery in vitro and in vivo. *Mol Ther*; 7:700-710.
78. Kullmer (2007): Lokaler Gentransfer mit implantierbaren Arzneistoffträgern. Neue Wege zur Rekonstruktion von Haut- und Knochengewebe. Dissertation, LMU München: Fakultät für Chemie und Pharmazie.
79. Kumar TR, Vasantha Bai M, Krishnan LK (2004) A freeze-dried discs as a biodegradable drug release matrix. *Biologicals*; 32:49-55.
80. Langer R, Vacanti JP (1993) Tissue engineering. *Science*; 260:920-926.
81. Laurens N, Koolwijk P, de Maat MPM (2006) Fibrin structure and wound healing. *J Thromb Haemost*; 4:932-939.
82. Lechardeur D, Lukacs GL (2006) Nucleocytoplasmic transport of plasmid DNA: a perilous journey from the cytoplasm to the nucleus. *Hum Gene Ther*; 17:882-889.
83. Lee KY, Peters MC, Anderson KW, Mooney DJ (2000) Controlled growth factor release from synthetic extracellular matrices. *Nature*; 408:998-1000
84. Levi M, van der Poll T (2005) Two-way interactions between inflammation and coagulation. *Trens Cardiovasc Med*; 15:254-259.
85. Li J, Chen J, Kirsner R (2007) Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*;25:9-18.

VI. Literaturverzeichnis

86. Li S, Huang L (1997) In vivo gene transfer via intravenous administration of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes. *Gene Ther*; 4:891-900.
87. Li S, Ma Z (2001) Nonviral gene therapy. *Curr Gene Ther*; 1:201-226.
88. Li S, Wu SP, Whitmore M, Loeffert EJ, Wang L, Watkins SC, Pitt BR, Huang L (1999) Effect of immune response on gene transfer to the lung via systemic administration of cationic lipid vectors. *Am J Physiol*; 276:L796-804.
89. Limat A, Hunziker T (1996) Cultivation of keratinocytes from the outer root sheath of human hair follicles. *Methods in Molecular Medicine* 21-31, Human Cell Culture protocols, edited by Jones GE, Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA.
90. Lv H, Zhang S, Wang B, Cui S, Yan J (2006) Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J Control Release*; 114:100-109.
91. Marlovits S, Zeller P, Singer P, Resinger C, Vécsei V (2006) Cartilage repair: generations of autologous chondrocyte transplantation. *Eur J Radiol*;57:24-31.
92. Matras H, Dinges HP, Lassmann H, Mamoli B (1972) Zur nahtlosen interfazikulären Nerventransplantation im Tierexperiment. *Wien Med Wochenschr*; 122:517-522.
93. McCormack MP, Rabbitts TH (2004) Activation of the T-cell oncogene LMO2 after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*; 350:913-922.
94. Mehier-Humbert S, Guy RH (2004) Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Adv Drug Deliv Rev*; 57:733-753.
95. Miller DG, Adam MA, Miller AD (1990) Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Bio*; 10:4239-4242.
96. Miller LS, Modlin RL (2007) Toll-like receptors in the skin. *Semin Immunopathol*;29:15-26.
97. Morral N, Parks RJ, Zhou HS, Langston C, Schiedner G, Quinones J (1998) High doses of a helper-dependent adenoviral vector yield supraphysiological levels of alpha(1)-antitrypsin with negligible toxicity. *Hum Gene Ther*; 9:2709-2716.

VI. Literaturverzeichnis

98. Mosesson MW (2005) Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost*; 3:1894-1904.
99. Mosesson MW, KR Siebenlist, DA Meh (2001) The structure an Biological Features of Fibrinogen an Fibrin. *Ann NY Acad Sci*; 936:11-30.
100. Murphy WL, Mooney DJ (1999) Controlled delivery of inductive proteins, plasmid DNA and cells from tissue engineering matrices. *J Periodontal Res*; 34:413-419.
101. Nabel GJ, Nabel EG, Yang ZY, Fox BA, Plautz GE, Gao X, Huang L, Shu S, Gordon D, Chang AE (1993) Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression biologic activity, and lack of toxicity in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 90:11307-11311.
102. Navsaria HA, Myers SR, Leigh IM, McKay IA (1995) Culturing skin in vitro for wound therapy. *Trends Biotechnol*;13:853-859.
103. Nguyen LT, Atobe K, Barichello JM, Ishida T, Kiwada H (2007) Complex formation with plasmid DNA increases the cytotoxicity of cationic liposomes. *Biol Pharm Bull*; 30:751-757.
104. Nimni ME (1997) Polypeptide growth factors: targeted delivery systems. *Biomaterials*; 18:1201-1225.
105. Niidome T, Huang L (2002) Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther*; 9:1647-1652.
106. Ogris M, Brunner S, Schüller S, Kircheis R, Wagner E (1999) PEGylated DNA/transferring-PEI complexes: reduced interaction with blood components extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther*; 6:595-605.
107. Ogris M, Brunner S, Schüller S, Kircheis R, Wagner E (1999) PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood an potential for systemic gene delivery. *Gen Ther*; 6:595-605.
108. Pannier AK, Shea LD (2004) Controlled release systems for DNA delivery. *Mol Ther*; 10:19-26.
109. Paul-Ehrlich Institut
110. Pavlov V, Zorn M, Krämer R (2006) Probing single-stranded DNA and its biomolecular interactions through direct catalytic activation of factor XII, a

VI. Literaturverzeichnis

- protease of the blood coagulation cascade. *Biochem Biophys Res Commun*; 349:1011-1015.
111. Pike-Overzet K, van der Burg M, Wagemaker G, van Dongen JJ, Staal FJ (2007) New insights and unresolved issues regarding insertional mutagenesis in X-linked SCID gene therapy. *Mol Ther*; 15:1910-1916.
112. Plank C, Mechtler K, Szoka FC, Wagner E (1996) Activation of the complement system by systemic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum Gene Ther*; 7:1437-1446.
113. Plank C, Oberhauser B, Mechtler K, Koch C, Wagner E (1994) The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems. *J Biol Chem*; 269:12918-12924.
114. Plank C, Schillinger U, Scherer F, Bergemann C, Remy JS, Krotz F, Anton M, Lausier J, Rosenecker J (2003) The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery. *Biol Chem*; 384:737-747.
115. Polak J, Hench L (2005) Gene therapy progress and prospects: in tissue engineering. *Gene Ther*; 12:1725-1733.
116. Rainov NG (2000) A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. *Hum Gene Ther*; 11:2389-2401.
117. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, Wilson JM, Batshaw ML (2003) Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab*; 80:148-158.
118. Recombinant DNA Advisory Committee
www4.od.nih.gov/oba/rac/aboutrdagt.htm
119. Rogers S (1976) Reflections on the issues posed by recombinant DNA molecule technology. *Ann N Y Acad Sci*; 265:66-70.
120. Rowe SL, Lee S, Stegemann JP (2007) Influence of thrombin concentration on the mechanical and morphological properties of cell-seeded fibrin hydrogels. *Acta Biomater*; 3:59-67.
121. Rudolph C, Schillinger U, Plank C, Gessner A, Nicklaus P, Müller R, Rosenecker J (2002) Nonviral gene delivery to the lung with copolymer-

VI. Literaturverzeichnis

- protected and transferrin-modified polyethylenimine. *Biochim Biophys Acta*;1573:75-83.
122. Ruiz FE, Clancy JP, Perricone MA, Bebok Z, Hong JS, Cheng SH, Meeker DP, Young KR, Schoumacher RA, Weatherly MR, Wing L, Morris JE, Sindel L, Rosenberg M, van Ginkel FW, McGhee JR, Kelly D, Lyrene RK, Sorscher EJ (2001) A clinical inflammatory syndrome attributable to aerosolized lipid-DNA administration in cystic fibrosis. *Hum Gene Ther*; 12:751-761.
123. Sakiyama-Elbert SE, Hubbell JA (2000) Development of fibrin derivatives for controlled release of heparin-binding growth factors. *J Control Release*; 65:389-402.
124. Salmon JK, Armstrong CA, Ansel JC (1994) The skin as an immune organ. *West J Med*;160:181-183.
125. Saltzman WM (1999) Delivering tissue regeneration. *Nature Biotech*; 17:534-535.
126. Scherer F, Anton M, Schillinger U, Henke J, Bergemann C, Kruger A, Gansbacher B, Plank C (2002) Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther*; 9:102-109.
127. Scherer F, Schillinger U, Putz U, Stemberger A, Plank C (2002) Nonviral vector loaded collagen sponges for sustained gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med*; 4:634-643.
128. Schiedner G, Morral N, Parks RJ, Wu Y, Koopmans SC, Langston C, Graham FL, Beaudet AL, Kochanek S (1998) Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat Genet*; 18:180-183.
129. Sellins K, Fradkin L, Liggitt D, Dow S (2005) Type I interferons potently suppress gene expression following gene delivery using liposome(-)DNA complexes. *Mol Ther*; 12:451-459.
130. Shah GA, Nair CH, Dhall DP (1985) Physiological studies on fibrin network structure. *Thromb Res*; 40:181-188.
131. Simpson-Haidaris PJ, Rybarczyk B (2001) Tumors and fibrinogen. The role of fibrinogen as an extracellular matrix protein. *Ann N Y Acad Sci*;936:406-25.

VI. Literaturverzeichnis

132. Sonawane ND, Szoka FC Jr, Verkman AS (2003) Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J Biol Chem*; 278:44826-44831.
133. Spängler HP, Braun F, Moritz E, Wolner E (1976) Die lokale Anwendung von Fibrinogen und Kollagen zur Blutstillung in der Herzchirurgie. *Wien Med Wochenschr*; 126:86-89.
134. Standeven KF, Aries RAS, Grant PJ (2005) The molecular physiology and pathology of fibrin structure/function. *Blood Reviews*; 19:275-288.
135. Steinwachs MR, Erggelet C, Lahm A, Guhlke-Steinwachs U. (1999) Clinical and cell biology aspects of autologous chondrocytes transplantation. *Unfallchirurg*;102:855-860.
136. Stewart MJ, Plautz GE, Del Buono L, Yang ZY, Xu L, Gao X, Huang L, Nabel EG, Nabel GJ (1992) Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes: safety and acute toxicity in mice. *Hum Gene Ther*; 3:267-275.
137. Stock UA, Vacanti JP (2001) Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med*, 52:443-451.
138. Tandia BM (2003) Identification of human plasma proteins that bind to cationic/lipid DNA complex and analysis of their effects on transfection efficiency: implication for intravenous gene transfer. *Mol Ther*;8:264-273.
139. Tatum EL (1966) Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine. *Perspect Biol Med*; 10:19-32.
140. Taylor SJ, Rosenzweig ES, McDonald JW3rd, Sakiyama-Elbert SE (2006) Delivery of neurotrophin-3 from fibrin enhances neuronal fiber sprouting after spinal cord injury. *J Control Release*; 113:226-235.
141. Terebesi J, Kwok KY, Rice KG (1998) Iodinated plasmid DNA as a tool for gene delivery. *Anal Biochem*;263:120-123.
142. The Journal of Gene Medicine (2007) , Gene Therapy Trials Worldwide. (<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>), Stand 25.07.2007.
143. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*; 282:1145-1147.
144. Tiera MJ, Winnik FO, Fernandes JC (2006) Synthetic and natural polycations for gene therapy: state of the art and new perspectives. *Curr Gene Ther*; 6:59-71.

VI. Literaturverzeichnis

145. Trainer AH, Alexander MY (1997) Gene delivery to the epidermis. *Hum Mol Genet*;6:1761-1767.
146. Trent RJA, Alexander IE (2004) Gene therapy: applications and progress towards the clinic. *Intern Med J*; 34:621-625.
147. Trentin D, Hubbell J, Hall H (2005) Non-viral gene delivery for local and controlled DNA release. *J Control Release*; 102:263-275.
148. Trippel SB, Ghivizzani SC, Nixon AJ (2005) Gene-based approaches for the repair of articular cartilage. *Gene Ther*;11:351-359.
149. Übelacker P, Wagner B, Vogt S, Salzmann G, Wexel G, Krüger A, Plank C, Brill T, Specht K, Hennig T, Schiller U, Imhoff AB, Martinek V, Gänsbacher B (2007) In vivo analysis of retroviral gene transfer to chondrocytes within collagen scaffolds for the treatment of osteochondral defects. *Biomaterials*;28:4480-4487.
150. Uchiyama T, Kumaki S, Ishikawa Y, Onodera M, Sato M, Du W, Sasahara Y, Tanaka N, Sugamura K, Tsuchiya S (2006) Application of HSVtk suicide gene to X-SCID gene therapy: ganciclovir treatment offsets gene corrected X-SCID B cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 341:391-398.
151. Vacanti JP, Langer R (1999) Tissue engineering : the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet*; 354 Suppl 1:32-34.
152. Vogel JC (2000) Nonviral skin gene therapy. *Hum Gene Ther*;11:2259-2259.
153. Vogt PM, Thompson S, Andree C, Liu P, Breuing K, Hatzis D, Brown H, Mulligan RC, Eriksson E (1994) Genetically modified keratinocytes transplanted to wounds reconstitute the epidermis. *Proc Natl Acad Sci USA*; 20:9307-11
154. Wagner E, Cotton M, Foisner R, Birnstiel ML (1991) Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 88:4255-4259.
155. Wagner E, Plank C, Zatloukal K, Cotton M, Birnstiel ML (1992) Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 89:7934-7938.

VI. Literaturverzeichnis

156. Walker GF, Fella C, Pelisek J, Fahrmeir J, Boeckle S, Ogris M, Wagner E (2005) Towards synthetic viruses: endosomal pH-triggered deshielding of targeted polyplexes greatly enhances gene transfer in vitro and in vivo. *Mol Ther*; 11:418-425.
157. Walker PS, Scharton-Kersten T, Krieg AM, Love-Homan L, Rowton ED, Udey MC, Vogel JC (1999) Immunostimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity and provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12- and IFN-gamma-dependent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96:6970-6975.
158. Watson JD, Crick FH (1953) The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*; 18:123-131.
159. Weisel JM, Nagaswami C (1992) Computer modelling of fibrin polymerisation kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations: clot structure and assembly are kinetically controlled. *Biophys J*; 63:111-128.
160. Wells DJ (2004) Gene therapy progress and prospects: electroporation and other physical methods. *Gene Ther*; 11:1363-1369.
161. Wiese M (2003) Behandlung von lokalen Knorpelschäden : Methode der Wahl noch nicht abschließend geklärt. *Dtsch Arztebl*; A2446
162. Wiethoff CM, Middaugh CR (2003) Barriers to nonviral gene delivery. *J Pharm Sci*; 92:203-217.
163. Willerth SM, Johnson PJ, Maxwell DJ, Parsons SR, Doukas ME, Sakiyama-Elbert SE (2007) Rationally designed peptides for controlled release of nerve growth factor from fibrin matrices. *J Biomed Mater Res A*; 80:13-23.
164. Woolverton CJ, Fulton JA, Salstrom SJ, Hayslip J, Haller NA, Wildrout ML, MacPhee M (2001) Tetracycline delivery from fibrin controls peritoneal infection without measurable systemic antibiotic. *J Biol Chem*; 276:861-867.
165. Yang NS, Burgholder J, Roberts B, Martinell B, McCabe D (1990) In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA*; 87:9568-9572.
166. Yen BL, Haung HI, Chien CC, Jui HY, Ko BS, Yao M, Shun CT, Yen ML, Lee MC, Chen YC (2005) Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells*; 23:3-9.

VI. Literaturverzeichnis

167. Yi Y, Hahm SH, Lee KH (2005) Retroviral gene therapy: safety issues and possible solutions. *Curr Gene Ther*; 5:25-35.
168. Young LS, Searle PF, Onion D, Mautner V (2006) Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *J Pathol*; 208:299-318.
169. Zabner J, Cheng SH, Meeker D, Launspach J, Balfour R, Perricone MA, Morris JE, Marshall J, Fasbender A, Smith AE, Welsh MJ (1997) Comparison of DNA-lipid complexes and DNA alone for gene transfer to cystic fibrosis airway epithelia in vivo. *J Clin Invest*; 100:1529-1537.

VII. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abbildung 1: Aufbau der in der Arbeitsgruppe hergestellten Copolymer-geschützten Genvektoren S. 10

Abbildung 2: Letzte Schritte der Blutgerinnung. S. 14

Abbildung 3: physiologischen Interaktionen von Fibrin(ogen) mit zellulärer und extrazellulärer Matrix S. 15

Abbildung 4: Herstellung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches Formulierung A S. 24

Abbildung 5: Herstellung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches Formulierung B S. 25

Abbildung 6: Herstellung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches Formulierung C S. 26

Abbildung 7: Prinzip der Rotationsthrombelastographie. S. 48

Abbildung 8: Beschreibung der Parameter CT, CFT und MCF. S. 49

Abbildung 9: roTEG- Analyse doppelt lyophilisierte Fibrinogenkomponente. S. 50

Abbildung 10: roTEG- Analyse Formulierung A. S. 53

Abbildung 11: roTEG-Analyse Formulierung B S. 56

Abbildung 12: Gelelektrophorese und Autoradiographie. S. 57

Abbildung 13: Kumulative, relative Freisetzung nackter radioaktiver *pDNA. S. 61

Abbildung 14: Kumulative, relative Freisetzung Hüllpolymer-PEI-*pDNA. S. 63

Abbildung 15: Mikroskopische Durchlichtaufnahme einer mit Kaninchenchondrozyten bewachsenen Gen-aktivierten Fibrin-Matrix. S. 65

Abbildung 16: Fluoreszenz-/Durchlichtaufnahme v. Kaninchenchondrozyten. S. 66

Abbildung 17: GFP-Expression in Chondrozyten. S. 67

Abbildung 18: Erweiterung des Schemas zur Herstellung eines Fibrinogen-Vektor-Gemisches nach Formulierung B um Zellen in eine Fibrinmatrix einzubetten. S. 68

Abbildung 19: Optimiertes Schema zur Einbettung von Zellen in eine Gen-aktivierte Fibrin-Matrix. S. 69

Abbildung 20: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix mit in diese eingebettet wachsende humane Keratinozyten. S. 70

Abbildung 21: Luciferase-Expression in humanen Keratinozyten (nackte pDNA, Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe). S. 72

Abbildung 22: Luciferase-Expression in humanen Keratinozyten (nackte pDNA, PEI-pDNA-Komplexe, Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe). S. 73

Abbildung 23: Interaktionen zwischen Genvektoren und den Bestandteilen der beiden Komponenten des Fibrinklebers. S.79

Tabellen

Tabelle 1: Interaktion von Fibrin(ogen) mit Proteinen und deren physiologische Bedeutung (nach Mosesson 2005). S. 16

Tabelle 2: Material und Geräte zur Formulierung einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix S. 19

Tabelle 3: Material und Geräte zur Analyse der Fibrinbildung. S. 27

Tabelle 4: Inhalt einer Messküvette bei Analyse von Formulierung A. S. 28

Tabelle 5: Inhalt einer Messküvette bei Analyse einer erneut gefriergetrockneten Fibrinogenkomponente. S. 29

Tabelle 6: Inhalt einer Messküvette bei Analyse von Formulierung B. S. 30

Tabelle 7: Inhalt einer Messküvette bei Analyse von Formulierung B (PEI-pDNA und Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe). S.32

Tabelle 8: Material und Geräte zur Untersuchung der Freisetzung. S.33

Tabelle 9: Schema zur Herstellung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches nach Formulierung B. S. 35

Tabelle 10: Schema zur Herstellung des Fibrinogen-Vektor-Gemisches nach Formulierung C. S. 37

Tabelle 11: Zusammensetzung eines Fibringerinnsels. S. 37

Tabelle 12: Material und Geräte für Zellkulturversuche. S. 38

Tabelle 13: Lysepuffer (Ansatz für 500 ml). S.40

Tabelle 14: Zusammensetzung der Gen-aktivierten Fibrin-Matrix. S. 42

Tabelle 15: Zusammensetzung einer Gen-aktivierten Fibrin-Matrix S. 45

Tabelle 16: Zusammensetzung einer optimierten Gen-aktivierten Fibrin-Matrix S. 47

VIII. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung des Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München erstellt. In diesem Zusammenhang möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. B. Gänsbacher für die Möglichkeit am Institut zu forschen, für die freundliche Unterstützung während der Arbeit und die gleichzeitige klinische Ausbildung bedanken. Herrn Prof. Dr. A. Stemberger möchte ich herzlich für seine zahlreichen Ideen und ausdauernde Unterstützung während der Arbeit und bei ihrer Ausarbeitung danken. Besonderer Dank gilt auch Herrn PD Dr. C. Plank für die bereitwillige Integration in sein Labor und die beständige freundliche und unkomplizierte Unterstützung bei allen Problemen im Laufe der Forschungsarbeit und der Auswertungen und Veröffentlichungen. Besonders danken möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe vom Labor 1.39, insbesondere bei Dr. Christian Koch, Sabine Brandt, Dr. Ulrike Schillinger und Ursula Putz, ohne deren fortwährende Unterstützung die Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Mein Dank gilt auch der Klinik für Nuklearmedizin für die freundliche Bereitstellung ihrer Messeinrichtungen. Ebenso möchte ich Herrn PD Dr. Braun-Falco und seinem Laborteam am Zentrum für Allergie und Umwelt an der Dermatologischen Klinik am Biederstein für die Unterstützung bei den Zellkulturversuchen mit humanen Keratinozyten danken, ebenso Frau Huber vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie für die Hilfe bei der statistischen Auswertung. Dank gilt auch der Firma Baxter, Wien für die freundliche Bereitstellung des Fibrinklebers.

IX. Lebenslauf

Name: Hacker Christian
Geburtsdatum: 30.12.1977
Geburtsort: München, Deutschland
Nationalität: Deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung: 1984 – 1988 Grundschule am Pfanzeltplatz, München
1988 – 1997 Städtisches Heinrich – Heine – Gymnasium,
München

Zivildienst : 1997 –1998 Johanniter – Unfallhilfe KV München Land

Universität: Studium der Humanmedizin am Klinikum Rechts der Isar,
Technische Universität München (Gesamtnote 1,49)

Klinische Tätigkeit:

Praktisches Jahr April 2004 – März 2005

Neurologie Klinikum Rechts der Isar, TU München, Deutschland
Innere Medizin University of Sydney, Australien und University of Edinburgh,
Schottland
Chirurgie Universität Zürich, Kantonsspital Luzern, Schweiz

Assistenzarzt

09/2005 – 06/2007 Assistenzarzt in der Klinik für Neurologie und
Neuropsychologie des Klinikums Harlaching, München.
seit 09/2007 Assistenzarzt im Sanatorium Kilchberg, Psychiatrische
Privatklinik, Zürich, Schweiz.

Winterthur, den 14.05.2008

Christian Hacker