

Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der  
Technischen Universität München, Klinikum Rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. K.-D. Wolff)

**Etablierung der nicht viralen Transfektion mittels copolymer protected  
gene vectors aus Poly-D-/-L-Laktid-beschichteten Titanoberflächen –  
eine In-vitro-Studie**

Christine Drechsler

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

Doktors der Zahnheilkunde

genehmigten Dissertation.

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

Prüfer der Dissertation: Univ.-Prof. Dr. H. Deppe  
apl. Prof. Dr. A. Krüger

Die Dissertation wurde am 15.11.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und  
durch die Fakultät für Medizin am 28.04.2010 angenommen.

**In Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet**

**Das, wobei unsere Berechnungen versagen, nennen wir Zufall.**

Albert Einstein (1879-1955)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>I. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Bedeutung des Gentransfers für die Zahnmedizin.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Defektheilung und Knochenregeneration .....</b>	<b>3</b>
<b>3. Wachstumsfaktoren in der Knochenheilung .....</b>	<b>5</b>
<b>4. Gentransfer .....</b>	<b>6</b>
<b>5. Genvektoren.....</b>	<b>9</b>
<b>6. Virale Genvektoren .....</b>	<b>9</b>
<b>7. Nicht virale Genvektoren.....</b>	<b>10</b>
<b>8. Copolymer Protected Gene Vectors - COPROGS .....</b>	<b>12</b>
<b>9. Möglichkeiten der biodegradierbaren Beschichtung mit Poly-D-/-L-Laktid .....</b>	<b>14</b>
<b>10. Problemstellung der Arbeit .....</b>	<b>17</b>
<b>II. Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
<b>1. Eigene Untersuchungen .....</b>	<b>18</b>
<b>2. Beschichtungstechnologie - Herstellung der Materialien .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 BMP-2-Plasmidpräparation mittels Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation..</b>	<b>18</b>
2.1.1 Materialien und Geräte.....	18
2.1.2 Ablauf der Plasmidpräparation.....	20
<b>2.2 Präparation von Plasmid-DNA mit Qiagen® Plasmid Purification.....</b>	<b>21</b>
2.2.1 Materialien und Geräte.....	21
2.2.2 Ablauf der Präparation von Plasmid-DNA mit Qiagen® Plasmid Purification .....	22
<b>2.3 Fotometrische Messung der Plasmidkonzentration.....</b>	<b>23</b>
2.3.1 Materialien und Geräte.....	23
2.3.2 Ablauf der fotometrischen Messung der Plasmidkonzentration.....	23
<b>2.4 Gelelektrophorese .....</b>	<b>24</b>
2.4.1 Materialien und Geräte.....	24
2.4.2 Ablauf der Gelelektrophorese .....	24
<b>2.5 Formulierung der Genvektoren .....</b>	<b>25</b>
2.5.1 Materialien und Geräte.....	26
2.5.2 Berechnung der nicht viralen Komplexe.....	26
2.5.3 Ablauf der Herstellung der Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe.....	27

<b>2.6</b>	<b>Beschichtungstechnologie.....</b>	<b>29</b>
2.6.1	Materialien und Geräte.....	29
2.6.2	Herstellung der Beschichtungslösung .....	30
2.6.3	Beschichtungstechnologie - Beschichten der Biomaterialien.....	31
2.6.4	Zellkultur.....	32
<b>2.7</b>	<b>Auswertung - Messverfahren.....</b>	<b>34</b>
2.7.1	Luciferase - Aktivitätsmessung .....	34
2.7.2	ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay)-Messung.....	35
2.7.2.1	Prinzip des Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay .....	35
2.7.2.2	Materialien und Herstellung der Pufferlösungen.....	36
2.7.2.3	Durchführung der ELISA-Messung .....	38
<b>3.</b>	<b>Analyse der Beschichtungsmethode - Expressionsnachweis aus COPROG<sub>Luciferase</sub>- Poly-D-/-L-Laktid-beschichteten Aluminiumfolien .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Materialien und Geräte .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2</b>	<b>Versuchsaufbau des Expressionsnachweises aus COPROG<sub>Luciferase</sub>- Poly-D-/-L-Laktid-beschichteten Aluminiumfolien .....</b>	<b>39</b>
<b>4.</b>	<b>Expressionsnachweis von BMP-2 aus COPROG<sub>BMP-2</sub>-Poly-D-/-L-Laktid-beschichteten Aluminiumfolien.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Materialien und Geräte .....</b>	<b>40</b>
<b>4.2</b>	<b>Versuchsaufbau.....</b>	<b>41</b>
<b>5.</b>	<b>Einfluss des Homogenisierens der COPROG<sub>Plasmid</sub>-Poly-D-/-L-Laktid-Beschichtungslösung auf die Expressionshöhe .....</b>	<b>42</b>
<b>5.1</b>	<b>Materialien und Geräte .....</b>	<b>42</b>
<b>5.2</b>	<b>Versuchsaufbau zum Vergleich Glashomogenisator - modifizierter Homogenisator ...</b>	<b>44</b>
<b>5.3</b>	<b>Versuchsdurchführung .....</b>	<b>45</b>
<b>6.</b>	<b>Erprobung des modifizierten Homogenisators -Expressionsnachweis von BMP-2 nach Beschichtung mit COPROG<sub>BMP-2</sub>-Poly-D-/-L-Laktid-Beschichtungslösung in Abhängigkeit von verschiedenen BMP-2-Konzentrationen .....</b>	<b>46</b>
<b>6.1</b>	<b>Materialien und Geräte .....</b>	<b>46</b>
<b>6.2</b>	<b>Versuchsdurchführung der Beschichtung mit COPROG<sub>BMP-2</sub>-Poly-D-/-L-Laktid-Beschichtungslösung mit verschiedenen BMP-2-Konzentrationen.....</b>	<b>46</b>
<b>III.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
<b>1.</b>	<b>Allgemeine Angaben zur Beschichtung .....</b>	<b>48</b>
<b>2.</b>	<b>Beschichtungstechnologie .....</b>	<b>49</b>
<b>2.1</b>	<b>Plasmidherstellung von BMP-2 .....</b>	<b>49</b>
<b>3.</b>	<b>Analyse der Beschichtungsmethode - Expressionsnachweis aus COPROG<sub>Luciferase</sub>- Poly-D-/-L-Laktid-beschichteten Aluminiumfolien .....</b>	<b>50</b>
<b>4.</b>	<b>Expressionsnachweis aus COPROG<sub>BMP-2</sub>- Poly-D-/-L-Laktid-beschichteten Aluminiumfolien.....</b>	<b>52</b>
<b>4.1</b>	<b>Expressionsnachweis mit je 10 µg BMP-2-Plasmid beschichteten Folien .....</b>	<b>52</b>

4.2	Expressionsnachweis mit je 20 µg BMP-2-Plasmid-beschichteten Folien .....	53
4.3	Expressionsnachweis mit je 40 µg BMP-2-Plasmid je Folie.....	54
4.4	Ergebnisse des Expressionsnachweises aus COPROG <sub>BMP-2</sub> - Poly-D-/-L-Laktid-beschichteten Aluminiumfolien im Vergleich .....	55
5.	Einfluss des Homogenisierens auf die Expressionshöhe .....	57
5.1	Glashomogenisator .....	57
5.2	Modifizierter Homogenisator .....	59
5.3	Ergebnisse des Glashomogenisators und des modifizierten Homogenisators im Vergleich.....	60
6.	Expressionsnachweis von BMP-2 nach Beschichtung mit dem modifizierten Homogenisator.....	62
6.1	Ergebnisse Gruppe 1 - 0,2 % DNA/R203 w/w.....	62
6.2	Ergebnisse Gruppe 2 - 0,4 %DNA/R203 w/w.....	63
6.3	Ergebnisse Gruppe 3 - 0,8 % DNA/R203 w/w.....	65
6.4	Ergebnisse des Expressionsnachweis nach Beschichtung mit dem modifizierten Homogenisator im Vergleich .....	67
IV.	Diskussion .....	68
1.	Zielsetzung .....	68
1.1	Das Prinzip der genaktivierten Biomaterialien.....	68
1.2	BMP-2-Genvektorenkomplexe für den nicht viralen Gentransfer .....	69
1.3	Poly-D-/-Laktid - Beschichtungstechnologie und Trägermaterialien.....	70
1.4	Zielsetzung.....	72
2.	Etablierung der Beschichtungsmethode.....	73
2.1	Expressionsnachweis aus COPROG <sub>Luciferase</sub> - Poly-D-/-L-Laktid-beschichteten Aluminiumfolien .....	73
2.2	Expressionsnachweis aus COPROG <sub>BMP-2</sub> - Poly-D-/-L-Laktid-beschichteten Aluminiumfolien .....	74
3.	Einfluss des Homogenisierens der COPROG <sub>DNA</sub> -Poly-D-/-L-Laktidlösung auf die Expression.....	74
4.	Analyse der Beschichtungsmethode mit COPROG <sub>BMP-2</sub> unter Berücksichtigung verschiedener Plasmidkonzentrationen.....	76
5.	Klinische Relevanz .....	79
V.	Zusammenfassung.....	82
VI.	Summary .....	83

<b>VII.</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>84</b>
<b>VIII.</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>98</b>
<b>IX.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>102</b>
<b>X.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>103</b>

## Abkürzungsverzeichnis

[c]	Konzentration
°C	Grad Celsius, Temperaturmaßeinheit
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BMP-2	Bone Morphogenetic Protein-2
bp	Baasenpaar
Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	Hydroxylapatit
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
COPROG	Copolymer protected gene vector
CsCl	Cäsiumchlorid
Da	Dalton
dd H <sub>2</sub> O	Zweifach destilliertes Wasser ( <i>aqua bidestillata</i> )
DNA	Deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
e-PTFE	Polyterafluorethylen
H <sub>2</sub> O	Wasser
IGF-I und II	insulin-like growth factors I und II
Luc	Luciferase
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium-Ion
Min.	Minuten
ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
P6YE5C	Pepdid-Polyethylenglycol-Copolymer
PAMAM Dendrimere	Poly(amido)amin-Dendrimere
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	platelet derived growth factors
PDLLA	Poly-D-/-L-Laktid
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin [H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH) <sub>n</sub> -H]

pg	Picogramm
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Kationen-Aktivität; $\text{pH} = -\lg a_{\text{H}^+}$
pK <sub>b</sub>	negativer dekadischer Logarithmus der Basenkonstante K <sub>b</sub> $\text{K}_b = -\lg K_b$
PRO COP	Protective copolymers
R203	Resomer 203; Poly D,L Laktid (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ) <sub>n</sub>
rpm	revolutions per minute – Umdrehungen pro Minute
s.c.	Super coiled
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
Sek.	Sekunden
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TGFβ	transforming growth factors beta
w/w	Gewichtsprozentangabe



# **I. Einleitung**

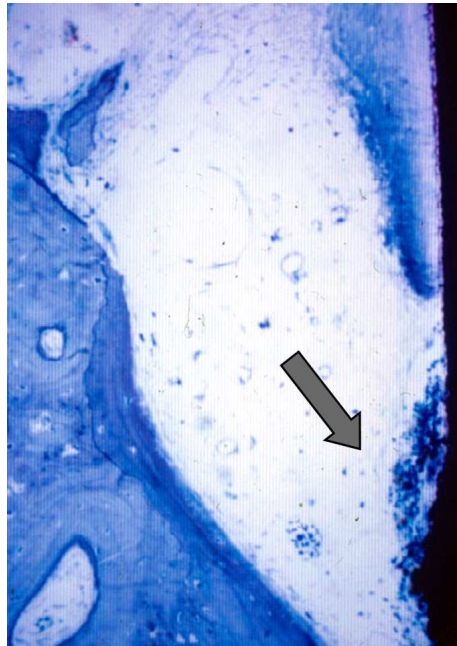
## **1. Bedeutung des Gentransfers für die Zahnmedizin**

In vielen Bereichen der rekonstruktiven Chirurgie des Gesichtsschädels (Horch und Steegmann 1985, Seite 673; Horch et al. 2006, Seite 709; Kolk et al. 2003a, Seite 45; Kolk et al. 2003b, Seite 309), aber auch in der Spalt- (Deppe et al. 2004c, Seite 211; Horch et al. 2004, Seite 681; Horch et al. 2006, Seite 709) und der zahnärztlichen Chirurgie (Deppe et al. 2003, Seite 369) besteht die Notwendigkeit der Förderung der Knochenregeneration bzw. der Knochenneubildung. Eine autologe Wiederherstellung, d. h. mit körpereigenem Gewebe, ist sehr aufwendig, teilweise risikoreich und daher in vielen Fällen nicht als Methode der ersten Wahl anzusehen (Horch et al. 2006, Seite 709; Papadopulos et al. 2008, Seite 76). Insbesondere im vorbestrahlten oder chronisch entzündlichen Knochen kann die Einheilung rekonstruktiver alloplastischer Implantate gestört oder z. T. sogar aussichtslos sein. Zahlreiche Patienten, die einer solchen Behandlung bedürfen, haben außerdem aufgrund ihrer Vorerkrankungen häufig auch in Verbindung mit Voroperationen bzw. Strahlentherapie schlechte vaskuläre Verhältnisse, welche die ausreichende Versorgung eines mikrovaskulären Transplantates erheblich gefährden oder sogar verhindern. Aus diesem Grund stellen die Verbesserung und die Beschleunigung der Osseointegration autologer und alloplastischer Implantate auch heute noch eine große Herausforderung dar.

In der zahnärztlichen Chirurgie bzw. Implantologie gehört die Verwendung dentaler Implantate in vielen Fällen zur Therapie der Wahl. Dentale alloplastische Implantate werden im Bereich der Schleimhaut-Periost-Decke bzw. des Kieferknochens eingebracht. Im Gegensatz zu Implantaten in der allgemeinen Chirurgie, wie Hüftgelenkprothesen, die nach der Einheilung von Gewebe umgeben sind, perforieren dentale Implantate die Schleimhaut und stehen so permanent mit der keimbeladenen Mundhöhle in Verbindung.

Mit zunehmender Verbreitung der dentalen Implantate rückt das analog zur Entstehung entzündlicher Zahnbetterkrankungen (Parodontitis) auftretende Problem der Periimplantitis in den Vordergrund. Es handelt sich hierbei um die mikrobielle Plaquebesiedlung des Implantatlagergewebes, woraus bei Nichtbehandlung eine chronische Entzündung mit nachfolgendem progredienten Knochenabbau und späterem Verlust des Implantates resultiert. Als unmittelbare Folge kommt es zum Verlust der Kaufunktion sowie Beeinträchtigung der Ästhetik und Phonetik. Nach Smedberg et al. (1993, Seite 44) weisen bis zu 28 % der dentalen Implantate periimplantäre Entzündungen auf. Da die Anzahl der inserierten Implantate in Deutschland von 600.000 Implantaten im Jahr 2006 auf über 800.000 im Jahr 2008 (KZBV Jahrbuch 2008, Seite 176) stieg, ist folglich mit einer rasanten Zunahme behandlungsbedürftiger Implantate zu rechnen.

Grundlage jeder Therapie periimplantärer Knochendefekte bildet die vollständige Dekontamination der Implantatoberfläche von Plaque und Endotoxinen, da nur an keimfreien Implantatoberflächen eine Wiederanlagerung von Knochen möglich ist. Die Keimbefreiung bzw. -reduktion der Implantatoberflächen repräsentiert nur eine Säule in der Periimplantitistherapie. Der zweite, wesentlich wichtigere Behandlungsschritt besteht in der Knochenregeneration im periimplantären Defektbereich.



**Abbildung 1: Histologische Darstellung eines ausgedehnten Knochenabbaus im Bereich des Interface (Pfeil) mit der Folge des Implantatverlusts (Vergrößerung x 50) (Quelle: Deppe 1998)**

Die Kontaktfläche zwischen Implantatoberfläche und Knochen ist von entscheidender Bedeutung für die langfristige Stabilität des Implantates, da es bei Kaubewegungen zu starken axialen Belastungen und Scherkräften kommt und somit hohe Belastungen auftreten.

Die konventionelle Therapie der sogenannten gesteuerten Geweberegeneration (GBR - Guided Bone Regeneration) führt oft zum Misserfolg, da die hierbei zum Einsatz kommenden Membranen aus Polytetrafluorethylen (e-PTFE) in der hoch kontaminierten Mundhöhle häufig bakteriell besiedelt werden und so keinen Schutz, sondern eine zusätzliche Gefahrenquelle darstellen (Deppe 1998, Seite 56; Grunder et al. 1993, Seite 290; Hürzeler et al. 1997, Seite 108). Dies unterstreicht die Notwendigkeit der Verbesserung der autologen, d. h. körpereigenen Knochen-Implantatverbindung (Deppe 1998, Seite 56).

## 2. Defektheilung und Knochenregeneration

Knochengewebe besteht aus 65 % anorganischen Mineralstoffen, 25 % organischer Matrix und 10 % Wasser. Den Hauptbestandteil des Mineralanteils des Knochens bildet nanokristallines Hydroxylapatit  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ . Die Knochenmatrix, d. h. der mineral- und wasserfreie organische Knochenanteil, setzt sich zu 95 % aus Kollagen (I, V) und zu 5 % aus der nicht kollagenen Matrix zusammen. Zu Letzterer zählen neben Proteoglykanen, Glykoproteinen und Serumproteinen auch die Wachstumsfaktoren. Durch die spezielle Anordnung von Hydroxylapatit und Kollagenfibrillen erhält der Knochen seine Festigkeit. Dabei vermitteln die organischen Anteile im Knochen die Biege- und Zugfestigkeit und der Mineralanteil die Druckstabilität (Soldner und Herr 2001, Seite 258). Knochen ist zur organotypischen Regeneration - *Resistutio ad integrum* - fähig, d. h., Frakturdefekte werden durch neu gebildeten Knochen und nicht durch minderwertiges Narbengewebe ersetzt. Der komplexe Vorgang der Knochenbruchheilung wird durch eine Vielzahl lokal und systemisch wirkender Mechanismen gesteuert. Zahlreiche zeitlich und räumlich begrenzte Interaktionen von Osteoblasten mit der extrazellulären Matrix sowie mit Hormonen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren sind beschrieben (Abe et al. 2000, Seite 669; Abiraman et al. 2002, Seite 3029; Akizuki et al. 1997, Seite 223; Alden et al. 1999, Seite 2245).

Die Integration implantierten Materials bedingt eine ähnliche Reaktion wie bei einer Frakturheilung und hat einen Umbau des Knochens zur Folge.

Die gesamte Integration eines Implantates wird in drei Phasen unterteilt (Albrektsson und Johansson 2001, Seite S96): die Osteoinduktion - als Teil der physiologischen Knochenheilung, die Osteokonduktion, die eine kurz wirkende Gewebsantwort auf ein Implantat verkörpert, sowie und die Osseointegration, die einen langen Halt des Implantates bewirkt (Albrektsson und Johansson 2001, Seite S97). Diese Phasen sind eng miteinander verbunden.

Die Osteoinduktion ist „ein Prozess, bei dem die Osteogenese induziert wird“ (Albrektsson und Johansson 2001, Seite S96). Aus dem verletzten Knochen und dem Blut werden extrazelluläre Flüssigkeit, nicht kollagene Proteine und Wachstumsfaktoren freigesetzt, welche die Reparatur des Knochens aktivieren (Schenk und Buser 1998, Seite 30). Aus dem Knochenmark und von Periost sowie Endost werden Osteoprogenitorzellen angezogen, welche sich proliferieren und zu Osteoblastenvorläuferzellen und Osteoblasten differenzieren. Von Bedeutung in diesem Kontext ist der Umstand, dass Zellen, sobald sie ausdifferenziert sind, die Migration einstellen (Davies 1998, Seite 393). Eine bedeutsame Rolle spielen bei der Osteoinduktion die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). Sie werden als Antwort auf ein Trauma oder beim Remodeling freigesetzt und besitzen osteoinduzierende Eigenschaften (Albrektsson und Johansson 2001, Seite S97).

Die Osteokonduktion beschreibt die Zellverteilung und das Knochenwachstum auf der Implantatoberfläche (Albrektsson und Johansson 2001; Seite S98; Marx und Garg 1998, Seite 273). Es erfolgt das Einsprossen von Kapillaren in das umliegende Gewebe und das Einwandern von

Osteoprogenitorzellen in und auf das Implantat (Masuda et al. 1998, Seite 23). Die Blutgefäßbildung wird durch die Wachstumsfaktoren IGF-I und -II, TGF- $\beta$  und PDGF unterstützt (Albrektsson und Johansson 2001, Seite S99).

Die Knochenbildung geht folgendermaßen vonstatten (Davies 1998, Seite 393-394):

Zunächst werden die beiden nicht kollagenen Proteine Osteopontin und Sialoprotein sezerniert. Kalziumphosphat heftet sich an die Bindungsstellen dieser Proteine an und bildet fächerförmige Kristalle. Anschließend werden Kollagenfasern sezerniert, die an dieser Oberfläche binden, kalzifizieren und den initialen Geflechtknochen bilden. Diese Fasern sind folglich durch die erste kalzifizierte Schicht, welche kollagenfrei, reich an Kalzium, Phosphor, Osteopontin und Sialoprotein des Knochens ist, vom Implantat getrennt. Diese Kittlinien-ähnliche schmale Schicht aus amorphem Gewebe mit einer Dicke von 20 bis 5000 nm (Albrektsson und Johansson 2001, Seite S99; Boss 1999, Seite 4; Davies 1996, Seite 427) markiert die Grenzschicht zwischen dem Implantat und neuem Knochen, genauso wie Kittlinien im physiologischen Remodelingzyklus die Grenze zwischen unterschiedlich altem Knochen markieren (Davies 1996, Seite 427). Der Erfolg der Osteokonduktion ist nicht nur von der Fähigkeit zur Knochenreparatur, sondern gleichsam von den Eigenschaften des Implantatmaterials abhängig (Albrektsson und Johansson 2001, Seite S99).

Die Phase der Osseointegration benötigt sowohl die Osteoinduktion als auch die Osteokonduktion als Vorbereitung. Osseointegration bedeutet eine stabile und langjährig anhaltende Fixation des Implantates im Knochen (Albrektsson und Johansson 2001, Seite S99). Unabhängig davon muss Osseointegration als Prozess aufgefasst werden und nicht als Ergebnis. Angestrebt wird eine möglichst umfangreiche Integration und Umwachsung des Implantates im Knochen, wobei aber auch nach vielen Jahren nie eine 100 %ige Kontaktfläche zwischen Knochengewebe und Implantat beobachtet werden konnte (Albrektsson und Johansson 2001, Seite S99; Schenk und Buser 1998, Seite 31). Während der Osseointegration wird der in der Osteokonduktionsphase gebildete Geflechtknochen durch Remodeling in lamellären Knochen umgebaut und somit das Implantat stabil in die mechanischen Belastungsanforderungen des Knochens einbezogen (Schenk und Buser 1998, Seite 31). Der Erfolg der Osseointegration, mithin die Haltbarkeit des sogenannten Interfaces (die Verbindungsstelle zwischen Knochen und Implantat) hängt von verschiedenen Faktoren ab. Als Grundvoraussetzung muss eine gute Knochenqualität mit ausreichender Vaskularisation vorhanden sein, damit die Regeneration von gesundem, neuem Knochengewebe erfolgen kann (Donath 1988, Seite 108; Fritz 1999, Seite 162). Weiterhin sind die Implantateigenschaften von Bedeutung. Zusätzliche entscheidende Faktoren für eine gelungene Osseointegration sind von verschiedenen Autoren benannt worden: So schreibt schon Branemark (1983, Seite 406), dass ein großes Präparationstrauma während der Operation zur Entwicklung der unerwünschten bindegewebigen Schicht führen kann. Weitere Untersucher (Knöfler und Graf 1989, Seite 257; Linder 1989, Seite 132) machten dieselbe Beobachtung. Auch sollte eine sofortige Stabilisierung des Implantates erreicht werden, da eine fehlende Fixation die Ausbildung einer fibrösen Zwischenschicht fördert und somit die

Osseointegration stören kann (Cameron et al. 1973, Seite 310; Soballe et al. 1990, Seite 304). Nach der Operation sollte für eine adäquate Bewegungseinschränkung gesorgt (Boss 1999, Seite 2; Brunski 1999, Seite 104; Goldberg und Jinno 1999, Seite 18-19; Henry 1999, Seite 148; Kirsch und Donath 1984, Seite 38-39; Martens et al. 1980, Seite 115; Schenk und Buser 1998, Seite 32) sowie die Belastung des operierten Bereichs auf ein Minimum reduziert werden, da bei sofortiger Belastung oder Überlastung (selbst wenn diese erst nach einiger Zeit eintritt) die Osseointegration vermindert bis gänzlich verhindert werden kann (Branemark 1983, Seite 406; Brunski 1999, Seite 99; Fritz 1999, Seite 163; Gondolph-Zink 1998, Seite 103-104; Huja et al. 1999, Seite 221; Schenk und Buser 1998, Seite 31).

### **3. Wachstumsfaktoren in der Knochenheilung**

Eine Erfolg versprechende Möglichkeit der Förderung der Wundheilung allgemein und im Besonderen der Knochenheilung besteht in der Anwendung von Wachstumsfaktoren (Baylink et al. 1993, Seite 565; Reddi 2001, Seite S1; Schliephake 2002, Seite 469-470), die seit vielen Jahren im Mittelpunkt des Interesses der Knochenforschung stehen. In zahlreichen In-vitro- und In-vivo-Studien konnte nachgewiesen werden, dass Wachstumsfaktoren in der Lage sind, Knochenwachstum signifikant zu beschleunigen und stimulierend auf die Heilung des umliegenden Gewebes zu wirken (Lind et al. 1998, Seite 4; Trippel et al. 1996, Seite 1279; Zellin und Linde. 1997, Seite 188). Zu nennen sind insbesondere TGF- $\beta$  (transforming growth factors), IGF (insulin-like growth factors) und die BMPs (Bone Morphogenetic Proteins). Wachstumsfaktoren gehören zu Polypeptiden von sechs bis 45 Kilodalton (1000 Dalton = 1 Kilodalton = 1 kDa), die an der Zellproliferation, -differenzierung und Morphogenese von Gewebe und Organen während der Embryogenese, im Wachstum und im Erwachsenenalter beteiligt sind (Schliephake 2002, Seite 469). Bisher sind die Funktionen der zahlreichen Wachstumsfaktoren während des Prozesses der Knochenheilung bzw. der Knochenregeneration lediglich in Ansätzen bekannt. Dennoch konnte für verschiedene Faktoren eine Förderung der Knochenbildung bzw. eine ektope Knochenbildung, folglich eine Knochenbildung außerhalb des eigentlichen Knochengewebes als Nachweis ihres osteoinduktiven Potenzials in vivo belegt werden (Huang et al. 2002, Seite 479; Nakamura et al. 2003, Seite 1861; Schliephake 2002, Seite 470; Schmidmaier et al. 2003, Seite 608). Wachstumsfaktoren sind wichtige Steuerelemente des Knochenzellmetabolismus. Der Anteil der Wachstumsfaktoren in der nicht kollagenen Matrix beläuft sich lediglich auf weniger als 0,1 % (Baylink et al. 1993, Seite 567; Habal und Reddi 1994, Seite 527), sie üben indes eine bedeutende Kontrollfunktion auf den Knochenstoffwechsel aus.

In-vitro- und In-vivo-Studien haben ergeben, dass einige dieser Faktoren einen stimulierenden Effekt auf osteo- und chondrogene Zellen aufweisen (Isgaard et al. 1986, Seite 369; Linkhart et al. 1996, Seite 1S-2S; Nielsen et al. 1994, Seite 37; Nilsson et al. 1987, Seite 94) und somit den Knochenstoffwechsel stimulieren (Aspenberg und Lohmander 1989, Seite 476; Joyce et al. 1990, Seite 206; Yasko et al. 1992, Seite 669). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die

Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$  1 und IGF-I einen stimulierenden Einfluss auf den Knochenstoffwechsel und die Defektheilung in der Mandibula besitzen (Deppe et al. 2003, Seite 376).

In den vergangenen Jahren hat sich die Forschung vor allem auf das BMP-2 fokussiert, da in Untersuchungen am lebenden Organismus gezeigt werden konnte, dass BMP-2 im Vergleich zu anderen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren über ein größeres Potenzial zur Förderung der Knochenheilung verfügt (Kandziora et al. 2002, Seite 489).

Die erstmals 1965 von Marshall Urist entdeckten Wachstumsfaktoren im Knochen wurden als Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) bezeichnet (Urist 1965, Seite 896; Wozney et al. 1988, Seite 1533). Sie gehören zu der gleichen Familie von Zytokinen wie TGF- $\beta$  1 und IGF-I (Rosen und Thies 1992, Seite 100). Sie spielen eine zentrale Rolle im Verlauf der enchondralen Osteogenese und dienen als chemotaktische Botenstoffe für mesenchymale Stammzellen aus dem Markraum (Abe et al. 2000, Seite 671), die zu Osteoblasten differenzieren (Suzawa et al. 1999, Seite 2130). Innerhalb der Bone Morphogenetic Proteins existieren acht miteinander verwandte Proteine (BMP-2 bis BMP-9). Der Gehalt an Bone Morphogenetic Proteins wird auf 1 $\mu$ g/kg Knochengewebe geschätzt (Kübler 1997, Seite 15). Der Einsatz von BMPs in vivo zeigte bei verschiedenen Tierversuchsmodellen eine Heilung mit beschleunigter Kallusbildung und -reifung (Schmidmeier et al. 2002, Seite 820; Zellin und Linde 1997, Seite 189). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass eine osteoinduktive Wirkung von rhBMP-2 auf die Knochenregeneration bukkaler Defekte in Verbindung mit dentalen Implantaten abhängig von einer Mindestkonzentration und dem Studiendesign sein kann (Smeets et al. 2009, Seite e10).

#### **4. Gentransfer**

Die kurze Halbwertszeit sowie die Schwierigkeit der Applikation direkt am Wirkort beschränken den klinischen Einsatz von Wachstumsfaktoren erheblich (Bonadio et al. 1999, Seite 756; Smeets et al. 2009, Seite e10). Diese Problematiken konnten z. T. durch die Einbindung von Wachstumsfaktoren in biodegradierbare Schwämme gelöst werden. Gleichwohl sind diese Schwämme nur eingeschränkt als medizinische Trägermaterialien, z. B. auf metallischen Implantaten, geeignet, da sie kaum mechanische Stabilität besitzen und dementsprechend bei der klinischen Anwendung nicht stabil mit dem Implantat verbunden sind (Marukawa et al. 2002, Seite 287; Weber et al. 2002, Seite 63). Dessen ungeachtet ist die Eigenstabilität dieser Schwämme zu gering, als dass sie als belastbare Knochenersatzmaterialien dienen könnten. Die schwerwiegendsten Einschränkungen der klinischen Anwendung von Wachstumsfaktoren liegen aber besonders in der erschwerten gentechnischen Herstellung aufgrund geringer Produktionsausbeuten in Verbindung mit einem sehr hohen Preis. Diese Aussage gilt generell für alle rekombinant hergestellten Wachstumsfaktoren und hier insbesondere auch für BMP-2 (Kawai et al. 2003, Seite 1547; Schmidmaier et al. 2002, Seite 821). Diese Limitationen erlauben daher mittelfristig keinen klinisch realisierbaren Einsatz, um größere Knochendefekte durch die Verwendung von Wachstumsfaktoren zur Ausheilung zu bringen. Ein

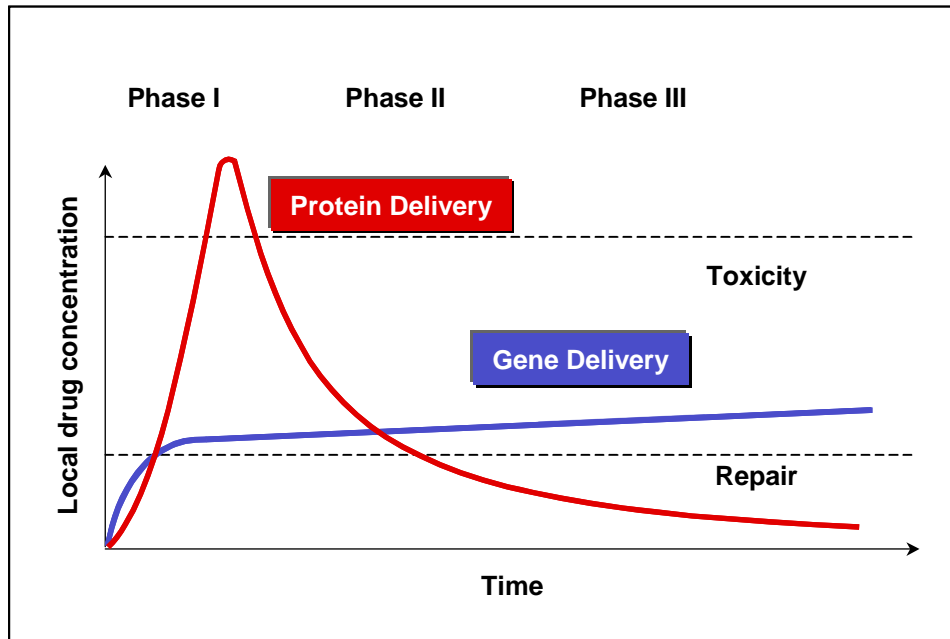
Lösungsansatz besteht in der Möglichkeit, die Anwendung teurer Wachstumsfaktoren durch die hier vorgestellte Gentherapie gezielt vom Körper selbst am Ort des Defektes übernehmen zu lassen (Hannallah et al. 2003, Seite 1046). Diese „natürliche“ Produktion von Wachstumsfaktoren wird durch die Übertragung der genetischen Information in die an der Gewebereaktion beteiligten Zellen erreicht. Diesen Vorgang bezeichnet man als Transfektion. Die Gensequenzen vieler Wachstumsfaktoren sind bekannt. Mithilfe von Vektoren als „carrier und shuttle“ therapeutischer Gensequenzen können Zellen nach erfolgter Transfektion am Wirkort die gewünschten Faktoren produzieren. Zu diesem Zweck werden die Zellen nach Transfektion implantiert (Partridge et al. 2002, Seite 144) oder die genetische Information anhand von Trägermaterialien an den gewünschten Ort transportiert. Biomaterialien wie Kollagenschwämme finden dabei Anwendung als Carrier von DNA oder Genvektoren (Bonadio et al. 1998, Seite 62; Bonadio 2000, Seite 304). Zellen, die in diese Matrix wachsen, werden so transfiziert. Eine solche Form der Applikation würde die In-vitro-Kultivierung und -Transfektion von Knochenzellen überflüssig machen (Bonadio et al. 1999, Seite 756).

Durch die kontinuierliche Freisetzung der Proteine beim Gentransfer können z. B. Mediatoren wie Wachstumsfaktoren exprimiert werden, um zelluläre Prozesse zu initiieren oder zu beschleunigen. Die Expression dieser Proteine findet über einen begrenzten Zeitraum statt und endet nach der gewünschten Wirkung. Bonadio et al. (1999, Seite 757) zeigte unterschiedliche Verläufe der Expressionen zwischen Proteinfreisetzung und Genfreisetzung. Während Proteine schnell freigesetzt werden, entfalten Gene ihre Wirkung langsamer, jedoch über einen langen Zeitraum mit einer relativ konstanten Wirkung (siehe Abb. 2 und 3).

Protein	Gentransfer
<ul style="list-style-type: none"> <li>• kurze Halbwertszeit (Inaktivierung)</li> <li>• Systemische Toxizität</li> <li>• Kommerzielle Verfügbarkeit (Preis)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• lokale Verfügbarkeit in „Self“-Form (posttransl. Modifikation)</li> <li>• Aktive Dosis nur lokal</li> <li>• Plasmid-DNA billig</li> </ul>

**Abbildung 2: Vergleich zwischen Protein und Gentransfer**

In zahlreichen In-vitro- und In-vivo-Studien konnte nachgewiesen werden, dass entsprechende Zellen in der Lage sind, Wachstumsfaktoren zu bilden (Okubo et al. 2001, Seite 102) und den Knochenstoffwechsel anzuregen (Baltzer et al. 2000, Seite 735; Musgrave et al. 1999, Seite 541). Sogenannte Plasmide können als Instrument genutzt werden, um die Bildung von Proteinen spezifisch in bestimmten Zellen und Geweben zu induzieren. Sie haben den Vorteil, dass sie nicht in das Genom integriert werden und nur für einen gewissen Zeitraum wirksam sind (Bonadio et al. 1999, Seite 757).



Local drug concentration = lokale Wirkstoffkonzentration  
 Protein Delivery = Proteinfreisetzung  
 Gene Delivery = Genfreisetzung  
 Toxicity = Wirkstoffkonzentration, die zur Toxizität führt  
 Repair = Wirkstoffkonzentration, die zu Wundheilung führt  
 Time = Zeitverlauf

**Abbildung 3: Freisetzungskinetik von rekombinantem Protein und Plasmid beim Gentransfer in der Wundheilung und Geweberegeneration im Vergleich, Einteilung der Wundheilung in 3 Phasen.** Proteine werden schnell von einer Matrix freigesetzt und erreichen einen hohen, sogar toxischen Wirkspiegel, der aber auch rasch wieder unter den therapeutischen Bereich abfällt. Dagegen entfalten die Gene mit ihrer Expression einen über einen langen Zeitraum anhaltenden Wirkspiegel, der im therapeutischen Bereich liegt. (Abbildung nach Bonadio et al. 1999, Seite 757)

„Ideale Gentransfersysteme sollten biologisch abbaubar und nicht toxisch sein, keine Immunantwort hervorrufen und in der Lage sein, in die Zielzellen zu gelangen und dort effiziente Genexpression erzielen“ (Huang 1999, Seite 4). Darüber hinaus sollten die Gentransfersysteme „ein hohes Maß an Stabilität im jeweiligen biologischen Umfeld“ des Zielgewebes aufweisen (Kircheis et al. 2001, Seite 354).

Häufig eingesetzte genterapeutische Verfahren lassen sich in virale und nicht virale Strategien unterscheiden (siehe Abb. 4). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, nackte DNA in die Zellen einzuschleusen.

Virale Vektoren	Nicht virale Vektoren		
Retroviren Herpesviren Adenoviren Adenoassoziierte Viren	<i>Biochemische Methoden:</i> Liposomen Rezeptortargeting Polymere	<i>Chemische Methoden:</i> Kalziumphosphat DEAE Dextran	<i>Physikalische Methoden:</i> Elektroporation „Gene Gun“ (= Partikelbeschuss) Jet injection Direkte Injektion

**Abbildung 4: Häufig eingesetzte virale und nicht virale Vektorsysteme in der Genterapie**



## 5. Genvektoren

Genvektoren sind Vehikel, die dazu dienen, ein therapeutisches Gen an die Zielzellen heranzubringen und in diese einzuschleusen. Ein grundlegendes Element in der Konstruktion von Genvektoren bilden die Plasmide.

Plasmide sind meist ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle. Die wichtigsten Funktionsmerkmale eines Plasmidvektors sind der Replikationsursprung, die Restriktionsschnittstellen (multiple cloning site), das therapeutische oder Reporter gen, das Antibiotikaresistenzgen und der Promotor.

Der Replikationsursprung (ori = origin of replication) dient sowohl bei Prokaryonten als auch bei Eukaryonten für die Replikation im Wirtsorganismus und als Bindungsstelle spezifischer Proteine. An den Restriktionsschnittstellen wird das therapeutische Gen inseriert (Schmid 2006, Seite 236).

Folgende ideale Anforderungen werden an einen Vektor für den Einsatz in der Gentherapie gestellt (Verma und Somia 1997, Seite 240):

1. hohe Titer, die es erlauben, das Transgen in möglichst viele Zellen einzubringen;
2. leichte Handhabbarkeit und leichte reproduzierbare, standardisierte Herstellung;
3. die Fähigkeit, gezielt an Stellen in das Genom einer Zielzelle zu integrieren, ohne Insertionsmutagenesen zu verursachen;
4. einen Promoter, der eine regulierbare Kontrolle der Expression zulässt;
5. die Fähigkeit, ausschließlich die gewünschten Zielzellen zu transduzieren;
6. möglichst keine Immunogenität.

Beim viralen Gentransfer fungiert der Virus als Vektor; das Gen ist in ein virales Genom integriert. In der Entwicklung der Gentherapie wurden zunächst Viren als Vektoren beim Gentransfer verwendet.

Die nicht viralen Vektoren mit dem inserierten therapeutischen Gen sind durch andere Elemente verpackt (siehe nicht viraler Gentransfer).

## 6. Virale Genvektoren

Um Erbinformation in Zellen einzubringen, macht man sich beim viralen Gentransfer die evolutionär erworbenen Fähigkeiten von Viren zunutze. Virale Vektoren bedienen sich der jeweiligen eigenen Penetrationsmechanismen, um ihre genetische Information in die Zellen zu transportieren, behalten aber teilweise ihre virusspezifischen Eigenschaften und somit Gefahrenpotenziale bei (Knoell und Yiu 1998, Seite 903). Es wurden virale Vektoren entwickelt, denen die Fähigkeit zur Replikation genommen wurde (Tabin et al. 1982, Seite 426; Wei et al. 1981, Seite 935). Fischer und Kollegen führten die erste erfolgreiche Gentherapie einer Erbkrankheit mithilfe retroviraler Vektoren durch (Fischer et al. 2002, Seite 615). Beim viralen Gentransfer bestehen indes bei der Anwendung trotz der hohen Effizienz viraler Genvektorsysteme einige gewichtige Nachteile, welche die Anwendung im Menschen limitieren. Zum einen können virale Genvektorsysteme immunologische Reaktionen hervorrufen (Brown und Lillicrap 2002, Seite 1138; Simon et al. 1993, Seite 771; Worgall et al. 1997,

Seite 37), die alle Schweregrade der anaphylaktischen Reaktion bis hin zum anaphylaktischen Schock zeigen (Alden et al. 1999, Seite 2251). Zum anderen können die viralen Gensequenzen in das Genom der Wirtszelle integriert und so unkontrolliert weitergegeben werden, unter Umständen sogar maligne Transformationen hervorrufen oder direkt zum Tode führen (Knoell und Yiu 1998, Seite 903). Grundsätzlich existiert die Gefahr, dass Viren die Fähigkeit zur Replikation wiedererlangen, zu ungewollten Infektionen beim Patienten führen und die remutierten Viren Verbreitung finden. Der eigentliche Vorteil des viralen Gentransfers, nämlich dass anhand bestimmter Viren die Erbinformation in das menschliche Genom stabil eingebaut werden kann, erweist sich hinsichtlich einer möglichen Mutagenese durch unkontrollierten Einbau als Risiko (Cooke 2001, Seite 247; Mitani und Kubo 2002, Seite 136). Auch eine virale Transfektion ex vivo im Sinne des tissue engineering mit anschließender Replantation der transfizierten Zellen stellt keine realisierbare Alternative dar, da die aufgeführten Risiken des viralen Gentransfers bestehen bleiben (Dragoo et al. 2003, Seite 628). Virale Vektoren sind in der Produktion zudem aufwendig und teuer, da sie die Herstellung in einem biologischen System erfordern (Kawai et al 2003, Seite 1547). Zwar lieferten zahlreiche In-vivo-Studien mit viralem BMP-2-Gentransfer bereits vielversprechende Ergebnisse und bewirkten im Tierversuch eine Beschleunigung der Knochenregeneration bzw. eine ektopische Knochenbildung (Alden et al. 1999, Seite 2251; Dragoo et al. 2003, Seite 627; Musgrave et al. 1999, Seite 542, Varady et al. 2002, Seite 632) jedoch mit den für den viralen Gentransfer verbundenen Risiken und Einschränkungen, die eine Übertragbarkeit auf den Menschen bisher verbieten (siehe auch Abb. 5).

	<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
Adenoviren	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infizieren auch nicht teilende Zellen</li> <li>• Hohe Transfereffizienz</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Immunogen</li> <li>• Nur kurzzeitige Genexpression</li> </ul>
AVV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Induzieren keine Immunreaktion</li> <li>• Nicht humanpathogener Virus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Niedrige Gentransfer-effizienz</li> </ul>
Retroviren	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infiziert nur sich teilende Zellen</li> <li>• Hohe Transfereffizienz</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Immunogen</li> <li>• Niedrige Effizienz</li> </ul>
Herpesviren	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sehr hohe Virustiter möglich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zytotoxische Infektion</li> </ul>
HIV-1 Lentviren	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lang andauernde Genexpression in Geweben und Zellen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Keine Erfahrungen</li> <li>• Humanpathogen</li> </ul>

**Abbildung 5: Vor- und Nachteile verschiedener viraler Gentransfersysteme**

## 7. Nicht virale Genvektoren

Nicht virale Vektoren sind nicht mit den Nachteilen viraler Vektoren behaftet, sodass die Möglichkeit besteht, diese nach eingehenden Untersuchungen auch am Menschen anzuwenden.

Der nicht virale Gentransfer lässt sich nach biochemischen, chemischen und physikalischen Vektorsystemen unterscheiden (vgl. Abb. 4).

Bei der Mikroinjektion werden die Nukleinsäuren und Vektoren mit einer feinen Kapillare in das Zytoplasma oder den Zellkern der Zelle injiziert. Sie findet Anwendung in der Grundlagenforschung und kann ex vivo oder in vitro erfolgen. Den Vorteil dieser Methode bildet eine Transfektion von nahezu 100 % der Zellen. Gleichwohl erweist sich die geringe Anzahl der Zellen, die injiziert werden können, als nachteilhaft, ebenso wie der hohe Aufwand und die komplizierte Handhabung. Die Verwendung kurzer elektrischer Impulse zum Einbringen von DNA in Zellen wird als Elektroporation bzw. Elektrotransfektion bezeichnet (Chu et al. 1987, Seite 1311; Neumann et al. 1982, Seite 842). Durch das elektrische Feld im Zielgewebe kommt es zu einer vorübergehenden Porenbildung in der Plasmamembran. Die Effizienz der Elektroporation hängt von folgenden Faktoren ab: der Stärke des elektrischen Feldes, der Dauer des Impulses, der Temperatur vor und nach dem elektrischen Impuls, der verwendeten DNA-Konzentration und des verwendeten Elektroporationsmediums. Um maximale Elektroporationseffizienzen zu erreichen, müssen alle diese Parameter für den jeweiligen Zelltyp optimal eingestellt werden (Wolf et al. 1994, Seite 525). Diese Gentransfermethode ist ebenfalls nur ex vivo und in vitro anwendbar und zeigt in vitro eine hohe Toxizität. Bei der Sonoporation wird das Zielgewebe Ultraschall ausgesetzt und wie bei der Elektroporation eine vorübergehende Porenbildung an der Membran erreicht (Deng et al. 2004, Seite 519). Ein In-vivo-Einsatz dieser Methode ist im kardiovaskulären System, aber auch im Muskelgewebe sowie in Tumoren möglich.

Die bisher erfolgreichsten nicht viralen Gentransfersysteme sind die kationischen Liposome und kationischen Polymere. Die Vektoren weisen unter physiologischen Bedingungen eine positive Ladung auf und binden so über elektrostatische Anziehungskräfte an die unter physiologischen Bedingungen negativ geladene DNA. Die Formulierung des Gen-Vektor-Komplexes geschieht über selbstständige spontane Aggregation von Vektor und DNA. Dieser Prozess wird als DNA-Kondensation bezeichnet; sie ist Voraussetzung für die Entstehung kleiner Genvektorkomplexe. Dabei spielen verschiedene molekulare Kräfte eine Rolle, wie elektrostatische und hydrophobe Anziehungskräfte, Wasserstoffbrückenbindungen und Ausschluss des Solvens (Huang 1999, Seite 9). Es wurden zahlreiche kationische Lipide entwickelt (Felgner et al. 1987, Seite 7413), wovon einige bereits in klinischen Tests therapeutische Anwendung fand (Alton et al. 1999, Seite 947; Caplen et al. 1995, Seite 39; Gill et al. 1997, Seite 199).

Im Rahmen der Entwicklung von Strategien zur nichtviralen Gentherapie wurden bereits etliche kationische Polymere entwickelt. Die am ausführlichsten untersuchten unter ihnen sind Polylysine (Wagner et al. 1990, Seite 3410), PAMAM Dendrimere (Haensler and Szoka 1993, Seite 372) und Polyethylenimin (PEI) (Boussif et al. 1995, Seite 7297). Polykationen mit hohem Molekulargewicht sind sehr effektiv für die Kondensation von DNA. In der Gruppe der polykationischen Polymere besitzt Polyethylenimin (PEI,  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH})_n-\text{H}$ ) die höchste Transfektionseffizienz. PEI verfügt über eine hohe positive Ladungsdichte, die mit der negativen DNA die Polyplexe bildet. Aufgrund seiner hohen Pufferkapazität führt PEI zu einer Freisetzung des Polykationen-DNA-Komplexes (Polyplexe) aus dem Endosomen-/Lysosomen-Kompartiment und verhindert somit den Abbau der

DNA durch Enzyme der Lysosomen; weiterhin transportiert das Polymer die DNA direkt in den Zellkern.

Polylysin zeigt gute Eigenschaften, DNA zu kondensieren, indes fehlt auf Polylysin basierenden Polyplexen der Mechanismus zur Endosomolyse, weshalb endosomolytische Substanzen, beispielsweise Chloroquin, zugegeben werden müssen, um hohe Transfektionseffizienzen zu erreichen (Cotten et al. 1990, Seite 4035; Zauner et al. 1996, Seite 911). Im Gegensatz dazu besitzen Dendrimere und PEI aufgrund ihrer hohen Pufferkapazität inhärente endosomolytische Eigenschaften. Besonders PEI verfügt über die Fähigkeit, aufgrund seines niedrigen  $pK_b$ -Wertes im Bereich der endosomalen pH-Werte als Puffer zu wirken (Kircheis et al. 2001, Seite 343). Aufgrund dieser hohen Pufferkapazität agiert PEI als eine Art „Protonenschwamm“ und führt bei pH-Abfall im Endolysosom zum osmotischen Anschwellen und schließlich zum Platzen des Endolysosoms (Boussif et al. 1995, Seite 7301).

## **8. Copolymer Protected Gene Vectors - COPROGS**

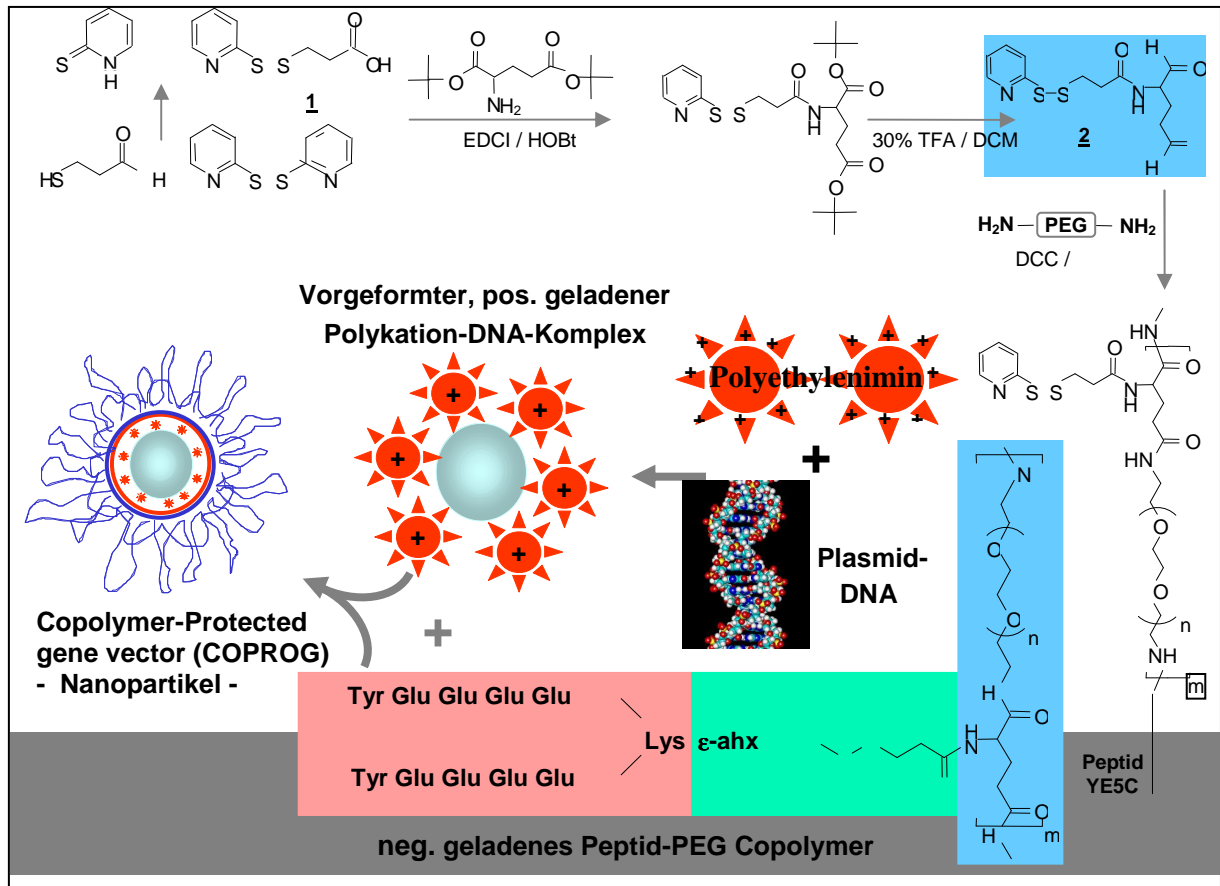
Aus der hohen positiven Ladungsdichte, welche die Effizienz des PEI bedingt, resultiert jedoch auch seine erhebliche Zytotoxizität. Membranen werden durch PEI lysiert; wahrscheinlich kommt es sogar zur Komplexierung zelleigener DNA. Aus diesem Grund wurden nicht virale copolymer protected gene vectors (COPROGs) entwickelt, indem die Polyplexe mit einem Hüllpolymer ummantelt werden. Dieses Hüllpolymer - ein Derivat von Polyethylenglykol (PEG) - ist ein Peptid-Polyethylenglycol-Copolymer. Dieses Konzept wurde von Finsinger et al. (2000, Seite 1183) und Ogris et al. (2001, Seite 1) beschrieben. Ogris et al. (2001, Seite 3) zeigte die Bindung der PEG-Ketten durch kovalente Bindung an die Oberflächen der PEI-DNA-Polyplexe. Finsinger et al. (2000, Seite 1184) ummantelte die PEI-DNA-Polyplexe mit einer Schutzhülle aus Kopolymeren von PEG und anionischen Peptiden (siehe Abb. 6). Die Anlagerung der negativ geladenen Polymere um die vorgeformten DNA-PEI-Komplexe erfolgt aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen. Die Seitenketten des Kopolymers bestehen aus dem Peptid „YE5C“ mit der Sequenz  $(YE_5)_2K\text{-ahx-C}$  [Y = Tyrosin, E = Glutaminsäure, K = Lysin, ahx = 6-Amino-hexansäure (als Spacer) und C = Cystein (für die kovalente Kopplung über Disulfidbrücken)].

Die so „geschützten“ DNA-Polykation-Komplexe sind reinen Polyplexen in Freisetungsverhalten, Vektorstabilität und Genexpression *in vitro* und *in vivo* überlegen (Scherer et al. 2002, Seite 642).

Durch die Entwicklung sogenannter protective Copolymers (PROCOPs) konnten Polyplexe vor inaktivierenden Interaktionen *in vivo* geschützt werden (Finsinger et al. 2000, Seite 1188).

Diese copolymer protected gene vectors wurden zur Applikation mittels Kollagenschwämme als Träger *in vitro* und *in vivo* genutzt (Scherer et al. 2002, Seite 634). Es konnte nachgewiesen werden, dass die COPROGs-beladenen Schwämme einer Applikation der nackten DNA oder mit ungeschützten Vektoren beladenen Kollagenschwämmen hinsichtlich protrahierter Freisetzung, Vektorstabilität und Genexpression *in vitro* und *in vivo* überlegen waren (Scherer et al. 2002,

Seite 634). Mit diesen Vorarbeiten wurde die Technik des nicht viralen Gentransfers etabliert und in vivo eine hinreichende Transfektionsrate erzielt.

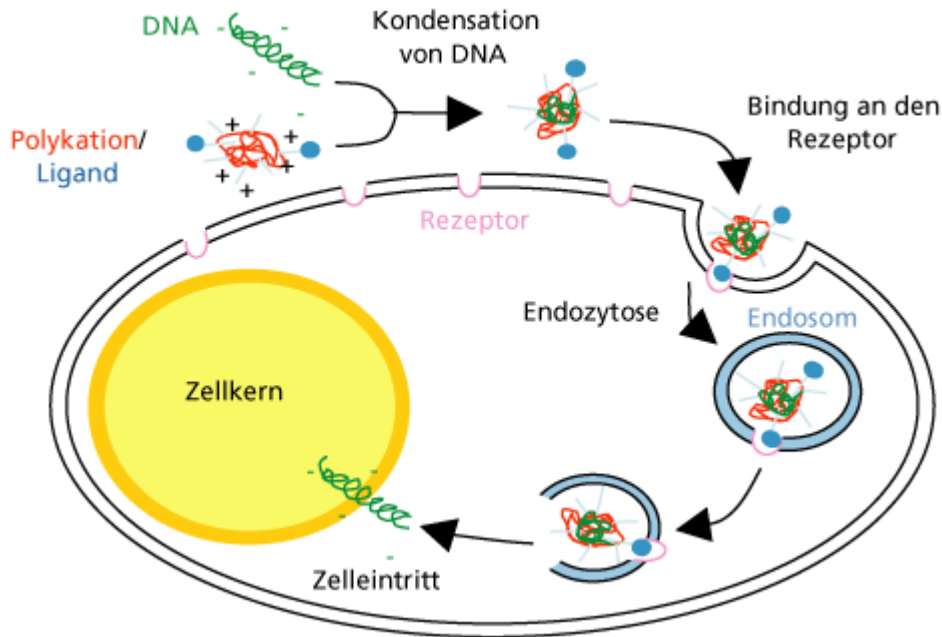


**Abbildung 6: Funktionsprinzip der Herstellung der copolymer protected gene vectors – schematische Darstellung:** pDNA wird mit Polykationen (Polyethylenimin PEI) inkubiert. Dabei wird die DNA kompaktiert, und ein positiv geladener Kernpartikel entsteht. Durch elektrostatische Wechselwirkungen bildet sich bei Zugabe des negativ geladenen Peptid-PEG-Kopolymers ein geschützter Komplex (Copolymer protected gene vector – COPROG) (Abbildung modifiziert durch Plank nach Finsinger et al. 2000, Seite 1183-1184)

Für eine effiziente Transfektion müssen mehrere Hürden, etwa die Aufnahme der Partikel in die Zelle (Endozytose), endosomale Freisetzung, Wanderung durch das Zytoplasma, Aufnahme in den Zellkern und schließlich die Transkription der DNA erfolgreich überwunden werden (siehe Abb. 7).

Polyplexe werden über Endozytose in die Zelle aufgenommen und gelangen so ins Endosom. Aufgrund der hohen Pufferkapazität des PEI kommt es dort zum Anstieg des osmotischen Druckes, der letztlich zur Ruptur des Endosoms führt. Die auf diese Weise aus dem Endosomen-/Lysosomen-Kompartiment freigesetzten Polyplexe sind ausreichend stabil, einem Angriff der Nukleasen in Endosomen, Lysosomen und dem Zytosol standzuhalten. Die PEI-DNA-Polyplexe gelangen unabhängig vom Zellzyklus als Einheit in den Kern und geben dort ihr genetisches Material frei.

Beim nicht viralen Gentransfer wurde gezeigt, dass nicht virale Genvektoren oder deren Bestandteile vor allem mit Blutbestandteilen des Komplementsystems interagieren. (Plank et al. 1996, Seite 1437).



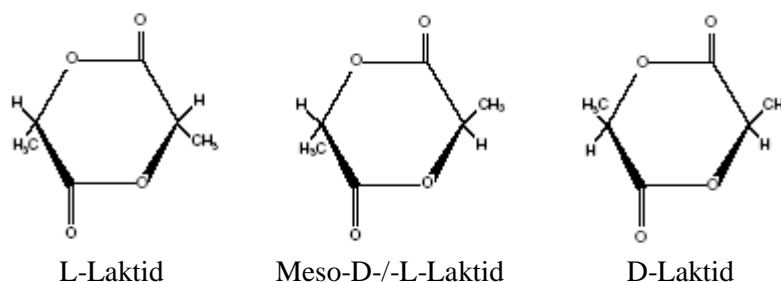
**Abbildung 7: Schematische Darstellung der DNA-Aufnahme in eine Zelle durch Endozytose und anschließende Genexpression.** Durch ionische Wechselwirkung wird aus negativ geladener DNA und einem positiv geladenen Polymer ein nicht viraler Vektor. Dieser wird nach Adsorption des DNA-Vektor-Komplexes an der negativen Zellmembran durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Nach Freisetzung der DNA im Zytoplasma wird das Transgen exprimiert. (Abbildung modifiziert nach Ogris und Wagner 2002, Seite 482)

## 9. Möglichkeiten der biodegradierbaren Beschichtung mit Poly-D/-L-Laktid

Biodegradierbare Polymere, insbesondere polymere Verbindungen vom Typ der Milch- und Glykolsäure, gewinnen in der Orthopädie und Unfallchirurgie immer mehr an Bedeutung (Lendlein 1999, Seite 279; Thoma und Schlütermann 1991, Seite 821). Diese werden als resorbierbares Naht-, Osteosynthesematerial oder als parenteral zu applizierende Wirkstoffträger eingesetzt (Middleton und Tipton 2000, Seite 2335; Thoma und Schlütermann 1991, Seite 821).

Unter resorbierbaren Polymeren werden polymere Werkstoffe zusammengefasst, die unter physiologischen Bedingungen primär durch Hydrolyse im Organismus zu nicht toxischen Produkten abgebaut werden (Thoma und Schlütermann 1991, Seite 821). Wichtigste Vertreter dieser Materialklasse sind Polylaktide, Polyglykolid und deren Copolymere sowie Polydioxanon.

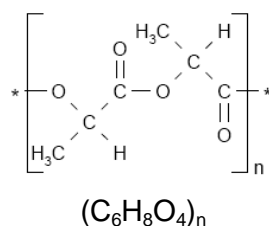
Grundbaustein für die Herstellung von Poly-laktid ist Laktat (Milchsäure), welches in zwei spiegelbildlichen Formen vorliegen kann. Man differenziert anhand der Stellung der OH-Gruppe zwischen D- und L-Laktat (siehe Abb. 8).



**Abbildung 8: Chemische Struktur der Monomerbausteine von Polylaktiden**

L-Laktat kommt im Blut, im Muskelserum, in der Gallenflüssigkeit, in den Nieren und in anderen Organen des Menschen vor. Auch in aktiven oder verletzten Muskeln wird durch den anaeroben Abbau von Glukose L-Laktat gebildet. D-Laktat kann ausschließlich künstlich hergestellt werden. Aus der Milchsäure werden durch eine Kondensationsreaktion (Wasserabspaltung) ringförmige Laktide. Der Abbau von Polymeren erfolgt durch unterschiedliche Mechanismen wie Hitze, Oxidation und enzymatische Vorgänge (Laurencin und Lane 1994, Seite 325). Aufgrund der instabilen Bindungen im Polymergerüst der Biomaterialien ist der häufigste Abbauweg die Hydrolyse (Middleton und Tipton 2000, Seite 2344). Polylaktide werden zu Milchsäure hydrolysiert, in den Zitatzyklus eingeschleust und enzymatisch zu Wasser und Kohlendioxid abgebaut (Athanasίου et al. 1998, Seite 727; Middleton und Tipton 2000, Seite 2344).

Eine biodegradierbare und biokompatible Polylaktidbeschichtung von medizinischen Titanfolien oder Implantaten kann mit dem Resomer R 203<sup>®</sup> der Fa. Boehringer Ingelheim, einem Poly-D-/L-Laktid mit einem spezifischen Gewicht von 29500 Dalton, durchgeführt werden.



**Abbildung 9: Resomer 203 - chem. Darstellung**

Die chemische Struktur dieses Polylaktids wird durch  $(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_4)_n$  beschrieben (vgl. Abb. 9). In dieses mittels Kaltbeschichtungstechnologie auf Biomaterialien aufgebrauchte Polymer können verschiedene Substanzen wie Wachstumsfaktoren oder Antibiotika integriert werden. Während der Resorption der Beschichtung erfolgt im Organismus eine kontinuierliche Freisetzung der integrierten Substanzen in die Umgebung, sodass auch Substanzen mit einer kurzen Halbwertszeit über einen längeren Zeitraum in hohen Konzentrationen am Wirkort vorliegen (Herrmann et al. 1999, Seite 51; Stemberger et al. 1997, Seite 17). Der Vorteil dieser Beschichtung gegenüber vergleichbaren Entwicklungen besteht

zum einen in der Möglichkeit, nahezu jedes beliebige Implantat und Knochenersatzmaterial beschichten zu können. Zum anderen besitzt diese Beschichtung eine besonders hohe mechanische Stabilität, sodass sie auch bei Belastung fest mit der Trägermatrix verbunden bleibt. So führen z. B. das Einbringen eines Implantates in den Knochen und das anschließende Entnehmen zu einem Verlust der Polyaktidbeschichtung von weniger als 10 % (Schmidmaier et al. 2001b, Seite 452). Damit ist eine grundlegende Voraussetzung erfüllt, geeignete Trägermaterialien, welche den mechanischen Voraussetzungen eines Knochenersatzes gerecht werden und belastbar sind, mit Wachstumsfaktoren und Plasmiden oder anderen chemischen Substanzen wie z. B. Antibiotika zu beschichten. Die Integration verschiedener Antibiotika in diese Polyaktidbeschichtung erbrachte in Studien keine einschränkende Wirkung auf die Knochenheilung (Deppe et al. 2003, Seite 369; Deppe und Stemberger 2004a, Seite 190; Deppe et al. 2004b, Seite 39; Stemberger et al. 1997, Seite 17), sodass auch die Voraussetzungen einer Verbesserung des Infektionsschutzes während der Einheilungsphase von Knochenersatzmaterialien und Implantaten gegeben ist. Die aus dieser Entwicklungsarbeit hervorgegangenen Polyaktidbeschichtungen mit integrierten Antibiotika werden inzwischen auf Osteosynthesematerialien erfolgreich klinisch am Menschen eingesetzt.

Ebenso wie Antibiotika können auch Wachstumsfaktoren bzw. ihre genetische Information in Form von Plasmiden unabhängig von ihrer kurzen biologischen Halbwertszeit in einer hohen und gleich bleibenden Konzentration über einen Zeitraum von mehreren Wochen direkt am Wirkort im Knochen-Implantat-Interface freigesetzt werden. In-vivo-Untersuchungen von Implantaten, die mit einer Kombination der Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$  1 und IGF-I beschichtet waren, demonstrierten nach 28 Tagen eine Beschleunigung der Defektfüllung als wichtige Vorstufe der Knochenheilung im Vergleich zu Implantaten ohne Wachstumsfaktoren in der Beschichtung. Die Wirkungsmechanismen beruhen wahrscheinlich auf einer Synthesesteigerung von Knochenmatrixproteinen durch IGF I bzw. auf einer Rekrutierung und Proliferation osteoblastärer Vorläuferzellen durch TGF- $\beta$  I (Deppe und Stemberger 2004a, Seite 190; Schmidmaier et al. 2001a, Seite 341; Schmidmaier et al. 2003, Seite 604).

Es konnte bewiesen werden, dass die Kombination der Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$  I/IGF-I ein größeres osteoinduktives Potenzial besitzt als die Applikation der einzelnen Wachstumsfaktoren (Schmidmaier et al. 2003, Seite 604). BMP-2 wiederum hat im Vergleich zur Kombination TGF- $\beta$  I/IGF-I ein nochmals gesteigertes Potenzial, die Knochenheilung zu fördern (Kandziora et al. 2002, Seite 482). Diese Erkenntnisse zusammen mit den vielversprechenden Ergebnissen des viralen BMP-2-Gentransfers zur Förderung der Knochenheilung haben zu der Entwicklung von Fahren für nicht virale BMP-2-Plasmide geführt. Diese Plasmidformulierungen besitzen nicht das Gefahrenpotenzial und die Limitationen eines viralen Gentransfers, sodass sie daher nach eingehenden Vorversuchen mittelfristig die Perspektive einer klinischen Anwendung am Mensch besitzen.



## 10. Problemstellung der Arbeit

Trotz verbesserter Oberflächen der Zahnimplantate und engmaschigem Patientenrecall kann es im Laufe der Zeit zu infektionsbedingten Implantatlockerungen und Knochenabbau kommen, die langfristig einen Verlust mit entsprechenden Folgeoperationen bedingen können. Diese sind mit hohen Belastungen und Risiken für den Patienten behaftet. Neben der Verbesserung bisheriger Behandlungsstrategien bedeutet dies gleichzeitig die Erforschung und Entwicklung neuer Systeme zur Geweberegeneration. Der lokale Matrix-vermittelte Gentransfer mit nicht viralen Genvektoren repräsentiert eine sichere und akzeptierte Methode in der Genthherapie.

Aufgrund bereits erhobener Daten für Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe sollten entsprechende Genvektorkonstrukte im Rahmen der vorliegenden Arbeit formuliert werden.

Zu diesem Zweck war es notwendig, eine geeignete Beschichtungsmethode eines Matrix-vermittelten Gentransfersystems auf metallischen Trägermaterialien zu entwickeln. Der in der vorliegenden Abhandlung verwendete Wachstumsfaktor BMP-2 benötigt ein Trägermaterial, um seine im Knochen induzierende Wirkung zu entfalten. Die Verwendung von Titanfolien erfolgte im Hinblick auf weiterführende Tests *in vivo*.

Zur Etablierung der Beschichtungstechnologie und zum Nachweis der Durchführbarkeit („proof of principle“) soll das Reporter-gen Luciferase in Verbindung mit einem Matrix-vermittelten Gentransfer verwendet werden. *In vitro* soll eine Expression von transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Bei der Entwicklung der Beschichtungsmethode für den nicht viralen, lokalen Gentransfer ist es vonnöten, eine Lösung für die Einarbeitung der wässrigen Genvektorformulierung in die organische Polymerlösung zu finden. Eine reproduzierbare Handhabung der Beschichtungstechnologie ist das Ziel der vorliegenden Entwicklung, um diese dann im zweiten Schritt auf den Wachstumsfaktor BMP-2 zu übertragen („proof of concept“). BMP-2 wird erfolgreich zur Verbesserung der Frakturheilung sowie bei parodontalen und dentalen Defekten eingesetzt.

Auf Grundlage der entwickelten Beschichtungstechnologie soll in der Zellkultur eine Genexpression von 3T3 Mausfibroblasten und 293 Zellen gemessen werden. Weiterhin sind Abhängigkeiten der Plasmidkonzentration auf die Expressionshöhe zu beleuchten.

## II. Material und Methoden

### 1. Eigene Untersuchungen

In den nachfolgenden Abschnitten wird die Entwicklung einer modifizierten Technologie zur Beschichtung von Titanfolien mit copolymer protected gene vectors beschrieben. Der Expressionsnachweis erfolgte in der Zellkultur mit verschiedenen Zelltypen.

Vorversuche und die Entwicklung einer geeigneten Methode des Beschichtungsvorganges wurden mit dem Reportergen Luciferase und Aluminiumfolie durchgeführt.

Nach Etablierung einer geeigneten Methode erfolgte die Verwendung des Plasmids des Wachstumsfaktors BMP-2.

### 2. Beschichtungstechnologie - Herstellung der Materialien

#### 2.1 BMP-2-Plasmidpräparation mittels Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation

##### 2.1.1 Materialien und Geräte

**Tabelle 1: Material und Geräte zur Plasmidpräparation mittels Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation**

##### **Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien (Bezugsquelle)**

Centrifuge Tubes, 500 ml (Fa. Beckmann, München)

Digitaler Multi Timer (Fa. Neolab, Heidelberg)

Eppendorf – Pipette Research<sup>®</sup>, versch. Größen (Fa. Eppendorf, Hamburg)

Erlmeyerkolben (Fa. Schott AG, Mainz)

Kanüle spitz – Serican (Fa. Braun, Melsungen)

Kanüle stumpf – Sterican (Fa. Braun, Melsungen)

Laborkittel

Messzylinder, 200 ml, 500 ml (Fa. Brand GmbH, Wertheim)

Nitril-Handschuhe (Fa. Kimberly Clark, Koblenz)

Pipetten, Falcon Pipette, versch. Größen (Fa. Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes)

E. coli, BMP-2 (Wyeth, 401 North Middleton Rd., Pearl River, NY)

Reaktionsgefäßständer (Fa. Neolab, Heidelberg)

Schutzbrille (Fa. UVEX GmbH, Fürth)

Sterilfilter (Millex – FG, 0,2 µl Filter Unit, Millipore)

TPP-Röhrchen – Falcon Tube (versch. Größen) (Fa. TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz)

**Geräte (Bezugsquelle)**

Eismaschine (Fa. Ziegra, Isenhagen)  
 High-speed-J2HS-Zentrifuge (Beckmann-Coulter GmbH, Krefeld)  
 Kühlschranks -80 °C (Fa. Heareus, Hanau)  
 Schüttelinkubator, Thermomixer comfort (Fa. Eppendorf, Hamburg)  
 Stativ  
 Tischzentrifuge Biofuge primo R (Fa. Heareus, Hanau)  
 Ultrazentrifuge Optima LE-80K (Fa. Beckmann, München)  
 UV-Licht  
 Varifuge 3.0R (Fa. Heraeus, Hanau)  
 Außerdem werden Geräte der Standardlaborausstattung verwendet.

**Chemikalien (Bezugsquelle)**

Ampicillin (Fa. Sigma, Deisenhofen)  
 Cäsiumchlorid (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)  
 EDTA (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)  
 Essigsäure (Fa. Merck, Darmstadt)  
 Ethidiumbromid (Fa. Boehringer, Mannheim)  
 Glukose 1M (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)  
 H<sub>2</sub>O dd (steril) (im eigenen Labor hergestellt)  
 Isopropanol (Fa. Merck, Darmstadt)  
 Kaliumacetat (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen)  
 Natriumchlorid (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen)  
 Natriumhydroxyd 0,2 N NaOH (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen)  
 Plasmid BMP-2 (Fa. Bayer Corp, Emery Ville, USA)  
 Natrium – Dodecyl – Sulfat SDS 1 % SDS (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)  
 Tris 1M; pH8 (Fa. Merck, Darmstadt)

**Puffer und Lösungen**

LB-Medium:	Hefeextrakt (5 g/l); Trypton (10 g/l); Natriumchlorid (10 g/l)
NaOH/SDS Puffer:	1 % SDS; 0,2N NaOH
Lysozypuffer (Angaben f. 500 ml):	0,5 EDTA, 10 mM (10 ml); 1M Glukose, 50 mM (25 ml); 1M Tris, 25 mM (12,5 ml); dd H <sub>2</sub> O (452,5 ml); Lysozym (5 mg/ml)
5M Kalium-Acetat-Puffer:	60 ml 5M Kaliumacetat; 11,5 ml Essigsäure; ad 100 ml H <sub>2</sub> O
SSC Sodium Citrate Standard:	3M NaCl; 0,3M Trinatriumcitrat; pH 7,3
Isopropanol gesättigt mit CsCl:	1M Tris pH8; 0,5 M EDTA pH8; Isopropanol ; ddH <sub>2</sub> O
TE-Puffer:	10 mM Tris, pH 7,5; 1 mM EDTA

### 2.1.2 Ablauf der Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation dient der Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien. Die DNA-Präparation erfolgte nach der Methode der Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation. Dabei wird im ersten Schritt ein Bakterienlysat hergestellt.

1. Zugabe von 0,5 ml Antibiotika (Ampicillin) zu 500 ml LB-Medium;
2. Überführung von 3 ml in 15 ml Kulturröhrchen, Zugabe von 70 µl Bakteriensuspension (E. coli);
3. Inkubation für vier Stunden bei 180 rpm und 37 °C;
4. Zugabe der 3 ml Vorkultur in den 500-ml-LB-Medium-Erlmeyerkolben;
5. Übernachtinkubation bei 37 °C und 180 rpm in einem Schüttelinkubator für 18 Stunden.

Im zweiten Schritt der Plasmidpräparation erfolgt die Lysatreinigung der DNA mittels alkalischer Lyse.

1. Verteilung der Bakteriensuspension auf 500 ml Beckmann-Becher (max. 250 ml);
2. Zentrifugation in High-speed-Zentrifuge bei 6000 rpm und 4 °C (15 Min.);
3. Entfernung des Überstandes, Resuspension des Pellets mit 40 ml Lysozympuffer;
4. Inkubation für 20 Min. bei Raumtemperatur;
5. Zugabe von 80 ml alkalischem SDS-Puffer (Natrium-Dodecyl-Sulfat-Puffer);
6. Inkubation für 5 Min. auf Eis;
7. Zugabe von 60 ml Kaliumacetatpuffer;
8. Inkubation für 30 Min. auf Eis;
9. Zentrifugation in High-speed-Zentrifuge bei 10000 rpm und 4 °C (30 Min.);
10. Überstand in neuem 500 ml Beckmann filtrieren;
11. Zugabe von 100 ml Isopropanol;
12. Inkubation für 30 Min. bei Raumtemperatur;
13. Überstand entfernen, Pellet bei Raumtemperatur 20 Min. trocknen;
14. Pellet mit 8 ml 0,1 x SSC-Puffer aufnehmen;
15. Einwiegen von 8 g CsCl in 50-ml-Falcon-Tube und mit den 8 ml pDNA-Lsg. aus 16. komplett lösen;
16. Inkubation für 30 Min. auf Eis;
17. Zentrifugation in einer Heraeus Varifuge bei 3800 rpm und 4 °C (15 Min.);
18. Vorlage von 200 µl Ethidiumbromid in 8,9-ml-Opti-seal-Tube und Überstand zugeben;
19. Versiegelung der Tubes;
20. Zentrifugation in Ultrazentrifuge (Ti880) bei 55000 rpm und 14 °C für 16 Stunden.

Die Präzipitation der Plasmid-DNA erfolgt durch Ethidiumbromid. Ethidiumbromid ist hochgiftig, mutagen und umweltgefährdend. Es ist daher wichtig, Handschuhe aus Nitril, eine Schutzbrille und

Schutzkleidung zu tragen. Des Weiteren sollte der Arbeitsplatz und sollten umliegende Bereiche abgedeckt werden. Alle Geräte für diesen Arbeitsschritt sind nur der Verwendung mit Ethidiumbromid vorbehalten. Jegliche Abfälle, die in Kontakt mit Ethidiumbromid gekommen sind, müssen gesondert entsorgt werden.

1. Entnahme der Opti seal tubes aus der Ultrazentrifuge;
2. Kontrolle der rot gefärbten Banden unter UV-Licht;
3. Vorlage von 5 ml CsCl-gesättigtem Isopropanol in ein 50-ml-Falcon-Tube;
4. Überführen der pDNA-Bande aus Opti seal tube in das vorbereitete Falcon Tube;
5. Falcon Tube schütteln – zwei Phasen werden sichtbar;
6. Auswaschen von Ethidiumbromid aus der CsCl-Phase mit CsCl-gesättigtem Isopropanol;
7. Wiederholung, bis beide Phasen klar erscheinen;
8. Versetzen der wässrigen pDNA-Lösung mit 3-fachem Volumen TE-Puffer und 8-fachem Volumen Ethanol 100 %;
9. Zentrifugation in Heraeus Varifuge bei 4000 rpm und 4 °C für 30 Min.;
10. Waschen mit Ethanol 70 % und Zentrifugation in Heraeus Varifuge bei 3800 rpm und 4 °C für fünf Min.;
11. Punkt 10. wiederholen;
12. Überstand entfernen, 20 Min. bei Raumtemperatur trocknen;
13. in 200-500 µl sterilem destillierten Wasser aufnehmen;
14. pDNA über Nacht bei 4 °C lösen.

## 2.2 Präparation von Plasmid-DNA mit Qiagen® Plasmid Purification

### 2.2.1 Materialien und Geräte

**Tabelle 2: Materialien und Geräte zur Plasmidpräparation mit Qiagen® Plasmid Purification**

<b>Vorgefertigte Systeme (Bezugsquelle)</b>
Qiagen Plasmid Purification Giga Präp (Qiagen GmbH, Hilden)
<b>Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien (Bezugsquelle)</b>
Digitaler Multi Timer (Fa. Neolab, Heidelberg)
Eppendorf – Pipette Research® (versch. Größen) (Fa. Eppendorf, Hamburg)
Erlmeyerkolben (Fa. Schott AG, Mainz)
Laborkittel
ES-Kompressen (Fa. Hartmann AG, Heidenheim)
Messzylinder, 200 ml, 500 ml (Fa. Brand GmbH, Wertheim)
Pipetten, Falcon Pipette, versch. Größen (Fa. Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes)
Reaktionsgefäßständer (Fa. Neolab, Heidelberg)
TPP-Röhrchen – Falcon Tube, versch. Größen (Fa. TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz)

<b>Geräte (Bezugsquelle)</b>	
Eismaschine (Fa. Ziegra, Isenhagen)	
Schüttelinkubator, Thermomixer comfort (Fa. Eppendorf, Hamburg)	
Außerdem werden Geräte der Standardlaborausstattung verwendet.	
<b>Chemikalien (Bezugsquelle)</b>	
Ampicilin (Fa. Sigma, Deisenhofen)	
EDTA (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)	
Ethanol 70 % (Fa. Merck, Darmstadt)	
H <sub>2</sub> O dd (steril) (im eigenen Labor hergestellt)	
Isopropanol (Fa. Merck, Darmstadt)	
Natriumchlorid (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	
Tris 1M; pH8 (Fa. Merck, Darmstadt)	
<b>Puffer und Lösungen</b>	
LB-Medium:	Hefeextrakt (5 g/l); Trypton (10 g/l); Natriumchlorid (10 g/l)
TE-Puffer:	10 mM Tris, pH 7,5; 1 mM EDTA

### 2.2.2 Ablauf der Präparation von Plasmid-DNA mit Qiagen® Plasmid Purification

Neben der Cäsiumchloridpräparation wurde das Plasmid BMP-2 mit einer Präparation mittels eines Qiagen® Plasmid Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden) hergestellt.

Es wird eine Übernachtkultur von BMP-2-transformierten E.-coli-Zellen in einem Kulturröhrchen angesetzt. Dem LB-Medium wird Ampicillin zugegeben. Nach zwölf Stunden Inkubation bei 37 °C im Schüttelinkubator finden folgende Schritte statt:

1. Ansetzen einer Übernachtkultur von BMP-2-transformierten E.-coli-Zellen;
2. Zugabe von Ampicillin;
3. Inkubation im horizontalen Schüttelinkubator bei 37 °C;
4. LB-Medium mit Übernachtinkubation (2,5 l) in 500 ml Beckmann-Becher verteilen;
5. Zentrifugation bei 6000 rpm für 15 Min. bei 4 °C;
6. Pellet mit 125 ml Puffer P1 resuspendieren und gründlich vermischen;
7. Zugabe von 125 ml Puffer P2 und 4-6 x vorsichtig schwenken
8. Inkubation von genau 5 Minuten
9. Zugabe von 125 ml Puffer P3, 4-6 x schwenken und Lysat unverzüglich in den vorbereiteten Filter (QIAfilter Mega-Giga Cartridge) geben;
10. Inkubation von 10 Min.;
11. Flüssigkeit im Vakuum absaugen;
12. Zugabe von 50 ml Puffer FWB2 und vorsichtig umrühren (evtl. mit sterilem Spatel);
13. Absaugen der gesamten Flüssigkeit im Vakuum – in dieser Flüssigkeit ist die DNA enthalten;

14. Zugabe von 30 ml Puffer ER zu gefiltertem Lysat, ca. 10 x schwenken;
15. Inkubation von 30 Min. auf Eis;
16. QIAGEN-tip 10000 vorbereiten: Zugabe von 75 ml QBT-Puffer;
17. Waschen mit 600 ml QC-Puffer;
18. Elution der DANN mit 100 ml QN-Puffer;
19. Zentrifugation mit 15000 g (Beckmann-Zentrifuge J2 HS = 9250 rpm) für 30 Min. bei 4 °C;
20. Überstand abgießen;
21. Waschen mit 10 ml Endotoxin-freiem 70 % Ethanol (40 ml 96-100 % Ethanol + Endotoxin-freies Wasser);
22. Zentrifugation bei 15000 g (Beckmann-Zentrifuge J2 HS = 9250 rpm) für 10 Min.;
23. Überstand abgießen, ohne das Pellet zu zerstören;
24. Trocknung für ca. 10-20 Min. an der Luft;
25. Pellet in Endotoxin-freiem TE-Puffer lösen.

## 2.3 Fotometrische Messung der Plasmidkonzentration

### 2.3.1 Materialien und Geräte

**Tabelle 3: Materialien und Geräte für die fotometrische Messung der p-DNA-Konzentration**

<b>Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien (Bezugsquelle)</b>
Eppendorf Tubes; 1,5 ml (Fa. Eppendorf, Hamburg)
Eppendorf – Pipette Research <sup>®</sup> , versch. Größen (Fa. Eppendorf, Hamburg)
<b>Geräte (Bezugsquelle)</b>
Fotometer – Spektrofotometer Beckmann DU 640 m. Drucker (Fa. Beckmann, München)
<b>Chemikalien (Bezugsquelle)</b>
H <sub>2</sub> O dd (steril) (im eigenen Labor hergestellt)

### 2.3.2 Ablauf der fotometrischen Messung der Plasmidkonzentration

Um reproduzierbar zu arbeiten, muss die DNA bei den Experimenten in definierter Menge eingesetzt werden. Zu diesem Zweck wird die Konzentration der Plasmid-DNA fotometrisch, das heißt mithilfe von monochromatischem Licht, bestimmt. Dabei wird ein Lichtstrahl durch die Lösung geschickt, der infolge der Absorption geschwächt wird. Die Anzahl der absorbierten Lichtquanten ist von der Konzentration [c] der Lösung und von der Länge des Weges, den der Lichtstrahl durch die Lösung zurücklegt, abhängig. Nukleinsäuren haben ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm.

In der Regel wird eine Verdünnung 1:100 hergestellt. Um ein genaueres Ergebnis zu erhalten, erweist es sich als sinnvoll, zwei Verdünnungen herzustellen, aus denen der Mittelwert errechnet wird. Bei

hohen Konzentrationen muss mit einer höheren Verdünnung erneut nachgemessen werden. Die Bestimmung erfolgte durch den Fotometer Beckmann DU 600. Die Verdünnung muss im Programm eingestellt werden.

1. 1:100-Verdünnung der Plasmid-DNA herstellen (5µl pDNA : 495µl ddH<sub>2</sub>O);
2. Referenzmessung der optischen Dichte von ddH<sub>2</sub>O bei 260 nm;
3. Messung der optischen Dichte der p-DNA bei 260 nm;
4. Mittelwertbestimmung und Bestimmung der Menge an pDNA anhand der gemessenen Konzentration mit der Formel:  $v[\mu\text{l}] \times c[\mu\text{g}/\mu\text{l}] = m[\mu\text{g}]$ .

## 2.4 Gelelektrophorese

### 2.4.1 Materialien und Geräte

**Tabelle 4: Materialien und Geräte für die Gelelektrophorese**

<b>Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien (Bezugsquelle)</b>	
Eppendorf – Pipette Research <sup>®</sup> , versch. Größen (Fa. Eppendorf, Hamburg)	
Erlmeyerkolben (Fa. Schott AG, Mainz)	
<b>Geräte (Bezugsquelle)</b>	
Elektrophoreseeinheit Power Pac 300 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)	
Geldokumentationsgerät Hoefer HE 33 (Amersham Biosciences Buckinghamshire, England)	
Gelplatte und Kamm für Elektrophorese (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)	
Mikrowelle (Fa. Siemens, München)	
Fotometer – Spektrofotometer Beckmann DU 640 m. Drucker (Fa. Beckmann, München)	
Außerdem werden Geräte der Standardlaborausstattung verwendet.	
<b>Chemikalien (Bezugsquelle)</b>	
Agarose 0,9 % (Fa. Peq Lab. Biotechnologie, Erlangen)	
Ethidiumbromid (Fa. Boehringer, Mannheim)	
H <sub>2</sub> O dd (steril) (im eigenen Labor hergestellt)	
Loading Buffer (Plasmid factory, Bielefeld)	
Super coiled Marker (Plasmid factory, Bielefeld)	
<b>Puffer</b>	
Elektrophoresepuffer:	(Tris – Borat – EDTA-Puffer: 21,6 g Tris; 11,0 g Borsäure, 8,0 ml, 0,5 M EDTA pH8,0)

### 2.4.2 Ablauf der Gelelektrophorese

Um die BMP-2-DNA-Moleküle sichtbar zu machen und sie nach ihrer Größe zu trennen, wird eine Gelelektrophorese in einem Agarosegel durchgeführt. Diese ermöglicht eine gute Trennung von DNA-Molekülen zwischen 500 Basenpaaren (bp) und 30 Kilobasenpaaren (kbp; 1 Kilo-Basenpaar entspricht 1000 Basenpaaren). BMP-2 hat 5226 bp. Die Trennung wird durch die im Gel befindlichen Poren



erreicht. Die Porengröße des Agarosegels bestimmt die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA. Um die DNA sichtbar zu machen, wird dem Gel Ethidiumbromid zugesetzt. Ethidiumbromid interkaliert in die Doppelhelix der DNA unter Bildung eines fluoreszierenden Komplexes.

Die gebräuchlichsten Puffer für die Elektrophorese sind TBE(Tris-Borat-EDTA)- und TAE(Tris-Acetat-EDTA)-Puffer. TAE hat eine geringere Pufferkapazität und ist nicht geeignet für längere Läufe. TBE zeichnet sich durch eine bessere Trennung und schärfere Banden aus.

1. Einwiegen von 0,6 g 1 % Agarosepulver in 500 ml Erlmeyerkolben;
2. Zugabe von 60 ml TBE-Puffer, Aufkochen in der Mikrowelle;
3. Einfüllen in eine Gelplatte mit eingesetztem Kamm;
4. Verteilung von 2,5  $\mu$ l Ethidiumbromid in dem flüssigen Gel und aushärten lassen;
5. Vorbereiten der pDNA-BMP-2-Lösung:
  - a. 3  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O vorlegen und 2  $\mu$ l der zu bestimmenden pDNA BMP-2 zupipettieren, mit kleiner Zentrifuge 30 Min. vermischen;
  - b. 8 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O vorlegen, 1 $\mu$ l der pDNA – Verdünnung zugeben und 2 $\mu$ l LB-Puffer (Loading Buffer) zum Anfärben zugeben; mit Handzentrifuge vermischen;
6. Kamm aus der Gelplatte entfernen;
7. Gelplatte in den TBE-Laufpuffer legen, auf vollständige Bedeckung achten;
8. Befüllen von einem Slot mit der p-DNA-Lösung, die beiden Nachbarslots mit super coiled (s.c.) Marker;
9. Anlegen einer konstante Spannung von 85 V für 65 Min.;
10. Spannung ausschalten, TBE-Laufpuffer entsorgen, Gelplatte entnehmen;
11. Gel aus der Platte entfernen und im Geldokumentationsgerät Banden unter UV-Licht sichtbar machen;
12. Bearbeiten und Beschriften der Banden mittels Computerprogramm „Bio Capt“;
13. Fotografieren und ausdrucken;
14. Gel entsorgen.

## 2.5 Formulierung der Genvektoren

Das Prinzip der Herstellung copolymer protected gene vectors für die nicht virale Gentherapie besteht aus der Kondensation negativ geladener DNA mit einer kationischen Komponente (Polyethylenimin = PEI) über elektrostatische Anziehung zu kompakten Partikeln. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Polyplexe mit einer Schutzhülle aus einem Peptid-Polyethylenglycol-Kopolymer, den PROCOP (protective copolymer), ebenfalls durch elektrostatische Anziehung umgeben.

## 2.5.1 Materialien und Geräte

**Tabelle 5: Materialien und Geräte für die Formulierung der Genvektoren**

<p><b>Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien (Bezugsquelle)</b></p> <p>Aluminiumfolie</p> <p>Eppendorf – Pipette Research® (versch. Größen) (Fa. Eppendorf, Hamburg)</p> <p>Glashomogenisator, eco Lab, 2 ml, 0,1 ml graduiert (Fa. Neolab, Heidelberg)</p> <p>Pipetten, Falcon Pipette, versch. Größen (Fa. Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes)</p> <p>Pipettierhelfer, Acu-jet (Fa. Brand GmbH, Wertheim)</p> <p>TPP-Röhrchen – Falcon Tube, versch. Größen (Fa. TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz)</p>
<p><b>Geräte (Bezugsquelle)</b></p> <p>Lyophilisationsgerät Hetosicc CD4 (Fa. Heto, Camberley, England)</p> <p>Vortexer, MS2, Minishaker (IKA®Works, Wilmington, USA)</p> <p>Außerdem werden Geräte der Standardlaborausstattung verwendet.</p>
<p><b>Chemikalien (Bezugsquelle)</b></p> <p>Luciferaseplasmid (P55-pCMV-IVS-luc<sup>+</sup>, Fa. Bayer Corp., Emery Ville, USA)</p> <p>BMP-2-Plasmid (selbst synthetisiert, siehe Kap. 2)</p> <p>H<sub>2</sub>O dd (steril) (im eigenen Labor hergestellt)</p> <p>Hüllpolymer P6YE5C (im eigenen Labor synthetisiert nach Finsinger et al. 2000)</p> <p>Polykation, verzweigtes Polyetylenimin (PEI), 25 kDa (Fa. Sigma Aldrich, Deisenhofen)</p>

## 2.5.2 Berechnung der nicht viralen Komplexe

Zur Bildung der Komplexe werden gleiche Volumina der Lösungen von pDNA, PEI und P6YE5C vereinigt. Die Formulierung der Vektoren erfolgte in destilliertem Wasser.

Die Menge an PEI wird so gewählt, dass sich das gewünschte Stickstoff-Phosphat-Verhältnis (N/P-Verhältnis) ergibt. Das N/P-Verhältnis ist das molare Verhältnis von Stickstoffatomen im PEI zu den Phosphaten der Nukleotide der DNA.

In allen Versuchen wurde mit einem N/P-Verhältnis von 8:1 gearbeitet.

Die Berechnung der Menge an PEI erfolgt nach der Formel:

$$N/P = \frac{\mu\text{g (PEI)}}{43} \times \frac{330}{(\mu\text{g DNA})}$$

330 = Mittelwert des Molekulargewichts eines Nukleotids [g/mol]

43 = Mittelwert des Molekulargewichts der sich wiederholenden Grundeinheit von PEI unter Berücksichtigung der primären Amine [g/mol]

Beispielrechnung für die Formulierung von PEI-pDNA-Komplexen aus 50 µg pDNA bei einem N/P-Verhältnis von 8:1:

$$\text{PEI } [\mu\text{g}] = \frac{172}{165} \times \mu\text{g DNA}$$

$$\text{PEI } [\mu\text{g}] = \frac{172}{165} \times 50\mu\text{g} = 52,12\mu\text{g}$$

Das Hüllpolymer P6YE5C wurde für alle Versuche mit der Ladungsäquivalente 3 verwendet. Die Ladungsäquivalente beschreiben den Quotienten aus negativer Ladung im Hüllpolymer und der negativen Ladung der DNA.

Die Berechnung der Menge [µl] an einzusetzendem P6YE5C errechnet sich nach der eingesetzten Menge an pDNA und erfolgt nach der Formel:

$$\text{Hüllpolymer } [\mu\text{l}] = 1000 \times \frac{\text{DNA } [\mu\text{g}]}{330} \times \frac{\text{Ladungsäquivalente}}{c \text{ (Hüllpolymer } [\mu\text{mol/ml})}}$$

$$\text{Ladungsäquivalente} = 3$$

Die Konzentration des Copolymers P6YE5C [mM] wird mittels fotometrischer Bestimmung der Peptidkonzentration bestimmt. Die Konzentration richtet sich nach der Anzahl der negativen Ladungen des Peptids im Polymer.

Beispielrechnung unter Verwendung von drei Ladungsäquivalenten und einer Hüllpolymerkonzentration von 5,5 mM zur Formulierung der Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe für 50 µg pDNA:

$$\text{Hüllpolymer } [\mu\text{l}] = 1000 \times \frac{50 \mu\text{g}}{330} \times \frac{3}{5,38 \text{ mM}} = 84,49 \mu\text{l}$$

### 2.5.3 Ablauf der Herstellung der Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe

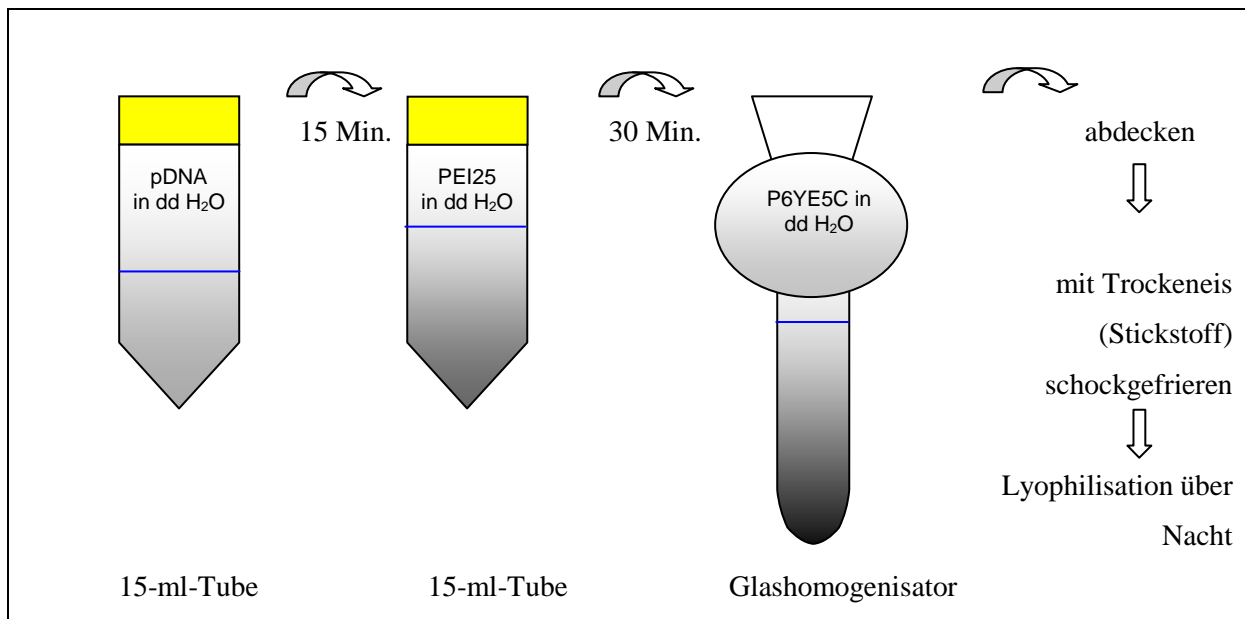
Formulierung der Hüllpolymer-PEI-pDNA-Komplexe:

1. Vorlegen der Volumenäquivalente der Suspensionen von pDNA und der von PEI in zwei separaten Tubes;
2. unter Vortexen schnelle Zugabe der pDNA-Suspension zur PEI-Suspension mittels einer Pipette;
3. Inkubation für 15 Min. bei Raumtemperatur;

4. Vorlegen eines weiteren Volumenäquivalentes des Hüllpolymers P6YE5C in Lösung in einem weiteren Tube;
5. unter Vortexen Zugabe der pDNA-PEI-Suspension zur P6YE5C-Lösung mittels Pipette;
6. Inkubation für 30 Min. bei Raumtemperatur;
7. Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und Lyophilisation bei leicht geöffnetem Deckel über Nacht.

Als Lyophilisation oder Gefriertrocknung bezeichnet man die Trocknung von Objekten in gefrorenem Zustand. Das so getrocknete Material nennt man Lyophilisat.

Die Lyophilisation ist ein Verfahren, bei dem wasserhaltigem Material das Wasser entzogen wird. Dazu wird die wässrige Lösung unter den Gefrierpunkt abgekühlt, bis sie vollständig zu Eis gefriert. Nun wird der Luftdruck über dem Eis vermindert (Vakuum), wodurch das Wasser (Eis) sublimiert und somit der gefrorenen Lösung das Wasser entzogen wird. Ziel ist die schonende Entfernung des Lösungsmittels. Das Endprodukt der Gefriertrocknung ist ein stabiles, trockenes Pulver.



**Abbildung 10: Ablauf der Herstellung der copolymer protected gene vectors im Glashomogenisator - schematische Darstellung**

In den ersten Versuchen des Expressionsnachweises mit Luciferase und BMP-2 wurde die Lösung 3 im Glashomogenisator hergestellt, mit sterilisierter Aluminiumfolie abgedeckt und lyophilisiert. Mit der Entwicklung eines modifizierten Homogenisators und dessen Einsatz konnte auch die Lösung 3 mit dem Hüllpolymer P6YE5C in einem 15-ml-Kulturröhrchen angesetzt werden. Das Schockgefrieren erfolgte mit dem Glaspotter in einer Mischung aus Trockeneis und Ethanol (70 %); der Inhalt des Kulturröhrchens wurde mit flüssigem Stickstoff gefroren.

Beim Gefrieren der Lösung ist darauf zu achten, dass die Lösung vollständig durchgefroren ist.

## 2.6 Beschichtungstechnologie

### 2.6.1 Materialien und Geräte

#### Arzneimittelträger

Als Trägermaterial dient das synthetische Poly-D-/-L-Laktid R203, Handelsname „Resomer R 203 Poly-D-/-L-Laktid“, der Fa. Boehringer AG, Ingelheim, mit einem Molekulargewicht von 30 000 Dalton.

In allen Voruntersuchungen zur Entwicklung der Beschichtungstechnologie kam das Poly-D-/-L-Laktid R 203 und Ethylacetat in einer Konzentration von 50 mg/ml zum Einsatz.

#### Lösungsmittel

Als organisches Lösungsmittel wurde Ethylacetat (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen) verwendet.

#### Trägerfolie

Trägerfolien in den Vorversuchen zur Etablierung der Methode waren Aluminiumfolien. In den Versuchen zum Expressionsnachweis mit dem Wachstumsfaktor BMP-2 wurde Titanfolie (Fa. Dentsply Friadent GmbH, Mannheim) verwendet. Die Folien wurden mit einem einheitlichen Durchmesser von 16 mm ausgestanzt und sind so passend für 24 Wellplatten in der Zellkultur.

#### Zellkultur

Alle im Folgenden erörterten Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S1 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten oder heißluftsterilisierten Materialien bzw. Geräten oder sterilfiltrierten Lösungen (Porendurchmesser der Filter: 0,2 µm).

Alle mit humanem oder transfiziertem Zellmaterial in Kontakt getretenen Materialien oder Geräte wurden anschließend mit 90 %igem Alkohol desinfiziert oder durch Autoklavieren sterilisiert.

Die Zellen wurden in einem CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank im offenen System bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert.

#### **Tabelle 6: Material und Geräte für die Beschichtungstechnologie**

<b>Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien (Bezugsquelle)</b>
Anatomische Pinzetten (Fa. Aeskulap, Tuttlingen)
Chemikalienspatel (Fa. Neolab, Heidelberg)
Eppendorf – Pipette Research <sup>®</sup> , versch. Größen (Fa. Eppendorf, Hamburg)
Glashomogenisator, eco Lab, 2 ml, 0,1 ml graduiert (Fa. Neolab, Heidelberg)
Glaspipetten (Fa. Neolab, Heidelberg)
Glasschalen und -petrischalen (Fa. Neolab, Heidelberg)

<p><b>Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien (Bezugsquelle)</b></p> <p>Pipettierhelfer, Acu-jet (Fa. Brand GmbH, Wertheim)</p> <p>Sterilfilter (Millex – FG, 0,2 µl Filter Unit, Millipore)</p> <p>TPP-Röhrchen, versch. Größen (Fa. TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz)</p> <p>Tubepotter (Eigenproduktion)</p>
<p><b>Geräte (Bezugsquelle)</b></p> <p>Laborrührwerk (Fa. IKA, Staufen)</p> <p>Präzisionswaage MC1 research RC210P (Fa. Sartorius, Göttingen)</p> <p>Sterilbank Hera Safe (Fa. Heareus, Hanau)</p> <p>Vortexer, MS2, Minishaker, IKA@Works, Wilmington, USA</p> <p>Binokulares Mikroskop Axiovert 25 (Fa. Zeiss AG, Göttingen)</p> <p>Inkubator (Fa. Heareus, Hanau)</p> <p>Außerdem werden Geräte der Standardlaborausstattung verwendet.</p>
<p><b>Zellen (Bezugsquelle)</b></p> <p>3T3 Mausfibroblasten, Deutsche Gesellschaft von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig</p> <p>293 (DSMZ Nr: ACC305) Deutsche Gesellschaft von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig</p>
<p><b>Materialien für die Zellkultur (Bezugsquelle)</b></p> <p>PBS (1 x) Duplecco (Fa. Biochrom AG, Berlin)</p> <p>FKS fetales Kälberserum, fetal Bovine Serum (Fa. Biochrom AG, Berlin)</p> <p>Mikropipetten (Fa. Eppendorf, Hamburg)</p> <p>Handzähler (Fa. Neolab, Heidelberg)</p> <p>Neubauer Zählkammer (Fa. Schubert &amp; Weiß, Schwandorf)</p> <p>PBS-Dulbecco w/o Ca<sup>2+</sup> , Mg<sup>2+</sup> (Fa. Biochrom AG, Berlin)</p> <p>Plastiktüten, Plastikbrand-Entsorgungsbeutel (Fa. Brand Wertheim)</p> <p>Trypsin (Fa. Biochrom, Berlin)</p> <p>Wellplatten 24 Well (Fa. TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz)</p> <p>Zellkulturflaschen (Fa. TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz)</p>

## 2.6.2 Herstellung der Beschichtungslösung

### Poly-D-/-L-Laktidlösung:

In einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß mit Deckel wird die entsprechende Menge Resomer R 203 auf der Präzisionswaage eingewogen. Das Ethylacetat wird als Lösungsmittel mit einer Glaspipette zugegeben. Das Gefäß wird verschlossen. Unter Vortexen werden beide Komponenten vermischt, bis das Resomerpulver vollständig aufgelöst ist. Die Lösung wird mit einer Einmalspritze aufgenommen und durch einen Sterilfilter in ein neues lösungsmittelbeständiges Tube steril filtriert.

### Pol-D-/L-Laktid-COPROG-Beschichtungslösung:

Nachfolgender Arbeitsablauf wurde in den ersten Versuchen für den Glashomogenisator angewendet. Die Verwendung des modifizierten Homogenisators erfolgte nach einem ausgetesteten Protokoll. Das Arbeiten fand unter der Sterilbank statt.

Die sterile Poly-D-/L-Laktid-Lösung wird zu den lyophilisierten COPROGs direkt in den Homogenisator pipettiert. Dabei ist auf steriles Arbeiten zu achten. Unter Auf- und Abbewegen des Stößels wird die Lösung homogenisiert. Vor der Entnahme wird die Lösung mit der Pipette mehrmals durchmischt.

### **2.6.3 Beschichtungstechnologie - Beschichten der Biomaterialien**

Alle Beschichtungsverfahren dieser Abhandlung wurden mit der Kaltbeschichtungstechnologie durchgeführt. Zu diesem Zweck wird das Poly-D-/L-Laktid in einem bei Raumtemperatur flüchtigen Lösungsmittel gelöst (Ethylacetat).

Alle Beschichtungsvorgänge zur Herstellung von Poly-D-/L-Laktid-Oberflächen für mikrobiologische Untersuchungen wurden mit sterilen Materialien unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Die Beschichtung erfolgte dabei im Reinraum an einem „lamina air flow“-Arbeitsplatz.

Als Trägerfolie für die Beschichtungslösung diente Titanfolie (Ø16 mm). Zur Etablierung der Methode wurde auch sterilisierte Aluminiumfolie (Ø16 mm) verwendet. Diese wurde in der Vorbereitung durch eine Stanze hergestellt, eingeschweißt und sterilisiert.

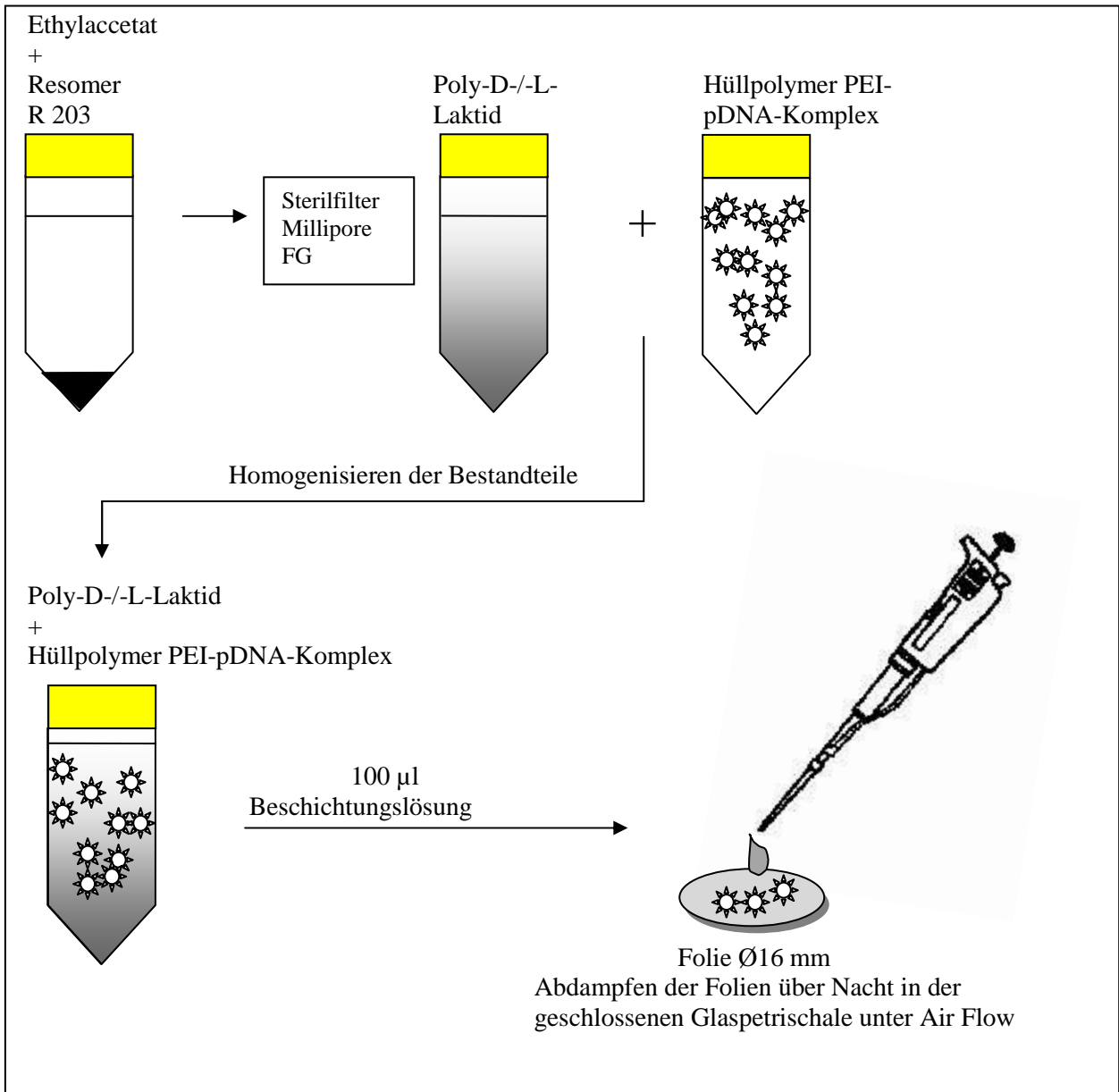
Die folgenden Arbeitsschritte werden unter der Sterilbank durchgeführt.

Die steril verpackten Folien werden mit einer sterilen Pinzette in die autoklavierten Glaspetrischalen gelegt. Mit einer Eppendorf-Pipette werden je 100 µl Poly-D-/L-Laktid-COPROG-Beschichtungslösung aus dem Homogenisator aufgenommen, und mit der gesamten Menge wird eine Seite der Folie beschichtet. In allen Versuchen dieser Studie wurden die Folien gleicher Größe (Ø16 mm) mit 100 µl Beschichtungslösung beschickt (siehe Abb. 11).

Die Petrischalen werden nach dem Beschichtungsvorgang abgedeckt und unter der Sterilbank mindestens 24 Stunden gelagert, damit das Lösungsmittel verdampfen kann. Für längere Lagerung können die Petrischalen steril eingeschweißt werden.

Während der Beschichtung ist darauf zu achten, die Beschichtungslösung immer sorgfältig abzudecken, da sonst das Lösungsmittel verdunstet und die Menge verfälscht. Aus dem gleichen Grund ist ein Verlaufen der Beschichtungslösung über den Rand der Folien zu vermeiden.

Die Beschichtung der Kontrollgruppen mit reiner Poly-D-/L-Laktid-Beschichtungslösung wurde analog im gleichen Arbeitsgang durchgeführt.



**Abbildung 11: Ablauf der Herstellung der Beschichtungslösung und Beschichtung der Folien-schematische Darstellung**

### 2.6.4 Zellkultur

Als Zellen für die Entwicklung der Methode mit dem Reporter gen Luciferase dienen 3T3-Mausfibroblasten. Die Versuche mit dem Plasmid BMP-2 wurden mit 293 Zellen (DSMZ Nr: ACC305) durchgeführt.

#### Bestimmung der Zellzahl:

Um alle Folien mit der gleichen Menge an Zellen zu besiedeln, ist die Bestimmung der Zellzahl notwendig.



Zur Bestimmung der Zellzahl wird das Kulturmedium entfernt und die Zellen einmal mit 100 µl PBS pro cm<sup>2</sup> gewaschen, um abgestorbene Zellen, Zelltrümmer und Reste verbrauchten Mediums zu entfernen. Danach werden die Zellen mit ca. 1 ml Trypsin-Lösung bedeckt und für einige Minuten inkubiert. Durch leichtes Klopfen an der Kulturschale („shake off“) können die Zellen vom Kulturschalenboden gelöst werden. Das Trypsin wird vorsichtig abgesaugt.

Die Enzymwirkung wird durch Zugabe von 10 ml Kulturmedium gestoppt; die Zellen werden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt, und der gesamte Inhalt wird in ein Kulturröhrchen überführt.

Mit einer Pipette wird ein Tropfen dieser Zellsuspension auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Für jede Bestimmung wurden die Zellzahlen von jeweils 16 Kleinquadraten summiert, um die Zellzahl über einem Großquadrat zu erhalten. Der Mittelwert errechnet sich aus den vier Großquadraten. Aus der Zellzahl und dem Verdünnungsverhältnis wird dann die Zellzahl pro ml Suspension wie folgt ermittelt:

$$\frac{\text{Benötigte Zellzahl}}{\text{Ausgezählte Zellen (MW) x Kammerkonstante } 10^4} = \text{Menge an Zellsuspension, in der die benötigte Zellmenge enthalten ist (in ml)}$$

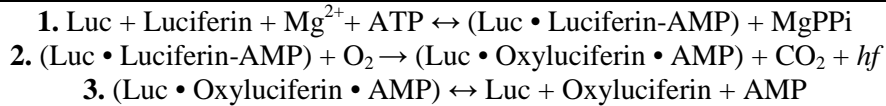
#### Zellzugabe zu den Folien – Transfektion:

Die Arbeiten erfolgen unter der Sterilbank. Die beschichteten Folien werden mit der Pinzette entsprechend der vorher angebrachten Beschriftung in die Wellplatten gelegt. In die Mitte der Folie werden ca. 80000 Zellen in ca. 200 µl Medium je Well pipettiert. Damit die Zellen auf die Folie absinken können, werden die restlichen 800 µl Medium erst nach ca. drei Stunden zugegeben. Die Gesamtmenge Medium je Well beträgt dann 1 ml. Die Lagerung erfolgt im Inkubator bei ca. 37 °C.

## 2.7 Auswertung - Messverfahren

### 2.7.1 Luciferase - Aktivitätsmessung

Das Enzym Luciferase der nordamerikanischen Feuerfliege *Phototinus pyralis* katalysiert in Gegenwart von ATP und  $Mg^{2+}$  die oxidative Dekarboxylierung von Luciferin (siehe Abb. 12). Dabei entstehen Lichtblitze, die sich zum Leuchten der Tiere aufaddieren.



**Abbildung 12: Luciferase-Reaktion: Schritt 1 ist die Bildung des Adenyl-Luciferin-Luciferase-Komplexes. Schritt 2 ist die oxidative Dekarboxylierung, in welcher das Endprodukt Oxyluciferin, gebunden am Enzym, entsteht und ein Photon bei 562 nm emittiert wird ( $hf$  ist die Energie des Photons). Schritt 3 ist die langsame Freisetzung von Oxyluciferin von der Bindungsstelle am Enzym. Die Klammern und Punkte indizieren die gebildeten Komplexe (De Wet et al. 1987, Seite 725).**

Das Gen, welches das Protein Luciferase kodiert, ist ein viel verwendetes Reporter gen für Screeningversuche. Luciferase kann leicht mit Biolumineszenzassay nachgewiesen werden. Der Nachweis von Luciferaseexpression geschieht nach dem Ende des Experimentes in Zellhomogenaten. Im vorliegenden Versuch wurden nur die Folien und die darauf wachsenden Zellen untersucht. Der Wellboden wurde lediglich in Gruppe 1 lysiert.

Zum Nachweis der Luciferaseexpression werden die Zellen auf den Folien mit dem Lysepuffer lysiert und mit Luciferin gemischt. Dabei auftretende Lumineszenz zeigt die Expression von Luciferase an.

**Tabelle 7: Materialien und Geräte zur Durchführung der Luciferase-Aktivitätsmessung**

<p><b>Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien (Bezugsquelle)</b></p> <p>Pinzette (Fa. Aeskulap, Tuttlingen)</p> <p>Eppendorf – Pipette Research<sup>®</sup>, versch. Größen (Fa. Eppendorf, Hamburg)</p> <p>Lysepuffer (Promega, Madison, WI 53711, USA)</p> <p>Luciferase Standard (Promega, Madison, WI 53711, USA)</p>
<p><b>Geräte (Bezugsquelle)</b></p> <p>Luciferasemessgerät Top Count (Fa. Canberra-Packard-Company, Dreieich)</p> <p>Eismaschine (Fa. Ziegra, Isenhagen)</p> <p>Außerdem werden Geräte der Standardlaborausstattung verwendet.</p>
<p><b>Materialien für die Zellkultur (Bezugsquelle)</b></p> <p>PBS (1 x) Duplecco (Fa. Biochrom AG, Berlin)</p> <p>Wellplatten 24 Well (Fa. TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz)</p> <p>Schwarze 96-Well-PCR-Platte (Fa. Corning Incorporated, New York, USA)</p>

Ablauf der Luciferase-Aktivitätsmessung:

1. Aufnahmen der Folie mit einer Pinzette aus der Wellplatte, Medium abtropfen lassen und Überführung in eine neue 24-Well-Platte;
2. Zugabe von 400 µl Lysepuffer;
3. Inkubation für 10 Min. bei Raumtemperatur;
4. Lagerung auf Eis;
5. durch Pipettieren Zellen von der Folie lösen und durchmischen;
6. Überführen von je 50 µl in die schwarze 96-Well-Platte;
7. Zugabe von je 100 µl Luciferase-Substratpuffer unmittelbar vor der Messung;
8. Messung.

## **2.7.2 ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay)-Messung**

### **2.7.2.1 Prinzip des Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay**

Beim Enzym-gekoppelten Immunosorbent-Assay (**Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay**, kurz **ELISA**) ist ein BMP-2-Antigen an den Boden der 96-Well-Platte kovalent gebunden. Der zu untersuchende Überstand mit den primären Antikörpern wird zugegeben. Die nach zwei Stunden Inkubation entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe bleiben am Boden der Well-Platte gebunden. Die überschüssigen Antikörper werden abgewaschen. Die sekundären Antikörper werden zugegeben und ebenfalls zwei Stunden inkubiert. Die Sekundärantikörper werden abschließend vom Komplex abgewaschen. Da die sekundären Antikörper vorher an ein Enzym (Peroxidase) gekoppelt wurden, kommt es nach Zugabe des Color-Reagent zu dessen Farbumschlag (siehe Abb. 13). Dessen Menge kann mithilfe eines Fotometers bestimmt werden. Die Intensität des Farbumschlages steht in direkter Beziehung zur Menge des nachzuweisenden BMP-2 (Hahn et al. 1991, Seite 143).

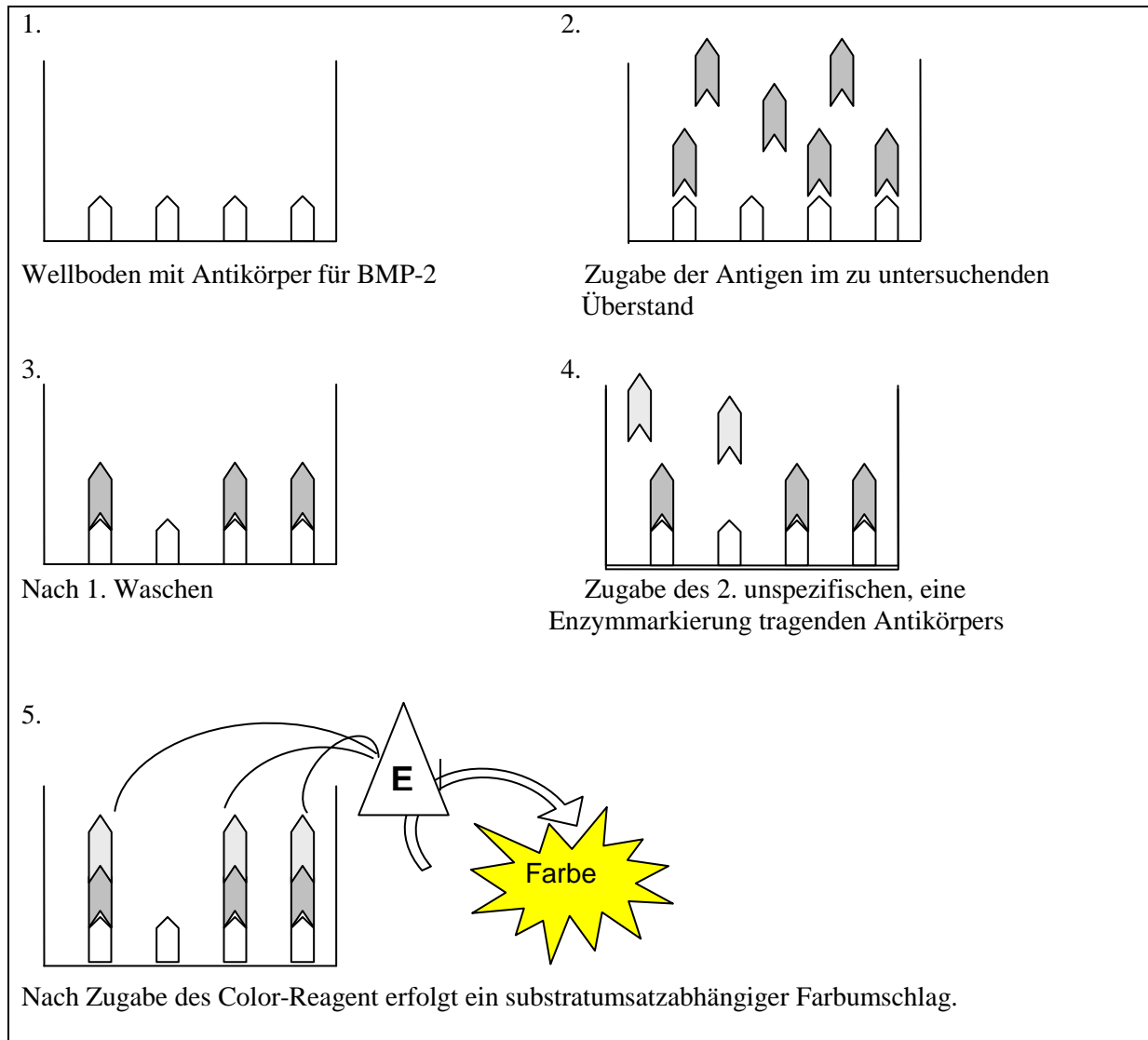


Abbildung 13: Ablauf bei der Antikörpertiterbestimmung beim ELISA - schematische Darstellung

### 2.7.2.2 Materialien und Herstellung der Pufferlösungen

Alle Messungen mittels ELISA wurden mit dem Quantikine<sup>®</sup> BMP-2 Immunoassay (R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt) durchgeführt.

Tabelle 8: Material und Geräte zu Durchführung der ELISA-Messungen

#### Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien (Bezugsquelle)

Dispenser Handy-Step<sup>®</sup> (Fa. Brand GmbH, Wertheim)

Eppendorf – Pipette Research<sup>®</sup>, versch. Größen (Fa. Eppendorf, Hamburg)

Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5 ml (Fa. Eppendorf, Hamburg)

Folienschreiber, Stadler permanent, Lumocolor

Messzylinder, 200 ml, 500 ml (Fa. Brand GmbH, Wertheim)

PD – Tips für Handy-Step<sup>®</sup> (Fa. Brand GmbH, Wertheim)

**Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien (Bezugsquelle)**

Pipettierhelfer, Acu-jet (Fa. Brand GmbH, Wertheim)

Reaktionsgefäßständer (Fa. Neolab, Heidelberg)

H<sub>2</sub>O dd (steril) (im eigenen Labor hergestellt)

**Geräte (Bezugsquelle)**

Horizontaler Schüttler IKA-Schüttler MTS 2 (Fa. Jahnke & Kunkel, Staufen)

Immuno Wash Model 1575 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter (Wallac, Turku, Finnland)

Vortexer, MS2, Minishaker (IKA®Works, Wilmington, USA)

Außerdem werden Geräte der Standardlaborausstattung verwendet.

Herstellung des Wash Buffers

- Kontrolle, ob sich im Wash-Buffer-Konzentrat keine Kristalle gebildet haben, evtl. durch Aufwärmen auf Raumtemperatur Kristalle auflösen.
- Verdünnung von 20 ml des Wash-Buffer-Konzentrat mit ddH<sub>2</sub>O auf 500 ml in sterilem 500-ml-Standzylinder. Für eine bessere Lagerung in eine sterile Flasche umfüllen.

Herstellung der Kalibratorverdünnung

- Verdünnung von 20 ml des Kalibratorverdünnungs-RD5P-Konzentrat mit ddH<sub>2</sub>O auf 200 ml in sterilem 200-ml-Standzylinder.

Herstellung dieser Verdünnung mindestens 15 Min. vor Gebrauch.

Herstellung der Substratlösung

- Mischung des Color-Reagents A und B zu gleichen Teilen in sterilem 50-ml-Tube.

Mischen der beiden Reagenzien erst 15 Min. vor Gebrauch und vor Licht schützen.

Herstellung der BMP-2-Standardreihe

- Auflösen von BMP-2-Standard mit 1 ml ddH<sub>2</sub>O;
- Beschriftung von sieben 1,5-ml-Reaktionsgefäßen für die Verdünnungsreihe;
- Vorlegen von 800 µl der Kalibratorverdünnung für eine 4000-pg-/ml-Verdünnung;
- Vorlegen von je 500 µl der Kalibratorverdünnung;
- Vermischen von 200 µl der BMP-2-Standardlösung mit der 4000-pg-/ml-Verdünnung;
- Pipettieren von 500 µl aus dieser Verdünnung in die 2000-pg-/ml-Verdünnung pipettieren;
- Das Prozedere für die absteigenden Verdünnungen wiederholen (siehe Abb. 14).

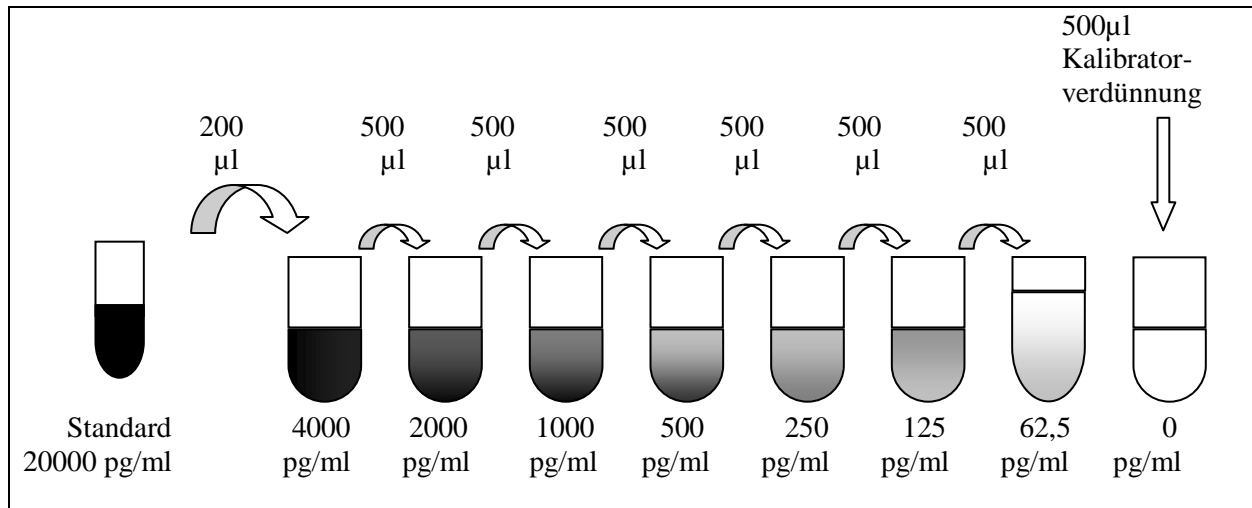


Abbildung 14: Herstellung der Standardverdünnungsreihe - schematische Darstellung

### 2.7.2.3 Durchführung der ELISA-Messung

Alle Reagenzien und die zu untersuchenden Überstände sind auf Raumtemperatur zu bringen.

1. Proben abzentrifugieren - 13000 rpm, 4 °C, 5 Min.;
2. Pipettieren von 100 µl der Probeverdünnung RD 1-19 in die Mikroplatte;
3. Pipettieren von je 50 µl der Standardverdünnung in die ersten zwei Reihen (1A-H und 2A-H);
4. Pipettieren von 50 µl der Probe;
5. Abdecken mit Klebefolie;
6. Inkubation für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem horizontalen Schüttler bei 500 rpm ( $\pm 50$  rpm);
7. Folie entfernen;
8. Proben 4 x mit je 400 µl Wash Buffer in einem Waschautomat waschen;
9. Zugabe von je 200 µl BMP-2-Konjugat;
10. Abdecken mit Klebefolie;
11. Inkubation für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem horizontalen Schüttler bei 500 rpm ( $\pm 50$  rpm);
12. Folie entfernen und wie unter 8. beschrieben nochmals waschen;
13. Pipettieren von je 200 µl der Substratlösung in jedes Well, vor Licht schützen!
14. Inkubation für 30 Min. bei Raumtemperatur und vor Licht geschützt;
15. Zugabe von je 50 µl der Stopp-Lösung;
16. Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm (0,1 s) und 590 nm (0,1 s).

### 3. Analyse der Beschichtungsmethode - Expressionsnachweis aus COPROG<sub>Luciferase</sub>-Poly-D-/-L-Laktid-beschichteten Aluminiumfolien

#### 3.1 Materialien und Geräte

**Tabelle 9: Materialien und Geräte zur Beschichtung von Aluminiumfolien mit Poly-D-/-L-Laktid + COPROG<sub>Luciferase</sub>**

<p><b>Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien (Bezugsquelle)</b></p> <p>Aluminiumfolie</p> <p>Poly-D-/-L-Laktid(R203)-beschichtete Aluminiumfolien (im Eigenlabor hergestellt)</p> <p>Eppendorf - Pipette Research<sup>®</sup>, versch. Größen (Fa. Eppendorf, Hamburg)</p> <p>COPROG<sub>Luciferase</sub>-beschichtete Aluminiumfolien (im Eigenlabor hergestellt)</p>
<p><b>Geräte (Bezugsquelle)</b></p> <p>Sterilbank Hera Safe (Fa. Heareus, Hanau)</p> <p>Inkubator (Fa. Heareus, Hanau)</p> <p>Außerdem werden Geräte der Standardlaborausstattung verwendet.</p>
<p><b>Zellen (Bezugsquelle)</b></p> <p>3T3-Mausfibroblasten, Deutsche Gesellschaft von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig</p>
<p><b>Materialien für die Zellkultur (Bezugsquelle)</b></p> <p>PBS (1 x) Duplecco (Fa. Biochrom AG, Berlin)</p> <p>Wellplatten 24 Well (Fa. TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz)</p> <p>Mikropipetten (Fa. Eppendorf, Hamburg)</p> <p>Plastiktüten, Plastibrand-Entsorgungsbeutel (Fa. Brand Wertheim)</p> <p>Wellplatten 24 Well (Fa. TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz)</p>

#### 3.2 Versuchsaufbau des Expressionsnachweises aus COPROG<sub>Luciferase</sub>-Poly-D-/-L-Laktid-beschichteten Aluminiumfolien

Für diesen Versuch wurde Aluminiumfolie verwendet. Als Vektor kam das Reportergen Luciferase zum Einsatz. Es wurden vier Gruppen über sechs Tage gemessen:

**Versuchsgruppen:**

1. Gruppe: 3T3-Mausfibroblasten
2. Gruppe: unbeschichtete Aluminiumfolie
3. Gruppe: Aluminiumfolie mit Poly-D-/-L-Laktid-Beschichtung (100 µl)
4. Gruppe: Aluminiumfolie mit Poly-D-/-L-Laktid- + COPROG<sub>Luciferase</sub>-Beschichtung [10 µg COPROGs/Folie] (100 µl)

Die Gruppen 1-3 dienen als Kontrollgruppen.

Da für die tägliche Messung die Zellen lysiert und damit zerstört wurden, mussten für jede Gruppe sechs Ansätze mit je drei Folien vorbereitet werden. Der Messwert ergibt sich aus dem Mittelwert der drei Folien.

Beschichtung:

Die Beschichtung und Zellzugabe wurde wie unter Kapitel 2.6 beschrieben durchgeführt. Bei der Herstellung der COPROG<sub>Luciferase</sub> wurde die Menge so berechnet, dass jede Folie mit 10 µg Plasmid beschichtet ist. Die Polylaktidlösung in Gruppe 3 und Gruppe 4 hatten eine Konzentration von 50 mg/ml.

Die Lagerung zum Abdampfen des Lösungsmittels der Beschichtung von Gruppe 3 und Gruppe 4 betrug 48 Stunden unter der Sterilbank.

Zellen:

Als Zellen wurden je Folie 80.000 3T3-Mausfibroblasten eingesetzt.

Messungen:

Die Messung erfolgte nach 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden. An jedem dritten Tag fand ein Mediumswechsel statt.

**4. Expressionsnachweis von BMP-2 aus COPROG<sub>BMP-2</sub>-Poly-D/-L-Laktid-beschichteten Aluminiumfolien**

**4.1 Materialien und Geräte**

**Tabelle 10: Materialien und Geräte zur Beschichtung von Aluminiumfolien mit Poly-D/-L-Laktid + COPROG<sub>BMP-2</sub>**

<p><b>Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien (Bezugsquelle)</b></p> <p>Aluminiumfolie</p> <p>Eppendorf - Pipette Research<sup>®</sup>, versch. Größen (Fa. Eppendorf, Hamburg)</p> <p>Reaktionsgefäße 1,5 ml, verschließbar (Fa. Neolab, Heidelberg)</p> <p>COPROG<sub>BMP-2</sub>-beschichtete Aluminiumfolien in verschiedenen Plasmidkonzentrationen (im Eigenlabor hergestellt)</p>
<p><b>Geräte (Bezugsquelle)</b></p> <p>Sterilbank Hera Safe (Fa. Heareus, Hanau)</p> <p>Inkubator (Fa. Heareus, Hanau)</p> <p>Kühlschrank -80 °C (Fa. Heareus, Hanau)</p> <p>Außerdem werden Geräte der Standardlaborausstattung verwendet.</p>



**Zellen (Bezugsquelle)**

293 (DSMZ Nr: ACC305), Deutsche Gesellschaft von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

**Materialien für die Zellkultur (Bezugsquelle)**

PBS (1 x) Duplecco (Fa. Biochrom AG, Berlin)

Wellplatten 24 Well (Fa. TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz)

Mikropipetten (Fa. Eppendorf, Hamburg)

Plastiktüten, Plastibrand-Entsorgungsbeutel (Fa. Brand Wertheim)

Wellplatten 24 Well (Fa. TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz)

## 4.2 Versuchsaufbau

In diesem Versuch wurden Aluminiumfolien mit verschiedenen BMP-2-Plasmidkonzentrationen in drei verschiedenen Gruppen beschichtet, und die Expression von BMP-2 wurde untersucht:

Versuchsgruppen:

1. Gruppe: Poly-D-/-L-Laktid + 0,2 % DNA/R203 w/w
2. Gruppe: Poly-D-/-L-Laktid + 0,4 % DNA/R203 w/w
3. Gruppe: Poly-D-/-L-Laktid + 0,8 % DNA/R203 w/w

Die Versuchsdauer betrug sieben Tage. Der Mediumwechsel wurde täglich (nach 24, 48, 72, 96 120 und 144 Stunden) durchgeführt.

Zellen:

Da es sich bei den im ersten Versuchsansatz verwendeten 3T3-Zellen aufgrund unklarer Interaktionen mit Poly-D-/-L-Laktid um schlecht transfizierbare Zellen handelte, wurden für diesen Versuch exemplarisch leicht transfizierbare 293 Zellen (DSMZ Nr: ACC305) eingesetzt.

Beschichtung:

Die Beschichtung und Zellzugabe wurde wie unter Kapitel 2.6 beschrieben durchgeführt. Die beschichteten Folien wurden abgedeckt und für 48 Stunden unter der Sterilbank zum Abdampfen des Lösungsmittels gelagert. Durch die unterschiedlichen Plasmidkonzentrationen erfolgte die COPROG<sub>BMP-2</sub>-Herstellung in drei verschiedenen Glashomogenisatoren. Die Poly-D-/-L-Laktidkonzentration war mit 50 µg/µl in allen drei Gruppen identisch.

Die Folien der Gruppe 1 waren mit 10 µg Plasmid je Folie beschichtet. Die COPROG<sub>BMP-2</sub>-Komplexe waren in 50 µg/µl konzentriertem Poly-D-/-L-Laktid eingearbeitet. Daraus ergibt sich eine Plasmidmenge von 0,2 % je Folie. Für die Gruppen 2 und 3 ergeben sich analog die Menge von 0,4 % bzw. 0,8 % (siehe Tab. 11).

**Tabelle 11: Unterschiedliche Poly-D-/-L-Laktid-COPROG-Konzentrationen - Mengenangabe für die Beschichtung pro Folie**

	Menge COPROGs	Konzentration Poly-D-/-L-Laktid	Menge Poly-D-/-L-Laktid
<b>0,2 %</b>	10 µg	50 µg/µl	100 µl
<b>0,4 %</b>	20 µg	50 µg/µl	100 µl
<b>0,8 %</b>	40 µg	50 µg/µl	100 µl

Auswertung:

Für die Auswertung wurde die Expression von BMP-2 im Überstand gemessen. Dazu wurde täglich der gesamte Überstand abgenommen und jedes Well mit frischem Medium (1 ml) aufgefüllt. Der Überstand wurde bis zur Auswertung mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die gewonnenen Überstände wurden mit einem Quantikine® BMP-2-Elisa ausgewertet.

## 5. Einfluss des Homogenisierens der COPROG<sub>Plasmid</sub>-Poly-D-/-L-Laktid-Beschichtungslösung auf die Expressionshöhe

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss des Homogenisierens mittels Potter auf das Expressionsverhalten untersucht.

### 5.1 Materialien und Geräte

**Tabelle 12: Materialien und Geräte für die Beschichtung von Aluminiumfolien mit Poly-D-/-L-Laktid + COPROG<sub>Luciferase</sub> zum Vergleich modifizierter Homogenisator und Glashomogenisator**

<p><b>Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien (Bezugsquelle)</b></p> <p>Aluminiumfolie</p> <p>Eppendorf – Pipette Research®, versch. Größen (Fa. Eppendorf, Hamburg)</p> <p>COPROG<sub>Luciferase</sub>-beschichtete Aluminiumfolien (im Eigenlabor mit Glaspotter hergestellt)</p> <p>COPROG<sub>Luciferase</sub>-beschichtete Aluminiumfolien (im Eigenlabor mit modifiziertem Homogenisator hergestellt)</p>
<p><b>Geräte (Bezugsquelle)</b></p> <p>Sterilbank Hera Safe (Fa. Heareus, Hanau)</p> <p>Inkubator (Fa. Heareus, Hanau)</p> <p>Glashomogenisator, 2 ml, 0,1 ml graduiert (Fa. Neolab, Heidelberg)</p> <p>Modifizierter Homogenisator (im Eigenlabor hergestellt)</p> <p>Laborrührwerk (Fa. IKA, Staufen)</p> <p>Außerdem werden Geräte der Standardlaborausstattung verwendet.</p>
<p><b>Zellen (Bezugsquelle)</b></p> <p>3T3-Mausfibroblasten, Deutsche Gesellschaft von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig</p>
<p><b>Materialien für die Zellkultur (Bezugsquelle)</b></p> <p>PBS (1 x) Duplecco (Fa. Biochrom AG, Berlin)</p> <p>Wellplatten 24 Well (Fa. TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz)</p>

**Materialien für die Zellkultur (Bezugsquelle)**

Mikropipetten (Fa. Eppendorf, Hamburg)

Plastiktüten, Plastibrand-Entsorgungsbeutel (Fa. Brand Wertheim)

Wellplatten 24 Well (Fa. TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz)

Modifizierter Homogenisator

In der eigenen Arbeitsgruppe wurde ein Homogenisator konstruiert. Grundlage für diesen Homogenisator ist ein 15-ml-Kulturröhrchen, in den ein passender Stößel aus Teflon eingepasst wurde. Der Teflonstößel ist zirkulär 250 µm kleiner als der Tubeinnendurchmesser. Da die 15-ml-Kulturröhrchen genormt sind, kann für jeden Ansatz ein neues, steriles Tube verwendet werden. Durch einen speziellen Deckel kann dieser Homogenisator auch geschlossen verwendet werden. Der Stößel kann mithilfe seines Griffs in ein rotierendes Gerät eingespannt werden, sodass eine gleichmäßige rotierende Bewegung des Teflonstößels erreicht wird.



**Abbildung 15: Glaspotter (links) mit Glasstößel, daneben der modifizierte Homogenisator mit dem Teflonstößel und Deckel (rechts)**

Fragestellungen:

1. Vergleich des bisher verwendeten Glashomogenisators mit dem eigens konstruierten, modifizierten Homogenisators hinsichtlich der Expression.
2. Untersuchung des Expressionsverhaltens bei unterschiedlichem Gebrauch der Homogenisatoren.

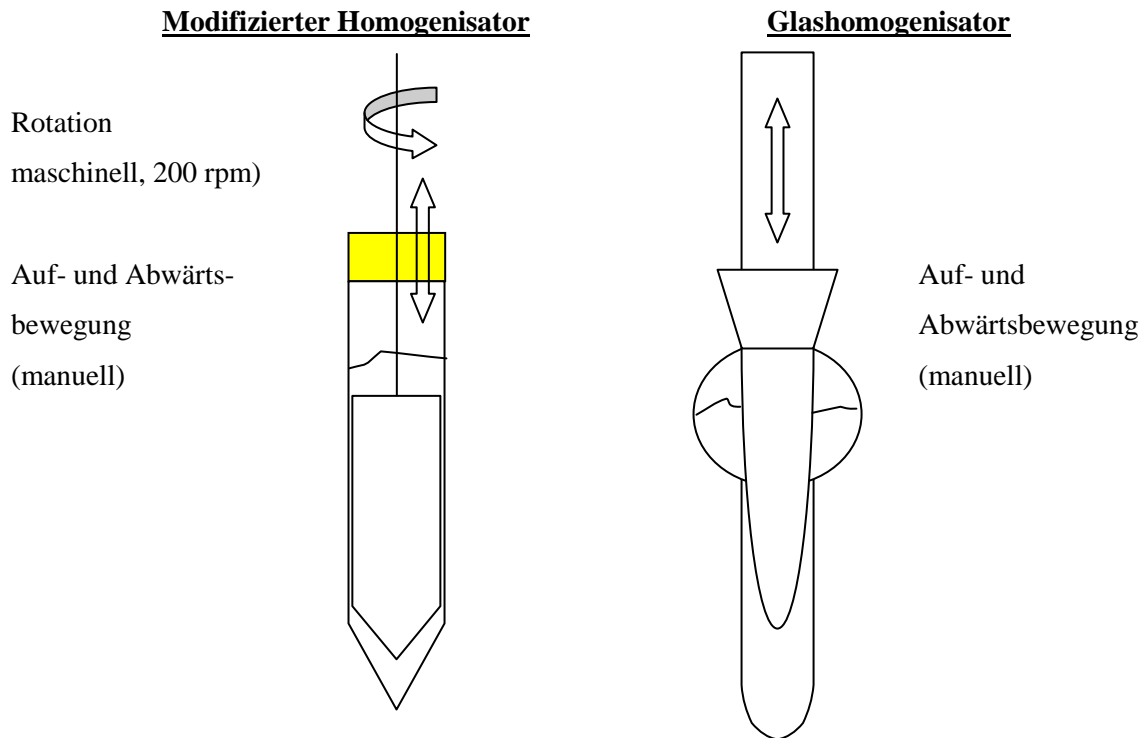
**5.2 Versuchsaufbau zum Vergleich Glashomogenisator - modifizierter Homogenisator**

Der Glashomogenisator und ein in der eigenen Arbeitsgruppe modifizierter Homogenisator wurden unter verschiedenen Bedingungen getestet (siehe Tab. 13). Um reproduzierbar zu arbeiten, wurde der Vorgang des Homogenisierens nach einem vorher festgelegten Protokoll durchgeführt. In den vorangegangenen Versuchen wurde mit dem Glashomogenisator die Lösung ca. 30 Sekunden von Hand dispergiert. Zusätzlich wurde für den Glashomogenisator die Expression bei ein-, zwei- und dreimaliger Auf und Abwärtsbewegung gemessen (siehe Abb. 16). Der eigens hergestellte modifizierte Homogenisator wurde maschinell mit einem Laborrührwerk mit einer Rotations- und zusätzlicher manueller Auf- und Abwärtsbewegung getestet (siehe Abb. 16). Die Rotation betrug gleichmäßig 200 rpm.

Versuchsgruppen:

**Tabelle 13: Versuchsprotokoll für den Vergleich von Glaspotter und modifiziertem Potter**

<b>Modifizierter Homogenisator</b>	<b>Glashomogenisator</b>
30 Sekunden Auf- und Abwärtsbewegung	30 Sekunden Auf- und Abwärtsbewegung
30 Sekunden maschinell; manuelle Auf- und Abwärtsbewegung	1 x Auf- und Abwärtsbewegung
60 Sekunden maschinell; manuelle Auf- und Abwärtsbewegung	2 x Auf- und Abwärtsbewegung
120 Sekunden maschinell; manuelle Auf- und Abwärtsbewegung	3 x Auf- und Abwärtsbewegung



**Abbildung 16: Modifizierter Homogenisator vs. Glashomogenisator - schemat. Darstellung der unterschiedlichen Gebrauchsformen und des Designs**

### 5.3 Versuchsdurchführung

#### Beschichtung:

Für diesen Versuch wurde Luciferase als Plasmid eingesetzt. Die Herstellung der COPROGs<sub>Luciferase</sub>- und der Poly-D-/L-Laktidlösung erfolgte wie in Kapitel 2.6 beschrieben. Die COPROGs für den Glashomogenisator wurden im Glaspotter, diejenigen für den Tubepottertest in einem 15-ml-Falcon Tube lyophilisiert.

Für die Herstellung der Beschichtungslösung wurde die Poly-D-/L-Laktidlösung in den Glas- bzw. Tubepotter pipettiert und entsprechend dem Versuchsprotokoll behandelt. Die Folien wurden zum Abdampfen des Lösungsmittels für 48 Stunden abgedeckt unter der Sterilbank gelagert. Die Menge von DNA je Folie wurde mit 10 µg gewählt. Die Poly-D-/L-Laktidkonzentration beträgt 50 µg/µl. Je Gruppe erfolgte eine Beschichtung von sechs Folien.

#### Zellen:

Als Zellen wurden je Folie 80.000 3T3-Mausfibroblasten eingesetzt.

#### Auswertung:

Die Expression von Luciferase wurde am zweiten Tag nach Zellzugabe mittels Luciferase-Aktivitätsmessung ermittelt.

## 6. Erprobung des modifizierten Homogenisators - Expressionsnachweis von BMP-2 nach Beschichtung mit COPROG<sub>BMP-2</sub>-Poly-D-/-L-Laktid-Beschichtungslösung in Abhängigkeit von verschiedenen BMP-2-Konzentrationen

In diesem Versuch wurden Titanfolien mit verschiedenen BMP-2-Plasmidkonzentrationen mit der in Kapitel 5 ermittelten Beschichtungstechnologie versehen, und die Expression wurde analysiert.

### 6.1 Materialien und Geräte

**Tabelle 14: Materialien und Geräte zur Beschichtung von Titanfolien mit COPROG<sub>BMP-2</sub>-Poly-D-/-L-Laktid-Beschichtungslösung mit verschiedenen BMP-2-Konzentrationen**

<p><b>Verbrauchsmaterialien (Bezugsquelle)</b></p> <p>COPROG<sub>BMP-2</sub>-beschichtete Titanfolien (im Eigenlabor mit modifiziertem Homogenisator hergestellt)</p> <p>Reaktionsgefäße 1,5 ml, verschließbar (Fa. Neolab, Heidelberg)</p>
<p><b>Geräte (Bezugsquelle)</b></p> <p>Sterilbank Hera Safe (Fa. Heareus, Hanau)</p> <p>Inkubator (Fa. Heareus, Hanau)</p> <p>Kühlschrank -80 °C (Fa. Heareus, Hanau)</p> <p>Außerdem werden Geräte der Standardlaborausstattung verwendet.</p>
<p><b>Zellen (Bezugsquelle)</b></p> <p>293 (DSMZ Nr: ACC305), Deutsche Gesellschaft von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig</p>
<p><b>Materialien für die Zellkultur (Bezugsquelle)</b></p> <p>PBS (1 x) Duplecco (Fa. Biochrom AG, Berlin)</p> <p>Wellplatten 24 Well (Fa. TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz)</p> <p>Mikropipetten (Fa. Eppendorf, Hamburg)</p> <p>Plastiktüten, Plastibrand-Entsorgungsbeutel (Fa. Brand Wertheim)</p> <p>Wellplatten 24 Well (Fa. TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz)</p>

### 6.2 Versuchsdurchführung der Beschichtung mit COPROG<sub>BMP-2</sub>-Poly-D-/-L-Laktid-Beschichtungslösung mit verschiedenen BMP-2-Konzentrationen

#### Versuchsaufbau:

- 1. Gruppe: pro Titanfolie 0,2 % DNA/R203 w/w
- 2. Gruppe: pro Titanfolie 0,4 % DNA/R203 w/w
- 3. Gruppe: pro Titanfolie 0,8 % DNA/R203 w/w

Die COPROG-Berechnung erfolgte wie unter Kapitel 2.5.2 beschrieben. Da in diesem Versuch erstmals der modifizierte Homogenisator zum Einsatz kam, erfolgte die Lyophilisation in 15-ml-Kulturröhrchen.

Für die Beschichtung mit der COPROG<sub>BMP-2</sub>-Lösung wurden je Gruppe sechs Titanfolienfolien, bei drei Versuchsgruppen 18 Folien, vorbereitet und sterilisiert.

Die Kaltbeschichtung fand unter der Sterilbank statt. Die Vermischung erfolgte in dem eigens modifizierten Homogenisator nach ausgetestetem Protokoll. Jede Lösung wurde 120 Sekunden maschinell bei 200 rpm dispergiert. Auf jede Folie wurden 100 µl Beschichtungslösung pipettiert. Die Folien wurden für 48 Stunden zum Abdampfen des Lösungsmittels unter der Sterilbank gelagert. Die Zellzugabe erfolgte wie unter Kapitel 2.6.4 beschrieben. Es wurden 293 Zellen (DSMZ Nr: ACC305) verwendet. Die Versuchsdauer betrug 14 Tage. Für die Auswertung wurde die Expression von BMP-2 im Überstand gemessen. Dazu wurde am 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8., 10. und 14. Tag der gesamte Überstand abgenommen und jedes Well mit frischem Medium (1 ml) aufgefüllt. Der Überstand wurde bis zur Auswertung mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

## III. Ergebnisse

### 1. Allgemeine Angaben zur Beschichtung

Sämtlichen in dieser Abhandlung durchgeführten Versuchen liegt eine sogenannte Kaltbeschichtungstechnologie zugrunde. Zu diesem Zweck wird das Poly-D-/-L-Laktid in einem bei Raumtemperatur flüchtigen Lösungsmittel gelöst. Mithilfe dieses „solvent casting“-Verfahrens werden die verschiedenen Folien bei Raumtemperatur mit einem gleichmäßigen Polymerfilm überzogen, in den die „Copolymer protective gene vectors“ eingearbeitet wurden. Als Plasmide kamen Luciferase und BMP-2 zum Einsatz, wobei die Luciferase lediglich zur Etablierung der Methode diente. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine geeignete Methode zu entwickeln, um BMP-2-Vektoren in Form von COPROGs in eine Poly-D-/-L-Laktidbeschichtung einzuarbeiten und in vitro eine Genexpression von BMP-2 zu erreichen.

Bei der Beschichtung wurden folgende Probleme beobachtet:

Ethylacetat ist ein sehr flüchtiges Lösungsmittel. Bei jedem Öffnen des Behälters verdampft ein Teil des Ethylacetats und verändert somit die Konzentration der Lösung. Die Behälter wurden deshalb verschließbar gewählt und nur zur Entnahme der Beschichtungslösung geöffnet. Die Veränderung der Konzentration der Poly-D-/-L-Laktidlösung hat außerdem eine Veränderung der Viskosität und mithin eine Veränderung der Oberflächenspannung zur Folge. Dies ist relevant für den Beschichtungsvorgang. Hoch konzentrierte Poly-D-/-L-Laktidlösung lässt sich nur schwer pipettieren, während eine gering konzentrierte Lösung durch die geringe Oberflächenspannung leicht über den Folienrand laufen kann.

Wie in Kapitel II / 5. beschrieben, wurde ein spezielles Verfahren entwickelt, um die COPROG-Poly-D-/-L-Laktidlösung besser zu homogenisieren und auch um das Problem des Verdampfens des Lösungsmittels einzuengen.

Es erfolgte stets die Herstellung einer Gesamtmenge, mit welcher mehrere Folien beschichtet wurden. Konzentrationsunterschiede der einzelnen Folien sind daher nicht auszuschließen.

Eine mikroskopische Kontrolle der Zellen auf den Folien während des Versuchs war nicht möglich, da die Folien nicht lichtdurchlässig sind. Dementsprechend konnte das Wachstum der Zellen auf den Folien nicht beurteilt werden.

Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel.



## 2. Beschichtungstechnologie

### 2.1 Plasmidherstellung von BMP-2

Durch Cäsiumchloridpräparation wurde das Plasmid BMP-2 für alle Vorversuche dieser Arbeit hergestellt. Das BMP-2 für die Ermittlung der optimalen Dosis wurde mittels eines Qiagen® Plasmid Giga Kits gebildet.

Die Ermittlung der Konzentrationen erfolgte durch eine fotometrische Messung. Die entsprechenden Mengen konnten so für jeden Versuch über diese Konzentration errechnet werden.

Zur qualitativen Kontrolle des Plasmids fand eine Gelelektrophorese statt. Als Marker kam der super coiled Marker (s.c.) zum Einsatz. Der unverdaute Vektor ergibt zwei Banden: Die eine verkörpert die komprimierte und die andere die lineare Form des Vektors. Abbildung 17 zeigt die Bande des s.c.-Markers und die Banden der pDNA. Die am stärksten komprimierte Form wandert am schnellsten, da sie den geringsten Widerstand im Gel erfährt.

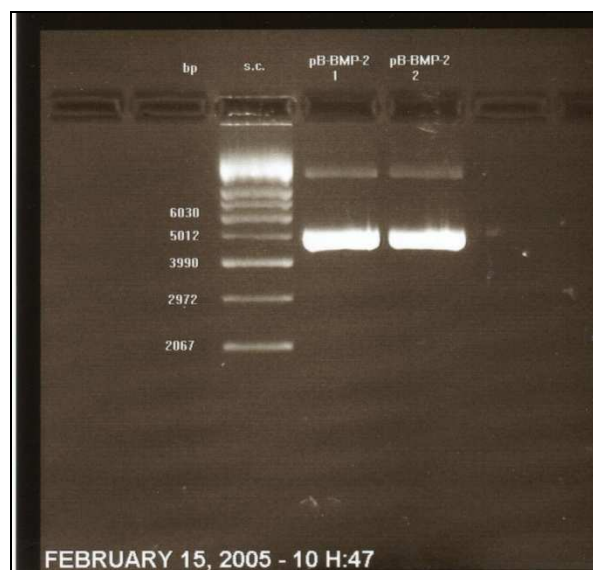


Abbildung 17: Gelelektrophorese von BMP-2 - deutlich zu erkennen sind die zwei Banden der komprimierten und linearen DNA; links zum Vergleich die Banden des s.c.-Markers. Die Basenpaare (bp) sind links beschriftet.

### **3. Analyse der Beschichtungsmethode - Expressionsnachweis aus COPROG<sub>Luciferase</sub>-Poly-D-/-L-Laktid-beschichteten Aluminiumfolien**

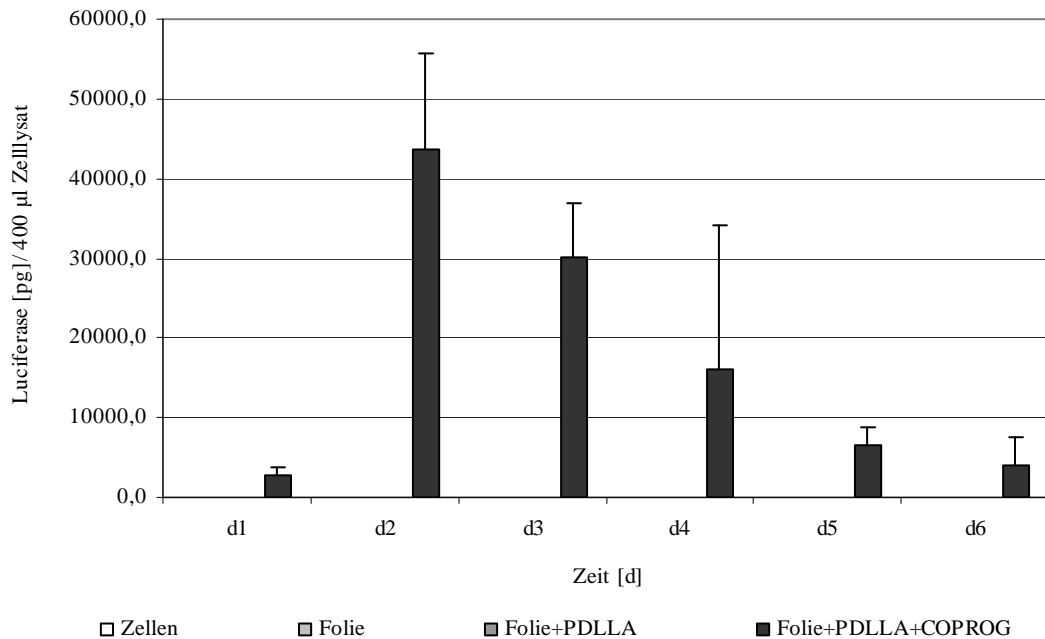
Der erste Abschnitt dieser Studie widmete sich der Entwicklung der Methode und des Ablaufs des Beschichtens. Aus Kostengründen wurde mit Aluminiumfolien und Luciferase als Plasmid gearbeitet. Das Ziel dieses Versuchs bestand darin, einen standardisierten Ablauf der Beschichtung von Folien mit einem Poly-D-/-L-Laktid, in welches ein Plasmid mittels Polyethylenimin und einem Hüllpolymer geschützt (COPROGs) eingearbeitet wurde, zu etablieren.

Es wurden 18 Folien mit der COPROG<sub>Luciferase</sub>-Poly-D-/-L-Laktidlösung beschichtet. Jede Folie wurde mit 10 µg Plasmid beschichtet, die Konzentration der Poly-D-/-L-Laktidlösung betrug 50 µg/µl. Daraus ergibt sich eine Beschichtung jeder Folie mit 0,2 %. In diesem Versuch kam ein handelsüblicher Glashomogenisator zum Einsatz. Hinsichtlich der starken Flüchtigkeit des Lösungsmittels ist hier zu erwähnen, dass dieser nicht verschlossen werden kann.

Die Expression wurde über sechs Tage gemessen (siehe Tab. 15). Parallel zu diesem Versuch wurden drei Kontrollgruppen getestet. In den Kontrollgruppen war z. T. eine geringe Expression messbar. Die mit dem COPROG<sub>Luciferase</sub>-Polylaktid beschichteten Folien zeigten am ersten Tag eine Expression von 2711,48 pg/400 µl Zellysat im Mittelwert. Diese Expression steigerte sich am zweiten Tag auf 43740,57 pg/400 µl Zellysat. Ab dem dritten Tag kam es zu einem langsamen Abfall der Expression bis zu Tag 6 (siehe Abb. 18). Da aus einer Messung mit Luciferase das Ablösen der Zellen von der Folie resultiert, konnte der Versuch über den sechsten Tag hinaus nicht verlängert werden.

**Tabelle 15: Expression von Luciferase-Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW); Tag 1-6**

	LU [pg]/400 µl Zelllysate	LU [pg]/400 µl Zelllysate	LU [pg]/400 µl Zelllysate	LU [pg]/400 µl Zelllysate
	Zellen	Alu	PDLLA	COPROGs
d1				
MW	0,000	0,000	0,020	2711,418
STABW	0,000	0,000	0,035	1025,767
d2				
MW	0,006	0,001	0,025	43740,570
STABW	0,010	0,002	0,015	12037,695
d3				
MW	0,028	0,000	0,001	30075,122
STABW	0,038	0,000	0,002	6704,529
d4				
MW	0,000	0,000	0,000	16076,139
STABW	0,000	0,000	0,000	18046,239
d5				
MW	0,000	0,000	0,000	6541,790
STABW	0,000	0,000	0,000	2296,671
d6				
MW	0,000	0,000	0,000	4055,579
STABW	0,000	0,000	0,000	3572,178



**Abbildung 18: Expression von Luciferase in den vier Versuchsgruppen; Tag 1-6; nach Transfektion von 3T3-Zellen mit COPROG<sub>Luciferase</sub>-PDLLA-beschichteten Aluminiumfolien; 0,2 % DNA/R203w/w**

#### 4. Expressionsnachweis aus COPROG<sub>BMP-2</sub>-Poly-D-/-L-Laktid-beschichteten Aluminiumfolien

Nach den ersten Ergebnissen des Versuchs mit Luciferase wurde die gleiche Methode der Beschichtung mit dem Plasmid des Bone morphogenetic protein 2 durchgeführt. Ziel dieses Versuchs war es, die positiven Ergebnisse des Vorversuchs zu bestätigen. Die Beschichtungsmethode war identisch. Auch die Konzentration der Poly-D-/-L-Laktidlösung wurde mit 50 µg/µl übernommen. Als neuer Parameter wurde der Einfluss der Menge an COPROG<sub>BMP-2</sub> auf der Folie untersucht. Dazu wurden in drei Untersuchungsgruppen jeweils 10 µg, 20 µg und 40 µg Plasmid je Folie in die Beschichtungslösung eingearbeitet und der Einfluss untersucht. Die Messung der Überstände erfolgte täglich über sechs Tage. Mittels BMP-2 ELISA wurden die Proben ausgewertet. Abweichend vom Vorversuch wurden exemplarisch leichter transfizierbare humane Nierenzellen (sogenannte 293 Zellen) eingesetzt.

##### 4.1 Expressionsnachweis mit je 10 µg BMP-2-Plasmid beschichteten Folien

Die Expression der Einzelfolien (siehe Tab. 16) dieser Gruppe lag am ersten Tag im Mittelwert um 122,77 pg/ml. Am zweiten Tag konnte eine Steigerung der Expression im Mittelwert über das Doppelte der Expression des Vortages (264,28 pg/ml) nachgewiesen werden. Der Spitzenwert der Folie n1 lag bei 386,96 pg/ml. Die Expression dieser Folie steigerte sich am dritten Tag auf 469,06 pg/ml. Ebenso überstieg der Wert der Folie n3 die Expression des Vortages. Der Mittelwert der Expression von Tag 3 lag mit 256,59 pg/ml jedoch hinter Tag 2 zurück. Ab dem vierten Tag war ein kontinuierlicher Expressionsabfall zu beobachten. Ab Tag 6 zeigte die Folie n=2 keine Expression mehr. An Tag 7 konnte bei allen Folien (n1, n3, n4, n5) eine leichte Steigung der Expression beobachtet werden. Der Verlauf der Expression ist in Abbildung 19 grafisch dargestellt.

**Tabelle 16: Expression von BMP-2 der Einzelfolien in pg/ml bei einer Beschichtung von 0,2 % Plasmid je Folie; Tag 1-7; Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW)**

	0,20 %	0,20 %	0,20 %	0,20 %	0,20 %	0,20 %	0,20 %
Einzelfolie	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7
n1	120,39	386,96	469,06	323,24	164,72	76,88	83,17
n2	115,01	334,06	270,56	158,63	102,88	0,00	0,00
n3	148,59	178,80	181,68	122,72	99,03	57,12	89,47
n4	113,68	139,17	94,90	61,51	80,75	38,74	58,51
n5	116,17	282,40	266,73	196,91	118,91	73,72	75,90
MW	122,77	264,28	256,59	172,60	113,26	49,29	61,41
STABW	14,65	103,93	138,92	97,86	31,81	31,47	36,23

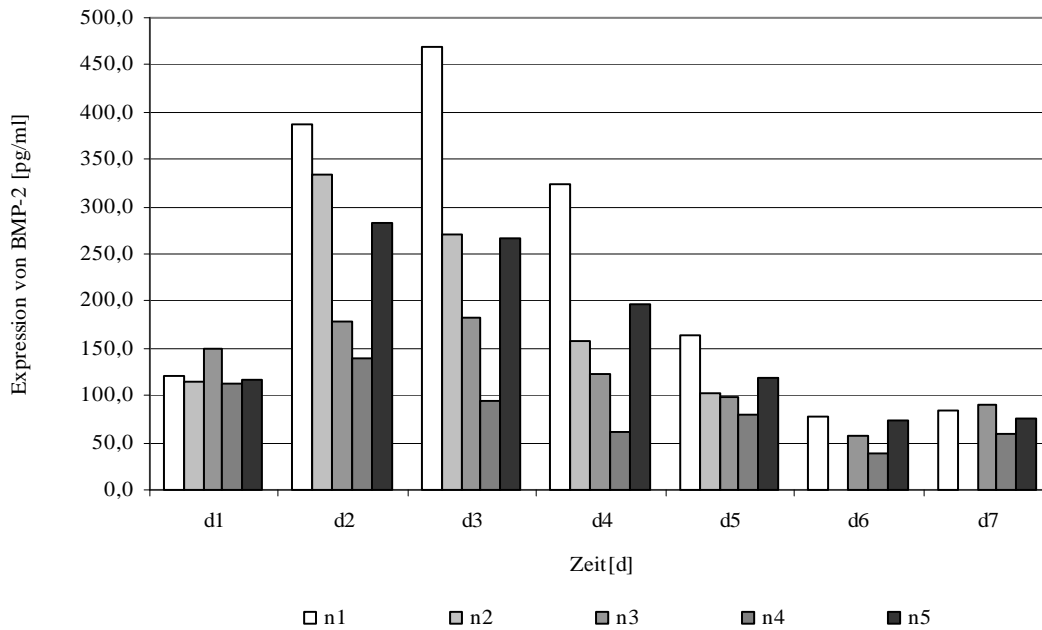


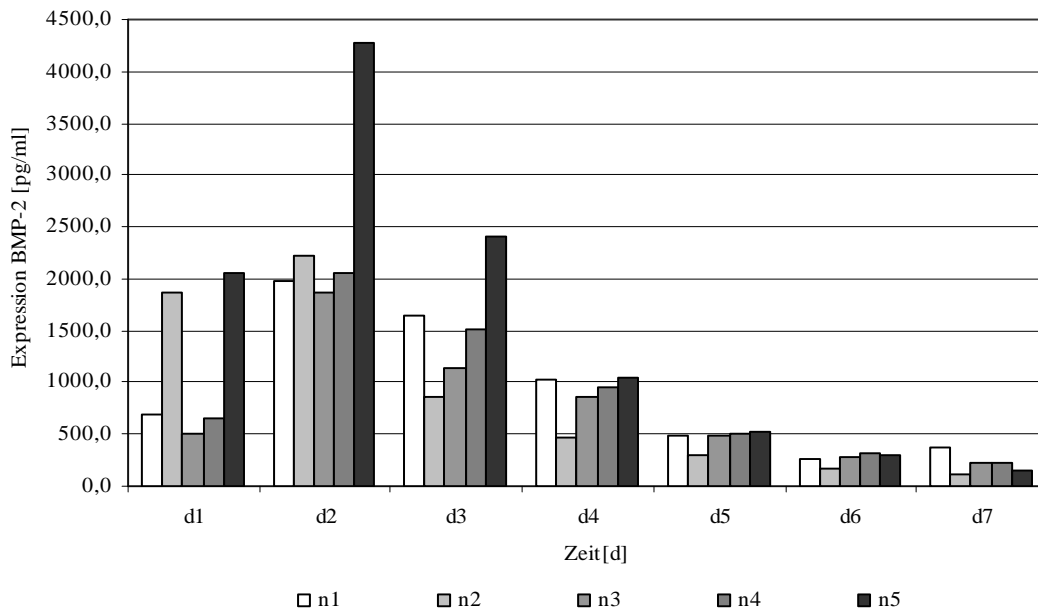
Abbildung 19: Expression von BMP-2 der Einzelfolien n1-5; Tag 1-7; nach Transfektion von 293 Zellen mit COPROG<sub>BMP-2</sub>-PDLLA-beschichteten Aluminiumfolien; 0,2 % DNA/R203 w/w, 10 µg DNA<sub>BMP-2</sub>

#### 4.2 Expressionsnachweis mit je 20 µg BMP-2-Plasmid-beschichteten Folien

In dieser Gruppe konnte eine Steigerung der Expression gegenüber Gruppe 1 beobachtet werden. Der Mittelwert der Expression lag am ersten Tag mit 1151,16 pg/ml deutlich über der ersten Untersuchungsgruppe. Signifikant sind hier die Werte der Folien n2 und n5, die mit 1858,09 pg/ml bzw. 2044,80 pg/ml deutlich die Expressionen der restlichen Folien übersteigen. Die Expressionssteigerung am zweiten Tag erreichte 2484,66 pg/ml im Mittelwert. Der fast doppelte Wert wurde bei der Folie n5 mit 4284,36 pg/ml nachgewiesen (vgl. Tab. 17). Ab dem dritten Tag ist ein Abfall der Expressionen im Mittelwert und auch in den Einzelwerten zu beobachten. Eine leichte Steigerung der Expression zeigte sich bei Folie n1 von Tag 6 zu Tag 7. Abbildung 20 veranschaulicht die Expressionen. Einen vollständigen Abfall mit Nullexpression war nicht zu beobachten.

Tabelle 17: Expression von BMP-2 der Einzelfolien in pg/ml bei einer Beschichtung von 0,4 % Plasmid je Folie, Tag 1-7, Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW)

	0,40 %	0,40 %	0,40 %	0,40 %	0,40 %	0,40 %	0,40 %
Einzelfolie	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7
n1	682,59	1984,28	1647,35	1029,08	483,52	263,93	370,26
n2	1858,09	2229,47	863,38	475,31	290,52	165,81	109,01
n3	511,19	1875,21	1141,06	854,65	476,76	288,25	215,10
n4	659,13	2049,97	1519,77	944,92	503,05	309,51	224,38
n5	2044,80	4284,36	2407,67	1052,10	522,81	298,61	158,13
MW	1151,16	2484,66	1515,84	871,21	455,33	265,22	215,38
STABW	736,47	1014,25	587,12	234,57	93,87	58,08	98,31



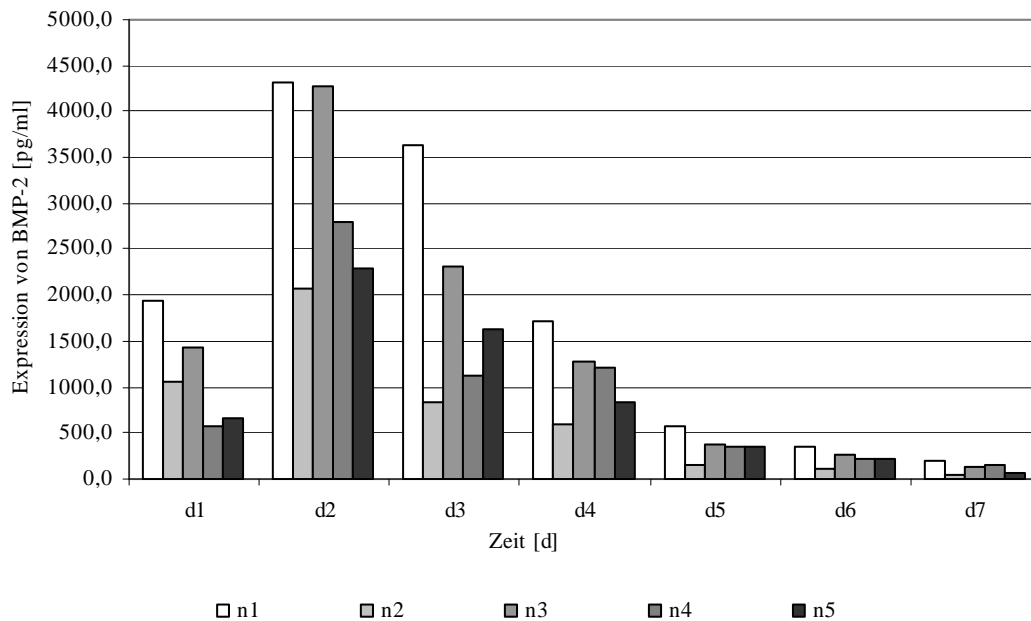
**Abbildung 20:** Expression von BMP-2 der Einzelfolien n1-5; Tag 1-7; nach Transfektion von 293 Zellen mit COPROG<sub>BMP-2</sub>-PDLLA-beschichteten Aluminiumfolien; 0,4 % DNA/R203 w/w, 20 µg DNA<sub>BMP-2</sub>

### 4.3 Expressionsnachweis mit je 40 µg BMP-2-Plasmid je Folie

Der Mittelwert der Expression in dieser Gruppe lag am ersten Tag mit 1135,83 pg/ml knapp unter dem Mittelwert des Tag 1 (d1) in der zweiten Untersuchungsgruppe. Die Expressionssteigerung am zweiten Tag war auch in dieser Gruppe nachweisbar und erreichte 3152,02 pg/ml. Die höchsten Expressionen zeigten hier die Folien n1 und n3 mit 4311,29 pg/ml bzw. 4271,82 pg/ml. Ab dem dritten Tag ist bei allen Folien ein Expressionsabfall zu beobachten. Lediglich die Folie n4 zeigte am vierten Tag einen leichten Anstieg gegenüber der Expression von Tag 3.

**Tabelle 18:** Expression von BMP-2 der Einzelfolien in pg/ml bei einer Beschichtung von 0,8 % Plasmid je Folie; Tag 1-7; Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW)

	0,80 %	0,80 %	0,80 %	0,80 %	0,80 %	0,80 %	0,80 %
Einzelfolie	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7
n 1	1938,26	4311,29	3639,95	1709,78	572,69	347,10	190,68
n 2	1065,52	2068,38	831,47	587,27	164,36	106,35	47,65
n 3	1428,45	4271,82	2303,93	1270,41	365,72	272,94	125,54
n 4	577,21	2807,26	1134,24	1200,48	349,81	225,46	146,82
n 5	669,70	2301,33	1622,17	846,06	351,77	230,95	63,67
MW	1135,83	3152,02	1906,35	1122,80	360,87	236,56	114,87
STABW	562,09	1074,09	1117,55	428,88	144,66	87,54	59,20



**Abbildung 21: Expression von BMP-2 der Einzelfolien n1-5; Tag 1-7; nach Transfektion von 293 Zellen mit COPROG<sub>BMP-2</sub>-PDLLA-beschichteten Aluminiumfolien; 0,8 % DNA/R203 w/w, 40 µgDNA<sub>BMP-2</sub>**

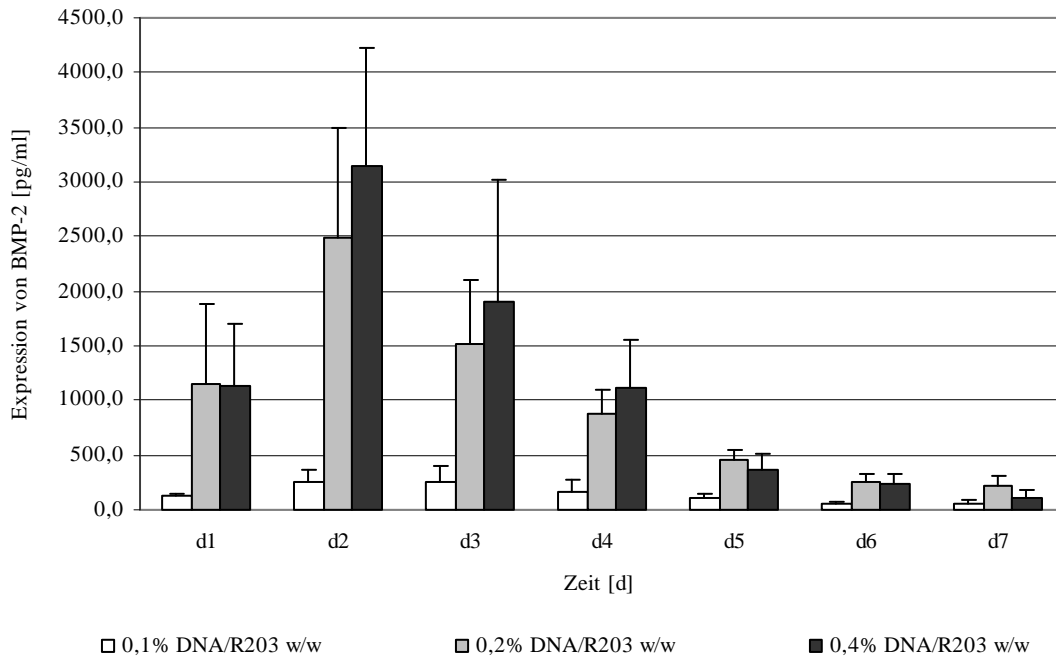
#### 4.4 Ergebnisse des Expressionsnachweises aus COPROG<sub>BMP-2</sub>-Poly-D/-L-Laktid-beschichteten Aluminiumfolien im Vergleich

Wie bereits im vorangegangenen Versuch mit Luciferase als Versuchsplasmid konnte mit BMP-2 ein Anstieg der Expression vom ersten zum zweiten Tag in allen Gruppen beobachtet werden. Diese Expression fällt dann ab dem dritten Tag ab. Auch die verschiedenen Mengen an eingearbeiteten COPROG<sub>BMP-2</sub> haben Einfluss auf die Höhe der BMP-2-Expression. So blieb die Gruppe mit 0,2 % Plasmid unter der therapeutischen Grenze. Die Gruppe mit 0,8 % Plasmid je Folie zeigte mit 3152,01 pg/ml BMP-2 im Mittelwert am zweiten Tag die höchste Expression. Die Folien, die mit 0,4 % Plasmid beschichtet wurden, erreichten am zweiten Tag eine Expression von 2484,65 pg/ml BMP-2 im Mittelwert. Es konnte beobachtet werden, dass die Gruppe mit 0,8 % pDNA beschichteten Folien die höchsten Expressionen zeigten, auch bei fallenden Expressionen (vgl. Tab. 19). Abbildung 22 zeigt die gemessenen Mittelwerte und Standardabweichungen im Vergleich.

**Tabelle 19: Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) in pg/ml; Tag 1-7; der Untersuchungsgruppen: 0,2 %DNA<sub>BMP-2</sub>/R203 w/w, 0,4 %DNA<sub>BMP-2</sub>/R203 w/w und 0,8 %DNA<sub>BMP2</sub>/R203 w/w**

	0,20 % DNA/R203 w/w 0,10 µg DNA	0,40 % DNA/R203 w/w 0,20 µg DNA	0,80 DNA/R203 w/w 0,40 µg DNA
d1			
MW	122,77	1151,16	1135,83
STABW	14,65	736,47	562,09
d2			
MW	264,277	2484,657	3152,017
STABW	103,934	1014,249	1074,091
d3			
MW	256,587	1515,844	1906,354
STABW	138,921	587,117	1117,554
d4			
MW	172,602	871,211	1122,798
STABW	97,862	234,568	428,876
d5			
MW	113,259	455,333	360,872
STABW	31,810	93,871	144,664
d6			
MW	49,292	265,222	236,560
STABW	31,465	58,075	87,537
d7			
MW	61,410	215,376	114,872
STABW	36,231	98,312	59,203





**Abbildung 22: Expression von BMP-2, Tag 1-7; nach Transfektion von 293 Zellen mit COPROG<sub>BMP-2</sub>-PDLLA-beschichteten Aluminiumfolien; 0,2 %DNA<sub>BMP-2</sub>/R203 w/w, 0,4 %DNA<sub>BMP-2</sub>/R203 w/w und 0,8 %DNA<sub>BMP-2</sub>/R203 w/w**

## 5. Einfluss des Homogenisierens auf die Expressionshöhe

In diesem Versuch wurde ein handelsüblicher Glashomogenisator mit einem modifizierten, in der eigenen Arbeitsgruppe hergestellten Homogenisator hinsichtlich der Expressionshöhe unter verschiedenen Bedingungen getestet.

Die Herstellung der Beschichtungslösung erfolgte mit dem Reporter gen Luciferase. Die COPROG<sub>Luciferase</sub> wurden mit einer Konzentration von 0,2 % DNA/R203 w/w eingearbeitet. Die Poly-D-/L-Laktidlösung wies eine Konzentration von 50 mg/ml auf.

### 5.1 Glashomogenisator

Der Glashomogenisator wurde nach folgendem Protokoll in vier verschiedenen Gruppen getestet:

1. Dispergieren durch manuelle Ab- und Aufwärtsbewegung 30 Sekunden,
2. Dispergieren durch 1 x manuelle Ab- und Aufwärtsbewegung,
3. Dispergieren durch 2 x manuelle Ab- und Aufwärtsbewegung,
4. Dispergieren durch 3 x manuelle Ab- und Aufwärtsbewegung.

In der ersten Gruppe wurde der Glashomogenisator nach Protokoll 30 Sekunden manuell auf und ab bewegt. Im Mittelwert wurde hierbei eine Expression von 10615,42 pg/400 µl Zelllysate gemessen. Die Einzelwerte (vgl. Tab. 20) der Folien schwanken zwischen 9320,74 pg/400 µl Zelllysate mit der niedrigsten und 54323,55 pg/400 µl Zelllysate mit der höchsten Expression.

Die zweite Versuchsgruppe ergab eine Expression von 57005,00 pg/400 µl Zelllysate. Dabei zeigten die ersten beiden beschichteten Folien mit 126225,68 und 61338,56 pg/400 µl Zelllysate die höchsten Expressionen. Die restlichen vier Folien der Gruppe wiesen Expressionen zwischen 30756,95 pg/400 µl Zelllysate und 36971,94 pg/400 µl Zelllysate auf.

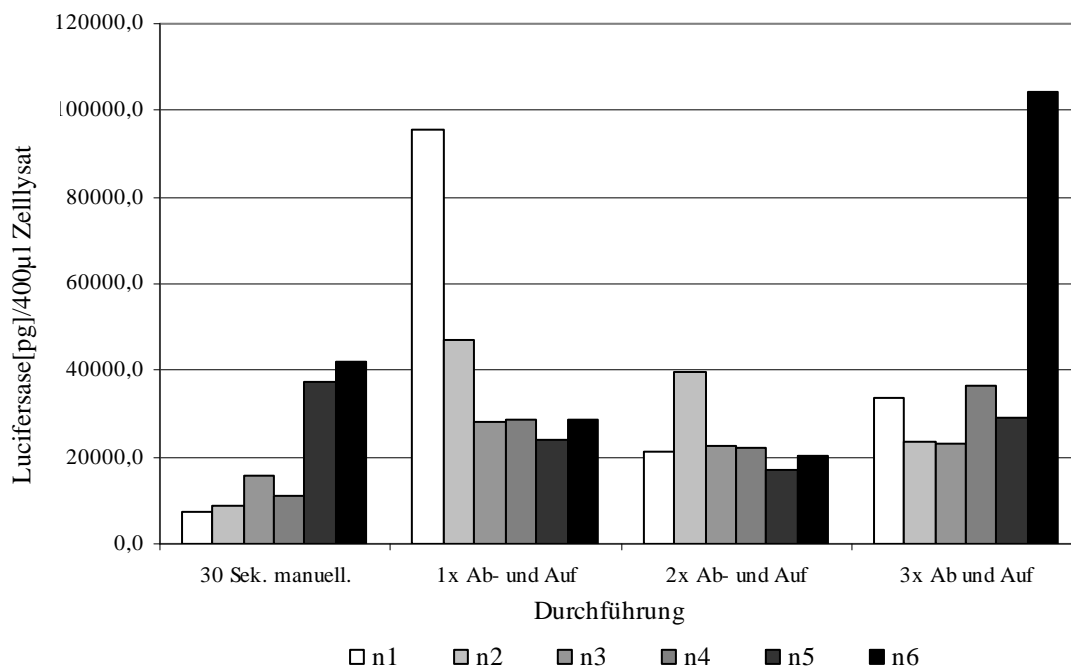
Die Ergebnisse der dritten Gruppe lagen im Mittelwert bei 27776,38 pg/400 µl Zelllysate. Die zweite Folie zeigte mit 51123,65 pg/400 µl Zelllysate eine wesentlich höhere Expression.

Die vierte Versuchsgruppe charakterisierte sich durch hohe Schwankung der Expression von Luciferase innerhalb der Gruppe. Der Mittelwert ergab eine Expression von 26736,01 pg/400 µl Zelllysate. Signifikant erhöht ist die Expression der sechsten Folie mit 137686,29 pg/400 µl Zelllysate.

Abbildung 23 enthält eine grafische Darstellung der Messwerte.

**Tabelle 20: Expression von Luciferase der Einzelfolien bei einer Beschichtung von 0,2 % DNA<sub>Luciferase</sub>/R203 w/w; Tag 1-7**

pg Luciferase in 400 µl Zelllysate bzw. pro Folie:				
Folien	LU [pg] 30 Sekunden manuell	LU [pg] 1 x Ab- und Aufwärtsbewegung	LU [pg] 2 x Ab- und Aufwärtsbewegung	LU [pg] 3 x Ab- und Aufwärtsbewegung
n1	9320,74	126225,68	27429,60	43249,49
n2	11126,19	61338,56	51123,65	30301,09
n3	19737,06	36215,22	28690,07	29535,87
n4	14258,44	36971,94	28313,38	47360,42
n5	48099,89	30756,95	21678,35	37280,14
n6	54323,55	36881,42	25813,52	137686,29
MW	10615,42	57005,00	27776,38	26736,01
STABW	4319,32	34815,53	10138,50	5869,08



**Abbildung 23: Expression von Luciferase der Einzelfolien n1-6; Tag 2; nach Transfektion von 3T3-Zellen mit COPROG<sub>Luciferase</sub>-PDLA-beschichteten Aluminiumfolien; 0,2 % DNA/R203 w/w**

## 5.2 Modifizierter Homogenisator

Der in der eigenen Arbeitsgruppe modifizierte Homogenisator wurde ebenfalls in vier Versuchsgruppen getestet.

1. Dispergieren durch manuelle Auf- und Abwärtsbewegung 30 Sekunden,
2. Dispergieren durch Rotation 30 Sekunden; manuelle Auf- und Abwärtsbewegung,
3. Dispergieren durch Rotation 60 Sekunden; manuelle Auf- und Abwärtsbewegung,
4. Dispergieren durch Rotation 120 Sekunden; manuelle Auf- und Abwärtsbewegung.

Die Luciferaseexpression lag in der ersten Gruppe im Mittelwert bei 109298,42 pg/400 µl Zelllysate.

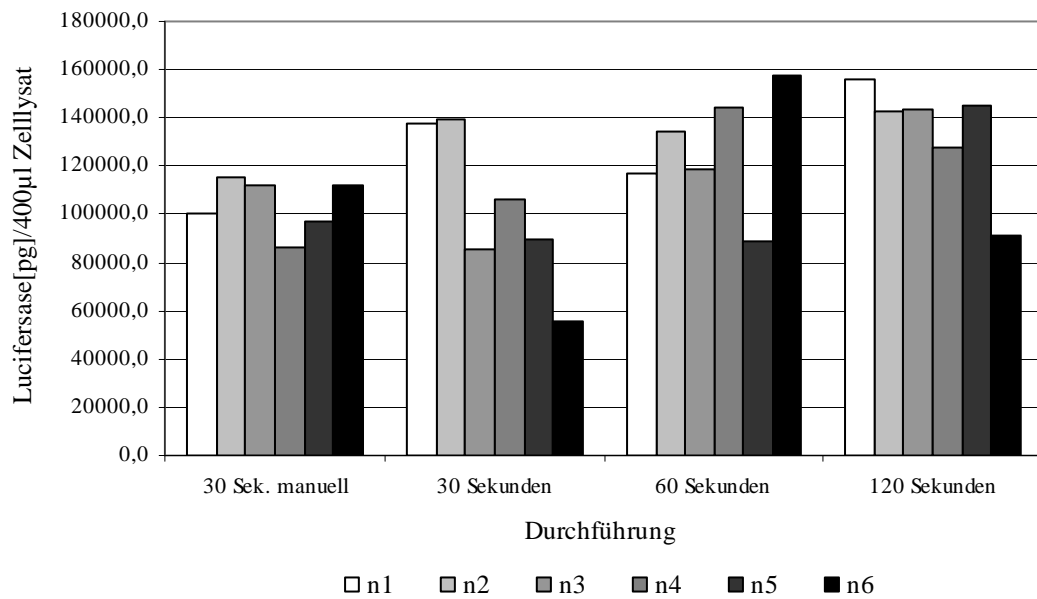
In der zweiten bis vierten Gruppe wurde neben der manuellen Auf- und Abwärtsbewegung eine zusätzliche kontinuierliche Rotationsbewegung mittels Laborrührwerk durchgeführt.

In der zweiten Untersuchungsgruppe schwanken die Expressionswerte zwischen 89191,86 pg/400 µl Zelllysate und 139464,18 pg/400 µl Zelllysate. Daraus ergibt sich im Mittelwert eine Expression von 120877,78 pg/400 µl Zelllysate.

In der dritten Gruppe lag die Expression im Mittelwert bei 1233248,23 pg/400 ml Zelllysate. In der vierten Gruppe zeigte sich mit 147348,58 pg/400 µl Zelllysate eine nochmalige Steigerung der Expression im Mittelwert. Der niedrigste Messwert mit 91313 pg/400 ml Zelllysate bewegt sich deutlich unterhalb des Mittelwertes. Dadurch beträgt die Standardabweichung 7174,53, erweist sich indes im Vergleich zum Mittelwert als relativ gering. Eine Übersicht über die Einzelexpressionen und Mittelwerte präsentiert Tabelle 21; die grafische Darstellung der Einzelexpressionen im Diagramm ist Abbildung 24 zu entnehmen.

**Tabelle 21: Expression von Luciferase der Einzelfolien bei einer Beschichtung von 0,2 % DNA<sub>Luciferase</sub>/R203 w/w; Tag 1-7**

pg Luciferase in 400 ul Zelllysate bzw. pro Folie:				
	LU [pg]	LU [pg]	LU [pg]	LU [pg]
Folien	30 Sekunden manuell	30 Sekunden	60 Sekunden	120 Sekunden
n1	100217,78	137334,42	116602,77	155630,82
n2	115435,97	139464,18	134649,15	143042,38
n3	112241,52	85834,74	118492,76	143372,53
n4	86433,06	105776,05	143958,35	127668,08
n5	97040,01	89191,86	89123,60	145219,49
n6	111688,95	55846,16	157620,92	91313,07
MW	109298,42	120877,78	123248,23	147348,58
STABW	8024,62	30366,83	9918,60	7174,53



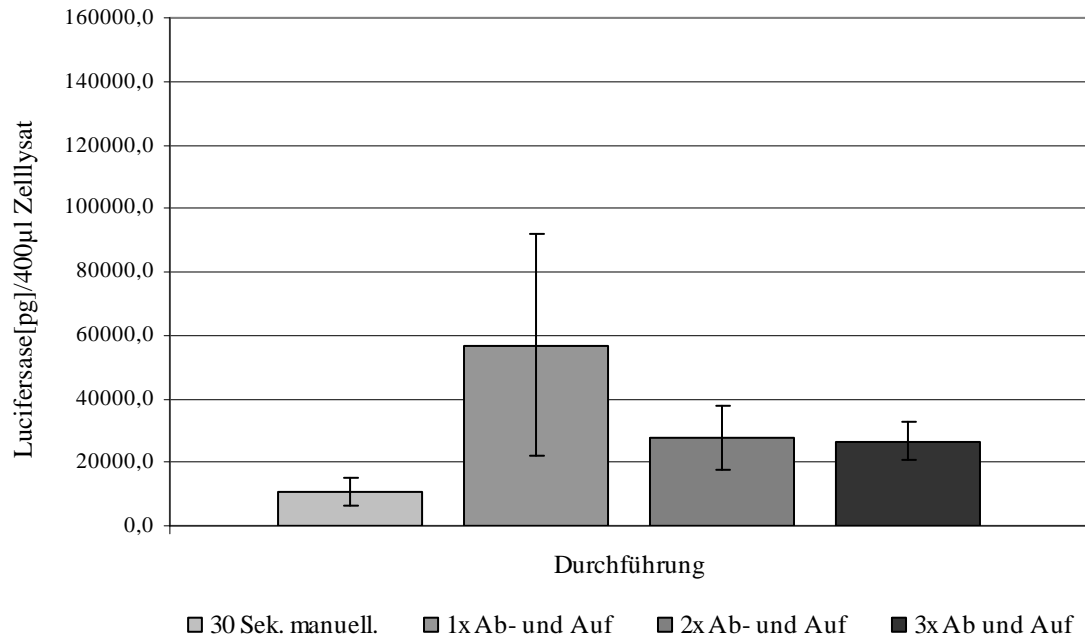
**Abbildung 24: Expression von Luciferase der Einzelfolien n1-6; Tag 2; nach Transfektion von 3T3-Zellen mit COPROG<sub>Luciferase</sub>-PDLLA-beschichteten Aluminiumfolien; 0,2 % DNA/R203 w/w**

### 5.3 Ergebnisse des Glashomogenisators und des modifizierten Homogenisators im Vergleich

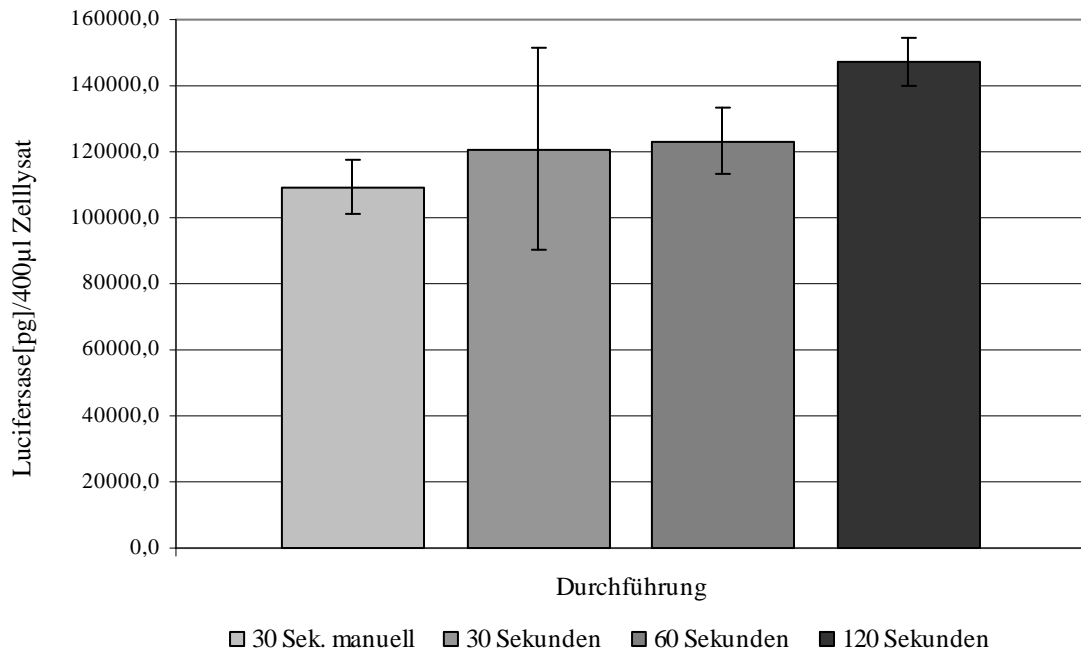
Jeweils in den Versuchsgruppen 1 wurden beide Homogenisatoren nach dem gleichen Protokoll getestet. Im Ergebnis lag die Expression beim modifizierten Homogenisator um das 2,5-Fache höher als beim handelsüblichen Glashomogenisator. Im Vergleich dazu war die Standardabweichung beim modifizierten Homogenisator nur um das Doppelte erhöht.

Auch in den restlichen Gruppen der Untersuchungen für den modifizierten Homogenisator zeigten sich durchweg höhere Expressionswerte (siehe Abb. 26) als für den Glashomogenisator (vgl. Abb. 25). Die höchsten Expressionen im Mittelwert mit der niedrigsten Standardabweichung offenbarten sich in der Versuchsgruppe 4 mit dem modifizierten Homogenisator.

Mit einzelnen signifikant erhöhten Werten konnten auch beim Glashomogenisator sehr hohe Expressionen nachgewiesen werden. Allerdings wurden in diesen Versuchsgruppen gleichsam höhere Standardabweichungen nachgewiesen.



**Abbildung 25: Expression von Luciferase; Tag 2; Glashomogenisator (s. Kap. 3.5.1) nach Transfektion von 3T3-Zellen mit COPROG<sub>Luciferase</sub>-PDLLA-beschichteten Aluminiumfolien; 0,2 % DNA<sub>Luciferase</sub>/R203 w/w**



**Abbildung 26: Expression von Luciferase; Tag 2; Modifizierter Homogenisator (s. Kap. 3.5.2) nach Transfektion von 3T3-Zellen mit COPROG<sub>Luciferase</sub>-PDLLA-beschichteten Aluminiumfolien; 0,2 % DNA<sub>Luciferase</sub>/R203 w/w**

## 6. Expressionsnachweis von BMP-2 nach Beschichtung mit dem modifizierten Homogenisator

Es wurden in drei Versuchsgruppen je sechs Titanfolien in verschiedenen Plasmid-Polylaktidverhältnissen beschichtet.

- 1. Gruppe: pro Titanfolie 0,2 % DNA<sub>BMP-2</sub>/R203 w/w,
- 2. Gruppe: pro Titanfolie 0,4 % DNA<sub>BMP-2</sub>/R203 w/w,
- 3. Gruppe: pro Titanfolie 0,8 % DNA<sub>BMP-2</sub>/R203 w/w.

Die Messung der Expression von BMP-2 in den Überständen erfolgte nach 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 und 14 Tagen.

### 6.1 Ergebnisse Gruppe 1 - 0,2 % DNA/R203 w/w

Die Konzentration der Poly-D-/L-Laktidlösung betrug 50,0 mg/ml. Sechs Titanfolien wurden beschichtet. Die Mittelwerte und Standardabweichungen veranschaulicht Tabelle 22.

In dieser Versuchsgruppe wurde am ersten Tag mit 18435,77 pg/ml die höchste Expression im Mittelwert der gesamten Versuchsreihe gemessen. Dabei schwankten die Werte an Tag 1 zwischen 25622,48 pg/ml mit der höchsten und 8508,4 pg/ml mit der niedrigsten Expression. Signifikant erhöhte Werte zeigen sich bei den Folien 1 und 3 mit Werten über 25000 pg/ml. Im Gegensatz dazu ergibt sich bei Folie 6 ein zum Mittelwert signifikant erniedrigtes Ergebnis. Für Tag 1 resultiert daher eine Standardabweichung von 6498,07. Am zweiten Tag lag der Mittelwert der Expression bei 8064,67 pg/ml. Auch an diesem Tag war der Expressionswert der Folie 1 mit 10751,71 pg/ml gegenüber dem Mittelwert erhöht.

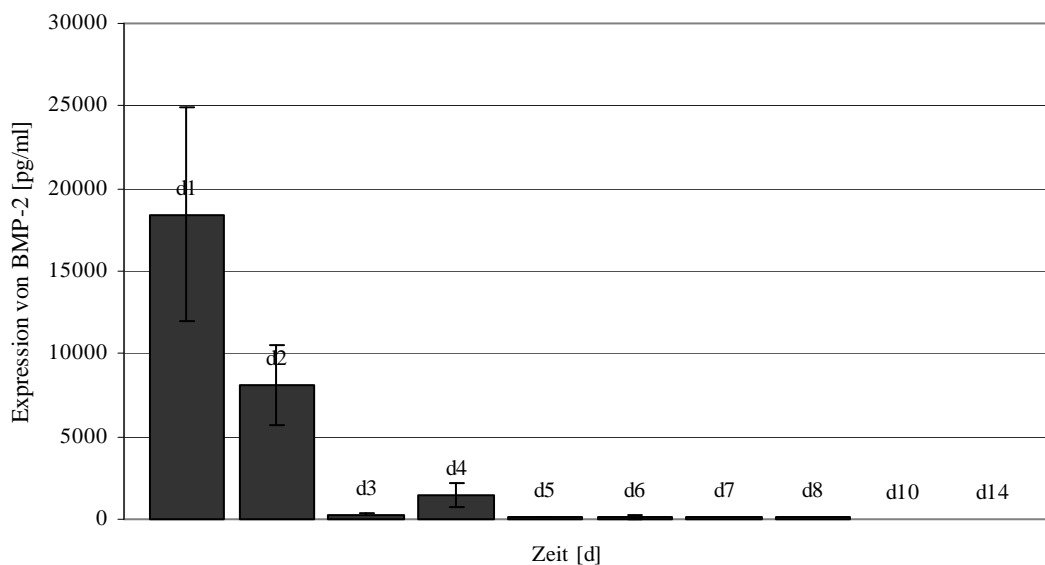
Ein starker Abfall der Expression ist am dritten Tag zu beobachten. Es wird lediglich eine Expression von 191,36 pg/ml im Mittelwert erreicht. Einen erhöhten Messwert zeigt Folie 3 mit 873,30 pg/ml. Bei den Folien 2 und 5 war keine Expression von BMP-2 nachweisbar. Die Standardabweichung ist daher mit 339,07 gegenüber dem Mittelwert erhöht.

Für den vierten Tag des Versuchs lässt sich auch in dieser Gruppe eine Expressionssteigerung feststellen. Bei allen Einzelfolien war eine Expression von BMP-2 messbar. Der Mittelwert lag bei 1449,65 pg/ml, die Einzelwerte schwankten zwischen 2088,63 pg/ml und 1225,55 pg/ml.

Für den fünften Tag war ein erneuter Abfall der Expression zu beobachten. Nach einem leichten Anstieg der Werte an Tag 6 zeigte sich an den restlichen Tagen des Versuchs ein kontinuierlicher Expressionsabfall. An Tag 14 war lediglich bei zwei von sechs Folien eine Expression messbar. Aus diesem Grund resultiert hier ebenfalls wieder eine hohe Standardabweichung gegenüber dem Mittelwert. Der Verlauf der Expressionshöhen ist in Abbildung 27 grafisch veranschaulicht.

**Tabelle 22: Expression von BMP-2, Mittelwerte und Standardabweichungen; Tag 1-14; nach Transfektion von 293 Zellen mit COPROG<sub>BMP-2</sub>-PDLLA-beschichteten Titanfolien mit 0,2 % DNA/R203 w/w; 10 µg DNA<sub>BMP-2</sub>**

10 µg pDNA	Mittelwert	Standardabweichung
0,2 % DNA/R203w/w	pg/ml	
d1	18435,77	6498,07
d2	8064,67	2325,95
d3	191,36	339,07
d4	1449,65	390,27
d5	129,92	42,06
d6	147,79	89,60
d7	98,42	38,26
d8	78,17	23,19
d10	34,43	12,21
d14	2,24	3,94



**Abbildung 27: Expression von BMP-2, Tag 1-14; nach Transfektion von 293 Zellen mit COPROG<sub>BMP-2</sub>-PDLLA-beschichteten Titanfolien; 0,2 % DNA<sub>BMP-2</sub>/R203 w/w, 10 µ DNA<sub>BMP-2</sub> je Folie**

## 6.2 Ergebnisse Gruppe 2 - 0,4 %DNA/R203 w/w

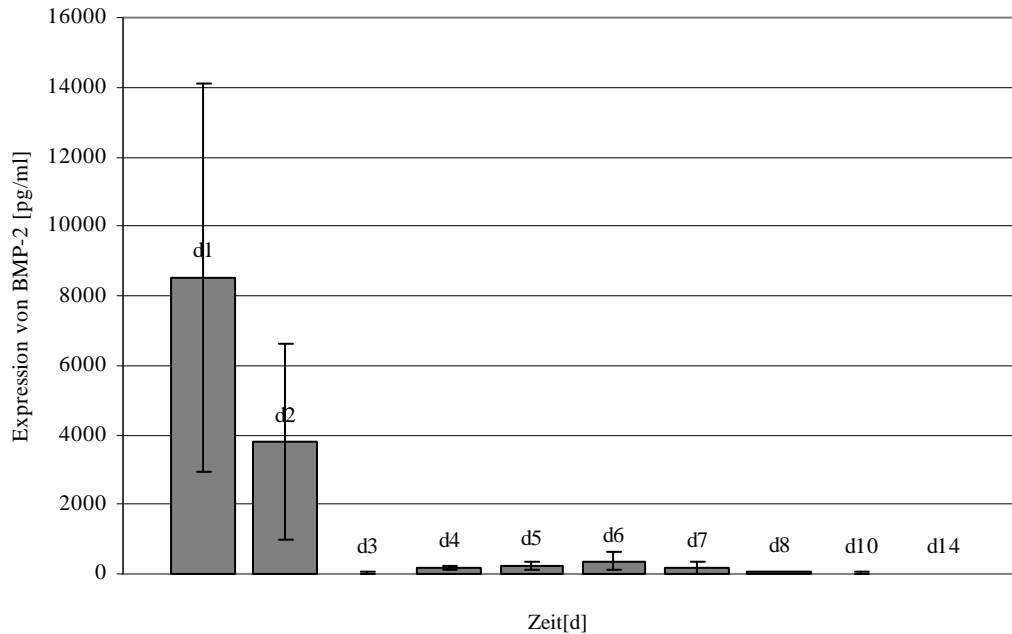
Die Konzentration der Poly-D-/-L-Laktidlösung betrug 50,0 mg/ml. Sechs Titanfolien wurden beschichtet. Die Mittelwerte und Standardabweichungen enthält Tabelle 23, die grafische Darstellung des Expressionsverlaufs ist Abbildung 28 zu entnehmen.

Am ersten Tag konnte in dieser Versuchsgruppe eine Expression von BMP-2 von 8531,44 pg/ml im Mittelwert gemessen werden. Die am Tag 2 gemessene Expression von BMP-2 zeigte im Mittelwert einen niedrigeren Wert als am Vortag. Gleichwohl konnte beobachtet werden, dass bei den Einzelwerten der Folien 1 und 5 höhere Werte als am Vortag gemessen wurden. So steigerten sich die Expressionen bei Folie 1 von 2567,99 pg/ml auf 4716,71 pg/ml und bei Folie 5 von 3815,43 pg/ml auf 8680,61 pg/ml. Die restlichen drei Folien offenbarten einen starken Abfall der Expression. Ein erneuter starker Abfall der Expression konnte am dritten Tag beobachtet werden. Bei zwei Folien (1 und 2) war keine Expression messbar. Die höchste Expression wurde mit 35,69 pg/ml (Folie 5) gemessen. Am vierten Tag konnte bei allen Folien ein Anstieg der Expression beobachtet werden. Die höchste Expression mit 273,20 pg/ml wurde ebenfalls bei Folie 5 gemessen. Eine Steigerung der Expression im Mittelwert konnte auch an Tag 6 nachgewiesen werden. Bei Betrachtung der Einzelwerte fällt allerdings auch hier auf, dass nur bei vier Folien ebenfalls eine Steigerung nachzuweisen war. Ab dem sechsten Tag kam es täglich zu einem Abfall der Expression von BMP-2. Auch hier war bei Einzelwerten ein Anstieg der Expression gegenüber dem Vortag messbar. Am 14. Tag war bei drei Folien keine Expression nachweisbar.

**Tabelle 23: Expression von BMP-2, Mittelwerte und Standardabweichungen; Tag 1-14; nach Transfektion von 293 Zellen mit COPROG<sub>BMP-2</sub>-PDLLA-beschichteten Titanfolien mit 0,4 % DNA/R203 w/w; 20 µg DNA<sub>BMP-2</sub>**

20 µg pDNA	Mittelwert	Standardabweichung
0,4 % DNA/R203w/w	pg/ml	
d1	8531,44	5572,27
d2	3785,08	2805,32
d3	16,32	16,13
d4	158,87	63,45
d5	209,77	120,85
d6	370,77	267,50
d7	192,18	169,59
d8	31,12	12,18
d10	22,64	9,96
d14	8,39	12,64





**Abbildung 28: Expression von BMP-2; Tag 1-14; nach Transfektion von 293 Zellen mit COPROG<sub>BMP-2</sub>-PDLA-beschichteten Titanfolien; 0,4 % DNA<sub>BMP-2</sub>/R203 w/w, 20 µ DNA<sub>BMP-2</sub> je Folie**

### 6.3 Ergebnisse Gruppe 3 - 0,8 % DNA/R203 w/w

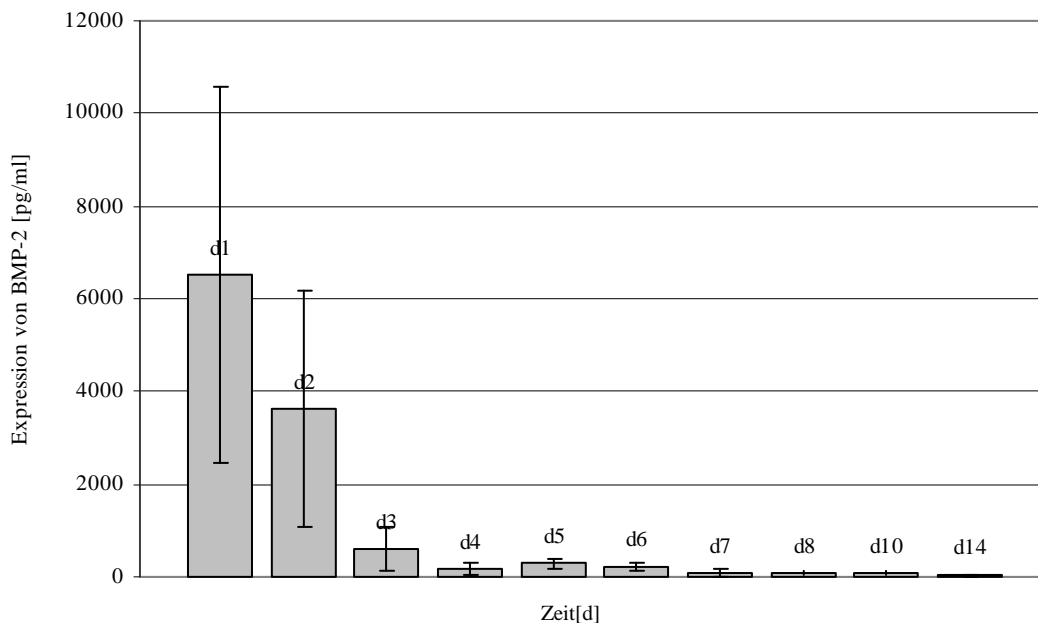
Die Konzentration der Poly-D-/L-Laktidlösung betrug 50,0 mg/ml. Sechs Titanfolien wurden beschichtet.

Die gemessene Expression von BMP-2 an Tag 1 lag bei 6531,20 pg/ml im Mittelwert (siehe Tabelle 24). Signifikant ist hier die erhöhte Expression bei zwei Folien mit Messwerten von 11490,74 pg/ml (Folie 1) bzw. 11990,08 pg/ml (Folie 5). Am zweiten Tag kam es zu einem Abfall der Expression im Mittelwert mit 3612,09 pg/ml. Hier war ebenfalls eine Erhöhung des Einzelwertes im Vergleich zum Mittelwert bei Folie 5 mit 8205,74 pg/ml zu beobachten. Die Messergebnisse von Tag 3 und 4 zeigten einen weiteren Abfall der Expression im Mittelwert. Der Expressionswert von BMP-2 bei Folie 5 war mit 1261,06 pg/ml (Tag 3) und 377,15 pg/ml (Tag 4) im Vergleich zum Mittelwert erneut erhöht. An Tag 5 ist ein leichter Anstieg der Expression von BMP-2 feststellbar. Ab dem sechsten Tag kommt es wieder zu einem Abfall der Expression. An den Tagen 7-10 konnten relativ konstante Werte gemessen werden. Am letzten Tag der Messung war bei einer Folie keine Expression nachweisbar.

Die grafische Darstellung des Expressionsverlauf zeigt Abbildung 29.

**Tabelle 24: Expression von BMP-2, Mittelwerte und Standardabweichungen; Tag 1-14; nach Transfektion von 293 Zellen mit COPROG<sub>BMP-2</sub>-PDLLA-beschichteten Titanfolien mit 0,8 % DNA/R203 w/w; 40 µg DNA<sub>BMP-2</sub>**

40 µg pDNA 0,8 % DNA/R203w/w	Mittelwert pg/ml	Standardabweichung
d1	6531,20	4052,67
d2	3612,09	2551,71
d3	618,73	472,58
d4	172,17	119,53
d5	287,65	111,69
d6	199,73	80,93
d7	79,11	78,68
d8	75,77	36,24
d10	78,74	48,71
d14	29,34	23,15



**Abbildung 29: Expression von BMP-2; Tag 1-14; nach Transfektion von 293 Zellen mit COPROG<sub>BMP-2</sub>-PDLLA-beschichteten Titanfolien; 0,8 % DNA<sub>BMP-2</sub>/R203 w/w, 20 µ DNA<sub>BMP-2</sub> je Folie**

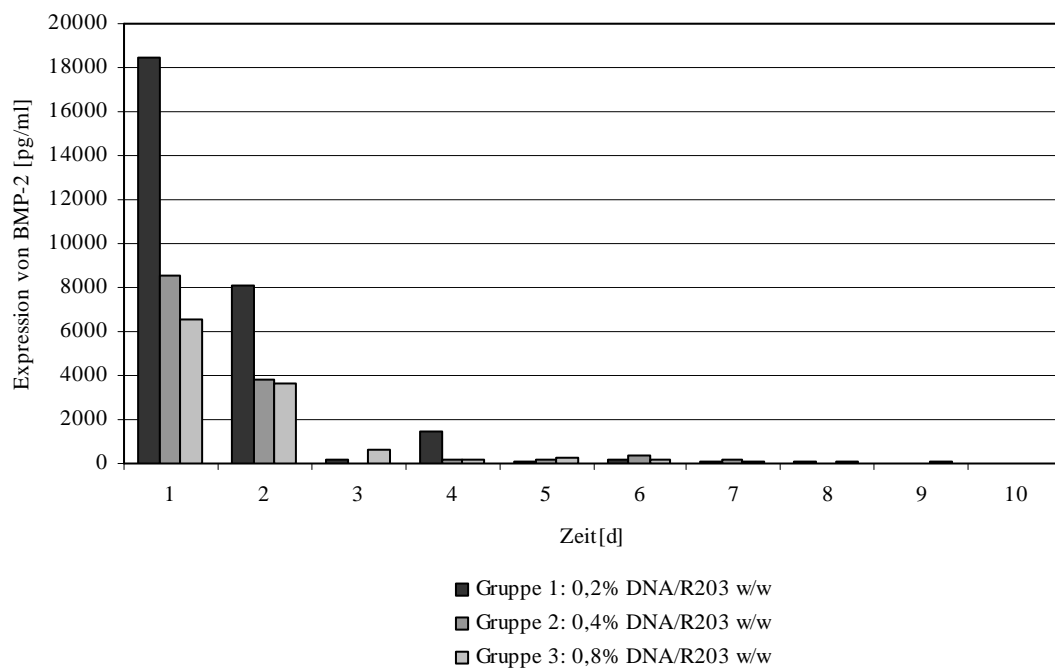
## 6.4 Ergebnisse des Expressionsnachweis nach Beschichtung mit dem modifizierten Homogenisator im Vergleich

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in allen der drei Versuchsgruppen Expressionen von BMP-2 nachgewiesen werden konnten.

Dabei offenbarten sich indes Unterschiede hinsichtlich der Höhe und der Dauer der Freisetzung zwischen den einzelnen Untersuchungsgruppen (siehe Abb. 30).

In allen Gruppen ging die Freisetzung nach dem gleichen Muster vonstatten:

Einer hohen Expression von BMP-2 am ersten Tag folgte ein Abfall der Freisetzung an Tag 2, der sich zum dritten Tag noch verstärkte. Für die folgenden Tage konnte eine leichte Steigung der Expression von BMP-2 mit leichten Schwankungen hinsichtlich der Höhe beobachtet werden. Auffällig ist eine Zunahme der Expression ab dem vierten bis sechsten Tag über die Expression des dritten Tages hinaus. Jedoch war ab dem dritten Tag eine Expression über der therapeutischen Grenze in keiner Gruppe messbar.



**Abbildung 30: Expression von BMP-2; Tag 1-14; nach Transfektion von 293 Zellen mit COPROG<sub>BMP-2</sub>-PDLLA-beschichteten Titanfolien; 0,2 % DNA<sub>BMP-2</sub>/R203 w/w, 10  $\mu$  DNA<sub>BMP-2</sub> je Folie; Vergleich der drei Versuchsgruppen.**

## **IV. Diskussion**

### **1. Zielsetzung**

#### **1.1 Das Prinzip der genaktivierten Biomaterialien**

Wachstumsfaktoren sind Grundlage einer Vielzahl von Studien, wenn es um die Förderung von Wundheilungsprozessen geht. Untersuchungen von Deppe et al. (2002, Seite 197) und Schmidmaier et al. (2001a, Seite 341) konnten belegen, dass sich die Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- $\beta$  in eine biodegradierbare Polylaktidbeschichtung einarbeiten lassen und es in vivo zu einer Beschleunigung der Defektdeckung an Critical-size-Defekten bzw. einer Beschleunigung der Frakturheilung kommt.

Kandziora et al. (2002, Seite 482) und Schmidmaier et al. (2002, Seite 816) konnten ähnliche Ergebnisse bei Untersuchungen mit biodegradierbaren Polylaktid-Trägersystemen in Verbindung mit dem Wachstumsfaktor BMP-2 präsentieren.

Die Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren wird allerdings durch die kostspielige Herstellung bioaktiver Wachstumsfaktoren begrenzt. Auch ist die biologische Wirkung aufgrund enzymatischer Abbauvorgänge eingeschränkt (Bonadio et al. 1999, Seite 757).

Durch den Einsatz genaktivierter Biomaterialien kann eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit erreicht werden. Werden Zielzellen mit geeigneten therapeutischen Genen transfiziert, kommt es zur lokalen Produktion ausgewählter Wundheilungsmediatoren, die entscheidend zur Verbesserung der Geweberegeneration und zur Wiederherstellung ursprünglicher Gewebestrukturen beitragen können.

Die genetische Sequenz zahlreicher Wachstumsfaktoren ist bekannt, mithin ist die Verwendung der Gene, die für diese Wachstumsfaktoren codieren, nahezu unbegrenzt. Abhängig von der Indikation werden die Plasmide der entsprechenden Gene mit geringerem finanziellen und technischen Aufwand hergestellt. Als Träger dieser genetischen Informationen werden in der regenerativen Medizin Biomaterialien mit Genvektoren angereichert und implantiert. Die Wachstumsfaktoren werden im Organismus selbst gebildet.

Um einen solchen lokalen direkten Gentransfer zu ermöglichen, wurde die sogenannte Gen-Aktivierte Matrix (GAM) entwickelt (Fang et al. 1996, Seite 5753; Bonadio 2000, Seite 304). Sie besteht prinzipiell aus der Plasmid-DNA und einer Matrixstruktur als Gerüst. Die Matrix setzt sich entweder aus natürlichen Materialien (Kollagen, Fibrin) oder synthetischen Polymeren (Polyglykolide, Polylaktide) zusammen. Sie kann unterschiedliche Formen annehmen, beispielsweise die eines Schwamms, eines lyophilen Implantates oder eines Gels.

Die Gen-Aktivierte Matrix lässt sich als genbeladener Träger in die Zielregion transplantieren, die einwachsenden Zellen werden durch die freigesetzten Genvektoren transfiziert und bilden das entsprechende Gen direkt am Zielort. Der Vorteil dieser genaktivierten Matrix liegt in der Freisetzungskinetik. Durch die kontinuierliche Freisetzung der Wundheilungsmediatoren können therapeutisch wirksame Konzentrationen über einen längeren Zeitraum erreicht werden. Die bei der

Freisetzung von Proteinen aus einer Matrix entstehenden hohen, z. T. toxischen Wirkspiegel mit einem schnellen Abfall der Konzentration unter den therapeutischen Bereich werden auf diese Weise vermieden (Bonadio et al. 1999, Seite 757). Ein weiterer Vorteil der Gen-Aktivierten Matrix besteht in der Bildung von Proteinen, spezifisch in bestimmten Zellen und Geweben zu induzieren. Sie bergen den Vorteil, dass sie nicht in das Genom integriert werden und nur für einen gewissen Zeitraum wirksam sind (Bonadio et al. 1999, Seite 757).

Es konnten als Trägermaterialien von Genvektoren erfolgreich Kollagenschwämme eingesetzt werden (Fang et al. 1996, Seite 5753; Bonadio et al. 2002, Seite 304). Das Anforderungsprofil an geeignete Biomaterialien muss individuell der entsprechenden Indikation angepasst werden. Je nach Anwendung sollen die eingesetzten Materialien bioabbaubar sein und sich in den Regenerationsprozess zerstörter Gewebe- und Organstrukturen integrieren. Darüber hinaus werden sie als Träger von Genvektoren für die lokale Transfektion von Zielzellen eingesetzt und können als Transfektionsmilieu einen entscheidenden Einfluss auf den Transfektionserfolg ausüben (Kong et al. 2005, Seite 460). Kollagenschwämme konnten ferner als Träger für nicht virale Genvektorkomplexe erfolgreich eingesetzt werden (Scherer et al. 2002, Seite 642). Dessen ungeachtet sind diese Schwämme nur eingeschränkt als medizinische Trägermaterialien, z. B. auf metallischen Implantaten, geeignet, da sie kaum mechanische Stabilität besitzen. Im Hinblick auf Osteosynthesematerialien und Implantaten in der Chirurgie wurde daher in der vorliegenden Arbeit auf metallische Trägermaterialien zurückgegriffen.

## **1.2 BMP-2-Genvektorenkomplexe für den nicht viralen Gentransfer**

BMP-2 ist ein osteoinduktives Protein, welches eine bedeutende Rolle beim Knochenwachstum und der -regeneration spielt (Awad et al. 2007, Seite 1979). Die Wirkung von BMP-2 beruht insbesondere auf dem Differenzierungseinfluss osteoblastärer Zellen sowie der Förderung der Reifung und Mineralisierung der extrazellulären Matrix (Kandziora et al. 2002, 482). BMP-2 wird erfolgreich zur Verbesserung in der Frakturheilung, bei Defekten im Gesichts und Kieferbereichs sowie bei parodontalen und dentalen Defekten eingesetzt (Kirker-Head 2000, Seite 73-77).

Die Transfektion der Zellen mit dem Plasmid des Wachstumsfaktors BMP-2 sollte in der vorliegenden Arbeit über einen nicht viralen Gentransfer erreicht werden. BMPs benötigen ein Trägermaterial, um ihre Knochen-induzierende Wirkung im Gewebe zu entfalten.

Grundlage für die Versuche bildet das Polyethylenimin (PEI). PEI ist ein gut charakterisiertes, kationisches Polymer für den Gentransfer. Es verfügt über eine hohe Dichte an protudierbaren Aminogruppen und eignet sich optimal für die Komplexbildung der negativ geladenen DNA. PEI kann entweder linear (PEI22) oder verzweigt (PEI25) mit unterschiedlichen Molekulargewichten vorliegen. Die strukturellen Unterschiede von PEI führen zu deutlichen Unterschieden im Transfektionsverhalten, ebenso Variationen der N/P-Ratio und Genvektormengen (Dang und Leong

2006, Seite 496; Kircheis et al. 2001, Seite 352; Storrie und Mooney 2006, Seite 502; Wrightman et al. 2001, Seite 371). Polykationen vermittelter Gentransfer bindet über elektrostatische Wechselwirkungen an die negativen Ladungen der DNA und bildet so die Polyplexe. Die DNA wird auf diese Weise vor physikalischer und biochemischer Degradierung geschützt. Die positive Ladung von PEI-Polyplexen führt in vivo zu einer unspezifischen Interaktion mit Blutkomponenten und Gewebe. Ein weiterer Nachteil der PEI-Polyplexe besteht darin, dass sie in physiologischer Salzlösung aggregieren und eine hohe Toxizität aufweisen (Wrightman et al. 2001, Seite 371).

Um beispielsweise die Toxizität der Polyplexe zu reduzieren, wurde das schützende Peptid-Polyethylenglykol-Kopolymer (P6YE5C) als Hüllpolymer eingesetzt. Dadurch entstehen die Copolymer Protected Gene Vectors (COPROGs). Diese Methode wurde von Finsinger et al. (2000, Seite 1183) entwickelt. Aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen bindet das negativ geladene Hüllpolymer an die positiv geladenen Genvektoren. Daraus resultiert u. a. eine Verringerung der Toxizität. Die Untersuchung von Finsinger et al. (2000, Seite 1183) zeigt, dass die Partikel in ihrer Gesamtladung neutral sind, keine salzinduzierte Aggregation demonstrieren und somit als effektiv abgeschirmt gelten können. Scherer et al. (2002, Seite 634) konnte nachweisen, dass die Expression, Vektorstabilität und Freisetzung von COPROG-beladenen Kollagenschwämmen im Vergleich zu nackter DNA oder ungeschützten Vektoren überlegen war.

Eine Hauptaufgabe der Arbeit war es, eine Beschichtungsmethode für den nicht viralen lokalen Gentransfer zu entwickeln. Um die schwierige und ineffiziente Einarbeitung der wässrigen Genvektorformulierung in die organische Polymerlösung zu umgehen, wurden die Genvektoren lyophilisiert. Die geschützten Genvektoren aus pDNA, PEI25 und P6YE5C (N/P Ratio 8) hielten der Gefriertrocknung stand. Nach Dispersion in organischer Polymerlösung blieb die eingesetzte pDNA in Form von COPROGs-Formulierungen funktionell intakt. Die so hergestellte Suspension der lyophilisierten Genvektoren und organischer Polymerlösung stellt das zentrale Element der hier angewandten Beschichtungstechnologie dar.

### **1.3 Poly-D-/-L-Laktid - Beschichtungstechnologie und Trägermaterialien**

Als Arzneistoffträger wurde für diese Arbeit das Poly-D-/-L-Laktid R203 (Fa. Boehringer, Ingelheim) gewählt. In Untersuchungen wurde gezeigt, dass das reine Poly-D-/-L-Laktid eine bakteriostatische, knochenheilungsfördernde Wirkung sowie eine gute Biokompatibilität am Knochenlager (Schmidmaier et al 2001a, Seite 341; Schmidmaier et al. 2001b, Seite 449; Gollwitzer 2002, Seite 68, Gollwitzer et al. 2003, Seite 347). In der Orthopädie wird dieses Polymer bereits erfolgreich bei Osteosynthesematerialien klinisch eingesetzt (Middleton und Tipton 2000, Seite 2335). Das Polymer kann in flüchtigen organischen Lösungsmitteln gelöst werden.

Als organisches Lösungsmittel wurde Ethylacetat verwendet. Nach Untersuchungen von Gollwitzer (2002, Seite 37) zeichnet sich Ethylacetat durch eine gleichmäßig dünne, flächendeckende Oberfläche

aus und weist eine geringere Toxizität im Vergleich zu anderen Lösungsmitteln, wie z. B. Chloroform, auf.

Die Beschichtung wurde durch eine Kaltbeschichtungstechnologie, solvent casting, durchgeführt. Nach Schmidmaier et al. (2001b, Seite 449) ist es notwendig, Wachstumsfaktoren mittels Kaltbeschichtung in die Lösung einzubringen, da Hitze ihre biologischen Eigenschaften gefährden oder ändern kann.

Im Idealfall sollte ein synthetischer Carrier eine Reihe von Anforderungen erfüllen: Ein ideales Trägermaterial soll das aktive Protein, die Wachstumsfaktoren oder wie im vorliegenden Fall die copolymer protected gene vectors reversibel binden und vor unspezifischer Proteolyse schützen können. Es soll biokompatibel, nicht immunogen, biodegradierbar sein und in vivo nicht mit dem Wundheilungsprozess interferieren.

Weiterhin wird von einem Trägermaterial eine langsame, kontinuierliche Freisetzung von Wachstumsfaktoren, eine osteoinduktive Fähigkeit, eine Minimierung der Wachstumsfaktorenkonzentration, Resorbierbarkeit, fehlende immunologische Wirkung, fehlendes antigenes Potenzial und mechanische Stabilität gefordert.

In Untersuchungen von Jepsen und Terheyden (2000, Seite 289) über Trägermaterialien für rekombinantes humanes BMP konnte festgestellt werden, dass die Menge und Struktur des neu gebildeten Knochens und der zeitliche Verlauf der Knocheninduktion vom verwendeten Träger abhängig sind. Dabei könnten u. a. materialspezifische Unterschiede in der Freisetzungskinetik des BMP für die beobachteten Ergebnisse verantwortlich sein.

Der Einfluss des Molekulargewichts der Polymere auf die Transfektionseffizienz zeigte in Untersuchungen von Basarkar et al. (2007, Seite 250) eine signifikante Steigerung der Transfektionseffizienz bei Poly-D-/-L-Laktiden mit geringem Molekulargewicht. Das in den vorliegenden Versuchen verwendete Poly-D-/-L-Laktidresomer R203 hat ein Molekulargewicht von 30 kDa.

Beim Beschichtungsvorgang trat außerdem ein Einfluss der Konzentration der Poly-D-/-L-Laktidlösung auf die Oberflächenspannung und Viskosität zutage. In vorab durchgeführten Tests zeigte sich, dass hoch konzentrierte Poly-D-/-L-Laktidlösungen (ab  $c = 100$  mg/ml) mit hoher Viskosität und Oberflächenspannung schwer zu pipettieren waren. Niedrig konzentrierte Lösungen (bis  $c = 12,5$  mg/ml) demonstrierten aufgrund einer ebenfalls niedrigen Viskosität und Oberflächenspannung die Tendenz, über den Folienrand zu laufen. Bei der in allen Versuchen verwendeten Konzentration von 50 mg/ml war der Einfluss der Viskosität und Oberflächenspannung gering. Eine Veränderung der Konzentration der Poly-D-/-L-Laktidlösung kann Einfluss auf die Expressionshöhe und -dauer von BMP-2 haben. Wenn davon ausgegangen wird, dass das Plasmid bei der Beschichtung auf die Oberfläche der Folie absinkt, ist bei hoch konzentrierten Lösungen mit einer verzögerten Freisetzung zu rechnen. Dieses Verhalten kann Grundlage weiterer Untersuchungen sein.

Im Hinblick auf weiterführende Untersuchungen wurde mit den Titanfolien ein Werkstoff verwendet, der auch *in vivo* angewendet werden kann. Titan kommt als neunthäufigstes Element in der Erdkruste (<http://www.deuschetitan.de/material/index.html>; Stand: 04.2007) und weit verbreitet in Mineralien vor. Im menschlichen Organismus wird es nicht in signifikanten Mengen angetroffen. Unter den Biomaterialien nimmt Titan hingegen eine besondere Stellung ein. Es gilt als eines der biokompatibelsten Werkstoffe überhaupt (Albrektsson et al. 1985, Seite 97). Wegen seiner mechanischen Eigenschaften und der ausgeprägten Bioverträglichkeit wird es als Werkstoff für Langzeitimplantate in der Orthopädie, z. B. als Hüftgelenksprothese, in der rekonstruktiven Chirurgie, in der zahnärztlichen Implantologie und für medizinische Instrumente verwendet. Seine außerordentliche Biokompatibilität verdankt Titan seiner dünnen, stabilen Oxidschicht, mit der es sich an der Luft oder in wässrigen Medien umgibt und die das Metall vor weiterer Korrosion schützt. Bisher sind keine allergischen Reaktionen oder andere schädliche Wechselwirkungen des Titans mit Zellen oder Geweben bekannt (Brunette et al. 2001, Seite 221).

#### **1.4 Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit war es, den nicht viralen Gentransfer mit einer Gen-Aktivierten Matrix in Verbindung mit einem metallischen Trägermaterial und einer biodegradierbaren Poly-D-/-L-Laktidbeschichtung zu etablieren, sodass das Plasmid des Wachstumsfaktors BMP-2 integriert und damit am Wirkort freigesetzt werden kann. Die Genvektorkomplexe wurden aus der pDNA, PEI(25) und dem schützenden Hüllpolymer P6YE5C (N/P Ratio 8) hergestellt, lyophilisiert und in eine organische Polymerlösung eingearbeitet. *In vitro* soll eine Expression transfizierter Zellen nachgewiesen werden.

Zu diesem Zweck wurde in einem ersten Schritt eine geeignete Methode entwickelt, um metallische Trägerplatten mit den Genvektorkomplexen zu beschichten. Dabei waren die Eigenschaften der einzelnen Bestandteile zu berücksichtigen, um nach der Herstellung der Formulierung optimale Transfektionseffizienzen zu erreichen. Anhand des Markergens Luciferase wurde eine reproduzierbare Beschichtungsmethode etabliert. Bei der Übertragung der Methode der Beschichtung auf den Wachstumsfaktor BMP-2 sollte die Transfektionseffizienz der geschützten Genvektorkomplexe im zeitlichen Verlauf untersucht werden. Außerdem galt es, verschiedene Plasmidkonzentrationen von BMP-2 hinsichtlich der Expressionshöhe zu analysieren.



## **2. Etablierung der Beschichtungsmethode**

### **2.1 Expressionsnachweis aus COPROG<sub>Luciferase</sub>-Poly-D-/-L-Laktid-beschichteten Aluminiumfolien**

In zahlreichen Studien konnte eine Expression von Wachstumsfaktoren aus biodegradierbaren Oberflächen nachgewiesen werden (Basarkar et al. 2007, Seite 250; Deppe et al. 2002, Seite 197; Schmidmaier et al. 2002, Seite 816, Schmidmaier et al 2001a, Seite 341). Polyethylenimin wird in der Gentherapie mit Erfolg als Gerüstpolymer für synthetische kationische Polymervektoren eingesetzt. Es ist bekannt, dass PEI hohe Transfektionsraten erzielt (Boussif et al. 1995, Seite 7299, Kircheis et al. 2001, Seite 343). In vivo konnte mit PEI-DNA Komplexen in einem biodegradierbaren PLGA-Gerüst eine effiziente Transfektion von Zellen in vivo erreicht werden (Huang et al. 2005, Seite 615). Zusätzliche Stabilität der Genvektorkomplexe generiert das Hüllpolymer P6YE5C (Scherer et al. 2002, Seite 634). Es ist ein Verfahren zu entwickeln, das die Vorteile aller Komponenten in einer geeigneten Beschichtungsmethode vereint. Mögliche Interaktionen müssen berücksichtigt werden, um die nötige Funktionalität der einzelnen Matrixbestandteile zu gewährleisten. In die Oberflächenbeschichtung eingearbeitete Wirkstoffe werden kontinuierlich freigesetzt; die Elution aus Poly-D-/-L-Laktid erfolgt hauptsächlich durch Diffusion (Heller 1996, Seite 346). Die auf die Oberfläche aufgebrauchte Wirkstoffmenge ist von der Beschichtungsdicke und der Implantatoberfläche abhängig (Gollwitzer 2002, Seite 55). Die Genvektorkomplexe wurden lyophilisiert und mittels eines handelsüblichen Glaspotter mit dem Poly-D-/-L-Laktid vermischt. Nach Abdampfen des organischen Lösungsmittels bilden sich auf den Aluminiumfolien Gen-Aktivierte Polymerfilme aus Poly-D-/-L-Laktid. Nach Besiedelung mit 3T3-Zellen führt die Gen-Aktivierte Matrix zur Expression des Transgens. Die gemessene Expression der beschichteten Aluminiumfolien mit den geschützten Genvektoren aus PEI 25 und P6YE5C (N/P Ratio 8) zeigt, dass Konstrukte der Gefrier Trocknung und der mechanischen Belastung durch das Homogenisieren standhalten. Es konnte über sechs Tage eine Expression gemessen werden, die höchste Expression war nach 48 Stunden nachweisbar.

Die z. T. gering positiven Messergebnisse in den Kontrollgruppen an den Tagen 1-3 können mit einem verunreinigten Lysepuffer erklärt werden. Ab dem vierten Tag wurde ein frischer Lysepuffer verwendet, und in den Kontrollgruppen war keine Expression nachweisbar.

Im ersten Versuch zur Etablierung der Methode diente Luciferase als Reportergen im Sinne eines Modellplasmids, womit die Theorie eines Beschichtungsverfahrens praktisch umgesetzt wurde.

In vielen Veröffentlichungen werden Reportergene beschrieben, die unter Kontrolle des zu charakterisierenden Promotors exprimiert werden (De Wet et al. 1987, Seite 725; Di Lella et al. 1988, Seite 4159; Finsinger et al. 2000, Seite 1188). Neben gewebs- oder spezie fremden Genen (BMP-2), deren Expressionsmuster zum Beispiel mit Antikörpern bestimmt werden können, existieren außerdem Gene, die durch Enzyme codiert werden.

Luciferase wird durch die Luciferase der Feuerfliege *Photinus pyralis* (Di Lella et al. 1988, Seite 4159) codiert. Luciferase produziert in der Gegenwart von ATP-molekularem Sauerstoff und Luciferin, einem heterocyclischen Carboxylat, sichtbares Licht (De Wet et al. 1987, Seite 725). Die Lichtemission kann man in einem Luminometer messen. Die Vorteile der Luciferase als Reporter gen sind Sensitivität und eine relativ gute Quantifizierbarkeit. Als nachteilhaft erweist sich, dass man mit Geweben oder Zellhomogenaten arbeitet und deshalb keine zelltypspezifische Expression nachweisen kann.

## **2.2 Expressionsnachweis aus COPROG<sub>BMP-2</sub>-Poly-D-/-L-Laktid-beschichteten Aluminiumfolien**

In einer zweiten Versuchsreihe wurde das Verfahren auf das Bone morphogenetic protein 2 übertragen. Das Prinzip der Formulierung der Genvektorkomplexe und die Beschichtung der Aluminiumfolien wurden aus dem ersten Versuch übernommen. Zusätzlich sollte der Einfluss der Plasmidkonzentration auf die Expressionshöhe beleuchtet werden. Wie schon im ersten Versuch mit dem Reporter gen Luciferase, zeigte sich das Maximum der Expression von BMP-2 nach ca. 48 Stunden, danach wurde ein Abfall der Expression bis zu Tag 7 gemessen. Die Expression in der Gruppe mit 0,2 % DNA<sub>BMP-2</sub>/R203 w/w, 10 µg BMP-2-Plasmid blieb unter der therapeutischen Grenze. Die Ergebnisse ließen durchaus eine Abhängigkeit der eingesetzten DNA-Menge zu der gemessenen Expression zu. Es konnte bei den hier exemplarisch verwendeten, leicht transfizierbaren 293 Zellen (DSMZ Nr: ACC305) mit steigender DNA-/R203-Konzentration eine gesteigerte Expression gemessen werden. Bei einer Verdopplung des DNA-/R203-Verhältnisses von 0,1 % DNA/R203 w/w auf 0,2 % DNA/R203 w/w konnten in den ersten Tagen zum Teil zehnfach höhere Expression von BMP-2 bei der höheren Konzentration nachgewiesen werden. Die nochmalige Verdopplung der Konzentration offenbarte einerseits weiter steigende Expressionen, aber auch einen geringfügig schnelleren Abfall der Expression.

In der Schlussfolgerung und Auswertung der Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass auch beim nicht viral, mittels copolymer protected gene vector vermittelten Gentransfer in Verbindung mit Poly-D-/-L-Laktid bis zu einem bestimmten Niveau eine Abhängigkeit der Konzentration zwischen DNA/R203 und der Expression der gebildeten DNA besteht.

## **3. Einfluss des Homogenisierens der COPROG<sub>DNA</sub>-Poly-D-/-L-Laktidlösung auf die Expression**

Im Verlauf der Untersuchungen nahm der Arbeitsschritt des Vermischens der hergestellten COPROGs- und der Poly-D-/-L-Laktidlösung eine Schlüsselposition ein. Aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften sind die copolymer protected gene vectors nicht löslich. Dadurch

können sie mit der Poly-D-/L-Laktidlösung nur so vermischt werden, dass die COPROGs in der Flüssigkeit annähernd homogen verteilt sind.

Um die copolymer protected gene vectors homogen in die Beschichtungslösung einzubringen, wurde die Lösung mit einem handelsüblichen Glashomogenisator dispergiert. Auf diese Weise sollte sichergestellt werden, dass die COPROGs gleichmäßig in der Lösung verteilt sind und dadurch auch mehrere Folien mit annähernd gleicher Konzentration beschichtet werden können.

Vorteil des Glashomogenisators ist in erster Linie sein Material, denn Glas wird von dem Lösungsmittel nicht angelöst. Deshalb wurde dieses Gerät in den ersten Versuchen verwendet und damit auch eine Genexpression *in vitro* erzielt.

Bei der Anwendung des Glashomogenisators fielen indes einige Nachteile auf:

1. Durch exakte Passung des Glasstößels mit der Innenseite konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die COPROG-Partikel bei dem Vorgang des Homogenisierens zerstört oder zumindest beschädigt wurden.
2. Während der Lyophilisation der copolymer protected gene vectors kam es zu elektrostatischen Aufladungen, wodurch bei Abnahme der bedeckenden sterilen Aluminiumfolie unter der Sterilbank einige COPROGs aus dem Homogenisator herausgewirbelt wurden. Dies führte zu einer Veränderung der Konzentration. Es konnte ferner beobachtet werden, dass sich einige COPROGs an der als Deckel dienenden Aluminiumfolie sammeln und dadurch ebenfalls die Konzentration verfälscht wurde.
3. Durch die Verwendung des nicht verschließbaren Glashomogenisators während der Herstellung der Poly-D-/L-Laktid-COPROG-Beschichtungslösung kam es zu einer nicht vermeidbaren Verflüchtigung des Lösungsmittels und damit zu einer unkontrollierbaren Verschiebung der Konzentration und Viskosität.
4. Da für Versuchsgruppen mit verschiedenen DNA-Konzentrationen die Herstellung der COPROGs in einem gesonderten Homogenisator erfolgte, mussten für umfangreiche Versuche genügend Homogenisatoren zur Verfügung stehen oder die Versuche zeitlich versetzt durchgeführt werden.
5. Ebenfalls als problematisch erwies sich bei mehrfachem Gebrauch der Glashomogenisatoren die Reinigung. Auch bei intensiver Reinigung der Innenseiten und anschließender Sterilisation konnte nicht ausgeschlossen werden, dass sich noch Reste von alter Beschichtungslösung in dem Glashomogenisator befinden.

Die verschiedenen Nachteile des Glashomogenisators bedingten die Konstruktion des modifizierten Homogenisators.

Grundlage für die Konstruktion ist ein 15-ml-Kulturröhrchen, für das ein passender Teflonstößel gefertigt wurde. Anders als beim Glashomogenisator, zeigte das modifizierte Gerät keine exakte

Passung des Teflonstößels an der Tubeinnenseite. Der zirkuläre Randspalt beträgt ca. 250 µm. So sollte sichergestellt werden, dass die COPROGs beim Vorgang des Homogenisierens nicht beschädigt werden. Ein wesentlicher Vorteil war die Verwendung handelsüblicher 15-ml-Kulturröhrchen. Damit konnte die Herstellung der COPROGs stets in einem neuen, sterilen Tube erfolgen, der dann als Homogenisator weiterverwendet werden konnte. Nach Gebrauch war das Tube zu entsorgen. Probleme und verfälschte Ergebnisse durch Rückstände alter Beschichtungslösungen sind somit auszuschließen.

Beide Systeme wurden hinsichtlich ihrer Verwendung und der erreichbaren Expressionshöhe getestet, um den optimalen Gebrauch zu ermitteln. Bei der Verwendung des modifizierten Homogenisators fiel auf, dass sich beim Lyophilisieren die COPROGs am Tubeboden und im unteren Drittel der Seitenwände sammeln. Verwirbelungen beim Abnehmen des Deckels oder auffallende Mengen von COPROGs am Deckel offenbarten sich nicht.

Generell konnte gezeigt werden, dass mit dem eigens modifizierten Homogenisator höhere Expressionen und geringere Schwankungen der Einzelwerte erzielt werden können. Dies bestätigte die Annahme, dass durch den Glashomogenisator die COPROGs z. T. beschädigt wurden.

Zwar wurden auch bei unterschiedlichem Gebrauch mit dem Glashomogenisator hohe Expressionen nachgewiesen, doch sind hier nur einzelne Werte im Vergleich zum Mittelwert erhöht. Es kann von einer inhomogenen Durchmischung der Beschichtungslösung ausgegangen werden.

Ein Hauptproblem bei der Beschichtung bildete die Flüchtigkeit des Lösungsmittels. Durch das Abdampfen des Ethylacetats verändern sich Konzentration und Viskosität der Beschichtungslösung. Die Verwendung verschließbarer Reaktionsgefäße bei der Herstellung der Poly-D-/L-Laktidlösung bot eine Möglichkeit, dieses Problem zu minimieren.

Bei der Herstellung des modifizierten Homogenisators wurde dieses Problem berücksichtigt und der Homogenisator so konstruiert, dass er mittels Schraubverschluss verschlossen werden konnte. Auf diese Weise erfolgte eine nochmalige Reduzierung der Menge des verdampfenden Lösungsmittels.

#### **4. Analyse der Beschichtungsmethode mit COPROG<sub>BMP-2</sub> unter Berücksichtigung verschiedener Plasmidkonzentrationen**

Da eine zu geringe DNA-Konzentration an der Zelloberfläche die Effizienz des Gentransfers limitieren kann (Luo und Saltzman 2000, Seite 893), wurde dessen ungeachtet der Einfluss der Menge von den COPROG<sub>BMP-2</sub> auf die Höhe der Expression untersucht. Auch im zweiten Versuch mit BMP-2 nach vorab getestetem Protokoll mit dem entwickelten Homogenisator zeigte sich eine Abhängigkeit der Konzentration auf die Expressionshöhe. Allerdings wurden hier die höchsten Expressionen mit der geringsten eingearbeiteten Plasmidmenge (10 µg pDNA) gemessen.

Wang et al. (1993, Seite 647) beschrieben, dass eine dosisabhängige Zunahme der Osteokonduktion mit BMP-2 besteht. Zeguzula et al. (1997, Seite 1786) konnten eine dosisabhängige Heilung von Knochendefekten nachweisen, die mit porösen PDLLA-Implantaten und rhBMP-2 behandelt wurden.

So konnten in diesem Versuch der Arbeit nach 24 Stunden Expressionen von BMP-2 über 18000,0 pg/ml nachgewiesen werden. Nach 48 Stunden waren in der gleichen Gruppe noch 8000 pg/ml nachweisbar.

Als Voraussetzung für die Induktion von Knochengewebe im Organismus bedarf es pluripotenter, undifferenzierter Vorläuferzellen. Für die Ossifikation ist die Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten erforderlich. Ohne die dafür notwendigen pluripotenten mesenchymalen Stammzellen, die im erwachsenen Organismus als Ursprungszellen nur noch in sehr geringer Anzahl vorhanden sind, kann eine Knocheninduktion nicht erfolgen. Um mesenchymale Stammzellen im Körper an den Wirkort zu bringen, muss ein entsprechend starker chemotaktischer Stimulus von den BMPs ausgehen. Diese Grenze, bei der eine entsprechende therapeutische Wirkung erzielt wird, wird für den Wachstumsfaktor BMP-2 mit 1000 pg beschrieben. Untersuchungen belegen, dass das Ausmaß der Knochenbildung von der Menge des implantierten rhBMP-2 abhängig ist (Kübler 1997, Seite 16). Inwieweit die Expressionshöhen, die mit diesem In-vitro-Versuch nachgewiesen wurden, auch in vivo erzielt werden und einen entsprechend chemotaktischen Anreiz für die mesenchymalen Stammzellen bilden, kann als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen. Als Vorteil kann deshalb neben der kontinuierlichen Freisetzung von BMP-2 auch die verglichen mit der direkten Applikation des Proteins wesentlich geringere erforderliche Menge an BMP-2 gewertet werden, da die Zellen das BMP-2 selbst bilden.

Auffallend in fast allen Versuchsgruppen ist ein Abfall der BMP-2-Expression nach 72 Stunden (am dritten Tag). Von Felgner und Ringold (1989, Seite 387) wurde postuliert, dass zur Einschleusung der DNA in den Zellkern die Phasen im Zellzyklus, in denen keine Kernmembran vorliegt, ausgenutzt werden können. Da dies lediglich während der Mitose der Fall ist, sollte sich für eine erfolgreiche nicht virale Transfektion eine möglichst hohe Zahl der kultivierten Zellen in der Proliferationsphase befinden. Bezug nehmend auf den starken Einbruch der Expression, kann vermutet werden, dass sich ab dem dritten Tag die Menge an teilungsfähigen Zellen stark reduziert hat. Unterstützt wird diese These dadurch, dass in den Folgetagen keine hohe Expression von BMP-2 mehr nachgewiesen werden kann, aber eine deutlich geringere Restexpression vorhanden ist.

Eine mikroskopische Kontrolle der Zellen war aufgrund der Titanfolien nicht möglich. Eine quantitative Bestimmung der Zellzahl wurde nach Versuchsende nicht durchgeführt. Dementsprechend könnte eine genauere Betrachtung der Zellen während der Transfektion mittels COPROGs, aber auch die Interaktionen zwischen den Zielzellen und der Polymerbeschichtung im Hinblick auf die Transfektionseffizienz Grundlage weiterführender Versuche sein (Lee et al. 2008, Seite 145).

In dieser ersten orientierenden Versuchsreihe mit HEK 293 Zellen (DSMZ Nr: ACC305) mit steigender DNA-Konzentration und entsprechenden Polylaktidkonzentrationen wurden höhere Schwankungen im Verlauf der Expressionen beobachtet. In anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Trägersubstanzen in der Lage sind, aufgrund deren Freisetzungseigenschaft die

Wirkungsweise der BMPs zu verändern (Cochran et al. 1997, Seite 739; Terheyden et al. 1997, Seite 272). Die Freisetzung aus der Poly-D-/L-Laktidlösung wird beeinflusst durch die Polymerstruktur und Hydrolyserate. Geht man davon aus, dass die Abgabe von Genvektoren ausschließlich über die Grenzflächen der Polymerschicht stattfindet, bleiben Genvektoren in tieferen Schichten formuliert und werden erst nach der Hydrolyse des Poly-D-/L-Laktid freigesetzt. Beobachtet wurde ein Abfall der Freisetzung der Genvektorformulierung bei steigenden Genvektorkonzentrationen. Weitere Untersuchungen könnten der Frage nachgehen, ob über die Konzentration des Polylaktids die Freisetzung beeinflusst werden kann.

Da mit steigender Polylaktidkonzentration die Dicke und Viskosität der Beschichtung zunehmen, ist einerseits zu vermuten, dass die COPROG-Partikel tiefer in die Beschichtung eingebettet waren bzw. sich am Boden der Folie sammeln, sodass die Freisetzung unvollständig und diskontinuierlich erfolgt. Andererseits kann durch die verzögerte Freisetzung angenommen werden, dass die copolymer protected gene vectors erst nach anfänglicher Hydrolyse bzw. Quellung der Trägersubstanz an die Zielzellen gelangen und damit eine verzögerte Transfektion stattfindet. Der Abbauprozess des Polymers gliedert sich in drei Teilschritte. Im ersten Schritt nimmt das Polymer Wasser auf und quillt, im zweiten Schritt entstehen bei der Spaltung der Esterbindungen Karbonsäuregruppen, welche die Hydrolyse autokatalysieren. Schließlich kommt es zu einem Verlust der mechanischen Stärke (Lendlein 1999, Seite 279). Es wird beschrieben, dass es nach zwölf bis 16 Wochen zum vollständigen Abbau des Poly-D-/L-Laktids kommt (Wu 1995, Seite 1015).

Im Hinblick auf die in der vorliegenden Arbeit hohe Expression von BMP-2 am ersten und zweiten Tag und der starken Abnahme der Expression nach 48 Stunden kann ebenfalls diskutiert werden, dass die COPROG-Formulierungen an der Oberfläche der Polylaktidbeschichtung eingebettet waren und so nach der Hydrolyse der oberflächlichen Schicht komplett freigesetzt wurden.

Die höchste Expression wurde in der Versuchsgruppe mit der geringsten Plasmidkonzentration (0,2% DNA/R203w/w) gemessen. Die schlechtere Expressionsrate in der Versuchsgruppe mit der höheren Plasmidkonzentration (0,4% DNA/R203w/w) kann damit begründet werden, dass sich bei einer eventuellen kompletten Freisetzung der COPROG<sub>BMP-2</sub> aus der Poly-D-/L-Laktidlösung das COPROG<sub>BMP-2</sub> in hohen Dosen toxisch auf das Zellwachstum und damit negativ auf die Transfektionseffizienz auswirkt. Eine nochmalige Verdopplung der Plasmidkonzentration (0,8% DNA/R203w/w) zeigt eine weitere Verringerung der Expression von BMP-2.

Beim Bone morphogenetic protein handelt es sich um ein hoch potentes, sogenanntes morphogenetisches, d. h. gestaltbildendes Hormon. Knochenmorphogenetische Proteine sind pleiotrope, knocheninduzierende Wachstumsfaktoren der TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor-beta)-Superfamilie (Wozney et al. 1988, Seite 1528), die Schlüsselfunktionen in der Zelle wie Chemotaxis, Mitose und Differenzierung regulieren (Reddi 1995, Seite 115). Bei hohen BMP-2-Konzentrationen überwiegen die ungünstigen pharmakologischen Wirkungen über den gewünschten physiologischen Effekten (Marukawa et al. 2001, Seite 452).

Deshalb erscheint ebenfalls eine kritische Betrachtung der Nebenwirkungen sinnvoll. So kann BMP-2, sollte es in die Blutbahn gelangen, auch an anderen Stellen des Körpers unerwünschte Wachstumsimpulse auslösen oder den Stoffwechsel negativ beeinflussen. Es sollte stets bedacht werden, dass das natürliche BMP im Körper rasch abtransportiert oder abgebaut wird (Kübler 1997, Seite 15). Durch diesen Abtransport bleiben die gewünschten Wirkungen wie auch die unerwünschten Nebenwirkungen nicht lokal begrenzt und es kann zu systemischen Veränderungen kommen. Auch deshalb erscheint es sinnvoll, ein System zu entwickeln, bei dem durch minimale Dosen die größtmögliche Wirkung erzielt werden kann, womit systemische Veränderungen ausgeschlossen werden können.

Zahlreichen Studien (Bax et al. 1999, Seite 83; Kandziora et al. 2002, Seite 482; Kübler et al. 1998, Seite 871; Marukawa et al. 2001, Seite 452; Schmidmaier et al. 2002, Seite 816; Seto et al. 2001, Seite 53; Weber et al. 2002, Seite 60; Yasko et al. 1992, Seite 659; Zegzula et al. 1997, Seite 1778) konnten in unterschiedlichen Untersuchungen nachweisen, dass das Bone morphogenetic protein 2 die Knochenheilung beschleunigen kann.

Der zeitliche Verlauf der Freisetzung von BMP-2 ist ein wichtiger Faktor in Bezug auf seine Effizienz. Untersuchungen ergaben, dass während der Frakturheilung das BMP-2 innerhalb der ersten ein bis zwei Wochen freigesetzt wird (Kitazawa et al. 1998, Seite 231). Deshalb wird im Hinblick auf den In-vivo-Einsatz ein System benötigt, welches das BMP-2 über mehrere Tage freisetzt und so die natürliche Expression von BMP-2 simuliert.

Weber et al. (2002, Seite 60) zeigten bei Untersuchungen mit BMP-2 in Verbindung mit einem biodegradierbaren Polylaktid eine langsame und kontinuierliche Freisetzung von (rh)BMP-2.

Einen entscheidenden Unterschied zu den vorher genannten Studien in der hier vorgelegten Untersuchung verkörpert der nicht virale Gentransfer. Durch die Einarbeitung des BMP-2-Plasmids in Hüllpolymer-geschützte Komplexe und in eine Poly-D-/L-Laktidbeschichtung wurden 293 Zellen (DSMZ Nr: ACC305) transfiziert, d. h., die DNA-Sequenz für das Bone morphogenetic protein 2 wurde in die Zelle und dann weiter in den Zellkern geschleust. Dadurch sind die Zellen in der Lage, das BMP-2 zu bilden.

## **5. Klinische Relevanz**

In der Entwicklung eines nicht viralen Gentransfers von BMP-2 zur Beschichtung von Oberflächen liegen Vorteile gegenüber herkömmlichen Verfahren, in denen das BMP-2 ungeschützt appliziert wird.

Brånemark (1983, Seite 399) zeigte, dass die Langzeitprognose eines Implantats unter Funktion von seiner knöchernen Integration abhängt. Das Ziel des Einsatzes von Wachstumsfaktoren und des BMP-2 in der Chirurgie besteht in der Verbesserung und Beschleunigung des Knochen-Implantat-Kontaktes. Zukünftige Ziele können in der Verbesserung der periimplantären Knochenqualität und

möglicherweise auch in der Reosseointegration nach Periimplantitis existieren (Hanisch et al. 1997, Seite 604).

Bereits mit der Verwendung von natürlichen BMPs wurden qualitativ die Beschleunigung und Verbesserung der Implantateinheilung in experimentellen Untersuchungen und am Patienten demonstriert (Wang et al. 1993, Seite 647; Wang et. al 1994, Seite 115; Yan et al.1994, Seite 289). Diese Ergebnisse wurden später ebenfalls mit rekombinantem BMP bestätigt (Cook et al. 1995, Seite 281). Durch Induktion osteogener Zellen mittels BMP kommt es zur Hartgewebsbildung. Osteoblasten benötigen eine feste Unterlage, an die sie Hartschubstanz anbauen. Startpunkte der Substanzbildung können Titanimplantate oder Knochenersatzmaterialien darstellen, die eine Knochenneubildung bewirken. Diese Interaktion der induzierten Osteoblasten mit den Implantatoberflächen findet lediglich bei gleichzeitiger Insertion der Implantate und BMP-Applikation statt. Der mit dieser Abhandlung vorgestellte nicht virale Gentransfer mittels copolymer protected gene vectors zeigte eine erfolgreiche und vielversprechende Freisetzung von BMP-2 in vitro.

Das System kann an unterschiedliche Implantatstrukturen angepasst werden. Für effektiven Gentransfer ist eine individuelle Optimierung der Versuchsparameter essenziell. Polymer-Art und -Menge sowie die Genvektorkonzentration repräsentierten zentrale Stellschrauben der Systemoptimierung. In zahlreichen Studien wird das Potenzial einer Oberflächenaktivierung medizinischer Implantate in vielversprechenden Konzepten unter Verwendung unterschiedlicher Trägermaterialien für oberflächenvermittelten Gentransfer eingesetzt (Dang und Leong 2006, Seite 487; Jang et al. 2004, Seite 127; Nie und Wang 2007, Seite 111; Storie und Mooney 2006, Seite 502). Der Einsatz von Genvektoren als Matrixzusätze für die Expression gewünschter Wundheilungsmediatoren stellt eine Alternative für die lokale Bereitstellung bioaktiver Substanzen dar. Durch Variationen der eingesetzten Nucleinsäuren können therapeutische Effekte durch gezielte Auswahl eines Transgens der entsprechenden Indikation angepasst werden. Mögliche Interaktionen müssen berücksichtigt werden, um die nötige Funktionalität der einzelnen Matrixbestandteile zu gewährleisten. Die in der vorgestellten Arbeit beschriebene Formulierungsstrategie erfordert die Lyophilisierbarkeit der Genvektor-Formulierung, um eine applikationsgerechte Darreichungsform zu gewährleisten, sowie die Beständigkeit in einem organischen Lösungsmittel. Nach Formulierung als genaktivierte Biomaterialien müssen Genvektoren für Zielzellen verfügbar sein, damit es zur erforderlichen lokalen Expression gewünschter Substanzen kommt. Einzelne Veränderungen im komplexen Verbund aus Matrixstrukturen, Genvektoren und Zielzellen können den Erfolg oder Misserfolg beeinflussen (De Laporte und Shea 2007, Seite 302; Mooney und Vandenburgh 2008, Seite 210). Die Versuchsansätze dieser Dissertation mit variierenden Genvektor- und PDLLA Konzentrationen zeigen, wie empfindlich und beeinflussbar ein derartiges System ist und wie dicht Erfolg und Misserfolg zusammenliegen. Im Hinblick auf eine spätere Übertragbarkeit auf eine klinische Anwendung kann das hier erprobte System als viel versprechend bezeichnet werden.



Gekoppelt mit den Vorteilen des nicht viralen Gentransfers, der hohen Transfektionseffizienz der Hüllpolymer-geschützten Polyplexe gegenüber ungeschützten Vektoren und den Vorteilen der biodegradierbaren Poly-D-/L-Laktidbeschichtung, ist es mehr als folgerichtig, dieses Verfahren in vivo zu testen.

Im Hinblick auf einen kommerziellen Einsatz einer genaktivierten Matrix stellt die Beschichtung von metallischen Oberflächen ein vielversprechendes Behandlungskonzept dar. Aufgrund kontrollierbarer Matriceigenschaften eignen sich synthetische Biomaterialien gut als „drug delivery systems“. Die lokale Bereitstellung von BMP-2 kann die Geweberegeneration entscheidend verbessern.

## V. Zusammenfassung

In zahlreichen In-vitro- und In-vivo-Studien konnte für das Bone morphogenetic protein 2 ein gesteigertes Potenzial zur Förderung der Knochenheilung gegenüber anderen osteoinduktiven Wachstumsfaktoren beschrieben werden.

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit bestand in der Etablierung des nicht viralen Gentransfers aus einer resorbierbaren Oberfläche für das Plasmid des Wachstumsfaktors BMP-2. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Methode zur stabilen Beschichtung metallischer Oberflächen entwickelt und in vitro getestet.

Für diese Beschichtungstechnologie wurde ein modifizierter Homogenisator entwickelt und wurden die Expressionen nach Zellbesiedlung mit einem handelsüblichen Glaspotter verglichen. Hierzu wurde das Reportergen Luciferase verwendet und mit Polyethylenimin komplexiert, das mit einem Hüllpolymer, dem Polyethylenglycol Copolymer (P6YE5C), zusätzlich zum Schutz ummantelt wurde. In dem Glas- bzw. modifizierten Homogenisator wurden die COPROGs<sub>Luciferase</sub> mit Poly-D-/L-Laktid nach verschiedenen Protokollen dispergiert und damit zunächst Aluminiumfolien (Ø16 mm) beschichtet. Die Expressionen wurden zwei Tage nach Zellzugabe gemessen. Im Ergebnis zeigte sich eine 2,5-fach höhere Expression bei Verwendung des modifizierten Homogenisators gegenüber dem konventionellen Glaspotter.

Im zweiten Teil der Studie wurde dieses Verfahren auf das Plasmid des Wachstumsfaktors BMP-2 übertragen, das in E. coli exprimiert, anschließend mit Polyethylenimin komplexiert und analog zum Vorversuch mit dem Polyethylenglycol Copolymer (P6YE5C) ummantelt wurde. Diese Partikel wurden durch das in den ersten Versuchen ermittelte Protokoll durch ein speziell entwickeltes Verfahren in das biodegradierbare Poly-D-/L-Laktid (Resomer R203<sup>®</sup>) unter aseptischen Bedingungen resuspendiert. Mittels Kaltbeschichtungstechnologie wurden Titanfolien (Ø16 mm) mit je 100 µl Lösung in verschiedenen DNA-/R203-Konzentrationen zur Ermittlung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung beschichtet.

In-vitro-Untersuchungen zur Expression mit 293 Zellen (DSMZ Nr: ACC305) demonstrierten eine nicht lineare Abhängigkeit von der DNA<sub>BMP-2</sub>/R203-Konzentration. Nach 24 Stunden konnten mittels BMP-2 ELISA konzentrationsabhängig Expressionen von bis zu 18435,77 pg/ml gemessen werden, die über eine Versuchsdauer von 14 Tagen feststellbar waren.

Diese Beschichtungstechnologie in Verbindung mit dem nicht viralen Gentransfer könnte ein neuer therapeutischer Ansatz in der rekonstruktiven Knochenchirurgie sein, um durch körpereigene Zellen das Protein BMP-2 lokal und kontrolliert bilden zu lassen, wodurch eine beschleunigte Knochenheilung erreicht werden kann. Weitere In-vitro-Studien mit anderen Zielzellen sowie In-vivo-Untersuchungen sind dazu noch notwendig.

## VI. Summary

The great osteoinductive potential of bone morphogenetic protein 2 compared to other growth factors has been proved in numerous studies.

The primary goal of this research work was to establish the non-viral gene transfer with the plasmid of BMP-2 out of a biodegradable surface. In the first step, a metallic surface coating method was developed and tested in vitro.

For this surface coating method, a modified homogenizer was designed and the expression rate after seeding with cells was compared with a conventional homogenizer. Hereunto, the reporter gene Luciferase was used which was complexed with Polyethylenimin and additionally covered by Polyethylenglycol Copolymer (P6YE5C) for additional protection.

The COPROGS<sub>Luciferase</sub> were dispersed with Poly-D-/L-Laktid in an conventional glass homogenizer respective in an modified homogenizer and then coated onto alloy foils (Ø 16 mm). The gene expression was measured two days after seeding. The modified homogenizer lead to a 2.5 times higher expression compared to the conventional glass homogenizer.

In the second part of the thesis, this method was developed for the plasmid of the growth factor BMP-2. The BMP-2 Plasmid was expressed in E. coli and afterwards renaturated. The rhBMP-2 was complexed with Polyethylenimin and then covered by the Polyethylenglycol Copolymer (P6YE5C).

On the lines of the protocol of the first trials these particles were incorporated into a biodegradable Poly-D-/L-Laktid (Resomer R203<sup>®</sup>) under aseptic conditions. In a cold coating technique titanium foils (Ø16 mm) were then covered with 100 µl solution of different DNA-/R203-concentrations each.

In vitro tests of the expression with 293 cells (DSMZ Nr: ACC305) showed a unlinear dependency upon the DNA<sub>BMP-2</sub>/R203-concentration. After 24 hours a BMP-2 expressions of up to 18435,77 pg/ml could be measured by the BMP-2 ELISA test. An expression was detectable over a period of 14 days.

This cold coating technique in combination with the non-viral gene transfer might be a new therapeutic approach in bone regeneration; an accelerated bone healing could be achieved by promoted human cells producing BMP-2.

For this purpose further in vitro studies with different target cells as well as in vivo tests are necessary.

## VII. Literatur

- ABE E., YAMAMOTO M., TAGUCHI Y., LECKA-CZERNIK B., O'BRIEN C. A., ECONOMIDES A. N., STAHL N., JILKA R. L., MANOLAGAS S. C. (2000)  
Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in Murine Bone Marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin.  
*J Bone Miner Res* 15(4): 663-673.
- ABIRAMAN S., VARMA H. K., UMASHANKAR P. R. JOHN A. (2002)  
Fibrin glue as an osteoinductive protein in a mouse model.  
*Biomaterials* 23 (14): 3023-3031.
- AKIZUKI S., YASUKAWA Y., TAKIZAWA T. (1997)  
A new method of hemostasis for cementless total knee arthroplasty.  
*Bull Hosp Jt Dis* 56(4): 222-224.
- ALBREKTSSON T., HANSSON H. A., IVARSSON B. (1985)  
Interface analysis of titanium and zirconium bone implants  
*Biomaterials* 6(2): 97-101.
- ALBREKTSSON T., JOHANSSON C. (2001)  
Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration.  
*Eur Spine J* 10, Suppl. 2: 96-S101.
- ALDEN T. D., PITTMAN D. D., HANKINS G. R., BERES E. J., ENGH J. A., DAS S., HUDSON S. B., KERNS K. M., KALLMES D. F., HELM G. A. (1999)  
In vivo endochondral bone formation using a bone morphogenetic protein 2 adenoviral vector.  
*Hum. Gene Ther.* 10: 2245-2253.
- ALTON E. W., STERN M., FARLEY R., JAFFE A., CHADWICK S. L., PHILLIPS J., DAVIES J., SMITH S. N., BROWNING J., DAVIES M. G., HODSON M. E., DURHAM S. R., LI D., JEFFERY P. K., SCALLAN M., BALFOUR R., EASTMAN S. J., CHENG S. H., SMITH A. E., MEEKER D., GEDDES D. M. (1999).  
Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: a double-blind placebo-controlled trial. *Lancet* 353(9157): 947-54.
- ASPENBERG P., LOHMANDER L. S. (1989)  
Fibroblast Growth Factor Stimulates Bone Formation. Bone Induction Studied in Rats.  
*Acta Orthop Scand* 60: 473-476.
- ATHANASIOU K. A., AGRAWAL C. M., BARBER F. A., BURKHART S. S. (1998)  
Current concepts. Orthopaedic applications for PLA-PGA biodegradable polymers. *Arthroscopy* 14: 726-737.
- AWAD H. A., ZHANG X., REYNOLDS D. G., GULDENBERG R. E., O'KEEFE R. J., SCHWARZ E. M. (2007)  
Recent Advances in Gene Delivery for Structural Bone Allografts.  
*Tissue Engineering*: 13 (8) 1973-1985.
- BALTZER A. W., LATTERMANN C., WHALEN J. D., WOLLEY P., WEISS K., GRIMM M., GHIVIZZANI S. C., ROBBINS P. D., EVANS C. H. (2000)  
Genetic Enhancement of Fracture Repair: Healing of an Experimental Segmental Defect by Adenoviral Transfer of the BMP-2 Gene.  
*Gene Therapy* 7: 734-739.

- BASARKAR A., DEVINENI D., PALANIAPPAN R., SINGH J. (2007)  
 Preparation, characterization, cytotoxicity and transfection efficiency of poly(dl-lactide-co-glycolide) and poly(dl-lactic acid) cationic nanoparticles for controlled delivery of plasmid DNA.  
 International journal of pharmaceutics 343: 247-254.
- BAX B. E., WOYZNEY J. M., ASHHURST D. E. (1999)  
 Bone Morphogenetic Protein-2 Increases the Rate of Callus Formation After Fracture of the Rabbit Tibia.  
 Calcif Tissue Int 65: 83-89.
- BAYLINK D. J., FINKELMAN R. D., MOHAN S. (1993)  
 Growth factors to stimulate bone formation.  
 J. Bone Miner. Res. 8 Suppl 2: 565-72.
- BONADIO J., GOLDSTEIN S. A., LEVY R. J. (1998)  
 Gene Therapy for Tissue Repair and Regeneration.  
 Advanced Drug Delivery Reviews 33: 53-69.
- BONADIO J., SMILEY E., PATIL P., GOLDSTEIN S. (1999)  
 Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration.  
 Nat.Med. 5: 753-759.
- BONADIO J. (2000)  
 Tissue Engineering Via Local Gene Delivery.  
 J Mol Med 78: 303-311.
- BOSS J. H. (1999)  
 Osseointegration  
 J Long Term Eff Med Implants 9 (1&2): 1-10.
- BOUSSIF O., LEZOUALC'H F., ZANTA M. A., MERGNY M. D., SCHERMAN D., DEMENEIX B., BEHR J. P. (1995).  
 A versatile vector for gene and lignonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine.  
 Proc Natl Acad Sci U S A 92(16): 7297-301.
- BRANEMARK P. I. (1983)  
 Osseointegration and its experimental background.  
 J Prosthet Dent 50, No.3: 399-410.
- BROWN B. D., LILICRAP D. (2002)  
 Dangerous liaisons: the role of „danger“ signals in the immune response to gene therapy. Blood 100(4): 1133-40.
- BRUNETTE D. M., TENGVALL P., TEXTOR M., THOMSEN P. (2001)  
 Titanium in medicine. Material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications. Springer-Verlag, Berlin: 2001, ISBN: 3-540-66936-1.
- BRUNSKI J. B. (1999)  
 In vivo bone response to biomechanical loading at the bone/dental-implant interface.  
 Adv Dent Res 13: 99-119.
- CAMERON H. U., PILLIAR R. M., MACNAB I. (1973)  
 The effect of movement on the bonding of porous metal to bone.  
 J Biomed Mater Res 7: 301-311.

CAPLEN N. J., ALTON E. W., MIDDLETON P. G., DORIN J. R., STEVENSON B. J., GAO X., DURHAM S. R., JEFFREY P. K., HODSON M. E., COUELLE C., HUANG L., PORTEOUS D. J., WILLIAMSON R., GEDDES D. M. (1995)

Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis.  
*Nat Med* 1(1): 39-46.

CHU G.; HAYAKAWA H., BERG P. (1987)

Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA.  
*Nucl. Acids Res.* 15 (3): 1311-1326.

COCHRAN D. L., NUMMIKOSKI P. V., JONES A. A., MARKINS S. R., TUREK T. J., BUSER D. (1997)

Radiographic analysis of regenerated bone around endosseous implants in the canine using recombinant human bone morphogenetic protein-2.  
*Int J Oral Maxillofac Implants*; 12: 739-748.

COOK S. D., SALKELD S. L., RUEGER D. C. (1995)

Evaluation of recombinant human osteogenic protein-1 (rhOP-1) placed with dental implants in fresh extraction sites.  
*J Oral Implantol*; 21: 281-289.

COOKE H. (2001)

Mammalian artificial chromosomes as vectors: progress and prospects.  
*Cloning Stem Cells* 3(4): 243-9.

COTTEN M., LANGLE-ROUAULT F., KIRLAPPOS H., WAGNER E., MECHTLER K., ZENKE M., BEUG H., BIRNSTIEL M. L. (1990).

Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(11): 4033-7.

DANG J. M., LEONG K. W. (2006)

Natural polymers for gene delivery and tissue engineering.  
*Advanced Drug Delivery Reviews* 58: 487-499.

DAVIES J. E. (1996)

In Vitro Modeling of the Bone/Implant Interface.  
*Anat Rec* 245: 426-445.

DAVIES J. E. (1998)

Mechanisms of Endosseous Integration.  
*Int J Prosthodont* 11, No.5: 391-401.

DE LAPORTE L., SHEA L. D. (2007)

Matrices and Scaffolds for DNA Delivery in Tissue Engineering  
*Adv Drug Deliv Rev.* 59(4-5): 292-307.

DENG C. X., SIELING F., PAN H., CUI J. (2004)

Ultrasound-induced cell membrane porosity  
*Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol 30(4): 519-526.

DEPPE H. (1998)

Experimentelle Untersuchungen zur laserassistierten Periimplantitistherapie. Medizinische Habilitationsschrift TU-München.

DEPPE H., HORCH H. H., STEMBERGER A., HENKE J., HILLEMANS M., WAGENPFEIL (2002)

Verbessern Wachstumsfaktoren an Titanfolien die Knochenqualität?  
ZZahnärztl Implantol 18(4): 197-204.

DEPPE H., STEMBERGER A., HILLEMANN M. (2003)

Effects of osteopromotive and anti-infective membranes on bone regeneration: an experimental study in rat mandibular defects.  
Int.J Oral Maxillofac.Implants. 18: 369-376.

DEPPE H., STEMBERGER A. (2004a)

Effects of laser-modified versus osteopromotively coated titanium membranes on bone healing: a pilot study in rat mandibular defects.  
Lasers Med.Sci. 18: 190-195.

DEPPE H., KOLK A., STEMBERGER A. (2004b)

Zur Knochenregeneration unter CO<sub>2</sub>-Laser-modifizierten Titanfolien - Eine tierexperimentelle Studie.  
LaserZahnheilkunde 1: 39-44.

DEPPE H., HORCH H. H., KOLK A. (2004c)

Microstructured dental implants and palatal mucosal grafts in cleft patients: a retrospective analysis  
J Cranio-Maxillofacial Surg 32: 211-215.

DE WET J. R., WOOD K. V., DELUCA M., HELINSKI D. R., SUBRAMANI S. (1987)

Firefly Luciferase gene: Structure and Expression in Mammalian Cells  
S. Mol. Cell. Biol., 7: 725.

DI LELLA A. G., HOPE D. A., CHEN H., TRUMBAUER M., SCHWARTZ (1988)

Utility of firefly luciferase as a reporter gene for promoter activity in transgenic mice  
Nucleic Acids Res., 16: 4159.

DONATH K. (1988)

Vergleichende histologische Untersuchung verschiedener enossaler Implantattypen.  
ZZahnärztl Implantol IV: 106-108.

DRAGOO J. L., CHOI J Y., LIEBERMAN J. R., HUANG J., ZUK P. A., ZHANG J., HEDRICK M. H., BENHAIM P. (2003)

Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat.  
J Orthop.Res. 21: 622-629.

FANG J., ZHU Y. Y., SMILEY E., BONADIO J., ROULEAU J P., GOLDSTEIN S. A., MCCAULEY L. K., DAVIDSON B. L., ROESSLER B. J. (1996)

Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes.  
Proc Natl Acad Sci U S A 93(12): 5753-5758.

FELGNER P. L., GADEK T. R., HOLM M., ROMAN R., CHAN H. W., WENZ M., NORTHROP J. P., RINGGOLD G. M., DANIELSEN M. (1987).

Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNAttransfection procedure.  
Proc Natl Acad Sci U S A 84(21): 7413-7417.

FELGNER P. L., RINGOLD G. M. (1989)

Cationic liposome-mediated transfection.  
Nature 337: 387-388.

- FINSINGER D., REMY J. S., ERBACHER P., KOCH C., PLANK C. (2000)  
 Protective copolymers for nonviral gene vectors: synthesis, vector characterization and application in gene delivery.  
 Gene Ther. 7: 1183-1192.
- FISCHER A., HACEIN-BEY S., CAVAZZANA-CALVO M. (2002)  
 Gene therapy of severe combined immunodeficiencies.  
 Nat Rev Immunol 2(8): 615-621.
- FRITZ M. E. (1999)  
 Two-stage implant systems.  
 Adv Dent Res 13: 162-169.
- GILL D. R., SOUTHERN K. W., MOFFORD K. A., SEDDON T., HUANG L., SORGI F., THOMSON A., MACVINISH L. J., RATCLIFF R., BILTON D., LANE D. J., LITTLEWOOD J. M., WEBB A. K., MIDDLETON P. G., COLLEDGE W. H., CUTHBERT A. W., EVANS M. J., HIGGINS C. F., HYDE S. C. (1997)  
 A placebo controlled study of liposome-mediated gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis.  
 Gene Ther 4: 199-209.
- GOLDBERG V. M., JINNO T. (1999)  
 The Bone-Implant Interface: A Dynamic Surface.  
 J Long Term Eff Med Implants 9 (1&2): 11-21.
- GOLLWITZER H. (2002)  
 Eine resorbierbare Poly-D,L-Laktid-Beschichtung zur Ausrüstung medizinischer Implantate mit antithrombogenen Oberflächen in der Neonatologie und anitinfektiven Oberflächen in der Orthopädie  
 Med. Diss. TU München 2002.
- GOLLWITZER H., MEYER H., STEMBERGER A. (2003)  
 Implantatinfektionen und Strategien zur abakteriellen Beschichtung  
 TraumaBerufskrankh 5[Suppl2]: 347-352.
- GONDOLPH-ZINK B. (1998)  
 Der Einfluß der Hydroxylapatitbeschichtung auf die Osteointegration belasteter und unbelasteter Implantate.  
 Orthopäde 27: 96-104.
- GRUNDER U., HÜRZELER M. B., SCHUEPBACH P., STRUB J. R. (1993)  
 Treatment of ligature induced periimplantitis using guided tissue regeneration. A clinical and histological study in the beagle-dog.  
 Int J Oral Maxillofac Implants. 8(3): 282-293.
- HABAL M. B., REDDI A. H. (1994)  
 Bone grafts and bone induction substitutes.  
 Cranifac. Surg 21: 525-542.
- HAENSLER J., SZOKA F. C. JR (1993)  
 Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. Bioconjug Chem 4(5): 372-9.
- HAHN H., FALKE D., KLEIN P. (Hrsg.)(1991)  
 Medizinische Mikrobiologie  
 Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.



- HANISCH O., TATAKIS D. N., BOSKOVIC M. M., ROHRER M. D., WIKESJÖ U. M. E. (1997)  
 Bone formation and reosseointegration in peri-implantitis defects following surgical implantation of rhBMP-2.  
*Int J Oral Maxillofac Implants*; 12: 604-610.
- HANNALLAH D., PETERSON B., LIEBERMAN J. R., FU F. H., HUARD J. (2003)  
 Gene therapy in orthopaedic surgery.  
*Instr. Course Lect.* 52: 1046-1052.
- HELLER J. (1996)  
 Drug delivery systems.  
 In: „Biomaterials Science“, Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E. (Hrsg.),  
 Academic Press, San Diego-London-Boston-NewYork-Sydney-Tokyo-Toronto, 1996, 346-356.
- HENRY P. J. (1999)  
 Clinical experiences with dental implants.  
*Adv Dent Res* 13: 147-152.
- HERRMANN R., SCHMIDMAIER G., MARKL B., RESCH A., HAHNEL I., STEMBERGER A.,  
 ALT E. (1999)  
 Antithrombogenic coating of stents using a biodegradable drug delivery technology.  
*Thromb.Haemost.* 82: 51-57.
- HORCH H. H., STEEGMANN B. (1985)  
 Experience with resorbable TCP-ceramic granules for the filling of large bone defects after  
 cystectomy in the jaw.  
*Dtsch. Zahnärztl.Z.* 40: 672-677.
- HORCH H. H., SADER R., KOLK A.. (2004)  
 Synthetische, phasenreine Beta-Trikalziumphosphat-Keramik (Cerasorb) zur Knochenregeneration bei  
 der rekonstruktiven Chirurgie der Kiefer – Eine klinische Langzeitstudie mit Literaturübersicht.  
*Dtsch. Zahnärztl. Z* 59(12): 680-686.
- HORCH H. H., SADER R., PAUTKE C., NEFF A., DEPPE H., KOLK A. (2006)  
 Synthetic, pure-phase betatricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb1) for bone regeneration in  
 the reconstructive surgery of the jaws  
*Int. J. Oral Maxillofac. Surg* 35(8): 708-713.
- HUANG, L. (1999)  
 Characteristics of a Nonviral Vector. Interactions with DNA  
 in: *Nonviral Vectors for Gene Therapy*.  
 L Huang, M Hung, E Wagner. San Diego, CA, Academic Press: 9.
- HUANG Q., GOH J. C., HUTMACHER D. W., LEE E. H. (2002)  
 In vivo mesenchymal cell recruitment by a scaffold loaded with transforming growth factor beta1 and  
 the potential for in situ chondrogenesis.  
*Tissue Eng* 8: 469-482.
- HUANG Y. C., RIDDLE K., RICE K. G., MOONEY D. J. (2005)  
 Long-term in vivo gene expression via delivery of PEI-DNA condensates from porous polymer  
 scaffolds.  
*Hum gene Ther.* 16: 609-617.
- HUJA S. S., KATONA T. R., BURR D. B., GARETTO L. P., ROBERTS W. E. (1999)  
 Microdamage Adjacent to Endosseous Implants.  
*Bone* 25: 217-222.

- HÜRZELER M. B., WENG D., KOHAL R., SCHÜPBACH P., SCHMIDT K. H. (1997)  
Neues knocheninduzierendes Biomaterial (BIC) zur Behandlung der Periimplantitis. Eine Pilotstudie am Beaglehund.  
Z Zahnärztl Impl 13:103-109.
- ISGAARD J., NILSSON A., LINDAHL A., JANSSON J., ISAKSSON O. (1986)  
Effects of Lokal Administration of GH and IGF-I on Longitudinal Bone Growth in Rats.  
Am J Physiol 250: 367-372
- JEPSEN S., TERHEYDEN H (2000)  
Growth factors and morphogenetic proteins in periodontal regeneration and oral implant integration.  
Journal de Parodontologie & d'Implantologie Orale, 19, N°3: 289-314.
- JANG J. H., HOUCHIN T. L., SHEA L. D. (2004)  
Gene delivery from polymer scaffolds for tissue engineering.  
Expert Rev Med Devices. Sep 1(1):127-38.
- JOYCE M., JINGUSHI S., BOLANDER M. (1990)  
Transforming Growth Factor-Beta in the Regulation of Fractur Repair.  
Orthop Clin North Am 21: 199-209.
- KANDZIORA F., PFLUGMACHER R., SCHOLZ M., KNISPEL C., HILLER T., SCHOLLMEIER G., BAIL H., SCHMIDMAIER G., DUDA G., RASCHKE M., HAAS N. P. (2002)  
Comparison of BMP-2 and combined IGF-I/TGF-ss1 application in a sheep cervical spine fusion model.  
Eur.Spine J 11: 482-493.
- KAWAI M., BESSHO K., KAIHARA S., SONOBE J., ODA K., IIZUKA T., MARUYAMA H. (2003)  
Ectopic bone formation by human bone morphogenetic protein-2 gene transfer to skeletal muscle using transcutaneous electroporation.  
Hum.Gene Ther. 14: 1547-1556.
- KIRCHEIS R., WIGHTMAN L., WAGNER E. (2001)  
Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines.  
Adv Drug Deliv Rev 53(3): 341-58.
- KIRKER-HEAD C. A. (2000)  
Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins.  
Advanced Drug Delivery Reviews 43: 65-92.
- KIRSCH A., DONATH K. (1984)  
Tierexperimentelle Untersuchungen zur Bedeutung der Mikromorphologie von Titanimplantatoberflächen.  
Fortschr. Zahnärztl. Implantol I: 35-40.
- KITAZAWA R., KITAZAWA S., KASHIMOTO H., MAEDA S. (1998)  
Expression of Bone morphogenetic Proteins (BMP) in Fractured Mouse Bone Tissue: In Situ Hybridization with polymerase Chain Reaktion (PCR)-derived Antisense DNA Probe.  
Acra Histochem Cystocem, 31: 231-236.
- KNOELL D. L., YIU I. M. (1998)  
Human gene therapy for hereditary diseases: a review of trials.  
Am.J Health Syst.Pharm. 55: 899-904.

KNÖFLER, W., GRAF H. L. (1989)

Zur Knochenreaktion auf Biomaterialien. Komplexes Versuchsmodell zur Beschreibung der Knochenumbauvorgänge und Interfacereaktionen unter Biomaterialeinfluß.  
Z Zahnärztl Implantol V: 256-262.

KOLK A., SADER R., ZEILHOFER H. F., WESTERMARK A., HORCH H. H. (2003a)

Zum Einsatz der Quinn/Lorenz Kiefergelenksprothese bei der Behandlung der schweren deformierenden Arthropathie.  
Journal DGPW 27: 45-48.

KOLK A., SADER R., ZEILHOFER H. F., BECKER I., WESTERMARK A., HORCH H. H. (2003b)

Kollumrekonstruktion nach Resektion einer intrakapsulären Magenkarzinommetastase.  
Mund Kiefer Gesichtschir. 7: 306-310.

KONG H. J., LIU J., RIDDLE K., MATSUMOTO T., LEACH K., MOONEY D. J. (2005)

Non-viral gene delivery regulated by stiffness of cell adhesion substrates.  
Nat Mater 4(6): 460-464.

KÜBLER, N. R. (1997)

Osteoinduktion und -reparation  
Mund Kiefer Gesichtschir 1: 2-25.

KÜBLER N. R., WÜRZLER K. K., BIEBL S., KÄDING C., FALLER G., SIEBER G., KIRCHNER T., SEBALD W., REUTHER J. F. (1998)

Die Rekonstruktion von Unterkieferdefekten mit BMP-2.  
Deutsch Zahnärztl Zeitschr 53: 871-878.

LAURENCIN C., LANE J. M. (1994)

Poly(lactid acid) and Poly(glycolic acid): orthopaedic surgery applications.  
Am Acad Orthop Surg: 324-339.

LEE K. Y., HYUN J. K., MOONEY D. J. (2008)

Quantifying Interactions between Cell Receptors and Adhesion Ligand-Modified Polymers in Solution  
Macromol. Biosci 8: 140-145.

LENDLEIN A. (1999)

Polymere als Implantatwerkstoffe.  
Chemie in unserer Zeit 33: 279-295.

LIND M. (1998)

Growth Factor Stimulation of Bone Healing. Effects on Osteoblasts, Osteomies and Implants Fixation.  
Acta Orthop Scand Suppl 283: 2-37.

LINDER L. (1989)

Osseointegration of metallic implants. I. Light microscopy in the rabbit.  
Acta Orthop Scand 60, No.2: 129-134.

LINKHART T. A., MOHAN S., BAYLINK D. J. (1996)

Growth Factors for Bone Growth and Repair: IGF, TGF Beta and BMP.  
Bone 19: 1S-12S.

LUO D., SALTZMAN W. M. (2000)

Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at the cell surface.  
Nat. Biotechnol. 18: 893-895.

- MARTENS M., DUCHEYNE P., DE MEESTER P., MULIER J. C. (1980)  
Skeletal Fixation of Implants by Bone Ingrowth into Surface Pores.  
*Arch Orthop Traumat Surg* 97: 111-116.
- MASUDA T., YLIHEIKKILÄ P. K., FELTON D. A., COOPER L. F. (1998)  
Generalizations Regarding the Process and Phenomenon of Osseointegration. Part I. In Vivo Studies.  
*Int J Oral Maxillofac Implants* 13: 17-29.
- MARUKAWA E., ASAHINA I., ODA M., SETO I., ALAM M., ENOMOTO S. (2001)  
Bone regeneration using recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in alveolar defects of primate mandibles  
*Brit. J Oral Maxillofac. Surg.* 39: 452-459.
- MARUKAWA E., ASAHINA I., ODA M., SETO I., ALAM M., ENOMOTO S. (2002)  
Functional reconstruction of the non-human primate mandible using recombinant human bone morphogenetic protein-2.  
*Int.J Oral Maxillofac.Surg* 31: 287-295.
- MARX R. E., GARG A. K. (1998)  
Bone Structure, Metabolism, and Physiology: Its Impact on Dental Implantology.  
*Implant Dent* 7, No. 4, 267-275.
- MIDDLETON J. C., TIPTON A. J. (2000)  
Synthetic biodegradable polymers as orthopaedic devices.  
*Biomaterials* 21: 2335-2346.
- MITANI K., KUBO S. (2002)  
Adenovirus as an integrating vector.  
*Curr Gene Ther* 2(2): 135-44.
- MOONEY D. J., VANDENBURGH H. (2008)  
Cell Delivery Mechanisms for Tissue Repair  
*Cell Stem Cell* 2(3): 205-213.
- MUSGRAVE D. S., BOSCH P., GHIVIZZANI S., ROBBINS P. D., EVANS C. H., HUARD J. (1999)  
Adenovirus-mediated direct gene therapy with bone morphogenetic protein-2 produces bone. *Bone* 24: 541-547.
- NAKAMURA Y., WAKITANI S., NAKAYAMA J., WAKABAYASHI S., HORIUCHI H., TAKAOKA K. (2003)  
Temporal and spatial expression profiles of BMP receptors and noggin during BMP-2-induced ectopic bone formation.  
*J Bone Miner.Res.* 18:1854-1862.
- NEUMANN E., SCHAEFER-RIDDER M., WANG Y., HOFSCHNEIDER P. H. (1982).  
Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields.  
*EMBO Journal* 1 (7): 841-845.
- NIE H., WANG C. H. (2007)  
Fabrication and characterization of PLGA/HAp composite scaffolds for delivery of BMP-2 plasmid DNA.  
*J Control Release.* Jul 16: 120(1-2):111-21.

- NIELSEN H. M., ANDREASSEN T. T., LEDET T., OXLUND H. (1994)  
Lokal Injection of TGF-Beta Increases the Strength of tibial Fractures in the Rat.  
*Acta Orthop Scand* 65: 37-41.
- NILSSON A., ISGAARD J., LINDAHL A., PETERSON L., ISAKSSON O. (1987)  
Effects of Unilateral Arterial Infusion of GH and IGF-I on Tibial Longitudinal Bone Growth in Hypophysectomized Rats.  
*Calif Tissue Int* 40: 91-96.
- OGRIS M., STEINLEIN P., CAROTTA S., BRUNNER S., WAGNER E. (2001)  
DNA/polyethylenimine transfection particles: Influence of ligands, polymer size, and PEGylation on internalization and gene expression.  
*AAPS PharmSci* 2001; 3 (3) article 21 : 1-11 (<http://www.pharmsci.org>).
- OGRIS M., WAGNER E. (2002)  
Targeting tumors with non-viral gene delivery systems  
*Drug discovery today*, Vol 7: 479-485.
- OKUBO Y., BESSHO K., FUJIMURA K., IIZUKA T., MIYATAKE S. I. (2001)  
In Vitro and in Vivo Studies of a Bone Morphogenetic Protein-2 Expressing Adenoviral Vector.  
*Journal of Bone and Joint Surgery* 83: 99-104.
- PAPADOPULOS N., SCHAFF J., SADER R., KOVACS L., DEPPE H., KOLK A., BIEMER E. (2008)  
Mandibular reconstruction with free osteofasciocutaneous fibula flap: A 10 years experience  
*Injury*, Vol. 39, Issue 3: 75-82.
- PARTRIDGE K., YANG X., CLARKE N. M. P., OKUBO Y., BESSHO K., SEBALD W., HOWDLE S. M., SHAKESHEFF K. M., OREFFO R. O. C. (2002)  
Adenoviral BMP-2 Gene Transfer in Mesenchymal Stem Cells: In Vitro and in Vivo Bone Formation on Biodegradable Polymer Scaffolds.  
*Biochemical and Biophysical Research Communications* 292: 144-152.
- PLANK C., MECHTLER K., SZOKA F. C. JR, WAGNER, E. (1996)  
Activation of the complement system by synthetic DNA complexes. A Potential Barrier for Intravenous gene delivery.  
*Hum Gene Ther.* 7: 1437-1446.
- REDDI A. H. (1995)  
Bone morphogenetic proteins, bone marrow stromal cells and mesenchymal stem cells. Maureen Owen Revisited.  
*Clin Orthop*, (313): 115-119.
- REDDI A. H. (2001)  
Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications.  
*J.Bone Joint Surg.Am.* 83-A Suppl 1: S1-S6.
- ROSEN V., THIES R. S. (1992)  
The BMP Proteins in Bone Formation and Repair.  
*Trends Genet* 8: 97-102.
- SCHENK R. K., BUSER D. (1998)  
Osseointegration: a reality.  
*Periodontol* 2000 17: 22-35.

- SCHERER F., SCHILLINGER U., PUTZ U., STEMBERGER A., PLANK C. (2002)  
Nonviral vector loaded collagen sponges for sustained gene delivery in vitro and in vivo.  
J Gene Med. 4: 634-643.
- SCHLIEPHAKE H. (2002)  
Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction.  
Int.J Oral Maxillofac.Surg. 31: 469-484.
- SCHMID R. D. (2006)  
Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik, 2. Auflage,  
Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim.
- SCHMIDMAIER G., WILDEMANN B., BAIL H., LUCKE M., FUCHS T., STEMBERGER A., FLYVBJERG A., HAAS N. P., RASCHKE M. (2001a)  
Lokal Application of Groth Factors (Insulin-Like Growth Factor-1 and Transforming Growth Factor- $\beta$ 1) From a Biodegradable Poly(D,L laktide) Coating of Osteosynthetic Implants Accelerates Fracture Healing in Rats  
Bone 28(4): 341-350.
- SCHMIDMAIER G., WILDEMANN B., STEMBERGER A., HAAS N. P., RASCHKE M. (2001b)  
Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. J Biomed.Mater.Res. 58: 449-455.
- SCHMIDMAIER G., WILDEMANN B., CROMME F., KANDZIORA F., HAAS N. P., RASCHKE M. (2002)  
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 30: 816-822.
- SCHMIDMAIER G., WILDEMANN B., GABELEIN T., HEEGER J., KANDZIORA F., HAAS N. P., RASCHKE M. (2003)  
Synergistic effect of IGF-I and TGF-beta1 on fracture healing in rats: single versus combined application of IGF-I and TGF-beta1.  
Acta Orthop.Scand. 74: 604-610.
- SETO I., ASAHINA I., ODA M., ENOMOTO S. (2001)  
Reconstruction of the Primate Mandible With a Combination Graft of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 and Bone Marrow.  
J Oral Maxillofac Surg 59: 53-61.
- SIMON R. H., ENGELHARDT J. F., YANG Y., ZEPEDA M., WEBER-PENDLETON S., GROSSMANN M., WILSON J. M. (1993)  
Adenovirus-mediated transfer of the CFTR gene to lung of nonhuman primates: toxicity study.  
Hum Gene Ther 4(6): 771-80.
- SMEETS R., MACIEJEWSKI O., GERRESSEN M., SPIEKERMANN H., HANISCH O., RIEDIGER D., BLAKE F., STEIN J., HÖLZLE F., KOLK A. (2009)  
Impact of rhBMP-2 on regeneration of buccal alveolar defects during the osseointegration of transgingival inserted implants.  
Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics 108(4): e3-e12.
- SMEDBERG J. I., LOTHIGIUS E., BODIN I., FRYKHOLM A., NILNER K. (1993)  
A clinical and radiological two year follow up study of maxillary overdentures on osseointegrated implants.  
Clin Oral Impl Res: 4: 39-46.

SOBALLE K., HANSEN E. S., BROCKSTEDT-RASMUSSEN H., PEDERSEN C. M., BÜNGER C. (1990)

Hydroxyapatite coating enhances fixation of porous coated implants. A comparison in dogs between press fit and noninterference fit.

Acta Orthop Scand 61, No.4: 299-306.

SOLDNER E., HERR G. (2001)

Knochen, Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien. Grundlagen, aktueller Stand und neue Entwicklungen.

Trauma Berufskrankh 3: 256-269.

STEMBERGER A., GRIMM H., BADER F., RAHN H. D., ASCHERL R. (1997)

Local treatment of bone and soft tissue infections with the collagen-gentamicin sponge.

Eur.J Surg Suppl: 17-26.

STORRIE H., MOONEY D. J. (2006)

Sustained delivery of plasmid DNA from polymeric scaffolds for tissue engineering.

Advanced Drug Delivery Reviews 58: 500-514.

SUZAWA M., TAKEUCHI Y., FUKUMOTO S., KATO S., UENO N., MIYAZONO K., MATSUMOTO T., FUJITA T. (1999)

Extracellular Matrix-Associated Bone Morphogenetic Proteins Are Essential for Differentiation of Murine Osteoblastic Cells in Vitro.

Endocrinology 140: 2125-2133.

TABIN C. J., HOFFMANN J. W., GOFF S. P., WEINBERG R. A. (1982)

Adaptation of a retrovirus as a eucaryotic vector transmitting the herpes simplex virus thymidine kinase gene.

Mol Cell Biol 2(4): 426-436.

TERHEYDEN H., JEPSEN S., VOGLER S., TUCKER M. M., RUEGER D. C. (1997)

Recombinant human osteogenic protein-1 (rhBMP-7) in the rat mandibular augmentation model: differences in bone morphology are dependent on the type of carrier.

Mund Kiefer Gesichtschir 1: 272-275.

THOMA K., SCHLÜTERMANN B. (1991)

Biodegradierbare Polymere als Retardierungsprinzip für Arzneistoffe.

Pharmazie 46: 821-830.

TRIPPEL S., COUTTS R., EINHORN T., MUNDY R., ROSENFELD R. (1996)

Growth Factors as Therapeutic Agents.

J Bone Joint Surg 78A: 1272-1286.

URIST M. R. (1965)

Bone: Formation by Autoinduction.

Science 150[698]: 893-899.

VARADY P., LI J. Z., ALDEN T. D., KALLMES D. F., WILLIAMS M. B., HELM, G. A. (2002)

CT and radionuclide study of BMP-2 gene therapy-induced bone formation.

Acad.Radiol. 9: 632-637.

VERMA I. M., SOMIA N. (1997).

Gene therapy . promises, problems and prospects.

Nature 389: 239-242.

- WAGNER E., ZENKE M., COTTEN M., BEUG H., BIRNSTIEL M. L. (1990).  
Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells.  
Proc Natl Acad Sci U S A 87(9): 3410-3414.
- WANG X., LIU B., JIN Y., YANG X. (1993)  
The effect of bone morphogenetic protein on osseointegration of titanium implants.  
J Oral Maxillofac Surg; 51: 647-651.
- WANG X., JIN Y., LIU B., ZHOU S., YANG L., YANG X., WHITE F. H. (1994)  
Tissue reactions to titanium implants containing bovine bone morphogenetic protein: a scanning electron microscopic investigation.  
Int J Oral Maxillofac Surg; 23: 115-199.
- WEBER F. E., EYRICH G., GRATZ K. W., MALY F. E., SAILER H. F. (2002)  
Slow and continuous application of human recombinant bone morphogenetic protein via biodegradable poly(lactide-co-glycolide) foamspheres.  
Int.J Oral Maxillofac.Surg 31: 60-65.
- WEI C. M., GIBSON M., SPEAR P. G., SCOLNICK E. M. (1981)  
Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1.  
J Virol 39(3): 935-944.
- WIGHTMAN L., KIRCHEIS R., RÖSSLER V., CAROTTA S., RUZICKA R., KURSA M.,  
WAGNER E. (2001).  
Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo.  
Journal of Gene Medicine 3(4): 362-72.
- WOLF H., ROIS M. P., BOLDT E., NEUMANN E., TEISSE J. (1994)  
Control by Pulse Parameters of Electric Field-Mediated Gene Transfer in Mammalian Cells.  
Biophysical Journal 66: 524-531.
- WORGALL S., WOLFF G., FALCK-PEDERSEN E., CRYSTAL R. G. (1997)  
Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration.  
Hum Gene Ther 8(1): 37-44.
- WOZNEY J. M., ROSEN V., CELESTE A. J., MITSOCK L. M., WHITTERS M. J., KRIZ R. W.,  
HEWICK R. M., WANG E. A. (1988)  
Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities.  
Science 242[4885]: 1528-1534.
- WU X. S. (1995)  
Encyklopedic handbook of biomaterials and bioengineering;  
Hrsg.: D. L. Wise, T. J. Trantolo, D.E. Altobelli, M. j. Yaszememski, D. J. Gresser, R. Schwarz; M  
Dekker, New York: 1015-1054.
- YAN J., XIANG W., BAOLIN L., WHITE F. H. (1994)  
Early histologic response to titanium implants complexed with bovine bone morphogenetic protein.  
J Prosth Dent; 71: 289-294.
- YASKO A. W., LANE J. M., FELLINGER E. J., ROSEN V., WOZNEY J. M., WANG E. A. (1992)  
The Healing of segmental Bone Defects Induced by Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein (RhBMP-2). A Radiographic, Histological and Biomechanical Study in rats.  
J Bone Joint Surg Am 74: 659-670.



ZAUNER W., KICHLER A., SCHMIDT W., SINSKI A., WAGNER E. (1996)  
Glycerol enhancement of ligand-polylysine/DNA transfection.  
Biotechniques 20(5): 905-13.

ZEGZULA H. D., BUCK D. C., BREKKE J., WOZNEY J. M., HOLLINGER J. O. (1997)  
Bone Formation with Use of rhBMP-2 (Recombinant Human Bone.  
Morphogenetic Protein-2)  
J Bone Joint Surg Am. 79:1778-90.

ZELLIN G., LINDE A. (1997)  
Importance of delivery systems for Growth-Stimulatory Factors in Combination With Osteopromotive  
Membranes. An experimental Study Using RhBMP-2 in Rat mandibular Defects.  
J Biomed Mater Res 35: 181-190.

## VIII. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungen

Abbildung 1:	Histologische Darstellung eines ausgedehnten Knochenabbaus im Bereich des Interface (Pfeil) mit der Folge des Implantatverlusts.....	2
Abbildung 2:	Vergleich zwischen Protein und Gentransfer .....	7
Abbildung 3:	Freisetzungskinetik von rekombinantem Protein und Plasmid beim Gentransfer in der Wundheilung und Geweberegeneration im Vergleich.....	8
Abbildung 4:	Häufig eingesetzte virale und nicht virale Vektorsysteme in der Gentherapie.....	8
Abbildung 5:	Vor- und Nachteile verschiedener viraler Gentransfersysteme .....	10
Abbildung 6:	Funktionsprinzip der Herstellung der copolymer protected gene vectors – schematische Darstellung.....	13
Abbildung 7:	Schematische Darstellung der DNA-Aufnahme in eine Zelle durch Endozytose und anschließende Genexpression .....	14
Abbildung 8:	Chemische Struktur der Monomerbausteine von Polylaktiden .....	15
Abbildung 9:	Resomer 203 - chem. Darstellung .....	15
Abbildung 10:	Ablauf der Herstellung der copolymer protected gene vectors im Glashomogenisator - schematische Darstellung .....	28
Abbildung 11:	Ablauf der Herstellung der Beschichtungslösung und Beschichtung der Folien – schematische Darstellung.....	32
Abbildung 12:	Luciferase-Reaktion.....	34
Abbildung 13:	Ablauf bei der Antikörpertiterbestimmung beim ELISA - schematische Darstellung .....	36
Abbildung 14:	Herstellung der Standardverdünnungsreihe - schematische Darstellung.....	38
Abbildung 15:	Glaspotter (links) mit Glasstößel, daneben der modifizierte Homogenisator mit dem Teflonstößel und Deckel (rechts).....	43
Abbildung 16:	Modifizierter Homogenisator vs. Glashomogenisator - schemat. Darstellung der unterschiedlichen Gebrauchsformen und des Designs.....	45
Abbildung 17:	Gelelektrophorese von BMP-2 - deutlich zu erkennen sind die zwei Banden der komprimierten und linearen DNA; links zum Vergleich die Banden des s.c.-Makers. Die Basenpaare (bp) sind links beschriftet. ....	49

Abbildung 18:	Expression von Luciferase in den vier Versuchsgruppen; Tag 1-6; nach Transfektion von 3T3-Zellen mit COPROG <sub>Luciferase</sub> -PDLLA-beschichteten Aluminiumfolien; 0,2 % DNA/R203w/w.....	51
Abbildung 19:	Expression von BMP-2 der Einzelfolien n1-5; Tag 1-7; nach Transfektion von 293 Zellen mit COPROG <sub>BMP-2</sub> -PDLLA-beschichteten Aluminiumfolien; 0,2 % DNA/R203 w/w, 10µg DNA <sub>BMP-2</sub> .....	53
Abbildung 20:	Expression von BMP-2 der Einzelfolien n1-5; Tag 1-7; nach Transfektion von 293 Zellen mit COPROG <sub>BMP-2</sub> -PDLLA-beschichteten Aluminiumfolien; 0,4 % DNA/R203 w/w, 20µg DNA <sub>BMP-2</sub> .....	54
Abbildung 21:	Expression von BMP-2 der Einzelfolien n1-5; Tag 1-7; nach Transfektion von 293 Zellen mit COPROG <sub>BMP-2</sub> -PDLLA-beschichteten Aluminiumfolien; 0,8 % DNA/R203 w/w, 40 µg DNA <sub>BMP-2</sub> .....	55
Abbildung 22:	Expression von BMP-2; Tag 1-7; nach Transfektion von 293 Zellen mit COPROG <sub>BMP-2</sub> -PDLLA-beschichteten Aluminiumfolien; 0,2 % DNA <sub>BMP-2</sub> /R203 w/w, 0,4 % DNA <sub>BMP-2</sub> /R203 w/w und 0,8 % DNA <sub>BMP-2</sub> /R203 w/w .....	57
Abbildung 23:	Expression von Luciferase der Einzelfolien n1-6; Tag 2; nach Transfektion von 3T3-Zellen mit COPROG <sub>Luciferase</sub> -PDLLA-beschichteten Aluminiumfolien; 0,2 % DNA/R203 w/w .....	58
Abbildung 24:	Expression von Luciferase der Einzelfolien n1-6; Tag 2; nach Transfektion von 3T3-Zellen mit COPROG <sub>Luciferase</sub> -PDLLA-beschichteten Aluminiumfolien; 0,2 % DNA/R203 w/w .....	60
Abbildung 25:	Expression von Luciferase; Tag 2; GLASHOMOGENISATOR (s. Kap. 3.5.1) nach Transfektion von 3T3-Zellen mit COPROG <sub>Luciferase</sub> -PDLLA-beschichteten Aluminiumfolien; 0,2 % DNA <sub>Luciferase</sub> /R203 w/w .....	61
Abbildung 26:	Expression von Luciferase; Tag 2; modifizierter Homogenisator (s. Kap. 3.5.2) nach Transfektion von 3T3-Zellen mit COPROG <sub>Luciferase</sub> -PDLLA-beschichteten Aluminiumfolien; 0,2 % DNA <sub>Luciferase</sub> /R203 w/w .....	61
Abbildung 27:	Expression von BMP-2; Tag 1-14; nach Transfektion von 293 Zellen mit COPROG <sub>BMP-2</sub> -PDLLA-beschichteten Titanfolien; 0,2 % DNA <sub>BMP-2</sub> /R203 w/w, 10 µ; DNA <sub>BMP-2</sub> je Folie.....	63
Abbildung 28:	Expression von BMP-2; Tag 1-14; nach Transfektion von 293 Zellen mit COPROG <sub>BMP-2</sub> -PDLLA-beschichteten Titanfolien; 0,4 % DNA <sub>BMP-2</sub> /R203 w/w, 20 µ; DNA <sub>BMP-2</sub> je Folie.....	65

Abbildung 29:	Expression von BMP-2; Tag 1-14; nach Transfektion von 293 Zellen mit COPROG <sub>BMP-2</sub> -PDLLA-beschichteten Titanfolien; 0,8 % DNA <sub>BMP-2</sub> /R203 w/w, 20 µ; DNA <sub>BMP-2</sub> je Folie.....	66
Abbildung 30:	Expression von BMP-2; Tag 1-14; nach Transfektion von 293 Zellen mit COPROG <sub>BMP-2</sub> -PDLLA-beschichteten Titanfolien; 0,2 % DNA <sub>BMP-2</sub> /R203 w/w, 10 µ; DNA <sub>BMP-2</sub> je Folie; Vergleich der drei Versuchsgruppen.....	67

## Tabellen

Tabelle 1:	Material und Geräte zur Plasmidpräparation mittels Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation.....	18
Tabelle 2:	Materialien und Geräte zur Plasmidpräparation mit Qiagen® Plasmid Purification...	21
Tabelle 3:	Materialien und Geräte für die fotometrische Messung der p-DNA-Konzentration .	23
Tabelle 4:	Materialien und Geräte für die Gelelektrophorese.....	24
Tabelle 5:	Materialien und Geräte für die Formulierung der Genvektoren .....	26
Tabelle 6:	Material und Geräte für die Beschichtungstechnologie.....	29
Tabelle 7:	Materialien und Geräte zur Durchführung der Luciferase-Aktivitätsmessung.....	34
Tabelle 8:	Material und Geräte zur Durchführung der ELISA-Messungen.....	36
Tabelle 9:	Materialien und Geräte zur Beschichtung von Aluminiumfolien mit Poly-D-/-L-Laktid + COPROG <sub>Luciferase</sub> .....	39
Tabelle 10:	Materialien und Geräte zur Beschichtung von Aluminiumfolien mit Poly-D-/-L-Laktid + COPROG <sub>BMP-2</sub> .....	40
Tabelle 11:	Unterschiedliche Poly-D-/-L-Laktid-COPROG-Konzentrationen - Mengenangabe für die Beschichtung pro Folie .....	42
Tabelle 12:	Materialien und Geräte für die Beschichtung von Aluminiumfolien mit Poly-D-/-L-Laktid + COPROG <sub>Luciferase</sub> zum Vergleich modifizierter Homogenisator und Glashomogenisator .....	42
Tabelle 13:	Versuchsprotokoll für den Vergleich von Glaspotter und modifiziertem Potter .....	44
Tabelle 14:	Materialien und Geräte zur Beschichtung von Titanfolien mit COPROG <sub>BMP-2</sub> -Poly-D-/-L-Laktid-Beschichtungslösung mit verschiedenen BMP-2-Konzentrationen.....	46
Tabelle 15:	Expression von Luciferase - Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW); Tag 1-6 .....	51

Tabelle 16:	Expression von BMP-2 der Einzelfolien in pg/ml bei einer Beschichtung von 0,2 % Plasmid je Folie; Tag 1-7; Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) .....	52
Tabelle 17:	Expression von BMP-2 der Einzelfolien in pg/ml bei einer Beschichtung von 0,4 % Plasmid je Folie; Tag 1-7; Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) .....	53
Tabelle 18:	Expression von BMP-2 der Einzelfolien in pg/ml bei einer Beschichtung von 0,8 % Plasmid je Folie; Tag 1-7; Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) .....	54
Tabelle 19:	Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) in pg/ml; Tag 1-7; der Untersuchungsgruppen: 0,2 % DNA <sub>BMP-2</sub> /R203 w/w, 0,4 % DNA <sub>BMP-2</sub> /R203 w/w und 0,8 % DNA <sub>BMP-2</sub> /R203 w/w .....	56
Tabelle 20:	Expression von Luciferase der Einzelfolien bei einer Beschichtung von 0,2 % DNA <sub>Luciferase</sub> /R203 w/w; Tag 1-7 .....	58
Tabelle 21:	Expression von Luciferase der Einzelfolien bei einer Beschichtung von 0,2 % DNA <sub>Luciferase</sub> /R203 w/w; Tag 1-7 .....	59
Tabelle 22:	Expression von BMP-2, Mittelwerte und Standardabweichungen; Tag 1-14; nach Transfektion von 293 Zellen mit COPROG <sub>BMP-2</sub> -PDLLA-beschichteten Titanfolien mit 0,2 % DNA/R203 w/w; 10 µg DNA <sub>BMP-2</sub> .....	63
Tabelle 23:	Expression von BMP-2, Mittelwerte und Standardabweichungen; Tag 1-14; nach Transfektion von 293 Zellen mit COPROG <sub>BMP-2</sub> -PDLLA-beschichteten Titanfolien mit 0,4 % DNA/R203 w/w; 20 µg DNA <sub>BMP-2</sub> .....	64
Tabelle 24:	Expression von BMP-2, Mittelwerte und Standardabweichungen; Tag 1-14; nach Transfektion von 293 Zellen mit COPROG <sub>BMP-2</sub> -PDLLA-beschichteten Titanfolien mit 0,8 % DNA/R203 w/w; 40 µg DNA <sub>BMP-2</sub> .....	66

## IX. Lebenslauf

Name: Christine Drechsler  
Geburtstag: 17. August 1974  
Geburtsort: Neubrandenburg  
Anschrift: Oberländer Str. 76a; 86163 Augsburg

Eltern: Helmut Drechsler, Tierarzt  
Christel Drechsler, geb. Beyer, Pharmazieingenieurin

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: 1981-1990: ehemalige POS Zeulenroda/Thüringen  
1991-1993: Friedrich-Schiller-Gymnasium Zeulenroda/  
Thüringen

Schulabschluss: 1993: Allgemeine Hochschulreife/Abitur

Berufsausbildung: 1993-1997: Ausbildung zur Zahntechnikerin in Augsburg  
Berufsabschluss: 1997: Zahntechnikerin

Berufliche Tätigkeit: 1997 als Zahntechnikerin im Dentallabor  
Hans Schneider in Augsburg,  
seit 1998 als Zahntechnikerin auf freiberuflicher Basis  
seit 2006 Assistenztaetigkeit in niedergelassener Zahnarztpraxis  
in Augsburg  
2007: Mitbegründerin des Zentrums für Implantatplanung  
Augsburg

Studium: 1998-2004: Studium der Zahnmedizin an der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
2004-2005: Promotionssemester an der TU München

Abschluss: Januar 2004: Staatsexamen mit Approbation zur Zahnärztin

## **X. Danksagung**

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Dr. h.c. Hans-Henning Horch (em.) und Univ. Prof. Dr. med. Dr. med. dent. K.-D. Wolff, die es mir ermöglichten, an der Klinik und Poliklinik der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der TU München die vorliegende Dissertation durchzuführen.

Der Arbeitsgruppe von PD Dr. Christian Plank vom Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung danke ich für die Hilfe bei der praktischen Durchführung der Versuche, die Vermittlung des im Rahmen seiner intensiven Vorarbeiten gewonnenen Grundlagen-Know-hows und der Bereitstellung einiger Materialien.

Weitergehend danke ich Herrn Prof. Dr. med. Bernd Gänsbacher, Direktor des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, sowie dessen Mitarbeiter, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Axel W. Stemberger, für die Überlassung des Arbeitsplatzes und für die theoretische Unterstützung während dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. dent. Herbert Deppe als Doktorvater für die Überlassung des Themas.

Ein großer Dank gilt der Arbeitsgruppe „Förderung des Knochenwachstums“ der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der TU München. Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Priv. Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Andreas Kolk für dessen Betreuung und bei Frau Dr. Cornelia Haczek für die praktische und theoretische Hilfe.

Vielen Dank auch an Frau Ursula Putz und Herrn Sepp Strassmeier für ihre Hilfsbereitschaft im Labor.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich ferner bei meinen Kolleginnen und Kollegen, im Besonderen bei Frau Gabi Hihler des Dentallabors Hans Schneider in Augsburg. Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Monika und Herrn Hans Schneider für ihre ständige Hilfe und Unterstützung der letzten Jahre.

Meinen größten Dank spreche ich meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Freunden für die mir entgegengebrachte Geduld, ständige Unterstützung und große Hilfe während der Zeit meines Studiums und meiner Promotion aus und dadurch auf ihre Weise zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Christine Drechsler