
Aus der Medizinischen Poliklinik Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Genaktivierung von bioabbaubaren, implantierbaren Matrices mit
einer neuen Klasse nicht-viraler Genvektoren zum Einsatz in der
Geweberegeneration von Haut und Knochen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ann Katharin Reckhenrich

aus
Mainz

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Florian Krötz

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Stefan Lichtenthaler
Priv. Doz. Dr. Stefan Piltz
Prof. Dr. Maximilian Stehr

Mitbetreuung durch
den promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. Christian Plank

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 02. 05. 2011

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	1
II.	Abkürzungs- und Fachwörterverzeichnis.....	4
1	Zusammenfassung.....	7
2	Einleitung	8
2.1	Gentherapie	8
2.1.1	Genvektoren	10
2.1.1.1	Virale Vektoren	10
2.1.1.2	Nicht-virale Vektoren	12
2.1.1.3	Copolymer-geschützte Genvektoren (COPROGs)	14
2.2	Tissue engineering und genaktivierte Matrices (GAM)	17
2.3	Tissue Engineering von Vollhautdefekten.....	19
2.4	Tissue engineering von Knochendefekten.....	22
2.4.1	Genaktivierte COPROG-PDLLA-Implantatoberflächen.....	30
2.4.2	Entwicklung einer dualen genaktivierten Matrix.....	31
2.5	Fragestellung.....	34
3	Material und Methoden.....	35
3.1	Plasmid-DNA	35
3.1.1	Klonierungen der Plasmide pSEAP und pMetLucDel	35
3.2	Synthese des Schutzpolymers P6YE5C.....	40
3.3	Formulierung der geschützten Genvektoren.....	42
3.4	COPROG-Genaktivierung der Biomaterialien.....	43
3.4.1	Beladung der Biomaterialien mit einer wässrigen COPROG-Lösung.....	43
3.4.2	COPROG-PDLLA-Oberflächenbeschichtung von Biomaterialien	45
3.5	Zellkultur	46
3.5.1	NIH3T3-Mausfibroblasten.....	46
3.5.2	C2C12-Mausmyoblasten	46
3.5.3	Primäre Chondrozyten.....	47
3.5.4	Kultivierung der Matrices	47
3.6	Genexpressionsanalyse	48

3.6.1	Metridia Luciferase Reporter Assay	48
3.6.2	SEAP Reporter Assay	48
3.6.3	Quantifizierung der Genexpression mittels ELISA	49
3.7	Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP)	51
3.8	BCA-Proteinbestimmung	52
3.9	Bestimmung der metabolische Aktivität – MTT-Assay	52
3.10	Histologie	52
3.10.1	Anfertigung von Paraffinschnitten	52
3.10.2	Histochemische Färbungen	53
3.10.3	Immunhistochemische Färbungen.....	54
3.11	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	56
3.12	Statistik	56
4	Ergebnisse	57
4.1	Klonierung von pSEAP und pMetLucDel	57
4.1.1	Kontrollverdau und Gelelektrophorese von pSEAP und pMetLucDel.....	57
4.1.2	Sequenzierung von pSEAP und pMetLucDel	58
4.1.3	Funktionalität von pSEAP und pMetLucDel	59
4.2	VEGF-COPROG-Genaktivierung eines künstlichen Kollagen Typ II Hautersatzmaterials.....	60
4.2.1	Mikrostruktur der Biomatrices nach COPROG-Aktivierung.....	60
4.2.2	Optimierung der Vektormenge für einen effizienten Gentransfer.....	61
4.2.3	Zellkompatibilität der genaktivierten Matrices	62
4.2.4	VEGF-Freisetzung <i>in vitro</i>	64
4.2.5	Funktionalität der genaktivierten Matrices <i>in vivo</i>	65
4.3	Genaktive Oberflächenbeschichtung eines Poly-(ϵ -caprolacton) Knochenersatzmaterials	68
4.3.1	Charakterisierung der Oberflächeneigenschaften einer PDLLA-PCL-Matrix	68
4.3.2	Optimierung der Vektormenge für einen effizienten Gentransfer.....	69
4.3.3	Expression des Wachstumsfaktors BMP-2.....	70
4.3.4	Untersuchung der biologischen Aktivität.....	71
4.4	Entwicklung einer dualen genaktivierten Matrix.....	74

4.4.1	Vorversuch: genetische Aktivierung einer Kollagen Typ I Matrix	74
4.4.1.1	Untersuchung der biologischen Aktivität der genaktivierten Kollagen Typ I Matrix.....	76
4.4.2	COPROG-PDLLA-Beschichtung einer genaktivierten Kollagen Typ I Matrix	77
5	Diskussion	84
5.1	Klonierungsarbeiten.....	84
5.2	Untersuchung des Potentials eines genaktivierten künstlichen Hautersatzes zur verbesserten dermalen Regeneration.....	85
5.3	Osteogene Transdifferenzierung von C2C12-Zellen über eine COPROG-PDLLA-beschichtete PCL-Matrix	88
5.4	Entwicklung einer dualen genaktivierten Matrix zur zeitlichen und räumlichen Kontrolle der Expression unterschiedlicher Proteine	91
5.4.1	Freisetzung von osteoinduktivem BMP-2 über eine genaktivierte Kollagen Typ I Matrix.....	91
5.4.2	Steuerung der Expressionskinetik über COPROG-PDLLA-Oberflächenbeschichtung von genaktivierten Kollagen Typ I Matrices....	92
5.5	Ausblick	95
6	Literaturverzeichnis.....	96
7	Danksagungen.....	114
8	Publikationen	116

II. Abkürzungs- und Fachwörterverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Agg	Aggrecan
Allogen	Spender gehört zur gleichen Art, ist aber eine andere Person
AP	Alkalische Phosphatase
Autokrin	Wirkung auf die absondernde Zelle selbst
Autolog	Spender und Empfänger sind die gleiche Person
AV	Adenovirus
BGLAP	<i>Bone γ-carboxylglutamic acid-containing protein</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
Cl ⁻	Chlorid-Ion
CMV	Cytomegalie Virus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPROG	<i>Copolymer-protected gene vector</i>
CSPD	3-(4-Methoxyspiro[1,2-dioxetan-3,2'(5'-chloro)-tricyclo[3,3,1,13,7]decan]-4-yl)phenylphosphat
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DBM	<i>Demineralized bone matrix</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECM	<i>Extracellular matrix</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EtOAc	Ethylacetat
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FDM	<i>Fused deposition modeling</i>

FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAM	Genaktivierte Matrix
GMP	<i>Good manufacturing practice</i>
H ⁺	Wasserstoff-Ion
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HA	Hydroxylapatit
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IL	Interleukin
Klonieren	Methode zur Gewinnung und identischen Vervielfältigung von DNA
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LIM	konserviertes Zinkfinger-Interaktionsmotiv, abgeleitet von den Genen <u>L</u> in11, <u>I</u> sl-1 und <u>M</u> ec-3
Lyophilisierung	Gefriertrocknung
Magnetofektion	Genvektoren werden mit superparamagnetischen Nanopartikeln assoziiert und unter Einfluß eines Magnetfeldes lokal angereichert
MSC	<i>Mesenchymal stem cells</i>
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid)
N/P	Molares Verhältnis positiv geladener Aminogruppen (N) und negativ geladener Phosphatgruppen (P)
OC	Osteocalcin
OPN	Osteopontin
P6YE5C	Copolymer aus PEG und YE5C
Parakrin	Wirkung in direkter Umgebung
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCL	Polycaprolacton
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin

PGF	<i>Placental growth factor</i>
PROCOP	<i>Protective copolymer</i>
RLU	<i>Relative light units</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAse	Ribonuklease
RPM	<i>Rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SCID-X ₁	<i>Severe combined immunodeficiency-X₁</i>
SEAP	<i>Secreted alkaline phosphatase</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TCP	Tricalciumphosphat
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TNAP	<i>Tissue-nonspecific alkaline phosphatase</i>
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
vWF	Von-Willebrand-Faktor
YE5C	Tyrosin(Y)/5 x Glutaminsäure(E)/Cystein(C) – Peptid

1 Zusammenfassung

Die aktuellen Herausforderungen der regenerativen Medizin sind geringe Funktionalität und Vaskularisierung, hohe Infektionsraten und inakzeptable Stabilität des zu regenerierenden Gewebes. In dieser Arbeit wurden, durch die Kombination von bioabbaubaren Matrices mit Copolymer-geschützten Genvektoren (COPROGs), Implantate entwickelt, die therapeutische Moleküle freisetzen und somit optimale Voraussetzungen für die Generation eines voll funktionstüchtigen Gewebes bieten. Es werden unterschiedliche Technologien zur Erzeugung von genaktivierten Matrices beschrieben. Beispielsweise ist es gelungen, Implantate zur verbesserten Regeneration von schlecht heilenden Vollhautdefekten durch den Einsatz einer solchen Matrix zu entwickeln, um in Zukunft geringe Vaskularisierungsraten von künstlichem Hautersatz positiv zu beeinflussen. In einem zweiten Ansatz konnte durch eine Oberflächenbeschichtung von bioabbaubaren, jedoch mechanisch stabilen Matrices mit COPROGs, zur Freisetzung von osteoinduktiven Wachstumsfaktoren, ein Implantat entwickelt werden, das die Regeneration von Knochen anstoßen kann. Durch den passgenauen Einsatz in das Wundgebiet bei nicht spontan heilenden Knochendefekten kann indirekt auch die Integrität und mechanische Belastbarkeit der zu regenerierenden Region verbessert werden. Obwohl die *in vitro* Ergebnisse vielversprechend sind, müssen weitere *in vivo* Experimente folgen, die die biologische Aktivität *in vivo* belegen können. Im Weiteren wurde eine duale genaktivierte Matrix durch die Kombination der beiden vorausgegangenen Technologien etabliert, um in komplexen Geweben die Regeneration nach traumatischen Ereignissen möglichst vielseitig, durch die Freisetzung von unterschiedlichen therapeutischen Molekülen von einem Implantat, zu fördern.

2 Einleitung

2.1 Gentherapie

Gentherapie ist definiert durch das Einbringen von Genen in Gewebe oder Zellen mit dem Ziel, durch die Expression und Funktion dieser Gene therapeutischen oder präventiven Nutzen zu erlangen. Das Einbringen von Genen in Zellen wird als Gentransfer bezeichnet, hierfür bedarf es eines Vektors, mit dem das Gen transportiert wird. Die Verwendung ist im Arzneimittelgesetz geregelt und in Deutschland ist ausschließlich die somatische Gentherapie erlaubt [1]. Die somatische Gentherapie beschränkt sich auf Körperzellen, die nicht die Keimbahn betreffen. Meilensteine der genetischen Forschung sind Gregor Mendels bereits 1866 vorgetragene Theorie, dass jeder Organismus bestimmte Merkmale an seine Nachkommen vererbt [2], sowie die Entdeckung von Desoxyribonukleinsäure (DNA) als genetisches Material durch Avery 1944 [3] und die Entschlüsselung der Struktur der DNA-Doppelhelix durch Watson und Crick 1953 [4, 5]. Nach der Entdeckung der Restriktionsschnittstellen 1978 [6] wurde das Klonieren von Genen zur Routine [7, 8]. In den 1980er Jahren wurden gentherapeutische Ansätze kontrovers diskutiert und ethische Bedenken formuliert [9, 10]. Als zu Beginn der 1990er die erste klinische Studie genehmigt wurde [11-13], entstand ein regelrechter Aufschwung und die Zahl der durchgeführten klinischen Studien in diesem Bereich stieg sprunghaft an (s. Abb. 1). 1989 bis heute sind mehr als 1634 klinische Gentherapie-Studien weltweit genehmigt worden. Nach der Art der Therapie unterscheidet man Substitutions-, Suppressions-, Additionsansätze und die Genreparatur. Die Substitutionstherapie zielt darauf ab fehlerhafte Genfunktionen bei monogenetischen Erbkrankheiten zu ersetzen [14, 15]. Die Suppressionstherapie dient der Unterdrückung pathogener Genaktivitäten [16]. Bei der Additionstherapie hingegen soll eine physiologische

Genfunktion verstärkt werden [17, 18]. Die direkte Reparatur von mutierten Genen bietet die Möglichkeit diese Mutationen durch homologe Rekombination, beispielsweise mithilfe von Zinkfinger nukleasen, zu korrigieren [19-21].

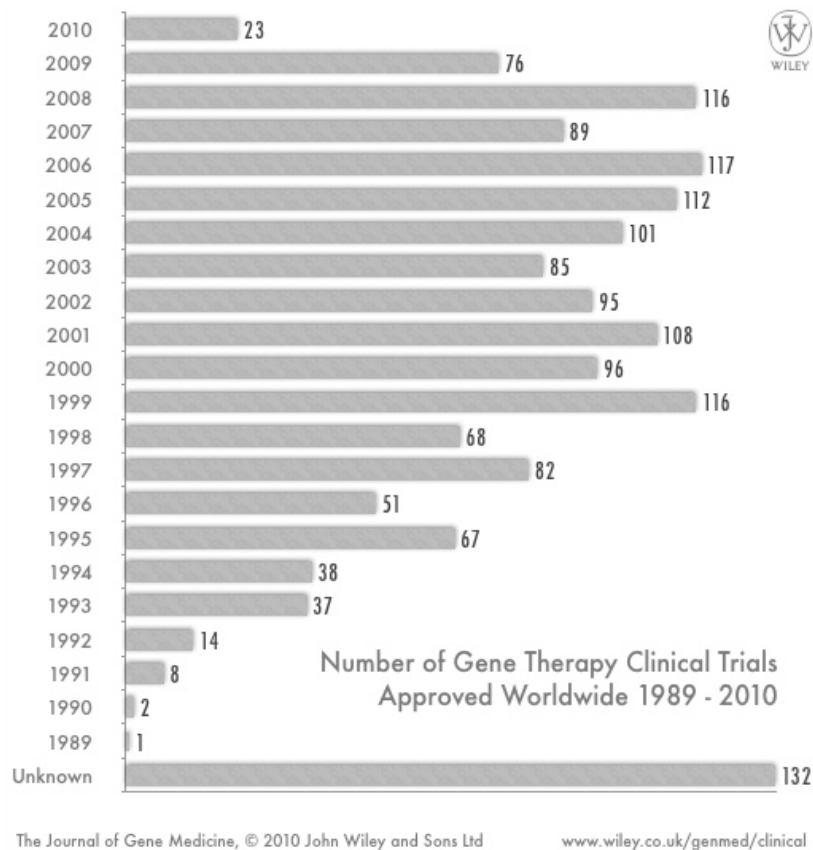


Abbildung 1: Übersicht über weltweit zugelassene klinische Genterapie Studien von 1989-2010. Quelle: www.wiley.co.uk/genmed/clinical

Strategisch unterscheidet man zwischen systemisch und lokal applizierten Verfahren, um Gene in Zielgewebe zu überführen. Eine systemische Applikation ist die direkte Injektion von Genvektoren in die Blutbahn. Aufgrund geringer Spezifität besteht jedoch das Risiko, dass gesundes Gewebe in seiner Funktion beeinträchtigt wird und zudem sind bei dieser Methode hohe Dosen an Genvektor erforderlich, die zu immunologischen oder toxikologischen Bedenken führen [22]. Lokale Applikationsformen bieten die Möglichkeit, die aktive Dosis des therapeutischen Proteins ausschließlich lokal zur Verfügung zu stellen. *Ex vivo* genterapeutisch

veränderte autologe oder allogene Zellen können alleine oder in Kombination mit einem Trägermaterial implantiert werden [23]. Die wesentlichen Nachteile dieser Methode sind die Spendermorbidity und im Fall der allogenen Transplantation bleibt das Restrisiko einer Immunreaktion oder der Transmission von Erkrankungen [24, 25]. In dieser Arbeit wurde der Ansatz der lokalen Applikation von auf einer Biomatrix immobilisierten Genvektoren untersucht. Hier wird die aktive Dosis des therapeutischen Proteins ausschließlich lokal und von Zellen des Wundgebietes produziert. Somit umgeht diese Methode die Nachteile der systemischen Applikation und der Verwendung von *ex vivo* veränderten autologen bzw. allogenen Spenderzellen [26].

2.1.1 Genvektoren

Unter Vektor versteht man ein Vehikel, welches ein therapeutisches Gen in Zielzellen befördert [1]. Es werden virale und nicht-virale Genvektoren unterschieden.

2.1.1.1 Virale Vektoren

Bei der Verwendung von rekombinanten Viren als therapeutische Vektorsysteme wird statt eines Teils des Virusgenoms eine therapeutische Genkassette mit funktioneller genetischer Information in Viruspartikel eingebracht. Den Gentransfer mittels viraler Vektorsysteme bezeichnet man als Transduktion [27]. Durch Deletion der Informationen für Enzyme, Kapsid- oder Hüllmembranproteine sind viralen Vektoren replikationsinkompetent. Ribonukleinsäure (RNA)-Viren, wie Retro- oder Lentiviren gehören zu den integrierenden Vektoren [27, 28]. Retroviren sind Lipid-umhüllte Partikel mit einsträngigem RNA-Genom. Nach der Infektion von Zellen wird diese RNA in lineare doppelsträngige DNA umgeschrieben und ins Zellchromatin

integriert. Seit 1999 wurden insgesamt 20 Kinder, die unter einer schweren Immunschwächeerkrankung (SCID- X_1) litten, in eine klinische Gentherapiestudie mit einem retroviralen therapeutischen Vektor aufgenommen [29-31]. Im Rahmen dieser Studie konnten nahezu alle Kinder erfolgreich nach retroviraler Transduktion von autologen CD34⁺ hämatopoetischen Zellen und Replantation behandelt werden. Bis heute entwickelten 5 dieser Patienten eine T-Zell-Leukämie, 4 von ihnen konnten erfolgreich durch eine konventionelle Chemotherapie behandelt werden [30-32]. Die Ursache für diese dramatische Entwicklung scheint die retrovirale Integration und darauffolgende Expression der proto-onkogenen LIM-Domäne zu sein [33]. Lentiviren sind eine Gattung innerhalb der Retroviren. Im Gegensatz zu diesen erfolgt der Gentransfer über einen aktiven Zellkerntransport durch die Kernporen [34, 35] und somit sind sie in der Lage auch ruhende Zellen zu transduzieren [7]. Das therapeutische Potential, die Effektivität und Sicherheit von lentiviralen Genvektoren werden aktuell in unterschiedlichen Ansätzen intensiv studiert [36-41]. Adenoviren (AV) sind doppelsträngige DNA-Viren und können bis zu 30 kb fremder DNA aufnehmen. Ihre Verwendung ist aufgrund der ausgeprägten Immunogenität und meist nur kurz anhaltenden Transgenexpression eingeschränkt [42]. Adeno-assoziierte Viren (AAV) sind einsträngige DNA-Viren und gehören mit einer Aufnahmefähigkeit von maximal 5 kb für fremde DNA zu den kleinsten Vektoren. AAV-Vektoren infizieren eine Vielzahl von ruhenden und sich teilenden Zellen stabil und effizient [42]. AV und AAV sind die am meisten untersuchten Vektoren ihrer Klasse [43-45]. Eine genaktivierte Matrix, die mit einem für „platelet derived growth factor“-Homodimer (PDGF-BB) kodierenden adenoviralen Vektor versehen wurde, erwies sich als sicher und aktiv in der Heilung von diabetischem Ulkus in kürzlich durchgeführten klinischen Studien [46-48]. Herpes Simplex Viren (HSV) stellen eine

weitere Gruppe der viralen Genvektoren dar [49, 50]. Virale Genvektoren haben sich im Bereich der Geweberegeneration als nützlich erwiesen und sie wurden weitverbreitet in Tiermodellen untersucht [26]. Die Verwendung im Menschen bleibt jedoch aufgrund der schwierigen klinischen Translation eingeschränkt. Die Produktion ist kostspielig und die Sicherheitsbestimmungen erfordern eine komplexe Logistik hinsichtlich ihrer Verwendung. Zudem ist die Aufnahmefähigkeit für fremde Nukleinsäuren beschränkt und einige der viralen Vektoren bergen das Risiko der ausgeprägten immunogenen Aktivität und der insertionellen Mutagenese [51].

2.1.1.2 Nicht-virale Vektoren

Nicht-viraler Gentransfer erlaubt durch das gezielte Einbringen von Nukleinsäuren in Zielzellen eine lokale Produktion von bioaktiven Molekülen über einen begrenzten Zeitraum. Nicht-virale Genvektoren umgehen die Nachteile der viralen Vektoren, wie Immunogenität oder insertioneller Mutagenese, zudem ist Plasmid-DNA (pDNA) relativ einfach und kostengünstig herzustellen. Die klinische Verwendung des nicht-viralen Gentransfers ist allerdings aufgrund der zumeist niedrigen Transfektionseffizienz und nur kurz anhaltender Expression des Transgens *in vivo* eingeschränkt. Im Bereich der Geweberegeneration ist eine kontrollierte zeitlich begrenzte Transgenexpression jedoch durchaus erwünscht, wenn es darum geht, kurzfristig in die Differenzierung von Zellen einzugreifen, die unter natürlichen Bedingungen einem fein abgestimmten Einfluss verschiedener Mediatoren, wie Wachstumsfaktoren, Hormonen und Zytokinen unterliegt [52]. Neben der direkten Injektion von Plasmid-DNA kann man die Vielfalt der nicht-viralen Genvektoren in Lipoplexe, Polyplexe und die physikalischen Methoden der Applikation einordnen. Die durch kationische Lipide oder kationische Polymere vermittelte Transfektion

gehört zu den meist verwendeten dieser Vektorklasse [53]. Zu den physikalischen Methoden zählen der Transfer mittels Gene Gun, Elektroporation, Ultraschall [54], die hydrodynamische Genfreisetzung [22] und die Magnetofektion [55, 56]. In der Abbildung 2 sind die Vorteile und Grenzen der einzelnen Methoden übersichtlich zusammengefasst. Um optimale Transfektionsergebnisse zu erzielen, besteht ebenso die Möglichkeit verschiedene Techniken zu kombinieren.

Method	Route of Gene Delivery	Advantages	Limitations
Needle injection	Intratissue	Simplicity and safety	Low efficiency
Gene gun	Topical	Good efficiency	Tissue damage in some applications
Electroporation	Topical	High efficiency	Limited working range; need for surgical procedure for nontopical applications
	Intratissue		
Hydrodynamic delivery	Systemic	High efficiency, simplicity, effectiveness for liver gene delivery	Extremely effective in small animals; surgical procedure may be needed for localized gene delivery
	Intravascular		
Ultrasound	Topical	Good potential for site-specific gene delivery	Low efficiency in vivo
Cationic lipids	Systemic	High efficiency in vitro; low to medium high for local and systemic gene delivery	Acute immune responses; limited activity in vivo
	Topical		
	Intratissue		
Cationic polymers	Systemic	Highly effective in vitro; low to medium high for local and systemic gene delivery	Toxicity to cells; acute immune responses
	Airway		
	Topical		
	Intratissue		
Lipid/polymer hybrids	Systemic	Low to medium-high efficiency in vitro and in vivo; low toxicity	Low activity in vivo
	Airway		
	Intratissue		
	Systemic		

Abbildung 2: Vorteile und Grenzen von aktuellen nicht-viralen Genfreisetzungsmethoden. Zitiert aus Gao et al. 2007 [53].

Boussif beschrieb 1995 Polyethylenimin (PEI, s. Abb. 3) als effizientes Gentransferreagenz. Polyethylenimin ist ein organisches Makromolekül mit hoher positiver Ladungsdichte. Jedes dritte Atom ist ein protonierbares Stickstoffatom [57]. Transfermethoden mittels des Zweikomponentensystems pDNA/kationisches Helfermolekül zeigen trotz effizienter Transfektion, unkontrollierte Interaktionen und ein erhöhtes Risiko der Komplementaktivierung *in vivo* [58]. Die Ursache dieser Beobachtungen liegt in der polykationischen Natur dieser Moleküle. Diese verursacht

in vivo deutliche Aggregationsreaktionen mit negativ geladenen Gewebestandteilen (z.B. Serumproteinen) wodurch die Freisetzung an Zielzellen eingeschränkt oder sogar verhindert wird [59].

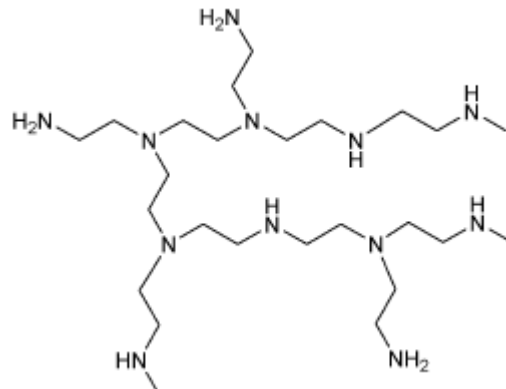


Abbildung 3: Chemische Struktur von verzweigtem Polyethylenimin. Zitiert aus Thomas et al. 2003 [60].

Der in dieser Arbeit verwendete Copolymer-geschützte Vektortyp ist eine Weiterentwicklung des Prinzips der durch kationische Polymere vermittelten Genfreisetzung.

2.1.1.3 Copolymer-geschützte Genvektoren (COPROGs)

In dieser Arbeit wurde eine neue Klasse nicht-viraler, synthetischer Genvektoren, so genannte „copolymer-protected gene vectors“ (COPROGs) [58, 61] zur Entwicklung von genaktivierten Matrices verwendet. COPROGs sind durch elektrostatische Wechselwirkungen zusammengefügt. Es handelt sich um Nanopartikel aufgebaut aus einem Kern von Plasmid-DNA komplexiert mit einem Polykation (verzweigtes Polyethylenimin) und umgeben von einem Polyethylenglykol-Copolymer. Durch die elektrostatische Interaktion der unter physiologischen Bedingungen negativ

geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäure mit den Aminogruppen des Polyethylenimins (PEI) reduziert sich die Gesamtgröße des Polyplexes erheblich im Vergleich zur durchschnittlichen Größe von Plasmid-DNA [62]. Grundsätzlich weiss man, dass die Kondensierung durch kationische Polymere die Zersetzung von DNA durch Nukleasen reduziert [63, 64]. Die große Anzahl an protonierbaren Stickstoffatomen im PEI bedingt, dass Wasserstoffatome (H^+) während der Ansäuerung des Endosoms gebunden werden. Durch das parallele Einströmen des Gegenions Chlorid (Cl^-) und Wasser ins Endosom kommt es zu einem Anstieg des osmotischen Drucks. Dies führt zum Anschwellen und schlussendlich zum Zerbersten der endosomalen Membran. Daraufhin wird der Genvektor ins Cytosol freigegeben. Dieses Phänomen bezeichnet man als „Protonenschwammeffekt“ [65] (s. Abb. 4).

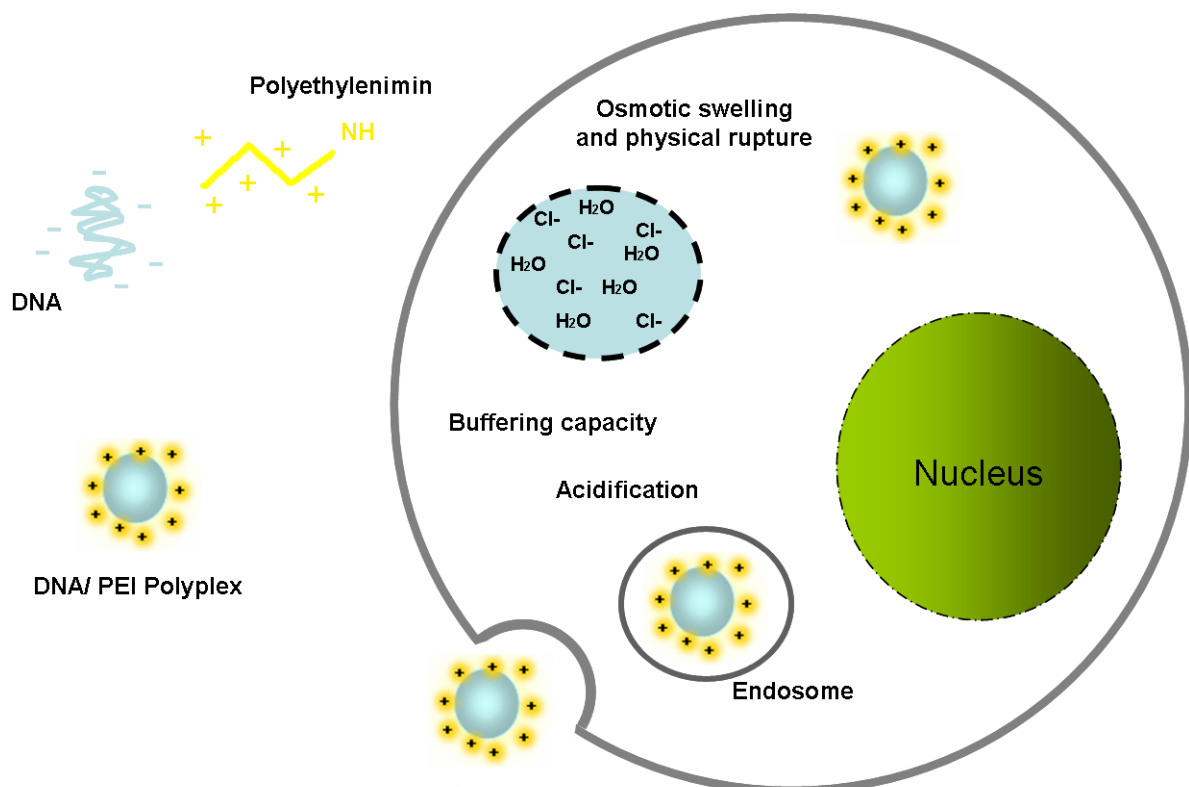


Abbildung 4: Schematische Darstellung der „Protonenschwammtheorie“.

Leider gibt es keine eindeutigen Studien, die belegen, wie sich der weitere Weg des Genvektors bis in den Zellkern und zur Transkription der DNA hin vollzieht. Vermutet wird, dass der Zusammenbruch der Kernmembran während der mitotischen Zellteilung eine Rolle spielt [66]. Um Plasmid-DNA vollständig zu komplexieren ist ein Überschuß an PEI notwendig, daraus ergibt sich eine vermehrte positive Ladungsdichte an der Oberfläche des resultierenden Partikels [67, 68]. Dieser Überschuß an positiven Ladungen führt zu einem positiven ζ -Potential und somit zu vermehrten elektrostatischen Wechselwirkungen mit negativ geladenen Zelloberflächen, bzw. Glykosylaminoglykanen [69-71], wodurch es zu einer vermehrten unspezifischen endosomal Aufnahme in die Zelle kommt. Allerdings kann dieser Umstand auch zu Wechselwirkungen der Polyplexe untereinander, oder mit Serumbestandteilen und daraus resultierender Aggregation, Inaktivierung oder Komplementaktivierung führen [58].

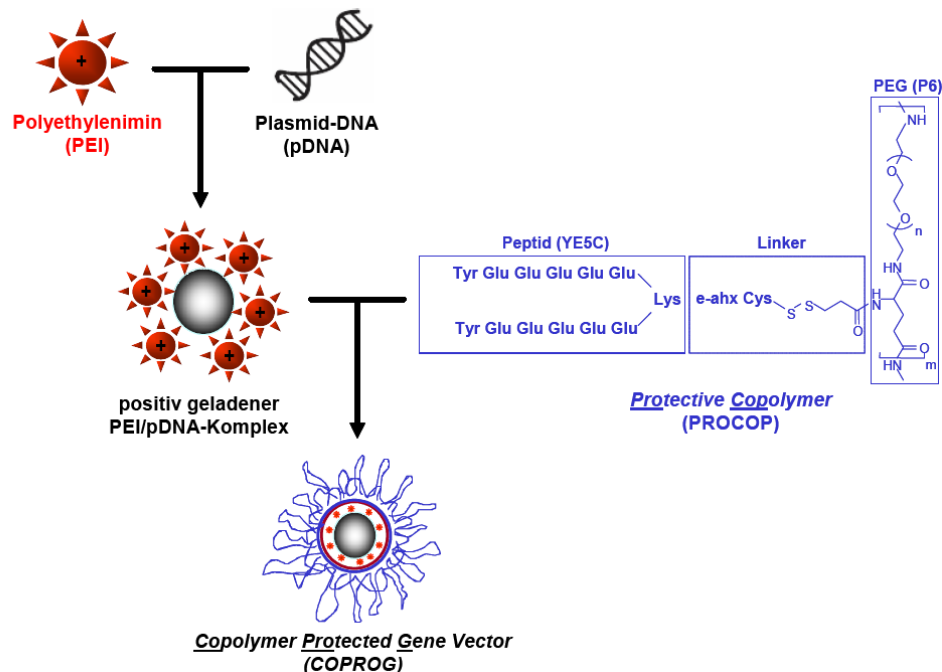


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Formulierung von „copolymer-protected gene vectors“ (COPROGs) mittels elektrostatischer Wechselwirkung zwischen positiv geladenen pDNA/PEI-Komplexen und negativ geladenem „Protective Copolymer“ (PROCOP) P6YE5C. Zitiert aus Kullmer 2006 [72].

Um diese Einschränkungen des nicht-viralen Gentransfers mit pDNA/PEI-Polyplexen zu vermindern, wurde, wie bereits beschrieben [58], ein Hüllpolymer entwickelt, welches die Vektoroberfläche gegen unerwünschte Wechselwirkungen abschirmt. Dieses Hüllpolymer besteht aus dem Peptid YE5C (Sequenz [Ac-YEEEEEE] 2-ahx-C), das über ein Linkermolekül mit einer Polyethylenglykol (PEG)-Einheit copolymerisiert ist. Über die unter physiologischen Bedingungen vorhandenen negativen Ladungen des Peptids kann sich diese Verbindung nach Zugabe zu preformierten pDNA/PEI-Polyplexen mit diesen elektrostatisch verbinden (s. Abb. 5). An der Oberfläche des resultierenden Genvektors befinden sich nun die PEG-Ketten und diese vermindern elektrostatische Interaktionen. Dieser Vektortyp wurde hinsichtlich seiner Transfektionseffizienz, Zelltoxizität, Integrität und Freisetungsverhalten ausgiebig beschrieben [52, 72]. Der hydrodynamische Radius dieser Partikel beträgt 60-120 nm und es konnte gezeigt werden, dass die Stabilität und die Reporterexpression von COPROGs gegenüber pDNA/PEI-Komplexen deutlich erhöht ist [61].

2.2 Tissue engineering und genaktivierte Matrices (GAM)

Tissue Engineering ist die Anwendung von Prinzipien und Methoden der Ingenieur-, Werkstoff- und Lebenswissenschaften zur Gewinnung eines fundamentalen Verständnisses von Struktur-Funktions-Beziehungen in normalen und pathologischen Säugergeweben und die Entwicklung von biologischem Ersatz zur Erneuerung, Bewahrung oder Verbesserung der Gewebefunktion [73]. Weltweit wurden viele Versuche unternommen, innovative Konzepte zur Therapie und Regeneration von Gewebedefekten zu entwickeln. Isolierte Zellen können die ursprüngliche Architektur des Gewebeverbandes nicht wiederherstellen, da ihnen eine Matrix fehlt, die als Leitstruktur dient. Biomaterialien wurden mit rekombinanten

Wachstumsfaktoren aktiviert und es konnte gezeigt werden, dass diese zu einer gezielten Differenzierung von Zielzellen führen können [74-77]. Die Bioverfügbarkeit von rekombinanten Proteinen ist *in vivo* durch ihre kurze Halbwertszeit begrenzt. Dies bedeutet, dass zum Erzielen eines therapeutischen Effekts lokal hohe Dosen an Wachstumsfaktoren freigesetzt werden müssen, was neben hohen Kosten und teilweise problematischer kommerzieller Verfügbarkeit das Risiko einer systemischen Toxizität birgt [78]. Mit nanobiotechnologischen Verfahren werden neue Materialien zum Tissue Engineering hergestellt, die als Träger genetischer Information die lokale Aktivierung und Differenzierung von Zellen zum Zwecke der Gewebe(re)generation bewirken können. Nukleinsäuren-transportierende Nanopartikel oder nackte Nukleinsäuren werden in die Trägermaterialien eingebracht bzw. deren Oberflächen beschichtet. Das Trägermaterial selbst bzw. die aufgebrachte Oberflächenschicht dienen als formgebende Matrix für Zellwachstum. Im Zuge der Kolonialisierung der Matrix erfolgt Nukleinsäuretransfer in die Zellen und eine lokal anhaltende Expression von Wachstumsfaktoren über einen definierten Zeitraum wird ermöglicht. In Folge wird die Entwicklung der Zellen bzw. des Zielgewebes in einer Weise gesteuert, die einen beabsichtigten therapeutischen Effekt, wie etwa verbesserte Wund-, Nerven-, Knochen- oder Knorpelheilung oder/und Neubildung von Blutgefäßen hervorruft. Das Konzept einer genaktivierten biodegradierbaren Matrix vereint den gentherapeutischen Ansatz der regenerativen Medizin mit der Idee eine kontrolliert anhaltende Freisetzung von Wachstumsfaktoren lokal im Wundgebiet zu gewährleisten, die auto- und parakrin Zielzellen stimulieren. In verschiedenen präklinischen Modellen führte dies zu vielversprechenden Ergebnissen [79, 80]. Genaktivierte Matrices finden bereits Anwendung in unterschiedlichsten therapeutischen Forschungsansätzen [80-84]. Die Matrix stellt die immobilisierten

Gene über einen definierten Zeitraum zur Verfügung, somit wird die Wahrscheinlichkeit der Zelltransfektion erhöht. Viele der verwendeten 3D Matrices weisen eine poröse Struktur auf [83, 85, 86]. Diese ermöglicht die freie Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen innerhalb des Materials und bietet somit optimale Bedingungen für das Einwachsen von Zellen und einer somit verbesserten Integration im Wundgebiet. Die Verwendung von bioabbaubaren Materialien umgeht die Notwendigkeit erneuter chirurgischer Eingriffe zur Entfernung eines Implantats nach abgeschlossener Behandlung. Diese Studie dient der Entwicklung von genaktivierten Implantaten, die zellfrei in das Wundgebiet eingesetzt werden [85] und nach Besiedelung durch Transfektion von Zellen des umgebenden Gewebes bioaktive Moleküle freisetzen, um die Geweberegeneration anzustoßen [87, 88].

2.3 Tissue Engineering von Vollhautdefekten

Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers. Sie besitzt eine Oberfläche von 1,5-2 m² und ihre Funktion beinhaltet die thermale Regulation, das Verhindern einer Dehydratation und die Abgrenzung gegen Umwelteinflüsse. Strukturell lässt sie sich in drei Schichten einteilen: Epidermis, Dermis und Subcutis. Die Epidermis ist ein mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel. Die Dermis besteht aus einem Kollagen-Netzwerk mit variierenden Anteilen an Elastin, Proteoglykanen (wie Hyaluronsäure, Dermatansulfat, Heparansulfat etc.) und Fibronectin und in ihr befinden sich Blut- und Lymphgefäße, Nerven, Talg- und Schweißdrüsen und Haarfollikel. Die Subcutis enthält subcutanes Fettgewebe, lockeres Bindegewebe und größere Blutgefäße und Nerven. Verletzungen der Haut, bei denen neben Epidermis auch Dermis und Subcutis betroffen sind, stellen aufgrund unzulänglicher Verheilungsaussichten für die regenerative Medizin und den klinischen Alltag eine

besondere Herausforderung dar. Aktuelle Therapieoptionen solcher Verletzungen sind die Verwendung von auto- oder allogener Spalthaut, aber auch von künstlichem Hautersatz [89]. Die Entwicklung solcher Matrices ist eines der Hauptthemen im Bereich der Geweberegeneration und der Biomaterialforschung [90] und manche sind bereits kommerziell verfügbar [91-93]. Obwohl die Verwendung dieser Matrices durchaus vielversprechend ist, waren klinische Resultate bisher eher enttäuschend. Es wurden viele Versuche unternommen, das regenerative Potential über eine Bioaktivierung durch die Bereitstellung zusätzlicher Eigenschaften zur strukturellen Rolle zu verbessern. In diesem Zusammenhang können Matrices als Träger genetischer Information verwendet werden und somit eine aktive Rolle in der Regeneration von Gewebe spielen. In dieser Studie dient die Matrix selbst als Struktur für Zellwachstum und Gentransfer. Zellen aus dem Wundbett besiedeln die Matrix und werden transient transfiziert, um lokal therapeutische Moleküle freizusetzen und somit die Regeneration des Gewebes voranzutreiben. Diese Technologie führte in verschiedenen präklinischen Modellen zu vielversprechenden Ergebnissen [79, 94]. Die Freisetzung von bioaktiven Molekülen durch das Besiedeln von Matrices mit Stammzellen oder genmodifizierten Zellen wurde als therapeutische Option beschrieben [95-97]. Allerdings sind solche Ansätze nur schwierig in den Klinikalltag zu integrieren. Spendermorbidity, begrenzte Verfügbarkeit und die Transmission von Erkrankungen sind Schwachpunkte dieser Ansätze [23, 24]. Die kombinierte Verwendung von Matrices und therapeutischen Vaskularisierungsstrategien ist ein rationaler Weg den Prozess der Geweberegeneration zu fördern. Eine direkte Injektion von proangiogenen Wachstumsfaktoren oder ihre Integration in Systeme mit verlangsamter Freisetzung in das Wundgebiet wurden bereits beschrieben [98]. Die nicht-virale Gentherapie

erlaubt die lokale Expression von spezifischen Wachstumsfaktoren und die Vermeidung, der im Zusammenhang mit viralen Genvektoren aufgeführten Sicherheitsbedenken. Zudem sind Herstellung, Anwendung, Kostenbilanz und regulatorische Bestimmungen weniger anspruchsvoll. Mit der Absicht die lokale Freisetzung von proangiogenen Wachstumsfaktoren im Wundbereich zu induzieren, wurde hier eine genaktivierte Kollagen Typ II Matrix mithilfe von für „vascular endothelial growth factor“ (VEGF₁₆₅) kodierenden Copolymer-geschützten Genvektoren (COPROGs) hergestellt [58, 61]. Nach subcutaner Implantation von COPROG-aktivierten Kollagen-Matrices in Ratten konnte in einer früheren Studie eine lokale Transfektion mittels eines Reportergens nachgewiesen werden [52]. In der hier beschriebenen Arbeit konnte zum ersten Mal die Funktionalität einer VEGF-COPROG-aktivierten Kollagen Matrix *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden.

„Vascular endothelial growth factor“ (VEGF)

Die Familie der „vascular endothelial growth factors“ (VEGF) umfaßt die Subtypen A-E und den „placental growth factor“ (PGF) [99]. Das in dieser Studie verwendete VEGF₁₆₅ ist eine Isoform des VEGF-A [100]. VEGF-A wird natürlicherweise von Endothelzellen, Keratinozyten, Fibroblasten, Makrophagen, Thrombozyten und Neutrophilen produziert [101-107]. VEGF-A bindet an die Tyrosin-Kinase-Oberflächen-Rezeptoren Flt-1 (VEGFR-1) und KDR (VEGFR-2) [108-110] und spielt während der Angiogenese eine Schlüsselrolle als potentes Mitogen für Endothelzellen und induziert Zellmigration, -aussprossung und -überleben der Zellen. Zudem fördert VEGF-A die Durchlässigkeit von Gefäßen und wirkt vasodilatativ [111]. Tierversuche konnten einen positiven Einfluß von VEGF-A auf die Angiogenese bei Diabetes-bedingten ischämischen Gliedmaßen nachweisen [112-

115]. Untersuchungen nach intramuskulärem Gentransfer von VEGF₁₆₅ an menschlichen Patienten mit ischämischen Ulcern oder Ruheschmerzen als Begleiterscheinung der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit ergaben eine deutliche Verbesserung der Schmerzsituation [116].

2.4 Tissue engineering von Knochendefekten

Knochen ist nach Blut eines der am meisten transplantierten Gewebe [117, 118]. Er besteht zu 60% aus anorganischer Matrix (Knochenapatit), aus etwa 30% organischer Matrix und zu 10% aus Wasser [119]. Knochenapatit ist eine carbonreiche Form des Hydroxylapatits und ist aufgrund seiner weniger kristallinen Struktur leichter löslich und somit im Zuge der Knochenhomöostase verfügbar. Der organische Teil des Knochens besteht aus Knochenzellen, wie Osteoblasten, Osteozyten, „Lining cells“ und Osteoklasten und aus der organischen Knochenmatrix, die wiederum zu ca. 95% aus Kollagen Typ I besteht. Die restlichen 5% entfallen auf nicht kollagene Proteine (Osteonectin, Osteocalcin, Sialprotein, Phosphoproteine, α_2 -Glykoproteine, Proteoglykane, Albumin) [120]. Knochengewebe unterliegt einer ständigen Remodellierung im Gleichgewicht von Knochenresorption durch Osteoklasten und Knochenbildung durch Osteoblasten, die sogenannte „basic multicellular unit“ (BMU). Durch diesen Prozeß ist Knochen in der Lage seine Struktur und Masse den mechanischen Anforderungen anzupassen und somit maximale mechanische Festigkeit bei minimaler Knochenmasse zu gewährleisten. Osteozyten reagieren auf mechanische Reize mit der Produktion von Modulatoren, die die Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten steuern und somit diese Reize in zelluläre Signale umwandeln [121, 122]. Osteocalcin (OC, = „bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein“ (BGLAP)) wird von Osteoblasten,

Odontoblasten und hypertrophen Chondrozyten produziert [123]. OC besitzt Calcium-bindende Eigenschaften [124] und dient in der biochemischen Analyse als Marker der Hypertrophie von Chondrozyten, späten osteogenen Differenzierung und Mineralisierung von Zellen [125-127]. Osteopontin (OPN) stimuliert die Migration und Anheftung von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) und stimuliert die Expression von Osteocalcin und alkalischer Phosphatase. Die Expression von OPN ist auf terminal differenzierte Chondrozyten, Osteoblasten und an der endochondralen Ossifikation beteiligte Osteoklasten beschränkt. Sobald der Prozeß der Mineralisierung beginnt, steigen OPN-Level deutlich an [128]. Ein weiterer biochemischer Analyseparameter ist die Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP). Sie ist ein membrangebundenes Enzym, das die Hydrolyse von Pyrophosphat katalysiert. Dabei entsteht Phosphat, welches nun für die Synthese von Hydroxylapatit innerhalb des Mineralisierungsprozesses zur Verfügung steht. Es existieren verschiedene Unterformen, von denen die „tissue-nonspecific AP“ (TNAP) an den Zell- und Matrixvesikelmembranen von hypertrophierenden Chondrozyten, Osteoblasten und Odontoblasten zu finden ist [129]. Matrixvesikel sind Phospholipid-Ausknospungen an Plasmamembranen von mineralisierenden Zellen [130]. Die Knochenbildung kann grob in die beiden Kategorien der desmalen und chondralen Ossifikation eingeteilt werden. Desmale Ossifikation umschreibt die direkte Bildung von Osteoblasten aus mesenchymalen Vorläuferzellen. Sie tritt bei der Bildung von Schädel- und Schlüsselbeinknochen auf [131]. Die meisten anderen Knochen entstehen durch chondrale Ossifikation. Hier entsteht die Knochenmatrix aus hyalinem Knorpel. Man unterscheidet die Proliferations-, Resorptions- und Verknöcherungszone. Die Proliferationszone ist gekennzeichnet durch die Proliferation von Chondrozyten und die Bildung von Säulenknorpel. Aggrecan ist das

vorrangige Proteoglykan in reifem Knorpel [132]. In der Resorptionszone kommt es zur Kalzifizierung des Knorpels, und in der Verknöcherungszone werden abgestorbene Knorpelzellen abgebaut und es entstehen Knorpelhöhlen, in die Blutkapillaren einsprießen und undifferenzierte Zellen einwachsen, die anschließend zu Osteoblasten differenzieren und Osteoid abscheiden [120] (s. Abb. 6).

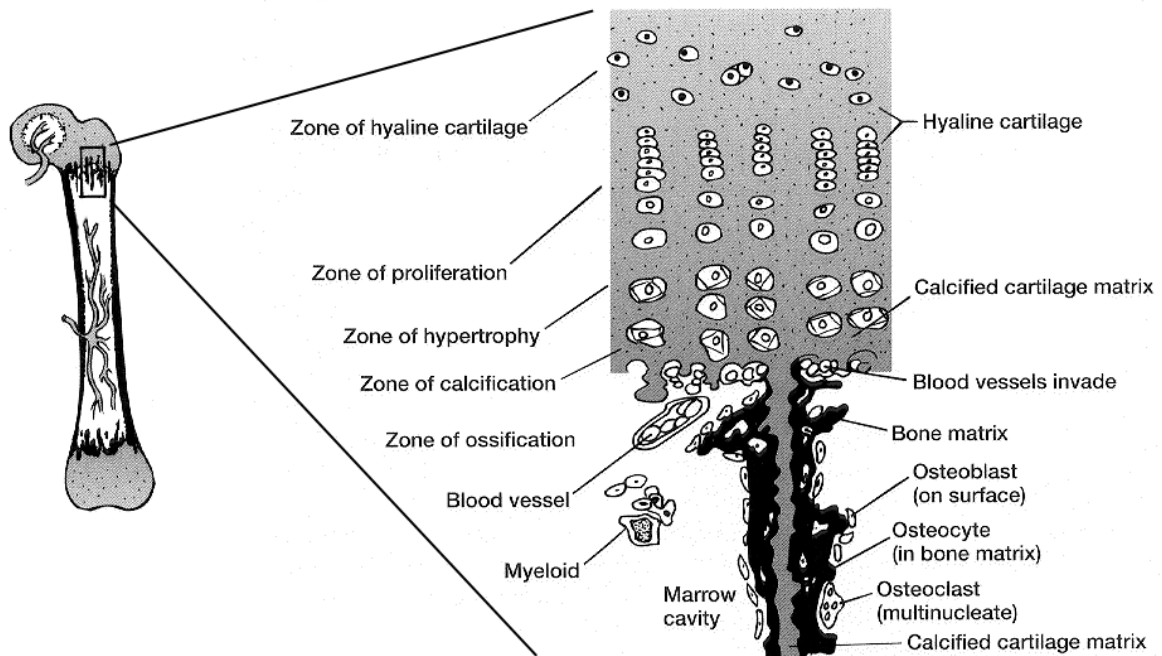


Abbildung 6: Chondrale Ossifikation. Zitiert aus Yetimoglu 2007 [133].

Beide Fälle der Knochenbildung resultieren vorerst in unreifen Faser- und Geflechtknochen (primäre Ossifikation), die erst nach mechanischer Beanspruchung durch reifen Lamellenknochen ersetzt werden (sekundäre Ossifikation) [134].

Knochenfrakturheilung

Knochen ist im Gegensatz zu vielen anderen Geweben in der Lage, organotypisch zu regenerieren, d.h. dass Defekte ohne die Entwicklung von minderwertigem Narbengewebe durch neues Knochengewebe ersetzt werden können. Die lokale

Steuerung dieses Prozesses ist komplex und beruht auf vielfältigen räumlich und zeitlich begrenzten Interaktionen von Knochenzellen mit extrazellulärer Matrix (ECM), Hormonen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen.

<i>Fibroblast growth factor (FGF-1 and -2)</i>	
<u>Source</u>	<u>Responding cells</u>
Inflammatory cells (macrophages)	Mitogenic effects on mesenchymal cells chondrocytes and osteoblasts
Mesenchymal cells	Angiogenic actions
Chondrocytes	FGF-1, primarily mitogenic to chondrocytes
Osteoblasts	FGF-2, possible involvement in chondrocyte maturation
<i>Platelet-derived growth factor (PDGF-AA, -AB, -BB)</i>	
<u>Source</u>	<u>Responding cells</u>
Degranulating platelets	Macrophage chemotaxis
Monocytes and macrophages	Mesenchymal cell chemotaxis
Hypertrophic chondrocytes (PDGF-A)	Mesenchymal cell proliferation
Osteoblasts (PDGF-B)	
<i>Transforming growth factor-β (TGFβ-1 and -2)</i>	
<u>Source</u>	<u>Responding cells</u>
Degranulating platelets	Pleiotropic factor
Bone extracellular matrix	Osteoprogenitor cell proliferation
Inflammatory cells	Stimulates undifferentiated mesenchymal cell and chondrocyte proliferation
Chondrocytes	
Osteoblasts	Stimulates extracellular matrix production
<i>Bone morphogenetic protein (BMP-2, -3, -4, and -7)</i>	
<u>Source</u>	<u>Responding cells</u>
Bone extracellular matrix	Activation of cortical osteoblasts
Osteoblasts and osteoprogenitors	Initiates differentiation of osteoprogenitor cells into osteoblasts
	Promotes differentiation of mesenchymal cells into chondrocytes

Abbildung 7: Die Rolle von Wachstumsfaktoren in der Regulation der Knochenfrakturheilung. Zitiert aus Barnes et al. 1999 [135].

In einer anfänglichen Entzündungsreaktion moderieren vornehmlich Wachstumsfaktoren, wie „platelet derived growth factor“ (PDGF), „transforming growth factor- β “ (TGF- β) und Zytokine, wie Interleukin-1 und -6 (Il-1, Il-6) das Geschehen [136, 137]. Darrauffolgend spielen lokale Botenstoffe, wie „fibroblast growth factors“(FGFs) und „bone morphogenetic proteins“ (BMPs) eine besondere Rolle (s. Abb. 7) [135]. Eine traumatische Knochenverletzung führt zur Hämatombildung, wodurch Entzündungszellen, Makrophagen und Thrombozyten aber auch pluripotente mesenchymale Stammzellen in das Wundgebiet gelangen. In

dieser unmittelbaren Verletzungssituation (s. Abb. 8; Phase 1) entsteht das faserarme, zell- und gefäßreiche Granulationsgewebe. Im Anschluss wird neues Knochengewebe unter der Knochenhaut (Periost, s. Abb. 8) direkt von Osteoblasten gebildet (periostale Ossifikation, s. Abb. 8; Phase 2). Angrenzend daran wird aus mesenchymalen Vorläuferzellen, die sich im Granulationsgewebe befinden, solange Knorpelgewebe gebildet, bis das gesamte Granulationsgewebe ersetzt ist (s. Abb. 8; Phase 3). Schließlich hypertrophieren die Chondrozyten im subperiostalen Bereich und die umliegende Knorpelmatrix kalzifiziert. Mit dem Einspiessen von Blutgefäßen aus dem Knochengewebe wandern Osteoblasten ein, die Osteoid bilden. Dieser Prozess ist erst abgeschlossen, wenn der gesamte Knorpel durch Knochen ersetzt ist (s. Abb. 8; Phase 4) [120].

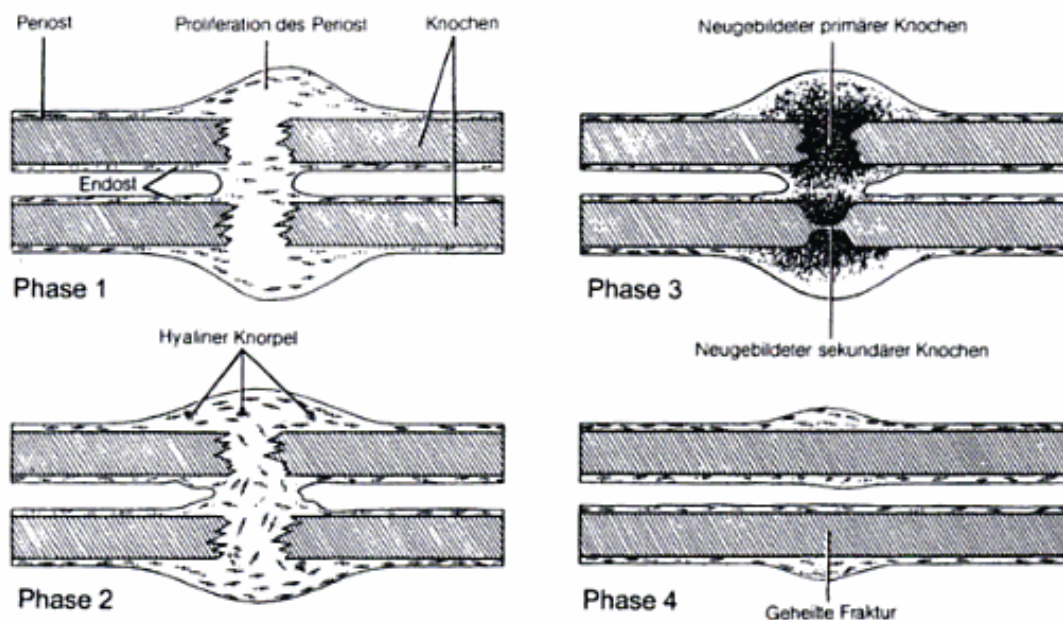


Abbildung 8: Schematische Darstellung einer Knochenfrakturheilung. Zitiert aus Wintermantel 2009 [120].

Die einwachsenden Blutgefäße sind mit Endothelzellen ausgekleidet, die wiederum während dieser Prozesse eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren ausschütten, die

aktiv an der Kontrolle von Rekrutierung, Differenzierung und Überleben von Osteoblasten beteiligt sind [138]. Im Zuge des natürlichen Knochenumbaus wird nun die neugebildete Knochenmatrix remodelliert und die Fraktur heilt mit der typischen Knochenarchitektur aus. In einigen Fällen wird die spontane Frakturheilung jedoch behindert, wenn beispielsweise der Defekt zu groß ist oder die Funktion des umliegenden Weichteilgewebes durch Infektionen oder Bestrahlungen beeinträchtigt ist. Neben den persönlichen Einschränkungen der Patienten führen nicht spontan heilende Knochenfrakturen zu enormen ökonomischen Folgen für das Gesundheitssystem, da meist eine Vielzahl von therapeutischen Interventionen und wiederholte Krankenhausaufenthalte notwendig sind [139, 140].

„Bone morphogenetic protein–2“ (BMP-2)

„Bone morphogenetic proteins“ (BMPs) sind multifunktionelle Proteine und gehören zur „transforming growth factor- β “ (TGF- β) Superfamilie. 1965 entdeckte Urist die Aktivität der BMPs und ihre Fähigkeit ektopisches Knochenwachstum zu initiieren [141]. In den 1980er Jahren wurden erstmals BMP-2 und BMP-4 rekombinant hergestellt [142]. Bis heute sind etwa 20 BMP-Subtypen bekannt. BMPs vermitteln ihre Aktivität mittels Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren [143] und spielen eine Schlüsselrolle in der embryonalen Entwicklung und der Regeneration von Knorpel und Knochen [144]. Auch wenn das detaillierte Zusammenspiel der einzelnen BMPs während der chondralen Ossifikation noch nicht abschließend geklärt ist, geht man davon aus, dass verschiedene BMP-Subtypen gemeinsam für eine adäquate Aktivität im Frakturgebiet verantwortlich sind [145]. BMPs vermitteln Chondrogenese als Vorstufe zur Bildung von Knochen [146] und sind involviert in die Stimulation der Proliferation und Hypertrophie von Chondrozyten [134, 147-149]. BMP-2 kommt in

der postnatalen Skeletthomöostase eine Schlüsselrolle unter anderen osteogenen BMPs zu [150, 151]. Es reguliert den fortschreitenden Ersatz von Knorpel durch mineralisierten Knochen während der endochondralen Ossifikation in der Reihenfolge Hypertrophie und Reifung von Chondrozyten, Vaskularisierung, Proliferation und Infiltration von Knochenvorläuferzellen und Differenzierung zu ausgereiften Osteoblasten, die in der Lage sind, ihre volle Funktion innerhalb der Knochenregeneration auszuüben [152-157]. Das osteoinduktive Potential von lokal freigesetzten BMPs, sowie die Fähigkeit ektopische Knochenformation über endochondrale Ossifikation anzuregen, wurden in Tierversuchen und klinischen Studien belegt [158-168]. Für eine adäquate Knochenfrakturheilung ist BMP-2 unabdingbar [150].

Knochenersatzmaterialien

Der Goldstandard zur Behandlung von Knochendefekten, die nicht, nur langsam oder insuffizient spontan heilen ist die autologe Transplantation von Kortikalis und Spongiosa aus dem Beckenkamm [166, 169]. Der Vorteil dieser Methode ist die gleichzeitige Bereitstellung von osteoinduktiven Wachstumsfaktoren, knochenbildenden Zellen und einer osteokonduktiven Matrix. Die wesentlichen Nachteile dieser Methode sind die begrenzte Verfügbarkeit des Materials und die Spendermorbidity. Die Verwendung von allogenen Material birgt zudem ein erhöhtes Risiko bezüglich der Transmission von Erkrankungen [24]. Eine Alternative hierzu stellt die Verwendung von künstlichem Knochenersatz dar. Ein optimales Knochenersatzmaterial sollte, neben guter Integrität im Wundgebiet, drei Grundeigenschaften besitzen: Osteogenizität, Osteoinduktivität und Osteokonduktivität [170]. Als osteogen bezeichnet man Materialien, die noch lebende

Vorläuferzellen enthalten, deren Fähigkeit, in knochenbildende Zellen zu differenzieren, erhalten ist [169]. Dies ist bei manchen Auto- und Allografts der Fall. Osteoinduktion beschreibt die Stimulation der Aktivierung von Vorläuferzellen und deren Differenzierung zu Knochenzellen, die durch ein fein abgestimmtes Zusammenspiel verschiedener bioaktiver Moleküle, wie Wachstumsfaktoren und Zytokinen bewerkstelligt wird. Eine besondere Rolle nehmen dabei die Proteine der TGF- β Superfamilie ein [171]. Die Bereitstellung einer Leitstruktur (Matrix), entlang der sich neues Gewebe bilden kann, bezeichnet man als Osteokonduktion [169]. Die meist verwendeten Biomaterialien zum Tissue Engineering von Knochen sind demineralisierter Knochen (DBM) [172] und Kollagen [173]. Klinische Ergebnisse zur Verwendung von DBM sind uneinheitlich und seine Anwendung beschränkt sich vielmehr auf ein Hilfsmittel zur Volumenvergrößerung bei der Verwendung von auto- oder allogenen Knochen, als auf seinen Ersatz [169]. Sowohl Kollagen, als auch synthetische Materialien, wie Calcium-Phosphat-Keramiken (Tricalciumphosphat TCP, Hydroxylapatit HA) oder Polymere werden meist in Kombination mit osteoinduktiven Biomolekülen verwendet [169]. Verschiedene Forschergruppen konzentrieren sich auf die Aktivierung von Biomaterialien in der Kombination mit rekombinanten BMPs [174-177]. Die Halbwertszeit von rekombinantem BMP beträgt etwa 20-30 Minuten [144]. In Relation zur Dauer einer adäquaten Ausheilung von Knochendefekten (Wochen bis Monate) [178], erscheint dieser Ansatz jedoch nur begrenzt einsatzfähig. Eine weitere Knochenersatzmaterialgruppe stellen Komposite dar. In ihnen werden synthetische osteokonduktive Matrices mit osteoinduktiven Faktoren versehen und mit osteogenen Zellen kombiniert [169]. Hier scheinen die Nachteile, die mit der Verwendung von Autografts einhergehen, reduziert, jedoch bleibt, wie bereits beschrieben, durch die Verwendung von auto- bzw. allogenen

Zellmaterial ein Restrisiko und zudem Mehraufwand bei klinischer Anwendung. Zusammenfassend kann man sagen, dass die heutigen Möglichkeiten im Bereich der Knochenersatzmaterialien noch nicht zufriedenstellend sind und es weiterer innovativer Konzepte zur funktionalen Regeneration von Knochengewebe bedarf.

2.4.1 Genaktivierte COPROG-PDLLA-Implantatoberflächen

In dieser Studie wird am Beispiel eines kommerziell erworbenen Poly-(ϵ -caprolacton) (PCL) Bioimplantates das Verfahren der Generierung von bioaktiven Oberflächen mittels genaktivierten Poly-D,L-Lactid (PDLLA)-Oberflächenbeschichtungen beschrieben. Das gesamte Implantat ist biokompatibel und wird vollständig verstoffwechselt. PDLLA und PCL sind biodegradierbare, aliphatische Polyester, die *in vivo* und *in vitro* vorrangig der hydrolytischen Degradation unterliegen. Die Dauer der vollständigen Zersetzung beträgt im Fall von PCL, je nach Konstruktaufbau 2-4 Jahre [120, 179, 180], der Abbau von PDLLA dauert je nach molarer Masse und Schichtdicke bis zu 16 Monate [179-181]. Das hier verwendete PCL-Implantatmaterial (Osteomesh™) wurde mittels „fused deposition modeling“ (FDM) hergestellt und verfügt über ein interkonnektives Porennetzwerk, Biokompatibilität und –abbaubarkeit und über die für Knochenersatzmaterialien wichtigen mechanischen Stabilität [182, 183]. Das Ziel dieser Untersuchung ist es, durch die kontrollierte Freisetzung von osteoinduktiven Molekülen, wie BMP-2 eine osteogene Differenzierung von Zielzellen und somit Knochenheilung anzustossen, um damit langfristig die Integration des Implantates im Wundgebiet zu verbessern.

2.4.2 Entwicklung einer dualen genaktivierten Matrix

Knochen ist ein vaskularisiertes Gewebe. Hier kommt es nicht alleine auf die Stimulation der osteogenen Differenzierung an, sondern beispielsweise auch auf die Gewährleistung der nutritiven Versorgung des neu entstehenden Gewebes. Hierzu bedarf es der Blutgefäße, deren Ausprossung u.a. durch das Einwirken von VEGF vorangetrieben wird [184]. Obwohl dieser proangiogene Effekt als primäre Wirkung von VEGF angesehen wird, gibt es Anhaltspunkte, die ein Mitwirken von VEGF in der Rekrutierung und Aktivierung von knochenbildenden Zellen belegen [166, 185-187]. Die zeitlich versetzte Bereitstellung von VEGF und anderen Wachstumsfaktoren, wie BMP-2 erscheint vor diesem Hintergrund durchaus sinnvoll, um die synergistischen Effekte zur Regeneration von voll funktionstüchtigem vaskularisiertem Knochen zu nutzen. In dieser Studie wird eine Kollagen Typ I Matrix mit Genvektoren, die für ein Reporterprotein (Metridia Luciferase) kodieren, wässrig beladen und darauffolgend lyophilisiert. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass sich eine solche Matrix als Träger von COPROGs mit verzögerter Freisetzungskinetik eignet. Innerhalb der ersten 3 Tage wurden nur etwa 27 % der aufgetragenen COPROG-Menge, gefolgt von einer exponentiellen Freisetzungsphase über mehrere Wochen, abgegeben [52]. In dem hier beschriebenen Experiment, wurde die Oberfläche der Kollagen Typ I Matrix mit einer PDLLA-Lösung in Ethylacetat überzogen, in der Genvektoren kodierend für ein zweites Reporterprotein (Secreted Alkaline Phosphatase (SEAP)) suspendiert sind. Nach Verdampfen des organischen Lösungsmittels (Ethylacetat) entsteht eine stabile Polylactidschicht an der Oberfläche der Matrix. Plasmid-DNA ist während der Lyophilisation und Dispersion in Ethylacetat nachweislich stabil [72]. Das hier untersuchte Konzept bietet die Möglichkeit, Materialien zu entwickeln, die in der Lage sind, unter räumlicher und zeitlicher

Kontrolle Genvektoren freizusetzen und die gewünschten therapeutischen Proteine zur Expression zu bringen. Die degradierbaren Biomaterialien Kollagen Typ I und PDLLA unterscheiden sich bezüglich ihrer Abbaukinetik [120, 181]. Kollagen Typ I ist die organische Grundsubstanz von Knochengewebe und findet in der Herstellung heutiger kommerziell verfügbarer Knochenersatzmaterialien weitverbreitete Anwendung. Der vollständige Abbau der hier verwendeten Kollagen Typ I Matrix (Tachotop®) dauert *in vivo* mindestens 6 Wochen [188].

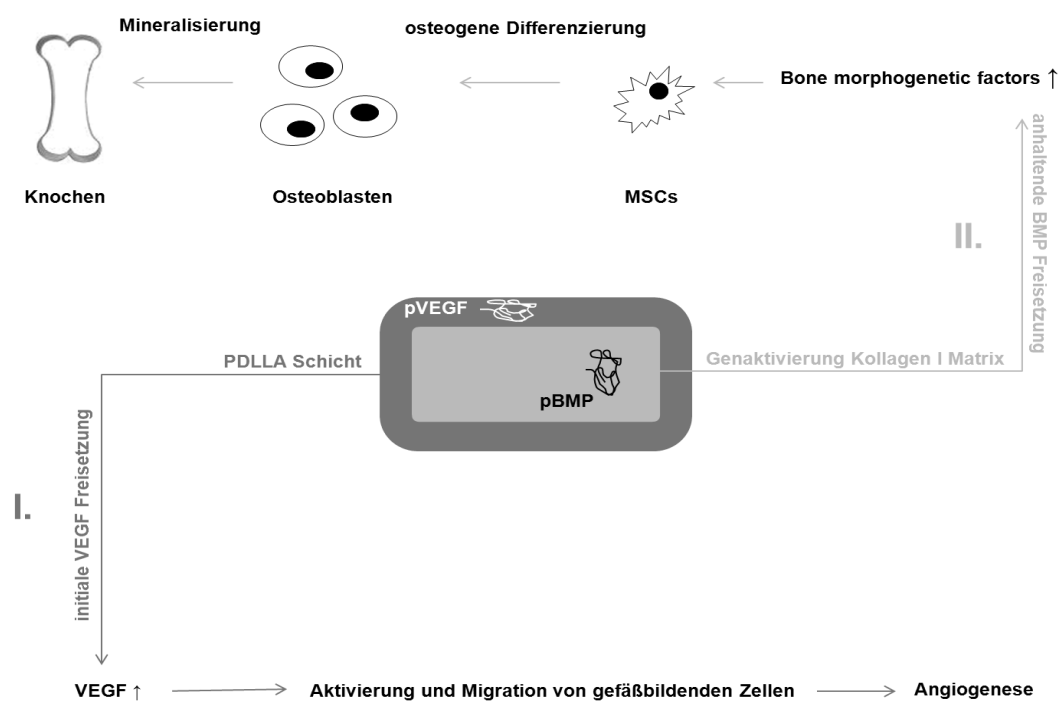


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Ansatzes einer dualen genaktivierten Matrix. Eine Kollagenmatrix wird mit einer wässrigen COPROG-Lösung kodierend für ein oder mehrere BMPs beladen und darauffolgend mit einer COPROG-PDLLA-Schicht kodierend für VEGF versehen. Nach der Besiedelung durch Zellen erfolgt eine initial erhöhte Produktion von proangiogenem VEGF und im weiteren Zeitverlauf eine anhaltende Produktion von osteoinduktivem BMP mit der Absicht die Regeneration von vaskularisiertem Knochengewebe anzustoßen.

Nach Besiedelung der dualen genaktivierten Matrix durch Zellen sollen diese zuerst die Genvektoren aus der PDLLA-Schicht aufnehmen und das entsprechende Protein zur Expression bringen. Da es sich bei PDLLA um ein degradierbares Polymer handelt, wird im Weiteren angenommen, dass nach Abbau dieser Schicht Zellen die

Kollagen Matrix besiedeln und nun die darauf immobilisierten Genvektoren aufnehmen und das dort codierte Protein exprimieren. Zu erwarten ist demnach eine Expressionskinetik mit initial hoher SEAP-Expression durch den im PDLLA suspendierten Reportervektor und eine später einsetzende anhaltende Metridia Luciferase Expression durch die verzögerte Aufnahme des zweiten Reportergens. Der Grundgedanke dieses Vorhabens ist die Idee, die beiden bereits vorangehend etablierten Technologien in einem Implantat zu kombinieren, so dass dieses in der Lage ist, im Wundgebiet beispielsweise proangiogene und osteogene Proteine zeitlich versetzt zur Verfügung zu stellen (s. Abb. 9). Durch eine frühzeitig hohe Produktion von proangiogenen Faktoren könnte das Einsprießen von Blutgefäßen ins Wundgebiet gefördert werden. Im Anschluss würde eine verzögerte und länger anhaltende Produktion von osteoinduktiven Wachstumsfaktoren die osteogene Differenzierung von Vorläuferzellen und synergistisch der Aufbau einer voll funktionstüchtigen Knochenmatrix anstoßen.

2.5 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung und Beschreibung einer neuen Klasse eines nicht-viralen Vektortyps, so genannter Copolymer-geschützter Genvektoren, zur Genaktivierung von implantierbaren, bioabbaubaren Materialien. Technologisch betrachtet ist diese Arbeit in vier Ansätze unterteilt:

- I. Genvektoren werden in wässriger Lösung gleichmäßig in porösen Biomaterialien verteilt und durch anschließende Lyophilisierung immobilisiert.
- II. Genaktivierte Materialoberflächen werden durch eine COPROG-PDLLA-Beschichtung erzeugt.
- III. Diese beiden Technologien werden im Anschluss daraufhin untersucht, ob durch ihre Kombination in einem Implantat eine zeitlich und räumlich versetzte Freisetzung unterschiedlicher Proteine erreicht werden kann.
- IV. Genaktivierte Matrices werden hinsichtlich ihrer Eigenschaften als Arzneistoff-freisetzendes System („drug delivery system“) und ihres therapeutischen Potentials in der Geweberegeneration untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Plasmid-DNA

Es wurden unterschiedliche eukaryotische Expressionsplasmide für die Genexpressionsanalysen verwendet. Die Plasmid-DNA pMetLuccontrol codiert für das sezernierte Protein Metridia Luciferase und wurde von Clontech Laboratories (CA, USA) bezogen. Das Plasmid pVF1164 kodierend für hVEGF₁₆₅ wurde freundlicherweise von Gene Medicine Inc. (Woodland, USA) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid pBMP2-Bullet kodierend für BMP-2 wurde freundlicherweise von Dr. Martina Anton zur Verfügung gestellt. Alle verwendeten Plasmide stehen unter der Kontrolle eines Cytomegalovirus (CMV) Promoters.

3.1.1 Klonierungen der Plasmide pSEAP und pMetLucDel

Die neu klonierten Plasmide (pSEAP und pMetLucDel) und pMetLuccontrol wurden durch PlasmidFactory GmbH & Co. (Bielefeld, Germany) amplifiziert und aufgereinigt. Das Gen für „secreted alkaline phosphatase“ (SEAP) wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ausgehend von pSEAP2control (Clontech Laboratories, CA, USA) amplifiziert und im Anschluss in das Plasmid Rückgrat von pMetLuccontrol eingefügt (s. Abb. 10). Diese Klonierungsarbeit soll gewährleisten, dass sich Unterschiede im Expressionsmuster der beiden parallel in einem Versuch beobachteten Reporterplasmide (pSEAP, pMetLuccontrol) auf den Versuchsaufbau beziehen und strukturelle Differenzen zwischen den Plasmiden weitestgehend ausgeschlossen werden können. Das Kontroll-Leerplasmid pMetLucDel wurde durch die Restriktion der kodierenden Sequenz von pMetLuccontrol durch die Enzyme NheI und HincII (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) und anschließende Religation kloniert. Es dient als Vektorkontrolle, um sicherzustellen, dass funktionelle Effekte *in*

in vivo auf die Genexpression zurückzuführen sind und nicht eine Folge von unspezifischen Reaktionen auf den Vektortyp sind

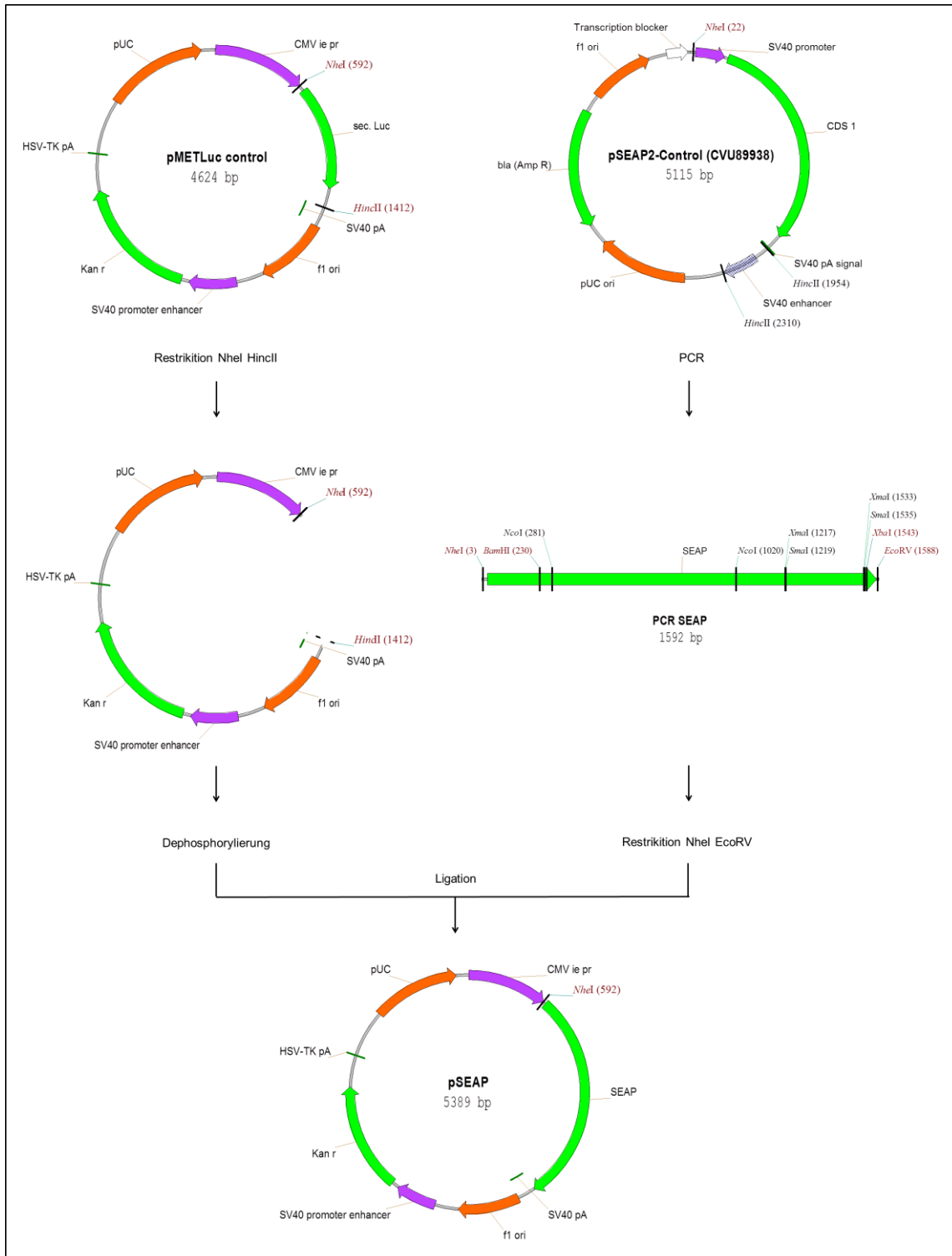


Abbildung 10: schematische Darstellung der Klonierungsstrategie von pSEAP. Das Gen für Secreted Alkaline Phosphatase (SEAP) wurde mittels Polymerase Ketten Reaktion (PCR) ausgehend von pSEAP2control amplifiziert und im Anschluss in das Plasmid Rückgrat von pMetLuccontrol eingefügt.

Polymerase Ketten Reaktion zur Amplifizierung der cDNA von SEAP
1: Primersequenzen

	Primersequenz
Primer forward	5'TGCTAGCTTATTCGCCCACCATGCTGC3'
Primer reverse	5'CGGATATCGTTATCATGTCTGCTCGAAG3'

2: PCR-Reaktionsansatz

Reagenz	verwendetes Volumen
H ₂ O steril	36 µl (für Kontrolle ohne DNA 37 µl)
10x Taq Puffer – MgCl ₂	5 µl
MgCl ₂ 25 mM	3 µl
dNTPs 10 mM	2 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
pSEAP2control (100ng/µl)	1 µl
Taq Polymerase (5u/µl)	1 µl

3: Temperaturprogramm

Segment	#Zyklen	T[C°]	Dauer
Phase 1 <i>initiale Denaturierung</i>	1	94	1 min
Phase 2 <i>Amplifizierung</i>	30	94	45 sec
<i>Annealing</i>		50	45 sec
<i>Elongation</i>		72	2 min
		72	10 min
Phase 3 <i>Extension</i>	1	4	über Nacht

Tabelle 1-3: Polymerase-Ketten-Reaktion zur Amplifizierung von SEAP. Tabelle 1 zeigt die verwendeten Primer Sequenzen. Der Reaktionsansatz (Tabelle 2) wurde in einen Thermocycler überführt und anhand des dargestellten Temperaturprogramms (Tabelle 3) inkubiert.

Die kodierende Sequenz für SEAP wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (s. Abb. 10 und Tab. 2 und 3) ausgehend vom Plasmid pSEAP2control (Clontech Laboratories, CA, USA) mit den in Tabelle 1 dargestellten Primern (Apara Bioscience, Denzlingen, Deutschland) mit Hilfe eines Thermocyclers (Mastercycler®, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) amplifiziert und darauffolgend mit den Restriktionsenzymen NheI und EcoRV verdaut. Alle hier verwendeten und nicht anderweitig deklarierten Reagenzien und Puffer wurden von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) bezogen.

Restriktionsverdau von pMetLuccontrol

Um die kodierende Sequenz für das Protein Metridia Luciferase aus dem Plasmidrückgrat von pMetLuccontrol herauszuschneiden, wurden die Restriktionsenzyme NheI und HincII verwendet (je 10 Enzymeinheiten, 60 min bei 37°C). Im Anschluss wurde das Restriktionsprodukt in zwei Ansätze aufgeteilt. Reaktionsansatz Nr. 1 (10µl Gesamtvolumen) wurde mittels alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) dephosphoryliert (30 min bei 37°C), um eine Rezirkularisierung der linearisierten DNA zu verhindern. Dem Reaktionsansatz 2 (10µl Gesamtvolumen) wurden 0,5 µl 2mM dNTP (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) und 5 Enzymeinheiten Klenow (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) zugesetzt, um die entstandenen sticky ends aufzufüllen (90 min bei 37°C). Anschliessend wurden die Enzyme hitzeinaktiviert (20 min bei 65°C).

Ligation (pSEAP) und Religation (pMetLucDel) der Plasmide

Die Ligation (pSEAP) und Religation (pMetLucDel) der DNA Fragmente erfolgte mit T4-DNA-Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) und wurde entsprechend der Tabelle 4 angesetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

	Ligation	Kontrolle I	Kontrolle IIa	Religation	Kontrolle IIb
Insert [μ l]	5	-	-	-	-
Vektor [μ l]	5	5	5	5	5
Ligase-Puffer [μ l]	4	4	4	4	4
T4-Ligase [μ l]	1	1	-	1	-
H ₂ O [μ l]	5	10	11	10	11

Tabelle 4: Ligation von pSEAP und Religation von pMetLucDel. Die Ansätze zur Ligation und Religation, sowie die Religationskontrolle (I) und die Ligasekontrollen (IIa, IIb) wurden entsprechend dieser Abbildung angesetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Transformation der Plasmide in DH10B kompetenten E.coli

MAX Efficiency® DH10B™ kompetente Zellen (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) wurden auf Eis aufgetaut. 10 μ l Ligationsansatz, bzw. 10 ng supercoiled DNA wurden zugesetzt und vorsichtig gemischt (15 min auf Eis inkubieren). Ein Hitzeschock (90 sec bei 42°C) dient der Öffnung der Membranporen und der Aufnahme der DNA in die Zellen. Dann wurde 1 ml LB Medium zugegeben und für 60 min unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. 30 μ l des Reaktionsansatzes wurden auf kanamycinhaltige (50 μ g/ml) Agar Platten ausgestrichen und diese wurden kopfüber über Nacht bei 37°C inkubiert. 2 ml LB Medium (50 μ g Kanamycin/ml) wurden mit 6 ausgewählten Klonen beimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator (Certomat® BS-T, Sartorius, Göttingen, Deutschland) belassen. Im Anschluss wurde nach Herstellerangaben eine DNA-Minipreparation (Plasmid Mini Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt und nach einem Kontrollverdau wurde ein geeigneter

Klon für die Maxipreparation (Plasmid Maxi Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) der Plasmid-DNA ausgewählt. Das Prinzip der Quiagen DNA-Maxipreparation beruht auf einer alkalischen Bakterienlyse und der Isolierung und Aufreinigung der Plasmid-DNA über Anionen-Austauscher-Säulen.

Kontrollverdau der Plasmide

Um die Qualität der in dieser Arbeit klonierten Plasmide zu überprüfen, wurden diese mit insgesamt 4 Restriktionsenzymen (SspI, SmaI, BamHI, NcoI) in einzelnen Ansätzen, bestehend aus 1 µg pDNA, 10 Einheiten Restriktionsenzym, Puffer, BSA (nur bei BamHI-Ansatz) und Aqua_{dest.} mit einem Gesamtvolumen von 20 µl, verdaut (60 min bei 37°C/ außer SmaI-Ansatz: 60 min bei 25 °C). Nach 30 min wird allen Ansätzen 50 ng RNase (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) zugegeben und für die restlichen 30 min mitverdaut, um eine Verunreinigung der Probe mit RNA zu vermeiden.

Gelelektrophorese

Hier wurden Gele aus 1% Agarose (peqGold Universal, PEQLAB Biotechnologie) in TRIS-Borat-EDTA-Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Gelelektrophorese wurde für ca. 60 min bei 80V durchgeführt. Als Referenz diente 1 kb DNA-Marker (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland).

3.2 Synthese des Schutzpolymers P6YE5C

Das Schutzpolymer P6YE5C wurde nach Finsinger et al. [58] synthetisiert und aufgereinigt. Die schematische Synthese ist in der Abbildung 11 gezeigt.

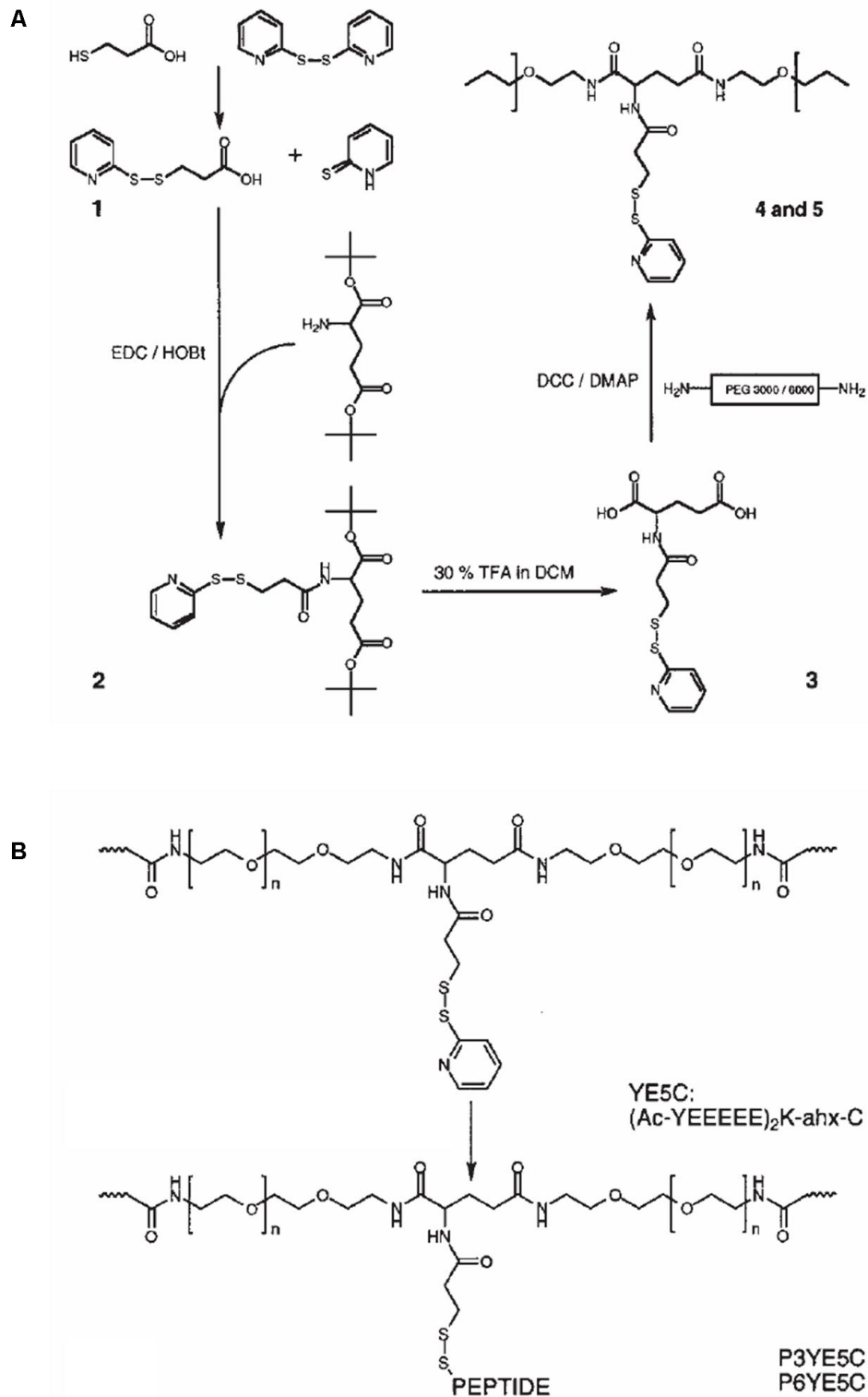


Abbildung 11: Copolymer-geschützte Genevektoren. (A) 3-(2'-thiopyridyl)-mercaptopropionyl-glutaminsäure (3) wird in einer Carbodiimid-aktivierenden Verknüpfungsreaktion aus t-Butyl-geschützter Glutaminsäure und 3-(2'-thio-pyridyl)-mercaptopropionsäure gewonnen (1). Nach der Abspaltung der Schutzgruppe wird das Produkt (3) mit Diamino-Polyethylenglykol (PEG) durch Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)-Aktivierung *in situ* copolymerisiert. (B) Das gereinigte thiol-reaktive Polymer-Rückgrat wird mit dem negativ geladenen Cystein-haltigen Peptid (YE5C, Sequenz (Ac-YEEEE)₂K-ahx-C, ahx = □6-Aminohexansäure, Ac = □Acetyl) umgesetzt. Abbildung nach Finsinger et al. [58]

P6YE5C verfügt über eine Peptidseitenkette mit einem anionischen Aminosäureteil (YE5C), die mittels Spacers mit dem Polyethylenglykol (PEG)-Rückgrat verknüpft ist. Das Reaktionsprodukt wurde gegen Wasser dialysiert und für die Formulierung von Genvektoren eingesetzt. COPROGs wurden verwendet, um genaktivierte Matrices herzustellen [52].

3.3 Formulierung der geschützten Genvektoren

Verzweigtes Polyethylenimin mit einem mittleren Molekulargewicht von 25 kDa (PEI 25, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) wurde in Wasser gelöst, mit konzentrierter Salzsäure neutralisiert, gegen Wasser dialysiert und nach Sterilfiltration mit einer Konzentration von 10 mg/ml verwendet. Zur Herstellung der geschützten Genvektoren wurde jede der drei Komponenten - Plasmid-DNA, verzweigtes Polyethylenimin (PEI br 25kD) und P6YE5C - jeweils in der vorgesehenen Verdünnung in Wasser vorbereitet.

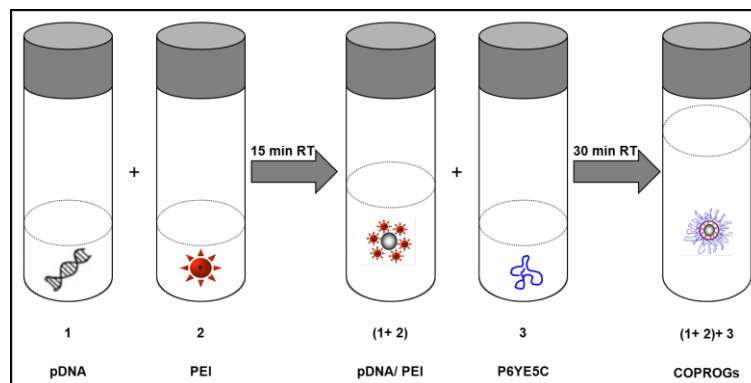


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Formulierung geschützter Genvektoren in Wasser. Im ersten Schritt wird der gesamte Inhalt von Reaktionsgefäß 1 (pDNA in Wasser) unter Schütteln in Reaktionsgefäß 2 (PEI in Wasser) überführt. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur und Bildung von pDNA/PEI-Komplexen wird die gesamte Mischung aus Reaktionsgefäß 1 und 2 unter Schütteln in Reaktionsgefäß 3 überführt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur bilden sich geschützte Genvektoren (COPROGs) in der Mischung aus Reaktionsgefäß 1, 2 und 3. Darstellung angelehnt an [72].

Alle in dieser Arbeit verwendeten Komplexe wurden nach der Definition der gewünschten Plasmidmenge mit einem N/P-Verhältnis von 8 und 2 Ladungsäquivalenten Schutzpolymer P6YE5C bezogen auf die negative Ladung der eingesetzten Plasmid-Menge verwendet. Die Volumina jeder Komponente waren vor dem Vermischen gleich, so dass das Endvolumen ein Dreifaches des jeweiligen Einzelvolumens betrug. Die PEI-Lösung wurde geschüttelt und währenddessen wurde die pDNA-Lösung zugefügt und noch einige Sekunden weitergeschüttelt. Während einer 15 min Inkubation bei Raumtemperatur bilden sich Polyplex-Genvektoren aus pDNA und PEI. Die nun entstandene Polyplexlösung wurde zügig und unter Schütteln zur P6YE5C-Lösung gegeben und wiederum einige Sekunden weitergeschüttelt. Während weiteren 30 min Inkubation bildeten sich geschützte Genvektoren aus pDNA, PEI und P6YE5C (s. Abb. 11 und 12), die nun zur Aktivierung von Biomaterialien eingesetzt werden konnten.

3.4 COPROG-Genaktivierung der Biomaterialien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Matrices sind bioabbaubar, steril verpackt, kommerziell verfügbar und zur klinischen Verwendung zugelassen.

3.4.1 Beladung der Biomaterialien mit einer wässrigen COPROG-Lösung

Für die Studie zur verbesserten Angiogenese von künstlichem Hautersatz wurde Integra® Dermal Regeneration Template (Integra LifeScience Corporation, NJ, USA) verwendet. Es handelt sich hierbei um einen zweischichtigen Vollhautersatz. Die Dermisersatzschicht besteht aus quervernetztem bovinem Kollagen Type II und Glykosaminoglykan (Chondroitin-6-sulfat) mit definierter Porengröße und Abbauezeit. Der Ersatz dieser Schicht durch Neodermis *in vivo* dauert durchschnittlich 14-21

Tage [189]. Die Epidermisersatzschicht ist eine dünne Silikonlage, die den Feuchtigkeitsverlust der Wunde kontrolliert. Für die *in vitro* Versuche wurde nur die Dermisersatzschicht aus Kollagen und Glykosaminoglykan verwendet. Zur Untersuchung der Genaktivierung einer Kollagen Typ I Matrix zur Induktion osteogener Differenzierung von Zielzellen zur zukünftigen Regeneration von Knochendefekten wurde Tachotop® (Nycomed, München, Deutschland) verwendet. Gleichgroße Stücke der porösen Materialien wurden ausgestanzt (Acupunch, Xiomedics, Unterhaching, Germany). Wie in Abbildung 13 dargestellt wurden 100 µl (für Integra Ø 6 mm), 150 µl (für Integra Ø 12 mm) oder 200 µl (für Tachotop Ø 12 mm) Genvektorenlösung oder Wasser (Kontrolle) auf die Matrices getropft. Im Anschluss wurde das Material unter vorsichtigem Schütteln ca. 120 min bei Raumtemperatur inkubiert und über Nacht lyophilisiert.

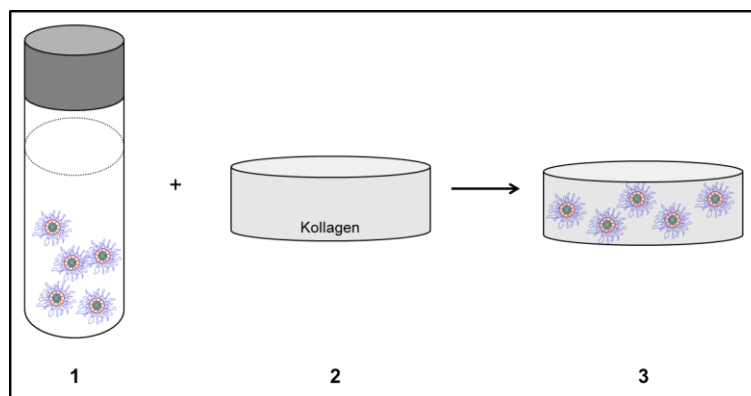


Abbildung 13: Schematische Darstellung der wässrigen Beladung von porösen Kollagenmatrices mit COPROGs. Die geschützten Genvektoren (1) werden in wässriger Lösung auf die Kollagenmatrices (2) gegeben und im Anschluss lyophilisiert (3).

Die Genvektormengen pro Matrix sind relativ zur im Genvektor enthaltenen Menge an pDNA angegeben. Für *in vivo* Studien wurden 2 Kontrollen verwendet. Zum einen wurde PBS anstatt der COPROG-Lösung verwendet (Kontrolle A) und zum anderen wurde ein Plasmid ohne Protein-kodierende Sequenz (Leerplasmid, pMetLucDel) zur

Herstellung von COPROGs genutzt (Kontrolle B) und wie beschrieben in wässriger Lösung aufgebracht.

3.4.2 COPROG-PDLLA-Oberflächenbeschichtung von Biomaterialien

β – Polycaprolacton (PCL) Osteomesh™ (Osteopore™, Singapur) bzw. Tachotop® (Nycomed, München, Deutschland) wurden in gleichgroße Stücke mit einem Durchmesser von 6 mm (PCL) bzw. 12 mm (Tachotop®) ausgestanzt (Acupunch, Xiomedics, Unterhaching, Germany). Das synthetische Polymer Poly-D-L-lactid (PDLLA) mit dem Handelsnamen Resomer® R 203 H (Boehringer Ingelheim Pharma, Ingelheim, Deutschland) wurde als Lösung in Ethylacetat (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Genevektoren wurden in der jeweiligen Lösung von PDLLA in Ethylacetat (EtOAc) mittels eines speziell hierfür angefertigten Teflonpistills in konischen 15 ml Polypropylenröhrchen (TPP, Trasadingen, Schweiz) homogen suspendiert und sofort mit einem Volumen von 50 μ l (für PCL) bzw. 100 μ l (für Tachotop®) in Konzentrationen von 150 mg PDLLA/ml EtOAc (für PCL) oder 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 mg PDLLA/ml EtOAc (für Tachotop®) auf die Stücke getropft (s. Abb. 14).

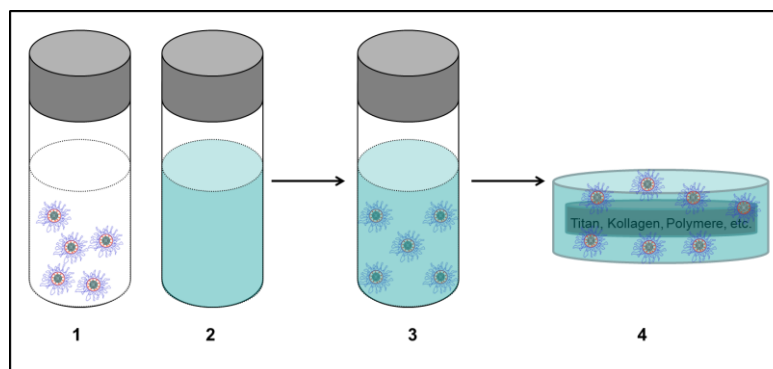


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Verlackung von Oberflächen mittels PDLLA/ COPROG Beschichtung. Die lyophilisierten Genevektoren (1) werden in einer Lösung von PDLLA in Ethylacetat (2) homogenisiert (3) und in Anschluss auf der Matrixoberfläche verteilt (4).

Diese wurden 120 min bei Raumtemperatur getrocknet und im Anschluss über Nacht einem Vakuum ausgesetzt, um sicherzustellen, dass die gesamte Menge an Ethylacetat verdampft ist.

3.5 Zellkultur

3.5.1 NIH3T3-Mausfibroblasten

NIH3T3-Mausfibroblasten (DSMZ #ATCC 59) wurden bei 37°C und 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Biochrom AG, Berlin, Germany) mit 10% fetal calf serum (FCS; PAN-Biotech, Aidenbach, Germany) und 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom AG, Berlin, Germany) gezüchtet. Es wurden 100.000 Zellen/50 µl pro Ø 12 mm Tachotop®-Matrix, bzw. 100.000 Zellen/50 µl pro Ø 6 mm und 500.000 Zellen/100 µl pro Ø 12 mm Integra®-Matrix ausgesät.

3.5.2 C2C12-Mausmyoblasten

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um Mausmyoblasten [190] die durch entsprechenden Stimulus osteogen transdifferenziert werden können [191]. C2C12-Zellen wurden für diese Studie freundlicherweise von Dr. Schermelleh vom Biozentrum Martinsried der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Verfügung gestellt. Sie wurden bei 37°C und 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Biochrom AG, Berlin, Germany) mit 10% fetal calf serum (FCS; PAN-Biotech, Aidenbach, Germany) und 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom AG, Berlin, Germany) gezüchtet. Es wurden 100.000 Zellen/50 µl pro Ø 6mm PCL-Matrix ausgesät.

3.5.3 Primäre Chondrozyten

Eine Knorpelbiopsie aus dem Kniegelenk von weißen New Zealand Kaninchen (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) wurde mit PBS (Biochrom, Berlin, Deutschland) gewaschen und zentrifugiert (900 RPM, 3 min, 20°C). Dann wurde der Knorpel zerkleinert und mit 10 ml PBS in ein 50 ml Polypropylenröhrchen (TPP, Trasadingen, Schweiz) überführt und mit 10 ml 0,25% Trypsin versehen. Nach 30 min Inkubation (450 RPM, 37°C) wurden 10 ml Medium zugesetzt und zentrifugiert (900 RPM, 3 min, 20°C). Der Überstand wurde entfernt und 20 ml 1,5 mg/ml Collagenase A Lösung (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) zugesetzt und über Nacht bei leichtem Schütteln und 37°C inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (900 RPM, 3 min, 20°C) wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in Medium überführt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Biochrom AG, Berlin, Germany) mit 10% fetal calf serum (FCS; PAN-Biotech, Aidenbach, Germany) und 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom AG, Berlin, Germany). Es wurden 200.000 Zellen/50 µl pro Ø 12 mm Tachotop®-Matrix ausgesät.

3.5.4 Kultivierung der Matrices

Nach Aussaat der Zellen erfolgte eine Inkubation von 60-120 min unter Kulturbedingungen, um eine gute Adhärenz der Zellen am Material zu fördern, bevor das Medium aufgefüllt wurde. Nach einem Tag wurden die Matrices in neue Zellkulturplatten überführt und mit frischem Medium versehen. An jedem Messzeitpunkt wurde eine Probe des Zellkulturüberstandes entnommen und umgehend bei -80°C tiefgefroren. Der restliche Überstand wurde komplett verworfen und durch frisches Medium ersetzt.

3.6 Genexpressionsanalyse

3.6.1 Metridia Luciferase Reporter Assay

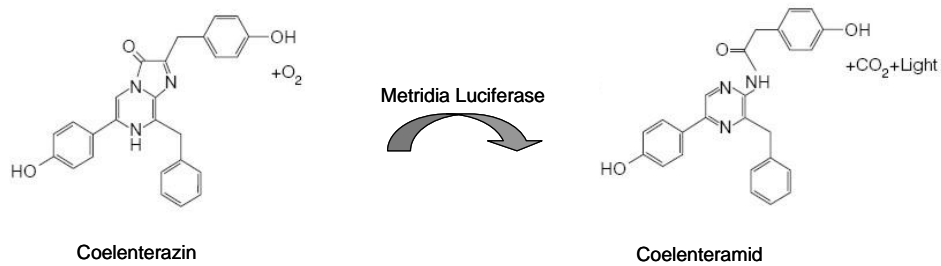


Abbildung 15: Reaktionsprinzip Metridia Luciferase Assay (Produktinformation Promega). In Anwesenheit von Sauerstoff setzt Metridia Luciferase das Substrat Coelenterazin unter Bildung von Coelenteramid, CO₂ und Lichteinheiten um. Diese Lichteinheiten werden zur Quantifizierung des Metridia Luciferase Gehaltes der Proben gemessen.

Zur Bestimmung der Metridia Luciferase Expression wurden 50 µl des Zellkulturüberstandes in schwarze 96-Loch-Zellkulturplatten (Corning Incorporated, New York, USA) überführt. Nach Zugabe von 20 µl 0,05 mM Coelenterazin (Synchem, Felsberg, Deutschland) zur Probe erfolgt die in Abbildung 15 dargestellte Reaktion und die ausgesendeten Lichteinheiten wurden sofort im Microplate Scintillation Counter TopCount (Canberra Packard, Dreieich, Deutschland) vermessen. Da kein Standardprotein zur Verfügung stand, wurde die Expression in relativen Lichteinheiten (RLU)/50 µl Zellkulturüberstand angegeben.

3.6.2 SEAP Reporter Assay

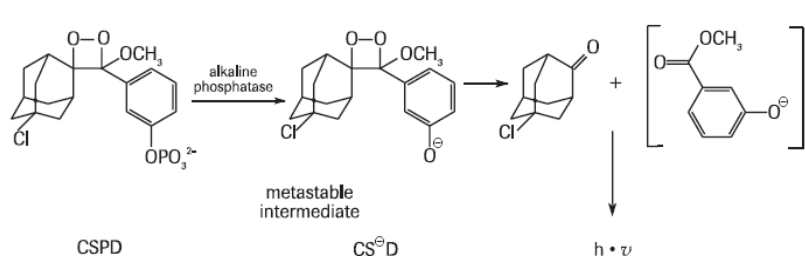


Abbildung 16: Reaktionsprinzip SEAP Assay (Produktinformation Roche). SEAP setzt das Substrat (CSPD®) unter Bildung von Lichteinheiten um. Diese Lichteinheiten werden zur Quantifizierung des SEAP-Gehaltes der Proben gemessen.

Zur Detektion des SEAP-Gehalts im Zellkulturüberstand wurde das Great EscAPe™ SEAP Chemiluminescence Kit 2.0 (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) verwendet. Jeweils 30 µl Überstand wurden in eine 96-Loch-Zellkulturplatte (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) überführt und nach Zugabe von 90 µl 1x Dilution Buffer wurden diese mit Silikon Verschlussmatten (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) verschlossen und endogene alkalische Phosphatase hitzeinaktiviert (30 min bei 65°C). Anschließend wurden die Proben auf Eis auf Raumtemperatur abgekühlt und daraufhin zentrifugiert (1500 RPM/ 20°C/ 5 min). Nach der Zugabe von 120 µl SEAP-Substrat-Lösung wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Messung der Biolumineszenz wurden 200 µl des finalen Assayansatzes in schwarze 96-Loch-Zellkulturplatten (Corning Incorporated, New York, USA) überführt und mittels Microplate Scintillation Counter TopCount (Canberra Packard, Dreieich, Deutschland) vermessen. Das Reaktionsprinzip ist in Abbildung 16 dargestellt. Die SEAP-Menge im Zellkulturüberstand wurde in µg/ml angegeben.

3.6.3 Quantifizierung der Genexpression mittels ELISA

Der VEGF-, BMP-2-, Osteocalcin-, Osteopontin- oder Aggrecan-Gehalt wurde in den Zellkulturüberständen bzw. in den Homogenisaten der Matrices bestimmt. Die Proben der Matrices wurden bis zum Analysezeitpunkt bei – 80°C schockgefroren. Unmittelbar vor Durchführung der Analyse wurden sie in 2 ml Schraubdeckelröhrchen (VWR Scientific Products, West Chester, USA) mit 1 g Zirkonia Kugeln (2.5 mm; Biospec Products, Inc., Bartlesville, USA) und 0,5 ml PBS überführt. Die Proben wurden vor und nach der Homogenisierung mit einem Mini-beadbeater™ (Biospec Products, Inc., Bartlesville, USA; 1 × 10 s Intervall) auf Eis

aufbewahrt. Nach dem Zentrifugieren (7600 RPM, 5 min, 4°C) wurden die angegebenen Volumina per ELISA analysiert.

VEGF-Bestimmung

Die Expression des Wachstumsfaktors „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) wurde nach den Herstellervorgaben (RayBio® Human VEGF ELISA Kit, BioCat, Heidelberg, Deutschland) mittels ELISA in je 100 µl Zellkulturüberständen oder Homogenisat der Integra® Matrices bestimmt. Die VEGF-Menge wurde für *in vitro* Versuche in ng/ml Zellkulturüberstand, bzw. ng/Ø 12 mm Matrix und für *in vivo* Versuche in pg/mg Material dargestellt.

BMP-2-Bestimmung

Die Expression des Wachstumsfaktors bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) wurde mittels ELISA Quantikine® BMP-2 Immunoassay (R&D, Minneapolis, USA) bestimmt. Für die Bestimmung der BMP-2-Konzentration wurden je 100 µl Zellkulturüberstand bzw. Homogenisat der Matrices eingesetzt. Zur Bestimmung der BMP-2-Produktion von C2C12-Zellen auf BMP-2-COPROG-PDLLA-Beschichtungen wurde die Homogenisation zusätzlich in 2M Guanidin-HCl (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) durchgeführt, da keine Detektion in PBS möglich war. Der ELISA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und ausgewertet. Die BMP-2-Konzentrationen wurden in pg/ml Zellkulturüberstand, bzw. pg/mg Gesamtprotein dargestellt.

Osteocalcin-Bestimmung

Osteocalcin (OC) wurde nach Herstellerangaben (Rabbit Osteocalcin ELISA Kit E0471Rb, USCN Lifescience Inc., Wuhan, China / Mouse Osteocalcin ELISA Kit BT-470, Biomedical Technologies Inc., Stoughton, MA, USA) mittels ELISA in 100 µl Zellkulturüberstand oder Homogenisat der Matrices bestimmt. Die OC-Menge wurde in pg/ml Zellkulturüberstand, bzw. pg/mg Gesamtproteingehalt dargestellt.

Osteopontin-Bestimmung

Osteopontin (OPN) wurde nach Herstellerangaben (Mouse Osteopontin ELISA Kit E0899Mu, USCN Lifescience Inc., Wuhan, China) mittels ELISA in 100 µl des Homogenisates der Matrices bestimmt. Die OPN-Menge wurde in pg/mg Gesamtproteingehalt dargestellt.

Aggrecan-Bestimmung

Aggrecan (AGC) wurde nach Herstellerangaben (Rabbit Aggrecan ELISA Kit E1908Rb, USCN Lifescience Inc., Wuhan, China) mittels ELISA in 100 µl des Homogenisates der Matrices bestimmt. Die AGC-Menge wurde in pg/mg Gesamtproteingehalt dargestellt.

3.7 Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP)

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde in 100 µl des Homogenisates der Matrices gemäß Herstellerangaben mittels p-Nitrophenyl-Phosphatase Liquid Systems (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) bestimmt.

3.8 BCA-Proteinbestimmung

Um den Proteingehalt in den Proben zu bestimmen, wurden 25 µl des Homogenisates der Matrices mit Hilfe des Pierce® BCA Protein Assay Kits (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) nach den Herstellerangaben untersucht. Zur Normierung der Aussagen wurden die Ergebnisse pro mg Gesamtprotein angegeben.

3.9 Bestimmung der metabolische Aktivität – MTT-Assay

Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Zellaussaat wurden die Matrices für 60 min unter Kulturbedingungen in 100 µl einer 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (MTT; Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) Lösung 500 µg/ml in PBS inkubiert. Im Anschluss wurde die MTT-Lösung entfernt und mit 100 µl PBS gewaschen. Dann wurden die Matrices in ein Eppendorfgefäß mit 500 µl DMSO überführt und gevortext, um das gebildete Formazanblausalz zu extrahieren. Schließlich wurde die Absorption bei 560 nm bestimmt.

3.10 Histologie

Alle Färbungen wurden mit einem Eclipse TE2000-S Mikroskop (Nikon, Germany) analysiert.

3.10.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Bei Versuchsende wurden die jeweiligen Matrices in 3,7% Formaldehyd (Fischer, Saarbrücken, Deutschland) fixiert. Im Anschluss folgte die automatische Entwässerung, die freundlicherweise durch das Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie unter Leitung von Prof. Höfler am Klinikum rechts der

Isar der TUM durchgeführt wurde. Die entwässerten Matrices wurden in Paraplast® Plus (Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingebettet (TBS-88, Medite, Burgdorf, Deutschland) und 7 µm Schnitte wurden angefertigt (Microtom HM355, Microm, Walldorf, Deutschland). Diese wurden mindestens 1 Tag bei Raumtemperatur auf Objektträgern (SuperFrost®, Menzel, Braunschweig, Deutschland) fixiert und unmittelbar vor einer Färbung in der Reihenfolge je 2 min 5x Roticlear entparaffinisiert und 3x Ethanol 99%, 1x Ethanol 90%, 1x Ethanol 80%, 1x Ethanol 70%, 1x Aqua_{dest.} rehydriert.

3.10.2 Histochemische Färbungen

Phalloidin-Färbung der Aktinfilamente

Entparaffinisierte Schnitte wurden 5 min mit 0,2% Triton in PBS bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach dem Waschen der Schnitte in PBS wurde 0,05 mg/ml Phalloidin-FITC Lösung (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) auf die Schnitte getropft und für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten in PBS wurden die Schnitte unter DAPI ProLong® Gold antifade reagent (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) eingebettet. Im Anschluss wurden die Verteilung und die Adhäsion der Zellen mikroskopisch untersucht.

DAPI-Färbung der Zellkerne

DAPI färbt DNA im Zellkern an und dient somit der Analyse von Zellvorkommen und -verteilung im Material. Zur Färbung wurde DAPI ProLong® Gold antifade reagent (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) auf die entparaffinisierten Schnitte aufgebracht.

Hämalaun-Eosin-Färbung

Paraffinschnitte wurden, wie bereits beschrieben, entparaffinisiert und rehydriert. Im Anschluss wurde für 10 min bei Raumtemperatur (RT) in einer Hämalaunlösung (Hämalaun nach Mayer gemäß Romeis Nr. 648) gefärbt (Blaufärbung der Zellkerne). Danach wurden die Proben im laufenden Leitungswasserstrom für 15 min gewässert und anschliessend für 15 min bei RT in 0,5% Eosinlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) gefärbt (Rotfärbung der Zellplasmaproteine). Nun wurden die Proben in der Reihenfolge 3 sec in 70%/ 10 sec in 80%/ 3 min in 90%/ 5 min in 99% Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) und dann fünfmal für 3 min in Xylol (Roticlear®, Roth, Karlsruhe, Deutschland) gebadet und darauffolgend in Eukitt® (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) eingebettet.

3.10.3 Immunhistochemische Färbungen

Vorbereitung der Schnitte

Nach der Entparaffinisierung (3x 3 min Xylol, 2x 3 min Ethanol 99%, 2x 3 min Ethanol 90%, 3 min Aqua_{dest.}) von 7 µm Schnitten wurde durch Kochen in einer randvoll mit 10mM Tris/ 1mM EDTA pH 9 gefüllten Plastikkuvette bei 680W in der Mikrowelle das Antigen demaskiert. Zum Abkühlen wurde die Kuvette im Anschluss 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann die Schnitte in destilliertem Wasser gewaschen. Um endogene Peroxidase zu blockieren wurden die Schnitte für 5 min mit 3% H₂O₂ versehen und zuerst in destilliertem Wasser und dann kurz in 1x TBS gewaschen. Um unspezifische Proteininteraktionen zu blockieren wurde 60 min bei 37°C mit 10% BSA (Roth, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert.

Detektion von VEGF in Paraffinschnitten

Der primäre polyklonale Antikörper Rb-anti-VEGF (ab39250, Abcam, Cambridge, UK) wurde 1:100 in PBS verdünnt, auf die Schnitte getropft und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschliessend wurde entsprechend den Herstellerangaben (Cell & Tissue Staining Kit, R&D systems, Wiesbaden, Germany) mit sekundärem biotinyliertem anti-rabbit Antikörper und HSS-HRP Streptavidin Komplex inkubiert.

Detektion von vWF in Paraffinschnitten

Der primäre polyklonale Antikörper Rb-anti-vWF (ab7356, Millipore, Billerica, USA) wurde 1:500 verdünnt, auf die Schnitte getropft und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in PBS wurde mit sekundärem Peroxidase-gelabelten Goat-anti-rabbit Antikörper (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA) für 60 min bei 37°C inkubiert.

Farbentwicklung

Zur Farbentwicklung wurden die Schnitte für 2 min bei Raumtemperatur mit 3,3'-Diaminobenzidine (DAB)-Substrat (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) inkubiert und darauffolgend in destilliertes Wasser überführt, um die Reaktion zu stoppen. Die Zellkerne wurden mit Hämalaun (Hämalaun nach Mayer gemäß Romeis Nr. 648) blau angefärbt und die Schnitte wurden in Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingebettet.

3.11 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Rasterelektronenmikroskopie wurde benutzt, um die strukturelle Beschaffenheit der Matrices zu charakterisieren. Die Proben wurden mit 3% Glutaraldehyd (Roth, Karlsruhe, Deutschland) fixiert und dehydriert in der Reihenfolge je 2x 15 min Ethanol 50%, Ethanol 70%, Ethanol 80%, 1x 15 min Ethanol 99%, 1x 30 min Ethanol 99% und über Nacht bei 4°C in Ethanol 99% (Merck, Darmstadt, Deutschland). Nach mehrtägiger Verwahrung im Eksikkator wurde mit Gold besputtert (Bal-Tec SCD005, 30 mA, 240 sec.) und mit einem JEOL Raster Elektronen Mikroskop JSM-5400 (Eching, Germany) Aufnahmen gemacht (Hi-Vac Modus, 5kV Beschleunigungsspannung). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden freundlicherweise am Lehrstuhl für Medizintechnik der TU München angefertigt.

3.12 Statistik

Alle Versuche wurden zumindest dreimal wiederholt. Statistische Berechnungen wurden mithilfe von SigmaPlot® für Windows Version 11.0 durchgeführt. Vergleiche von normalverteilten Werten zweier Gruppen wurden mit Hilfe des *Student's t-Test* und Vergleiche von drei oder mehr Gruppen mit Hilfe von *One-way-ANOVA* Tests gefolgt von *Post-hoc* Analysen durch Anwendung von *Tukey* Tests untersucht. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant angesehen. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM) dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung von pSEAP und pMetLucDel

4.1.1 Kontrollverdau und Gelelektrophorese von pSEAP und pMetLucDel

Um den Erfolg der Plasmid-Klonierungen zu überprüfen wurden diese mit entsprechenden Enzymen an spezifischen Restriktionsschnittstellen geschnitten und die Größe der Fragmente mittels Gelelektrophorese bestimmt.

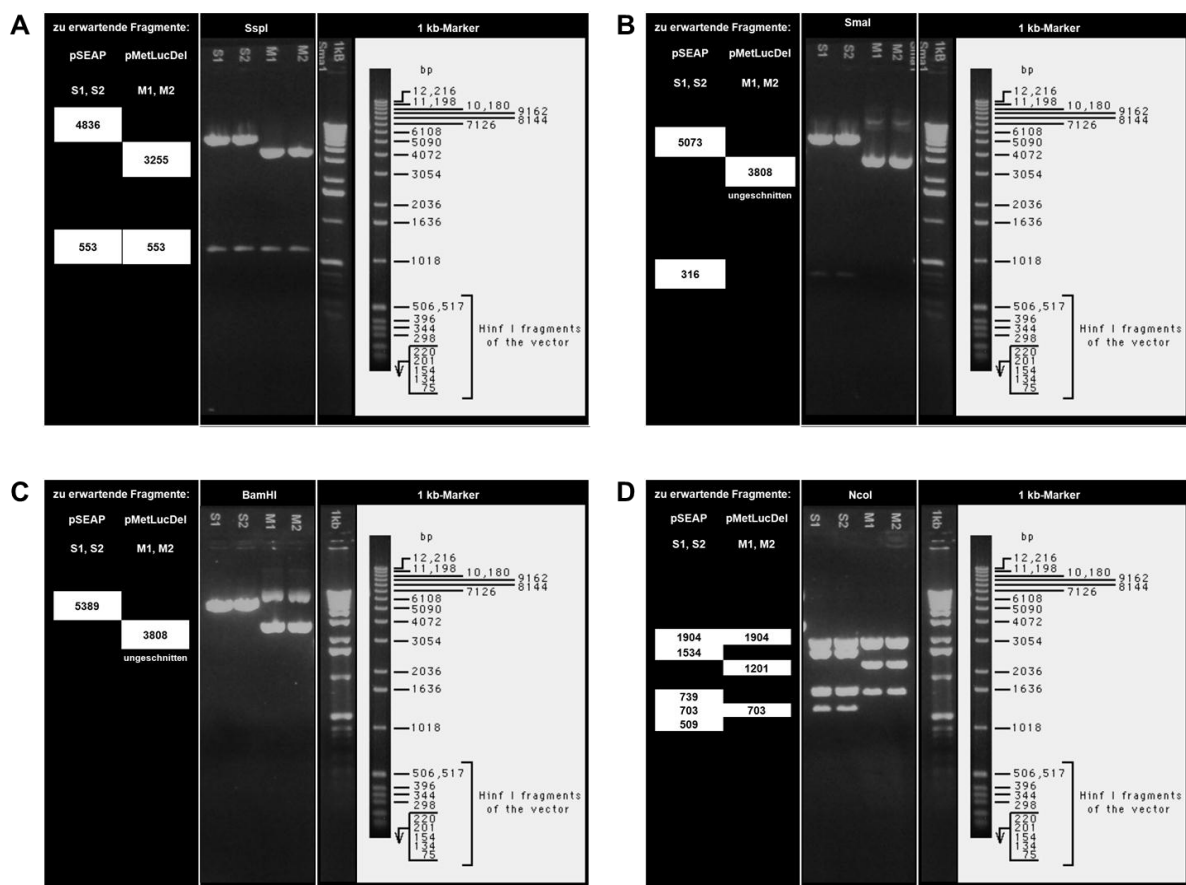


Abbildung 17: Kontrollverdau und Gelelektrophorese der DNA-Maxipreparation ausgewählter Klone von pSEAP (S1, S2) und pMetLucDel (M1, M2) mit den Restriktionsenzymen SspI (A), SmaI (B), BamHI (C) und NcoI (D).

Der Kontrollverdau der ausgewählten Klone für pSEAP (S1, S2) und pMetLucDel (M1, M2) nach DNA-Maxipreparation mit den Restriktionsenzymen SspI (s. Abb.

17A), *Sma*I (s. Abb. 17B), *Bam*HI (s. Abb. 17C) und *Nco*I (s. Abb. 17D) führte zu DNA-Fragmenten mit erwarteter Größe.

4.1.2 Sequenzierung von pSEAP und pMetLucDel

Nach Abschluss der Klonierungsarbeiten wurden die Sequenzierungen für beide Plasmide (pSEAP, pMetLucDel) von Sequiserve (Vaterstetten, Deutschland) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden neu klonierten Plasmide bezüglich ihrer Sequenzen in Identität und Qualität mit den innerhalb der Klonierungsstrategie entwickelten Erwartungen übereinstimmen (s. Abb. 18).

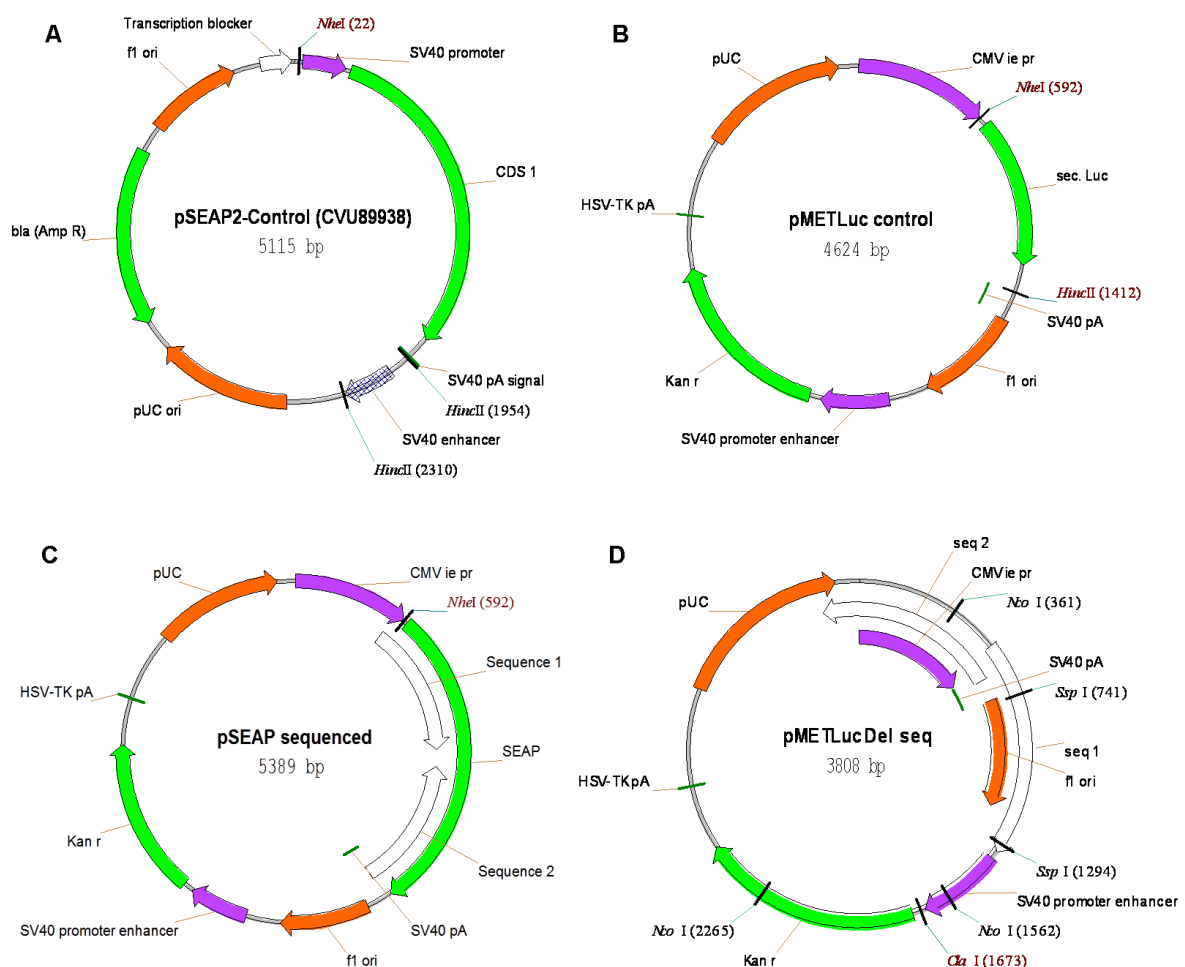


Abbildung 18: Plasmid Maps der verwendeten Ausgangsplasmide pSEAP2control (A) und pMetLuccontrol (B) und der neu klonierten Plasmide pSEAP (C) und pMetLucDel (D) nach Sequenzierung.

4.1.3 Funktionalität von pSEAP und pMetLucDel

Zur Überprüfung der Funktionalität des neu klonierten Plasmids pSEAP wurden NIH3T3-Mausfibroblasten im 96 Zellkulturplattenmaßstab mit Polyplexen, formuliert aus 0,25 µg/µl der jeweiligen Plasmid-DNA und Polyethylenimin mit unterschiedlichen N/P-Verhältnissen, transfiziert. 3 Tage nach der Transfektion wurde die SEAP-Menge im Zellkulturüberstand bestimmt. Der Vergleich der SEAP-Expression des neu klonierten Plasmids pSEAP und des kommerziell verfügbaren Ausgangsplasmids pSEAP2-control (s. Abb. 19A) ergab, dass sich der SEAP-Gehalt in den Zellkulturüberständen nicht signifikant unterschied. Beide Plasmide zeigen ein Expressionsoptimum bei einem N/P-Verhältnis von 7,7. Zudem konnte beobachtet werden, dass pSEAP bereits bei niedrigeren N/P-Verhältnissen eine signifikant erhöhte Menge an SEAP in Relation zu untransfizierten Zellen freisetzt ($p < 0,05$).

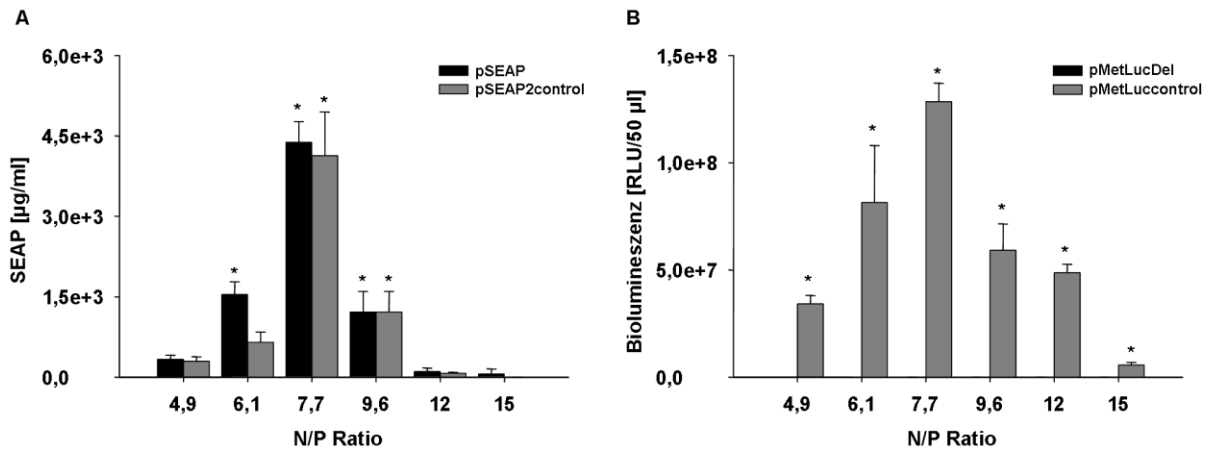


Abbildung 19: Funktionalität von pSEAP (A) und pMetLucDel (B). A. Analyse der Expression von SEAP in Abhängigkeit zum N/P-Verhältnis angegeben in µg SEAP/ml Zellkulturüberstand. Der Vergleich der beiden Plasmide pSEAP und pSEAP2control ergab keinen signifikanten Unterschied bzgl. der Transgenexpression untereinander. Beide Plasmide zeigten ein Maximum der Expression bei einem N/P-Verhältnis von 7,7. Signifikante erhöhte SEAP-Mengen im Vergleich zu untransfizierten Zellen wurden bei N/P 6,1; 7,7 und 9,6 detektiert (* $p < 0,05$). B. Metridia Luciferase angegeben in *relative light units* RLU/50 µl Zellkulturüberstand. pMetLucDel zeigte keine Genexpression. pMetLuccontrol zeigte in allen N/P-Verhältnissen eine signifikant erhöhte Metridia Luciferase Menge im Zellkulturüberstand (* $p < 0,05$).

Die Analyse Reporterexpression ergab für pMetLucDel keine detektierbare Metridia Luciferase im Zellkulturüberstand, hingegen zeigte pMetLucontrol in allen N/P-Verhältnissen eine signifikant erhöhte Proteinmenge im Zellkulturüberstand im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$) (s. Abb. 19B).

4.2 VEGF-COPROG-Genaktivierung eines künstlichen Kollagen Typ II Hautersatzmaterials

4.2.1 Mikrostruktur der Biomatrices nach COPROG-Aktivierung

Mit dem Ziel festzustellen, ob der Lyophilisationsprozess im Rahmen der Bioaktivierung der hier verwendeten Kollagen Typ II Matrix die Struktur des Materials beeinflusst, wurden lyophilisierte Matrices elektronenmikroskopisch untersucht.

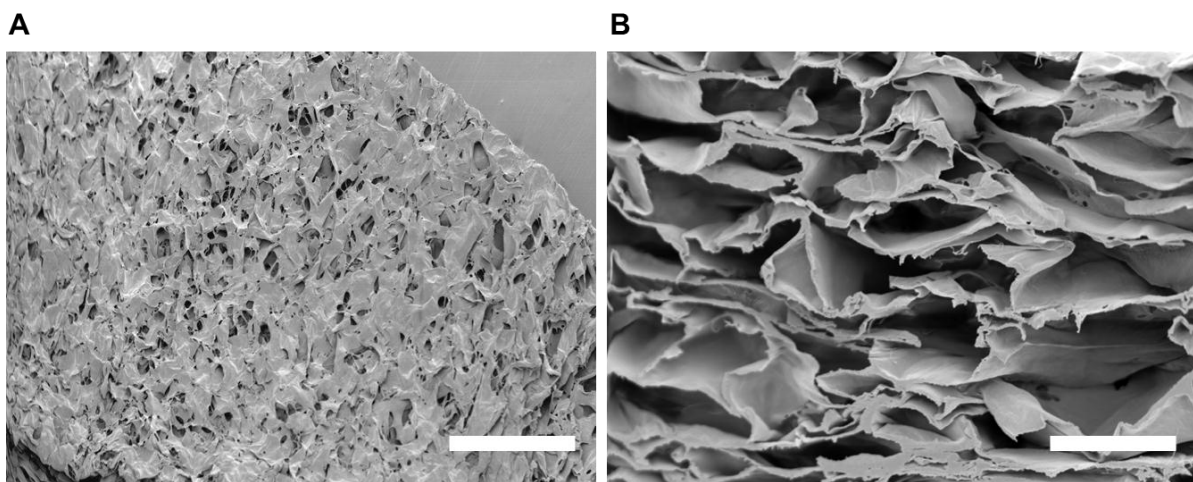


Abbildung 20: Mikrostruktur der Matrix. Raster Elektronen Mikroskop Aufnahmen der Aufsicht (A) und des Querschnittes (B) der Matrix. Der Maßstab entspricht in A 500 μm und in B 50 μm .

Die Analyse zeigte die in Abbildung 20 dargestellte Mikrostruktur mit gleichmäßig verteilten Poren und keine Zerstörung der Architektur durch den Lyophilisationsprozess.

4.2.2 Optimierung der Vektormenge für einen effizienten Gentransfer

Um die optimalen Konditionen für einen effizienten Gentransfer festzulegen, wurden unterschiedliche COPROG-Mengen (angegeben in μg pDNA) auf der Matrix immobilisiert. Anschließend wurden NIH3T3-Zellen ausgesät und die in den Zellkulturüberstand freigesetzte Metridia Luciferase-Menge über den gesamten Versuchszeitraum bestimmt. Die Abbildung 21 zeigt eine detektierbare Genexpression über mindestens 21 Tage *in vitro* mit einem maximalen Proteingehalt im Überstand an Tag 3 und 5. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Verwendung von 12,5 μg oder 25 μg pDNA (in Form von COPROGs) gefunden werden. Beide lagen aber deutlich über den Werten der mit 6,25 μg pDNA (in Form von COPROGs) beladenen Matrices ($p < 0,05$).

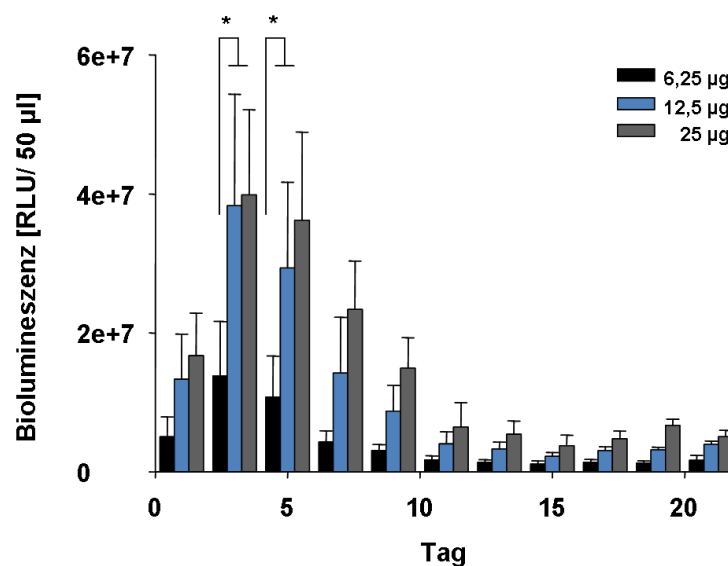


Abbildung 21: Optimierung der DNA Menge in den Matrices. Mit der Absicht die optimalen Konditionen für einen effizienten Gentransfer zu bestimmen, wurden unterschiedliche COPROG-Mengen (angegeben relativ zur pDNA Menge) kodierend für das Reporterprotein Metridia Luciferase in den Matrices immobilisiert und die Kinetik der Proteinfreisetzung in den Zellkulturüberstand wurde beobachtet. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen 12,5 μg und 25 μg pDNA/Matrix festgestellt werden, jedoch unterschied sich die Metridia Luciferase-Freisetzung im Expressionspeak an Tag 3 (6,25 μg = $1,4e+7 \pm 7,9e+6$; 12,5 μg = $3,8e+7 \pm 1,6e+7$; 25 μg = $4,0e+7 \pm 1,2e7$; * $p = 0,008$) und 5 (6,25 μg = $1,1e+7 \pm 5,9e+6$; 12,5 μg = $2,9e+7 \pm 1,2e+7$; 25 μg = $3,6e+7 \pm 1,3e+7$; * $p = 0,006$) signifikant von 6,25 μg pDNA/Matrix ($n = 3$).

4.2.3 Zellkompatibilität der genaktivierten Matrices

Nachdem gezeigt wurde, dass eine Genaktivierung dieser Matrix mit der entwickelten Technologie möglich ist, wurden mögliche toxische Effekte im Zusammenhang mit der Verwendung von COPROGs evaluiert. Hierzu wurden NIH3T3-Zellen in mit COPROGs (12,5 µg pDNA in Form von COPROGs) beladene Matrices gesiedelt und die metabolische Aktivität der Zellen wurde mittels MTT Assays bestimmt. Die Quantifizierung des Farbstoffes zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen COPROG-aktivierten und unbehandelten Matrices (s. Abb. 22A). Zudem deutet der starke Anstieg der metabolischen Aktivität zwischen Tag 1 und 7 ($p < 0,05$) auf eine deutliche Proliferation der Zellen innerhalb der Matrix hin. Im Anschluss wurde untersucht, ob die Genaktivierung die Verteilung oder das Anheften der Zellen innerhalb der Matrix beeinflusst. Hierfür wurden 2 Wochen nach der Zellaussaat koronale Schnitte der Matrix angefärbt. Es konnte gezeigt werden, dass weder die Verteilung (s. Abb. 22B) noch die Anheftung (s. Abb. 22C) der Zellen durch die Anwesenheit von COPROGs beeinträchtigt war.

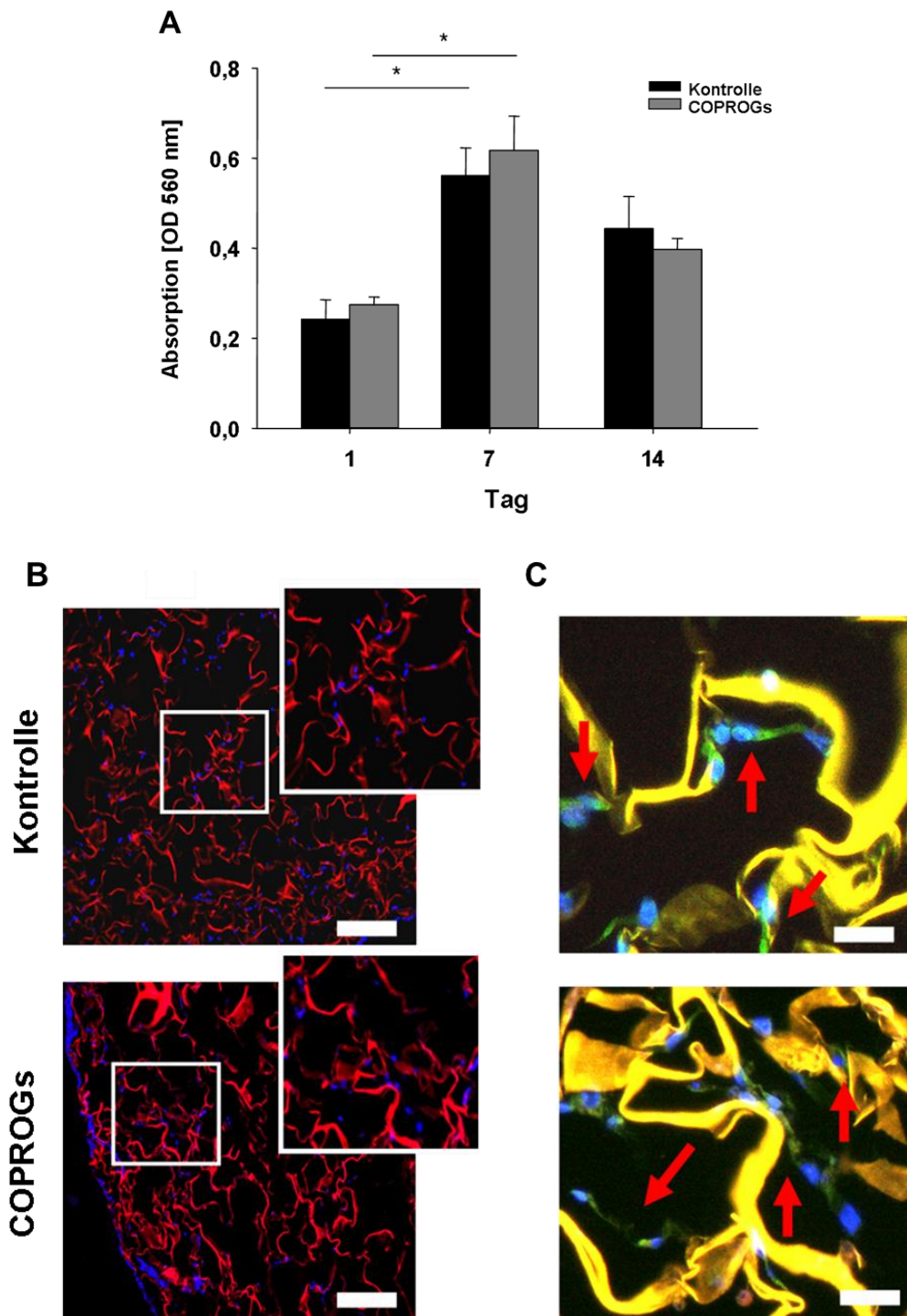


Abbildung 22: Zellkompatibilität der genaktivierten Matrices. Die metabolische Aktivität von auf den Matrices wachsenden Zellen wurde verglichen (A). Die Quantifizierung des Farbstoffes ergab in beiden Konditionen eine deutliche metabolische Aktivität der Zellen. Zwischen Tag 1 (Kontrolle = $0,24 \pm 0,04$; COPROGs = $0,27 \pm 0,02$) und 7 (Kontrolle = $0,56 \pm 0,06$; COPROGs = $0,62 \pm 0,08$) war ein signifikanter Anstieg ($n = 3$; $*p < 0,001$) der Aktivität in beiden Gruppen zu erkennen, jedoch unterschieden sich die Aktivitäten der modifizierten Matrices nicht von den unbehandelten. Die Verteilung der Zellen (blau/DAPI) in der Matrix (rot/Autofluoreszenz) und das Anheften wurde 2 Wochen nach Zellaussaat untersucht (B, C). B zeigt eine homogene Verteilung der Zellen, während C eine direkte Interaktion der Fibroblasten (grün/Phalloidin-FITC; blau/DAPI) mit der Kollagen Matrix (gelb/Autofluoreszenz) zeigt. Der Maßstab entspricht $200 \mu\text{m}$ in B und $10 \mu\text{m}$ in C.

4.2.4 VEGF-Freisetzung *in vitro*

COPROGs, die für VEGF₁₆₅ kodieren wurden in die Matrix eingebracht und die Freisetzung des Wachstumsfaktors wurde *in vitro* quantifiziert.

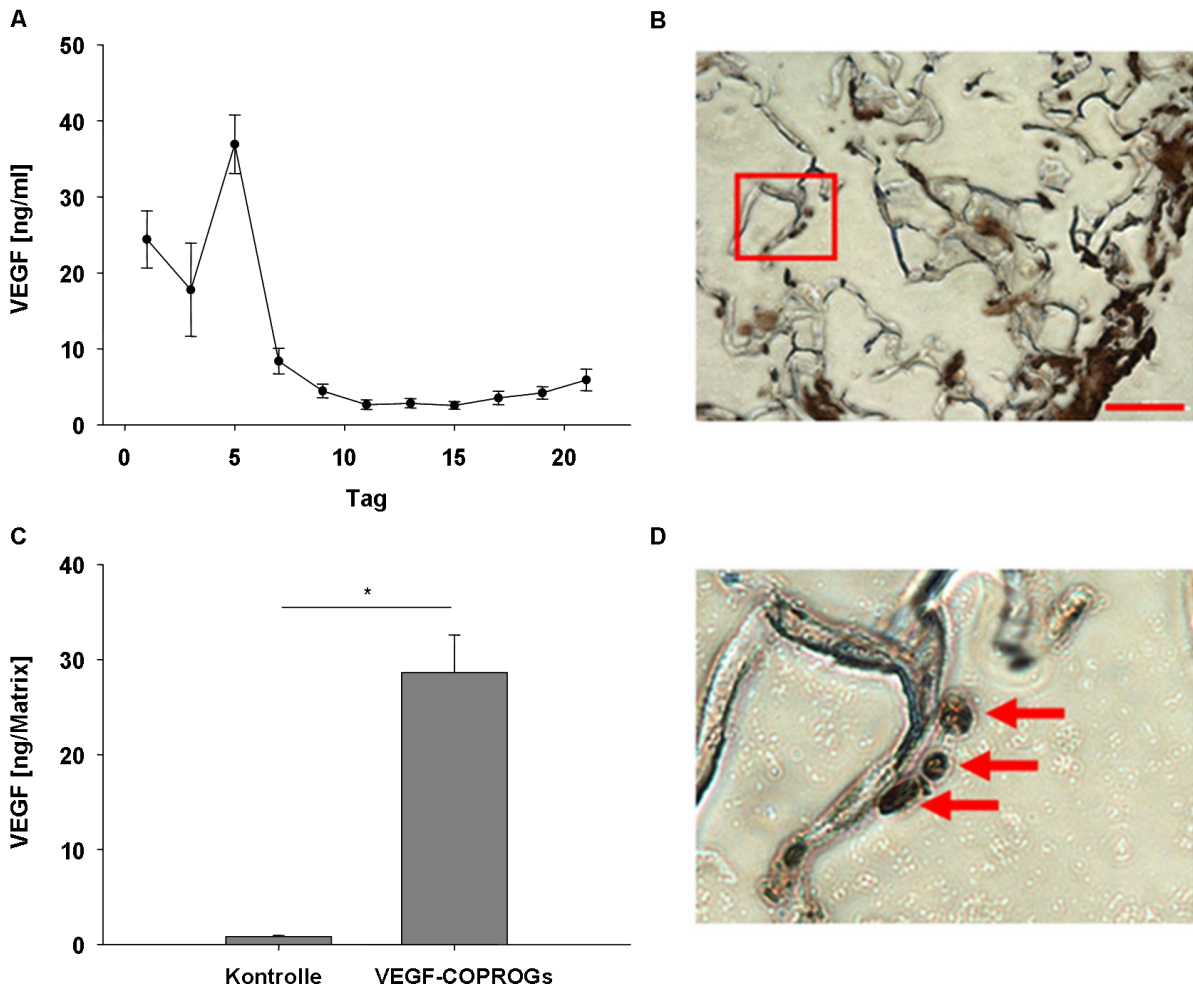


Abbildung 23: VEGF Freisetzung von genaktivierten Matrices *in vitro*. NIH3T3-Zellen wurden in modifizierte Matrices (VEGF-COPROGs) oder Kontrollmatrices ausgesät und die VEGF-Expression wurde analysiert. An Tag 5 wurde ein Maximum Peak der VEGF Freisetzung in den Zellkulturüberstand beobachtet, der für mehr als 10 Tage anhielt (A). Nach 3 Wochen zeigte die VEGF-Bestimmung in den homogenisierten Matrices eine 35 fache Steigerung im Vergleich zur Kontrolle (Kontrolle = $0,8 \pm 0,1$; VEGF-COPROGs = $28,6 \pm 3,9$; $n = 3$; $*p < 0,001$) (C). Immunhistochemische Analysen der Matrices zeigten VEGF (braune Färbung) in Zellen (D; rote Pfeile) und im Material (B). Der Maßstab entspricht 100 μm .

Die Ergebnisse zeigen, dass NIH3T3-Zellen, die auf die genaktivierten Matrices ausgesät wurden, in der Lage waren, VEGF über einen Zeitraum von zumindest 21 Tagen freizusetzen. VEGF-Konzentrationen von 2,5 bis 37 ng/ml Zellkulturüberstand

mit einem Peak an Tag 5 konnten bestimmt werden (s. Abb. 23A). 21 Tage nach der Zellaussaat wurden die Matrices homogenisiert und ihr VEGF-Gehalt bestimmt. Durchschnittlich waren 28 ng VEGF in den genaktivierten Matrices nachzuweisen, dies ist eine 35 fache Induktion der VEGF-Expression in Relation zu den Kontrollmatrices (s. Abb. 23C). Außerdem konnte VEGF mithilfe von immunhistochemischen Methoden auch an die Kollagenmatrix gebunden und in den darauf wachsenden Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 23B und D).

4.2.5 Funktionalität der genaktivierten Matrices *in vivo*

Um die genaktivierten Matrices *in vivo* zu beschreiben, wurden sie in einen Vollhautdefekt im Rücken von Nacktmäusen eingesetzt (s. Abb. 24).

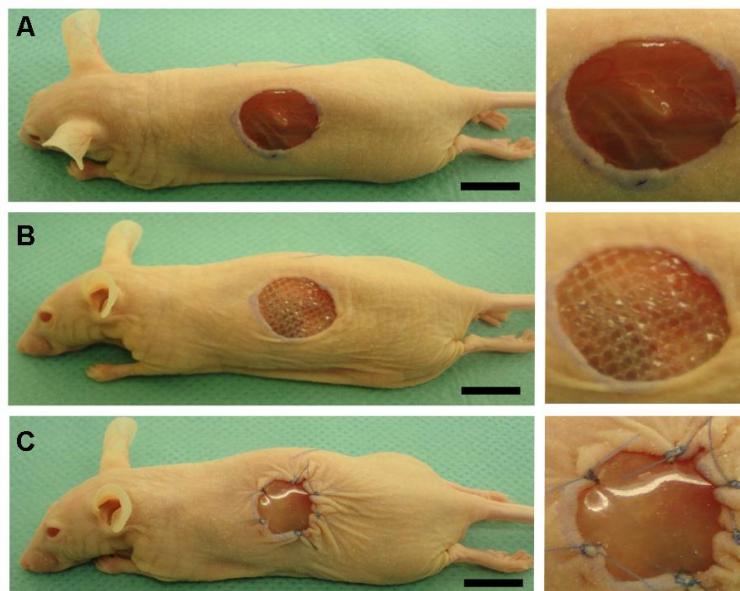


Abbildung 24: Bilateraler Vollhautdefekt – Tiermodell. Ein Vollhautdefekt von 12 mm Durchmesser wurde im Rücken der Tiere verursacht (A). Mit der Absicht mögliche Artefakte während der späteren Entnahme zu vermeiden wurde ein titanisiertes Netz zwischen Wundbett und Matrix platziert (B). Schließlich wurde die Wunde mit einer Matrix für dermale Regeneration verschlossen (C). Der Maßstab entspricht 1 cm.

2 Wochen nach Implantation wurden die Matrices mit etwa 1 cm der umgebenden Haut entnommen und transilluminert. Ein definiertes vaskularisiertes Netzwerk konnte in keiner der Matrices nachgewiesen werden. Jedoch erschienen VEGF-

COPROG-aktivierte Matrices gelb bis rot gefärbt. Im Gegensatz dazu waren Kontrolle A (PBS Kontrolle) und B (Leervektor Kontrolle) eher transparent (s. Abb. 25A). Um mehr Informationen über die Struktur und Zusammensetzung der explantierten Matrices zu gewinnen, wurden histologische Untersuchungen durchgeführt. HE-Färbungen zeigten viele nicht-adhärende Zellen, im besonderen Erythrozyten in den VEGF-COPROG-aktivierten Matrices, wohingegen beide Kontrollgruppen vorrangig adhärente Zellen aufwiesen (s. Abb. 25B). Immunhistochemische Anfärbungen von von-Willebrand-Faktor (vWF) zeigten eine deutlich erhöhte vWF-Menge in den VEGF-COPROG-aktivierten Matrices im Vergleich zu beiden Kontrollen (s. Abb. 25C).

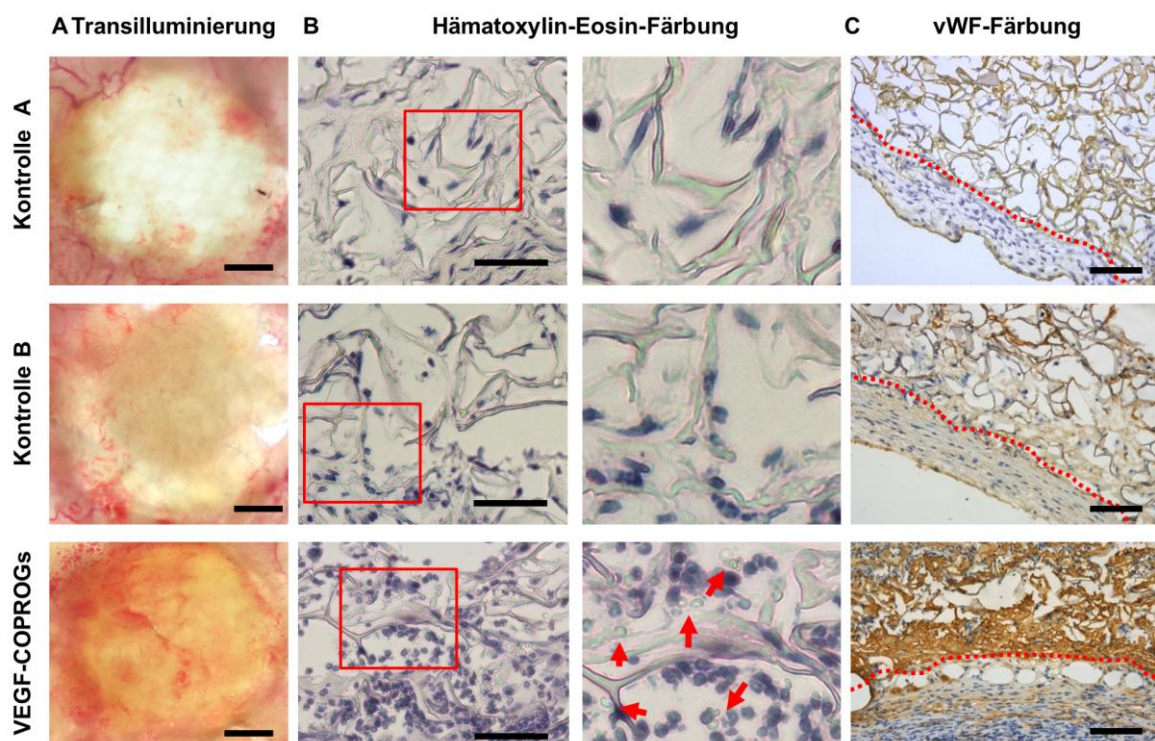


Abbildung 25: Funktionalität der Matrices *in vivo*. 2 Wochen nach der Implantation der Matrices wurde die Neovaskularisierung durch Transilluminierung untersucht (A). Danach wurden Querschnitte der Matrix Hämatoxylin-Eosin (HE) (B) und vWF (C) gefärbt. Die HE Färbung zeigte eine große Menge an nicht adhärenenten Zellen, im Speziellen Erythrozyten (rote Pfeile) in VEGF-COPROG aktivierten Matrices im Vergleich zu beiden Kontrollen (B). Immunhistochemische Analyse zeigt eine erhöhte Menge an vWF in VEGF-COPROG-aktivierten Matrices im Vergleich zu Kontrolle A (PBS Kontrolle) und B (Leervektor Kontrolle). Der Bereich oberhalb der roten gestrichelten Linie repräsentiert die Matrix, der Bereich darunter das Wundbett (C). Der Maßstab entspricht 3 mm in A, 50 µm in B und 100 µm in C.

Zur Quantifizierung der VEGF-Expression *in vivo* wurden entnommene Matrices und Haut des Wundbettes mittels ELISA untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die VEGF-Menge in den VEGF-COPROG-aktivierten Matrices im Vergleich zu beiden Kontrollen signifikant erhöht war ($p < 0,05$). Zwischen Kontrolle A und B wurden keine Unterschiede gefunden (s. Abb. 26A). Die Analyse der Haut des Wundbettes zeigte keine signifikanten Unterschiede des VEGF-Gehaltes zwischen allen drei Gruppen (s. Abb. 26C). Die histologische Analyse zeigte einen erhöhten VEGF-Gehalt in den Zellen und an die Matrix gebunden im Vergleich zu beiden Kontrollen (s. Abb. 26B).

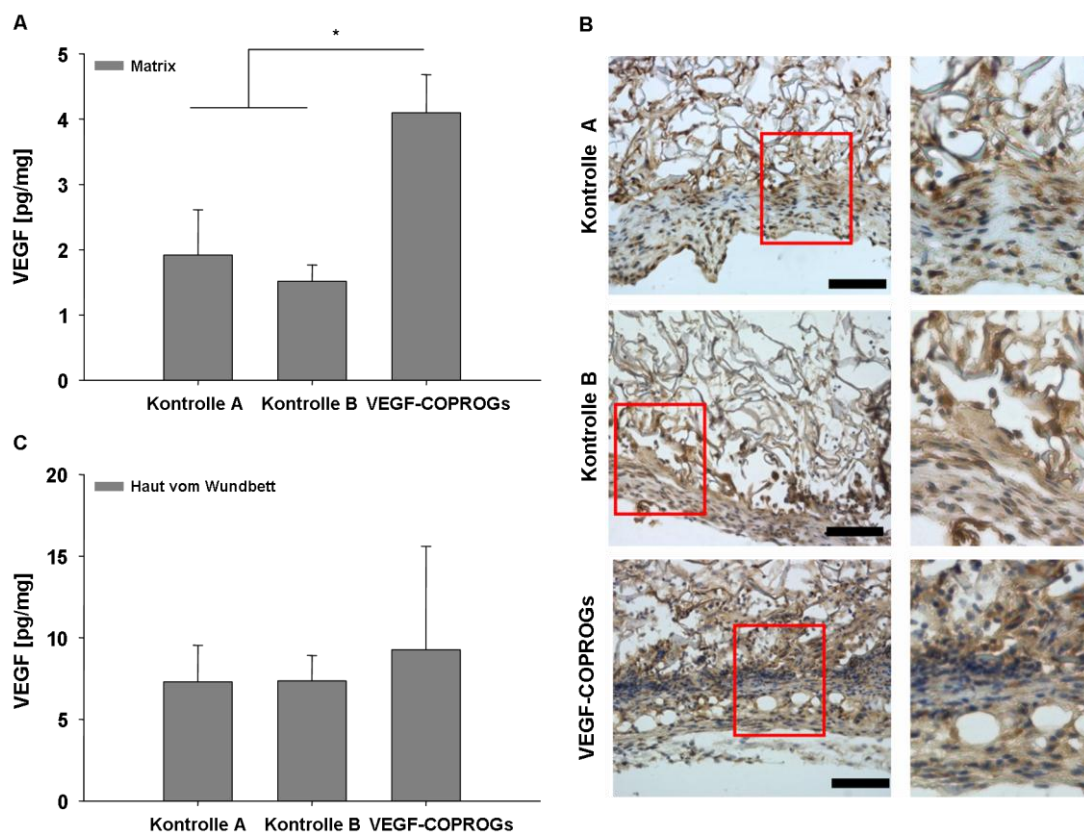


Abbildung 26: Proteinfreisetzung *in vivo*. Nach 14 Tagen wurden die Matrices dem Mause Rücken entnommen und der VEGF-Gehalt in den Matrices und in der Haut des Wundbettes separat mittels ELISA (A, C) analysiert. Die Quantifizierung zeigte eine signifikant erhöhte Menge an VEGF in den VEGF-COPROG aktivierten Matrices im Vergleich zu Kontrolle A (PBS Kontrolle) und B (Leervektor Kontrolle) (Kontrolle A = $1,9 \pm 0,7$ (n = 3); Kontrolle B = $1,5 \pm 0,3$ (n = 2); VEGF-COPROGs = $4,1 \pm 0,6$ (n = 4); * $p = 0,018$) (A). Es konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich des VEGF-Gehaltes in der Haut des Wundbettes festgestellt werden (Kontrolle A = $7,3 \pm 2,3$ (n = 3); Kontrolle B = $7,4 \pm 1,6$ (n = 2); VEGF-COPROGs = $9,3 \pm 6,3$ (n = 4); * $p = 0,873$) (C). Die immunohistochemische Analyse zeigt eine erhöhte Menge an VEGF (braune Färbung) in den genaktivierten Matrices im Vergleich zu beiden Kontrollen (B). Der Maßstab entspricht 100 µm.

4.3 Genaktive Oberflächenbeschichtung eines Poly-(ϵ -caprolacton) Knochenersatzmaterials

4.3.1 Charakterisierung der Oberflächeneigenschaften einer PDLLA-PCL-Matrix

Der elektronenmikroskopische Vergleich der Oberflächenbeschaffenheit von unbeschichtetem und PDLLA-beschichtetem PCL zeigte, dass durch PDLLA-Beschichtung eine sehr glatte Oberfläche entsteht und die Poren des Polycaprolactonmaterials mit PDLLA aufgefüllt werden (s. Abb. 27B).

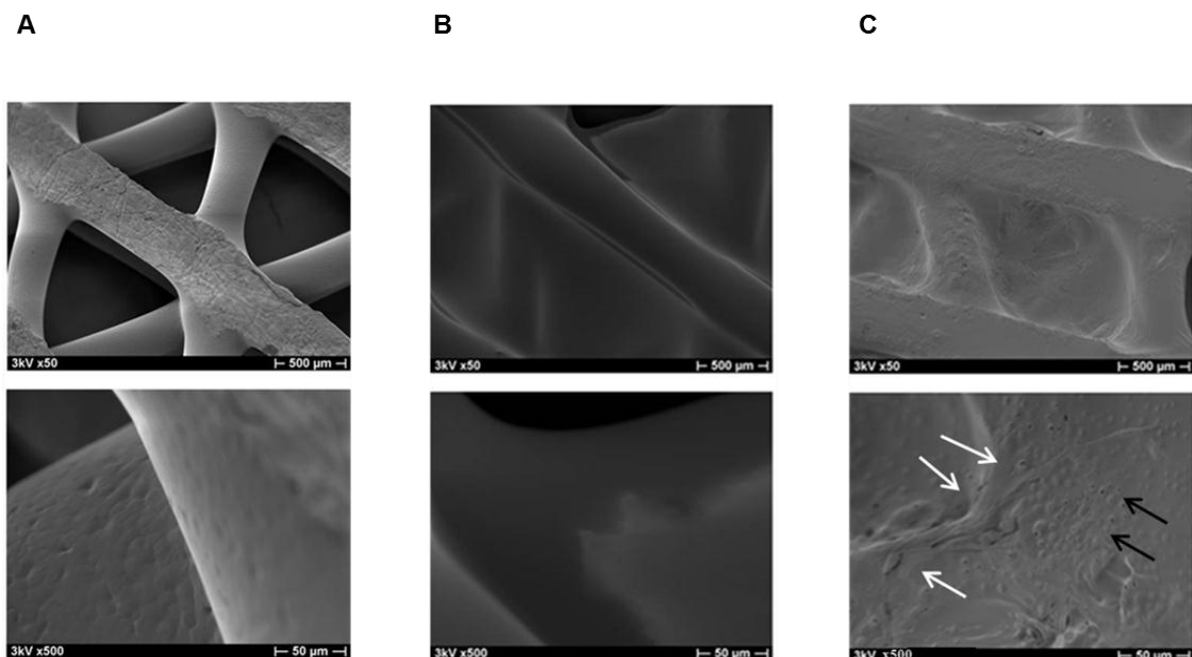


Abbildung 27: REM-Aufnahmen von nativem (A) und mit PDLLA beschichtetem Polycaprolacton ohne Zellen (B) und 5 Tage nach Aussaat von C2C12-Zellen auf mit PDLLA beschichtetem (C) Polycaprolacton. Der Maßstab entspricht 500 μm der oberen Reihe und 50 μm in der unteren Reihe.

5 Tage nach Aussaat von C2C12-Zellen auf PDLLA-beschichtetes PCL ist eine regelmäßige Verteilung von adhärennten Zellen auf der PDLLA-Oberfläche zu beobachten. Die adhärrierenden Zellen zeigen die für diese Zelllinie übliche Morphologie (s. Abb. 27C; weiße Pfeile). Unebenheiten in der Oberfläche zeigen die

begonnene Zersetzung der PDLLA Schicht (s. Abb. 27C; schwarze Peile) unter Zellkulturbedingungen.

4.3.2 Optimierung der Vektormenge für einen effizienten Gentransfer

Zur Optimierung der Konditionen für einen effizienten Gentransfer wurden unterschiedliche COPROG-Mengen (angegeben in μg pDNA) als PDLLA/Ethylacetat-Suspension auf der PCL-Matrix immobilisiert und C2C12-Zellen ausgesät. Im Anschluss wurde die Freisetzungskinetik des Reporterproteins Metridia Luciferase (s. Abb. 28A) in den Zellkulturüberstand und die metabolische Aktivität (s. Abb. 28B) der an der Matrix wachsenden C2C12-Zellen in Abhängigkeit zur aufgetragenen Genvektormenge bestimmt.

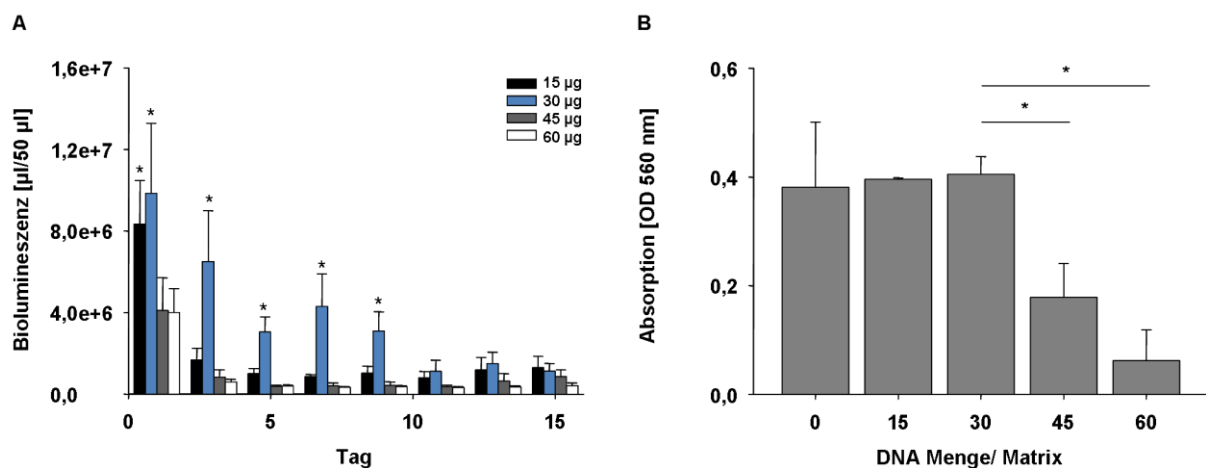


Abbildung 28: Optimierung der DNA Menge. Unterschiedliche COPROG-Mengen (angegeben relativ zur pDNA-Menge: 0; 15; 30; 45; 60 μg) kodierend für das Reporterprotein Metridia Luciferase wurden in 7,5 mg PDLLA/50 μl EtOAc suspendiert und die Proteinfreisetzung in den Zellkulturüberstand wurde beobachtet (A). An Tag 1 sind für 15 und 30 μg die höchsten Proteinmengen im Zellkulturüberstand zu detektieren. 30 μg pDNA (in Form von COPROGs) zeigte über einen Versuchszeitraum von 9 Tagen eine signifikant erhöhte Metridia Luciferase-Freisetzung im Vergleich zur genvektorfreen Kontrolle ($*p < 0,05$). Eine weitere Erhöhung der Vektormenge erzielte keine weitere Steigerung der freigesetzten Proteinmenge. 15 Tage nach Zellaussaat wurde die metabolische Aktivität der Zellen mittels MTT-Assays (B) bestimmt. Die metabolische Aktivität von Zellen auf Matrices mit 15 μg und 30 μg pDNA (in Form von COPROGs) unterschieden sich nicht von der genvektorfreen Kontrolle, jedoch konnten signifikant erniedrigte Aktivitäten bei Verwendung von 45 μg ($*p = 0,045$) und 60 μg pDNA (in Form von COPROGs) ($*p = 0,003$) gemessen werden (0 $\mu\text{g} = 0,38 \pm 0,12$; 15 $\mu\text{g} = 0,40 \pm 0,00$; 30 $\mu\text{g} = 0,41 \pm 0,03$; 45 $\mu\text{g} = 0,18 \pm 0,06$; 60 $\mu\text{g} = 0,06 \pm 0,06$; $n = 3$).

An Tag 1 war die Metridia Luciferase-Menge für 15 und 30 µg pDNA/Matrix im Zellkulturüberstand signifikant erhöht im Vergleich zur genvektorfreen Kontrolle und für 30 µg pDNA/Matrix konnte eine anhaltende signifikant erhöhte Reporterproteinfreisetzung über einen Zeitraum von 9 Tagen detektiert werden. Eine weitere Erhöhung der Vektormenge zeigte keinen weiteren Anstieg der Genexpression. Vergleicht man nun diese Werte mit der Bestimmung der metabolischen Aktivität der Zellen mittels MTT Assays bei den gleichen Matrices nach Entnahme aus der Zellkultur, ist festzustellen, dass die Quantifizierung des Formazansalzes keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konzentrationen 0 µg, 15 µg und 30 µg pDNA (in Form von COPROGs) aufwies. Die metabolische Aktivität von Zellen auf Matrices mit 45 µg und 60 µg pDNA war hingegen deutlich erniedrigt (s. Abb. 28B).

4.3.3 Expression des Wachstumsfaktors BMP-2

Nachdem eine Menge von 30 µg pDNA (in Form von COPROGs) pro 7,5 mg PDLLA in 50 µl Ethylacetat auf PCL-Matrices mit einem Durchmesser von 6 mm als optimale Kondition für einen effizienten Gentransfer festgelegt wurde, sind mit einer genaktivierten BMP-2-COPROG-PDLLA-Beschichtung versehene PCL-Matrices hinsichtlich ihrer Fähigkeit, den Wachstumsfaktor BMP-2 freizusetzen, untersucht worden (s. Abb. 29). Hier wurden BMP-2-COPROGs in einer Lösung von PDLLA in Ethylacetat suspendiert und auf PCL-Matrices aufgebracht. Die Abbildung 29A zeigt die freigesetzte BMP-2-Menge in den Zellkulturüberstand in Relation zur genvektorfreen Kontrollgruppe. An Tag 1 und 3 wurde eine signifikant erhöhte BMP-2-Menge mittels ELISA gemessen ($p < 0,05$). Die Abbildung 29B zeigt die im Homogenisat der Matrix nach 17 Tagen Zellkultur nachgewiesene BMP-2-Menge.

Bei einem ersten Versuch der Homogenisierung der Matrix in PBS konnte kein BMP-2 nachgewiesen werden. In einem zweiten Versuch wurde die Matrix in 2M Guanidin-HCl homogenisiert und darauffolgend konnte eine erhöhte BMP-2-Menge im Homogenisat festgestellt werden. Die mit BMP-2-COPROGs oberflächenaktivierte PCL-Matrix weist eine BMP-2-Menge von durchschnittlich 12 pg/mg Gesamtprotein im Homogenisat der Matrix auf. Dies entspricht dem 8-fachen BMP-2-Gehalt in Relation zur nicht genaktivierten Kontrollgruppe ($p = 0,067$).

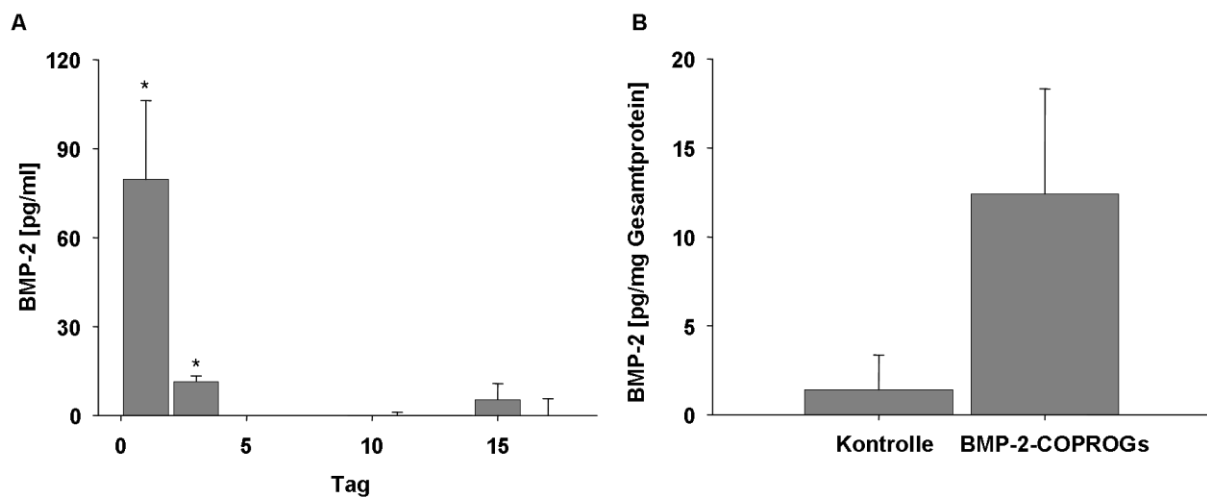


Abbildung 29: BMP-2 Expression nach Transfektion über genaktivierte Oberflächen. Die BMP-2-Freisetzung in den Zellkulturüberstand von COPROG-PDLLA-beschichteten PCL-Oberflächen wurde über einen Versuchszeitraum von 17 Tagen im Zellkulturüberstand (A) und im Homogenisat des Materials in 2M Guanidin-HCl nach 17 Tagen in der Zellkultur mit C2C12-Zellen (B) bestimmt. A zeigt an Tag 1 und 3 eine signifikant erhöhte Menge an BMP-2 im Zellkulturüberstand ($*p < 0,05$). Im Homogenisat der Matrix wurde eine deutlich erhöhte BMP-2-Menge detektiert (Kontrolle = $1,4 \pm 1,9$; BMP-2-COPROGs = $12,4 \pm 5,9$; $n = 3$; $*p = 0,067$).

4.3.4 Untersuchung der biologischen Aktivität

Um eine Aussage zur biologischen Aktivität einer Matrix, die BMP-2 nach Zelltransfektion abgibt zu überprüfen, wurden Parameter wie die Produktion von Osteocalcin (s. Abb. 30) und Osteopontin (s. Abb. 31B) in Abhängigkeit von der BMP-2-Freisetzung und die Aktivität der alkalischen Phosphatase (Abb. 31A) der auf der Matrix wachsenden C2C12-Zellen bestimmt.

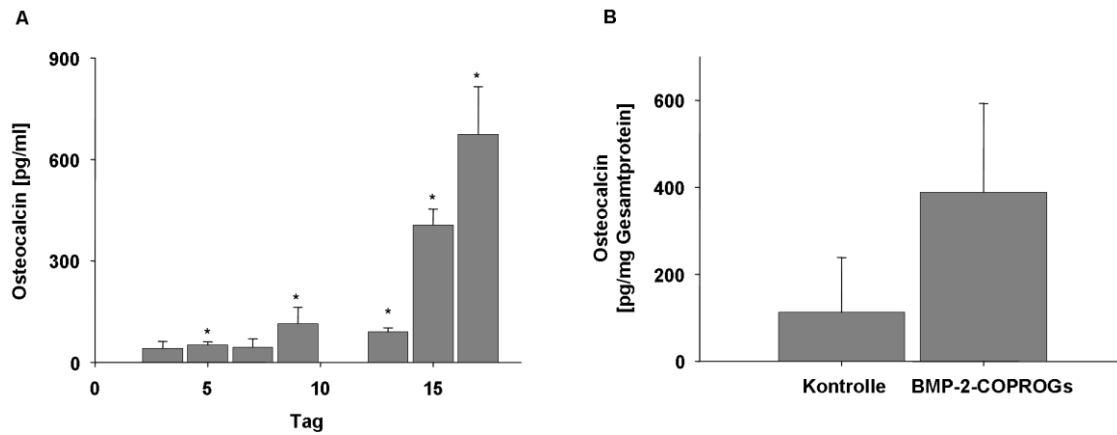


Abbildung 30: Bestimmung des Osteocalcingehaltes. Über einen Zeitraum von 17 Tagen wurde die Freisetzung von Osteocalcin von mit C2C12-Zellen besiedelten BMP-2-COPROG-PDLLA beschichtetem Polycaprolacton in den Zellkulturüberstand beschrieben (A). Dargestellt ist die mittels ELISA detektierte Mehrproduktion in Relation zur nicht genaktivierten Kontrolle. An Tag 5, 9, 13, 15 und 17 wurden signifikant erhöhte Osteocalcin-Mengen detektiert (* $p < 0,05$). B zeigt die deutlich erhöhte Osteocalcin-Menge im Homogenisat der Matrix nach 17 Tagen in der Zellkultur in Relation zur genvektorfreien Kontrolle (Kontrolle = $112,4 \pm 126,3$; BMP-2-COPROGs = $388,3 \pm 204,8$; $n = 3$; * $p = 0,180$).

In der Abbildung 30 ist die Freisetzung von Osteocalcin durch auf einer BMP-2-COPROG-PDLLA genaktivierten Oberfläche wachsenden C2C12-Zellen in Relation zur nicht genaktivierten Kontrollgruppe in den Zellkulturüberstand dargestellt. Eine signifikant erhöhte Freisetzung ist ab Tag 5 zu beobachten und ab dem 11. Zellkulturtag steigt diese im weiteren Verlauf kontinuierlich an ($p < 0,05$) (s. Abb. 30A).

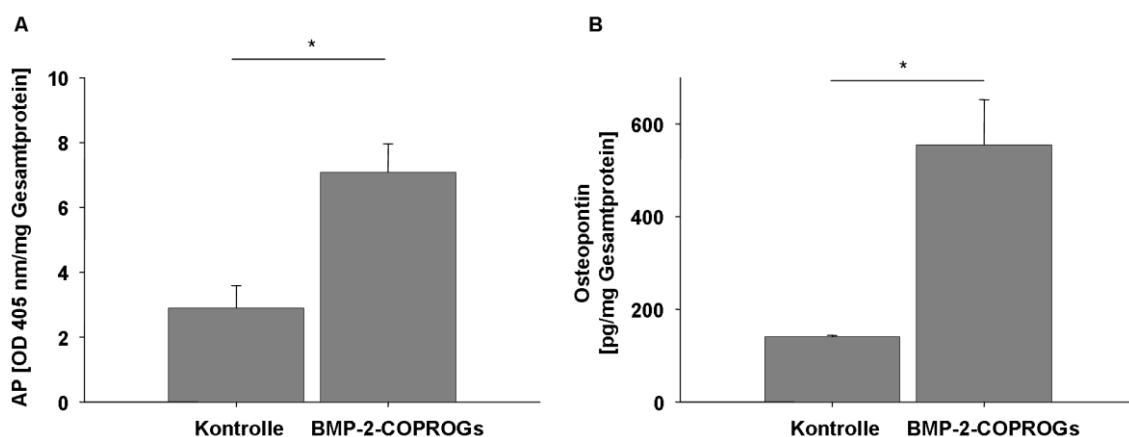


Abbildung 31: 17 Tage nach Aussaat von C2C12-Zellen auf BMP-2-COPROG-PDLLA beschichtete PCL-Matrizes wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase (A) und der Osteopontin-Gehalt (B) im Homogenisat der Matrix untersucht. Beide Parameter sind in Relation zur genvektorfreien Kontrolle signifikant erhöht (A: Kontrolle = $2,9 \pm 0,7$; BMP-2-COPROGs = $7,1 \pm 0,9$; $n = 3$; * $p = 0,006$ / B: Kontrolle = $140,5 \pm 3,4$; BMP-2-COPROGs = $554,7 \pm 98,1$; $n = 3$; * $p = 0,004$).

Das Homogenisat der Matrix zeigte einen 3,5-fach erhöhten Osteocalcin-Gehalt 17 Tage nach Zellaussaat im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb. 30B). Die Aktivität der AP (s. Abb. 31A) von C2C12-Zellen 17 Tage nach Aussaat auf BMP-2-freisetzenden Matrices und die Osteopontinmenge (s. Abb. 31B) ist in Relation zu genvektorfreen Kontrollmatrices signifikant erhöht ($p < 0,05$).

4.4 Entwicklung einer dualen genaktivierten Matrix

4.4.1 Vorversuch: genetische Aktivierung einer Kollagen Typ I Matrix

Nachdem in Abschnitt 4.2. bereits gezeigt werden konnte, dass Kollagen Typ II Matrices mit darauf immobilisierten geschützten Genvektoren aktiviert werden können, wurde diese Technologie daraufhin untersucht, ob durch sie Kollagen Typ I Matrices mit erhöhter osteoinduktiver Aktivität erzeugt werden können. Zuerst wurde mit dem Reporter Metridia Luciferase überprüft, ob diese Technologie auch mit dem hier verwendeten Material kompatibel und eine adäquate Genexpression zu erzielen ist.

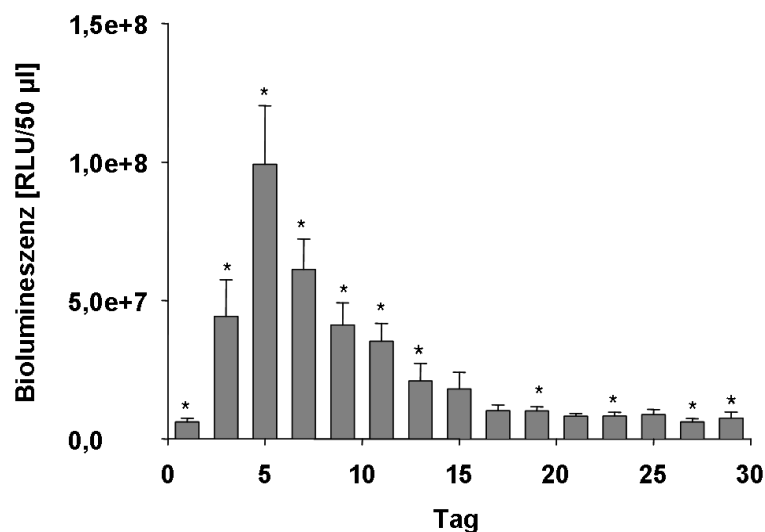


Abbildung 32: Metridia Luciferase Freisetzung von genaktivierten Kollagen Typ I Matrices. Primäre Chondrozyten wurden auf Kontroll- oder COPROG-aktivierte Kollagen Typ I Matrices ausgesät und die Metridia Luciferase-Freisetzung in den Zellkulturüberstand wurde analysiert. Die Freisetzung von Metridia Luciferase war mit einem Peak an Tag 3 bis Tag 11 über einen Zeitraum von 29 Tagen signifikant erhöht in Relation zur Kontrollgruppe (* $p < 0,05$).

Die Freisetzung des Proteins Metridia Luciferase wurde über den gesamten Versuchszeitraum beobachtet und es konnte festgestellt werden, dass ab dem 1. Tag nach Zellaussaat eine signifikant erhöhte Metridia Luciferase-Menge mit einem Peak von Tag 3 bis Tag 11 über einen Zeitraum von 29 Tagen ($p < 0,05$) im Zellkulturüberstand nachzuweisen war (s. Abb. 32). Im Anschluss wurden COPROGs, die für BMP-2 kodieren, in eine Kollagen Typ I Matrix eingebracht und

die Freisetzung des Wachstumsfaktors wurde *in vitro* mittels ELISA quantifiziert (s. Abb. 33).

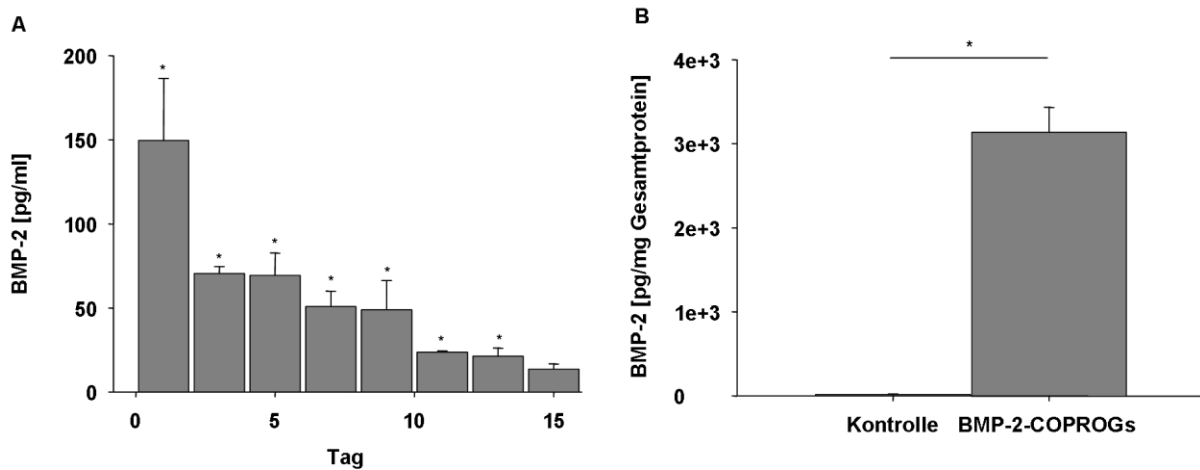


Abbildung 33: BMP-2 Produktion auf genaktivierten Matrices. Primären Chondrozyten wurden in Kontroll- oder BMP-2-COPROG aktivierte Kollagen Typ I Matrices ausgesät und die BMP-2-Menge wurde mittels ELISA im Zellkulturüberstand (A) und im Homogenisat der Matrix (B) analysiert. An Tag 1 wurde ein Maximum der BMP-2-Freisetzung in den Zellkulturüberstand beobachtet. BMP-2 war über einen Zeitraum von 15 Tagen in Relation zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (* $p < 0,05$) (A). Die Bestimmung des BMP-2-Gehaltes in den homogenisierten Matrices 15 Tage nach Aussaat der Zellen zeigte eine 195 fache Steigerung im Vergleich zu den Kontrollmatrices (Kontrolle= $68,7 \pm 35,8$; BMP-2-COPROGs= $2592,2 \pm 246,4$; $n = 3$; * $p < 0,001$) (B).

Primäre Chondrozyten, die auf die genaktivierten Matrices ausgesät wurden, sind in der Lage, BMP-2 konstant über einen Zeitraum von zumindest 15 Tagen freizusetzen. BMP-2-Konzentrationen von 13 bis 150 pg/ml Zellkulturüberstand mit einem Peak an Tag 1 konnten bestimmt werden (s. Abb. 33A). 15 Tage nach der Zellaussaat wurden die Matrices homogenisiert und der BMP-2-Gehalt mittels ELISA bestimmt. Durchschnittlich waren 3136 pg BMP-2/mg Gesamtproteingehalt in den genaktivierten Matrices nachzuweisen, was eine 195-fache Erhöhung der BMP-2 Menge in Relation zu den Kontrollmatrices darstellt (s. Abb. 33B) ($p < 0,001$).

4.4.1.1 Untersuchung der biologischen Aktivität der genaktivierten Kollagen Typ I Matrix

Um zu evaluieren, ob diese BMP-2-Menge eine biologische Aktivität besitzt, wurde der Osteocalcin- und Aggrecan-Gehalt mittels ELISA und die Aktivität der alkalischen Phosphatase in den Proben analysiert und eine histologische Untersuchung durchgeführt.

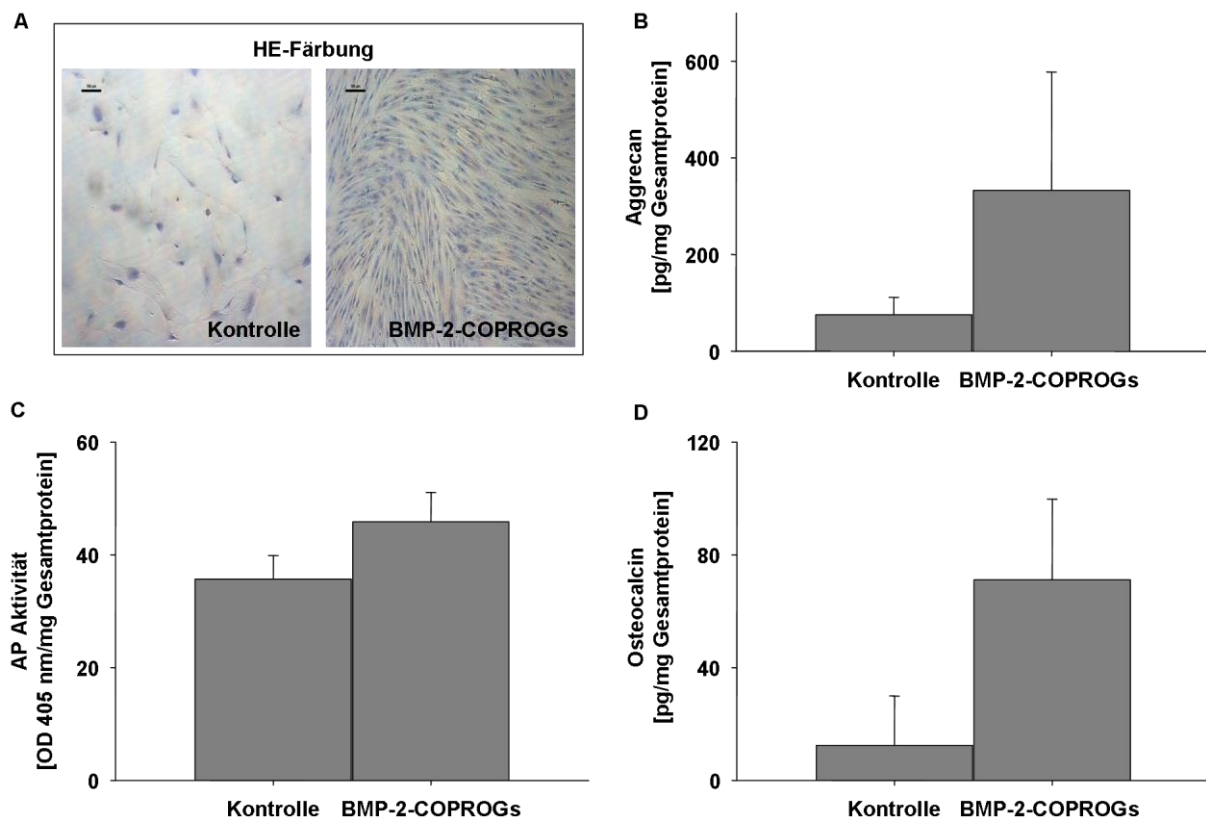


Abbildung 34: Untersuchung der biologischen Aktivität einer genaktivierten Kollagen Typ I Matrix. 15 Tage nach Aussaat von primären Chondrozyten wurden die aus der Matrix ausgewachsenen Zellen HE gefärbt (A) und der Aggrecan-Gehalt (B), die Aktivität der alkalischen Phosphatase (C) und die Osteocalcinmenge (D) in den homogenisierten Matrices bestimmt. A zeigt eine deutlich stärkere Proliferation von Zellen, die aus einer BMP-2-COPROG-aktivierten Matrix auswuchsen im Vergleich zur genvektorfreen Kontrolle. Der Maßstab entspricht 100 µm. Der Aggrecan- und Osteocalcin-Gehalt wurde mittels ELISA bestimmt und war in beiden Fällen deutlich erhöht (B, D). C zeigt eine ebenfalls erhöhte Aktivität der alkalischen Phosphatase von Zellen auf BMP-2-COPROG aktivierten Matrices. (B: Kontrolle = 75,1 ± 36,2; BMP-2-COPROGs = 332,7 ± 245,0; n = 3; *p = 0,215/ C: Kontrolle = 35,7 ± 4,2; BMP-2-COPROGs = 45,8 ± 5,2; n = 3; *p = 0,099/ D: Kontrolle = 12,4 ± 17,5; BMP-2-COPROGs = 71,2 ± 28,6; n = 3; *p = 0,068).

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase (s. Abb. 34C) und der Aggrecan- (s. Abb. 34B) und Osteocalcin- (s. Abb. 34D) Gehalt waren durch die Aktivierung der Matrices mit BMP-2-COPROGs erhöht. Die histologische Auswertung der aus der Matrix ausgewachsenen Zellen deutete auf eine stark erhöhte Proliferation der Chondrozyten von BMP-2-COPROG-aktivierten Matrices im Vergleich zur Kontrolle hin (s. Abb. 34A).

4.4.2 COPROG-PDLLA-Beschichtung einer genaktivierten Kollagen Typ I Matrix

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Kollagen Typ I Matrices mit BMP-2-COPROGs bioaktiviert werden können, sollten nun in einem ersten Versuch die optimalen Bedingungen zur Freisetzung des Reporterproteins SEAP aus einer PDLLA-Schicht auf dieser Kollagen Typ I Matrix bestimmt werden. Hierzu wurden SEAP-COPROGs in unterschiedlich konzentrierten Lösungen von PDLLA in EtOAc suspendiert.

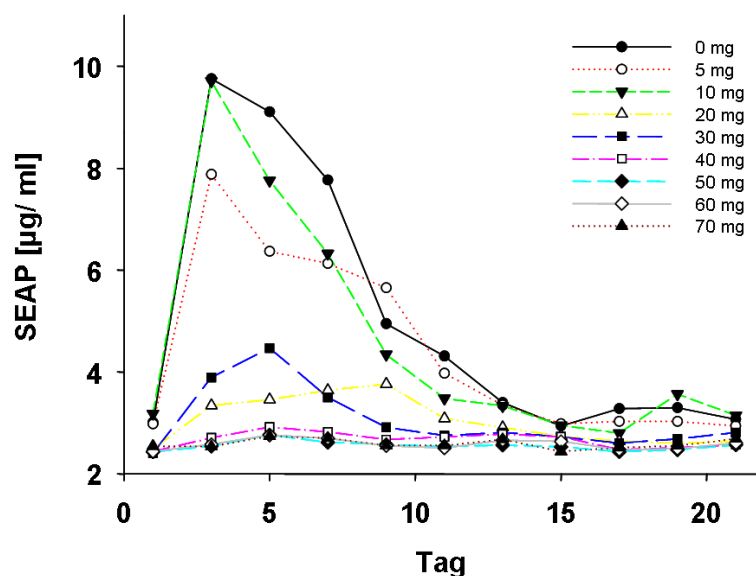


Abbildung 35: Bestimmung des optimalen Verhältnisses von COPROGs (je 33µg pSEAP pro PDLLA-Schicht) zur PDLLA-Menge (0-70 mg) auf einer Kollagen Typ I Matrix. Die SEAP-Menge wurde jeden 2. Tag bioluminometrisch über einen Zeitraum von 21 Tagen bestimmt und in µg SEAP/ml Zellkulturüberstand wiedergegeben.

Nach COPROG-PDLLA-Beschichtung von Kollagen Typ I Matrices wurden NIH3T3-Zellen ausgesät und darauffolgend die Abhängigkeit der SEAP-Expression bzw. Freisetzung von der PDLLA-Konzentration beobachtet. Bis zu einer Konzentration von 10 mg PDLLA/Matrix war ein effektiver Gentransfer möglich. Ein Expressionspeak an Tag 3 und eine Freisetzungsdauer über zumindest 10 Tage war zu beobachten. Höhere Mengen an PDLLA verringerten die Genexpression oder verhinderten sie sogar völlig (s. Abb. 35). Mit diesen Informationen wurde nun in einem weiteren Experiment die PDLLA-Menge bestimmt, die eine verzögerte Transgenexpression verursacht.

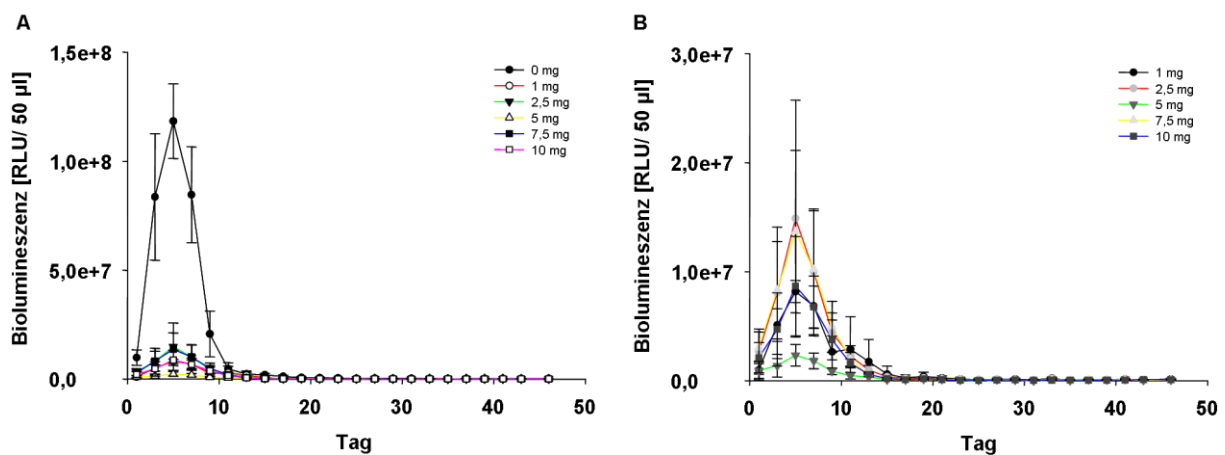


Abbildung 36: Beobachtung der Metridia Luciferase Expression von einer mit PDLLA beschichteten genaktivierten Kollagen Typ I Matrix. Pro Kollagen Typ I Matrix wurden 33 µg pMetLuccontrol (in Form von COPROGs) wässrig aufgebracht und diese nach Lyophilisierung mit unterschiedlichen PDLLA Mengen (0-10 mg) in EtOAc beschichtet. Die Metridia Luciferase-Menge wurde jeden 2. Tag bioluminometrisch über einen Zeitraum von 45 Tagen bestimmt und in relativen Lichteinheiten (RLU)/50 µl Zellkulturüberstand wiedergegeben.

Hierzu wurden Kollagen Typ I Matrices mit einer wässrigen Lösung von Metridia Luciferase-COPROGs beladen und anschließend lyophilisiert. Nun wurden diese Matrices mit unterschiedlichen Mengen an PDLLA (0–10 mg) beschichtet und die Metridia Luciferase-Freisetzung in den Zellkulturüberstand wurde nach Aussaat von NIH3T3-Zellen beobachtet. Die Expressionsanalyse ergab eine deutliche

Verminderung der Genexpression bereits bei einer Menge von 1 mg PDLLA pro Matrix. Der erwartete Anstieg der Expression nach mehreren Tagen blieb völlig aus (s. Abb. 36). Selbst nach einer Versuchsdauer von 45 Tagen war kein Metridia Luciferase-Anstieg im Zellkulturüberstand zu detektieren.

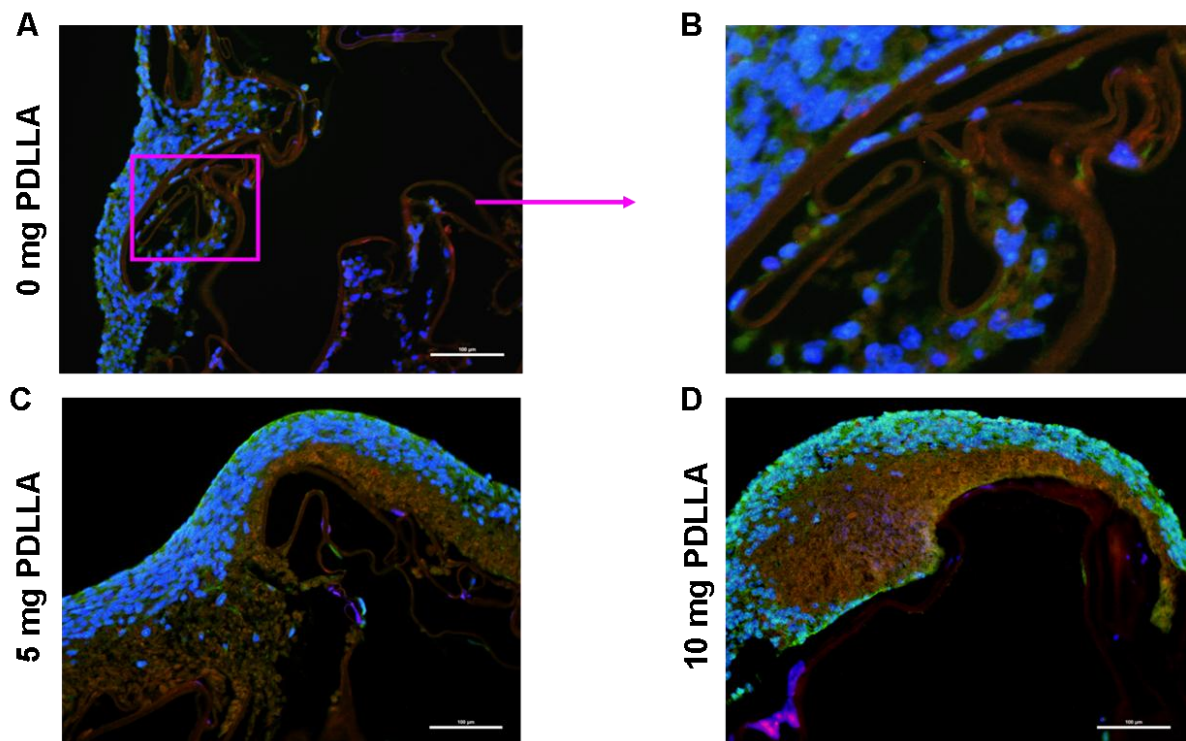


Abbildung 37: Zellcharakterisierung in mit PDLLA beschichteten Kollagen Typ I Matrices. NIH3T3-Zellen wurden auf mit unterschiedlichen PDLLA-Mengen (0 – 10 mg) beschichteten Kollagen Typ I Matrices ausgesät. 45 Tage danach wurde die Verteilung der Zellen (blau/ DAPI) in der Matrix (rot-orange/ Autofluoreszenz) und das Anwachsen mittels Aktinfärbung (grün/ Phalloidin- FITC) analysiert. Dargestellt sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von DAPI/Phalloidin-FITC gefärbten Paraffinschnitten der Matrices mit 0 mg (A, B), 5 mg (C) und 10 mg (D) PDLLA-Beschichtung. Der Maßstab entspricht 100 μ m.

Um herauszufinden, was der Grund für dieses unerwartete Expressionsmuster ist, wurden histologische Untersuchungen zum Verteilungs- und Anheftungsverhalten der Zellen durchgeführt. Die Abbildung 37 zeigt eine inhomogene Zellverteilung bei allen drei untersuchten PDLLA-Beschichtungsmengen (0 mg, 5 mg, 10 mg PDLLA). Zellen wachsen in das unbeschichtete Material ein und adhärieren (s. Abb. 37A, B), jedoch sind große Poren auch nach einer Zellkulturdauer von 45 Tagen

unbewachsen. Nach der Beschichtung des Materials mit 5 mg PDLLA ist eine Zellschichtbildung auf der Laktidschicht und nur noch vereinzelte Zellen innerhalb der Kollagen Typ I Matrix zu sehen. Die DAPI Anfärbung der Nuklei zeigt, dass diese vorrangig im oberen Bereich der Zellschicht nachzuweisen waren (s. Abb. 37C). Bei den mit 10 mg PDLLA beschichteten Matrices ist diese Zellaufschichtung ebenfalls deutlich zu erkennen, aber es konnten keine Zellen in tiefergelegenen Bereichen der porösen Kollagen Typ I Matrix nachgewiesen werden (s. Abb. 37D). Eine elektronenmikroskopische Analyse sollte weitere Details zur Beschaffenheit des Materials und dem Verhalten der Zellen darauf geben. In Abbildung 38 ist die Aufsicht auf unbesiedelte Matrices mit steigender PDLLA-Menge dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass durch die Beschichtung mit steigender PDLLA-Menge eine kontinuierlich dichter werdende glatte PDLLA-Schicht die Kollagen Typ I Matrix überzieht. Nach Aussaat von NIH3T3-Zellen sind in der Aufsicht keine Unterschiede bzgl. des Anwachsens, der Verteilung und der Morphologie der Zellen festzustellen (s. Abb. 39). Nach der Beobachtung von Querschnitten der unbesiedelten und besiedelten Matrices mit steigender PDLLA-Menge sind jedoch deutlich Unterschiede zu erkennen (s. Abb. 40). Die unbeschichteten Matrices sind dicht mit Zellen bewachsen und auch einige Poren weisen dichte Zellverbände auf (s. Abb. 40E). Mit steigender PDLLA-Menge nimmt die Dicke der Zellschicht an der Oberfläche zu (s. Abb. 40E-I). Nach Beschichtung mit 1 mg PDLLA sind noch vereinzelte Zellen in Poren zu sehen (s. Abb. 40F). Ab einer PDLLA-Menge von 5 mg zeigten sich zwar deutliche Zellaufschichtungen an der Oberfläche des Materials, jedoch keine Zellen innerhalb der Matrix (s. Abb. 40G, H, I).

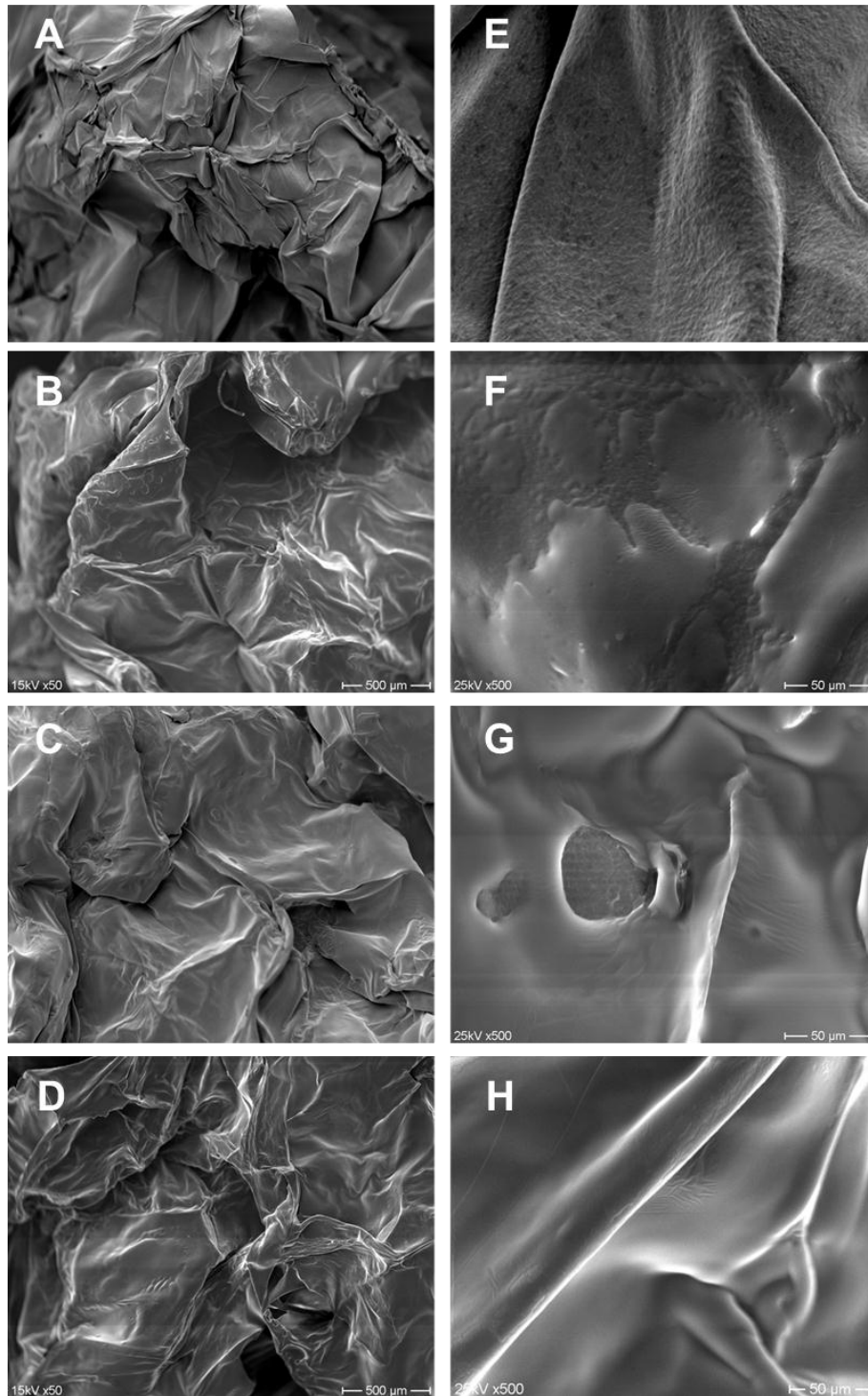


Abbildung 38: REM-Aufnahmen der Oberfläche von unbesiedelten, unbeschichteten (A, E) und mit 1 mg (B, F), 5 mg (C, G) und 10 mg (D, H) PDLLA beschichteten Kollagen Typ I Matrices. Mit steigender PDLLA-Menge ist eine zunehmend dichtere glatte Schichtbildung zu erkennen. Der Maßstab entspricht 500 µm (A-D) und 50 µm (E-H).

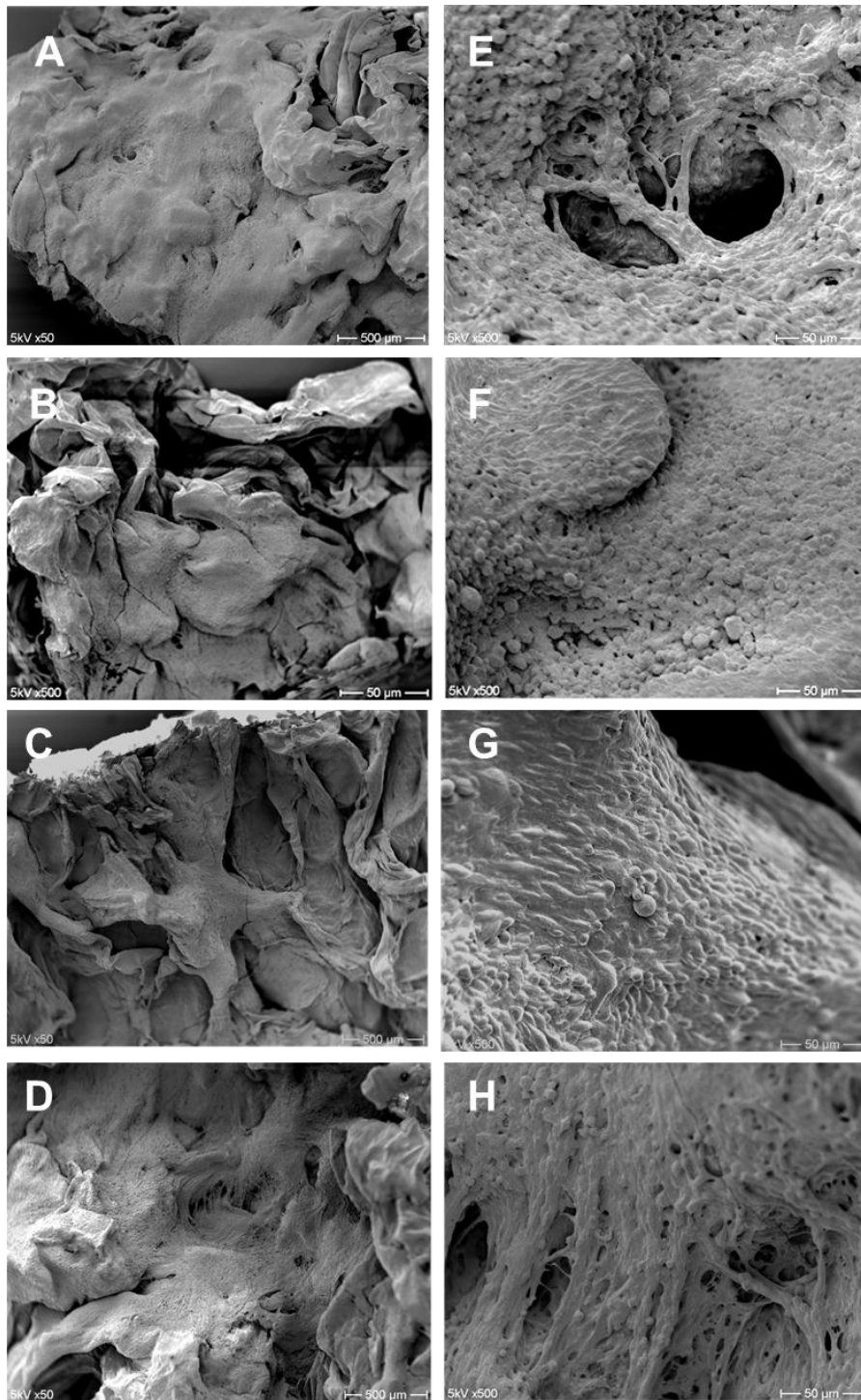


Abbildung 39: REM-Aufnahmen der Oberfläche von mit NIH3T3-Zellen besiedelten unbeschichteten (A, E) und mit 1 mg (B, F), 5 mg (C, G) und 10 mg (D, H) PDLLA beschichteten Kollagen Typ I Matrices. Es sind keine Unterschiede hinsichtlich der Verteilung oder Morphologie der Zellen auf der Oberfläche der Matrix zu erkennen. Der Maßstab entspricht 500 µm (A-D) und 50 µm (E-H).

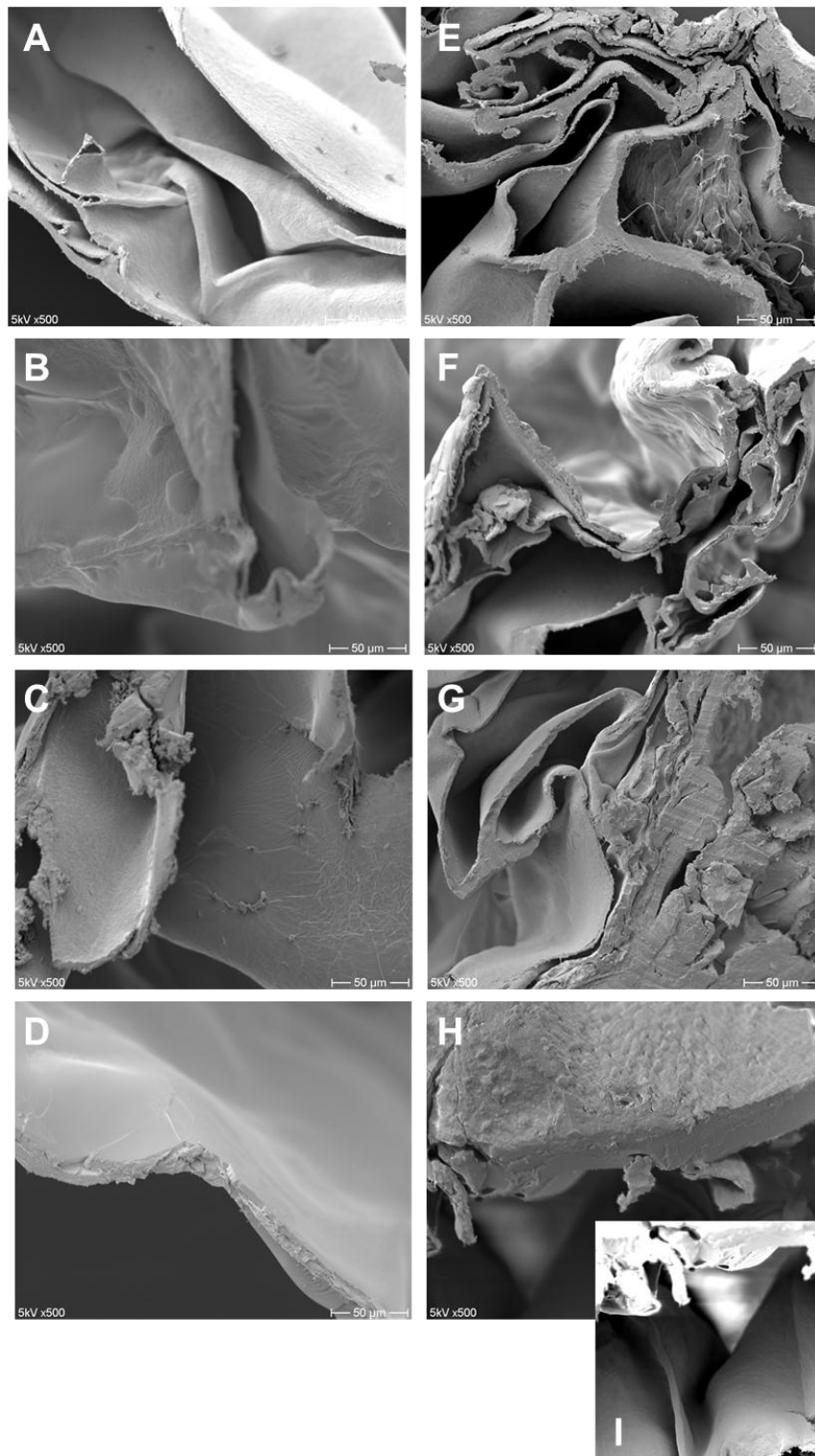


Abbildung 40: REM-Aufnahmen des Querschnittes von unbesiedelten (A-D) und mit NIH3T3-Zellen besiedelten (E-I) PDLLA-beschichteten Kollagen Typ I Matrices mit steigender PDLLA-Menge (0, 1, 5, 10 mg). Mit steigender PDLLA-Menge ist eine zunehmend dickere Schichtbildung zu erkennen. Die anwachsenden Zellen unterscheiden sich nicht hinsichtlich ihrer Morphologie, jedoch ist das Eindringen in tiefer gelegene Poren der Matrix mit steigender PDLLA-Menge deutlich behindert. I fokussiert die tiefer gelegenen Regionen von H. Der Maßstab entspricht 50 µm.

5 Diskussion

5.1 Klonierungsarbeiten

Bei der gleichzeitigen genetischen Aktivierung einer Matrix mit zwei unterschiedlichen Plasmiden ist es von Vorteil, wenn beide verwendeten Plasmide möglichst ähnliche strukturelle Eigenschaften besitzen. Um dies zu gewährleisten, wurde neben dem käuflich erworbenen Reporterplasmid pMetLuccontrol ein weiteres Reporterplasmid (pSEAP) und ein entsprechendes Kontrollplasmid (pMetLucDel), das keine für ein Protein kodierende Sequenz enthält, kloniert. Diese zusätzliche Kontrolle sollte vor allem in den durchgeführten *in vivo* Versuchen sicherstellen, dass eventuelle physiologische Effekte nicht auf unspezifischen Reaktionen auf das Vektorsystem selbst zurückzuführen sind, sondern auf die Expression der therapeutischen Gene. Die neu klonierten Plasmide entsprachen in Identität, Qualität (s. Abb. 17 und 18) und Funktionalität (s. Abb. 19), den gewünschten Anforderungen. Der Vergleich der SEAP-Expression des neu klonierten Plasmids pSEAP und des kommerziell verfügbaren Ausgangsplasmids pSEAP2control ergab, dass sich die SEAP-Expressionen nicht signifikant unterscheiden (s. Abb. 19A). Demnach wurde durch die strukturellen Veränderungen im Plasmidrückgrat das Ausmaß der Transfektion nicht nachteilig beeinflusst und somit zeigten pSEAP und pSEAP2control die gleiche Funktionalität bezüglich ihrer Expressionseigenschaften. pSEAP setzte bereits bei niedrigeren N/P-Verhältnissen eine signifikant erhöhte Menge an SEAP in Relation zu untransfizierten Zellen frei. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass Veränderungen in der resultierenden Plasmidgröße einen positiven Effekt auf die Transfektionseffizienz haben können. Die Expression von Metridia Luciferase durch die Transfektion von NIH3T3-Zellen mit pMetLuccontrol war in allen N/P-Verhältnissen signifikant erhöht

im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle (pMetLucDel), hier konnte keine Metridia Luciferase im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden (Abb. 19B).

5.2 Untersuchung des Potentials eines genaktivierten künstlichen Hautersatzes zur verbesserten dermalen Regeneration

In dieser Studie sollte gezeigt werden, dass genaktivierte Matrices, beladen mit COPROGs die für therapeutische Proteine kodieren, in der Lage sind, eine regenerative Mikroumgebung während des Wundheilungsprozesses zu kreieren. Ungenügende Vaskularisierung ist eines der Hauptprobleme in matrixvermittelter Geweberegeneration [192]. In der Abwesenheit von Blutgefäßen können weder Sauerstoff oder Nährstoffe, noch Immunzellen das Wundgebiet erreichen. Die Konsequenzen sind schlechte Regenerations- und hohe Infektionsraten. Biomatrices dienen als Strukturgerüst und Substrat für Zellwachstum und gehen alleine eingesetzt mit limitierter Regenerationskapazität einher. Durch die Bioaktivierung einer solchen Matrix mit COPROGs konnte hier eine Verbesserung des regenerativen Potentials gezeigt werden. Weder die Mikrostruktur (s. Abb. 20) noch das Verhalten der Zellen auf der Matrix (s. Abb. 22B, C) wurde durch diese Technologie negativ beeinflusst. Die Expression des Reporterproteins Metridia Luciferase ergab eine optimale DNA-Dosis (in Form von COPROGs) von 0,45 µg pDNA/mg Matrix, d.h. 12,5 µg pDNA/Ø 6 mm Matrix (s. Abb. 20). Überraschenderweise konnte eine weitere Erhöhung der DNA-Menge *in vitro* die Genexpression nicht weiter steigern. VEGF ist ein ausgiebig beschriebener Wachstumsfaktor, der ausführliche Verwendung in Vaskularisierungsstrategien im Bereich der Geweberegeneration findet [96, 193, 194]. In dieser Studie wurde die VEGF-Freisetzung von COPROG-aktivierten Matrices *in vitro* und *in vivo* untersucht.

Die Kinetik der Genexpression war bei der Verwendung von VEGF und Reporterprotein ähnlich (s. Abb. 20 und 23A). Ein Maximum an VEGF-Freisetzung in den Zellkulturüberstand an Tag 5 und eine anhaltende Freisetzung für mindestens 21 Tage wurde beobachtet. Um diese Ergebnisse in *in vivo* Konditionen zu übersetzen, wurde eine Studie durchgeführt, die das Konzept belegen sollte. Dort konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, Zellen des Wundgebietes lokal über COPROG-aktivierte Kollagen Typ II Matrices zu transfizieren. In beiden Studien, *in vitro* und *in vivo*, wurden hohe Mengen an VEGF in den homogenisierten Matrices gefunden (s. Abb. 23C und 26A). Histologische Untersuchungen zeigten, dass VEGF hauptsächlich im Zytoplasma der Zellen, aber auch direkt an das Kollagengerüst gebunden vorlag (s. Abb. 23C, D und 26B). Zur Berücksichtigung von Sicherheitsbedenken im Zusammenhang mit der systemischen Verteilung von Wachstumsfaktoren wurde die VEGF-Menge in der Haut des Wundgrenzgebietes untersucht und die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollen A (PBS Kontrolle) und B (Leervektorkontrolle) und den VEGF-COPROG-aktivierten Matrices (s. Abb. 26C). Dies deutet darauf hin, dass die Verwendung von genaktivierten Matrices beides darstellen kann, eine konstante Quelle zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren und ein lokales VEGF-Reservoir im Wundgebiet. Transilluminierete VEGF-COPROG-aktivierte Matrices erscheinen gelbrötlich (s. Abb. 25A). Um weitere Details zur Ursache zu evaluieren, wurden histologische Analysen der explantierten Matrices durchgeführt. In den VEGF-COPROG-aktivierten Matrices konnten erhöhte Mengen an nicht adhätierenden Zellen, im besonderen Erythrozyten (s. Abb. 25B; rote Pfeile) und vWF (s. Abb. 25C) gefunden werden. Die Kontrollen A und B zeigten vergleichbare Eigenschaften bezüglich Zellmorphologie und – verteilung und des vWF-Gehaltes in der Matrix (s.

Abb. 25B, C). Diese Ergebnisse zeigen, dass die beobachteten Effekte aufgrund der Expression von VEGF entstanden sind und nicht auf unspezifische Reaktionen auf das Vektorsystem selbst zurückzuführen sind. Zudem ist zu vermuten, dass die erhöhte VEGF-Menge in der Matrix die Formation von durchlässigen Gefäßen zur Folge hatte [195]. Die Bildung von stabilen Gefäßen beruht nicht alleine auf der Wirkung von VEGF. Verschiedene Studien konnten bereits die Entwicklung von durchlässigen oder schlecht organisierten Blutgefäßen nach exogener Zufuhr von VEGF belegen [102, 196, 197]. „Fibroblast growth factors“ (FGF) und „platelet derived growth factors“ (PDGF) spielen entscheidende Rollen in der Stabilisierung der Gefäßwand [198, 199]. Nicht vollendete Bildung von Gefäßen resultiert in einer erhöhten Menge an Blutzellen in der Matrix. vWF wird durch die Interaktion mit Kollagen aktiviert und ist somit hoch reaktiv hinsichtlich vorbeifließender Thrombozyten [200], somit kann der hohe vWF-Gehalt in den VEGF-COPROG aktivierten Matrices teilweise mit der Aktivierung von Thrombozyten im Anschluss an die Bildung von durchlässigen Gefäßen erklärt werden. In dieser Studie wurden genaktivierte Matrices direkt in einen Vollhautdefekt eingesetzt, und die Zellen des Wundgebietes wurden nach Infiltration in das Material transfiziert und darauffolgend VEGF produziert. Die lokale VEGF-Dosis im Wundgebiet und die räumliche und zeitliche Kontrolle der Freisetzung sind von besonderer Bedeutung bei der Formation eines stabilen und funktionsfähigen vaskularen Netzwerks [201]. Obwohl in dieser Studie ein deutlicher physiologischer Effekt durch die Verwendung von VEGF-COPROG-aktivierten Matrices zu beobachten war, ist es notwendig, weitere Optimierungsstudien *in vivo* zur Feinabstimmung des Systems durchzuführen.

5.3 Osteogene Transdifferenzierung von C2C12-Zellen über eine COPROG-PDLLA-beschichtete PCL-Matrix

Die aktuelle Herausforderung in der matrixvermittelten Therapie von nicht oder nur insuffizient spontan heilenden Knochendefekten ist neben der Bereitstellung von osteokonduktiven und -induktiven Eigenschaften, mechanischer Stabilität und Belastbarkeit eines Implantates, die Gewährleistung einer ausreichenden Integrität im Wundgebiet [202]. Rekombinante Wachstumsfaktoren werden erfolgreich zur verbesserten Knochenheilung eingesetzt und mehrere durch die FDA freigegebene Produkte sind bereits auf dem Markt [144, 203]. Verschiedene Studien belegen eine verbesserte Knochenheilung bei Verwendung von mit rekombinanten BMPs aktivierten PDLLA-beschichteten Metallimplantaten [77, 204]. Im Hinblick auf die optimierte Regenerationsfähigkeit zeigte eine Studie zur Untersuchung des Potentials einer Fibrinkleberbeschichtung der in dieser Arbeit verwendeten PCL-Matrix als Träger von rekombinatem BMP-2 (rhBMP-2) eine nur kurz nachweisbare Freisetzung von BMP-2 *in vitro* [205]. Der gesamte Prozeß der Frakturheilung dauert unter natürlichen Bedingungen etwa 20 Wochen [139], somit bedarf es einer anhaltenden Bereitstellung von osteoinduktiven Faktoren. Dies ist mit rekombinanten Proteinen unter Berücksichtigung von dosisabhängigen systemischen Nebenwirkungen nur schwer zu erreichen. In dieser Studie wurden die Eigenschaften einer Oberflächenbeschichtung eines mechanisch stabilen, jedoch bioabbaubaren Materials mittels nicht-viraler genaktivierter COPROG-PDLLA-Beschichtung untersucht. Die Verwendung eines solchen bioaktiven Implantates böte die Möglichkeit in einem einzigen chirurgischen Eingriff einen Knochendefekt zu versorgen und umgeht somit Risiken, die eine wiederholte Operation zur Entnahme des Implantates nach Beendigung der Therapie mit sich bringen würde [206]. Durch

die Freisetzung eines therapeutischen Proteins über eine COPROG-PDLLA Beschichtung einer PCL-Matrix konnte ein erhöhtes osteoinduktives Potential einer solchen bioaktiven Oberfläche gezeigt werden. Durch die Beschichtung von PCL entstand eine glatte Fläche (s. Abb. 27B), welche keine negative Beeinflussung von Zellverteilung, -anheftung oder -morphologie (s. Abb. 27C; weiße Pfeile) zeigte. Bereits nach 5 Tagen unter Zellkulturbedingungen war eine beginnende Zersetzung der PDLLA-Schicht deutlich zu erkennen (s. Abb. 27C; schwarze Pfeile). Die Analyse der Reporterexpression zur Bestimmung der optimalen Gentransferbedingungen ergab, dass eine Steigerung der Vektormenge (angegeben in μg pDNA) über $30 \mu\text{g}$ pDNA/ $7,5 \text{ mg}$ PDLLA/ $\varnothing 6 \text{ mm}$ Matrix keine weitere Steigerung der Genexpression (s. Abb. 28A), aber eine verringerte Zellaktivität zur Folge hatte (s. Abb. 28B). Somit wurde diese Kondition als Optimum für weitere Versuche festgesetzt. BMP-2 spielt in der Regeneration von Knochengewebe eine Schlüsselrolle und stimuliert die Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen zu Osteoblasten. Hier wurde die Freisetzung von BMP-2 über BMP-2-COPROG-PDLLA-Beschichtungen in den Zellkulturüberstand und die am Material verbleibende Proteinmenge bestimmt. Die Kinetik der BMP-2 Freisetzung in den Zellkulturüberstand ähnelte der Reporterproteinfreisetzung (s. Abb. 28A und 29A). Eine signifikant erhöhte BMP-2-Abgabe in den Zellkulturüberstand war an Tag 1 und Tag 3 (s. Abb. 29A) zu beobachten. Erst nach Homogenisierung der Matrices in 2M Guanidin-HCl wurden deutlich erhöhte BMP-2-Mengen in den BMP-2-COPROG-aktivierten Matrices nachgewiesen (s. Abb. 29B). Dies und die Tatsache, dass ab dem 5. Tag nur noch kleinere BMP-2-Mengen im Zellkulturüberstand zu finden waren (s. Abb. 29A) deutet auf das Verbleiben des therapeutischen Moleküls am Implantat und damit eine ausschließlich lokale Bereitstellung des Wachstumsfaktors im Hinblick auf die

Vermeidung systemischer Nebenwirkung hin. Zellen, die direkt auf der genaktivierten Matrix wuchsen, zeigten deutliche Unterschiede hinsichtlich ihres Differenzierungsstatus verglichen mit denen der Kontrollgruppe. Es konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von Osteocalcin im Anschluss an die erhöhte Abgabe von BMP-2 in den Zellkulturüberstand an Tag 1 und 3 kontinuierlich anstieg (s. Abb. 29A und 30A). Die Aktivität der alkalischen Phosphatase der auf der BMP-2-COPROG-aktivierten Matrix wachsenden Zellen zeigte nach einem Versuchszeitraum von 17 Tagen erhöhte Werte im Vergleich zur genvektorfreen Kontrolle (s. Abb. 31A). Auch die Quantifizierung des Osteocalcin- bzw. Osteopontin-Gehaltes im Homogenisat der Matrix zeigte am Endpunkt des Versuches eine deutlich erhöhte Proteinmenge (s. Abb. 30B und 31B). Diese Beobachtungen deuten auf eine fortgeschrittene osteogene Transdifferenzierung der C2C12-Zellen hin. Mit dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass eine BMP-2-COPROG-PDLLA-Oberflächenbeschichtung von Biomaterialien durch die Kombination von osteoinduktiven Eigenschaften mit denen des mechanisch stabilen PCL in einer genaktivierten Matrix die Differenzierung von relevanten Zellen *in vitro* anstoßen kann. Der nächste Schritt sollte die Übersetzung dieser *in vitro* eindeutig zu beobachtenden Ergebnisse in *in vivo* Konditionen darstellen. Es ist zu vermuten, dass der Anstoß der osteogenen Differenzierung *in vivo* zudem zu einer verbesserten Integrität des Implantates im Wundgebiet führen kann und die mechanische Belastbarkeit und damit die Funktionalität des regenerierenden Gewebes verbessert werden kann [207]. Das Aufbringen einer genaktivierten COPROG-PDLLA-Schicht bietet die Möglichkeit bioabbaubare und nicht abbaubare, poröse und nicht poröse Materialien mit einer Oberfläche zu versehen, die je nach Abbaueigenschaften des verwendeten Beschichtungspolymers (hier PDLLA) eine

kontrollierte Freisetzung der nach Transfektion von Zellen des Wundgebietes exprimierten therapeutischen Proteine aufweist, um in Zukunft eine verbesserte Versorgung von Knochendefekten zu erzielen.

5.4 Entwicklung einer dualen genaktivierten Matrix zur zeitlichen und räumlichen Kontrolle der Expression unterschiedlicher Proteine

Das Ziel dieser Studie war die Entwicklung einer dualen genaktivierten Matrix, die in der Lage ist, unterschiedliche therapeutische Moleküle unter räumlicher und zeitlicher Kontrolle versetzt zur Expression zu bringen, um somit im Wundgebiet an unterschiedlichen Stellen in die Geweberegeneration eingreifen zu können und diese in komplexen Geweben, wie Knochen möglichst vielseitig zu fördern.

5.4.1 Freisetzung von osteoinduktivem BMP-2 über eine genaktivierte Kollagen Typ I Matrix

Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass eine Genaktivierung von Kollagen Typ II Matrices mit COPROGs eine Freisetzung von therapeutischen Molekülen gewährleistet (s. Abb. 23 und 26) und somit die physiologischen Prozesse innerhalb des Wundgebietes beeinflussen kann (s. Abb. 25), sollte diese Vorstudie zeigen, ob es möglich ist, mit dieser Technologie ebenso eine Kollagen Typ I Matrix dahingehend zu aktivieren, über COPROG-transfizierte Zellen BMP-2 freizusetzen und somit osteoinduktive Effekte zu vermitteln. Erste Optimierungsstudien auf Reportergerbasis zeigten eine signifikant erhöhte Menge an Metridia Luciferase im Zellkulturüberstand im Vergleich zur genvektorfreen Kontrolle. Die Freisetzung zeigte die für diese Technologie übliche Kinetik mit einem anfänglichen Peak der Genexpression von Tag 3 bis Tag 11 und einer anhaltenden Expression über einen

Zeitraum von zumindest 29 Tagen (s. Abb. 32). Nachdem festgestellt wurde, dass die bereits für Kollagen Typ II beschriebene Prozessierung auch mit einer Kollagen Typ I Matrix kompatibel ist, wurden die Eigenschaften einer BMP-2-COPROG-genaktivierten Kollagen Typ I Matrix beschrieben. BMP-2 wurde mit der für den Reporter etablierten Kinetik über einen Zeitraum von zumindest 15 Tagen in den Zellkulturüberstand abgegeben (s. Abb. 33). Zudem konnte ein Depoteffekt ähnlich wie in Abbildung 23C durch eine 195 fache erhöhte BMP-2-Menge in der homogenisierten Matrix am Ende des Versuchs nach 17 Tagen festgestellt werden (s. Abb. 33B). Histologische Untersuchungen zeigten eine deutliche stärkere Proliferation der aus der Matrix über einen Zeitraum von 17 Tagen in das Zellkulturgefäß ausgewachsenden Zellen (s. Abb. 34A). Diese Beobachtung deckt sich mit der stark erhöhten Aggrecan-Menge in den Homogenisaten der Matrix (s. Abb. 34B). Der Osteocalcin-Gehalt, sowie die Aktivität der alkalischen Phosphatase waren ebenfalls deutlich erhöht (s. Abb. 34C, D), dies deutet auf einen terminalen Differenzierungsstatus der Chondrozyten hin. Nachdem eine osteoinduktive Aktivität einer solchen genaktivierten Matrix beschrieben wurde, konnte im Weiteren mit den Beschichtungsarbeiten zur Verzögerung der Abgabe von BMP-2 und der genaktiven Oberflächenbeschichtung zur Etablierung einer dualen genaktivierten Matrix fortgefahren werden.

5.4.2 Steuerung der Expressionskinetik über COPROG-PDLLA-Oberflächenbeschichtung von genaktivierten Kollagen Typ I Matrices

Die funktionale Regeneration eines komplexen Gewebes wie Knochen bedarf neben einer mechanisch stabilen, bestenfalls osteokonduktiven Matrix und eines osteoinduktiven Stimulus, ebenso der Gewährleistung der Versorgung eines solchen

Areals mit Sauerstoff, Nährstoffen und Immunzellen über Blutgefäße. Das Fehlen einer adäquaten Sauerstoffversorgung führt zur Unterversorgung des neugebildeten Gewebes mit daraus resultierender mangelhafter Qualität [138]. Die in den vorangegangenen Untersuchungen etablierten Technologien wurden in dieser Studie mit dem Ziel zusammengeführt, initial proangiogene und anhaltend osteoinduktive Proteine über ein Implantat zeitlich versetzt zur Expression zu bringen. Therapeutische Moleküle konnten mit einem initialen Peak zwischen Tag 1 und 3 über eine PDLLA Verlackung von PCL-Matrices freigesetzt werden (s. Abb. 29A). Mit dieser Vorgabe wurden die optimalen Bedingungen zur Expression des Reporterproteins SEAP aus einer COPROG-PDLLA-aktivierten Oberfläche einer Kollagen Typ I Matrix etabliert. Bis zu einer Menge von 10 mg PDLLA/Matrix konnte eine initial hohe Freisetzung von SEAP in den Zellkulturüberstand ähnlich der Verlackungsexperimente von PCL-Matrices beobachtet werden (s. Abb. 28A und 35). Ab einer Menge von 20 mg PDLLA/Matrix wurde die Expression des Reporters SEAP bereits deutlich reduziert und ab 40 mg PDLLA/Matrix konnte keine Genexpression mehr nachgewiesen werden (s. Abb. 35). Unter Berücksichtigung dieser Informationen sollten nun die optimalen Bedingungen für eine verzögerte und lang anhaltende Expression des zweiten Reporters Metridia Luciferase, der in wässriger Lösung auf eine Kollagen Typ I Matrix aufgebracht wurde, definiert werden. Es wurden PDLLA Mengen von 1 mg bis 10 mg/Metridia Luciferase-COPROG aktivierten Matrix aufgebracht und die Freisetzung des Reporters in den Zellkulturüberstand beobachtet. Bereits bei einer Menge von 1 mg PDLLA/Matrix war eine deutlich erniedrigte Genexpression zu beobachten (s. Abb. 36). Die Erwartung, dass die Expression von Metridia Luciferase durch die Oberflächenbeschichtung mit PDLLA verzögert ist und zu einem späteren Versuchszeitpunkt zu detektieren sei,

bestätigte sich nicht. Über eine Versuchsdauer von 45 Tagen war kein Anstieg der Metridia Luciferase Freisetzung zu erkennen (s. Abb. 36). Histologische Untersuchungen zum Verteilungs- und Anheftungsverhalten der Zellen und die elektronenmikroskopische Analyse der Matrixeigenschaften sollten Aufschluß über die Ursache dieser Beobachtung liefern. Die kontinuierlich erhöhte PDLLA-Menge führte zu einer dichter werdenden glatten Schicht auf der Kollagen Typ I Matrix (s. Abb. 38 und 40A-D). Es konnten ebenso wie in vorangegangenen Beobachtungen keine Unterschiede bzgl. des Anwachsens, der Verteilung und der Morphologie der Zellen auf der PDLLA-Schicht festgestellt werden (s. Abb. 39). Bereits die Analyse von besiedelten, unbeschichteten Kollagen Typ I Matrices zeigte, dass die Porengrößen innerhalb des Materials ausgesprochen unterschiedlich sind und auch nach einer Versuchsdauer von 45 Tagen nicht in allen Poren Zellen nachzuweisen waren (s. Abb. 37A, B und 40A, E). Mit steigender PDLLA-Menge verringert sich die Zellmenge innerhalb der Matrix deutlich (s. Abb. 37C, B und 40A, E). Das Einwachsen der Zellen in die Poren der Matrix ist bereits bei einer Menge von 1 mg PDLLA/Matrix stark eingeschränkt (s. Abb. 40B, F). Ab einer Menge von 5 mg PDLLA/Matrix sind bereits keine Zellen mehr in den Tiefen der Matrix zu finden (s. Abb. 37C und 40C, G). Nach Verlackung mit 5 mg und 10 mg PDLLA/Matrix sind deutliche Aufschichtung der Zellen an der Oberfläche der Matrix zu erkennen (s. Abb. 37C, D und 40C, D, G, H, I), wobei eine Anfärbung der Zellkerne nur in den oberen Bereichen der Zellschichten zu erkennen ist (s. Abb. 37C, D). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Lackschicht die Matrix oberflächlich abdichtet und die Zellen unter Zellkulturbedingungen diese Schichten innerhalb des Versuchszeitraums nicht durchdringen konnten. Dies hätte zur Folge, dass ebenso der Sauerstoff- und Nährstofftransport unter diesen Bedingungen stark eingeschränkt

wäre, so dass in den tiefer gelegenen Bereichen der Matrix ein Überleben der Zellen stark behindert oder nicht möglich wäre. Diese Analyse erklärt, warum die Expression, des an der Kollagen Typ I Matrix immobilisierten Reporterplasmids *Metridia Luciferase* auch über einen Versuchszeitraum von 45 Tagen nicht ansteigt (s. Abb. 36). Um in Zukunft die Entwicklung von dualen genaktivierten Matrices voranzutreiben, ist es denkbar, eine Kombinationen von anderen Biomaterialien, wie beispielsweise TCP oder Kollagen Typ I Matrices mit einem interkonnektiven Porennetzwerk jeweils in Kombination mit Fibrinkleber etc., zu verwenden und eine Expression von Proteinen mit dem hier entwickelten dualen Reporterplasmidsystems über den gesamten Versuchszeitraum über die anwenderfreundliche Analyse der Zellkulturüberstände zu beobachten.

5.5 Ausblick

Die in dieser Arbeit entwickelten Technologien besitzen gegenüber den bisher beschriebenen Methoden zur Bioaktivierung von Implantaten deutliche Vorteile. Hier wurden in einer Einschnitt-Prozedur zell- und virusfreie Matrices generiert, um lokal Wachstumsfaktoren im Wundgebiet freizusetzen. Diese neuen Ansätze erlauben eine relativ einfache anwenderfreundliche klinische Übersetzung, da die Herstellung unter GMP-Standards möglich ist und ein stabiles Produkt entsteht, das einfach in klinische Abläufe integriert werden kann. Es ist durchaus vorstellbar, mit diesen Technologien nahezu jedes Biomaterial dahingehend zu modifizieren, gewissermaßen jedes Protein freizusetzen, solange deren kodierende Sequenz bekannt ist. Zudem besteht die Möglichkeit nach Auswahl geeigneter Materialien mit unterschiedlichen Abbaueigenschaften *in vivo*, diese zu kombinieren und die zeitliche und räumliche Expression von therapeutischen Molekülen zu kontrollieren.

6 Literaturverzeichnis

1. DFG. Entwicklung der Gentherapie: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA Weinheim, 2007.
2. Mendel. Versuche über Pflanzen-Hybriden IV. Bande der Verhandlungen des naturforschenden Vereins in Brünn, 1866.
3. Avery OT, Macleod CM, McCarty M. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types: Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type lii. *J Exp Med* 1944 Feb 1;79(2):137-158.
4. Watson JD, Crick FH. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 1953 May 30;171(4361):964-967.
5. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953 Apr 25;171(4356):737-738.
6. Raju TN. The Nobel chronicles. 1978: Werner Arber (b 1929); Hamilton O Smith (b 1931); Daniel Nathans (b 1928). *Lancet* 1999 Oct 30;354(9189):1567.
7. Escors D, Breckpot K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2010 Apr;58(2):107-119.
8. Vosberg HP. Molecular cloning of DNA. An introduction into techniques and problems. *Hum Genet* 1977 Dec 29;40(1):1-72.
9. Kelley WN, Palella TD. The Jeremiah Metzger lecture. Current status of human gene therapy. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 1988;99:152-169.
10. Lee RE. Gene therapy: clipping the wings of nature's own gene transfer vectors. *CMAJ* 1986 Feb 15;134(4):311-313.
11. Anderson WF, Blaese RM, Culver K. The ADA human gene therapy clinical protocol: Points to Consider response with clinical protocol, July 6, 1990. *Hum Gene Ther* 1990 Fall;1(3):331-362.
12. Blaese RM, Culver KW, Chang L, Anderson WF, Mullen C, Nienhuis A, et al. Treatment of severe combined immunodeficiency disease (SCID) due to adenosine deaminase deficiency with CD34+ selected autologous peripheral blood cells transduced with a human ADA gene. Amendment to clinical research project, Project 90-C-195, January 10, 1992. *Hum Gene Ther* 1993 Aug;4(4):521-527.

13. Levine F, Friedmann T. Gene therapy techniques. *Curr Opin Biotechnol* 1991 Dec;2(6):840-844.
14. Griesenbach U, Alton EW. Cystic fibrosis gene therapy: successes, failures and hopes for the future. *Expert Rev Respir Med* 2009 Aug;3(4):363-371.
15. Hyde SC, Southern KW, Gileadi U, Fitzjohn EM, Mofford KA, Waddell BE, et al. Repeat administration of DNA/liposomes to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther* 2000 Jul;7(13):1156-1165.
16. Patil SD, Rhodes DG, Burgess DJ. DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. *AAPS J* 2005;7(1):E61-77.
17. Huye LE, Dotti G. Designing T cells for cancer immunotherapy. *Discov Med* 2010 Apr;9(47):297-303.
18. DG-GT. 2010 ; Available from: <http://www.dg-gt.de/>
19. Cathomen T, Weitzman MD. Gene repair: pointing the finger at genetic disease. *Gene Ther* 2005 Oct;12(19):1415-1416.
20. Radecke S, Radecke F, Cathomen T, Schwarz K. Zinc-finger nuclease-induced gene repair with oligodeoxynucleotides: wanted and unwanted target locus modifications. *Mol Ther* 2010 Apr;18(4):743-753.
21. Sollu C, Pars K, Cornu TI, Thibodeau-Beganny S, Maeder ML, Joung JK, et al. Autonomous zinc-finger nuclease pairs for targeted chromosomal deletion. *Nucleic Acids Res* 2010 Aug 16.
22. Villemejeane J, Mir LM. Physical methods of nucleic acid transfer: general concepts and applications. *Br J Pharmacol* 2009 May;157(2):207-219.
23. Sheyn D, Mizrahi O, Benjamin S, Gazit Z, Pelled G, Gazit D. Genetically modified cells in regenerative medicine and tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2010 Jun 15;62(7-8):683-698.
24. Tomford WW. Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts. *J Bone Joint Surg Am* 1995 Nov;77(11):1742-1754.
25. Vaishnav S, Thomas Vangsness C, Jr., Dellamaggiora R. New techniques in allograft tissue processing. *Clin Sports Med* 2009 Jan;28(1):127-141.
26. Zhang X, Godbey WT. Viral vectors for gene delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2006 Jul 7;58(4):515-534.
27. Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 2001 Jan;7(1):33-40.

28. Verma IM, Weitzman MD. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem* 2005;74:711-738.
29. Cavazzana-Calvo M, Lagresle C, Hacein-Bey-Abina S, Fischer A. Gene therapy for severe combined immunodeficiency. *Annu Rev Med* 2005;56:585-602.
30. DG-GT. Stellungnahme der Deutsche Gesellschaft für Gentherapie (DG-GT e.V.) zu einer in einer Gentherapiestudie des Wiskott-Aldrich-Syndroms aufgetretenen Nebenwirkung. 2010.
31. Herzog RW. Gene therapy for SCID-X1: round 2. *Mol Ther* 2010 Nov;18(11):1891.
32. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* 2008 Sep;118(9):3132-3142.
33. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003 Oct 17;302(5644):415-419.
34. Bukrinsky MI, Haggerty S, Dempsey MP, Sharova N, Adzhubel A, Spitz L, et al. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* 1993 Oct 14;365(6447):666-669.
35. De Rijck J, Vandekerckhove L, Christ F, Debyser Z. Lentiviral nuclear import: a complex interplay between virus and host. *Bioessays* 2007 May;29(5):441-451.
36. Li H, Lu Y, Witek RP, Chang LJ, Campbell-Thompson M, Jorgensen M, et al. Ex vivo transduction and transplantation of bone marrow cells for liver gene delivery of alpha1-antitrypsin. *Mol Ther* 2010 Aug;18(8):1553-1558.
37. Matsumoto H, Kimura T, Haga K, Kasahara N, Anton P, McGowan I. Effective in vivo and ex vivo gene transfer to intestinal mucosa by VSV-G-pseudotyped lentiviral vectors. *BMC Gastroenterol* 2010;10:44.
38. Parker DG, Coster DJ, Brereton HM, Hart PH, Koldej R, Anson DS, et al. Lentivirus-mediated gene transfer of interleukin 10 to the ovine and human cornea. *Clin Experiment Ophthalmol* 2010 May;38(4):405-413.
39. Shiau AL, Teo ML, Chen SY, Wang CR, Hsieh JL, Chang MY, et al. Inhibition of experimental lung metastasis by systemic lentiviral delivery of kallistatin. *BMC Cancer* 2010;10:245.

40. Tsai BY, Suen JL, Chiang BL. Lentiviral-mediated Foxp3 RNAi suppresses tumor growth of regulatory T cell-like leukemia in a murine tumor model. *Gene Ther* 2010 Aug;17(8):972-979.
41. Persons DA. Lentiviral vector gene therapy: effective and safe? *Mol Ther* 2010 May;18(5):861-862.
42. Grimm D, Kay MA. RNAi and gene therapy: a mutual attraction. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007:473-481.
43. Jiang H, Pierce GF, Ozelo MC, de Paula EV, Vargas JA, Smith P, et al. Evidence of multiyear factor IX expression by AAV-mediated gene transfer to skeletal muscle in an individual with severe hemophilia B. *Mol Ther* 2006 Sep;14(3):452-455.
44. Lanuti M, Gao GP, Force SD, Chang MY, El Kouri C, Amin KM, et al. Evaluation of an E1E4-deleted adenovirus expressing the herpes simplex thymidine kinase suicide gene in cancer gene therapy. *Hum Gene Ther* 1999 Feb 10;10(3):463-475.
45. Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, Larson PJ, Herzog RW, Arruda VR, et al. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 2003 Apr 15;101(8):2963-2972.
46. Margolis DJ, Crombleholme T, Herlyn M. Clinical protocol: Phase I trial to evaluate the safety of H5.020CMV.PDGF-B for the treatment of a diabetic insensate foot ulcer. *Wound Repair Regen* 2000 Nov-Dec;8(6):480-493.
47. Margolis DJ, Cromblehome T, Herlyn M, Cross P, Weinberg L, Filip J, et al. Clinical protocol. Phase I trial to evaluate the safety of H5.020CMV.PDGF-b and limb compression bandage for the treatment of venous leg ulcer: trial A. *Hum Gene Ther* 2004 Oct;15(10):1003-1019.
48. Mulder G, Tallis AJ, Marshall VT, Mozingo D, Phillips L, Pierce GF, et al. Treatment of nonhealing diabetic foot ulcers with a platelet-derived growth factor gene-activated matrix (GAM501): results of a phase 1/2 trial. *Wound Repair Regen* 2009 Nov-Dec;17(6):772-779.
49. Heilbronn R, Weger S. Viral vectors for gene transfer: current status of gene therapeutics. *Handb Exp Pharmacol* 2010(197):143-170.
50. Marconi P, Argnani R, Epstein AL, Manservigi R. HSV as a vector in vaccine development and gene therapy. *Adv Exp Med Biol* 2009;655:118-144.

51. Daniel R, Smith JA. Integration site selection by retroviral vectors: molecular mechanism and clinical consequences. *Hum Gene Ther* 2008 Jun;19(6):557-568.
52. Scherer F, Schillinger U, Putz U, Stemberger A, Plank C. Nonviral vector loaded collagen sponges for sustained gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med* 2002 Nov-Dec;4(6):634-643.
53. Gao X, Kim KS, Liu D. Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *AAPS J* 2007;9(1):E92-104.
54. Wells DJ. Gene therapy progress and prospects: electroporation and other physical methods. *Gene Ther* 2004 Sep;11(18):1363-1369.
55. Plank C, Rosenecker J. Magnetofection: the use of magnetic nanoparticles for nucleic acid delivery. *Cold Spring Harb Protoc* 2009 Jun;2009(6):pdb prot5230.
56. Plank C, Schillinger U, Scherer F, Bergemann C, Remy JS, Krotz F, et al. The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery. *Biol Chem* 2003 May;384(5):737-747.
57. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Aug 1;92(16):7297-7301.
58. Finsinger D, Remy JS, Erbacher P, Koch C, Plank C. Protective copolymers for nonviral gene vectors: synthesis, vector characterization and application in gene delivery. *Gene Ther* 2000 Jul;7(14):1183-1192.
59. Plank C, Mechtler K, Szoka FC, Jr., Wagner E. Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum Gene Ther* 1996 Aug 1;7(12):1437-1446.
60. Thomas M, Klivanov AM. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003 Jul;62(1):27-34.
61. Honig D, DeRouchey J, Jungmann R, Koch C, Plank C, Radler JO. Biophysical characterization of copolymer-protected gene vectors. *Biomacromolecules* 2010 Jul 12;11(7):1802-1809.
62. De Smedt SC, Demeester J, Hennink WE. Cationic polymer based gene delivery systems. *Pharm Res* 2000 Feb;17(2):113-126.
63. Bielinska AU, Kukowska-Latallo JF, Baker JR, Jr. The interaction of plasmid DNA with polyamidoamine dendrimers: mechanism of complex formation and analysis of alterations induced in nuclease sensitivity and

- transcriptional activity of the complexed DNA. *Biochim Biophys Acta* 1997 Aug 7;1353(2):180-190.
64. Wen Y, Pan S, Luo X, Zhang X, Zhang W, Feng M. A biodegradable low molecular weight polyethylenimine derivative as low toxicity and efficient gene vector. *Bioconjug Chem* 2009 Feb;20(2):322-332.
65. Zuber G, Dauty E, Nothisen M, Belguise P, Behr JP. Towards synthetic viruses. *Adv Drug Deliv Rev* 2001 Nov 19;52(3):245-253.
66. Lechardeur D, Lukacs GL. Intracellular barriers to non-viral gene transfer. *Curr Gene Ther* 2002 May;2(2):183-194.
67. Midoux P, Breuzard G, Gomez JP, Pichon C. Polymer-based gene delivery: a current review on the uptake and intracellular trafficking of polyplexes. *Curr Gene Ther* 2008 Oct;8(5):335-352.
68. Wagner E, Culmsee C, Boeckle S. Targeting of Polyplexes: Toward Synthetic Virus Vector Systems. *Adv Genet* 2005;53PA:333-354.
69. Mislick KA, Baldeschwieler JD. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Oct 29;93(22):12349-12354.
70. Dombu CY, Kroubi M, Zibouche R, Matran R, Betbeder D. Characterization of endocytosis and exocytosis of cationic nanoparticles in airway epithelium cells. *Nanotechnology* 2010 Sep 3;21(35):355102.
71. Poon GM, Garipey J. Cell-surface proteoglycans as molecular portals for cationic peptide and polymer entry into cells. *Biochem Soc Trans* 2007 Aug;35(Pt 4):788-793.
72. Kullmer M. Lokaler Gentransfer mit implantierbaren Arzneistoffträgern. Neue Wege zur Rekonstruktion von Haut- und Knochengewebe: Ludwig-Maximilians-Universität München; 2006.
73. Skalak R. *Tissue Engineering*. New York, 1988.
74. Chang PC, Liu BY, Liu CM, Chou HH, Ho MH, Liu HC, et al. Bone tissue engineering with novel rhBMP2-PLLA composite scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2007 Jun 15;81(4):771-780.
75. Lee J, Bhang SH, Park H, Kim BS, Lee KY. Active blood vessel formation in the ischemic hindlimb mouse model using a microsphere/hydrogel combination system. *Pharm Res* 2010 May;27(5):767-774.
76. Lee J, Lee KY. Local and sustained vascular endothelial growth factor delivery for angiogenesis using an injectable system. *Pharm Res* 2009 Jul;26(7):1739-1744.

77. Schmidmaier G, Wildemann B, Cromme F, Kandziora F, Haas NP, Raschke M. Bone morphogenetic protein-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodeling in fracture treatment: a biomechanical and histological study in rats. *Bone* 2002 Jun;30(6):816-822.
78. Bonadio J, Smiley E, Patil P, Goldstein S. Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. *Nat Med* 1999 Jul;5(7):753-759.
79. De Laporte L, Shea LD. Matrices and scaffolds for DNA delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2007 May 30;59(4-5):292-307.
80. Shea LD, Smiley E, Bonadio J, Mooney DJ. DNA delivery from polymer matrices for tissue engineering. *Nat Biotechnol* 1999 Jun;17(6):551-554.
81. Chandler LA, Gu DL, Ma C, Gonzalez AM, Doukas J, Nguyen T, et al. Matrix-enabled gene transfer for cutaneous wound repair. *Wound Repair Regen* 2000 Nov-Dec;8(6):473-479.
82. Endo M, Kuroda S, Kondo H, Maruoka Y, Ohya K, Kasugai S. Bone regeneration by modified gene-activated matrix: effectiveness in segmental tibial defects in rats. *Tissue Eng* 2006 Mar;12(3):489-497.
83. Guo T, Zhao J, Chang J, Ding Z, Hong H, Chen J, et al. Porous chitosan-gelatin scaffold containing plasmid DNA encoding transforming growth factor-beta1 for chondrocytes proliferation. *Biomaterials* 2006 Mar;27(7):1095-1103.
84. Pan H, Jiang H, Chen W. Interaction of dermal fibroblasts with electrospun composite polymer scaffolds prepared from dextran and poly lactide-co-glycolide. *Biomaterials* 2006 Jun;27(17):3209-3220.
85. Jang JH, Rives CB, Shea LD. Plasmid delivery in vivo from porous tissue-engineering scaffolds: transgene expression and cellular transfection. *Mol Ther* 2005 Sep;12(3):475-483.
86. Jang JH, Shea LD. Controllable delivery of non-viral DNA from porous scaffolds. *J Control Release* 2003 Jan 9;86(1):157-168.
87. Murphy WL, Mooney DJ. Controlled delivery of inductive proteins, plasmid DNA and cells from tissue engineering matrices. *J Periodontal Res* 1999 Oct;34(7):413-419.
88. Richardson TP, Murphy WL, Mooney DJ. Polymeric delivery of proteins and plasmid DNA for tissue engineering and gene therapy. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2001;11(1-3):47-58.

89. Balasubramani M, Kumar TR, Babu M. Skin substitutes: a review. *Burns* 2001 Aug;27(5):534-544.
90. Place ES, Evans ND, Stevens MM. Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nat Mater* 2009 Jun;8(6):457-470.
91. Chiono V, Tonda-Turo C, Ciardelli G. Chapter 9: Artificial scaffolds for peripheral nerve reconstruction. *Int Rev Neurobiol* 2009;87:173-198.
92. Kreuz PC, Muller S, Ossendorf C, Kaps C, Erggelet C. Treatment of focal degenerative cartilage defects with polymer-based autologous chondrocyte grafts: four-year clinical results. *Arthritis Res Ther* 2009;11(2):R33.
93. Gohari S, Gambla C, Healey M, Spaulding G, Gordon KB, Swan J, et al. Evaluation of tissue-engineered skin (human skin substitute) and secondary intention healing in the treatment of full thickness wounds after Mohs micrographic or excisional surgery. *Dermatol Surg* 2002 Dec;28(12):1107-1114; discussion 1114.
94. Schillinger U, Wexel G, Hacker C, Kullmer M, Koch C, Gerg M, et al. A fibrin glue composition as carrier for nucleic acid vectors. *Pharm Res* 2008 Dec;25(12):2946-2962.
95. Egana JT, Danner S, Kremer M, Rapoport DH, Lohmeyer JA, Dye JF, et al. The use of glandular-derived stem cells to improve vascularization in scaffold-mediated dermal regeneration. *Biomaterials* 2009 Oct;30(30):5918-5926.
96. Nomi M, Atala A, Coppi PD, Soker S. Principals of neovascularization for tissue engineering. *Mol Aspects Med* 2002 Dec;23(6):463-483.
97. Scheller EL, Krebsbach PH. Gene therapy: design and prospects for craniofacial regeneration. *J Dent Res* 2009 Jul;88(7):585-596.
98. Wilcke I, Lohmeyer JA, Liu S, Condurache A, Kruger S, Mailander P, et al. VEGF(165) and bFGF protein-based therapy in a slow release system to improve angiogenesis in a bioartificial dermal substitute in vitro and in vivo. *Langenbecks Arch Surg* 2007 May;392(3):305-314.
99. Saaristo A, Tammela T, Farkkila A, Karkkainen M, Suominen E, Yla-Herttuala S, et al. Vascular endothelial growth factor-C accelerates diabetic wound healing. *Am J Pathol* 2006 Sep;169(3):1080-1087.
100. Eming SA, Krieg T. Molecular mechanisms of VEGF-A action during tissue repair. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2006 Sep;11(1):79-86.

101. Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, Stanley A, Ingham E, Walters C, et al. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer* 1998 Mar;77(6):956-964.
102. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 2008 Sep-Oct;16(5):585-601.
103. Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell* 1992 Feb;3(2):211-220.
104. Gaudry M, Bregerie O, Andrieu V, El Benna J, Pocard MA, Hakim J. Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood* 1997 Nov 15;90(10):4153-4161.
105. Jazwa A, Loboda A, Golda S, Cisowski J, Szelag M, Zagorska A, et al. Effect of heme and heme oxygenase-1 on vascular endothelial growth factor synthesis and angiogenic potency of human keratinocytes. *Free Radic Biol Med* 2006 Apr 1;40(7):1250-1263.
106. Namiki A, Brogi E, Kearney M, Kim EA, Wu T, Couffignal T, et al. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* 1995 Dec 29;270(52):31189-31195.
107. Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol* 1998 Jun;152(6):1445-1452.
108. de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992 Feb 21;255(5047):989-991.
109. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, et al. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 Sep 30;187(3):1579-1586.
110. Thomas KA. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* 1996 Jan 12;271(2):603-606.

111. Li J, Zhang YP, Kirsner RS. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc Res Tech* 2003 Jan 1;60(1):107-114.
112. Bauters C, Asahara T, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, et al. Physiological assessment of augmented vascularity induced by VEGF in ischemic rabbit hindlimb. *Am J Physiol* 1994 Oct;267(4 Pt 2):H1263-1271.
113. Bauters C, Asahara T, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, et al. Site-specific therapeutic angiogenesis after systemic administration of vascular endothelial growth factor. *J Vasc Surg* 1995 Feb;21(2):314-324; discussion 324-315.
114. Takeshita S, Pu LQ, Stein LA, Sniderman AD, Bunting S, Ferrara N, et al. Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia. *Circulation* 1994 Nov;90(5 Pt 2):II228-234.
115. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, et al. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest* 1994 Feb;93(2):662-670.
116. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, et al. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998 Mar 31;97(12):1114-1123.
117. Boyce T, Edwards J, Scarborough N. Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am* 1999 Oct;30(4):571-581.
118. Van Heest A, Swiontkowski M. Bone-graft substitutes. *Lancet* 1999 Apr;353 Suppl 1:S128-29.
119. Feng X. Chemical and Biochemical Basis of Cell-Bone Matrix Interaction in Health and Disease. *Curr Chem Biol* 2009 May 1;3(2):189-196.
120. Wintermantel. *Medizintechnik*. 5. überarbeitete und erweiterte Auflage; Springer-Verlag GmbH, 2009.
121. Klein-Nulend J, Bacabac RG, Mullender MG. Mechanobiology of bone tissue. *Pathol Biol (Paris)* 2005 Dec;53(10):576-580.
122. Mullender M, El Haj AJ, Yang Y, van Duin MA, Burger EH, Klein-Nulend J. Mechanotransduction of bone cells in vitro: mechanobiology of bone tissue. *Med Biol Eng Comput* 2004 Jan;42(1):14-21.

123. Coleman R, Brown J, Terpos E, Lipton A, Smith MR, Cook R, et al. Bone markers and their prognostic value in metastatic bone disease: clinical evidence and future directions. *Cancer Treat Rev* 2008 Nov;34(7):629-639.
124. Civitelli R, Armamento-Villareal R, Napoli N. Bone turnover markers: understanding their value in clinical trials and clinical practice. *Osteoporos Int* 2009 Jun;20(6):843-851.
125. Alliston T, Choy L, Ducey P, Karsenty G, Derynck R. TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J* 2001 May 1;20(9):2254-2272.
126. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 2007 Aug 10;130(3):456-469.
127. Owen TA, Bortell R, Yocum SA, Smock SL, Zhang M, Abate C, et al. Coordinate occupancy of AP-1 sites in the vitamin D-responsive and CCAAT box elements by Fos-Jun in the osteocalcin gene: model for phenotype suppression of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Dec;87(24):9990-9994.
128. Alford AI, Hankenson KD. Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. *Bone* 2006 Jun;38(6):749-757.
129. Orimo H. The Mechanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in Health and Disease. *J Nippon Med Sch* 2010(77):4-12.
130. Golub EE. Role of matrix vesicles in biomineralization. *Biochim Biophys Acta* 2009 Dec;1790(12):1592-1598.
131. Mundlos S. Entwicklung und Wachstum des Skeletts – biologische Grundlagen Medizinische Genetik - Genetik der Skelettdysplasien. 2004.
132. zur Nieden NI, Kempka G, Rancourt DE, Ahr HJ. Induction of chondro-, osteo- and adipogenesis in embryonic stem cells by bone morphogenetic protein-2: effect of cofactors on differentiating lineages. *BMC Dev Biol* 2005;5:1.
133. Yetimoglu C. Expression von Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) während der Knochenentwicklung, der physiologischen Knochenheilung und der durch systemisch appliziertes Wachstumshormon (GH)

- stimulierten Knochenheilung. Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin; 2007.
134. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol* 2008 Oct;19(5):459-466.
135. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 1999 Nov;14(11):1805-1815.
136. Pape HC, Marcucio R, Humphrey C, Colnot C, Knobe M, Harvey EJ. Trauma-induced inflammation and fracture healing. *J Orthop Trauma* 2010 Sep;24(9):522-525.
137. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998 Oct(355 Suppl):S7-21.
138. Santos MI, Reis RL. Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. *Macromol Biosci* 2010 Jan 11;10(1):12-27.
139. Garrison KR, Shemilt I, Donell S, Ryder JJ, Mugford M, Harvey I, et al. Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;6:CD006950.
140. Donaldson LJ, Reckless IP, Scholes S, Mindell JS, Shelton NJ. The epidemiology of fractures in England. *J Epidemiol Community Health* 2008 Feb;62(2):174-180.
141. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965 Nov 12;150(698):893-899.
142. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988 Dec 16;242(4885):1528-1534.
143. Rountree RB, Schoor M, Chen H, Marks ME, Harley V, Mishina Y, et al. BMP receptor signaling is required for postnatal maintenance of articular cartilage. *PLoS Biol* 2004 Nov;2(11):e355.
144. Valentin-Opran A, Wozney J, Csimma C, Lilly L, Riedel GE. Clinical evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clin Orthop Relat Res* 2002 Feb(395):110-120.
145. Bandyopadhyay A, Tsuji K, Cox K, Harfe BD, Rosen V, Tabin CJ. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet* 2006 Dec;2(12):e216.

146. Barna M, Niswander L. Visualization of cartilage formation: insight into cellular properties of skeletal progenitors and chondrodysplasia syndromes. *Dev Cell* 2007 Jun;12(6):931-941.
147. Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Mukudai Y, Kawakami Y, Nohno T, Higuchi Y, et al. Bone morphogenetic protein signaling is required for maintenance of differentiated phenotype, control of proliferation, and hypertrophy in chondrocytes. *J Cell Biol* 1998 Jan 26;140(2):409-418.
148. Kobayashi T, Lyons KM, McMahon AP, Kronenberg HM. BMP signaling stimulates cellular differentiation at multiple steps during cartilage development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Dec 13;102(50):18023-18027.
149. Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(1):46-62.
150. Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, et al. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet* 2006 Dec;38(12):1424-1429.
151. Tsuji K, Cox K, Gamer L, Graf D, Economides A, Rosen V. Conditional deletion of BMP7 from the limb skeleton does not affect bone formation or fracture repair. *J Orthop Res* 2010 Mar;28(3):384-389.
152. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 2006 Jan 1;97(1):33-44.
153. Hartmann C, Tabin CJ. Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb. *Development* 2000 Jul;127(14):3141-3159.
154. Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell* 2002 Apr;2(4):389-406.
155. Bais MV, Wigner N, Young M, Toholka R, Graves DT, Morgan EF, et al. BMP2 is essential for post natal osteogenesis but not for recruitment of osteogenic stem cells. *Bone* 2009 Aug;45(2):254-266.
156. Granero-Molto F, Weis JA, Miga MI, Landis B, Myers TJ, O'Rear L, et al. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem Cells* 2009 Aug;27(8):1887-1898.
157. Zhao M, Ko SY, Liu JH, Chen D, Zhang J, Wang B, et al. Inhibition of microtubule assembly in osteoblasts stimulates bone morphogenetic protein 2 expression and bone formation through transcription factor Gli2. *Mol Cell Biol* 2009 Mar;29(5):1291-1305.

158. Gelse K, von der Mark K, Aigner T, Park J, Schneider H. Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells. *Arthritis Rheum* 2003 Feb;48(2):430-441.
159. Pelttari K, Winter A, Steck E, Goetzke K, Hennig T, Ochs BG, et al. Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis Rheum* 2006 Oct;54(10):3254-3266.
160. Steinhardt Y, Aslan H, Regev E, Zilberman Y, Kallai I, Gazit D, et al. Maxillofacial-derived stem cells regenerate critical mandibular bone defect. *Tissue Eng Part A* 2008 Nov;14(11):1763-1773.
161. Bilic R, Simic P, Jelic M, Stern-Padovan R, Dodig D, van Meerdervoort HP, et al. Osteogenic protein-1 (BMP-7) accelerates healing of scaphoid non-union with proximal pole sclerosis. *Int Orthop* 2006 Apr;30(2):128-134.
162. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004 Dec;22(4):233-241.
163. Dimar JR, Glassman SD, Burkus KJ, Carreon LY. Clinical outcomes and fusion success at 2 years of single-level instrumented posterolateral fusions with recombinant human bone morphogenetic protein-2/compression resistant matrix versus iliac crest bone graft. *Spine (Phila Pa 1976)* 2006 Oct 15;31(22):2534-2539; discussion 2540.
164. Jones AL, Bucholz RW, Bosse MJ, Mirza SK, Lyon TR, Webb LX, et al. Recombinant human BMP-2 and allograft compared with autogenous bone graft for reconstruction of diaphyseal tibial fractures with cortical defects. A randomized, controlled trial. *J Bone Joint Surg Am* 2006 Jul;88(7):1431-1441.
165. Kirker-Head CA. Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 2000 Sep 15;43(1):65-92.
166. Lee SH, Shin H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2007 May 30;59(4-5):339-359.
167. Nakagawa T, Sugiyama T, Kamei T, Murata T, Tagawa T. An immunolight- and electron-microscopic study of the expression of bone morphogenetic protein-2 during the process of ectopic bone formation in the rat. *Arch Oral Biol* 2001 May;46(5):403-411.

168. Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, Konishi Y, Kusumoto K, Ogawa Y, et al. Osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 at intramuscular, intermuscular, subcutaneous and intrafatty sites. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2000 Feb;29(1):62-66.
169. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury* 2005 Nov;36 Suppl 3:S20-27.
170. Bueno EM, Glowacki J. Cell-free and cell-based approaches for bone regeneration. *Nat Rev Rheumatol* 2009 Dec;5(12):685-697.
171. Cypher TJ, Grossman JP. Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg* 1996 Sep-Oct;35(5):413-417.
172. Friedlaender GE, Strong DM, Tomford WW, Mankin HJ. Long-term follow-up of patients with osteochondral allografts. A correlation between immunologic responses and clinical outcome. *Orthop Clin North Am* 1999 Oct;30(4):583-588.
173. Fleming JE, Jr., Cornell CN, Muschler GF. Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. *Orthop Clin North Am* 2000 Jul;31(3):357-374.
174. Boyne PJ, Lilly LC, Marx RE, Moy PK, Nevins M, Spagnoli DB, et al. De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 2005 Dec;63(12):1693-1707.
175. Dawson E, Bae HW, Burkus JK, Stambough JL, Glassman SD. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 on an absorbable collagen sponge with an osteoconductive bulking agent in posterolateral arthrodesis with instrumentation. A prospective randomized trial. *J Bone Joint Surg Am* 2009 Jul;91(7):1604-1613.
176. Liang H, Wang K, Shimer AL, Li X, Balian G, Shen FH. Use of a bioactive scaffold for the repair of bone defects in a novel reproducible vertebral body defect model. *Bone* 2010 Aug;47(2):197-204.
177. McKay WF, Peckham SM, Badura JM. A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft). *Int Orthop* 2007 Dec;31(6):729-734.
178. Marks SC, Jr., Popoff SN. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat* 1988 Sep;183(1):1-44.

179. Gunatillake PA, Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater* 2003 May 20;5:1-16; discussion 16.
180. Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 2000 Dec;21(23):2335-2346.
181. Pitt CG, Gratzl MM, Kimmel GL, Surles J, Schindler A. Aliphatic polyesters II. The degradation of poly (DL-lactide), poly (epsilon-caprolactone), and their copolymers in vivo. *Biomaterials* 1981 Oct;2(4):215-220.
182. Causa F, Netti PA, Ambrosio L, Ciapetti G, Baldini N, Pagani S, et al. Poly-epsilon-caprolactone/hydroxyapatite composites for bone regeneration: in vitro characterization and human osteoblast response. *J Biomed Mater Res A* 2006 Jan;76(1):151-162.
183. Hutmacher DW, Schantz T, Zein I, Ng KW, Teoh SH, Tan KC. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *J Biomed Mater Res* 2001 May;55(2):203-216.
184. Loges S, Roncal C, Carmeliet P. Development of targeted angiogenic medicine. *J Thromb Haemost* 2009 Jan;7(1):21-33.
185. Hsiong SX, Mooney DJ. Regeneration of vascularized bone. *Periodontol* 2000 2006;41:109-122.
186. Orlandini M, Spreafico A, Bardelli M, Rocchigiani M, Salameh A, Nucciotti S, et al. Vascular endothelial growth factor-D activates VEGFR-3 expressed in osteoblasts inducing their differentiation. *J Biol Chem* 2006 Jun 30;281(26):17961-17967.
187. Nauth A, Giannoudis PV, Einhorn TA, Hankenson KD, Friedlaender GE, Li R, et al. Growth factors: beyond bone morphogenetic proteins. *J Orthop Trauma* 2010 Sep;24(9):543-546.
188. Schneider A, Bennek J, Olsen KO, Weiss J, Schmidt W, Rolle U. Experimental study evaluating the effect of a barrier method on postoperative intraabdominal adhesions. *Dig Dis Sci* 2006 Mar;51(3):566-570.
189. LifeSciences I. *Integra Dermal Regeneration Template - Package Insert International*; 2003.
190. Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 1977 Dec 22-29;270(5639):725-727.

191. Chen Y, Luk KD, Cheung KM, Xu R, Lin MC, Lu WW, et al. Gene therapy for new bone formation using adeno-associated viral bone morphogenetic protein-2 vectors. *Gene Ther* 2003 Aug;10(16):1345-1353.
192. Laschke MW, Harder Y, Amon M, Martin I, Farhadi J, Ring A, et al. Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng* 2006 Aug;12(8):2093-2104.
193. Guo R, Xu S, Ma L, Huang A, Gao C. Enhanced angiogenesis of gene-activated dermal equivalent for treatment of full thickness incisional wounds in a porcine model. *Biomaterials* 2010 Oct;31(28):7308-7320.
194. Jay SM, Shepherd BR, Andrejcsk JW, Kyriakides TR, Pober JS, Saltzman WM. Dual delivery of VEGF and MCP-1 to support endothelial cell transplantation for therapeutic vascularization. *Biomaterials* 2010 Apr;31(11):3054-3062.
195. Thurston G. Complementary actions of VEGF and angiopoietins on blood vessel permeability and growth in mice. *J Anat* 2002 May;200(5):529.
196. Carmeliet P. VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angioma-genesis? *Nat Med* 2000 Oct;6(10):1102-1103.
197. Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med* 2002 Dec 2;196(11):1497-1506.
198. Breen EC. VEGF in biological control. *J Cell Biochem* 2007 Dec 15;102(6):1358-1367.
199. Yla-Herttuala S. Gene therapy with vascular endothelial growth factors. *Biochem Soc Trans* 2009 Dec;37(Pt 6):1198-1200.
200. Rivera J, Lozano ML, Navarro-Nunez L, Vicente V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica* 2009 May;94(5):700-711.
201. Cao L, Mooney DJ. Spatiotemporal control over growth factor signaling for therapeutic neovascularization. *Adv Drug Deliv Rev* 2007 Nov 10;59(13):1340-1350.
202. Kanczler JM, Oreffo RO. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater* 2008;15:100-114.
203. Khan SN, Lane JM. The use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in orthopaedic applications. *Expert Opin Biol Ther* 2004 May;4(5):741-748.

204. Wildemann B, Kandziora F, Krummrey G, Palaschies N, Haas NP, Raschke M, et al. Local and controlled release of growth factors (combination of IGF-I and TGF-beta I, and BMP-2 alone) from a polylactide coating of titanium implants does not lead to ectopic bone formation in sheep muscle. *J Control Release* 2004 Mar 5;95(2):249-256.
205. Rai B, Teoh SH, Hutmacher DW, Cao T, Ho KH. Novel PCL-based honeycomb scaffolds as drug delivery systems for rhBMP-2. *Biomaterials* 2005 Jun;26(17):3739-3748.
206. Busam ML, Esther RJ, Obremskey WT. Hardware removal: indications and expectations. *J Am Acad Orthop Surg* 2006 Feb;14(2):113-120.
207. Mavrogenis AF, Dimitriou R, Parvizi J, Babis GC. Biology of implant osseointegration. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2009 Apr-Jun;9(2):61-71.

7 Danksagungen

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Christian Plank vom Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung des Klinikums rechts der Isar der TU München für die Initiierung und Betreuung meiner Arbeit bedanken. Die Geradlinigkeit seiner innovativen Forschungsvorhaben und die menschliche, sowie fachliche Kompetenz haben mich besonders beeindruckt. Zudem möchte ich ihm für das Vertrauen danken, das mir großen Freiraum für eigenständige Ideen und Projekte gab.

Bei meinem Doktorvater PD Dr. Florian Krötz aus der Medizinischen Poliklinik Innenstadt der LMU München möchte ich mich für die professionelle Supervision, die mich in entscheidenden Momenten auf Kurs hielt und für die Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Prof. Dr. Bernd Gänsbacher danke ich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung des Klinikums rechts der Isar der TU München anzufertigen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. José Tomas Egaña aus der Klinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie des Klinikums rechts der Isar der TU München, der mich freundschaftlich und ausgesprochen großzügig an seiner wissenschaftlichen Expertise teilhaben ließ und ohne dessen Begleitung Teile dieser Arbeit nicht mit gleicher Qualität umzusetzen gewesen wären.

Bei Ursula Hopfner möchte ich mich für ihre unerschöpfliche Hilfsbereitschaft bedanken.

Für die Einarbeitung in die Methoden des nicht-viralen Gentransfers und der Polymersynthese möchte ich Christian Koch danken, sowie Dr. Martina Anton für die ausführliche Anleitung während der Klonierungsarbeiten.

PD Dr. Manfred Ogris, Katarina Farkasova und Arzu Cengizeroglu vom Lehrstuhl für pharmazeutische Biotechnologie der LMU München und Dr. Carsten Rudolph, Dr. Michael Kormann, Dr. Manish Aneja, Dr. Günther Hasenpusch und Johannes Geiger aus der Arbeitsgruppe Molekulare Pneumologie und Experimentelle Therapieforschung am Dr. von Haunersches Kinderspital der LMU München möchte ich mich für ihren Einsatz im Zusammenhang mit verschiedenen Bioimaging-Studien bedanken.

Von unschätzbarem Wert sind der Rückhalt und die Unterstützung meiner Familie und meiner Freunde, die mir die Kraft gegeben haben, diesen Weg zu gehen.

8 Publikationen

8.1 Artikel in Fachzeitschriften

- „*Bioactivation of dermal scaffolds with a non-viral copolymer-protected gene vector*“. **Reckhenrich AK**, Hopfner U, Krötz F, Zhang Z, Koch C, Kremer M, Machens HG, Plank C, Egaña JT. *Biomaterials*. 2011 Mar;32(7):1996-2003.
- „*The role of single cell derived vascular resident endothelial progenitor cells in the enhancement of vascularization in scaffold-based skin regeneration*“. Zhang Z, Ito WD, Hopfner U, Böhmert B, Kremer M, **Reckhenrich AK**, Harder Y, Lund N, Kruse C, Machens HG, Egaña JT. *Biomaterials*. 2011 Jun;32(17):4109-17.
- „*The use of non-viral copolymer-protected gene vectors for bioactive poly-(D,L)-lactid implant surfaces in bone tissue engineering*“. **Reckhenrich AK**, Koch C, Egaña JT, Plank C. manuscript submitted to *European Cells and Materials Journal*
- „*The Use of Human Sweat Gland-derived Stem Cells for Enhancing Vascularization during Dermal Regeneration*“. Danner S, Kremer M, Petschnik AE, Nagel S, Zhang Z, Hopfner U, **Reckhenrich AK**, Weber C, Schenck TL, Becker T, Kruse C, Machens HG, Egaña JT. submitted to *Biomaterials*
- „*Cell-based Resorption Assays for Bone Graft Substitutes*“. Zhang Z, Egaña JT, **Reckhenrich AK**, Schenck TL, Lohmeyer JA, Schantz JT, Machens HG, Schilling AF. invited review submitted to *Acta Biomaterialia*

8.2 Kongressbeiträge (Erstautorenschaften)

8.2.1 Präsentationen

- „*The use of non-viral gene vectors to activate collagen scaffolds in tissue regeneration*“, **Reckhenrich AK. et al.**, 14. Chirurgische Forschungstage 2010, Rostock, Deutschland
- „*The release of proangiogenic molecules by gene activated scaffolds for tissue regeneration in vitro and in vivo*“, **Reckhenrich AK. et al.**, European Conference of Scientists and Plastic surgeons 2010, Helsinki, Finnland
- „*Genetic activation of collagen scaffolds to enhance angiogenesis during dermal regeneration*“, **Reckhenrich AK. et al.**, 127. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie 2010, Berlin, Deutschland

8.2.2 Postervorträge

- „*Bioactivation of collagen scaffolds with non-viral gene vectors to enhance the release of proangiogenic molecules in tissue regeneration*“. **Reckhenrich AK. et al.**, 7. Jahrestreffen der Deutschen Gesellschaft für Gentherapie 2010, München, Deutschland
- „*Genetic activation of collagen scaffolds to enhance angiogenesis during dermal regeneration*“. **Reckhenrich AK. et al.**, TERMIS-EU Meeting 2010, Galway, Irland
- „*Gene activated biomatrices for bone regeneration*“. **Reckhenrich AK. et al.**, 2nd Chinese-European Symposium on Biomaterials in Regenerative Medicine 2009, Barcelona, Spanien