

**Aus der Klinik für Chirurgie
Sektion für Plastische Chirurgie, Handchirurgie
und Intensiveinheit für Schwerbrandverletzte
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Peter Mailänder**

**Therapeutische Angiogenese -
ein Modell zur Untersuchung der präklinischen Aspekte der
biologischen Sicherheit eines Gentransferarzneimittels**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät –

vorgelegt von
Astrid Arnold, geb. Kathöfer
aus Teterow

Lübeck 2010

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Peter Mailänder

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. Siegfried Görg

Tag der mündlichen Prüfung: 19.09.2011

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 19.09.2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
1.1 Grundlagen der Gentherapie	3
1.2 Therapeutische Angiogenese als Einsatzgebiet für die Gentherapie	6
1.2.1 Grundlagen der Therapeutischen Angiogenese	6
1.2.2 Angiogenetische Faktoren	7
1.2.3 Präklinische und klinische Studien zur Therapeutischen Angiogenese	9
1.3 Regulatorische Aspekte der Gentherapie für die Anwendung am Menschen	12
1.4 Präklinische Untersuchungen zur biologischen Sicherheit der Gentherapie	15
1.5 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit	19
2. Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Geräte und Software	21
2.1.2 Reagenzien und Kits	22
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	24
2.1.4 Primer	24
2.2 Methoden	25
2.2.1 Tierexperimentelle Methoden	25
2.2.1.1 Hautentnahme zur Zellgewinnung	25
2.2.1.2 „Hindlimb“ Modell zur Ischämieinduktion bei Ratten	25
2.2.2 Zellbiologische Methoden	27
2.2.2.1 Isolation von primären isogenen Fibroblasten aus Rattenhaut	27
2.2.2.2 Kultivierung von Rattenfibroblasten	28
2.2.2.3 Transfektion von Rattenfibroblasten	28
2.2.2.4 Untersuchung des Zeitverlaufs der Expression nach Transfektion	29
2.2.3 Molekularbiologische Methoden	30
2.2.3.1 Extraktion von DNA aus Zellkulturproben	30
2.2.3.2 Extraktion von RNA aus Zellkulturproben	30
2.2.3.3 Vorbereitung der Gewebeproben	31
2.2.3.4 Extraktion von DNA aus Gewebeproben	31
2.2.3.5 Extraktion von RNA aus Gewebeproben	31
2.2.3.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren am Photometer	32
2.2.3.7 DNase Verdau und Reverse Transkription	32
2.2.3.8 Real-Time PCR zum Nachweis der Proteinexpression in Zellkultur- und Gewebeproben	33
2.2.3.9 Real-Time PCR zum Nachweis der Plasmid-DNA in Zellkultur- und Gewebeproben	34
2.2.3.10 Ermittlung der PCR Effizienz	35
2.2.3.11 Real-Time PCR Array	35
2.2.3.12 Nachweis der DNA Moleküle mittels Agarose-Gelelektrophorese	36
2.2.4 Immunologische Methoden	36

INHALTSVERZEICHNIS

2.2.4.1 Durchflusszytometrie	36
2.2.4.2 Untersuchung der Reinheit der kultivierten Zellen in Bezug auf den Zelltyp	36
2.2.4.3 Apoptosetest	37
2.2.4.4 Proteinnachweis aus Gewebeproben und Zellkulturüberständen mittels ELISA	37
2.2.5 Statistische Auswertung	38
3. Ergebnisse	39
3.1 Optimierung des Gentransfers in primären Rattenfibroblasten	39
3.2 Optimierung der Real-Time PCR	42
3.3 <i>Ex vivo</i> Charakterisierung der transfizierten Zellen	45
3.3.1 Einfluss auf die Apoptoseinduktion	45
3.3.2 Zeitverlauf der Proteinexpression	47
3.4 <i>In vivo</i> Experimente	50
3.4.1 Charakterisierung der Proteinexpression an der Injektionsstelle	51
3.4.2 Verteilung der Plasmid-DNA im Körper - Biodistribution	53
3.4.3 Untersuchung von Stress- und Toxizitätsfaktoren an der Injektionsstelle	56
4. Diskussion	58
4.1 Optimierung des Gentransfers	58
4.2 Expression der therapeutischen Wachstumsfaktoren	61
4.3 Biodistribution der therapeutischen Plasmide	63
4.4 Biologische Sicherheit in Bezug auf Stress und Toxizität	69
4.5 Ausblick	73
5. Zusammenfassung	75
6. Literaturverzeichnis	77
6.1 Wissenschaftliche Veröffentlichungen	77
6.2 Regularien und Gesetze	84
7. Anhang	86
7.1 Versuchsergebnisse	86
7.1.1 Untersuchung der Reinheit der kultivierten Zellen – Fibroblastennachweis	86
7.1.2 Agarose-Gelelektrophorese	86
7.1.3 Expressionsvergleich verschiedener Housekeeping Gene	87
7.2 Komplette Liste der Organe für die Untersuchung der Biodistribution	88
7.3 Veröffentlichungen und Kongressteilnahmen	89
7.3.1 Vorträge	89
7.3.2 Poster	90
7.3.3 Publikationen	90
7.4 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	91
7.5 Abkürzungsverzeichnis	92
8. Danksagung	94

1. Einleitung

1.1 Grundlagen der Gentherapie

Die Gentherapie ist ein erst relativ junges Gebiet der medizinischen Forschung. Sie ist definiert als das Einbringen von genetischem Material in somatische Zellen oder Gewebe mit dem Ziel, einen therapeutischen Effekt auszuüben (Ylä-Herttuala und Martin, 2000). Voraussetzung für diesen Fortschritt bildeten wichtige bahnbrechende Entdeckungen auf dem Gebiet der Molekularbiologie und Biochemie, wie beispielsweise die Entschlüsselung des chemischen und strukturellen Aufbaus der Erbinformation und des genetischen Codes sowie die Entwicklung gentechnischer Verfahren. Die ersten klinischen Therapieversuche wurden bereits im Jahr 1990 an Patienten mit Adenosin Desaminase Defizienz (ADA Defizienz) durchgeführt (Anderson et al., 1990). In den letzten Jahrzehnten wurde die Gentherapie immer stärker vorangetrieben. Die Anzahl der klinischen Studien, die auf diesem Therapieprinzip beruhen, nimmt stetig zu. Weltweit wurden bereits 1.644 klinische Studien registriert, davon 79 allein in Deutschland (Quelle: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>; Stand: Juni 2010). Bislang konnte jedoch noch keine erfolgreiche Zulassung auf dem europäischen oder US-amerikanischen Markt verzeichnet werden. Die Einsatzgebiete der Gentherapie sind vielfältig, wobei der Fokus auf der Behandlung von Krebserkrankung liegt (siehe Tabelle 1).

Einsatzgebiet der Gentherapie/Indikation	Anzahl	Prozentualer Anteil
Krebs	1.060	64,5 %
Kardiovaskuläre Erkrankungen	143	8,7 %
Monogene Krankheiten	134	8,2 %
Infektionskrankheiten	131	8,0 %
Genmarkierung	50	3,0 %
Gesunde Freiwillige	38	2,3 %
Neurologische Krankheiten	30	1,8 %
Augenkrankheiten	18	1,1 %
Andere	40	2,4 %
Gesamt	1.644	100 %

Tabelle 1: **Überblick über klinische Gentherapiestudien.** Stand Juni 2010, Quelle: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>

Bei der Gentherapie lässt sich zwischen dem *ex vivo* Gentransfer, bei dem körpereigene Zellen außerhalb des Körpers genetisch modifiziert und anschließend reimplantiert werden, und dem lokalem oder systemischem *in vivo* Gentransfer unterscheiden. Hierbei erfolgt die vektorvermittelte Übertragung der Nukleinsäuren direkt im Körper (Madeddu, 2005).

Die Herstellung des gentherapeutischen Produktes geschieht folgendermaßen: Das entsprechende Gen wird aus dem Genom der Spenderzelle isoliert und mit molekularbiologischen Methoden in einen Vektor eingebracht. Dieser Vektor dient als Vehikel für die Übertragung des Gens in die Zielzelle beziehungsweise das Zielgewebe (Gentransfer). Durch eine vor das Gen geschaltete Promotorsequenz wird es gesteuert und seine Transkriptionsrate reguliert. Es kann somit in den Stoffwechsel bzw. die Proteinbiosynthese der Zellen integriert werden.

Der Erfolg dieser Therapie ist stark abhängig von der optimalen Kombination aus Target, Vektor und Verabreichungsweg (Korpisalo und Ylä-Herttuala, 2010). Dabei ist die Wahl des Vektors entscheidend für die Effizienz der Gentherapie. Das Vektorsystem sollte verschiedenen Anforderungen genügen. Neben einer hohen Transfektionseffizienz ist häufig auch die Selektivität für bestimmte Zielzellen von Bedeutung. Die Dauer der Genexpression hängt ebenfalls vom eingesetzten Vektorsystem ab. Zudem sind die Sicherheit sowie eine fehlende Immunogenität von Bedeutung (Hallek et al., 2001).

Für den Gentransfer stehen verschiedene Vektoren zur Verfügung, die sich aufgrund ihres biologischen Hintergrunds in virale und nicht-virale Vektoren einteilen lassen (siehe Abbildung 1).

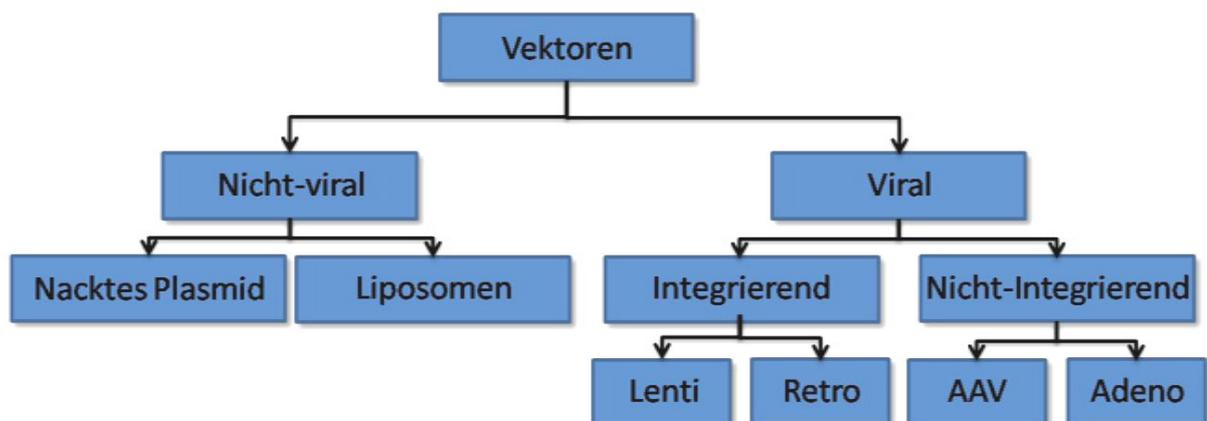


Abb. 1 **Vektoren in der Gentherapie.** (nach Korpisalo und Ylä-Herttuala, 2010); AAV=Adenoviral assoziiertes Virus

In der Tabelle 2 sind die Eigenschaften von einigen häufig verwendeten viralen Vektoren zusammengestellt.

Virustyp	Adenoviren	Adeno-assoziierte Viren (AAV)	Lentiviren	Retroviren
Transfereffizienz	hoch	hoch	mittel	mittel
Genetisches Material	dsDNA	ssDNA	RNA	RNA
Transferkapazität	8-30 kb	< 5 kb	8 kb	8 kb
Zell-Tropismus	alle	alle, v.a. Nerven und Muskel	alle	nur teilende Zellen
Integration ins Genom	nein	nein*	ja	ja
Expressionsdauer <i>in vivo</i>	transient	stabil	stabil	transient
Prä-existente Immunogenität des Empfängers	häufig	häufig	selten	selten
Inflammatorisches Potential	stark	schwach	schwach	schwach
Nachteile/ Sicherheitsrisiken	Entzündungen, Toxizität	geringe Transferkapazität	Insertion	nur teilende Zellen, Insertion
Vorteile	effiziente Transduktion	keine Immunreaktion, nicht pathogen	persistenter Gentransfer	persistenter Gentransfer

* Wildtyp Adeno-assoziiertes Virus integriert spezifisch im humanen Chromosom 19

Tabelle 2: **Charakteristika von viralen Genterapievektoren.** (nach Verma und Somia, 1997; Romano et al., 1999; Davidson und Breakefield, 2003; Thomas et al., 2003)

Der therapeutische Nutzen von viralen Vektoren ist zwar unumstritten, es sind jedoch in mehreren klinischen Studien schwerwiegende Nebenwirkungen aufgetreten, die zum Teil bis zum Tode führten. So verstarb im Jahr 1999 ein Patient nach systemischer Applikation einer hohen Dosis genetisch modifizierter Adenoviren (Somia und Verma, 2000). Zudem wurden Fälle dokumentiert, bei denen es durch Insertionsmutagenese nach Genterapie zum Auftreten einer Leukämie kam (Marshall, 2003).

Mit den sogenannten nicht-viralen Vektoren steht eine interessante Alternative zu den viralen Systemen zur Verfügung. Diese lassen sich durch chemische oder physikalische Methoden in die Zellen einschleusen. Zu den gängigsten chemischen Verfahren zählen die Calciumphosphatpräzipitation (Graham und van der Eb, 1973) und die Bildung von positiv geladenen Liposomenkomplexen (Lipofektion) (Felgner et al., 1987). Die Mikroinjektion direkt in den Zellkern (Capecchi, 1980) sowie die Elektroporation (Andreason und Evans, 1988) zählen beispielsweise zu den physikalischen Transfektionsmethoden.

Bei der Elektroporation wird die Zellmembran durch elektrische Impulse permeabilisiert, wodurch die Plasmid-DNA in die Zellen eindringen kann. Dieses Verfahren kann sowohl *ex vivo* als auch *in vivo* (Tupin et al., 2003) angewandt werden. Die Vorteile der *ex vivo* Elektroporation bestehen darin, dass die Transfektionseffizienz besser ermittelt werden kann und somit die Dosierung des Gentherapiearzneimittels vereinfacht ist.

Im Vergleich zu den viralen Methoden ist die Effizienz des Gentransfers sowie auch die Dauer der Expression des Therapeutikums, also das Zeitfenster der therapeutischen Wirkung, bei der Verwendung nicht-viraler Vektoren etwas geringer. Daher ist es nötig, die Bedingungen optimal auf die gestellten Anforderungen anzupassen (Leiden, 2000; Grigsby und Leong, 2010).

1.2 Therapeutische Angiogenese als Einsatzgebiet für die Gentherapie

1.2.1 Grundlagen der Therapeutischen Angiogenese

Störungen des Herzkreislaufsystems können eine Unterversorgung im betroffenen Gewebe bewirken, die sogenannte Ischämie. Ischämische Erkrankungen lassen sich durch unzureichende oder fehlende arterielle Blutzufuhr charakterisieren, die aufgrund verengter oder blockierter Gefäße, eines Gefäßkrampfes oder durch Abschnürung einer Arterie zustande kommt (Riedel, 1998; Novo et al., 2004).

Die Therapeutische Angiogenese ist ein Therapieansatz um diese Symptome zu lindern beziehungsweise zu heilen. Durch den Einsatz angiogenetischer Faktoren soll die Blutgefäßbildung gezielt stimuliert und somit der Unterversorgung im geschädigten Gewebe entgegengewirkt werden.

Die folgenden Mechanismen spielen während des Wachstums und der Entwicklung vaskulärer Gefäße eine Rolle: Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese.

Als Vaskulogenese wird die Neubildung von Blutgefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen, den Angioblasten, bezeichnet. Dieser Prozess tritt vor allem während der Embryogenese auf. Es wurde jedoch postuliert, dass Vaskulogenese auch postnatal stattfindet (Asahara et al., 1997; Rafii und Lyden, 2003). Nach heutigem Stand der Forschung sind diese ursprünglich aus dem Knochenmark stammenden Vorläuferzellen jedoch nicht direkt durch Einbau in das wachsende Endothelium an der Gefäßbildung

beteiligt, sondern vorwiegend indirekt durch die Freisetzung von angiogenetischen Wachstumsfaktoren (Korpisalo und Ylä-Herttuala, 2010).

Die Angiogenese bezeichnet das Wachstum neuer Gefäßstrukturen aus bereits bestehenden Strukturen durch die Aktivierung von Endothelzellen. Bei diesem Vorgang spielen Proliferation, Migration und Knospung der Zellen eine entscheidende Rolle (Madeddu, 2005). Um die Migration von Endothelzellen zu ermöglichen, müssen die Interaktionen der Zellen untereinander sowie mit der Basalmembran durch Proteinasen (Extrazelluläre Matrixmetalloproteasen, MMPs) zerstört werden. Die so aktivierten Zellen können nun einfache vaskuläre Strukturen mit Anschluss an ein bestehendes Gefäß ausbilden, die stabilisiert werden und ein dreidimensionales Netzwerk formen (Emanuelli und Madeddu, 2001). Die Angiogenese wird *in vivo* durch Hypoxie (Germain et al., 2010) und metabolische Stimuli wie Acidose und oxidativen Stress (Carmeliet, 2003) induziert.

Ein weiterer Mechanismus, der in dem therapeutischen Angiogenese-Ansatz genutzt werden kann, ist die Arteriogenese. Bei diesem Prozess bilden sich aus kleineren bestehenden Gefäßen, den Kollateralarterien, größere leitende Arterien. Diese werden durch den Einbau von Perizyten und kontraktilen Elementen stabilisiert. Arteriogenese spielt unter anderem bei der Überwindung von vaskulären Blockaden (Schaper und Scholz, 2003) eine wichtige Rolle. Ausschlaggebend sind hierfür vor allem hämodynamische Faktoren wie Blutfluss und Scherkräfte. Durch die Aktivierung des Gefäßendothels werden chemotaktische Faktoren freigesetzt, die Leukozyten rekrutieren. Diese dringen in die Gefäßwände und wandnahe Gewebe ein und stimulieren durch die Produktion von Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Proteasen die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen. Die Gefäßwand wird stärker und der Gefäßdurchmesser steigt (Heil und Schaper, 2007).

1.2.2 Angiogenetische Faktoren

Die proangiogenetischen Faktoren, die in die Prozesse der (therapeutischen) Angiogenese involviert sind, lassen sich wie folgt unterteilen: Wachstumsfaktoren, Chemokine, Transkriptionsfaktoren und Substanzen mit pleiotropen Aktivitäten (siehe Tabelle 3).

Wachstumsfaktoren	Chemokine	Transkriptionsfaktoren	Pleiotrope Substanzen
VEGF Familie	MCP-1	HIF-1 α	Tissue Kallikrein
FGF Familie		EGR-1	PAR-Aktivatoren
Angiopoietine 1 und 2		Prox-1	Thrombin
HGF, PDGF-BB			Sekretiertes FRZ- ähnliches Protein
IGF-1, IGF-2			Del-1, Cyr61, PR39
NGF			eNOS, iNOS
Gm-CSF, Neutrophin			

Tabelle 3: **Faktoren mit angiogenetischen Eigenschaften.** (nach Madeddu, 2005); VEGF=Vascular Endothelial Growth Factor; FGF=Fibroblast Growth Factor; HGF=Hepatocyte Growth Factor; PDGF-BB=Plated-Derived Growth Factor BB; IGF=Insulin-like Growth Factor; NGF=Nerve Growth Factor; GM-CSF=Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor; MCP-1=Monocyte Chemo-Attractant Protein 1; HIF=Hypoxia-Inducible Transcription Factor; EGR-1=Early Growth Response-1; PAR=Proteinase-Activated Receptors; FRZ=Frizzled; eNOS/iNOS=Endothelial/Inducible Nitric Oxid Synthase

Die Familie der VEGF, bestehend aus VEGF-A, -B, -C, -D, -E, -F und PlGF (Placental Growth Factor), nimmt eine Schlüsselrolle in der Stimulation des vaskulären Wachstums ein. Sie reguliert sowohl die Vaskulogenese, die Angiogenese als auch die Arteriogenese. Hierbei ist die Funktion von VEGF-A besonders hervorzuheben. Das lässt sich unter anderem daran erkennen, dass sich die Mutation von nur einem VEGF-A Allel bereits letal auf die embryonale Entwicklung durch die gestörte Bildung des vaskulären Systems auswirkt (Carmeliet et al., 1996).

Neben den VEGFs sind die Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGF Familie, bestehend aus mindestens 23 Mitgliedern) potente Stimulatoren der Angiogenese. Diese Heparin-bindenden Polypeptide können viele Zelltypen aktivieren, zu denen auch Endothelzellen und die Zellen der glatten Muskulatur gehören (Presta et al., 2005; Chen und Forough, 2006). Zudem sind sie in die embryonale Entwicklung, die Geweberegenerierung, die Zelltransformation und das Tumorwachstum involviert (Murakami und Simons, 2008).

Angiopoietin-1 und -2 stabilisieren durch die Stimulation der Interaktion zwischen Endothelzellen und Perizyten das vaskuläre Netzwerk, das durch VEGF induziert wurde (Madeddu, 2005). Weitere Wachstumsfaktoren, die die Gefäßbildung beeinflussen, wirken unter anderem, indem sie die Transkription von VEGF und anderen angiogenetischen Proteinen hochregulieren. HIF-1 α aktiviert beispielsweise gleich mehrere VEGF-A Isoformen, was einen physiologischeren Effekt hat als der Gentransfer einer einzelnen Isoform. Die NO-Synthasen eNOS und iNOS produzieren

Stickstoffmonoxid (NO), das ebenfalls ein wichtiger Mediator der Angiogenese und Arteriogenese ist.

Die Abbildung 2 gibt einen Überblick, wie einige proangiogenetische Faktoren in das Wachstum von funktionalen Gefäßen eingreifen.

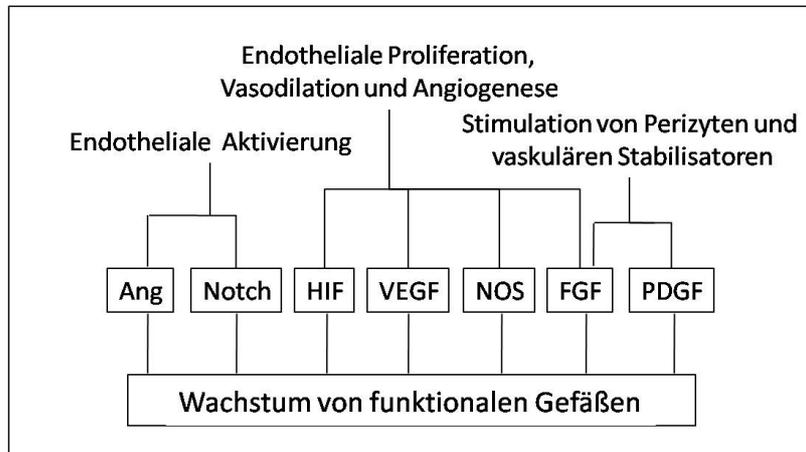


Abb. 2: **Faktoren, die das Gewebewachstum induzieren können.** (nach Korpisalo und Ylä-Herttuala, 2010)

1.2.3 Präklinische und klinische Studien zur Therapeutischen Angiogenese

Die Anwendung von angiogenetischen Faktoren zu therapeutischen Zwecken geht auf die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Folkman zurück (Folkman, 1971). Er dokumentierte die Abhängigkeit des Tumorwachstums von neovaskulatorischen Prozessen und postulierte den Einfluss der Wachstumsfaktoren. In den letzten Jahrzehnten hat sich das Verständnis angiogenetischer Mechanismen stark erweitert. In den frühen 1990ern konnte in Tierexperimenten gezeigt werden, dass sich durch die Gabe von rekombinantem bFGF die Dichte der Arteriolen und Kapillaren nach einem Infarkt im Herzmuskel von Hunden (Yanagisawa-Miwa et al., 1992) und im „Hindlimb“ Ischämiemodell bei Kaninchen (Takeshita et al., 1994) im Vergleich zur Kontrolle erhöhte. Mit diesen Experimenten konnte der therapeutische Effekt der Wachstumsfaktoren *in vivo* nachgewiesen und in nachfolgenden Experimenten bestärkt werden. Erste klinische Studien mit rekombinanten Proteinen zur Behandlung ischämischer Erkrankungen folgten. Die VIVA Studie (Vascular Endothelial Growth Factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis) war die erste randomisierte, doppelblinde, placebokontrollierte Phase II Studie, die die Sicherheit und Effizienz einer intrakoronaren und intravenösen Infusion von rekombinantem humanem VEGF (rhVEGF) untersucht hat (Henry et al., 2003). Jedoch war 60 Tage nach der ersten Infusion kein eindeutiger Unterschied zwischen den drei Patientengruppen erkennbar

(Placebo, geringe rhVEGF-Dosis, hohe rhVEGF-Dosis). Lediglich an Tag 120 zeichnete sich ein signifikant positiver Effekt durch die Gabe einer hohen rhVEGF Dosis ab.

Die Ergebnisse der ersten klinischen Phase I Studie mit dem Fibroblastenwachstumsfaktor-1 (aFGF) wurden 1998 von Schumacher et al. publiziert (Schumacher et al., 1998). Sie injizierten aFGF intramyokardial in Patienten mit ischämischen Herzerkrankungen und konnten die Bildung eines kapillaren Netzwerkes um die Injektionsstelle nachweisen.

Über die Gabe von rekombinantem bFGF liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. In der FIRST Studie (FGF-2 Initiating Revascularization Trial), einer randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten Multizenterstudie, konnten nach einer einmaligen intrakoronaren bFGF-Injektion keine signifikanten Unterschiede zur Placebogruppe festgestellt werden (Simons et al., 2002). Die TRAFFIC Studie (Therapeutic Angiogenesis with Recombinant bFGF for Intermittent Claudication) konnte jedoch in peripheren Gefäßerkrankungen einen positiven Effekt nach einmaliger intraarterieller Injektion von bFGF zeigen, während die wiederholte Gabe keinen zusätzlichen Erfolg bewirkte (Lederman et al., 2002).

Bedingt durch die kurze Halbwertszeit von Wachstumsfaktoren ist ihre Wirkung nach einmaliger Gabe stark beschränkt. Diesem Problem soll durch den Einsatz gentherapeutischer Methoden begegnet werden. Sie haben den Vorteil, dass sie schon durch die einmalige Applikation langanhaltende therapeutische Effekte hervorrufen können (Ylä-Herttuala und Alitalo, 2003).

Das Konzept der Therapeutischen Angiogenese durch Gentherapie konnte bereits in verschiedenen Tiermodellen und klinischen Studien erfolgreich getestet werden (Mikroulis et al., 2007; Ahn et al., 2008a und 2008b).

Erste klinische Studien, bei denen zum Beispiel VEGF₁₆₅-kodierende Plasmide (phVEGF₁₆₅) direkt in den ischämischen Muskel von Patienten mit einem Ischämiesyndrom im Bein injiziert wurden, zeigten positive Effekte, unter anderem durch die Entstehung neuer kollateraler Blutgefäße und die allgemeine Verbesserung der distalen Durchblutung (Baumgartner et al., 1998). Diese positiven Resultate konnten auch in Folge der Injektion von phVEGF₁₆₅ in den Herzmuskel beobachtet werden (Losordo et al., 1998; Symes et al., 1999). Zudem konnte im Rahmen dieser Studien gezeigt werden, dass die Injektion von reinem Plasmid keine systemischen Reaktionen hervorruft. Adenovirale Vektoren wurden beispielsweise in der AGENT Studie (Angiogenic Gene Therapy; FGF-4) am Herzen (Grines

et al., 2002) oder der RAVE Studie (Regional Angiogenesis with VEGF; VEGF₁₂₁) zur Behandlung von peripheren arteriosklerosen Gefäßerkrankungen eingesetzt (Rajagopalan et al., 2003). Beide Studien zeigten ebenfalls positive klinische Auswirkungen auf das Krankheitsprofil, wobei die Placebogruppe und die adenoviral behandelten Patienten keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Auftretens schwerwiegender Nebenwirkungen und Ereignisse erkennen ließen. Ein Vergleich unterschiedlicher Transfermethoden erfolgte unter anderem in der KAT Studie (Kuopio's Angiogenesis Trial). Hier wurden Patienten mit koronarer Herzkrankheit entweder mit adenoviralem VEGF₁₆₅ oder mit einem Plasmid-Liposom-Komplex, der das VEGF₁₆₅ Gen enthielt, behandelt (Hedman et al., 2003). Während die Restenose und der Lumendurchmesser keine signifikanten Unterschiede zwischen der Placebogruppe und den gentherapeutisch behandelten Patienten aufwies, wurde jedoch das Myokard bei den Patienten, die adenovirales VEGF₁₆₅ erhielten, besser durchblutet. Die Langzeiteffekte der Therapie wurden über acht Jahre verfolgt und es konnten keine Unterschiede hinsichtlich des Auftretens schwerwiegender Nebenwirkungen oder der Mortalität in den drei Gruppen festgestellt werden (Hedman et al., 2009).

Neben dem Einsatz einzelner Wachstumsfaktoren wurden auch Therapien mit kombinierter Gabe von mehreren Wachstumsfaktoren durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass bFGF und VEGF einen synergistischen Effekt ausüben (Asahara et al., 1995; Kondoh et al., 2004). So führt die Injektion von Fibroblasten, die nach adenoviraler Transduktion sowohl bFGF als auch VEGF₁₆₅ exprimieren, zu einer verringerten Nekroserate im ischämischen Hautlappenmodell der Ratte. In diesen Tieren ist ebenfalls im Vergleich zu den Kontrollgruppen, die nur mit einem Wachstumsfaktor behandelt wurden, ein Anstieg der funktionalen, stabilen Gefäße erkennbar (Spanholtz et al., 2010). Zudem konnte im Rattenmodell der „Hindlimb“ Ischämie durch den zellbasierten Gentransfer von bFGF und VEGF₁₆₅ eine Proliferation der Kollateralarterien nachgewiesen werden (Zhang et al., 2011).

1.3 Regulatorische Aspekte der Gentherapie für die Anwendung am Menschen

Die Anwendung der Gentherapie am Menschen wird auf Bundesebene durch die Landesbehörden und spezielle Einrichtungen wie das Paul-Ehrlich-Institut (PEI) sowie auf europäischer Ebene durch die Europäischen Arzneimittelagentur (EMA, European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) streng reguliert. Grundlegend darf der Gentransfer am Menschen in Deutschland ausschließlich in somatischen Zellen erfolgen, da der Keimbahngentransfer durch das Embryonenschutzgesetz (ESchG) verboten ist.

Gentherapeutika gehören zusammen mit somatischen Zelltherapeutika und biotechnologisch bearbeiteten Gewebeprodukten gemäß den europäischen Richtlinien 2001/83/EG und 1394/2007/EG zu den „Arzneimitteln für neuartige Therapien“ (ATMP, Advanced Therapy Medicinal Products).

Die Definition besagt, dass ein Gentherapeutikum ein Arzneimittel ist, „bei dem durch eine Reihe von Verarbeitungsgängen der (*in vivo* oder *ex vivo* erfolgende) Transfer eines prophylaktischen, diagnostischen oder therapeutischen Gens (d. h. eines Stücks Nukleinsäure) in menschliche oder tierische Zellen und dessen anschließende Expression *in vivo* bewirkt werden sollen. Der Gentransfer erfordert ein Expressionssystem, das in einem Darreichungssystem, einem sogenannten Vektor, enthalten ist, der viralen aber auch nicht-viralen Ursprungs sein kann. Der Vektor kann auch in einer menschlichen oder tierischen Zelle enthalten sein.“ (RL 2001/83/EG, Anhang I, Teil VI). Die Anwendung von Gentherapeutika kann durch gebrauchsfertige Vektoren mit eingebautem genetischem Material oder allogene, xenogene sowie autologe genetisch modifizierte Zellen erfolgen. Somit umfassen Gentherapeutika nackte Nukleinsäuren, komplexe Nukleinsäuren, nicht-virale Vektoren, virale Vektoren und genetisch veränderte Zellen. Im Falle, dass das Arzneimittel humane Zellen oder Gewebe enthält, tritt ebenfalls die Richtlinie 2004/23/EG in Kraft. Diese regelt vorwiegend die Spende, Beschaffung und Testung der ATMP.

Um den Übergang vom Forschungslabor zur klinischen Anwendung am Menschen zu vollziehen, müssen gesetzlich geregelte Verfahrensschritte durchlaufen werden. Zunächst muss die Wirksamkeit und Unbedenklichkeit des Gentherapeutikums in geeigneten Labor- und Tierexperimenten im Rahmen einer präklinischen Studie nachgewiesen werden. Präklinische Studien sind nach den Bestimmungen der Guten Laborpraxis (GLP, Good Laboratory Practice) durchzuführen (RL 87/18/EWG, 88/320/EWG). Zudem müssen

alle Versuche an Tieren dem Tierschutzgesetz (TierSchG) und der Richtlinie 86/609/EWG unterliegen. Ziel der präklinischen Prüfung ist es, Aussagen über die Pharmakologie, Pharmakokinetik und Toxikologie des Gentherapeutikums zu liefern. Der Umfang dieser Tests wird durch den Anhang I der Richtlinie 2001/83/EG sowie in der Richtlinie 2009/120/EG bestimmt. Zudem gibt die EMEA Richtlinien heraus, die beschreiben, welche Untersuchungen benötigt werden, bevor eine klinische Studie erfolgen kann (CPMP/BWP/3088/99, EMEA/CHMP/410869/2006, EMEA/GTWP/125459/2006, EMEA/273974/2005).

Nach der präklinischen Forschung folgt die klinische Prüfung, die zuvor von der zuständigen Ethikkommission zustimmend bewertet und durch die zuständige Bundesoberbehörde genehmigt werden muss. Dieses Genehmigungsverfahren wird durch die GCP-Verordnung (GCP, Good Clinical Practice) (GCP-V) und durch das Arzneimittelgesetz (AMG), § 40-42a, geregelt. Die klinische Prüfung von Arzneimitteln am Menschen ist laut AMG definiert als „jede am Menschen durchgeführte Untersuchung, die dazu bestimmt ist, klinische oder pharmakologische Wirkungen von Arzneimitteln zu erforschen oder nachzuweisen oder Nebenwirkungen festzustellen oder die Resorption, die Verteilung, den Stoffwechsel oder die Ausscheidung zu untersuchen, mit dem Ziel, sich von der Unbedenklichkeit oder Wirksamkeit der Arzneimittel zu überzeugen“ (AMG, §4, Abs. 23). Durch die Unterteilung in mehrere Phasen (Phase 0 – IV, siehe Tabelle 4) ist der Verlauf der Studie geregelt. Der Übergang in die nächsthöhere Phase wird von der zuständigen Aufsichtsbehörde nur dann genehmigt, wenn die vorangegangene Studienphase mit Erfolg abgeschlossen wurde.

Phase	Hauptziel
0	Pharmakokinetik, Pharmakodynamik, Prüfungen mit subtherapeutischen Dosen
I	Pharmakokinetik, Pharmakodynamik, Verträglichkeit und Sicherheit des Arzneimittels, in der Regel Prüfungen an gesunden Probanden
II	Explorative Prüfungen zum Generieren von Hypothesen, Überprüfung eines Therapiekonzepts („proof of concept“) und Dosisfindung am Patienten
III	Konfirmatorische Prüfungen zum Testen einer Hypothese, Wirksamkeitsnachweis in der Regel für die Marktzulassung eines Arzneimittels
IV	Langzeitsicherheit, Prüfungen mit zugelassenen Arzneimitteln innerhalb der Zulassungsbedingungen (zugelassene Indikation, zugelassene Dosis usw.)

Tabelle 4: **Phasen der klinischen Prüfung und deren Hauptziele.** (nach Schriever et al., 2009)

Für die Zulassung der Gentherapeutika kann auf der Basis der Ergebnisse der klinischen Prüfungen aus den Phasen I bis III ein Antrag bei der EMA gestellt werden (Verordnung 1394/2007/EG). Die Beurteilung dieses Antrags erfolgt durch den Ausschuss für neuartige Therapien (CAT, Committee for Advanced Therapies), der aus Wissenschaftlern und Ärzten mit sehr gutem relevanten Fachwissen besteht. Dieser Ausschuss arbeitet den Entwurf eines Gutachtens über die Qualität, Unbedenklichkeit und Wirksamkeit des betreffenden Arzneimittels aus, welcher vom Ausschuss der Agentur für Humanarzneimittel (CHMP, Committee for Medicinal Products for Human Use) angenommen oder abgelehnt werden kann. Die endgültige Zulassung erfolgt durch die EU-Kommission. Nach der Genehmigung erfolgen im Rahmen der Phase IV der Studie Nachbeobachtungen über Wirksamkeit und Nebenwirkungen des neuartigen Arzneimittels, welche in einem Risikomanagementsystem dokumentiert werden müssen (EMA/149995/2008, EMA/CHMP/GTWP/60436/2007).

Neben der Anwendung ist auch die Herstellung von Gentherapiearzneimitteln gesetzlich geregelt. Sie sollte nach den Grundsätzen und Leitlinien der Guten Herstellungspraxis (GMP, Good Manufacturing Practice) erfolgen, die in RL 2003/94/EG beschrieben werden. Da bei der Herstellung gentechnische Verfahren eingesetzt werden, greift hier zudem das Gentechnikgesetz (GenTG). Dieses gilt für gentechnische Anlagen, gentechnische Arbeiten, die Freisetzung von gentechnischen Organismen sowie deren Inverkehrbringen. Die Anwendung gentechnisch veränderter Organismen (GVOs) am Menschen fällt jedoch nicht unter dieses Gesetz und muss daher nicht bei der zuständigen Landesbehörde angezeigt werden.

Im Zuge der Globalisierung wird angestrebt, einheitliche Vorschriften für die Zulassung von Arzneimitteln zu schaffen. In Europa werden zunehmend einheitliche Regularien angewandt. Zudem sorgt die ICH Konferenz (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) für eine Harmonisierung der Richtlinien zwischen Europa, Japan und den USA.

1.4 Präklinische Untersuchungen zur biologischen Sicherheit der Gentherapie

Die Anwendung von gentherapeutischen Arzneimitteln am Patienten beinhaltet verschiedene Risiken, die zuvor in präklinischen Untersuchungen abgeschätzt werden müssen. Hierzu zählen das Entstehen replikationskompetenter Vektoren oder neuer Stämme, der Austausch bestehender Genomsequenzen („Reassortment“) und die neoplastische Vermehrung aufgrund von Insertionsmutagenese (RL 2009/120/EG). Die Festlegung von Art und Umfang der präklinischen Studien, die für die Bestimmung der nichtklinischen Unbedenklichkeitsdaten erforderlich sind, hängt hierbei stark von der Art und Wirkungsweise des Gentherapeutikums ab. Es liegen jedoch noch keine konkreten produktspezifischen Leitlinien vor, die diese Problematik regeln. Grundsätzlich beinhalten die präklinischen Untersuchungen die Beurteilung der Pharmakologie, Pharmakokinetik und Toxikologie des Arzneimittels.

Pharmakologische Studien umfassen die Untersuchung der Wirksamkeit *in vitro* und *in vivo* in geeigneten Tiermodellen („proof of concept“ Studien, Analyse der Expressionsstärke und -dauer, Spezifität sowie der funktionellen Aktivität des Therapeutikums). Die Pharmakokinetik muss Informationen über die Verteilung des Arzneimittels und des Wirkstoffes im Körper geben, die Ausscheidung an die Umwelt untersuchen und zudem auf die Gefahr eines Gentransfers in die Keimbahn eingehen. Zur Bestimmung der Toxikologie des Gentherapeutikums müssen unter anderem die Karzinogenität, Immunogenität und Immunotoxizität geprüft werden, sowie die Integration in das Genom untersucht werden.

Zur Untersuchung der verschiedenen Aspekte ist es nötig, geeignete Analysemethoden zu etablieren. Diese müssen die spezifischen Anforderungen der Arzneimittel für neuartige Therapien erfüllen.

Zur Untersuchung der Pharmakologie und Pharmakokinetik eignet sich besonders die Real-Time PCR. Diese Methode stellt eine Weiterentwicklung der konventionellen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dar, welche 1985 erstmals veröffentlicht wurde (Saiki et al., 1985).

Das Prinzip beruht auf Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch zyklische Wiederholung von drei Reaktionsschritten: Denaturierung (Auftrennung des DNA-Doppelstranges), Primer Annealing (spezifische Anlagerung von synthetischen Oligodesoxynukleotiden

(Primern) an die DNA Einzelstränge) und Elongation (Synthese eines neuen DNA-Stranges durch die DNA-Polymerase komplementär zum bestehenden Einzelstrang). In jedem Zyklus wird die Menge der Ziel-DNA, also des DNA-Fragments zwischen dem Primerpaar, theoretisch verdoppelt. Die Analyse der konventionellen PCR erfolgt in der Regel durch Agarose-Gelelektrophorese und Vergleich der Bandenstärke nach Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. Ethidiumbromid). Hierfür ist es jedoch wichtig, dass die Reaktion in der exponentiellen Phase analysiert wird.

Im Vergleich zu dieser nur semi-quantitativen Methode liefert die Real-Time PCR die Möglichkeit, die Vervielfältigung der Nukleinsäuren in Echtzeit zu erfassen und zu quantifizieren. Die Detektion erfolgt am Ende oder während eines PCR-Zyklus mit Hilfe von Fluoreszenzsignalen, wobei die Stärke des Signals proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die hohe Sensitivität und Spezifität. Daher ist sie gut geeignet, um die Expression und die Verteilung von gentherapeutischen Arzneimitteln im Körper zu untersuchen. Sie genügt zudem den Anforderungen der EMEA-Richtlinie CPMP/BWP/3088/99, die für die Bestimmung von Expressionsstärke und -ort sowie von der Verteilung des Vektors Methoden empfiehlt, die auf der Amplifikation von Nukleinsäuren beruhen.

Bei der Real-Time PCR kann grundsätzlich zwischen nichtspezifischen (unabhängig von der DNA Sequenz) und spezifischen Detektionssystemen unterschieden werden.

Interkalierende Cyaninfarbstoffe, zu denen das SYBR GreenTM I gehört, können sequenzunspezifisch und mit hoher Affinität an doppelsträngige DNA Moleküle binden. Durch die dadurch stattfindende Konformationsänderung bzw. planare Fixierung des Moleküls ist die Fluoreszenz um ein 1000faches höher als ungebunden in Lösung (Nygren et al., 1998), was zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals proportional zum Anstieg der doppelsträngigen PCR-Produkte führt. Da die Bindung sequenzunabhängig ist, kann während der Amplifizierung nicht zwischen den PCR-Produkten und unerwünschten Nebenprodukten, wie Primerdimeren, unterschieden werden. Zur Kontrolle der Reinheit des Amplifikats sollte daher stets eine Schmelzkurvenanalyse erfolgen, die eine Differenzierung der PCR-Produkte nach Länge, Sequenz und GC/AT-Verhältnis erlaubt. Hierbei wird bei einer schrittweisen Erhöhung der Temperatur im Reaktionsansatz die Fluoreszenz gemessen. Wird die jeweilige Schmelztemperatur des Amplifikats erreicht, denaturiert dieses unter Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffes in die Einzelstränge und

ein starker Abfall des Fluoreszenzsignals ist detektierbar. Mit dieser Methode lassen sich Produkte unterscheiden, deren Schmelztemperaturen um weniger als 2°C variieren (Ririe et al., 1997). Um die Spezifität der PCR zu erhöhen, ist es wichtig, die Primer sorgfältig auszuwählen und die Reaktionsbedingungen für jedes Primerpaar zu optimieren. Da an ein PCR-Produkt, abhängig von der Produktlänge, mehrere Fluoreszenzmoleküle binden, ist diese Methode sensitiver als der Einsatz von spezifischen PCR-Sonden. Zudem ist sie weniger kostenintensiv.

Die spezifische Detektion der Nukleinsäureamplifikation basiert auf dem Einsatz Fluoreszenz-gelabelter Sonden, die gezielt an eine Sequenz innerhalb der Ziel-DNA binden. Unspezifische PCR-Produkte oder Primerdimere werden somit nicht visualisiert. Das erhöht auf der einen Seite die Spezifität dieser Methode, auf der anderen Seite ist es jedoch nicht mehr möglich Amplifikationsartefakte zu erkennen, die Einfluss auf die Effizienz der Reaktion haben können. Die meisten der verwendeten SONDENSYSTEME beruhen auf dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers (FRET) (Bustin und Nolan, 2004). Hierbei wird die Energie eines angeregten Fluoreszenzmoleküls (Donor) auf ein zweites Molekül (Rezeptor) übertragen. Der Rezeptor kann entweder ebenfalls ein Fluoreszenzfarbstoff sein, was zur Emission von Photonen mit geringerer Wellenlänge führt, oder ein nichtfluoreszierender Quencher, welcher die Lichtenergie strahlungsfrei in Wärme umwandelt (Bustin, 2000). Dieser Transfer kann nur stattfinden, wenn die Emissions- und Absorptionsspektren überlappen und sich beide Moleküle in unmittelbarer Nähe zueinander befinden. Wird der Abstand vergrößert, nimmt der Energietransfer stark ab und das Fluoreszenzsignal des Donors nimmt zu (Clegg, 1992).

Für die Auswertung der Real-Time PCR ist die exponentielle Phase von Bedeutung. Der Zyklus, in dem die Fluoreszenz der Probe erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz (Schwellenwert, Threshold) steigt, wird als Ct (Threshold Cycle) beziehungsweise Cq (Cycle of Quantification) bezeichnet. Der Cq-Wert hängt von der Ausgangskonzentration der Probe ab. Je höher diese ist, desto früher wird der Schwellenwert überschritten. Am Cq ist die Menge an neu synthetisierter DNA in allen Reaktionsgefäßen identisch. Daher kann dieser Wert für die Quantifizierung genutzt werden. Es wird grundsätzlich zwischen absoluter und relativer Quantifizierung unterschieden. Durch die absolute Quantifizierung kann anhand einer externen Kalibrierkurve (Standardkurve) die Anzahl der Ausgangsprodukte ermittelt werden. Bei

der relativen Quantifizierung wird die Expression des Zielgens auf ein nicht reguliertes Referenzgen (HKG, Housekeeping Gen) bezogen. Diesen Vorgang bezeichnet man als Normalisierung. Die Varianz der Expressionsergebnisse wird reduziert, da HKG und Zielgen in gleichem Maße von Gewebe- und Matrixeffekten, unterschiedlichen RNA-Extraktionseffizienzen und Problemen bei der Reversen Transkription betroffen sind. Durch den Vergleich von Kontrollen und behandelten Proben lassen sich somit Expressionsunterschiede (Ratio) analysieren.

Die Real-Time PCR stellt folglich eine geeignete Methode dar, um sowohl die absolute Konzentration des Gentherapeutikums zu detektieren als auch Differenzen in der Expression zwischen der Kontrolle und den behandelten Proben zu erkennen.

Die Analyse der „Biodistribution“ der Vektoren ist eine wichtige Voraussetzung, um (I) Organe zu identifizieren, in denen toxische Effekte auftreten können, (II) die Übertragung des genetischen Materials auf die Keimbahn auszuschließen sowie (III) das Risiko der Ausbreitung im Patienten und in dessen Umfeld abzuschätzen (Gonin und Gaillard, 2004). Somit gehören diese Untersuchungen zu den präklinischen Studien über die Sicherheit des Gentherapiearzneimittels. Für die Anwendung der Real-Time PCR als präklinische Prüfungsmethode ist es jedoch wichtig, dass alle Schritte validiert sind. Hierfür müssen die Parameter bestimmt und festgelegt werden, die die Ergebnisse beeinflussen, um die methodische Varianz zu minimieren.

In den veröffentlichten Tierexperimenten wurde vorwiegend die TaqMan™ Sondentechnik angewandt (Gonin und Gaillard, 2004). Es ist aber auch möglich, die SYBR Green™ Real-Time PCR zu validieren und somit valide Aussagen über die Verteilung von genetischem Material im Körper zu gewinnen (Fu et al., 2009). Allen Analysemethoden muss jedoch eine gründliche Optimierung der Reaktionsbedingungen voraus gehen.

1.5 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Zu den Arzneimitteln für neuartige Therapien gehören gemäß der EG Verordnung Nr. 1394/2007 unter anderem genetisch modifizierten Zellen. Im Rahmen der Therapeutischen Angiogenese wurden transfizierte isogene Fibroblasten zur Behandlung einer induzierten Ischämie im Tiermodell eingesetzt. Für dieses Verfahren müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

1. Das gentherapeutische Verfahren muss effizient, sicher und reproduzierbar angewandt werden können.
2. Die Expression der therapeutischen Proteine muss transient, also nur über einen bestimmten Zeitverlauf, erfolgen.
3. Die Integration des Wirkstoffes in die Körperzellen oder in die Keimbahn ist auszuschließen.
4. Die Wirkung der therapeutischen Proteine muss lokal begrenzt sein.
5. Eine Verteilung des Arzneimittels (modifizierte Fibroblasten) sowie des Wirkstoffes (Plasmid) über den gesamten Organismus muss analysiert und möglichst ausgeschlossen werden können.

In der vorliegenden Arbeit soll daher der Frage nachgegangen werden, welches Gefährdungspotential von dieser neuartigen Therapieform für den Patienten ausgeht. Für die Anwendung gentechnischer Verfahren in präklinischen und klinischen Studien gibt es bereits mehrere Richtlinien, die die genannten Aspekte berücksichtigen und die Anforderungen beschreiben, die diese Therapieansätze erfüllen müssen. Hierbei handelt es sich jedoch nur um Richtwerte und nicht um konkrete produktspezifische Leitlinien. Ziel dieser Arbeit ist daher die Übertragung der Richtlinien auf die speziellen Anforderungen dieses Verfahrens. Hierfür ist es notwendig, geeignete analytische Methoden zu wählen, an die Fragestellung anzupassen und ihren Nutzen zu bewerten. Das Hauptziel ist hierbei die Untersuchung der Verteilung des Wirkstoffes im Körper (Biodistribution).

Die Fragestellungen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, können daher wie folgt formuliert werden:

1. Besteht ein effizientes, sicheres und reproduzierbares Verfahren, um Gewebezellen genetisch zu modifizieren?
2. Welches Gefährdungspotential geht vom Einsatz gentechnisch veränderter Zellen für das Tier aus?
3. Welche analytischen Verfahren sind geeignet, dieses Gefährdungspotential, vor allem in Hinblick auf die biologische Sicherheit einer Gentherapie, zu untersuchen?
4. Ist das gewählte Modellsystem, der zellbasierte Gentransfer von genetisch modifizierten isogenen Fibroblasten im „Hindlimb“ Ischämiemodell der Ratte, sicher in Bezug auf die lokale, transiente Expression des Therapeutikums sowie die Verteilung des Vektors im Körper?
5. Hat die Expression der humanen Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF an der Injektionsstelle Auswirkungen auf Signalwege, die infolge von Stress und Toxizität aktiviert werden, wie Apoptose, Nekrose oder Inflammation?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Software

Gerät	Hersteller
Absauggerät UniVac 1	Whatmann GmbH, Dassel, D
Absaugpumpe mit Flasche	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Autoklav Typ V-150	Systec GmbH, Wettenberg, D
CASY® Zellzähler und Analysesystem Modell TT	innovatis AG, Reutlingen, D
Chirurgische Scheren (Aesculap)	Braun Melsungen AG, Melsungen, D
CO ₂ Inkubator Modell 381	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Dispensette® III	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, D
Durchflusszytometer	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Einfriercontainer (Nunc)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Eismaschine	Ziegra- Eismaschinen GmbH, Isernhagen, D
Elektrophoresegerät PowerPack Basic	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Elektroporationsgerät Nucleofector® II, KAA-1001	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz
ELISA Reader Sunrise Remote Typ 1237301	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Gefrierschrank -86C ULT Freezer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Geldokumentation TFP-M/WL mit Foculus Digital Camera System	PHASE GmbH, Lübeck, D
Kühl- und Gefrierkombination KGTes 4066 Index 27B/001, Typ 561294	Liebherr AG, Bulle, Schweiz
Küvette Sub Micro 40 µl	Starna Scientific Ltd., Hainault, GB
Magnetrührer Micro-Stir 1 PL	Wheaton Industries Inc., Millville, USA
Mikroskop ECLISPE TS 100 mit Fluoreszenzeinheit Model C-SHG Hg 50W und Kamerasystem Digital Sight DS-U1	Nikon Instruments Inc., Melville, USA
Mikrowelle HS23024	Siemens AG, Berlin, D
pH-Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, D
Pinzetten	Omnilab-Laborzentrum GmbH&Co. KG, Bremen, D
Pipetten 0,1 - 1000 µl Reference	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH&Co. KG, Eberstadt, D
Real-Time PCR Gerät iCycler Thermal Cycler mit MyiQ™ Optics Module	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Reibeschale (Mörser) und Pistill	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, D
Schermaschine Favorita II mit 1/20 mm Scherkopf	Lennartz GmbH Medizintechnik, Hamburg, D
Sicherheitswerkbank Klasse 2 Clean Air EF6EC	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Signaltimer mit Zeituhr	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, D
Software für das Mikroskop: NIS-Elements D3.00	Nikon Instruments Inc., Melville, USA

Software für Bestimmung der PCR Effizienz: LinRegPCR Version 7.5	Dr. J.M. Ruijter, Amsterdam, Niederlande
Software für Durchflusszytometer: Summit v4.3	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Software für ELISA Reader: Magellan	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Software für molekularbiologische Fragestellungen: GENTle V1.9.4	M. Manske, Universität zu Köln, D
Software für Real-Time PCR Gerät: iQ5 V2.0	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Software für Zellzähler: CASYexcell 2.2	innovatis AG, Reutlingen, D
Spektralphotometer Libra S22	Biochrom AG, Berlin, D
Spülmaschine Professional G7883	Miele KG, Gütersloh, D
Standardoperationsinstrumentarium inkl. Mikrobesteck	
Stickstoffanlage XLC 810 HEFD GEN 2 mit Tec 2000 System Monitor und LAB50 (MVE)	Chart Industries Inc., Ball Ground, USA
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg, D
Transferpette-8 703610, 20-200 µl	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, D
Trockenschrank T 20, Heraeus	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, D
Ultra Turrax T25 Basic	IKA® Werke GmbH und Co. KG, Staufen, D
Vortexer Minishaker MS2	IKA® Werke GmbH und Co. KG, Staufen, D
Waagen LA 4200 S, LA 120 S, MC 5	Sartorius AG, Göttingen, D
Wasseraufbereitungssystem Control 300 mit Ionenaustauscher DI12800	TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Niederelbert, D
Wasserbad Typ 1004	GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, D
Wheaton-Reaktionsmischgefäß Typ 9-0860	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, D
Zentrifugen 5810R, 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, D

2.1.2 Reagenzien und Kits

Reagenz / Kit	Hersteller
(s)-(+)-Camptothecin	Alexis Biochemicals, San Diego, USA
1 Kb DNA Ladder	Invitrogen Corp., Carlsbad, USA
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, D
2-Propanol, Rotipuran	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, D
Amphotericin B	Biochrom AG, Berlin, D
Basic Nucleofector® Kit für primäre Fibroblasten	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz
Bovines Serum Albumin (BSA)	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, D
CASY®ton	innovatis AG, Reutlingen, D
Collagenase II	Biochrom AG, Berlin, D
Cryopan Serumfree Freezing Medium	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D
Dispase 2	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, D
DMEM mit Glutamax I, Natriumpyruvat und 4,5 g/l Glucose	Invitrogen Corp., Carlsbad, USA

MATERIAL UND METHODEN

DNA Away®	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, D
dNTP Set (4x 25pmol)	Invitrogen Corp., Carlsbad, USA
Dulbecco's PBS (1x) ohne Magnesium und Calcium	Invitrogen Corp., Carlsbad, USA
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, D
FBS (Fetal Bovine Serum) Lot 0963H	Biochrom AG, Berlin, D
Fluoromount Eindeckmedium	Biozol GmbH, Eching, D
GeneJET™ PCR Purification Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
Humanes FGF basic, rekombinant	Invitrogen Corp., Carlsbad, USA
Humanes VEGF, rekombinant	Invitrogen Corp., Carlsbad, USA
iQ™ SYBR® Green Supermix 2x	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Ketamin (Ketanest 100 mg/ml)	Pfizer Pharma GmbH, Berlin, D
Kohlendioxid für Brutschrank und Tierexperiment zur Narkoseeinleitung	Haustechnik
Maxima™ SYBR® Green Supermix/Fluorescein	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
NucleoSpin® RNA II Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, D
NucleoSpin® Tissue Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, D
Nuklease-freies Wasser	QIAGEN GmbH, Hilden, D
Oligo dT ₁₂₋₁₈ Primer	Invitrogen Corp., Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin (100x)	Biochrom AG, Berlin, D
pmaxbFGF	PlasmidFactory GmbH & Co. KG, Bielefeld, D
pmaxGFP	PlasmidFactory GmbH & Co. KG, Bielefeld, D
pmaxVEGF	PlasmidFactory GmbH & Co. KG, Bielefeld, D
Polyclonal Antibody to Mouse IgG [H&L] – FITC	Acris Antibodies GmbH, Herford, D
Primer only geNorm Kit für 6 Gene für Ratte	PrimerDesign Ltd., Southampton, GB
Anti-Prolyl-4-Hydroxylase beta (Fibroblastenmarker)	Acris Antibodies GmbH, Herford, D
Propidiumiodid	Invitrogen Corp., Carlsbad, USA
Quantikine® human FGF basic ELISA Kit	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA
Quantikine® human VEGF ELISA Kit	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA
Random Primer	Invitrogen Corp., Carlsbad, USA
Rat RT2 RNA QC PCR Array	SABioscience Corp., Frederick, USA
Rekombinante DNase (RNase-frei)	Applied Biosystems Corp., Carlsbad, USA
RIDASCREEN® Mycoplasma IFA	PAN Biotech, Aidenbach, D
RNA Away®	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, D
RNaseOut®	Invitrogen Corp., Carlsbad, USA
RT ² PCR Array First Strand Synthesis Kit	SABioscience Corp., Frederick, USA
RT ² Profiler PCR Array 3.0 Rat Stress and Toxicity	SABioscience Corp., Frederick, USA
RT ² Real-Time PCR Master Mix SYBR® Green	SABioscience Corp., Frederick, USA
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, D
SuperScript® III Reverse Transkriptase	Invitrogen Corp., Carlsbad, USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, D
TRIzol® Reagenz	Invitrogen Corp., Carlsbad, USA
Trypsin/EDTA (10x)	Biochrom AG, Berlin, D
Vybrant® Apoptosis Assay Kit #3	Invitrogen Corp., Carlsbad, USA
Xylazin (Rompun 20 mg/ml)	Bayer Health Care AG, Leverkusen, D

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
CASY®cup	innovatis AG, Reutlingen, D
Einmalkanülen 20G, 27G, 30G	Brand GmbH&Co. KG, Wertheim, D
Einwegskalpelle Cutfix No 22	Braun GmbH, Kronberg, D
Elektroporationsküvetten 4 mm, 800 µl	Eppendorf AG, Hamburg, D
iQ™ 96 well PCR Platten	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Lab-Tek™ Chamber Slide™ System	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Nahtmaterial 4-0 atraumatische Nadel, Seralon	Serag-Wiessler KG, Naila, D
Nylon Zellsieb 100 µm	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, D
Petrischale 100 mm	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Pipettenspitzen Filter Tip 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, D
Reagenzreservoir PP Mehrkanalpipette	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml (PCR clean)	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, D
Rotilabo® Schraubdeckeldose 120 ml	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, D
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Spritzen 1 ml, 25 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Transportgefäß 250 ml (Nalgene)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Zellkulturflaschen mit Filter T150, T75, T25	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturplatten 6-Well, 12-Well	TPP AG, Trasadingen, Schweiz

2.1.4 Primer

Primer	Sequenz	Annealing Temperatur
KanG+P_CMV_for	5'-TGA AGC ATT TAT CAG GGT TCG-3'	59°C
KanG+P_CMV_rev	5'-CAA CAT GGC GGT CAT ATT GG-3'	59°C
hrbFGF_for	5'-GGC TAT GAA GGA AGA TGG A-3'	59°C
hrbFGF_rev	5'-CAG CTC TTA GCA GAC ATT G-3'	59°C
hbFGF_for	5'-CCT CAC ATC AAG CTA CAA CTT C-3'	59°C
hbFGF_rev	5'-GCC AGT AAT CTT CCA TCT TC-3'	59°C
hrVEGF_for	5'-GTG GAC ATC TTC CAG GAG TA-3'	59°C
hrVEGF_rev	5'-CTT TGG TCT GCA TTC ACA-3'	59°C
hVEGF_for	5'-CCC TGA TGA GAT CGA GTA CAT CTT-3'	62°C
hVEGF_rev	5'-AGC AAG GCC CAC AGG GAT TT-3'	62°C
GAPDH_for	5'-GAC TTC AAC AGC AAC TCC CAT TC -3'	59°C
GAPDH_rev	5'-GAG GCC ATG TAG GCC ATG AG-3'	59°C

2.2 Methoden

2.2.1 Tierexperimentelle Methoden

Alle Tierversuche erfolgten streng nach den hierfür vorgesehenen Protokollarien des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein und wurden durch das Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein genehmigt (Tierversuchsnummer: 27/g/08).

Als Versuchstiere dienten männliche isogene Lewis-Ratten der Firma Charles River Laboratories (Deutschland) mit einem Gewicht von ca. 75 bis 100 g für die Gewinnung von primären Hautfibroblasten bzw. von ca. 150 bis 200 g für die Ligation der Femoralarterie. Bei allen Ratten handelt es sich um Tiere aus einem isogenen Inzuchtstamm, so dass bei der Transplantation von Zellen die Immunantwort vernachlässigbar gering sein sollte. Die Anästhesie erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion von Ketamine (100 mg/kg Körpergewicht) und 2% Xylazine (5 mg/kg Körpergewicht) nach Vorbetäubung mit CO₂.

2.2.1.1 Hautentnahme zur Zellgewinnung

Die Zellgewinnung erfolgte aus Vollhautproben isogener männlicher Lewis-Ratten. Dafür wurde den Tieren unter Vollnarkose ein etwa 2x3 cm großer Hautlappen vom Rückenbereich entnommen und die Wunde anschließend wieder verschlossen. Für den Transport in das Labor wurde die Gewebeprobe in eine sterile Lösung aus PBS mit 1x Penicillin/Streptomycin (P/S) überführt.

2.2.1.2 „Hindlimb“ Modell zur Ischämieinduktion bei Ratten

Die Induktion einer Ischämie durch Ligation wurde wie bei Herzog et al., 2002, beschrieben durchgeführt. Hierfür wurde die rechte Femoralarterie frei präpariert ohne die Vene oder den Nerv zu beschädigen und im Abstand von ca. 0,5 cm mit zwei Nähten ligiert (siehe Abb. 3). Die transfizierten Zellen bzw. die unbehandelten Kontrollzellen wurden anschließend an mehreren Stellen in den *Musculus Gracilis* und *Musculus adductor* injiziert. Nach dem Verschließen der Wunde wurden die Tiere beobachtet, bis sie aus der Narkose erwachten.

Die Probenentnahme erfolgte nach dem in Tabelle 5 dargestellten Schema. Hierfür wurden die Tiere getötet und die zu untersuchenden Organe mit sauberem und sterilem Operationsbesteck präpariert. Es wurde dabei besonders darauf geachtet, das Besteck nach jeder Organentnahme zu reinigen, um Kontaminationen zu vermeiden.

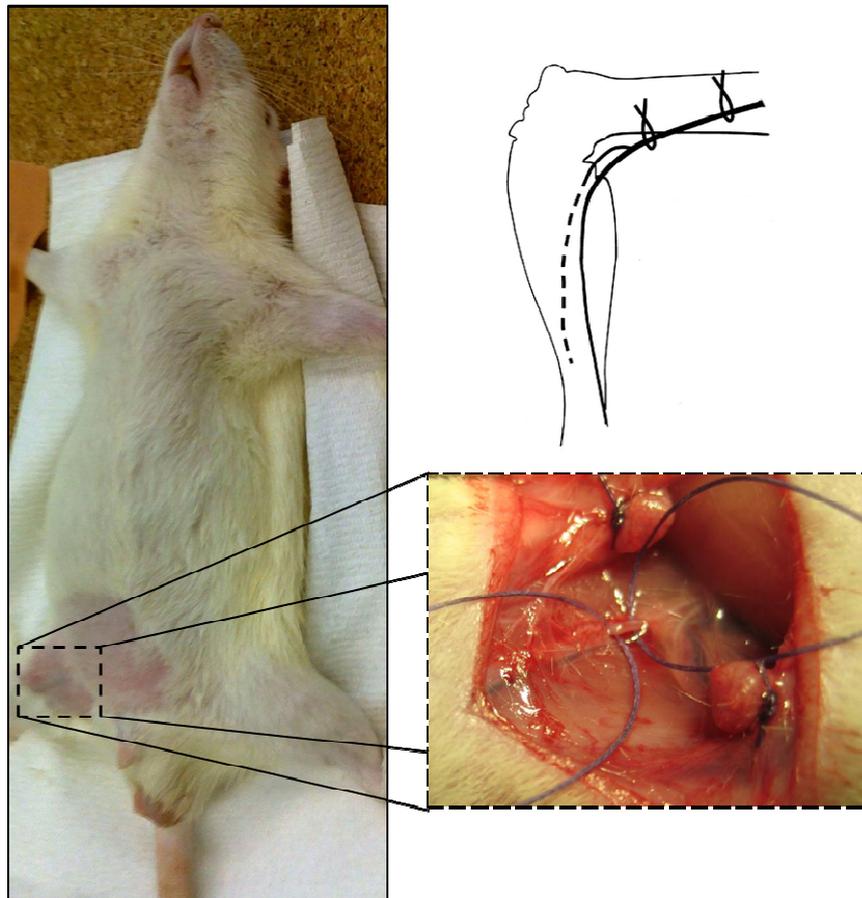


Abb. 3 Induktion einer Ischämie durch Ligation der Femoralarterie am „Hindlimb“ Modell der Ratte.

Tag der Probenentnahme (... Tage nach Ligation/Injektion)	Anzahl der Tiere, denen transfizierte Zellen injiziert wurden
1	2
3	3
7	3
14	3
28	3
86	3

Tabelle 5: **Übersicht der Versuchstiere für das Ligationsexperiment.** Pro Versuchszeitpunkt wurden zudem je einem Tier unbehandelte Fibroblasten als Kontrolle injiziert.

Folgende Organe wurden für die weitere Analyse entnommen:

- Injektionsstelle/injizierter rechter Oberschenkel (*M. Gracilis*, *M. adductor*) (inj. OS)
- Oberschenkelmuskel aus linkem Bein, nicht injiziert (Kontrollmuskel)
- Lunge (Lu)
- Herz (He)
- Dünndarm (DD)
- Leber (Le)
- Milz (Mi)
- Niere (Ni)
- Hoden (Ho)
- Gehirn (Ge)

2.2.2 Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Arbeiten erfolgten unter aseptischen Bedingungen in einer sterilen Sicherheitswerkbank.

2.2.2.1 Isolation von primären isogenen Fibroblasten aus Rattenhaut

Alle Schritte der Zellisolierung erfolgten unter Zuhilfenahme steriler Arbeitsmaterialien und Reagenzien. Nachdem die Reste des Fettgewebes von der Hautprobe entfernt wurden, erfolgte die Bestimmung von Gewicht und exakter Größe der Biopsie. Mithilfe einer Schere wurde die Probe in ca. 1 bis 2 mm breite Streifen geschnitten und nach einem Waschschrift in PBS in einer Dispase Lösung (10 Units/ml Dispase in DMEM+10% FBS+1% P/S+100 ng/ml Amphotericin B) bei 4°C über Nacht inkubiert. Durch diesen enzymatischen Verdau ließ sich die Epidermis, die vorwiegend aus Keratinocyten besteht, gut von der fibroblastenreichen Dermis trennen. Die Dermis wurde anschließend mithilfe einer Schere in ca. 1 mm² große Stücke geschnitten und in eine Spinnerflasche überführt. Nach Zugabe einer Collagenase II Lösung (500 Units/ml Collagenase II in DMEM+1% P/S+100 ng/ml Amphotericin B) wurde die Probe für drei Stunden bei 37°C/5% CO₂ unter Rühren (70 rpm) inkubiert. Anschließend folgte ein Filtrationsschritt durch einen 100 µm Nylonfilter und mehrere Waschschriffe mit PBS. Zur Abschätzung der Zellzahl wurde eine kleine Probe der Zellsuspension am CASY® Zellzähler gemessen und die Zellen anschließend zur Kultivierung in Vollmedium (DMEM+10% FBS+1% P/S+ 100 ng/ml Amphotericin B) in Zellkulturflaschen überführt.

2.2.2.2 Kultivierung von Rattenfibroblasten

Die Kultivierung der adhärennten Rattenfibroblasten erfolgte als Monolayerkultur bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre und einem CO₂-Gehalt von 5%. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage mit frischem Standardmedium (DMEM+10% FBS+1% P/S) versorgt und einer regelmäßigen Kontrolle der Konfluenz am Mikroskop unterzogen.

Die Passagierung der Zellen erfolgte bei ca. 80 bis 90%iger Konfluenz. Dafür wurden die Fibroblasten mithilfe einer Trypsin/EDTA-Lösung vom Flaschenboden gelöst und in geringerer Dichte in neue Zellkulturflaschen überführt.

2.2.2.3 Transfektion von Rattenfibroblasten

Die Transfektion der Rattenfibroblasten erfolgte durch Elektroporation.

Die ca. 80 bis 90%ig konfluenten Fibroblasten wurden mithilfe einer Trypsin/EDTA-Lösung vom Flaschenboden gelöst und die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe der vierfachen Menge Standardmedium gestoppt. Nach Bestimmung der Zellzahl am CASY® Zellzähler erfolgte die Pelletierung der Zellen durch Zentrifugation (10 min bei 100xg). Für eine Transfektion wurden je nach Versuchsansatz zwischen einer und drei Millionen Zellen eingesetzt. Das Zellpellet wurde in 100 µl (Amaxa® Küvetten) bzw. 150 µl (Eppendorf Küvetten) Transfektionsmedium aufgenommen und gut resuspendiert. Nach Überführung in die Transfektionsküvetten erfolgte die Elektroporation im Nucleofector® II mit dem entsprechenden Programm. Die Zellen wurden daraufhin sofort mit warmem Standardmedium versetzt und durch vorsichtiges Pipettieren in die vorbereiteten Zellkulturflaschen überführt.

Die Plasmide, die für die Transfektion eingesetzt wurden, bestehen aus CMV Promotor, Intron, Multipler Klonierungsstelle, Poly-A Sequenz, pUC Origin, Resistenzgen mit Resistenzgenpromotor und dem Insert (siehe Abb. 4). Die drei in dieser Arbeit verwendeten Plasmide unterscheiden sich nur in der Insertsequenz: pmaxGFP mit GFP als Insert, pmaxbFGF mit der humanen bFGF Sequenz als Insert und pmaxVEGF mit der humanen VEGF₁₆₅ Sequenz als Insert.

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit pmaxGFP transfiziert. Bereits nach einem Tag ließ sich die Expression des grün fluoreszierenden Proteins GFP am Fluoreszenzmikroskop sowie am Durchflusszytometer untersuchen.

Für die Analyse der Expression der Wachstumsfaktoren nach Transfektion mit pmaxbFGF und pmaxVEGF wurden Zellkulturüberstände gesammelt und Zellproben genommen. In diesen Proben ließen sich sowohl die Plasmid-DNA und cDNA mittels Real-Time PCR als auch die exprimierten Proteine mittels ELISA nachweisen.

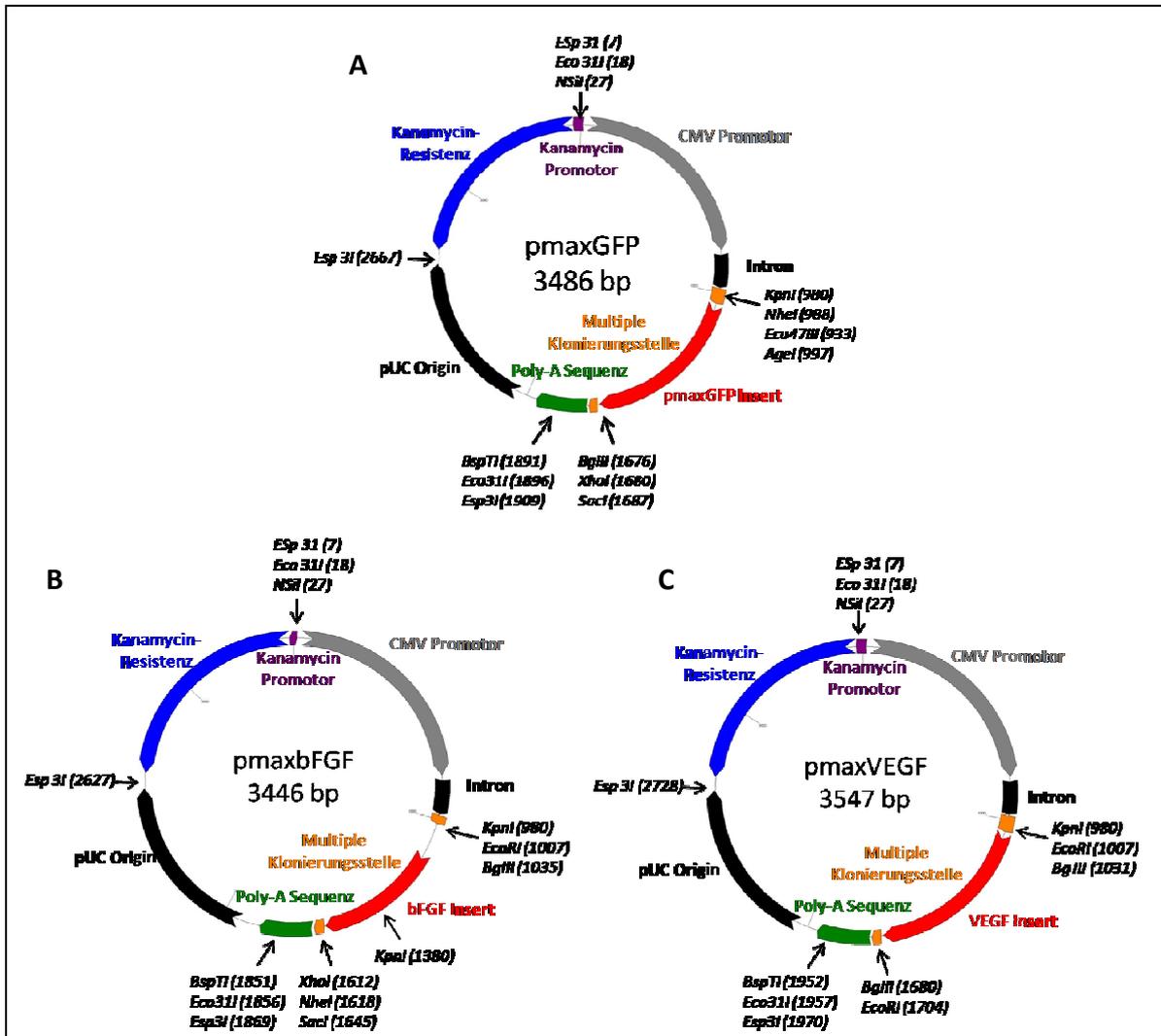


Abb. 4 Plasmidkarten der verwendeten Plasmide. A pmaxGFP, B pmaxbFGF, C pmaxVEGF

2.2.2.4 Untersuchung des Zeitverlaufs der Expression nach Transfektion

Zur Charakterisierung des Zeitverlaufs der Transfektion erfolgte die Kultivierung der transfizierten Zellen über einen längeren Zeitraum mit regelmäßigen Probenahmen. Hierfür wurden die Zellen nach der Transfektion in 12-Well Platten mit einer Zelldichte von 40.000 Zellen/cm² ausgesät. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage beziehungsweise 24 Stunden vor der Probenentnahme. Die Zellkulturüberstände wurden gesammelt und die Zellen gerntet, gezählt und für die weiteren Analysen vorbereitet:

- RNA Isolierung: Zellen in TRIzol® lysiert, -80°C
- DNA Isolierung: Zellen in T1 Puffer (NucleoSpin® Tissue Kit) lysiert, -80°C
- Durchflusszytometrie: Zellen in PBS+4 % BSA, direkt analysiert

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

Für alle molekularbiologischen Arbeiten mussten die Arbeitsplätze zuvor gründlich mit Ethanol und RNase Away® beziehungsweise DNA Away® gereinigt werden.

2.2.3.1 Extraktion von DNA aus Zellkulturproben

Die Isolierung der DNA aus Zellkulturproben erfolgte mit dem NucleoSpin® Tissue Kit der Firma Macherey-Nagel nach dem Originalprotokoll des Herstellers.

Die Filtersäule bindet sowohl DNA als auch RNA. Da die RNA in der weiteren Analyse mittels Real-Time PCR nicht detektiert werden kann, wurde auf die Entfernung dieser durch Verdau mit RNase H verzichtet.

2.2.3.2 Extraktion von RNA aus Zellkulturproben

Für die Gewinnung der RNA aus Zellkulturproben wurden die Zellen mit dem TRIzol® Reagenz (Invitrogen, USA) versetzt und bei -80°C zwischengelagert. Die Isolierung der RNA erfolgte nach einem leicht modifizierten Protokoll des Herstellers.

Das durch Trypsinieren gewonnene Zellpellet wurde in TRIzol® resuspendiert, 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und mit Chloroform durch kräftiges Schütteln gut gemischt. Nach 2 bis 3 min Inkubation erfolgte eine Trennung in eine farblose wässrige obere Phase (RNA), eine weißliche Intermediärphase (DNA) und eine rötliche untere Phenol-Chloroform-Phase (Proteine, DNA) durch Zentrifugation für 15 min bei 12.000xg und 4°C. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, ohne dabei die Interphase zu berühren, und mit Isopropanol versetzt. Das Gemisch wurde mehrfach invertiert und 10 min bei RT inkubiert. Durch einen Zentrifugationsschritt für 10 min bei 12.000xg und 4°C konnten die ausgefallenen Nukleinsäurepräzipitate pelletiert werden. Das Pellet wurde zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in Nuklease-freiem Wasser resuspendiert.

2.2.3.3 Vorbereitung der Gewebeproben

Die Gewebeproben aus den Tierversuchen wurden für die folgenden Analysen in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill zerkleinert beziehungsweise pulverisiert. Wichtig war dabei, dass die Proben nicht auftauten. Daher wurden alle Gegenstände, mit denen das Gewebe in Berührung kam, ebenfalls mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Zudem wurden alle gebrauchten Geräte zwischen den einzelnen Proben gründlich mit Wasser, Ethanol und DNA Away® gereinigt, um Kontaminationen zu vermeiden.

2.2.3.4 Extraktion von DNA aus Gewebeproben

Die Isolierung der DNA aus den Gewebeproben erfolgte mithilfe des NucleSpin® Tissue Kit der Firma Macherey-Nagel.

Bis zu 30 mg zerkleinerte Probe wurde mit T1 Puffer und Proteinase K versetzt und über Nacht im Thermoschüttler bei 600 rpm und 56°C inkubiert. Nach Zugabe von B3 Puffer und kräftigem Mischen der Probe erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt im Thermoschüttler für 10 min bei 70°C. Um nicht lysierte Bestandteile zu entfernen, wurde das Gemisch für 5 min bei 11.000xg zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 96%igem Ethanol wurden die Nukleinsäuren ausgefällt und durch Zentrifugation auf der NucleoSpin® Tissue Säule gebunden. Nach mehreren Waschschritten konnte die DNA nach 3minütiger Inkubation des 70°C warmen BE Puffers aus der Membran eluiert werden.

2.2.3.5 Extraktion von RNA aus Gewebeproben

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Gewebeproben erfolgte mithilfe des NucleoSpin® RNA II Kit der Firma Macherey-Nagel nach leicht modifiziertem Protokoll.

Bis zu 30 mg fein pulverisierte Probe wurde mit RA1 Puffer versetzt und mit einer sterilen 20G Kanüle durch Auf- und Abziehen gründlich homogenisiert. Nach 5minütiger Inkubation auf Eis wurde die lysierte Gewebeprobe kräftig gemischt. Zum Abtrennen unlöslicher Bestandteile erfolgte ein Sedimentationsschritt bei 12.000xg für 5 min. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 96%igem Ethanol durch kräftiges Schütteln gemischt. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 12.000xg wurde der Überstand komplett abgenommen und verworfen und das entstandene Pellet 5 min bei RT getrocknet, um anschließend in Wasser resuspendiert zu

werden. Es folgte ein weiterer Lyseschritt durch Zugabe von RA1 Puffer sowie 2-Mercaptoethanol. Das gut gemischte Lysat wurde auf eine Filtersäule gegeben und 1 min bei 11.000xg zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit 70%igem Ethanol versetzt, gut gemischt und auf der RNA-Bindungssäule gegeben mit anschließender 0,5minütiger Zentrifugation bei 11.000xg. Nach Entsalzen der Membran mit einem speziellen Puffer erfolgte die enzymatische Spaltung der ebenfalls gebundenen genomischen DNA durch Zugabe einer DNase Lösung. Die zurückbleibende RNA wurde gewaschen, getrocknet und mit Nuklease-freiem Wasser eluiert.

2.2.3.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren am Photometer

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm. Gleichzeitig wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 280 nm die Reinheit der Probe in Bezug auf Proteinkontaminationen abgeschätzt. Der Faktor OD_{260}/OD_{280} sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen. Wenn dies nicht der Fall war, musste die Probe aufgereinigt werden.

Für die Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Probe in TE Puffer (10 mMol Tris/HCl pH 7,5; 1 mMol EDTA) verdünnt. Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte in 10 mMol Tris/HCl.

Durch Berücksichtigung des Faktors für DNA beziehungsweise RNA und unter Einbezug der Verdünnung errechnet sich die Konzentration (c_{DNA} beziehungsweise c_{RNA}) wie folgt:

$$c_{DNA/RNA} [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \cdot x_{\epsilon} \cdot f$$

OD_{260} (Absorption bei 260 nm)
 $x_{\epsilon} = 50$ (Faktor für DNA)
 $x_{\epsilon} = 40$ (Faktor für RNA)
 f (Verdünnungsfaktor)

2.2.3.7 DNase Verdau und Reverse Transkription

Um die gewonnene RNA von DNA-Kontaminationen zu befreien, erfolgte ein Verdau mit DNase I. Hierfür wurden die Proben mit DNase I Puffer und DNase I versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Um die DNase zu inaktivieren ohne die RNA zu beschädigen, wurde das Gemisch nach Zugabe von EDTA (Endkonzentration 5 mMol) für 10 min bei 75°C inkubiert.

Mithilfe der Reversen Transkription kann RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt werden. Hierfür wurde die RNA mit einem dNTP Mix sowie einer 1:1 Mischung aus Random Primern und Oligo-dT₁₂₋₁₈ Primern versetzt, 5 min bei 65°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Nach der Zugabe von Reaktionspuffer, Magnesiumchlorid, DTT, RNaseOut® und der Reversen Transkriptase (SuperScript® III) erfolgte die cDNA Synthese für eine Stunde bei 50°C. Das Enzym wurde durch 15 minütige Inkubation bei 70°C zerstört und die entstandene cDNA auf Eis beziehungsweise bei -20°C gelagert.

2.2.3.8 Real-Time PCR zum Nachweis der Proteinexpression in Zellkultur- und Gewebeproben

Der Nachweis der Expression der Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF erfolgte sowohl durch relative als auch durch absolute Quantifizierung mittels Real-Time PCR.

Bei der relativen Quantifizierung wurden Primerpaare eingesetzt (hrbFGF_for+hrbFGF_rev, hrVEGF_for+hrVEGF_rev), die sowohl die vom Plasmid codierten humanen Wachstumsfaktorsequenzen erkennen, als auch die für die Ratte spezifischen. Die Expression dieser Zielgene wurde mit der des nicht regulierten Housekeeping Gens GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) normalisiert. GAPDH wurde als Housekeeping Gen gewählt, da es im Vergleich zu anderen Genen (beta Actin, 18S ribosomale RNA, Malatdehydrogenase I, Tyrosin 3-Monooxygenase, Ribosomales Protein L13; Daten siehe Anhang) nur sehr schwach unter den gegebenen Versuchsbedingungen variiert.

Um die Expression der Wachstumsfaktoren zu bestimmen, die nur durch die Transfektion hervorgerufen wurde, erfolgte eine absolute Quantifizierung. Die eingesetzten Primerpaare (hbFGF_for+hbFGF_rev, hVEGF_for+hVEGF_rev) binden ausschließlich an die humanen Wachstumsfaktorsequenzen, die auf dem Plasmid codiert sind. Diese PCR-Produkte wurden zuvor durch konventionelle PCR (ohne SYBR® Green) amplifiziert, aufgereinigt und quantifiziert, um als Verdünnungs- bzw. Standardreihe die absolute Quantifizierung zu ermöglichen.

Um Pipettierfehler zu vermeiden, wurde für jedes Primerpaar ein Mastermix angesetzt. Dieser Mastermix bestand aus dem iQ™ SYBR® Green Supermix (Endkonzentration 1x), dem Primerpaar (Endkonzentration 400 nMol) und Nuklease-freiem Wasser und wurde in

die Wells vorgelegt (20 µl pro Well). Die cDNA (1 pg bis 100 ng in 5 µl pro Well) wurde anschließend zu dem Mastermix gegeben und mit diesem durch Pipettieren leicht gemischt. Zudem wurde für jeden Mastermix eine Wasserkontrolle (5 µl Nuklease-freies Wasser statt cDNA, NTC) mitgeführt, um die Reinheit des Mastermixes zu kontrollieren. Die vollständige PCR-Platte wurde anschließend zum Entfernen von Luftblasen und Flüssigkeitstropfen am Rand kurz zentrifugiert.

Die Real-Time PCR erfolgte nach folgendem Programm:

1. Initiale Denaturierung: 3 min 95°C (inklusive Messung des internen Fluoreszenzstandards [Fluorescein])
- 2.1 Denaturierung: 10 sec 95°C
- 2.2 Primer-Annealing: 20 sec 59°C bzw. 62°C
- 2.3 Elongation: 20 sec 72°C

→ Die Schritte 2.1 bis 2.3 wurden 40x (relative Quantifizierung) bzw. 50x (absolute Quantifizierung) wiederholt.

3. Denaturierung: 1 min 95°C
4. DNA-Hybridisierung: 1 min 59°C
5. Schmelzkurve: 59°C bis 95°C in 0,5°C /10 sec
6. Kühlen auf 15°C

2.2.3.9 Real-Time PCR zum Nachweis der Plasmid-DNA in Zellkultur- und Gewebeproben

Zur Untersuchung der Verteilung der injizierten transfizierten Zellen wurde ebenfalls die Real-Time PCR eingesetzt. Als Erkennungssequenz für die Primer wurde ein Bereich auf dem Plasmid gewählt, der mehrere Sequenzen umspannt (siehe Abb. 5). Hiermit konnte eine hohe Spezifität gewährleistet werden. Zudem detektierte das Primerpaar alle eingesetzten Plasmidvarianten (pmaxbFGF, pmaxVEGF, pmaxGFP).

Anhand absoluter Quantifizierung wurde die Anzahl der Plasmide mit einer Verdünnungsreihe aus reiner Plasmid-DNA ermittelt.

Die Durchführung der PCR erfolgte mit kleinen Variationen zu dem bereits beschriebenen Protokoll (siehe „Real-Time PCR zum Nachweis der Proteinexpression in Zellkultur- und Gewebeproben“). Der Mastermix enthielt anstelle des iQ™ SYBR® Green Supermix den

Maxima™ SYBR® Green Supermix der Firma Fermentas (Endkonzentration 1x). Zudem wurde eine 10minütige initiale Denaturierung durchgeführt.

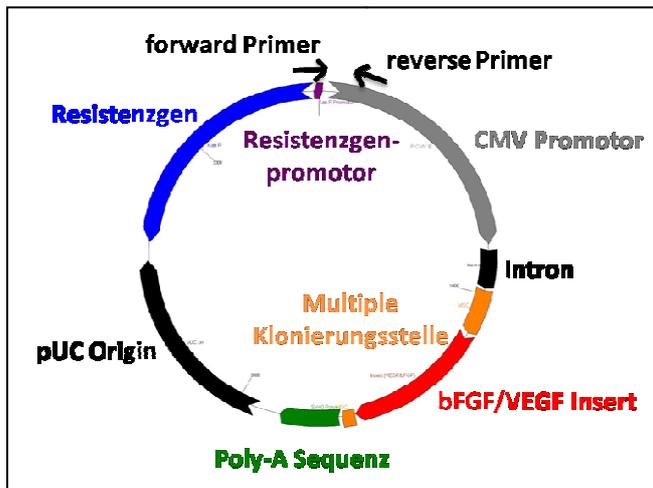


Abb. 5 Bindungsstellen der Primer für den Nachweis der Plasmid-DNA in Zellkultur- und Gewebeproben.

2.2.3.10 Ermittlung der PCR Effizienz

Die Effizienzbestimmung der Real-Time PCR-Reaktion wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden durchgeführt. Zum einen lässt sich die Effizienz (E) aus dem Anstieg einer Verdünnungsreihe durch die Auftragung der Probenkonzentration in logarithmischer Form gegen die Zyklenzahl (Cq) ermitteln:

$$E = 10^{[-1/\text{Steigung}]}$$

Dieses Verfahren wurde vorwiegend bei der absoluten Quantifizierung eingesetzt. Zudem kann die Effizienz aus jeder einzelnen Real-Time PCR Kurve mithilfe einer speziellen Software (LinRegPCR) aus dem Fluoreszenzanstieg in der logarithmischen Phase der Reaktion bestimmt werden.

2.2.3.11 Real-Time PCR Array

Der Real-Time PCR Array „Rat Stress and Toxicity PathwayFinder™“ von SABiosciences™ wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Hierfür wurden zunächst die RNA-Proben mithilfe des „RT² First Strand Kit“ in cDNA umgeschrieben und die Probenqualität durch den „RT² RNA QC PCR Array“ überprüft. Die Analyse erfolgte anschließend nach dem Originalprotokoll am iCycler/MyiQ™ Real-Time PCR Gerät.

2.2.3.12 Nachweis der DNA Moleküle mittels Agarose-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der Reinheit der PCR-Reaktion sowie zur Bestimmung der Größe des PCR-Produkts wurden die Real-Time PCR-Ansätze stichprobenweise mit DNA-Auftragspuffer versetzt und auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung erfolgte die Auftrennung der DNA nach ihrer Größe. Um die Größe der PCR-Produkte abzuschätzen, wurde auf jedes Gel zudem ein DNA-Marker mit aufgetragen. Die Visualisierung der DNA erfolgte durch Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid.

2.2.4 Immunologische Methoden

2.2.4.1 Durchflusszytometrie

Die Analyse Fluoreszenz-gefärbter Zellen erfolgte durch Herrn Dr. Tillman Vollbrandt vom KEF (Klinisch Experimentelle Forschungseinrichtung, UK-SH) am Durchflusszytometer der Firma DakoCytomation.

Die Zellen wurden ihm hierfür gut resuspendiert in einer Pufferlösung aus 4% BSA in PBS übergeben. Die anschließende Analyse erfolgte mithilfe der Software Summit v4.3 (DakoCytomation).

2.2.4.2 Untersuchung der Reinheit der kultivierten Zellen in Bezug auf den Zelltyp

Um eine Kontamination der isolierten Fibroblasten mit anderen Zelltypen auszuschließen, wurde stichprobenweise eine Färbung mit dem Fibroblastenmarker anti-Prolyl-4-Hydroxylase beta durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen in ChamberSlides™ kultiviert.

Der Nachweis der Rattenfibroblasten erfolgte durch Immunfluoreszenz. Die Probe wurde nach Fixieren und Blocken zunächst eine Stunde mit dem Primärantikörper (Prolyl-4-Hydroxylase beta, 1:100 in PBS/1% BSA) inkubiert und nach drei Waschschritten mit PBS/0,2% Triton-X-100 erneut eine Stunde mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper (Polyclonal Antibody to Mouse IgG [H&L] – FITC, 1:1000 in PBS/1%BSA) inkubiert. Nach weiteren Waschschritten wurde eine Gegenfärbung mit Propidiumiodid (PI) (2 µg/ml) durchgeführt. Die Auswertung der gefärbten Zellen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

2.2.4.3 Apoptosetest

Der Apoptosetest erfolgte mithilfe des Vybrant® Apoptosis Assay Kit #3 der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben.

Das in diesem Testsystem angewandte Annexin V (FITC-gekoppelt) bindet an Phosphatidylserin, das sich nur in apoptotischen Zellen auf der äußeren Zellmembran nachweisen lässt. Bei Zellen, die ein positives Propidiumiodid (PI) Signal aufzeigen, sind die Zell- und Kernmembran nicht mehr intakt, was darauf hindeutet, dass es sich um tote Zellen handelt.

Die Apoptoseinduktion in den Zellen der Positivkontrolle erfolgte durch 4stündige Inkubation mit 10 µMol (s)-(+)-Camptothecin. Für die Totkontrolle wurde die Membran der Zellen für 5 min mit Formalin fixiert und dadurch permeabilisiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen.

Die Zellen wurden durch Trypsinieren geerntet, in kaltem PBS gewaschen und in 1x Annexin-Bindepuffer mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml aufgenommen. Nach Zugabe von FITC Annexin V (Komponente A, Verdünnung 1:20) und PI (Endkonzentration 1 µg/ml) folgte eine 15minütige Inkubation bei RT. Die Proben wurden anschließend mit 1x Annexin-Bindepuffer gemischt (Endkonzentration $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml) und zeitnah am Durchflusszytometer analysiert.

2.2.4.4 Proteinnachweis aus Gewebeproben und Zellkulturüberständen mittels ELISA

Der quantitative Nachweis der durch die Transfektion der Rattenzellen exprimierten humanen Proteine bFGF und VEGF in den Gewebeproben und Zellkulturüberständen erfolgte durch das Quantikine® human FGF basic ELISA Kit bzw. das Quantikine® human VEGF ELISA Kit der Firma R&D Systems nach dem Protokoll des Herstellers.

Die Zellkulturüberstände wurden direkt nach der Probenentnahme 5 min bei 600xg zentrifugiert um Zellreste zu entfernen. Die Lagerung bis zur Analyse erfolgte bei -80°C.

Die Analyse der Gewebeproben erfolgte nach Lyse in 0,2x Lysispuffer (1x Cell Culture Lysis Reagenz von Promega, 1:5 in PBS verdünnt). Durch Zentrifugation von 15 min bei 4°C und 11.000xg konnten die unlöslichen Bestandteile von der Probe abgetrennt und der Überstand für den ELISA gewonnen werden.

2.2.5 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Für Vergleiche zwischen zwei unterschiedlichen Gruppen wurde ein Student t-Test durchgeführt, wobei das Signifikanzniveau auf $\alpha = 0,05$ festgesetzt wurde. Eine Signifikanz lag vor, wenn $p \leq 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1 Optimierung des Gentransfers in primären Rattenfibroblasten

Der in dieser Arbeit angewandte Gentransfer erfolgte *ex vivo* durch Elektroporation von isogenen Rattenfibroblasten. Bei der Optimierung der Versuchsbedingungen wurden folgende Parameter besonders berücksichtigt:

- Transfektionseffizienz
- Vitalität der transfizierten Zellen
- Zellausbeute und
- „Handling“ der Zellen (z.B. Haftung an Zellkulturflasche).

Die Aufnahme von Plasmiden in den Zellkern erfolgt bei der Elektroporation durch die Permeabilisierung der Zellmembran. Die Effizienz der Übertragung hängt stark von den Eigenschaften der Zellen ab, die transfiziert werden sollen. Daher müssen die Transfektionsbedingungen für jeden Zelltyp optimiert werden.

Um diesen Prozess besser verfolgen zu können, wurden die Optimierungsversuche bei Rattenfibroblasten mit einem Plasmid (pmaxGFP) durchgeführt, das anstelle der therapeutischen Proteine als Reporter gen das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) enthielt. Die Proteinexpression konnte so mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie analysiert werden.

Die Elektroporation erfolgte mit dem Nucleofector® II der Firma Lonza. Dieses Gerät besitzt voreingestellte Programme, die auf die jeweiligen Zelltypen abgestimmt sind.

Zum Vergleich unterschiedlicher Transfektionsprogramme wurden $1 \cdot 10^6$ primäre Rattenfibroblasten mit dem Amaxa® Basic Fibroblast Nucleofector® Kit (mit Nucleofector® Lösung und Amaxa® Küvetten) und 2 µg pmaxGFP transfiziert. Da das Programm U30 eine relativ gute Transfektionseffizienz lieferte ($59,5 \pm 9,0$ %), wurde es in den folgenden Versuchen als Standardprogramm eingesetzt. Zudem ist die Vitalität der geernteten Zellen ($76,0 \pm 12,2$ %), gemessen am CASY® Cell Counter, ebenfalls besser als bei den Vergleichsprogrammen (siehe Abbildung 6).

Die Zellausbeute wurde definiert als der Quotient aus der Anzahl der transfizierten Zellen durch die Anzahl der vitalen Zellen bei Zellernte. Sie spielt neben der

Transfektionseffizienz ebenfalls eine entscheidende Rolle, da sie eine Abschätzung über die Toxizität der Methode erlaubt. Zellen, die durch die Elektroporation zu stark beschädigt werden, sterben ab und schwimmen im Überstand. Beim Ernten der Zellen für die Analyse werden sie abgesaugt und daher nicht mit quantifiziert.

Die Zellausbeute war bei den getesteten Transfektionsprogrammen vergleichbar.

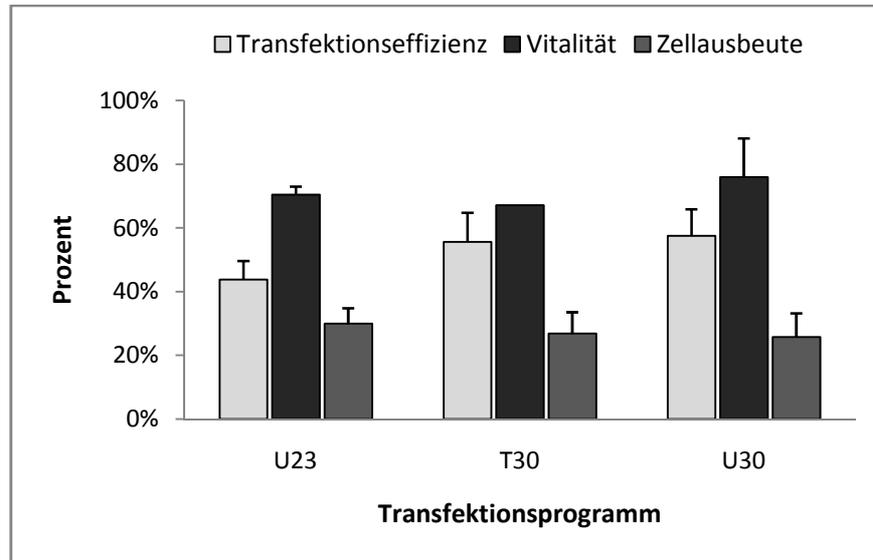


Abb. 6 **Vergleich unterschiedlicher Transfektionsprogramme.** Die Abbildung zeigt die Transfektionseffizienz, Vitalität und Zellausbeute zwei Tage nach Transfektion von $1 \cdot 10^6$ primären Rattenfibroblasten mit $2 \mu\text{g}$ pmaxGFP Plasmid. Das Programm U30 zeigt sowohl die höchste Transfektionseffizienz als auch die höchste Zellvitalität nach Transfektion. Die Unterschiede in der Zellausbeute sind vernachlässigbar gering. (n=3)

Die Verwendung des Basic Fibroblast Nucleofector® Kit von Amaxa® ist zum einen eine relativ kostenintensive Lösung und stellt zum anderen in Hinblick auf die geplante präklinische und klinische Anwendung dieser Methode das Problem dar, dass die Zusammensetzung der Nucleofector® Lösung patentrechtlich geschützt ist. Daher wurde das Standardzellkulturmedium (DMEM+10% FBS+1% P/S) als Elektroporationslösung getestet. Zwar weist dieses im Vergleich zur Nucleofector® Lösung unter den gleichen Versuchsbedingungen eine geringere Transfektionseffizienz ($44,7 \pm 9,6\%$ Standardmedium, $57,5 \pm 8,4\%$ Nucleofector® Lösung) auf (siehe Abb. 7), die Zellen ließen sich jedoch leichter von der Zellkulturoberfläche lösen, was die Handhabung bedeutend erleichterte.

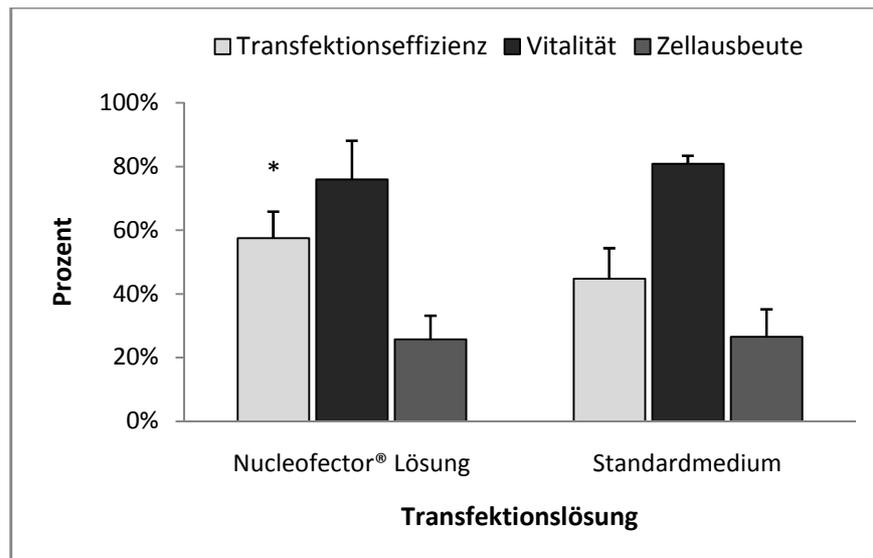


Abb. 7: **Vergleich unterschiedlicher Transfektionslösungen.** Die Abbildung zeigt die Transfektionseffizienz, Vitalität und Zellausbeute zwei Tage nach Transfektion von $1 \cdot 10^6$ primären Rattenfibroblasten mit $2 \mu\text{g}$ pmaxGFP Plasmid. Die Nucleofector® Lösung zeigt im Vergleich zum Standardmedium eine signifikant bessere Transfektionseffizienz. Vitalität und Zellausbeute sind jedoch beim Transfer mit Standardmedium leicht erhöht. (* $p \leq 0,05$, $n \geq 3$)

Als weiterer Optimierungsschritt wurde die Plasmidmenge von $2 \mu\text{g}$ pmaxGFP auf $4 \mu\text{g}$ pmaxGFP pro $1 \cdot 10^6$ Zellen erhöht. Zudem wurden Elektroporationsküvetten der Firma Eppendorf mit einer Spaltbreite von 4 mm im Vergleich zu den Amaxa® Küvetten mit 2 mm Spaltbreite getestet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich die größere Spaltbreite und die damit veränderten Transfektionseigenschaften positiv auf die Vitalität der transfizierten Zellen auswirken. Die Zellausbeute erhöhte sich von $22,8 \pm 1,9 \%$ in den Amaxa® Küvetten auf $40,9 \pm 6,8 \%$ in den Eppendorf Küvetten. Zudem erleichterte die größere Spaltbreite die Entnahme der Zellen aus der Küvette.

Für die Anwendung der transfizierten Zellen im Tiermodell wurde eine relativ hohe Anzahl an Zellen benötigt. Daher wurde in einer weiteren Testreihe untersucht, welchen Einfluss die Erhöhung der Zellzahl auf die Transfektion hat (siehe Abb. 8). Besonders hervorzuheben ist die signifikant verbesserte Transfektionseffizienz ($p \leq 0,05$). Zwei Tage nach der Transfektion von $3 \cdot 10^6$ Rattenfibroblasten mit $12 \mu\text{g}$ pmaxGFP (entspricht $4 \mu\text{g}$ pmaxGFP pro $1 \cdot 10^6$ Zellen) exprimierten fast 60 % der Zellen das Grün Fluoreszierende Protein.

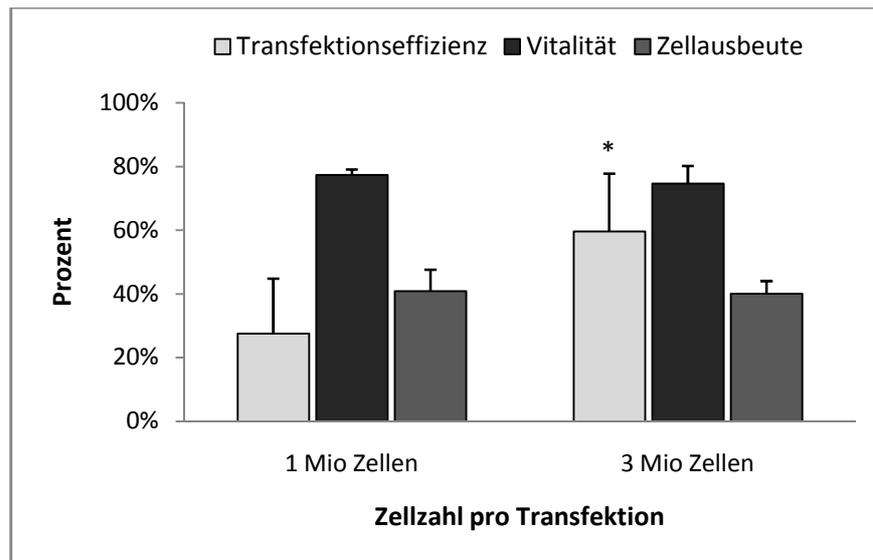


Abb. 8: **Erhöhung der Zellzahl pro Transfektion.** Die Abbildung zeigt die Transfektionseffizienz, Vitalität und Zellausbeute zwei Tage nach Transfektion von $1 \cdot 10^6$ bzw. $3 \cdot 10^6$ primären Rattenfibroblasten mit $4 \mu\text{g}$ pmaxGFP Plasmid/ $1 \cdot 10^6$ Zellen. Die Erhöhung der Zellzahl wirkt sich positiv auf die Transfektionseffizienz aus. (* $p \leq 0,05$, $n \geq 7$)

Das optimierte Protokoll für die Transfektion von primären Rattenfibroblasten setzt sich wie folgt zusammen:

- Transfektionsmedium: DMEM+10% FBS+1% P/S
- Transfektionsprogramm: U30 (Nucleofector® II)
- Elektroporationsküvetten: 4 mm Spaltbreite (Eppendorf)
- Zellzahl pro Transfektion: $3 \cdot 10^6$ Zellen
- Plasmidmenge: $12 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA pro $3 \cdot 10^6$ Zellen

3.2 Optimierung der Real-Time PCR

Die Real-Time PCR ist eine sehr sensitive Methode um Nukleinsäuren nachzuweisen. Die Spezifität wird unter anderem durch die Wahl des Detektionssystem bestimmt, wobei SYBR® Green sequenzunspezifisch an doppelsträngige DNA bindet. Daher muss die Spezifität durch das Primerdesign und die Optimierung der Versuchsbedingungen erzeugt werden.

Für alle zu detektierenden Gene beziehungsweise für die Plasmid-DNA wurden verschiedene Primerpaare auf ihre Spezifität getestet, um die Bildung unerwünschter Nebenprodukte und Primerdimere auszuschließen. Neben der Schmelzkurvenanalyse, die jedem PCR Programm nachgeschaltet war, wurden die PCR-Produkte zur visuellen Kontrolle auch auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe Anhang). Zudem wurde die optimale

Annealing-Temperatur für die jeweiligen Primerpaare durch einen Temperaturgradienten bestimmt.

Für die absolute Quantifizierung von DNA und cDNA muss eine Standardreihe mit bekannter Konzentration mitgeführt werden. Anhand dieser lassen sich die PCR-Effizienz sowie die Nachweisgrenzen der Reaktion bestimmen. Für die Quantifizierung der Plasmid-DNA in Zellkultur- und Gewebeproben wurde eine Verdünnungsreihe aus reiner Plasmid-DNA als Standard eingesetzt. Wie in Abbildung 9 A gut zu erkennen ist, konnten die Versuchsbedingungen so optimiert werden, dass mit der PCR reproduzierbar 10 bis 10^7 Plasmidmoleküle (CN, Copy Number) nachweisbar waren. Die mittlere PCR-Effizienz betrug hierbei 90,8 %. Die Quantifizierung der Expression der plasmidcodierten Wachstumsfaktoren erfolgte durch eine Verdünnungsreihe aufgereinigter PCR-Produkte bekannter Konzentration. Hierbei war es ebenfalls möglich, bis zu 10 Kopien der cDNA im Probenansatz mit einer mittleren PCR-Effizienz von 94,6 % (hbFGF) bzw. 90,9 % (hVEGF) nachzuweisen (siehe Abb. 9 B, C).

Genomische DNA (gDNA) kann die Polymerasereaktion inhibieren. Um diesen Einfluss zu charakterisieren, wurde eine bekannte Plasmidmenge zu unterschiedlichen Konzentrationen von genomischer DNA gegeben und mittels Real-Time PCR analysiert. Mit steigender gDNA-Konzentration steigt der Cq-Wert (siehe Abb. 10). Das deutet auf eine zunehmende Inhibition der Reaktion bzw. eine sinkende PCR-Effizienz hin. Für die weiteren Versuche wurden aus diesem Grund 100 ng gDNA als Template eingesetzt, da bei dieser Menge der inhibitorische Einfluss vernachlässigbar gering war und zudem die Menge noch ausreichend hoch, um falsch negative Ergebnisse zu minimieren.

Der Nachweis der cDNA erfolgte mit 10 ng Template, da bedingt durch den Versuchsaufbau höhere Konzentrationen nicht erreicht werden konnten.

ERGEBNISSE

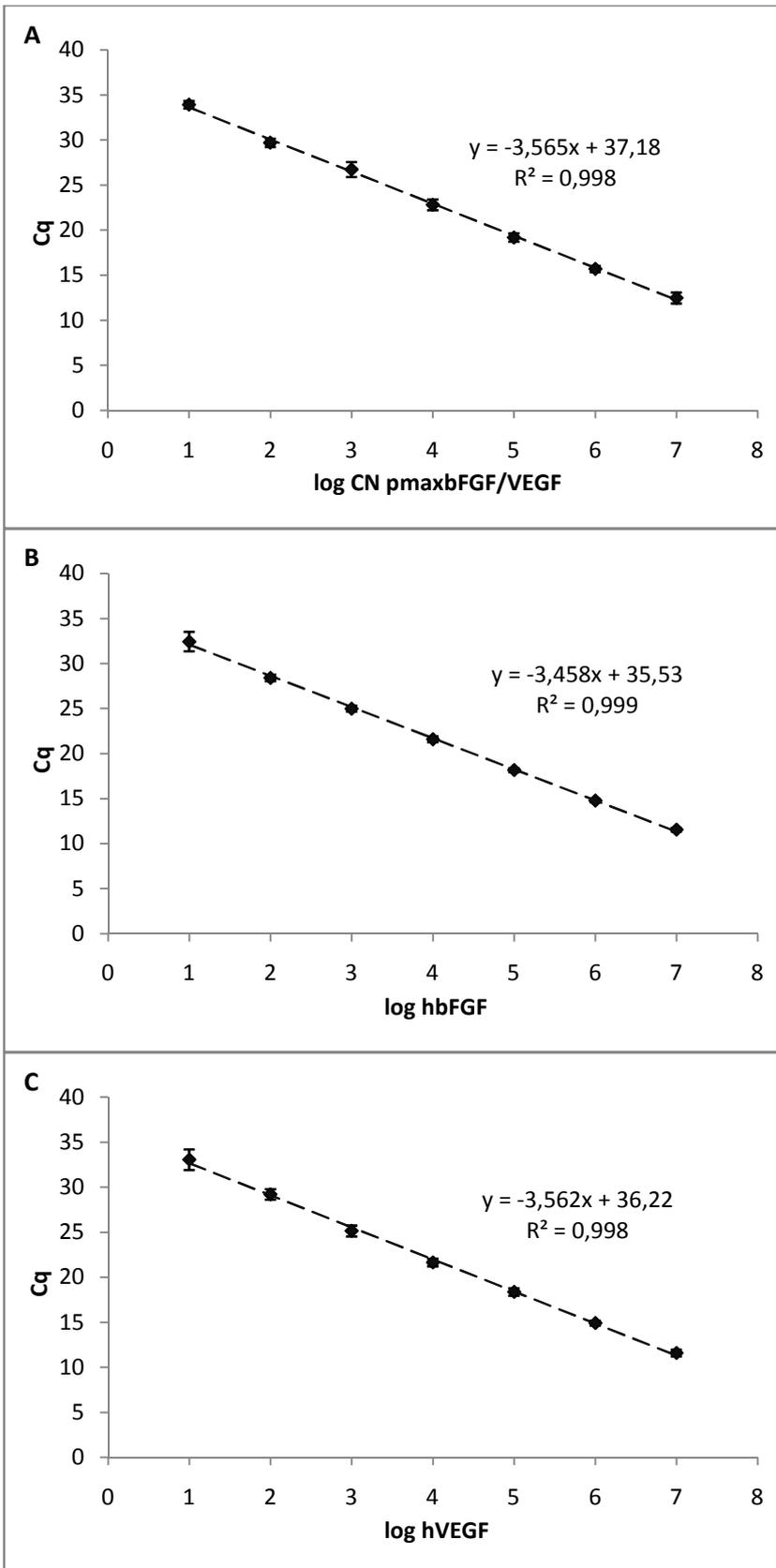


Abb. 9 Standardreihen für die absolute Quantifizierung mittels Real-Time PCR. A zeigt den Nachweis des Gemisches aus pmaxbFGF und pmaxVEGF im Verhältnis 1:1. Die mittlere PCR-Effizienz beträgt 90,9 %. (n=9)

B zeigt den Nachweis der humanen bFGF cDNA mit einer mittleren PCR-Effizienz von 94,6 % (n=6).

C zeigt den Nachweis der humanen VEGF cDNA mit einer mittleren PCR-Effizienz von 90,9 %. (n=5)

ERGEBNISSE

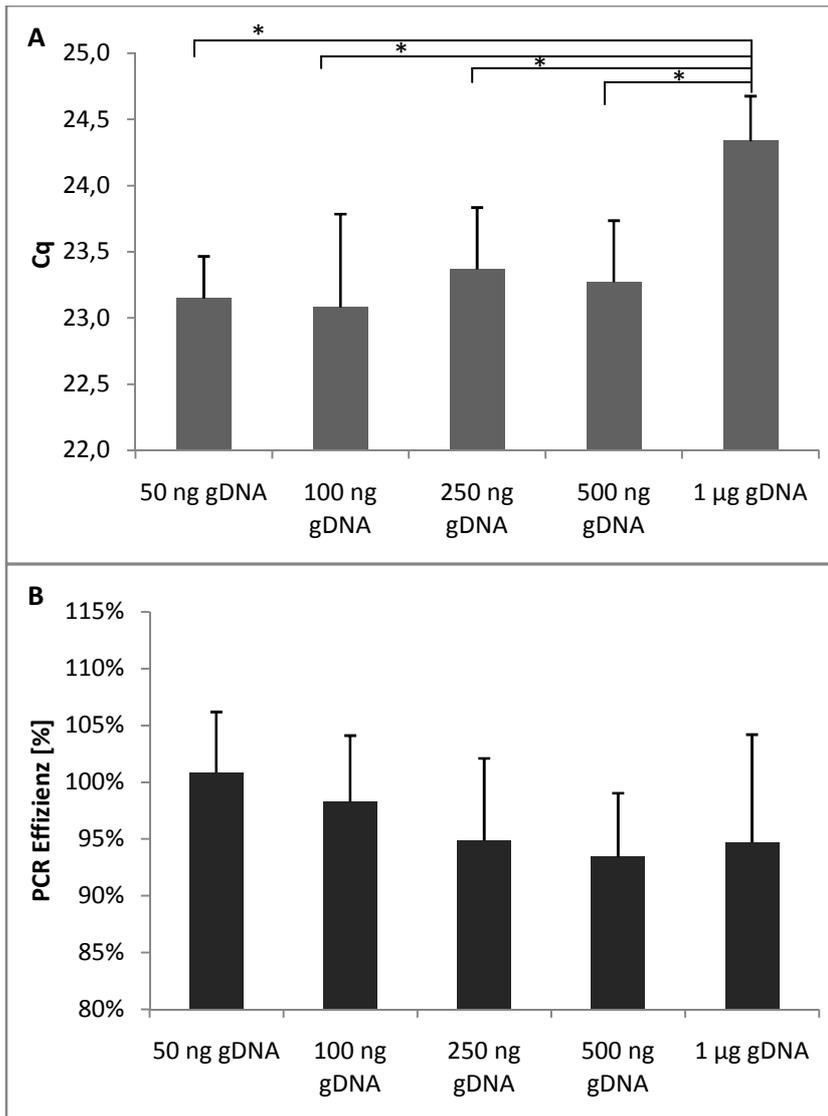


Abb. 10 Einfluss von genomischer DNA (gDNA) aus Gewebeproben auf die Real-Time PCR in Gewebeproben. A Mit steigender Konzentration der gDNA steigt der Cq-Wert der „Spike-in“ Plasmid-DNA.

B Die PCR-Effizienz ist bei geringer gDNA-Konzentration besser als bei höheren Konzentrationen.

(* $p \leq 0,05$; $n=3$)

3.3 *Ex vivo* Charakterisierung der transfizierten Zellen

Für die Anwendung in präklinischen und klinischen Studien muss das Expressionssystem gut charakterisiert sein. Aus diesem Grunde wurde die Proteinexpression und der Plasmidgehalt der transfizierten Zellen *ex vivo* untersucht. Zudem wurde getestet, ob durch die Elektroporation der apoptotische Signalweg in den Zellen stimuliert wird.

3.3.1 Einfluss auf die Apoptoseinduktion

Die Permeabilisierung der Zellmembran durch Elektroporation stellt für die Zellen eine besondere Stresssituation dar. Um zu untersuchen, ob dieser Stress in den Zellen den programmierten Zelltod induziert, wurde ein Apoptostest durchgeführt. Das Membranprotein Phosphatidylserin, das in vitalen Zellen nur auf der cytosolischen Seite der Membran lokalisiert ist, lässt sich in apoptotischen Zellen auch auf der äußeren

Zellmembran nachweisen. Durch die spezifische Bindung von FITC-gelabeltem Annexin V lassen sich diese Zellen detektieren.

Im Vergleich zu unbehandelten Fibroblasten zeigten die Zellen, die dem elektrischen Impuls der Elektroporation ausgesetzt waren, eine erhöhte Anzahl apoptotischer und toter Zellen (siehe Abb. 11, Tabelle 6). Dabei hatte es jedoch nur geringen Einfluss, ob in der Transfektionslösung Plasmid enthalten war oder nicht. Bei allen Transfektionsansätzen war der Anteil apoptotischer Zellen unter 5 % der Gesamtpopulation. Die Transfektion mit pmaxVEGF zeigte im Vergleich jedoch den höchsten Anteil apoptotischer und toter Zellen.

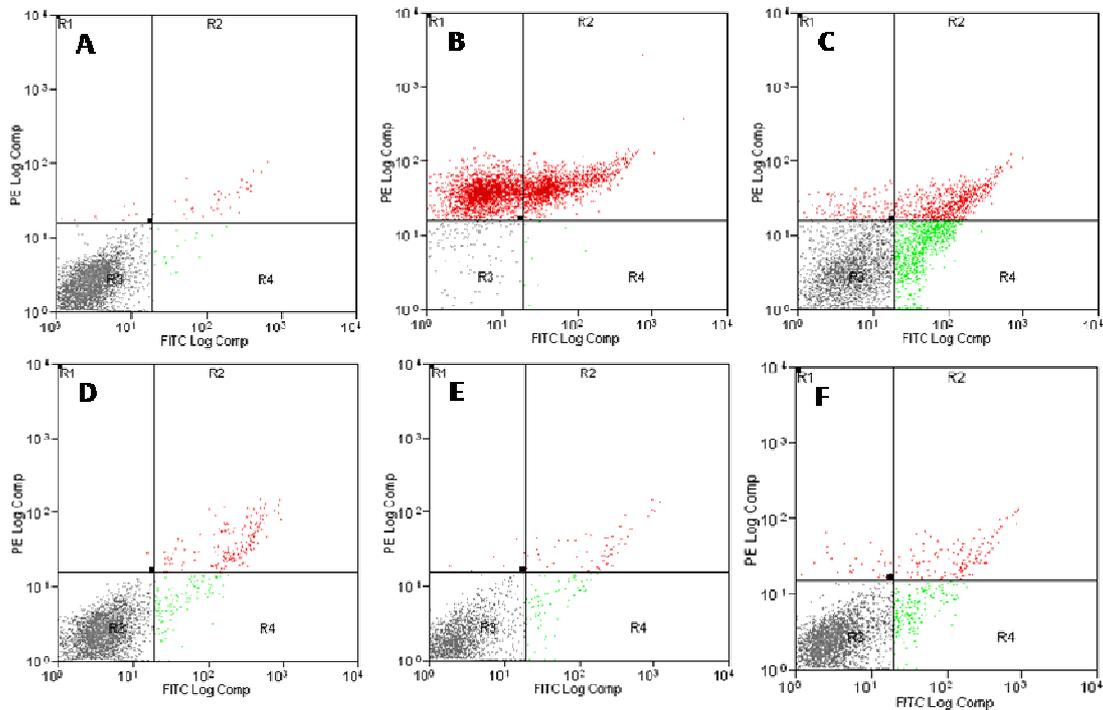


Abb. 11 **Apoptosetest nach Elektroporation.** Die Abbildung zeigt graphisch die Ergebnisse der Durchflusszytometrie von Propidiumiodid (y-Achse) und FITC-Annexin-V (x-Achse) gefärbten Zellen. A unbehandelte Kontrollzellen, B Totkontrolle, C Zellen nach Apoptoseinduktion, D Zellen ohne Plasmid transfiziert, E Zellen mit pmaxbFGF transfiziert, F Zellen mit pmaxVEGF transfiziert. Durch die Elektroporation steigt die Anzahl apoptotischer und toter Zellen (D, E, F) im Vergleich zur Kontrolle (A). Die Transfektion mit pmaxVEGF wirkt sich dabei am negativsten auf die Vitalität der Zellen aus.

Behandlungsmethode	apoptotische Zellen, R4 [%]	tote Zellen, R1+R2 [%]
unbehandelte Zellen (A)	0,5 %	1,0 %
Totkontrolle (B)	0,2 %	96,5 %
Zellen nach Apoptoseinduktion (C)	20,4 %	19,9 %
ohne Plasmid transfizierte Zellen (D)	2,4 %	4,0 %
mit bFGF transfizierte Zellen (E)	1,4 %	1,3 %
mit VEGF transfizierte Zellen (F)	4,6 %	4,3 %

Tabelle 6 **Apoptosetest nach Elektroporation.** Tabellarische Darstellung der Abb. 11

3.3.2 Zeitverlauf der Proteinexpression

Durch die Elektroporation der Zellen können die plasmidcodierten Wachstumsfaktoren beziehungsweise das Reportergen von den Zellen exprimiert werden. Um den Erfolg der Transfektion genauer zu charakterisieren, wurde die Expression auf mRNA- und Proteinebene über eine bestimmte Zeit verfolgt. Zudem konnte mittels Real-Time PCR das Plasmid in den Zellen nachgewiesen werden.

Die Expression des Reportergens GFP wurde über 28 Tage detektiert. Über diesen Zeitverlauf wurden die Zellen nicht passagiert. Wie in Abbildung 12 zu erkennen ist, nahm die Vitalität der Zellen ab. Der Anteil GFP-positiver Zellen (Transfektionseffizienz) zeigte an Tag 3 ein Maximum mit $79,3 \pm 0,8$ %. An Tag 28 war noch in $33,1 \pm 0,7$ % der Zellen ein GFP-Signal detektierbar. Das Grün Fluoreszierende Protein besitzt jedoch im Vergleich zu bFGF und VEGF eine höhere Halbwertszeit. Daher sind diese Ergebnisse nicht direkt auf die Expression der Wachstumsfaktoren übertragbar.

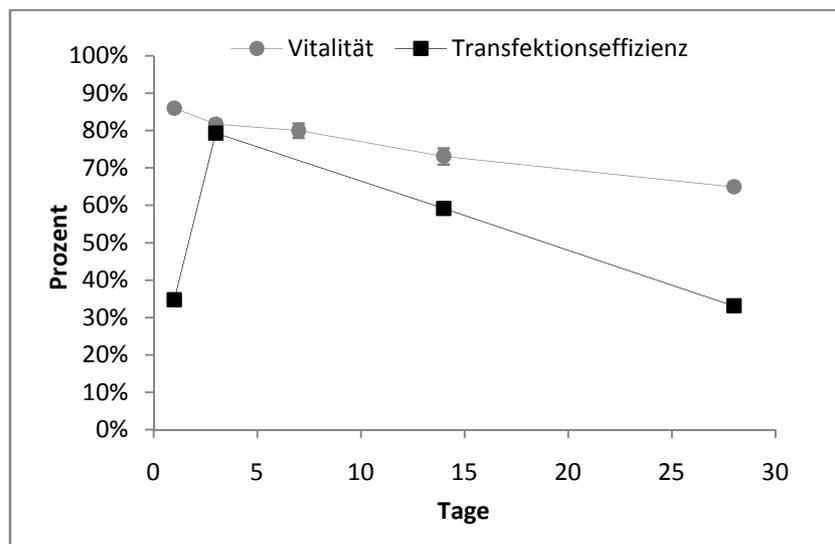


Abb. 12 **Zeitverlauf der GFP-Expression.** Die Abbildung zeigt die Vitalität und den Anteil GFP-positiver Zellen (Transfektionseffizienz) nach Transfektion. Die Vitalität der Zellen nimmt im Verlauf der Kultivierung von Tag 1 bis Tag 28 ab. Die Transfektionseffizienz, gemessen am Durchflusszytometer, steigt dagegen von Tag 1 auf Tag 3, nimmt jedoch im Zeitverlauf bis Tag 28 wieder ab. (n=2)

Die Expression der plasmidcodierten Wachstumsfaktoren wurde mittels Real-Time PCR detektiert. Nach der Transfektion war die höchste Konzentration der humanen cDNA an Tag 1 mit 450,5 (hbFGF) bzw. 484,3 (hVEGF) cDNA Kopien pro 1000 Zellen nachweisbar (siehe Abb. 13). Vier Wochen nach Transfektion (Tag 28) konnten noch 0,4 Kopien cDNA pro 1000 Zellen von beiden Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden.

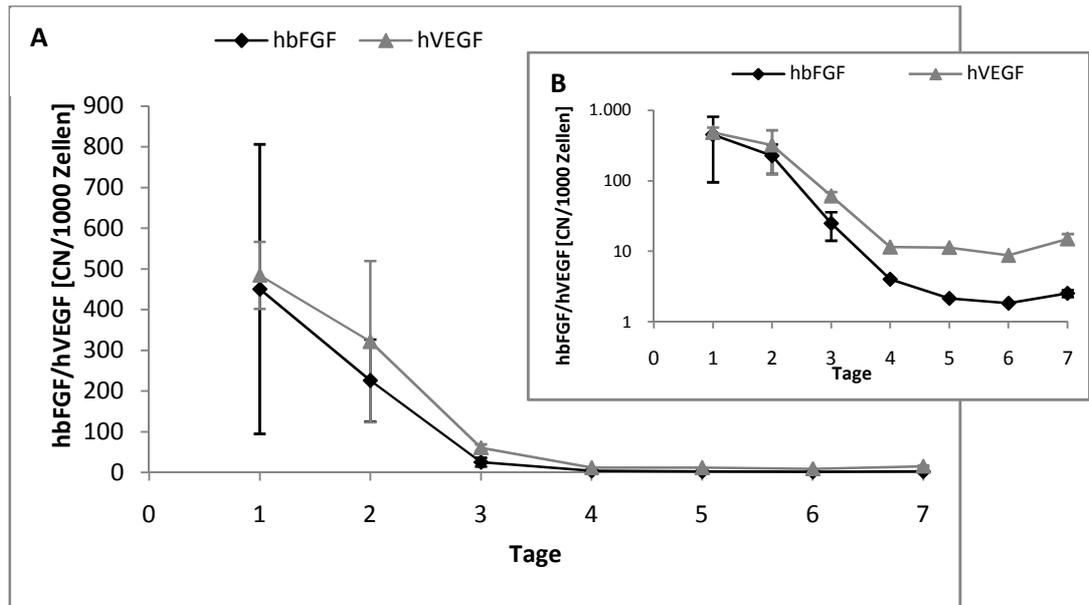


Abb. 13 **cDNA-Nachweis der Plasmid-codierten Wachstumsfaktoren im Zeitverlauf mittels Real-Time PCR.** Die Abbildungen A und B zeigen die cDNA-Konzentration von humanem bFGF und VEGF pro 1000 Zellen von Tag 1 bis Tag 7 nach Transfektion (B logarithmische Skalierung). Die Konzentration der cDNA beider Wachstumsfaktoren ist an Tag 1 am höchsten und nimmt im Verlauf der Kultivierung ab. An Tag 7 sind noch 0,6 % (hbFGF) bzw. 3,1 % (hVEGF) der cDNA Moleküle von Tag 1 nachweisbar. (n≥2)

Mittels ELISA konnten die exprimierten Wachstumsfaktoren im Zellkulturüberstand detektiert werden. Der basische Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) zeigte ein Maximum von $10,5 \pm 2,9$ pg/1000 Zellen an Tag 2 nach Transfektion und konnte nur bis Tag 5 in den Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 14 A+B). Nach pmaxVEGF-Transfektion konnte die höchste VEGF Konzentration bereits an Tag 1 mit $279,6 \pm 38,1$ pg/1000 Zellen detektiert werden, während nach 4 Wochen (28 Tage) Kultivierung dieser Wachstumsfaktor nicht mehr nachweisbar war (siehe Abb. 14 C+D).

Der Nachweis der Plasmid-DNA erfolgte nach Transfektion mit den wachstumsfaktor-codierenden Plasmiden (siehe Abbildung 15) mittels Real-Time PCR. Die Anzahl von Plasmid-DNA pro Zelle sank nach Tag 1 (ca. 8.000 pmaxbFGF bzw. ca. 4.000 pmaxVEGF Moleküle pro Zelle) stark ab. Bereits an Tag 4 nach Transfektion war nur noch etwa 10 % der Plasmidmenge pro Zelle von Tag 1 detektierbar. Sowohl nach Transfektion mit pmaxbFGF als auch mit pmaxVEGF war auch nach 84 Tagen noch Plasmid-DNA in den Zellen nachweisbar (pmaxbFGF: $1,6 \pm 0,2$ Moleküle/Zelle; pmaxVEGF: $6,0 \pm 2,5$ Moleküle/Zelle).

ERGEBNISSE

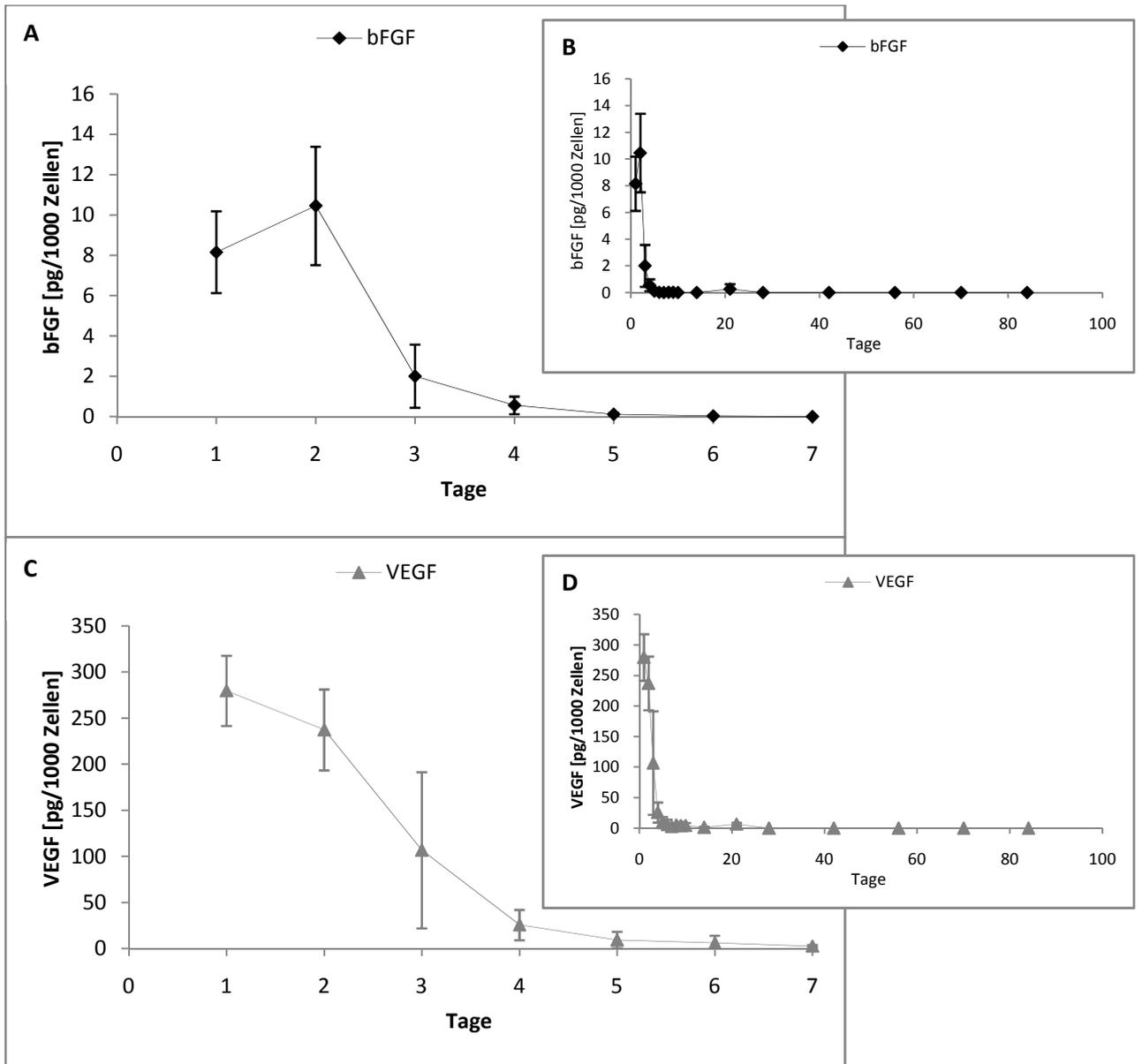


Abb. 14 **Nachweis der plasmidcodierten Wachstumsfaktoren im Zellkulturüberstand mittels ELISA.** Die Abbildungen A und B zeigen die Proteinkonzentration von bFGF pro 1000 Zellen. Die Konzentration ist an Tag 2 nach Transfektion maximal und fällt dann stark ab. Bereits an Tag 6 ist im Überstand kein Protein mehr nachweisbar. In Abbildung C und D ist der Nachweis der VEGF-Expression dargestellt. Die VEGF-Konzentration sinkt nach Tag 1 kontinuierlich und ist noch bis Tag 21 im Zellkulturüberstand detektierbar. Alle Werte spiegeln die Proteinexpression in 24 Stunden wider, da einen Tag vor der Probennahme ein Mediumwechsel erfolgte. (n≥2)

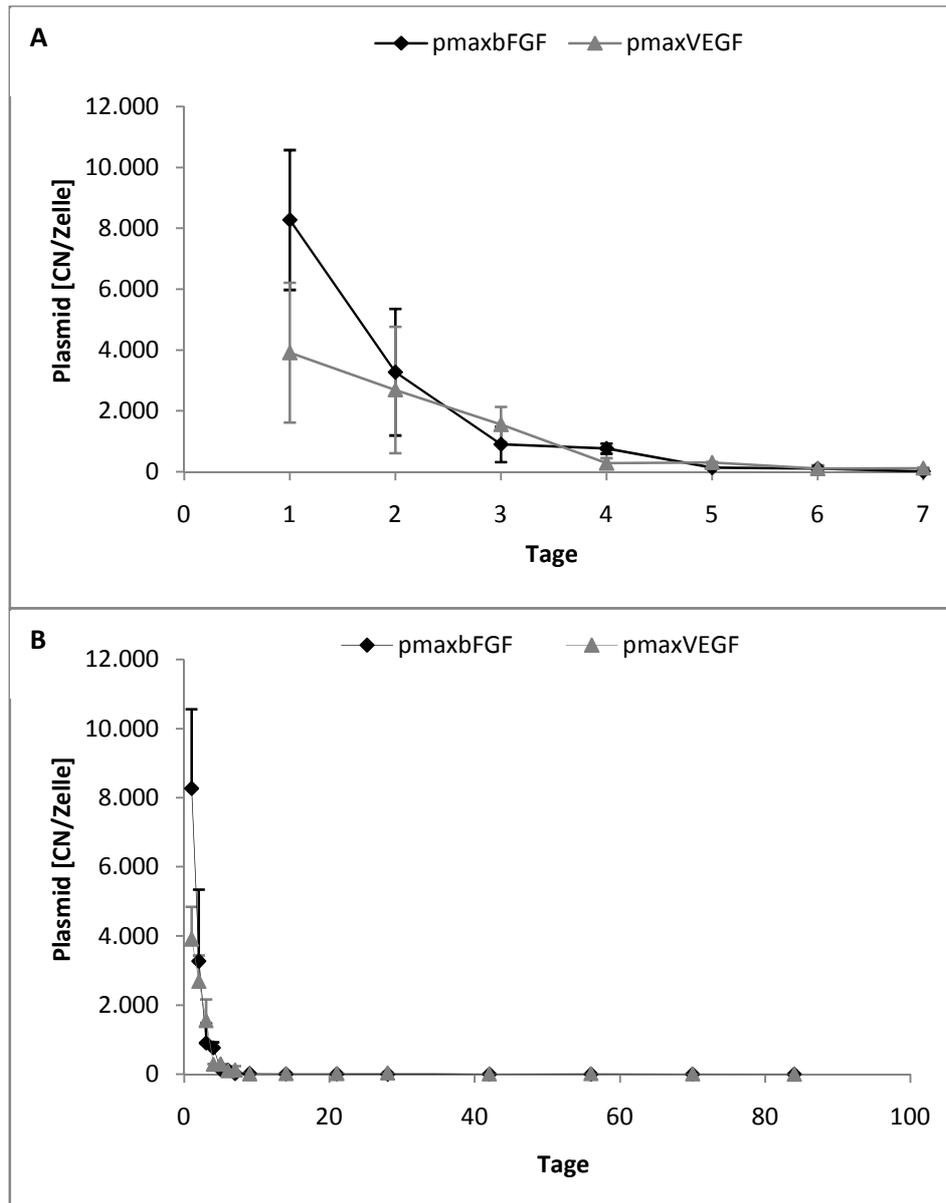


Abb. 15 **Nachweis der Plasmid-DNA *ex vivo* im Zeitverlauf mittels Real-Time PCR.** In A ist der Nachweis der Plasmid-DNA über die ersten 7 Tage dargestellt. An Tag 1 sind pro Zelle mehr pmaxbFGF- als pmaxVEGF-Moleküle detektierbar. Beide Plasmide werden jedoch innerhalb weniger Tage stark abgebaut. An Tag 7 sind nur noch etwa 20 (pmaxbFGF) bzw. 71 (pmaxVEGF) Plasmidmoleküle pro Zelle nachweisbar. B zeigt den Verlauf über drei Monate. An Tag 84 lassen sich noch $1,6 \pm 0,2$ pmaxbFGF- und $6,0 \pm 2,5$ pmaxVEGF-Moleküle pro Zelle nachweisen. ($n \geq 2$)

3.4 *in vivo* Experimente

Die transfizierten Zellen wurden den Ratten im „Hindlimb“ Modell intramuskulär um die Ligationsstelle injiziert. Anschließend wurde die lokale Expression der Wachstumsfaktoren sowie die Verteilung der Plasmid-DNA im Körper analysiert und das Gewebe auf die Expression von Genen untersucht, die bei Stress und Toxizität von Bedeutung sind.

3.4.1 Charakterisierung der Proteinexpression an der Injektionsstelle

Die Expression der plasmidcodierten Wachstumsfaktoren konnte nach Injektion der transfizierten Zellen im Gewebe mittels Real-Time PCR nachgewiesen werden (siehe Abb. 16). An Tag 1 nach Injektion waren im Muskel um die Injektionsstelle 2.454 ± 251 hbFGF-Moleküle und 3.451 ± 299 hVEGF-Moleküle pro 10 ng eingesetzter cDNA detektierbar. Das entspricht ca. $7,0 \cdot 10^4$ hbFGF-Molekülen beziehungsweise $9,8 \cdot 10^4$ hVEGF-Molekülen pro mg Gewebe. Sieben Tage nach Injektion konnten nur noch 0,5 % der hbFGF- und 0,6 % der hVEGF-Moleküle von Tag 1 nachgewiesen werden. Ab Tag 14 nach Injektion war ein Nachweis der plasmidcodierten Wachstumsfaktoren im behandelten Gewebe nicht mehr möglich.

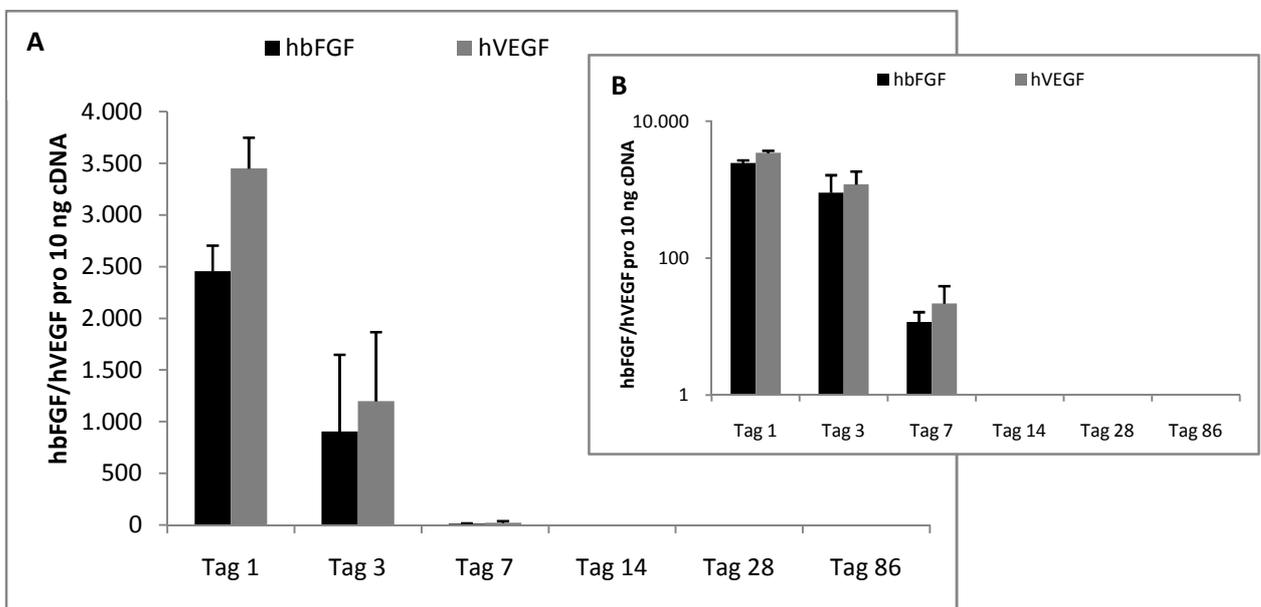


Abb. 16 **Nachweis der plasmidcodierten Wachstumsfaktoren *in vivo* mittels Real-Time PCR.** Die Abbildungen A und B zeigen die Anzahl humaner bFGF und VEGF cDNA-Moleküle pro 10 ng cDNA aus dem injizierten Muskel in linearer (A) und logarithmischer (B) Skalierung. Die Expression an der Injektionsstelle nimmt innerhalb der ersten 7 Tage stark ab. Nach 14 Tagen sind die plasmidcodierten Wachstumsfaktoren bereits nicht mehr nachweisbar.

Neben der absoluten Quantifizierung der humanen Wachstumsfaktoren, die durch die Injektion transfizierter Zellen im Gewebe exprimiert wurden, wurde auch der Anstieg der bFGF- beziehungsweise VEGF-Moleküle der Ratte analysiert (siehe Abb. 17). Hierfür wurden Primerpaare gewählt, die sowohl die humanen als auch die Ratten-Isoformen der Proteine erkennen. So konnten autokrine und parakrine Effekte abgeschätzt werden. Die Expression von bFGF stieg an Tag 1 nach Injektion des Gemisches von mit pmaxbFGF und pmaxVEGF transfizierten Zellen um den Faktor $9,1 \pm 3,1$ im Vergleich zur Kontrolle, in der

nur unbehandelte Zellen injiziert wurden. Der Expressionsanstieg der VEGF-Isoformen an Tag 1 war $7,4 \pm 2,5$ fach im Vergleich zur Kontrolle. An Tag 7 nach Injektion konnte sowohl bei bFGF als auch bei VEGF keine Veränderung der wachstumsfaktorcodierenden cDNAs im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden, während an Tag 14, 28 und 86 die Expression der Wachstumsfaktoren in den mit transfizierten Zellen behandelten Tieren sogar geringer war als in der Kontrollgruppe. Die Injektion von Fibroblasten, die hbFGF und hVEGF exprimieren, führt folglich zu einer Herunterregulation der rattenspezifischen Wachstumsfaktoren.

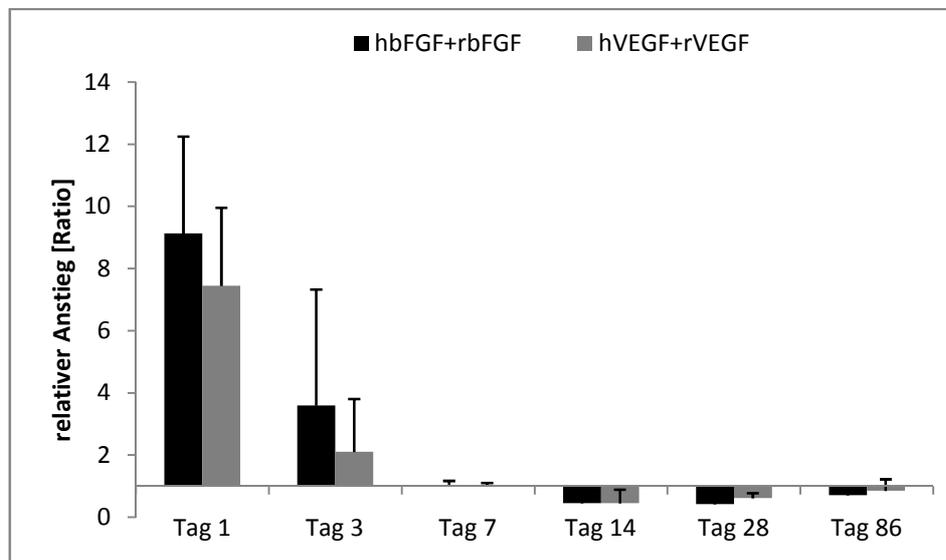


Abb. 17 **Nachweis der relativen Expression von bFGF und VEGF *in vivo* mittels Real-Time PCR.** Die Abbildung zeigt den relativen Anstieg der humanen und Rattenisoformen von bFGF und VEGF nach Injektion transfizierter Zellen an der Injektionsstelle im Vergleich zur Kontrolle. An Tag 1 und Tag 3 nach Injektion ist die relative Expression von bFGF und VEGF erhöht und entspricht an Tag 7 dem Expressionslevel der Kontrollproben. An Tag 14, 28 und 86 ist in den mit transfizierten Zellen behandelten Tieren weniger cDNA von bFGF und VEGF detektierbar.

Für die Bestimmung der Wachstumsfaktorkonzentration an der Injektionsstelle wurden die Gewebeproben mittels ELISA untersucht. Das Quantikine® human VEGF ELISA Kit ist spezifisch für das humane VEGF. Die VEGF-Isoformen der Ratte werden von diesem Assay nicht detektiert. Das Quantikine® human FGF basic ELISA Kit dagegen erkennt auch Isoformen des Rattenproteins. Demzufolge ist dieser Assay nicht spezifisch für den plasmidcodierten Wachstumsfaktor. Die höchste Proteinkonzentration konnte mit beiden Kits an Tag 3 nach Injektion gemessen werden (bFGF: 27,6 pg/mg Gewebe; VEGF: 3,8 pg/mg Gewebe). VEGF war bereits ab Tag 7 in den Gewebeproben nicht mehr nachweisbar, während die bFGF-Konzentration an Tag 7 im Vergleich zur Kontrolle noch leicht erhöht war und ab Tag 14 nur noch dem Kontrolllevel entsprach (siehe Tabelle 7).

	bFGF in pg/mg Gewebe		VEGF in pg/mg Gewebe	
	MW	Stabw	MW	Stabw
Kontrolle	2,02	0,77	n.d.	/
Tag 1	13,10	2,83	1,75	1,23
Tag 3	27,56	19,61	3,79	3,21
Tag 7	2,94	0,23	n.d.	/
Tag 14	1,40	0,36	n.d.	/

Tabelle 7 *In vivo* Expression (ELISA) an der Injektionsstelle. Kontrolle: Injektion von unbehandelten Fibroblasten, Tag 1 bis Tag 14 nach Injektion von je $5 \cdot 10^6$ bFGF- und VEGF-transfizierten Fibroblasten. Die höchste Proteinkonzentration ist an Tag 3 nach Injektion der modifizierten Zellen nachweisbar. n.d.=nicht detektierbar; MW=Mittelwert; Stabw=Standardabweichung

3.4.2 Verteilung der Plasmid-DNA im Körper - Biodistribution

Um die Verteilung der transfizierten Zellen im Körper zu untersuchen, wurden die unterschiedlichen Gewebeproben auf das Vorhandensein der Plasmid-DNA mittels Real-Time PCR untersucht. Mit dieser Methode konnte sowohl pmaxbFGF als auch pmaxVEGF erfasst werden.

Die höchste Plasmidkonzentration wurde um die Injektionsstelle detektiert (siehe Abb. 18). An Tag 1 nach Injektion konnten hier ca. $13,3 \cdot 10^6$ DNA-Moleküle pro mg Muskelgewebe nachgewiesen werden. Im Zeitverlauf nahm die nachweisbare Plasmidmenge stetig ab. Bereits eine Woche nach Injektion waren nur noch 2 % der Konzentration von Tag 1 im injizierten Muskel detektierbar. Im Rahmen des Versuchsaufbaus konnte kein vollständiger Abbau der Plasmid-DNA nachgewiesen werden. Etwa zwölf Wochen nach Injektion (Tag 86) ließen sich noch 306 Plasmidmoleküle pro mg Muskelgewebe detektieren.

ERGEBNISSE

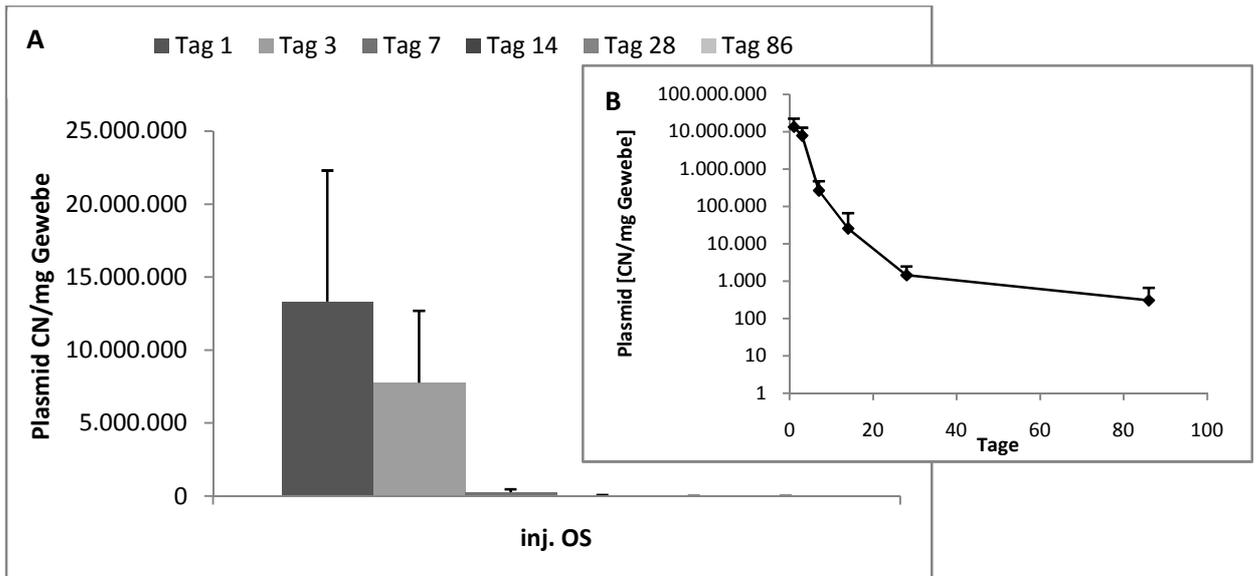


Abb. 18 **Nachweis der Plasmid-DNA *in vivo* im injizierten Muskel mittels Real-Time PCR.** In Abbildung A und B ist die Menge der Plasmid-DNA pro mg Muskelgewebe in linearer und logarithmischer Skalierung dargestellt. Die meisten Plasmidmoleküle sind an Tag 1 nach Injektion nachweisbar. Danach ist bis Tag 86 ein stetiger Rückgang der Plasmidmenge pro Muskelgewebe erkennbar. Inj. OS=injizierter Oberschenkel.

In der Tabelle 8 und Abbildung 19 sind die Ergebnisse des Plasmidnachweises in den peripheren Organproben zusammengestellt. Aus der Abbildung 19 ist zudem das individuelle Verteilungsmuster der einzelnen Tiere erkennbar. Neben der Injektionsstelle konnte die Plasmid-DNA in einigen Versuchstieren auch in Herz, Leber, Milz, Lunge, Dünndarm, Niere und Kontrollmuskel in geringen Konzentrationen detektiert werden. Lediglich im Gehirn und im Hoden war in allen Tieren der Nachweis des Gentransfervektors negativ.

ERGEBNISSE

	Tag 1		Tag 3		Tag 7		Tag 14		Tag 28		Tag 86	
	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw
Kontrollmuskel	0,0	0,0	50,7	87,9	0,0	0,0	27,0	46,8	0,0	0,0	25,3	43,9
Lunge	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	29,3	50,7	0,0	0,0
Herz	0,0	0,0	304,2	526,8	0,0	0,0	0,0	0,0	16,6	28,7	0,0	0,0
Dünndarm	0,0	0,0	55,2	95,6	10,6	18,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Leber	0,0	0,0	141,4	244,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Milz	0,0	0,0	0,0	0,0	465,2	805,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Niere	0,0	0,0	0,0	0,0	38,1	52,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Hoden	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Gehirn	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabelle 8 **Nachweis der Plasmid-DNA *in vivo* in peripheren Gewebeproben mittels Real-Time PCR.** In der Tabelle sind die Ergebnisse des Plasmidnachweises in Copy Number (CN) Plasmid-DNA pro mg Gewebe dargestellt. Pro Versuchstag wurden jeweils 3 mit transfizierten Zellen injizierte Tiere (Exp) und ein Kontrolltier (Ko, Injektion von unbehandelten Zellen) untersucht (Ausnahme Tag 1 Exp: n=2, Ko: n=1). Die Proben der Kontrolltiere waren alle negativ (nicht dargestellt). Die Farbcodierung liefert folgende Aussagen: violett markierten Werte: Organprobe in einem der drei Versuchstiere positiv, blau markierte Werte: Organprobe in zwei der drei Versuchstiere positiv. MW=Mittelwert, Stabw=Standardabweichung

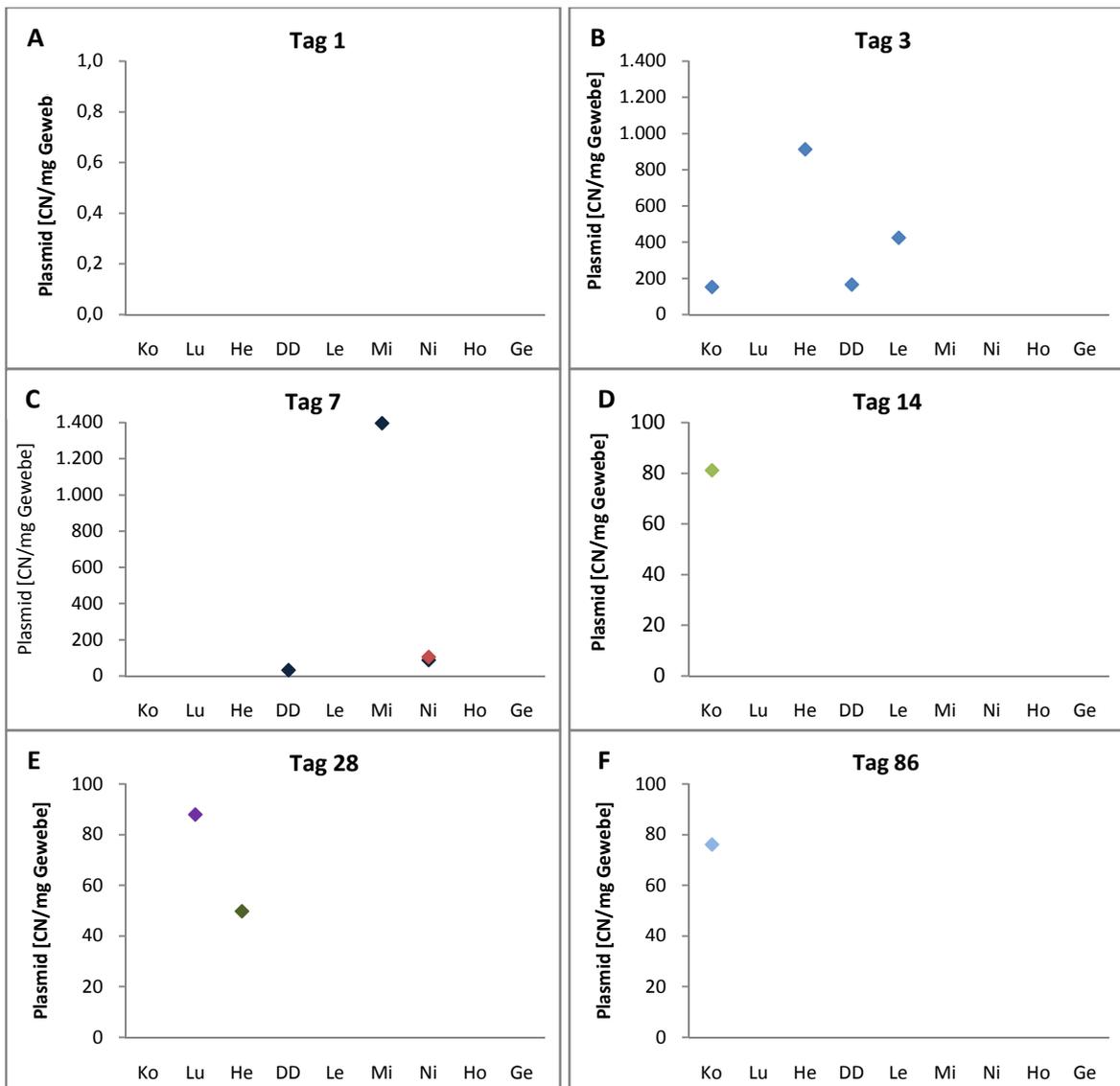


Abb. 19 **Nachweis der Plasmid-DNA *in vivo* in peripheren Gewebeproben mittels Real-Time PCR.** Quantifizierung in verschiedenen Geweben zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion A Tag 1, B Tag 3, C Tag 7, D Tag 14, E Tag 28, F Tag 86. Jedes Signal steht für eine positive Gewebeprobe. Gleiche Farbe bedeutet gleiches Versuchstier. Ko=Kontrollmuskel, Lu=Lunge, He=Herz, DD=Dünndarm, Le=Leber, Mi=Milz, Ni=Niere, Ho=Hoden, Ge=Gehirn.

3.4.3 Untersuchung von Stress- und Toxizitätsfaktoren an der Injektionsstelle

Ein weiterer Aspekt bei der Analyse der biologischen Sicherheit eines Gentransfersystems ist das Auftreten von unerwünschten Reaktionen des Organismus, wie die Aktivierung einer Immunantwort oder die Einleitung von Apoptosesignalwegen oder gar Nekrose.

Um diese Mechanismen zu untersuchen, wurde der Real-Time PCR Array „Rat Stress and Toxicity PathwayFinder™“ angewandt. Mithilfe dieses Assays konnte in einem Versuchsaufbau die Expression von 84 Genen charakterisiert werden, die mit Stress und Toxizität in Verbindung gebracht werden.

Als Versuchszeitpunkt wurde Tag 7 nach Injektion gewählt, da die Expression der plasmid-codierten Proteine zu diesem Zeitpunkt noch detektierbar war und der angiogenetische Effekt bereits nachgewiesen werden konnte (vergl. Zhang et al., 2011). Die Abbildung 20 gibt einen Überblick über die Gene, deren Expression an der Injektionsstelle der Experiment- und Kontrolltiere um den Faktor 2,5 und mehr variierte. Auffällig war, dass besonders die Expression proinflammatorischer Cytokine nach Injektion der transfizierten Zellen erhöht war. Zudem konnten in diesem Gewebe erhöhte Mengen der Fas Ligand- (Faslg) und Caspase 1-cDNA gefunden werden, die beide in der Apoptoseinduktion involviert sind. Die cDNA von Ercc1, einer Endonuklease für die DNA Reparatur, wurde dagegen geringer exprimiert, ebenso wie die cDNA von „Early Growth Response 1“ (Egr1), Cyclin G1, „Epoxidhydrolase 2“ (Ephx2), „Flavin Containing Monooxygenase 1“ (Fmo1) und „Heat Shock 70 kD Protein 1 like“ (Hspa1l).

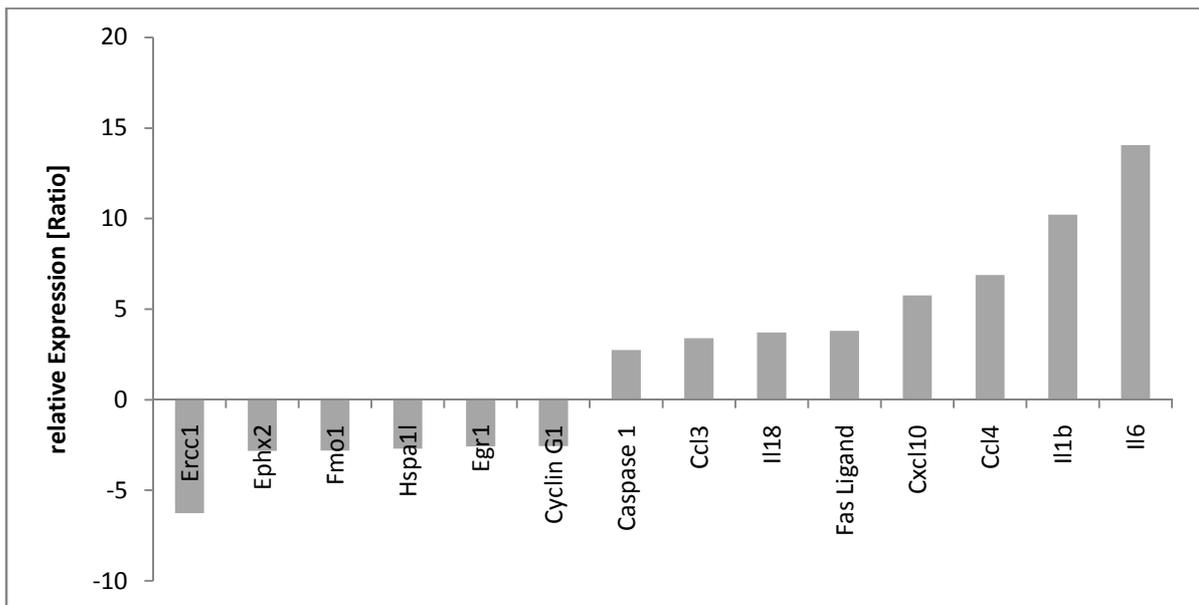


Abb. 20 **Expressionsmuster von Stress- und Toxizitätsgenen im injizierten Muskelgewebe an Tag 7 nach Injektion.** Die Abbildung zeigt die Expressionsmuster der Gene, die sich mindestens um den Faktor 2,5 in Experiment (Injektion transfizierter Zellen) und Kontrolle (Injektion unbehandelter Zellen) unterscheiden. Ercc1=Excision Repair Cross-Complementing Rodent Repair Deficiency, Complementation Group 1, Ephx2=Epoxide Hydrolase 2, Fmo1=Flavin Containing Monooxygenase 1, Hspa1l=Heat Shock 70 kD Protein 1-like, Egr1=Early Growth Response 1, CCL=Chemokin (C-C Motiv) Ligand, Cxcl=Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand, Il=Interleukin. n=1

4. Diskussion

4.1 Optimierung des Gentransfers

Obwohl die Gentherapie in den letzten Jahrzehnten viele Fortschritte gemacht hat, ist sowohl in Europa als auch in den USA bislang noch keine klinische Studie erfolgreich mit einer Genehmigung abgeschlossen worden. Einer der Gründe hierfür ist in der Verfügbarkeit hocheffizienter und vor allem sicherer Vektorsysteme zu suchen, die eine an die Problemstellung angepasste Expression des Therapeutikums ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein nicht-virales Gentransfermodell gewählt. Hiermit können einige Probleme umgangen werden, die häufig bei viralen Methoden berücksichtigt werden müssen, wie beispielsweise endogene Virusrekombination, onkogene Effekte oder starke Immunreaktionen auf das Viruspartikel. Zudem bietet der Einsatz nicht-viraler Vektoren auch Vorteile in Bezug auf die einfache Anwendbarkeit, die relativ einfache und damit kosteneffektivere Herstellung großer Vektormengen sowie die geringe, unspezifische Immunantwort (Niidome und Huang, 2002; Thomas et al., 2003; Wolff et al., 2005, Parra-Guillén et al., 2010).

Das in dieser Arbeit verwendete Gentransfersystem, die Elektroporation, gehört zu den physikalischen nicht-viralen Modellen. Hierbei kann im Vergleich zu chemischen Methoden auf den Einsatz von Carrier-DNA oder toxischen Substanzen wie Glycerol, DMSO oder Polyethylenglycol verzichtet werden (Fountain et al., 1988). Zudem konnte gezeigt werden, dass nur relativ wenig Plasmid-DNA pro Zelle eingesetzt werden muss. Chemische Methoden erfordern höhere DNA-Konzentrationen um vergleichbare Transfektionseffizienzen zu erreichen (Zhang et al., in Bearbeitung).

Die Elektroporation, auch Elektropermeabilisierung genannt, ist eine weit verbreitete Methode, um genetisches Material in Zellen einzubringen. Sie wurde erstmals 1982 von Neumann et al. publiziert und seitdem stetig weiterentwickelt (Neumann et al., 1982). Durch die Anwendung von elektrischen Impulsen werden die Zellmembranen transient permeabilisiert. Dabei können hydrophile Moleküle, wie Medikamente oder Plasmide, *in vitro* in die Zellen oder auch *in vivo* in das zu transfizierende Gewebe aufgenommen werden. Während kleine Moleküle vorwiegend durch Diffusion in das Zellinnere gelangen, konnte bislang der genaue Mechanismus der Aufnahme größerer Moleküle, wie beispielsweise der Plasmid-DNA, noch nicht geklärt werden. Es wird angenommen, dass

sich das Membranpotential durch einen elektrischen Impuls so ändert, dass die Plasmid-DNA mit der permeabilisierten Membran interagieren kann. Dabei entstehen DNA-Aggregate, die in die Zelle gelangen (Escoffre et al., 2009). Neben der Durchquerung der Zellmembran sind auch die metabolische Stabilität der Plasmid-DNA, ihre intrazelluläre Migration sowie die Translokation in den Zellkern entscheidende Faktoren, die die Effizienz der Methode beeinflussen (Lechardeur und Lukacs, 2002). Bei der Analyse der Plasmidkonzentration (DNA) sowie der Expression der therapeutischen Proteine (cDNA) *in vitro* als auch *in vivo* wurde deutlich, dass 10fach (*in vitro*) bzw. 100fach (*in vivo*) mehr Plasmid-DNA pro Zelle bzw. pro Gewebemenge als cDNA detektiert werden konnte. Diese Unterschiede können darauf beruhen, dass das Plasmid zwar von den Zellen aufgenommen wurde, jedoch nur zum Teil im Zellkern vorliegt und somit nur vermindert exprimiert werden kann.

Für die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zellen ist es wichtig die optimalen Versuchsbedingungen zu finden. Während für die meisten Zelllinien gut etablierte Parameter beschrieben sind, ist eine Optimierung der Transfektion bei primären Zellen unbedingt erforderlich. Primäre Fibroblasten zählen zu den schwer zu transfizierenden Zellen (Fountain et al., 1988), jedoch lassen sich mit viralen Methoden sehr hohe Transduktionseffizienzen erreichen (Walther und Stein, 2000; Howarth et al., 2010; Spanholtz et al., 2010).

Die Anwendung der Nucleofector® Technologie stellt bei der Optimierung einen guten Ausgangspunkt dar, da sie für viele verschiedene primäre Zelltypen spezifische Transfektionslösungen und -protokolle anbietet. Die Elektroporationsparameter, wie die Stärke des elektrischen Feldes, die Pulsdauer und -stärke, sind für unterschiedliche Zelltypen optimiert und in den Programmen des Nucleofector® Gerätes festgelegt. Der Vergleich mehrerer Transfektionsprogramme ergab, dass mit dem Protokoll U30 für die primären Rattenfibroblasten aus der Vollhaut die besten Transfektionseffizienzen und Zellvitalitäten erzielt werden konnten. Mueller et al. nutzten für primäre Rattenfibroblasten aus Bindegewebsproben die Protokolle U23 und P22 (Mueller et al. 2010).

Eine weitere Besonderheit der Nucleofector® Technologie ist es, dass der Vektor durch die spezielle Zusammensetzung der Transfektionslösung schneller in den Zellkern transportiert wird. Somit kann die Expression früher starten und die

Transfektionseffizienz ist im Vergleich zu anderen nicht-viralen Methoden erhöht. Zudem ist der Gentransfer unabhängig von der Teilungsfähigkeit der Zellen, die bei nicht-viralen Transfektionen häufig Voraussetzung für die Aufnahme der Vektor-DNA in den Zellkern ist. So können auch Zellen, die sich nicht teilen, wie beispielsweise adulte Neuronen oder unstimulierte Blutzellen, relativ effizient transfiziert werden (Leclere et al., 2005; Nguyen et al., 2006). Da primäre Fibroblasten verhältnismäßig stark proliferieren, ist der Zusatz von Stoffen, die den Kerntransport erleichtern, nicht zwangsläufig notwendig. In dieser Arbeit wurde daher getestet, ob die Elektropermeabilisierung auch in einem anderen Puffersystem durchgeführt werden kann. Der Vergleich der Nucleofector® Lösung mit serumhaltigem Zellkulturmedium zeigte, dass die Transfektionseffizienz in Medium unter gleichen Bedingungen zwar etwas geringer war als in der Nucleofector® Lösung, jedoch Vorteile im Handling der Zellen bot. Nach Elektroporation mit Nucleofector® Lösung ließen sich die Zellen nur relativ schlecht durch Trypsinieren von der Zellkulturflasche lösen. Diese Problematik wurde durch die Anwendung von Medium als Elektroporationspuffer umgangen. Durch den Einsatz von Küvetten mit größerer Spaltbreite und die Erhöhung der Zellzahl konnte zudem die Effizienz der Zellaufarbeitung erhöht werden. Somit war es möglich, die für die Tierexperimente benötigten Zellen mit relativ geringem Material-, Zeit- und Kostenaufwand zu generieren. Auch in anderen Arbeitsgruppen wurde der Nucleofector® Apparat mit anderen Küvetten und Elektroporationspuffern getestet. So konnten beispielsweise Kang et al. zeigen, dass primäre humane Endothelzellen nach Elektroporation in PBS nur leicht verringerte Transfektionseffizienzen und Vitalitäten im Vergleich zur Nucleofector® Lösung aufweisen (Kang et al., 2009).

Durch die beschriebenen Optimierungsschritte konnte ein Transfektionssystem entwickelt werden, das den Anforderungen für die (präklinischen) Tierexperimente, wie hoher Zelldurchsatz bei relativ geringem Materialverbrauch und gute Reproduzierbarkeit, genügt.

4.2 Expression der therapeutischen Wachstumsfaktoren

In der vorliegenden Arbeit wurden Plasmidvektoren im Rattenmodell eingesetzt, auf denen die humanen Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF₁₆₅ codiert sind. Dieses war begründet mit der Absicht, die Plasmide in folgenden klinischen Studien am Menschen zu testen.

Die Wachstumsfaktoren der beiden Spezies unterscheiden sich nur gering. So ist die Sequenz des humanen bFGF-Proteins mit der Rattenproteinsequenz zu 96 % identisch. Die in dieser Arbeit genutzte Isoform VEGF₁₆₅ unterscheidet sich in seiner Sequenz vom Rattenprotein (VEGF-A, Isoform 2) nur um 11 %. Werden zudem die spezifischen Eigenschaften der verschiedenen Aminosäuren berücksichtigt, so sind die Unterschiede zwischen den Spezies noch geringer (bFGF: 1 %, VEGF₁₆₅: 8 %).

Humane Proteine kamen auch in anderen Arbeitsgruppen in Rattenmodellen zum Einsatz (Boussairi und Sassard, 1994; Hu und Wu, 2001; Kunig et al., 2005; Zhou et al., 2005; Kunig et al., 2006; Hao et al., 2007). Einen direkten Vergleich von rekombinantem humanen und Ratten-bFGF führten Zittermann und Issekutz durch. Sie untersuchten den Einfluss der Proteine auf die Rekrutierung von Leukozyten bei einer Hautentzündung und konnten zeigen, dass beide Formen in vergleichbarer Stärke eine Migration von Neutrophilen bewirken (Zittermann und Issekutz, 2006).

Ein wichtiger Aspekt bei der Anwendung mehrerer Wachstumsfaktoren ist die Frage nach dem richtigen Mischungsverhältnis. Der synergistische Effekt von bFGF und VEGF konnte bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen werden (Asahara et al., 1995; Mattern et al., 1997; Mason et al., 2002; Kondoh et al., 2004; Kano et al., 2005; Lee et al., 2007; Spanholtz et al., 2010), jedoch gibt es nur wenige Publikationen, in denen das optimale Verhältnis der Wachstumsfaktoren zueinander untersucht wurde. Ley et al. testeten *in vivo* unterschiedliche Konzentrationen von rekombinantem bFGF und VEGF in einem Matrixgel. Den stärksten synergistischen Effekt konnten sie bei einem bFGF zu VEGF Verhältnis von 3:1 feststellen (Ley et al., 2004). Ansätze mit gleichen Proteinkonzentrationen oder einem Überschuss an VEGF zeigten dagegen nur geringere therapeutische Erfolge. Es ist jedoch zu erwähnen, dass die Experimente mit rekombinantem humanen bFGF und rekombinantem murinen VEGF im Mausmodell durchgeführt wurden. Daher ist es möglich, dass die erforderliche höhere bFGF Konzentration durch die geringere Spezifität bedingt ist. Asahara et al. zeigten, dass *in*

in vivo im „Hindlimb“ Modell (Kaninchen) mit einem bFGF zu VEGF Verhältnis von 1:50 ebenfalls ein synergistischer Effekt erzielt werden konnte. Sie injizierten jeweils 10 µg rekombinantes humanes bFGF und 500 µg rekombinantes humanes VEGF intraarteriell in die innere Beckenarterie des ischämischen Beins. Diese Kombination der Wachstumsfaktoren zeigte im Vergleich zur Einzelgabe eine höhere Blutdruckrate (gesundes Bein/ischämisches Bein), einen erhöhten luminalen Durchmesser der Kollateralarterien sowie eine höhere Kapillardichte im medialen Oberschenkelmuskel des ischämischen Beins (Asahara et al., 1995).

Das in der vorliegenden Arbeit ermittelte Verhältnis der Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF zueinander entsprach mit ca. 1:34 an Tag 1 und 1:53 an Tag 3 etwa dem Verhältnis, das auch Asahara et al. in ihren Experimenten gewählt haben.

Dieser Konzentrationsunterschied der Wachstumsfaktoren ist jedoch nur auf Proteinebene nachweisbar. Auf DNA- (Plasmid) und mRNA-Ebene wurden beide Faktoren in vergleichbarer Menge detektiert. Ein Grund für diese Unterschiede ist im Sekretionsverhalten der Proteine zu suchen. Während das VEGF-Insert eine Signalpeptidsequenz trägt, die die Sekretion des Proteins nach der Biosynthese über den konventionellen Golgi-ER-Weg bewirkt, ist ein solcher Mechanismus bei bFGF nicht vorhanden. bFGF wird über einen unkonventionellen Mechanismus sekretiert. Dieser ist bislang nicht vollständig aufgeklärt, es wird jedoch vermutet, dass die Sekretion durch direkte Translokation über die Plasmamembran erfolgt (Nickel und Seedorf, 2008; Nickel, 2010). Der postulierte Mechanismus besteht aus einem dreistufigen Prozess, der auf passiver Diffusion beruht. Zunächst erfolgt die Annäherung und Bindung des Wachstumsfaktors an die Zellmembran. Im zweiten Schritt durchdringt bFGF die Membran, um dann an extrazelluläre FGF Rezeptoren und Heparansulfatproteoglykan Moleküle gebunden zu werden. Diese Bindung wirkt als molekulare „Falle“ und ermöglicht die gerichtete Diffusion in den Extrazellularraum (Zehe et al., 2006).

Die exakte Regulation dieses Exports ist bislang nicht bekannt. Es wurden jedoch mehrere Stimuli identifiziert, die die Freisetzung von bFGF bewirken, wie beispielsweise Östrogen (Albuquerque et al., 1998), Hypoxie (Ishibashi et al., 2001) und inflammatorische Cytokine (Samaniego et al., 1997). In unstimulierten Zellen ist der größte Anteil an bFGF intrazellulär im Cytosol sowie im Zellkern zu finden. Nur ca. 20 % des Wachstumsfaktors

befinden sich außerhalb der Zelle, vorwiegend an die Extrazellulärmatrix gebunden (Cronauer et al., 1999).

Durch genetische Modifikation (Transfektion oder Transduktion) kann die Expression von bFGF erhöht werden (Akimoto et al., 1999; Cucchiarini et al., 2009). Es wurde jedoch beobachtet, dass auch hier das Protein vorwiegend innerhalb der Zelle zu finden ist (Takahashia et al., 1997). Um den Proteinexport zu erhöhen, wurde ein Fusionsprotein hergestellt (Sasada et al., 1991; Ohara et al., 2001; Ninomiya et al., 2003; Nishikage et al., 2004). Die Einfügung des Sekretionssignals von IL-2 erhöhte die Konzentration von bFGF im Zellkulturmedium *in vitro* um ein zehnfaches im Vergleich zum unmodifizierten Protein (Matsuoka et al., 2000; Watanabe et al., 2007). *In vivo* konnte nach adenoviralem Gentransfer der modifizierten Form im Gehirn von Ratten ebenfalls eine erhöhte bFGF-Konzentration im *Liquor cerebrospinalis* sowie eine erhöhte angiogenetische Aktivität nachgewiesen werden (Yukawa et al., 2000). Somit kann die Einfügung einer sekretorischen Signalsequenz von Vorteil für die Freisetzung von bFGF sein. Dieses ist jedoch in der Dosierung des Gentherapeutikums mit zu berücksichtigen. Da die Lokalisation des Wachstumsfaktor jedoch auch Auswirkungen auf den Wirkmechanismus (autokrin, parakrin sowie intrakrin) hat (Chen et al., 2004), wurde in der vorliegenden Arbeit auf den Einsatz einer Signalsequenz und damit auf eine Erhöhung der bFGF-Sekretion verzichtet.

4.3 Biodistribution der therapeutischen Plasmide

Ein wichtiger Aspekt bei der Beurteilung der biologischen Sicherheit einer neuen Behandlungsmethode ist die lokale bzw. systemische Verteilung des Therapeutikums im Körper (Biodistribution). Dieses gilt für konventionelle Arzneimittel genauso wie für „Arzneimittel für neuartige Therapien“, zu denen auch die gentherapeutischen medizinischen Produkte (GTMP, Gene Therapy Medicinal Products) gehören. Die EMA hat in der Anleitung CPMP/BWP/3088/99 diese Produkte definiert und generelle Anweisungen für die Produktion und Anwendung sowie die sicherheitsrelevanten Fragestellungen bezüglich präklinischer und klinischer Untersuchungen beschrieben. Die Untersuchung der Biodistribution fällt hierbei unter die präklinische Beurteilung. Der Ort, die Verteilung und die Stärke der Vektorgenexpression sollen mit geeigneten Methoden analysiert werden.

Die Real-Time PCR stellt eine gute Option dar, die genannten Aspekte zu untersuchen, da es sich um eine sehr sensitive und spezifische Methode zum Nachweis von Nukleinsäuren handelt (Bustin, 2002; Bustin und Mueller, 2005). Zudem erfüllt sie die Anforderungen der EMEA, da diese Methode auf der Amplifikation von Nukleinsäuren beruht (CPMP/BWP/3088/99). Mithilfe der absoluten Quantifizierung kann die genaue Menge des Vektors in einer Gewebeprobe ermittelt werden (Joshi et al., 2008).

Es ist jedoch wichtig, die Real-Time PCR so zu optimieren, dass störende Einflüsse, wie beispielsweise die Auswirkungen von PCR-Inhibitoren, möglichst gering gehalten und falsch positive oder negative Ergebnisse ausgeschlossen werden können (Lovatt, 2002). Für die Anwendung in präklinischen Studien ist es daher unumgänglich das Verfahren zu validieren. Die Experimente, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, dienen als Grundlage und Voraussetzung für die Validierung der Real-Time PCR als Nachweismethode der Plasmid-DNA in Gewebeproben.

Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass genomische DNA (gDNA) die PCR-Reaktion inhibiert. Anhand von Verdünnungsreihen genomischer DNA aus verschiedenen Gewebeproben, denen eine bekannte Menge Plasmid-DNA zugeführt wurde, konnte dieser Einfluss genauer charakterisiert werden. Für die Untersuchung der Verteilung des Gentherapeutikums im Körper wurde eine Templatmenge von 100 ng gDNA pro Real-Time PCR Reaktionsansatz (25 µl) gewählt, da bei dieser Konzentration der inhibitorische Effekt der Probe vernachlässigbar gering war und zudem die Menge noch ausreichend, um falsch negative Reaktionsergebnisse zu minimieren. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch Fu et al. zeigen. Sie optimierten die Versuchsbedingungen zum Nachweis eines HIV-Plasmid DNA-Impfstoffes mittels Real-Time PCR aus Gewebeproben und zeigten, dass der Einsatz von 100 ng genomische DNA pro Reaktionsansatz (20 µl) die Amplifikationseffizienz nicht signifikant beeinflusst. Zudem nutzten sie ebenfalls die genomische DNA als externen Standard für die Quantifizierung (Fu et al., 2009).

Die Menge von 100 ng gDNA entspricht etwa 16.000 Genomäquivalenten der Ratte. Bedingt durch das Detektionslimit von 10 Plasmidkopien pro 100 ng genomischer DNA ergibt sich mit der optimierten Real-Time PCR Methode eine Sensitivität von ca. 1 Plasmid pro 1.600 Gewebezellen beziehungsweise pro Zelle können mindestens $6,2 \cdot 10^{-4}$ Plasmide nachgewiesen werden.

Neben der Real-Time PCR werden auch andere Methoden zur Analyse der Verteilung des genetischen Materials *in vivo* nach Gentherapie genutzt. Dazu zählt unter anderem die Verwendung von Protein-Tags, die dem zu exprimierenden Genkonstrukt angefügt werden (Lobbestael et al., 2010). Durch Tagspezifische Antikörper kann das so modifizierte Protein im Körper immunhistochemisch oder durch Immunfluoreszenz detektiert werden. Diese Methode eignet sich jedoch vorwiegend, um wenige einzelne Organe zu untersuchen. Zudem kann die Spezifität durch unspezifische Immunreaktionen der Antikörper oder die Autofluoreszenz der Gewebeproben verringert werden.

Eine andere Option zur Untersuchung der Biodistribution stellen nichtinvasive Abbildungsverfahren dar, zu denen unter anderem die Magnetresonanztomographie, die Einzelphotonen-Emissions-Tomographie und die Positronen-Emissions-Tomographie sowie Lumineszenz- und Fluoreszenzmessungen gehören (Räty et al., 2007). Der große Vorteil dieser Methoden liegt darin, dass die Verteilung des Therapeutikums verfolgt werden kann, ohne dass ein operativer Eingriff notwendig ist. So lassen sich einzelne Individuen über einen gewissen Zeitraum untersuchen und der Verlauf der Biodistribution abschätzen. Auch eine Kombination von verschiedenen Verfahren ist möglich. Ein Fusionsprodukt aus einem Somatostatin-Rezeptor und dem GFP-Protein kann beispielsweise sowohl mit nuklearen als auch mit Fluoreszenzmethoden nachgewiesen werden (Chen et al., 2010). Zudem ist eine Kombination nichtinvasiver Verfahren mit der Real-Time PCR-Analyse in präklinischen Studien denkbar, da hiermit die Vorteile der einzelnen Methoden vereint werden könnten: die hohe Sensitivität, Selektivität und Reproduzierbarkeit der Real-Time PCR sowie die Verfolgung der Biodistribution in individuellen Tieren mithilfe von nichtinvasiven Abbildungsverfahren.

Die Verteilung des Gentherapeutikums hängt sehr stark von der Art des Vektors und der Behandlungsmethode ab. Besonders bei intravenöser Injektion lässt sich das Konstrukt in vielen Organen nachweisen. Ye et al. injizierten rekombinante Adenoviren intravaskulär (i.v.) in die Schwanzvene von Mäusen und konnten die Virus-DNA in verschiedenen Geweben, wie Leber, Lunge, Niere und Hoden, nachweisen (Ye et al., 1998). Ähnliche Ergebnisse erzielten Hiltunen et al. im Kaninchenmodell. Zwei Wochen nach i.v. Injektion von replikationsdefizienten Adenoviren über einen Katheter in die Bauchorta ließ sich die Expression des Reportergens sowohl im injizierten Gefäß als auch in der Leber, Lunge, Hoden, Skelettmuskel und Knochenmark detektieren (Hiltunen et al., 2000). Die

intravenöse Injektion von nackter Plasmid-DNA führt ebenfalls zu einer Verteilung des Vektors über mehrere Organe, wobei vorwiegend Leber, Lunge, Niere, Herz und Milz zu erwähnen sind (Kang et al., 2007; Fu et al., 2009). Auffällig ist, dass der Vektor überwiegend in den gleichen Organen nachgewiesen werden kann, was unter anderem durch ihre starken Durchblutung und Filtrationswirkung (Leber, Lunge, Niere, Milz) begründet werden kann.

Entscheidend für die Verteilung des Vektors im Körper ist zudem auch der Aufbau des Therapeutikums. Komplexe aus Liposomen und Plasmid-DNA zeigten je nach Zusammensetzung unterschiedliche Verteilungsmuster (Zhang et al., 2008).

Durch die Injektion des Therapeutikums in spezielle Strukturen, wie beispielsweise in Tumorgewebe, in den Darm oder intramuskulär (i.m.), wird die Biodistribution ebenfalls beeinflusst (Walther et al., 2008; Matsumoto et al., 2010). Der direkte Vergleich von intramuskulärer und intravenöser Injektion von Plasmid-DNA zeigte, dass nach 24 Stunden nur bei den intravenös injizierten Tieren der Vektor im Blut, Muskelgewebe und Lunge noch relativ stark nachweisbar war, während nach i.m. Injektion kaum Plasmid-DNA detektiert werden konnte (Quezada et al., 2004).

Die meisten Publikationen zur Verteilung von Gentherapeutika beruhen auf der direkten Applikation dieser Vektoren im Körper. Bislang sind nur wenige Studien veröffentlicht, die die Biodistribution von zellbasierten Therapieoptionen untersuchen. Bei der Injektion von genetisch modifizierten Zellen spielen andere Faktoren eine Rolle, da Zellen beispielsweise ein anderes Diffusionsverhalten aufweisen als nackte Plasmid-DNA oder auch virale Vektoren. Zudem wurde der Vektor bereits in die Zellen aufgenommen und kann aus diesem Grund nicht durch extrazelluläre Nukleasen im Plasma abgebaut werden, was eine häufige Ursache der kurzen Halbwertszeit von Plasmid-DNA *in vivo* ist (Parra-Guillén et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Untersuchung der Verteilung der Plasmid-DNA im Körper über einen Zeitverlauf von etwa 12 Wochen. Die höchste Plasmidmenge konnte erwartungsgemäß einen Tag nach Injektion der transfizierten Zellen im injizierten Muskelgewebe detektiert werden. Über den gesamten Zeitverlauf sank die Konzentration der Plasmid-DNA an der Injektionsstelle kontinuierlich ab. Ein Plasmidnachweis war jedoch auch 86 Tage nach Injektion noch möglich, was darauf hindeutet, dass eine komplette Eliminierung der Fremd-DNA noch nicht stattgefunden hat.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte der Nachweis der therapeutischen Plasmide aufgrund der relativ hohen methodischen Anforderungen nur in einer begrenzten Anzahl von Organproben. Für die folgenden präklinischen Studien müssen nach Rücksprache mit dem Paul-Ehrlich Institut zudem auch Proben aus dem Fettgewebe, Pankreas, Knochenmark, den Nebennieren sowie Blutproben auf das Vorhandensein von Vektorpartikeln untersucht werden. Eine vollständige Liste aller zu untersuchenden Organe, die für die Untersuchungen relevant sein können, ist im Anhang dargestellt (CPMP/SWP/1042/99 corr.).

Im peripheren Gewebe lässt sich die Plasmid-DNA vorwiegend an Tag 3 und 7 nach Injektion der modifizierten Fibroblasten detektieren. Hierbei ist jedoch auffällig, dass nicht alle Tiere das gleiche Verteilungsmuster zeigen, sondern häufig pro Untersuchungszeitpunkt nur in einem Tier der Plasmidnachweis außerhalb der Injektionsstelle positiv war. Das führt zu der Annahme, dass diese Schwankungen durch einen methodischen Fehler hervorgerufen wurden. Die Injektion der transfizierten Zellen erfolgte direkt in das Muskelgewebe. Dabei konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Blutgefäße verletzt werden, was zu einer Verteilung des Gentherapeutikums über die Blutbahn führen kann. Die starke Durchblutung von Herz, Dünndarm, Milz und Niere kann folglich den Nachweis der Plasmid-DNA in diesen Organen erklären. Zudem ist die Niere das Hauptorgan für die Ausscheidung von Plasmid-DNA (Fu et al., 2009). Die Analyse von Proben aus dem Gehirn war bei allen Versuchstieren negativ, was auf die Wirkung der Blut-Hirn Schranke zurückgeführt werden kann. Zudem konnte die Plasmid-DNA nicht im Hoden nachgewiesen werden. Damit kann eine Übertragung des Therapeutikums auf die Keimbahn ausgeschlossen werden.

Die Expression des therapeutischen Proteins ließ sich mittels Real-Time PCR aus den RNA/cDNA-Proben der Injektionsstelle bis Tag 7 detektieren. Die Analyse von Gewebeproben späterer Zeitpunkte zeigte keine Expression der humanen Wachstumsfaktoren mehr. Dies lässt sich unter anderem durch die im Vergleich zum DNA-Nachweis geringe Sensitivität des Versuchsaufbaus erklären. Die Quantifizierung der mRNA-Konzentration erfolgt über die Umschreibung in cDNA. Dieser Zwischenschritt, sowie die Tatsache, dass RNA im Vergleich zu DNA sehr instabil ist und daher relativ schnell abgebaut werden kann, beeinflussen die Sensitivität der Reaktion (Bustin und Müller, 2005). Zudem konnten als Template nur 10 ng cDNA eingesetzt werden, während

beim Plasmid-DNA Nachweis die zehnfache DNA-Menge pro Reaktionsansatz verwendet wurde. Da jedoch auch *ex vivo* die Expression der therapeutischen Wachstumsfaktoren bis Tag 7 nach Transfektion stark abnimmt, ist davon auszugehen, dass die injizierten Zellen nach einer Woche auch *in vivo* nur noch sehr schwach die plasmidcodierten Proteine synthetisieren.

In den peripheren Organproben, in denen die Plasmid-DNA mittels Real-Time PCR nachgewiesen wurde, konnte keine Expression von humanem bFGF oder VEGF detektiert werden. Es kann daher angenommen werden, dass die therapeutischen Proteine vorwiegend lokal im injizierten Muskelgewebe exprimiert werden. Somit ist ein wichtiger Aspekt in Bezug auf die biologische Sicherheit des Gentherapiearzneimittels gegeben.

4.4 Biologische Sicherheit im Bezug auf Stress und Toxizität

Array-Systeme bieten eine gute Möglichkeit, in einer einzigen Probe eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren zu untersuchen. In Kombination mit der sehr sensitiven Real-Time Technologie ist so die Möglichkeit gegeben, die Expression mehrerer Proteine gezielt zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Real-Time PCR Array „Rat Stress and Toxicity PathwayFinder™“ von SABiosciences™ angewandt. Dieser detektiert die Expression von 84 Genen, die im Zusammenhang mit oxidativem und metabolischem Stress oder Hitzeschock stehen, sowie in den Zelltod durch Apoptose, Nekrose, Wachstumsstillstand oder Seneszenz involviert sind. Ferner werden Gene analysiert, die in Verbindung mit Proliferation, Kanzerogenese und Inflammation im Zusammenhang stehen.

Hierfür wurden RNA-Proben aus dem injizierten Muskel von einem Kontrolltier sowie einem mit transfizierten Fibroblasten behandelten Tier gewonnen und nach Umschreibung in cDNA untersucht. Für die Analyse wurde Tag 7 nach Injektion gewählt, da sich zu diesem Zeitpunkt die positiven Effekte auf Angiogenese und Arteriogenese im ischämischen Gewebe bereits nachweisen lassen (Zhang et al., 2011). Zudem lässt sich die Expression der therapeutischen Proteine noch detektieren und somit ihr direkter Einfluss auf die oben genannten Signalwege abschätzen.

Im Rahmen der Untersuchungen konnten 14 Gene identifiziert werden, deren Expression mindestens um den Faktor 2,5 zwischen der Kontrolle und der mit Wachstumsfaktoren behandelten Probe variieren. Die Einteilung dieser Genprodukte in verschiedene Gruppen ist jedoch nur bedingt möglich, da die verschiedenen Signalwege teilweise stark miteinander verzweigt sind.

Auffällig ist, dass die mRNA von Proteinen, die eine Rolle beim Schutz der Zellen vor äußeren Stresseinflüssen spielen, im Muskel, der mit Wachstumsfaktoren behandelt wurde, herunter reguliert ist. Hierzu zählt beispielsweise Ercc1 (Excision Repair Cross-Complementing Rodent Repair Deficiency, Complementation Group 1), welches ein Heterodimer mit XPF (Xeroderma Pigmentosum Group F) bildet, um bei der Nukleotid-Excisions-Reparatur beschädigte DNA-Strukturen zu zerschneiden (Houtsmuller et al., 1999; Wood, 2010). Zudem ist auch die Expression eines Hitzeschockproteins, des Hspa11 (Heat Shock 70 kD Protein 1-like) in der behandelten Muskelprobe verringert. Hspa11 ist involviert in die Proteinfaltung sowie den Schutz vor Denaturierung (Singh et al., 2006).

Die Herunterregulation dieser Proteine könnte eine erhöhte Anfälligkeit der Zellen im injizierten Muskelgewebe gegenüber Stress bewirken.

Die Expression von Cyclin G und Egr1 (Early Growth Response 1), die mit der Proliferation und Kanzerogenese in Verbindung stehen, ist ebenfalls reduziert. Cyclin G greift in die Regulation des Zellzyklus ein (Kimura et al., 2001). Es ist eines der Zielgene des Tumorsuppressorproteins p53. Seine Wirkung wird jedoch kontrovers diskutiert. Während Cyclin G1 unter bestimmten experimentellen Bedingungen Apoptose induzieren kann und den Zellzyklus inhibiert, wird auch beschrieben, dass es das Zellwachstum anregt (Kimura et al., 2001; Zhao et al., 2003; Li et al., 2009). Zudem wird Cyclin G1 sowohl als negativer (Harris et al., 2005) als auch als positiver (Zhao et al., 2003) Feedbackregulator von p53 dargestellt. Egr1 ist ein Transkriptionsfaktor, der in die Regulation von Zellwachstum und Differenzierung involviert ist. Auslöser für seine Expression können Mitogene, Wachstumsfaktoren oder auch Stress sein. In ischämischem Gewebe ist die Konzentration von Egr1 erhöht, was zu einer Induktion von Genen führt, die für die inflammatorische Reaktion und Blutgerinnung von Bedeutung sind (Yan et al., 2000; Okada et al., 2001). Auffällig ist, dass in vielen humanen Tumorzelllinien sowie in einigen Tumorgeweben die Expression von Egr1 stark verringert ist (Levin et al., 1995; Huang et al., 1997). Die Reaktivierung von Egr1 führt unter diesen Umständen zu einer geringeren Proliferation, einem verringertem Tumorwachstum und der Wiederherstellung der Kontakthemmung (Shozu et al., 2004). Es wird zudem postuliert, dass Egr1 sowohl als Tumorsuppressor als auch Tumorpromotor wirken kann (Krones-Herzog et al., 2005).

Aufgrund der divergenten Wirkung von Cyclin G1 und Egr1 ist es schwer möglich, die verringerte Expression dieser Proteine in dem mit transfizierten Zellen behandelten Muskelgewebe zu bewerten. Um jedoch die Entstehung von tumorartigem Gewebe auszuschließen, sollten weitere Untersuchungen, auch zu späteren Versuchszeitpunkten, erfolgen.

Neben den bereits genannten wurden auch die mRNAs von Ephx2 (Epoxide Hydrolase 2) und Fmo1 (Flavin Containing Monooxygenase 1) im transfizierten Muskel schwächer exprimiert. Diese Proteine sind in der Metabolisierung von Epoxyeicostrienen Säuren (EETs) (Ephx2) und körperfremden Chemikalien (Fmo1) involviert. EETs werden von Cytochrom P450 Epoxygenasen aus Arachidonsäure synthetisiert und aktivieren unter

anderem die Proliferation und Migration von Endothelzellen sowie die Angiogenese (Webler et al., 2008). Zudem haben sie antiinflammatorische und anti-apoptotische Effekte (Michaelis und Fleming, 2006). Die verringerte Ephx2-Expression kann zu einer Erhöhung der EET-Konzentration im Vergleich zum Kontrolltier führen, was unter anderem mit positiven Effekten auf die Angiogenese verbunden ist. Zhang et al. konnten zeigen, dass Fmo1 unter inflammatorischen Bedingungen (Lipopolysaccharid-Infektion) im Mausmodell herunter reguliert ist (Zhang et al., 2009). Ob die Injektion von bakteriellen Plasmiden den gleichen Effekt zeigt, muss in weiteren Studien untersucht werden.

Zu den Proteinen, deren mRNA-Konzentration im behandelten Tier höher ist als in der Kontrolle, zählt Faslg (Fas Ligand). Faslg ist ein homotrimeres Transmembranprotein, das durch Trimerisierung des Fas-Rezeptors Apoptose in der Zielzelle auslöst. Es kann jedoch durch enzymatische Spaltung ebenfalls als sekretierte, inaktive Form vorliegen (Jodo et al., 2001). Die biologische Wirkung von Faslg wird sowohl durch seine Expression als auch durch posttranslationale Modifikationen und die subzelluläre Lokalisation reguliert. Aus diesem Grund lässt sich die erhöhte Faslg-Expression nicht zwangsläufig mit einer verstärkten Apoptose im betroffenen Gewebe gleichsetzen (Ramaswamy et al., 2009).

Eine erhöhte mRNA-Expression konnte zudem bei den proinflammatorischen Chemokinen Ccl3 und 4 (Chemokin (C-C Motiv) Ligand), Cxcl10 (Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand) sowie den Interleukinen Il-1 beta, Il-6 und Il-18 detektiert werden.

Chemokine sind kleine basische, heparinbindende Proteine, die bei der angeborenen Immunabwehr eine wichtige Rolle spielen, da sie unter anderem die Rekrutierung von Leukozyten in geschädigtes Gewebe bewirken (Gerard und Rollins, 2001). Zudem können sie Leukozyten aktivieren, was eine erhöhte lokale inflammatorische Reaktion bewirkt (Menten et al., 2002). Sie werden durch inflammatorische Stimuli, wie Lipopolysaccharide, Interferon γ und Il-1 α/β , induziert, können aber auch unter ischämischen Bedingungen verstärkt sezerniert werden (Fragogiannis, 2007). Ccl3 und Ccl4, auch MIP-1 α und MIP-1 β (Macrophage Inflammatory Protein) genannt, werden unter anderem von aktivierten Zellen des Immunsystems, wie Makrophagen, Dendritischen Zellen, T- und B-Lymphozyten exprimiert. Durch Bindung an ihre Rezeptoren können in den Zielzellen verschiedene Signalwege induziert werden, die die Chemotaxis, Degranulation, Phagozytose und Synthese von Mediatormolekülen bewirken. Ihnen wird eine entscheidende Rolle in der Induktion und Regulation von

inflammatorischen Antworten zugeschrieben (Maurer und von Stebut, 2004). Eine Konzentrationserhöhung von Ccl3 und Ccl4 führt somit zu einer gesteigerten Reaktion des Immunsystems im betroffenen Gewebe. Cxcl10 bindet an den CXC Chemokin Rezeptor 3 (CXCR3) und bewirkt vor allem die Infiltration von Th1 Helferzellen in das geschädigte Gewebe. Zudem wirkt es angiostatisch, insbesondere in Gegenwart von Il-8 und bFGF (Strieter et al., 1995). Die Aktivierung von CXCR3 zeigt hingegen auch positive Effekte bei der Neovaskularisierung von ischämischem Gewebe (Waeckel et al., 2005). Die Auswirkungen der erhöhten Cxcl10 Expression in dem mit transfizierten Zellen behandelten Muskelgewebe lassen sich daher nicht eindeutig abschätzen.

Il-1 beta und Il-18 sind proinflammatorische Cytokine, die als inaktive cytosolische Vorstufen synthetisiert werden und durch die Caspase-1, die im mit transfizierten Fibroblasten behandelten Tier ebenfalls erhöht exprimiert wird, in ihre biologisch aktiven Formen gespalten werden (Lamkanfi und Dixit, 2009). Neben ihren regulatorischen Effekten in Bezug auf akute und chronische Immunreaktionen spielen sie auch bei der Angiogenese eine Rolle (Guarda und So, 2010). Die Aktivierung von Il-1 beta führt unter anderem zu einer verstärkten VEGF-Expression (Kawaguchi et al., 2004). Einen vergleichbaren Effekt bewirkt auch Il-6 (Yeh et al., 2006). Angiogenese und Inflammation sind eng miteinander verbunden und die entsprechenden Signalwege stark miteinander verknüpft (Angelo und Kurzrock, 2007). So konnten Schweighofer et al. zeigen, dass VEGF-A und Il-1 in humanen Endothelzellen (HUVEC) zu etwa 60 % die gleichen Gene regulieren. VEGF-A kann somit zu der angiogenetischen eine signifikante inflammatorische Wirkung zugesprochen werden (Schweighofer et al., 2009).

In wieweit die erhöhte Expression der inflammatorischen Proteine mit der Induktion der Angiogenese im betroffenen Gewebe in Verbindung steht, lässt sich nicht abschätzen. In weiteren Untersuchungen muss daher ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt durch den Vektor (bakteriell hergestelltes Plasmid) oder auch durch die humanen Wachstumsfaktoren im Rattenmodell ausgelöst wird.

4.5 Ausblick

Die Gentherapie ist ein relativ neues Gebiet in der medizinischen Forschung, das nach einigen Rückschlägen in den letzten 20 Jahren große Fortschritte in Hinblick auf die Wirkungsweise und die spezifischen Probleme dieser Methode gewonnen hat. Bislang konnte jedoch weder in Europa noch in den USA eine klinische Studie erfolgreich mit der Marktzulassung abgeschlossen werden.

In den kommenden Jahren wird demzufolge der Schwerpunkt bei der Entwicklung von Gentherapiearzneimitteln vor allem auf der Beantwortung der Frage liegen, wie die Effizienz und Sicherheit weiter erhöht werden können, um diese neuartigen Therapieansätze möglichst risikofrei am Menschen anzuwenden. Dabei sind einige generelle Probleme besonders hervorzuheben:

- Wie kann sichergestellt werden, dass das Arzneimittel nur lokal wirkt und somit keine unerwünschten Reaktionen in anderen Geweben oder Organen zeigt?
- Können mögliche Nebenwirkungen, vor allem auch Langzeitnebenwirkungen, erkannt und abgeschätzt werden?
- Wie kann gewährleistet werden, dass die Immunreaktion des Patienten auf die Behandlungsmethode möglichst gering ist?

Bei dem in dieser Arbeit vorgestellten Projekt der Therapeutischen Angiogenese werden isogene beziehungsweise autologe Zellen mit Plasmidvektoren *ex vivo* transfiziert, um therapeutische Wachstumsfaktoren im ischämisch geschädigten Gewebe zu exprimieren. Durch die lokale Applikation der Zellen kann die Gefahr einer systemischen Wirkung verringert und somit der Wirkungsort begrenzt werden. Nebenwirkungen, die von dieser Methode ausgehen, müssen jedoch weiterhin genau beobachtet werden. So muss unter anderem ausgeschlossen werden, dass das Plasmid in die chromosomale DNA der Wirtszelle integrieren kann und damit unerwünschte langfristige Effekte hervorruft. Zudem muss in weiteren Studien die optimale Dosis der gentechnisch modifizierten Zellen untersucht werden. Da die Behandlung am Patienten mit autologen Zellen erfolgt, die die Plasmid-DNA bereits aufgenommen haben, wird die Reaktion des Immunsystems wahrscheinlich gering ausfallen. Doch auch dieser Aspekt muss besonders untersucht werden.

Der Einsatz geeigneter Tiermodelle bietet zwar erste Anhaltspunkte zur Klärung vieler Fragen, die diese neuartigen Behandlungsmethoden betreffen, es bleibt dennoch ein

Restrisiko für den Menschen bestehen. Um dieses zu minimieren ist es wichtig, dass alle Gentherapiestudien nach den vorgegebenen Richtlinien durchgeführt werden. Durch die Schaffung neuer spezifischer Standards für Gentherapiearzneimittel werden die Anforderungen immer konkreter formuliert und somit die Sicherheit für den Patienten erhöht.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung, Etablierung und Bewertung einer analytischen Methode, um die biologische Sicherheit von gentechnisch veränderten Arzneimitteln zu untersuchen. Als Modellsystem diente die Angiogeneseinduktion durch zellbasierten Gentransfer im „Hindlimb“ Modell der Ratte.

Bevor die biologische Sicherheit untersucht werden konnte, musste zunächst der *ex vivo* stattfindende Gentransfer mittels Elektroporation so optimiert werden, dass er eine stabile, effiziente und reproduzierbare Methode zur Modifizierung der primären Rattenfibroblasten darstellte. Durch die Abstimmung von Transfektionsmedium, Transfektionsprogramm, Elektroporationsküvetten sowie eingesetzter Zellzahl und Plasmidmenge konnte eine hohe Transfektionseffizienz (ca. 60 %) bei relativ guter Vitalität der Zellen (ca. 75 %) und Zellausbeute (ca. 40 %) erreicht werden.

Für die Analyse der Proteinexpression und den Nachweis der Plasmid-DNA in Zellkultur- und Gewebeproben wurde in dieser Arbeit neben dem ELISA die Real-Time PCR mittels SYBR® Green gewählt. Die Optimierung der Primer, Annealingtemperatur und Templatekonzentration führte zur Etablierung eines effizienten Verfahrens, das den spezifischen Nachweis von bis zu 10 Plasmid- bzw. cDNA-Äquivalenten pro Reaktionsansatz erlaubte.

Die Expression der humanen therapeutischen Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF konnte mit Hilfe von Real-Time PCR und ELISA über einen Zeitverlauf von 7 Tagen *ex vivo* mit einem Maximum an Tag 1 bis 2 nach Transfektion detektiert werden. Die Analyse über einen Zeitraum von 12 Wochen zeigte, dass die Expression von bFGF und VEGF bereits nach 4 Wochen kaum noch nachzuweisen war. Im Gegensatz dazu ließ sich der Vektor, die Plasmid-DNA, auch nach 84 Tagen noch in den Zellen detektieren.

Die *in vivo* Versuche erfolgten nach intramuskulärer Injektion der modifizierten isogenen Rattenfibroblasten um die ligierte Femoralarterie der Ratte. Zur Charakterisierung der lokalen Effekte sowie der Verteilung des Therapeutikums über den Körper wurden die Tiere nach bestimmten Zeitabständen zur Organentnahme getötet. Die Expression der humanen Wachstumsfaktoren ließ sich an der Injektionsstelle bis Tag 7 nach Injektion detektieren, während die Vektor-DNA auch nach etwa 12 Wochen noch nachgewiesen werden konnte. In peripheren Organproben konnte das Plasmid vor allem an Tag 3 und 7 nach Injektion in stark durchbluteten Geweben wie Herz, Dünndarm oder Leber

nachgewiesen werden. Eine Proteinexpression in den betroffenen Organen konnte nicht detektiert werden.

Die Behandlung des Muskelgewebes nach Ischämieinduktion mit genetisch modifizierten Fibroblasten führte zudem zu einer erhöhten Expression proinflammatorischer Gene an Tag 7 nach Injektion. Ob dieser Effekt auf die enge Verknüpfung von Angiogenese und Immunantwort, auf den Einsatz von humanen Wachstumsfaktoren im Rattenmodell oder auf die Auswirkungen der gentherapeutischen Maßnahme *per se* zurückzuführen ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Zusammenfassend stellt diese Arbeit ein Verfahren vor, um die biologische Sicherheit einer Gentherapie in Bezug auf die Biodistribution des gentechnischen Wirkstoffes zu untersuchen. Im angewandten Modellsystem der Therapeutischen Angiogenese durch Injektion von genetisch modifizierten isogenen Zellen ist die Expression des Therapeutikums lokal nachweisbar, während sich das eingesetzte Plasmid über einen begrenzten Zeitraum auch in stark durchbluteten peripheren Gewebeproben detektieren lässt. Die Real-Time PCR stellt in diesem Zusammenhang aufgrund ihrer hohen Spezifität und Sensitivität eine geeignete Methode dar, um die biologische Sicherheit von Gentherapiearzneimitteln zu untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

6.1 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

- Ahn, A., Frishman, W.H., Gutwein, A., Passeri, J., Nelson, M. (2008a) Therapeutic angiogenesis: a new treatment approach for ischemic heart disease--part I. *Cardiol Rev* 16, 163-171.
- Ahn, A., Frishman, W.H., Gutwein, A., Passeri, J., Nelson, M. (2008b) Therapeutic angiogenesis: a new treatment approach for ischemic heart disease--Part II. *Cardiol Rev* 16, 219-229.
- Akimoto, M., Miyatake, S., Kogishi, J., Hangai, M., Okazaki, K., Takahashi, J.C., Saiki, M., Iwaki, M., Honda, Y. (1999). Adenovirally expressed basic fibroblast growth factor rescues photoreceptor cells in RCS rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 273-279.
- Albuquerque, M.L., Akiyama, S.K., Schnaper, H.W. (1998). Basic fibroblast growth factor release by human coronary artery endothelial cells is enhanced by matrix proteins, 17beta-estradiol, and a PKC signaling pathway. *Exp. Cell Res.* 245, 163-169.
- Anderson, W.F., Blaese, R.M., Culver, K. (1990). The ADA human gene therapy clinical protocol: Points to Consider response with clinical protocol, July 6, 1990. *Hum. Gene Ther.* 1, 331-362.
- Andreason, G.L., Evans, G.A. (1988) Introduction and expression of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation. *BioTechniques* 6, 650-660.
- Angelo, L.S., Kurzrock, R. (2007). Vascular endothelial growth factor and its relationship to inflammatory mediators. *Clin. Cancer Res.* 13, 2825-2830.
- Asahara, T., Bauters, C., Zheng, L.P., Takeshita, S., Bunting, S., Ferrara, N., Symes, J.F., Isner, J.M. (1995). Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation* 92, 11365-71.
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., Isner, J.M. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964-967.
- Baumgartner, I., Pieczek, A., Manor, O., Blair, R., Kearney, M., Walsh, K., Isner, J.M. (1998). Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 97, 1114-1123.
- Boussairi, E.H., Sassard, J. (1994). Cardiovascular effects of basic fibroblast growth factor in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 23, 99-102.
- Bustin, S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169-193.
- Bustin, S.A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 29, 23-39.
- Bustin, S.A., Nolan, T. (2004). Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 15, 155-166.
- Bustin, S.A., Mueller, R. (2005). Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin. Sci.* 109, 365-379.
- Capecchi, M.R. (1980). High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* 22, 479-488.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., Nagy, A. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435-439.
- Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 9, 653-660.
- Chen, C.-H., Poucher, S.M., Lu, J., Henry, P.D. (2004). Fibroblast growth factor 2: from laboratory evidence to clinical application. *Curr Vasc Pharmacol* 2, 33-43.

- Chen, G.J., Forough, R. (2006). Fibroblast growth factors, fibroblast growth factor receptors, diseases, and drugs. *Recent patents on cardiovascular drug discovery* 1, 211-224.
- Chen, R., Parry, J.J., Akers, W.J., Berezin, M.Y., El Naqa, I.M., Achilefu, S., Edwards, W.B., Rogers, B.E. (2010). Multimodality imaging of gene transfer with a receptor-based reporter gene. *J. Nucl. Med.* 51, 1456-1463.
- Clegg, R.M. (1992). Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Meth. Enzymol.* 211, 353-388.
- Cronauer, M.V., Stadlmann, S., Klocker, H., Abendstein, B., Eder, I.E., Rogatsch, H., Zeimet, A.G., Marth, C., Offner, F.A. (1999). Basic fibroblast growth factor synthesis by human peritoneal mesothelial cells: induction by interleukin-1. *Am. J. Pathol.* 155, 1977-1984.
- Cucchiari, M., Schetting, S., Terwilliger, E.F., Kohn, D., Madry, H. (2009). rAAV-mediated overexpression of FGF-2 promotes cell proliferation, survival, and alpha-SMA expression in human meniscal lesions. *Gene Ther.* 16, 1363-1372.
- Davidson, B.L., Breakefield, X.O. (2003). Viral vectors for gene delivery to the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 353-364.
- Emanuelli, C., Madeddu, P. (2001). Angiogenesis gene therapy to rescue ischaemic tissues: achievements and future directions. *Br. J. Pharmacol.* 133, 951-958.
- Escoffre, J.-M., Portet, T., Wasungu, L., Teissié, J., Dean, D., Rols, M.-P. (2009). What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues. *Mol. Biotechnol.* 41, 286-295.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 7413-7417.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285, 1182-1186.
- Fountain, J.W., Lockwood, W.K., Collins, F.S. (1988). Transfection of primary human skin fibroblasts by electroporation. *Gene* 68, 167-172.
- Frangogiannis, N.G. (2007). Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb. Haemost.* 97, 738-747.
- Fu, J., Li, D., Xia, S., Song, H., Dong, Z., Chen, F., Sun, X., Tang, Z. (2009). Absolute quantification of plasmid DNA by real-time PCR with genomic DNA as external standard and its application to a biodistribution study of an HIV DNA vaccine. *Anal Sci* 25, 675-680.
- Gerard, C., Rollins, B.J. (2001). Chemokines and disease. *Nat. Immunol.* 2, 108-115.
- Germain, S., Monnot, C., Muller, L., Eichmann, A. (2010). Hypoxia-driven angiogenesis: role of tip cells and extracellular matrix scaffolding. *Curr. Opin. Hematol.* 17, 245-251.
- Gonin, P., Gaillard, C. (2004). Gene transfer vector biodistribution: pivotal safety studies in clinical gene therapy development. *Gene Ther.* 11 Suppl 1, S98-S108.
- Graham, F.L., van der Eb, A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456-467.
- Grigsby, C.L., Leong, K.W. (2010). Balancing protection and release of DNA: tools to address a bottleneck of non-viral gene delivery. *J R Soc Interface* 7 Suppl 1, S67-82.
- Grines, C.L., Watkins, M.W., Helmer, G., Penny, W., Brinker, J., Marmur, J.D., West, A., Rade, J.J., Marrott, P., Hammond, H.K., Engler, R.L. (2002). Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 105, 1291-1297.
- Guarda, G., So, A. (2010). Regulation of inflammasome activity. *Immunology* 130, 329-336.
- Hallek, M., Buening, H., Ried, M., Hacker, U., Kurzeder, C., Wendtner, C.M. (2001). Grundlagen der Genterapie: Prinzipien und Stand der Entwicklung. *Internist (Berl)* 42, 1306-8, 1311-3.
- Hao, X., Månsson-Broberg, A., Grinnemo, K.-H., Siddiqui, A.J., Dellgren, G., Brodin, L.A., Sylvén, C. (2007). Myocardial angiogenesis after plasmid or adenoviral VEGF-A(165) gene transfer in rat myocardial infarction model. *Cardiovasc. Res.* 73, 481-487.
- Harris, S.L., Levine, A.J. (2005). The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 24, 2899-2908.

- Hedman, M., Hartikainen, J., Syväne, M., Stjernvall, J., Hedman, A., Kivelä, A., Vanninen, E., Mussalo, H., Kauppila, E., Simula, S., Närvänen, O., Rantala, A., Peuhkurinen, K., Nieminen, M.S., Laakso, M., Ylä-Herttua S. (2003). Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT). *Circulation* 107, 2677-2683.
- Hedman, M., Muona, K., Hedman, A., Kivelä, A., Syväne, M., Eränen, J., Rantala, A., Stjernvall, J., Nieminen, M.S., Hartikainen, J., Ylä-Herttua S. (2009). Eight-year safety follow-up of coronary artery disease patients after local intracoronary VEGF gene transfer. *Gene Ther.* 16, 629-634.
- Heil, M., Schaper, W. (2007). Insights into pathways of arteriogenesis. *Curr Pharm Biotechnol* 8, 35-42.
- Henry, T.D., Annex, B.H., McKendall, G.R., Azrin, M.A., Lopez, J.J., Giordano, F.J., Shah, P.K., Willerson, J.T., Benza, R.L., Berman, D.S., Gibson, C.M., Bajamonde, A., Rundle, A.C., Fine, J., McCluskey, E.R.; VIVA Investigators. (2003). The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation* 107, 1359-1365.
- Herzog, S., Sager, H., Khmelevski, E., Deylig, A., Ito, W.D. (2002). Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the rat hindlimb. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283, H2012-20.
- Hiltunen, M.O., Turunen, M.P., Turunen, A.M., Rissanen, T.T., Laitinen, M., Kosma, V.M., Ylä-Herttua, S. (2000). Biodistribution of adenoviral vector to nontarget tissues after local in vivo gene transfer to arterial wall using intravascular and periadventitial gene delivery methods. *FASEB J.* 14, 2230-2236.
- Houtsmuller, A.B., Rademakers, S., Nigg, A.L., Hoogstraten, D., Hoeijmakers, J.H., Vermeulen, W. (1999). Action of DNA repair endonuclease ERCC1/XPF in living cells. *Science* 284, 958-961.
- Howarth, J.L., Lee, Y.B., Uney, J.B. (2010). Using viral vectors as gene transfer tools (Cell Biology and Toxicology Special Issue: ETCS-UK 1 day meeting on genetic manipulation of cells). *Cell Biol. Toxicol.* 26, 1-20.
- Hu, Y.F., Wu, Y.J. (2001). Effect of recombinant human basic fibroblast growth factor on acute inflammation in mice and rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 22, 375-379.
- Huang, R.P., Fan, Y., Belle, I. de, Niemeyer, C., Gottardis, M.M., Mercola, D., Adamson, E.D. (1997). Decreased Egr-1 expression in human, mouse and rat mammary cells and tissues correlates with tumor formation. *Int. J. Cancer* 72, 102-109.
- Ishibashi, H., Shiratuchi, T., Nakagawa, K., Onimaru, M., Sugiura, T., Sueishi, K., Shirasuna, K. (2001). Hypoxia-induced angiogenesis of cultured human salivary gland carcinoma cells enhances vascular endothelial growth factor production and basic fibroblast growth factor release. *Oral Oncol.* 37, 77-83.
- Jodo, S., Xiao, S., Hohlbaum, A., Strehlow, D., Marshak-Rothstein, A., Ju, S.T. (2001). Apoptosis-inducing membrane vesicles. A novel agent with unique properties. *J. Biol. Chem.* 276, 39938-39944.
- Joshi, M., Keith Pittman, H., Haisch, C., Verbanac, K. (2008). Real-time PCR to determine transgene copy number and to quantitate the biolocalization of adoptively transferred cells from EGFP-transgenic mice. *BioTechniques* 45, 247-258.
- Kang, E.S., Kim, C.Y., Kim, S.B., Im, S.J., Yang, S.H., Sung, Y.C., Kim, B.M. (2007). In vivo kinetics and biodistribution of HB-110, a novel HBV DNA vaccine, after administration in mice. *Arch. Pharm. Res.* 30, 355-360.
- Kang, J., Ramu, S., Lee, S., Aguilar, B., Ganesan, S.K., Yoo, J., Kalra, V.K., Koh, C.J., Hong, Y.-K. (2009). Phosphate-buffered saline-based nucleofection of primary endothelial cells. *Anal. Biochem.* 386, 251-255.
- Kano, M.R., Morishita, Y., Iwata, C., Iwasaka, S., Watabe, T., Ouchi, Y., Miyazono, K., Miyazawa, K. (2005). VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B-PDGFRbeta signaling. *J. Cell. Sci.* 118, 3759-3768.
- Kawaguchi, M., Akagi, M., Gray, M.J., Liu, W., Fan, F., Ellis, L.M. (2004). Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human gastric cancer cells by interleukin-1beta. *Surgery* 136, 686-692.
- Kimura, S.H., Ikawa, M., Ito, A., Okabe, M., Nojima, H. (2001). Cyclin G1 is involved in G2/M arrest in response to DNA damage and in growth control after damage recovery. *Oncogene* 20, 3290-3300.

- Kondoh, K., Koyama, H., Miyata, T., Takato, T., Hamada, H., Shigematsu, H. (2004). Conduction performance of collateral vessels induced by vascular endothelial growth factor or basic fibroblast growth factor. *Cardiovasc. Res.* *61*, 132-142.
- Korpisalo, P., Ylä-Herttuala, S. (2010). Stimulation of functional vessel growth by gene therapy. *Integr Biol (Camb)* *2*, 102-112.
- Krones-Herzig, A., Mittal, S., Yule, K., Liang, H., English, C., Urcis, R., Soni, T., Adamson, E.D., Mercola, D. (2005). Early growth response 1 acts as a tumor suppressor in vivo and in vitro via regulation of p53. *Cancer Res.* *65*, 5133-5143.
- Kunig, A.M., Balasubramaniam, V., Markham, N.E., Morgan, D., Montgomery, G., Grover, T.R., Abman, S.H. (2005). Recombinant human VEGF treatment enhances alveolarization after hyperoxic lung injury in neonatal rats. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* *289*, L529-35.
- Kunig, A.M., Balasubramaniam, V., Markham, N.E., Seedorf, G., Gien, J., Abman, S.H. (2006). Recombinant human VEGF treatment transiently increases lung edema but enhances lung structure after neonatal hyperoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* *291*, L1068-78.
- Lamkanfi, M., Dixit, V.M. (2009). The inflammasomes. *PLoS Pathog.* *5*, e1000510.
- Lechardeur, D., and Lukacs, G.L. (2002). Intracellular barriers to non-viral gene transfer. *Curr Gene Ther* *2*, 183-194.
- Leclere, P.G., Panjwani, A., Docherty, R., Berry, M., Pizzey, J., Tonge, D.A. (2005). Effective gene delivery to adult neurons by a modified form of electroporation. *J. Neurosci. Methods* *142*, 137-143.
- Lederman, R.J., Mendelsohn, F.O., Anderson, R.D., Saucedo, J.F., Tenaglia, A.N., Hermiller, J.B., Hillegass, W.B., Rocha-Singh, K., Moon, T.E., Whitehouse, M.J., Annex, B.H.; TRAFFIC Investigators (2002). Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet* *359*, 2053-2058.
- Lee, J.-S., Kim, J.-M., Kim, K.L., Jang, H.-S., Shin, I.-S., Jeon, E.-S., Suh, W., Byun, J., Kim, D.-K. (2007). Combined administration of naked DNA vectors encoding VEGF and bFGF enhances tissue perfusion and arteriogenesis in ischemic hindlimb. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *360*, 752-758.
- Leiden, J.M. (2000). Human gene therapy: the good, the bad, and the ugly. *Circ. Res.* *86*, 923-925.
- Levin, W.J., Press, M.F., Gaynor, R.B., Sukhatme, V.P., Boone, T.C., Reissmann, P.T., Figlin, R.A., Holmes, E.C., Souza, L.M., Slamon, D.J. (1995). Expression patterns of immediate early transcription factors in human non-small cell lung cancer. The Lung Cancer Study Group. *Oncogene* *11*, 1261-1269.
- Ley, C.D., Olsen, M.W.B., Lund, E.L., Kristjansen, P.E.G. (2004). Angiogenic synergy of bFGF and VEGF is antagonized by Angiopoietin-2 in a modified in vivo Matrigel assay. *Microvasc. Res.* *68*, 161-168.
- Li, H., Okamoto, K., Peart, M.J., Prives, C. (2009). Lysine-independent turnover of cyclin G1 can be stabilized by B'alpha subunits of protein phosphatase 2A. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 919-928.
- Lobbestael, E., Reumers, V., Ibrahim, A., Paesen, K., Thiry, I., Gijsbers, R., van den Haute, C., Debyser, Z., Baekelandt, V., Taymans, J.-M. (2010). Immunohistochemical detection of transgene expression in the brain using small epitope tags. *BMC Biotechnol.* *10*, 16.
- Losordo, D.W., Vale, P.R., Symes, J.F., Dunnington, C.H., Esakof, D.D., Maysky, M., Ashare, A.B., Lathi, K., Isner, J.M. (1998) Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* *98*, 2800-2804.
- Lovatt, A. (2002). Applications of quantitative PCR in the biosafety and genetic stability assessment of biotechnology products. *J. Biotechnol.* *82*, 279-300.
- Madeddu, P. (2005). Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration. *Exp. Physiol.* *90*, 315-326.
- Marshall, E. (2003). Gene therapy. Second child in French trial is found to have leukemia. *Science* *299*, 320.
- Mason, J.C., Lidington, E.A., Ahmad, S.R., Haskard, D.O. (2002). bFGF and VEGF synergistically enhance endothelial cytoprotection via decay-accelerating factor induction. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *282*, C578-87.

LITERATURVERZEICHNIS

- Matsumoto, H., Kimura, T., Haga, K., Kasahara, N., Anton, P., McGowan, I. (2010). Effective in vivo and ex vivo gene transfer to intestinal mucosa by VSV-G-pseudotyped lentiviral vectors. *BMC Gastroenterol* 10, 44.
- Matsuoka, N., Miyatake, S., Yukawa, H., Takahashi, J.C., Saiki, M., Mori, H., Ishii, K., Akimoto, M., Hamada, H., Hashimoto, N. (2000). Adenovirus-mediated gene transfer of basic fibroblast growth factor promotes the survival of primary-cultured rat neuronal cells. *Neuroreport* 11, 2001-2006.
- Mattern, J., Koomägi, R., Volm, M. (1997) Coexpression of VEGF and bFGF in human epidermoid lung carcinoma is associated with increased vessel density. *Anticancer Res.* 17, 2249-2252.
- Maurer, M., Stebut, E. von (2004). Macrophage inflammatory protein-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1882-1886.
- Menten, P., Wuyts, A., van Damme, J. (2002). Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13, 455-481.
- Michaelis, U.R., Fleming, I. (2006). From endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) to angiogenesis: Epoxyeicosatrienoic acids (EETs) and cell signaling. *Pharmacol. Ther.* 111, 584-595.
- Mikroulis, D., Papanas, N., Maltezos, E., Bougioukas, G. (2007). Angiogenic growth factors in the treatment of peripheral arterial disease. *Curr Vasc Pharmacol* 5, 195-209.
- Mueller, C.K., Thorwarth, M.W., Schultze-Mosgau, S. (2010). Angiogenic gene-modified fibroblasts for induction of localized angiogenesis. *J. Surg. Res.* 160, 340-348.
- Murakami, M., Simons, M. (2008). Fibroblast growth factor regulation of neovascularization. *Curr. Opin. Hematol.* 15, 215-220.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., Hofschneider, P.H. (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1, 841-845.
- Nguyen, D.H., Hurtado-Ziola, N., Gagneux, P., Varki, A. (2006). Loss of Siglec expression on T lymphocytes during human evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 7765-7770.
- Nickel, W., Seedorf, M. (2008). Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24, 287-308.
- Nickel, W. (2010). Pathways of unconventional protein secretion. *Current opinion in biotechnology.*
- Niidome, T., Huang, L. (2002). Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther.* 9, 1647-1652.
- Ninomiya, M., Koyama, H., Miyata, T., Hamada, H., Miyatake, S., Shigematsu, H., Takamoto, S. (2003). Ex vivo gene transfer of basic fibroblast growth factor improves cardiac function and blood flow in a swine chronic myocardial ischemia model. *Gene Ther.* 10, 1152-1160.
- Nishikage, S., Koyama, H., Miyata, T., Ishii, S., Hamada, H., Shigematsu, H. (2004). In vivo electroporation enhances plasmid-based gene transfer of basic fibroblast growth factor for the treatment of ischemic limb. *J. Surg. Res.* 120, 37-46.
- Novo, S., Coppola, G., Milio, G. (2004). Critical limb ischemia: definition and natural history. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 4, 219-225.
- Nygren, J., Svanvik, N., Kubista, M. (1998). The interactions between the fluorescent dye thiazole orange and DNA. *Biopolymers* 46, 39-51.
- Ohara, N., Koyama, H., Miyata, T., Hamada, H., Miyatake, S.I., Akimoto, M., Shigematsu, H. (2001). Adenovirus-mediated ex vivo gene transfer of basic fibroblast growth factor promotes collateral development in a rabbit model of hind limb ischemia. *Gene Ther.* 8, 837-845.
- Okada, M., Fujita, T., Sakaguchi, T., Olson, K.E., Collins, T., Stern, D.M., Yan, S.F., Pinsky, D.J. (2001). Extinguishing Egr-1-dependent inflammatory and thrombotic cascades after lung transplantation. *FASEB J.* 15, 2757-2759.
- Parra-Guillén, Z.P., González-Aseguinolaza, G., Berraondo, P., Trocóniz, I.F. (2010). Gene therapy: a pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling overview. *Pharm. Res.* 27, 1487-1497.
- Presta, M., Dell'Era, P., Mitola, S., Moroni, E., Ronca, R., Rusnati, M. (2005). Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 159-178.

LITERATURVERZEICHNIS

- Quezada, A., Larson, J., French, M., Ponce, R., Perrard, J., Durland, R., Coleman, M. (2004). Biodistribution and safety studies of hDel-1 plasmid-based gene therapy in mouse and rabbit models. *J. Pharm. Pharmacol.* *56*, 177-185.
- Rafii, S., Lyden, D. (2003). Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat. Med.* *9*, 702-712.
- Rajagopalan, S., Mohler, E.R., Lederman, R.J., Mendelsohn, F.O., Saucedo, J.F., Goldman, C.K., Blebea, J., Macko, J., Kessler, P.D., Rasmussen, H.S., Annex, B.H. (2003). Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation* *108*, 1933-1938.
- Ramaswamy, M., Cleland, S.Y., Cruz, A.C., Siegel, R.M. (2009). Many checkpoints on the road to cell death: regulation of Fas-FasL interactions and Fas signaling in peripheral immune responses. *Results Probl Cell Differ* *49*, 17-47.
- Räty, J.K., Liimatainen, T., Unelma Kaikkonen, M., Gröhn, O., Airene, K.J., Jumani Airene, K., Ylä-Herttuala, S. (2007). Non-invasive Imaging in Gene Therapy. *Mol. Ther.* *15*, 1579-1586.
- Riedel, B.J. (1998). Ischemic injury and its prevention. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* *12*, 20-7; discussion 41-4.
- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* *245*, 154-160.
- Romano, G., Pacilio, C., Giordano, A. (1999). Gene transfer technology in therapy: current applications and future goals. *Stem Cells* *17*, 191-202.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* *230*, 1350-1354.
- Samaniego, F., Markham, P.D., Gendelman, R., Gallo, R.C., Ensoli, B. (1997). Inflammatory cytokines induce endothelial cells to produce and release basic fibroblast growth factor and to promote Kaposi's sarcoma-like lesions in nude mice. *J. Immunol.* *158*, 1887-1894.
- Sasada, R., Seno, M., Watanabe, T., Igarashi, K. (1991). Expression of modified bFGF cDNAs in mammalian cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *638*, 149-160.
- Schaper, W., Scholz, D. (2003). Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *23*, 1143-1151.
- Schriever, J., Schwarz, G., Steffen, C., Krafft, H. (2009). Das Genehmigungsverfahren klinischer Prüfungen von Arzneimitteln bei den Bundesoberbehörden. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* *52*, 377-386.
- Schumacher, B., Pecher, P., Specht, B.U. von, Stegmann, T. (1998). Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease. *Circulation* *97*, 645-650.
- Schweighofer, B., Testori, J., Sturtzel, C., Sattler, S., Mayer, H., Wagner, O., Bilban, M., Hofer, E. (2009). The VEGF-induced transcriptional response comprises gene clusters at the crossroad of angiogenesis and inflammation. *Thromb. Haemost.* *102*, 544-554.
- Shozu, M., Murakami, K., Segawa, T., Kasai, T., Ishikawa, H., Shinohara, K., Okada, M., Inoue, M. (2004). Decreased expression of early growth response-1 and its role in uterine leiomyoma growth. *Cancer Res.* *64*, 4677-4684.
- Simons, M., Annex, B.H., Laham, R.J., Kleiman, N., Henry, T., Dauerman, H., Udelson, J.E., Gervino, E.V., Pike, M., Whitehouse, M.J., Moon, T., Chronos, N.A. (2002). Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation* *105*, 788-793.
- Singh, R., Kølvråa, S., Bross, P., Jensen, U.B., Gregersen, N., Tan, Q., Knudsen, C., Rattan, S.I.S. (2006). Reduced heat shock response in human mononuclear cells during aging and its association with polymorphisms in HSP70 genes. *Cell Stress Chaperones* *11*, 208-215.
- Somia, N., Verma, I.M. (2000). Gene therapy: trials and tribulations. *Nat. Rev. Genet.* *1*, 91-99.

- Spanholtz, T.A., Theodorou, P., Holzbach, T., Wutzler, S., Giunta, R.E., Machens, H.-G. (2010). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF(165)) Plus Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) Producing Cells induce a Mature and Stable Vascular Network-a Future Therapy for Ischemically Challenged Tissue. *J. Surg. Res.*
- Strieter, R.M., Kunkel, S.L., Arenberg, D.A., Burdick, M.D., Polverini, P.J. (1995). Interferon gamma-inducible protein 10 (IP-10), a member of the C-X-C chemokine family, is an inhibitor of angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *210*, 51-57.
- Symes, J.F., Losordo, D.W., Vale, P.R., Lathi, K.G., Esakof, D.D., Mayskiy, M., Isner, J.M. (1999). Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease. *Ann. Thorac. Surg.* *68*, 830-6; discussion 836-7.
- Takahashi, J.C., Saiki, M., Miyatake, S., Tani, S., Kubo, H., Goto, K., Aoki, T., Takahashi, J.A., Nagata, I., Kikuchi, H. (1997). Adenovirus-mediated gene transfer of basic fibroblast growth factor induces in vitro angiogenesis. *Atherosclerosis* *132*, 199-205.
- Takeshita, S., Zheng, L.P., Brogi, E., Kearney, M., Pu, L.Q., Bunting, S., Ferrara, N., Symes, J.F., Isner, J.M. (1994). Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J. Clin. Invest.* *93*, 662-670.
- Thomas, C.E., Ehrhardt, A., Kay, M.A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* *4*, 346-358.
- Tupin, E., Poirier, B., Bureau, M.F., Khallou-Laschet, J., Vranckx, R., Caligiuri, G., Gaston, A.-T., van Duong Huyen, J.-P., Scherman, D., Bariéty, J., Michel, J.B., Nicoletti, A. (2003). Non-viral gene transfer of murine spleen cells achieved by in vivo electroporation. *Gene Ther.* *10*, 569-579.
- Verma, I.M., Somia, N. (1997). Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* *389*, 239-242.
- Waeckel, L., Mallat, Z., Potteaux, S., Combadière, C., Clergue, M., Duriez, M., Bao, L., Gerard, C., Rollins, B.J., Tedgui, A., Levy, B.I., Silvestre, J.S. (2005). Impairment in postischemic neovascularization in mice lacking the CXC chemokine receptor 3. *Circ. Res.* *96*, 576-582.
- Walther, W., Stein, U. (2000). Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs* *60*, 249-271.
- Walther, W., Siegel, R., Kobelt, D., Knösel, T., Dietel, M., Bembenek, A., Aumann, J., Schleef, M., Baier, R., Stein, U., Schlag, P.M. (2008). Novel jet-injection technology for nonviral intratumoral gene transfer in patients with melanoma and breast cancer. *Clin. Cancer Res.* *14*, 7545-7553.
- Watanabe, T., Okuda, Y., Nonoguchi, N., Zhao, M.Z., Kajimoto, Y., Furutama, D., Yukawa, H., Shibata, M.-A., Otsuki, Y., Kuroiwa, T., Miyatake, S. (2004). Postischemic intraventricular administration of FGF-2 expressing adenoviral vectors improves neurologic outcome and reduces infarct volume after transient focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *24*, 1205-1213.
- Webler, A.C., Michaelis, U.R., Popp, R., Barbosa-Sicard, E., Murugan, A., Falck, J.R., Fisslthaler, B., Fleming, I. (2008). Epoxyeicosatrienoic acids are part of the VEGF-activated signaling cascade leading to angiogenesis. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *295*, C1292-301.
- Wolff, J., Lewis, D.L., Herweijer, H., Hegge, J., Hagstrom, J. (2005). Non-viral approaches for gene transfer. *Acta Myol* *24*, 202-208.
- Wood, R.D. (2010). Mammalian nucleotide excision repair proteins and interstrand crosslink repair. *Environ. Mol. Mutagen.* *51*, 520-526.
- Yan, S.F., Fujita, T., Lu, J., Okada, K., Shan Zou, Y., Mackman, N., Pinsky, D.J., Stern, D.M. (2000). Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress. *Nat. Med.* *6*, 1355-1361.
- Yanagisawa-Miwa, A., Uchida, Y., Nakamura, F., Tomaru, T., Kido, H., Kamijo, T., Sugimoto, T., Kaji, K., Utsuyama, M., Kurashima, C. (1992). Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science* *257*, 1401-1403.
- Ye, X., Gao, G.P., Pabin, C., Raper, S.E., Wilson, J.M. (1998). Evaluating the potential of germ line transmission after intravenous administration of recombinant adenovirus in the C3H mouse. *Hum. Gene Ther.* *9*, 2135-2142.

- Yeh, H.-H., Lai, W.-W., Chen, H.H.W., Liu, H.-S., Su, W.-C. (2006). Autocrine IL-6-induced Stat3 activation contributes to the pathogenesis of lung adenocarcinoma and malignant pleural effusion. *Oncogene* 25, 4300-4309.
- Ylä-Herttuala, S., Martin, J.F. (2000). Cardiovascular gene therapy. *Lancet* 355, 213-222.
- Ylä-Herttuala, S., Alitalo, K. (2003). Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat. Med.* 9, 694-701.
- Yukawa, H., Takahashi, J.C., Miyatake, S.I., Saiki, M., Matsuoaka, N., Akimoto, M., Yanamoto, H., Nagata, I., Kikuchi, H., Hashimoto, N. (2000). Adenoviral gene transfer of basic fibroblast growth factor promotes angiogenesis in rat brain. *Gene Ther.* 7, 942-949.
- Zehe, C., Engling, A., Wegehingel, S., Schäfer, T., Nickel, W. (2006). Cell-surface heparan sulfate proteoglycans are essential components of the unconventional export machinery of FGF-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 15479-15484.
- Zhang, J., Chaluvadi, M.R., Reddy, R., Motika, M.S., Richardson, T.A., Cashman, J.R., Morgan, E.T. (2009). Hepatic flavin-containing monooxygenase gene regulation in different mouse inflammation models. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, Jg. 37, H. 3, S. 462-468.
- Zhang, Y., Bradshaw-Pierce, E.L., Delille, A., Gustafson, D.L., Anchordoquy, T.J. (2008). In vivo comparative study of lipid/DNA complexes with different in vitro serum stability: effects on biodistribution and tumor accumulation. *J Pharm Sci* 97, 237-250.
- Zhang, Z., Slobodianski, A., Ito, W.D., Arnold, A., Nehlsen, J., Weng, S., Lund, N., Liu, J., Egaña, J.-T., and Lohmeyer, J.A., et al. (2011). Enhanced collateral growth by double transplantation of gene-nucleofected fibroblasts in ischemic hindlimb of rats. *PLoS ONE* 6, e19192.
- Zhao, L., Samuels, T., Winckler, S., Korgaonkar, C., van Tompkins, Horne, M.C., Quelle, D.E. (2003). Cyclin G1 has growth inhibitory activity linked to the ARF-Mdm2-p53 and pRb tumor suppressor pathways. *Mol. Cancer Res.* 1, 195-206.
- Zhou, L., Ma, W., Yang, Z., Zhang, F., Lu, L., Ding, Z., Ding, B., Ha, T., Gao, X., Li, C. (2005). VEGF165 and angiopoietin-1 decreased myocardium infarct size through phosphatidylinositol-3 kinase and Bcl-2 pathways. *Gene Ther.* 12, 196-202.
- Zittermann, S.I., Issekutz, A.C. (2006). Basic fibroblast growth factor (bFGF, FGF-2) potentiates leukocyte recruitment to inflammation by enhancing endothelial adhesion molecule expression. *Am. J. Pathol.* 168, 835-846.
- <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/> (Tag des Zugriffs: 16.11.2010)

6.2 Regularien und Gesetze

AMG: Arzneimittelgesetz

CPMP/SWP/1042/99 corr.: Note for guidance on repeated dose toxicity

EMA/149995/2008: Guideline on safety and efficacy follow-up – risk management of advanced therapy medicinal products

EMA/273974/2005: Guideline on non-clinical testing for inadvertent germline transmission of gene transfer vectors

EMA/CHMP/GTWP/60436/2007: Guideline on follow-up of patients administered with gene therapy medicinal products

EMA/GTWP/125459/2006: Guideline on the non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products

ESchG: Embryonenschutzgesetz

GCP-V: Verordnung über die Anwendung der Guten Klinischen Praxis bei der Durchführung von klinischen Prüfungen mit Arzneimitteln zur Anwendung am Menschen

GenTG: Gentechnikgesetz

RL 2001/83/EG: Richtlinie 2001/83/EG des europäischen Parlaments und des Rates vom 6. November 2001 zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Humanarzneimittel

LITERATURVERZEICHNIS

- RL 2003/94/EG: Richtlinie 2003/94/EG der Kommission vom 8. Oktober 2003 zur Festlegung der Grundsätze und Leitlinien der Guten Herstellungspraxis für Humanarzneimittel und für zur Anwendung beim Menschen bestimmte Prüfpräparate
- RL 2004/23/EG: Richtlinie 2004/23/EG des europäischen Parlaments und des Rates vom 31. März 2004 zur Festlegung von Qualitäts- und Sicherheitsstandards für die Spende, Beschaffung, Testung, Verarbeitung, Konservierung, Lagerung und Verteilung von menschlichen Geweben und Zellen
- RL 2009/120/EG: Richtlinie 2009/120/EG der Kommission vom 14. September 2009 zur Änderung der Richtlinie 2001/83/EG des Europäischen Parlaments und des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Humanarzneimittel im Hinblick auf Arzneimittel für neuartige Therapien
- RL 86/609/EWG: Richtlinie des Rates 86/609/EWG vom 24. November 1986 zur Annäherung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere
- RL 87/18/EWG: Richtlinie 87/18/EWG des Rates vom 18. Dezember 1986 zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften für die Anwendung der Grundsätze der Guten Laborpraxis und zur Kontrolle ihrer Anwendung bei Versuchen mit chemischen Stoffen
- RL 88/320/EWG: Richtlinie 88/320/EWG des Rates vom 9. Juni 1988 über die Inspektion und Überprüfung der Guten Laborpraxis (GLP)
- TierSchG: Tierschutzgesetz
- Verordnung 1394/2007/EG: Verordnung (EG) Nr. 1394/2007 des europäischen Parlaments und des Rates vom 13. November 2007 über Arzneimittel für neuartige Therapien und zur Änderung der Richtlinie 2001/83/EG und der Verordnung (EG) Nr. 726/2004

7. Anhang

7.1 Versuchsergebnisse

7.1.1 Untersuchung der Reinheit der kultivierten Zellen - Fibroblastennachweis

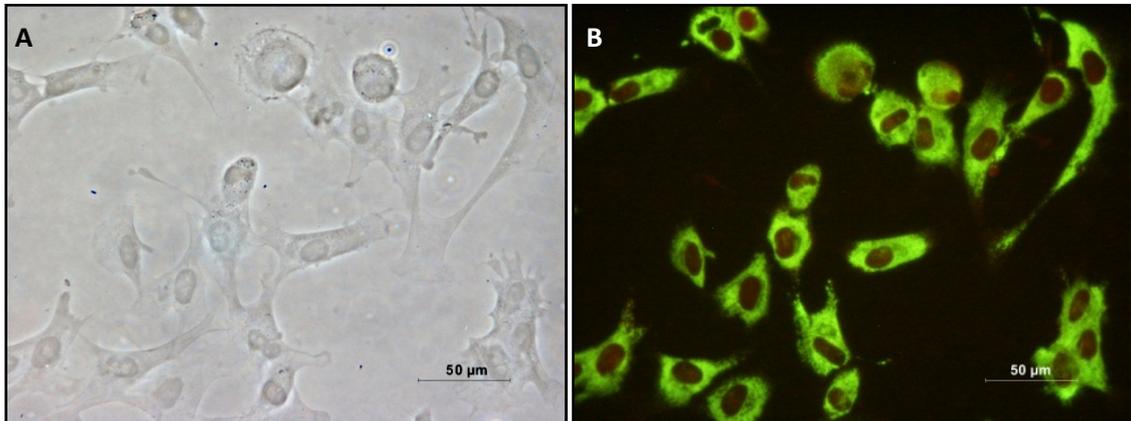


Abb. 21 **Rattenfibroblasten**. A Phasenkontrastmikroskopie, B Fluoreszenzmikroskopie nach Inkubation mit anti-Prolyl-4-Hydroxylase beta, FITC-markiertem Sekundärantikörper (grün) und Propidiumiodid (rot)

7.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

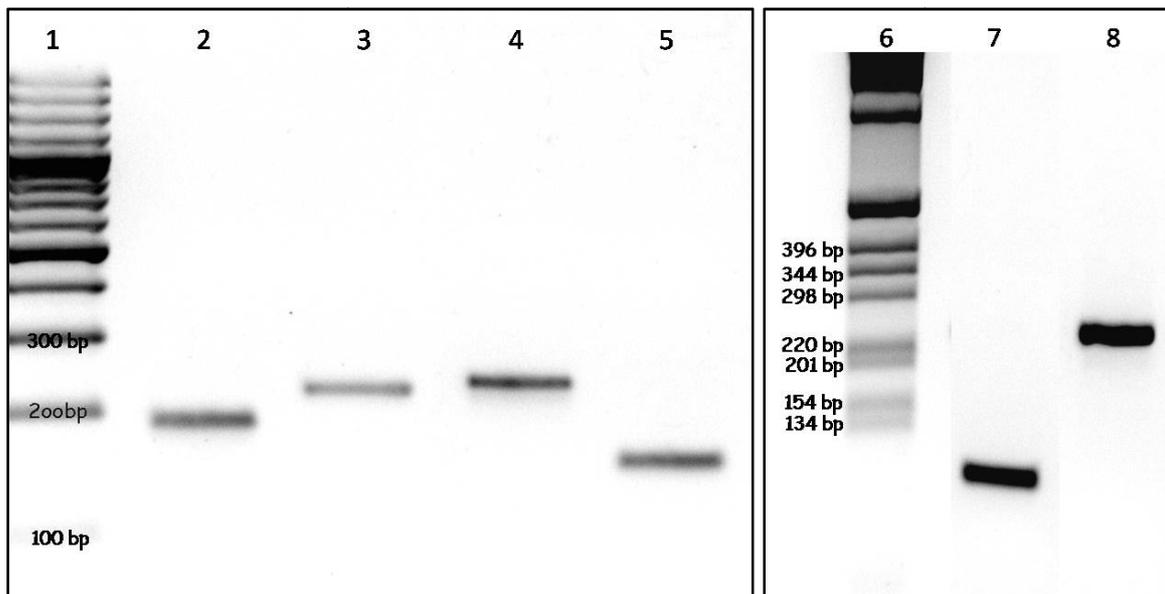


Abb. 22 **2%iges Agarosegel, Auftragung der PCR-Produkte**. 1 Marker (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas), 2 Plasmid/Backbone (186 bp), 3 hrbFGF (219 bp), 4 hrVEGF (225 bp), 5 GAPDH (146 bp), 6 Marker (1Kb DNA Ladder , Invitrogen), 7 hbFGF (107 bp), 8 hVEGF (245 bp)

7.1.3 Expressionsvergleich verschiedener Housekeeping Gene

Primer/ Probe	ACTB	GAPDH	rGAPDH	18S	MDH1	YWHAZ	RPL13	Normalisierungs- Faktor
1	1,000	0,686	0,616	0,458	0,614	0,232	0,695	0,651
2	4,558	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,422
3	1,445	0,962	1,010	0,677	0,983	0,720	1,340	1,128
4	1,247	0,124	0,248	0,313	0,392	0,238	0,626	0,406
5	1,825	0,215	0,352	0,521	0,360	0,243	0,778	0,536
6	1,862	0,391	0,426	0,699	0,161	0,358	0,653	0,576
7	3,613	1,017	1,318	1,795	2,781	2,160	0,417	1,778
8	3,105	0,948	0,769	0,875	0,784	1,553	0,554	1,192
9	2,164	0,543	0,650	2,628	1,879	1,185	0,652	1,333
10	2,017	0,539	0,446	1,015	0,604	0,769	1,059	0,934
11	5,022	1,138	1,405	4,836	2,666	2,376	0,745	2,413
12	3,451	1,041	0,877	1,354	0,163	1,672	1,215	1,201
M < 1,5	0,852	0,880	0,756	0,916	1,271	0,932	1,178	

Tab 8 Vergleich der relativen Expression verschiedener Housekeeping Gene. M mittlere Expressionsstabilität

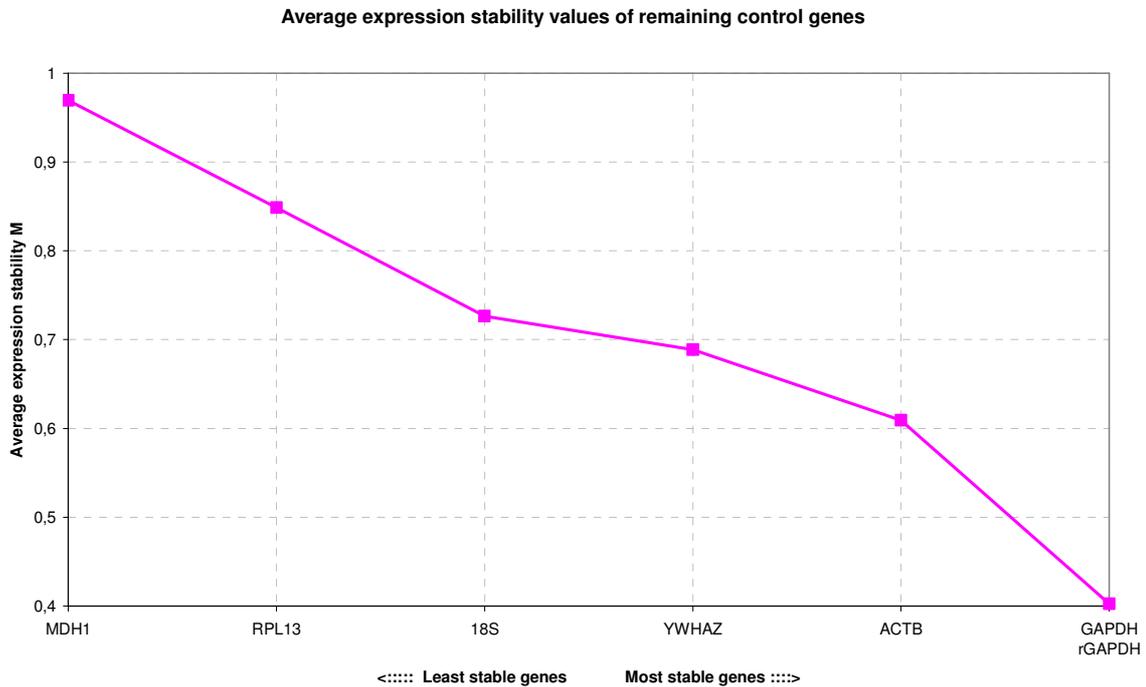


Abb. 23 Graphische Darstellung der mittleren Expressionsstabilität verschiedener Housekeeping Gene. Zunahme der Stabilität von links (MDH1) nach rechts (GAPDH, rGAPDH)

7.2 **Komplette Liste der Organe für die Untersuchung der Biodistribution**

Nach CPMP/SWP/1042/99 corr., Appendix A

- Applikationsstelle/ Wunde
- Tumorgewebe
- Blut
- Lymphknoten (mesenteriale und periphere)
- Brustdrüsen
- Speicheldrüsen (mandibular, parotid und sublingual)
- Skelettmuskel
- Sternebrae, Oberschenkelknochen, Wirbelknochen
- Hypophyse
- Thymus
- Trachea
- Lungen mit Bronchien und Bronchiolen
- Herz
- Aorta
- Schilddrüse, Nebenschilddrüse
- Speiseröhre
- Magen
- Dünndarm
- Dickdarm (mit Peyer'schen Plaques)
- Leber
- Gallenblase
- Pankreas
- Milz
- Niere und Harnleiter
- Nebenniere
- Urinblase
- Prostata
- Hoden
- Nebenhoden
- Samenblase
- Eierstöcke
- Uterus mit Gebärmutterhals und Eileitern
- Vagina
- Gehirn (mit Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm)
- Periphere Nerven
- Augen und Sehnerven
- Rückenmark
- Haut und subkutanen Gewebe
- Gelenk mit Knochen
- Kehlkopf
- Zunge

7.3 Veröffentlichungen und Kongressteilnahmen

7.3.1 Vorträge

A GMP-adapted technique to induce cell-based therapeutic angiogenesis in ischemic tissue.

(2007) Slobodianski, A., Kathöfer, A., Middeler, G., Machens, H.G.; ECSAPS, Aachen

Development of “therapeutic angiogenesis” - a technique to induce angiogenic reaction in ischemic tissue.

(2008) Slobodianski, A., Kathöfer, A., Frenz, A., Zhang, Z., Middeler, G., Machens, H.G.; ECSAPS, Bern

Analyses of collateral vessel growth in a rat cell therapy model of ischemia hindlimb: a computer tomography based research about angiogenesis and arteriogenesis assessment.

(2008) Zhang, Z., Slobodianski, A., Kathöfer, A., Frenz, J., Hartog, C., Ito, W.D., Machens, H.G.; ECSAPS, Bern

Significant neovascularization effect induced by non viral transfection of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor.

(2009) Zhang, Z., Slobodianski, A., Kathöfer, A., Frenz, J., Egaña, J.T., Salem, H., Ito, W.D., Mailänder, P., Machens, H.G.; Plastic Surgery Research Council - 54th Annual Meeting, Pittsburgh

Non-viral gene delivery system of bFGF and VEGF165 in an ischemic flap model.

(2009) Slobodianski, A., Kathöfer, A., Frenz, J., Hartog, C., Zhang, Z., Evers, L., Mailänder, P., Machens, H.G.; ECSAPS, Rotterdam

Therapeutic angiogenesis - preclinical aspects in view of efficacy and safety.

(2009) Kathöfer, A., Slobodianski, A., Zhang, Z., Frenz, J., Mailänder, P., Machens, H.G. ; ECSAPS, Rotterdam

Optimization of transfection for human and rat skin primary fibroblasts within pre-clinical research.

(2009) Slobodianski, A., Zhang, Z., Kathöfer, A., Frenz, J., Mailänder, P., Machens, H.G. ; ECSAPS, Rotterdam

Nicht-virale Gentherapie verbessert Regeneration im ischämischen Lappenmodell der Ratte.

(2010) Slobodianski, A., Hartog, C., Kathöfer, A., Frenz, J., Zhang, Z., Evers, L., Mailänder, P., Machens, H.G.; Chirurgisches Forum und DGAV Forum 2010 für experimentelle und klinische Forschung, Berlin

Some preclinical aspects of non-viral gene therapy in rat hindlimb ischemia model.

(2010) Slobodianski, A., Kathöfer, A., Zhang, Z., Frenz, J., Hartog, C., Mailänder, P., Machens, H.G.; 45th Congress of the ESSR, Genf

Therapeutic angiogenesis – non viral gene therapy for regeneration in an ischemic flap model.

(2010) Slobodianski, A., Hartog, C., Kathöfer, A., Frenz, J., Zhang, Z., Evers, L., Mailänder, P., Machens, H.G.; 45th Congress of the ESSR, Genf

Verbesserte Regeneration nach Transplantation isogener nicht-viral transfizierter Fibroblasten im ischämischen Lappenmodell der Ratte. (2010) Hartog, C., Slobodianski, A., Frenz, J., Kathöfer, A., Zhang, Z., Evers, L., Mailänder, P., Machens, H.G.; DGPRÄC, Dresden

Therapeutic angiogenesis – a treatment method for patients with chronic limb ischemia. (2010)

Slobodianski, A., Kathöfer, A., Hartog, C., Zhang, Z., Frenz, J., Evers, L., Mailänder, P., Machens, H.G.; ECSAPS, Helsinki

7.3.2 Poster

Optimization of nucleofection provides high efficiency of transfection for human and rat skin primary fibroblasts within GMP based pre-clinical research. (2009) Hartog, C., Slobodianski, A., Zhang, Z., Kathöfer, A., Frenz, J., Evers, L., Mailänder, P., Machens, H.G.; DGPRÄC - Hannover

Optimization of nucleofection provides high efficiency of transfection for human and rat skin primary fibroblasts within GMP based pre-clinical research. (2009) Kathöfer, A., Slobodianski, A., Zhang, Z., Frenz, J., Hartog, C., Evers, L., Mailänder, P., Machens, H.G.; 13. Chirurgische Forschungstage, München

Therapeutic angiogenesis – non viral gene therapy for patients with critical limb ischemia.

(2010) Slobodianski, A., Kathöfer, A., Hartog, C., Zhang, Z., Frenz, J., Mailänder, P., Machens, H.G.; 17th Annual Meeting of the German Society for Gene Therapy, München

7.3.3 Publikationen

Enhanced Collateral Growth by Double Transplantation of Gene-Nucleofected Fibroblasts in Ischemic Hindlimb of Rats. (2011) Zhang, Z., Slobodianski, A., Ito, W.D., Arnold, A., Nehlsen, J., Weng, S., Lund, N., Liu, J., Egaña, J.T., Lohmeyer, J.A., Müller, D.F., Machens, H.G. PLoS ONE 6(4): e19192. doi:10.1371/journal.pone.0019192

High efficient nucleofection for therapeutic angiogenesis- a comparison study of different gene transfer methods. Zhang, Z., Slobodianski, A., Arnold, A., Frenz, J., Hartog, C., Hopfner, U., Egana, T., Machens, H.G. In Bearbeitung

7.4 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung	Seite	Titel
1	4	Vektoren in der Gentherapie
2	9	Faktoren, die das Gewebewachstum induzieren können
3	26	Induktion einer Ischämie durch Ligation der Femoralarterie am „Hindlimb“ Modell der Ratte
4	29	Plasmidkarten der verwendeten Plasmide
5	35	Bindungsstellen der Primer für den Nachweis der Plasmid-DNA in Zellkultur- und Gewebeproben
6	40	Vergleich unterschiedlicher Transfektionsprogramme
7	41	Vergleich unterschiedlicher Transfektionslösungen
8	42	Erhöhung der Zellzahl pro Transfektion
9	44	Standardreihen für die absolute Quantifizierung mittels Real-Time PCR
10	45	Einfluss von genomischer DNA (gDNA) aus Gewebeproben auf die Real-Time PCR in Gewebeproben
11	46	Apoptosetest nach Elektroporation
12	47	Zeitverlauf der GFP-Expression
13	48	cDNA-Nachweis der plasmidcodierten Wachstumsfaktoren im Zeitverlauf mittels Real-Time PCR
14	49	Nachweis der plasmidcodierten Wachstumsfaktoren im Zellkulturüberstand mittels ELISA
15	50	Nachweis der Plasmid-DNA <i>ex vivo</i> im Zeitverlauf mittels Real-Time PCR
16	51	Nachweis der plasmidcodierten Wachstumsfaktoren <i>in vivo</i> mittels Real-Time PCR
17	52	Nachweis der relativen Expression von bFGF und VEGF <i>in vivo</i> mittels Real-Time PCR
18	54	Nachweis der Plasmid-DNA <i>in vivo</i> im injizierten Muskel mittels Real-Time PCR
19	56	Nachweis der Plasmid-DNA <i>in vivo</i> in peripheren Gewebeproben mittels Real-Time PCR
20	57	Expressionsmuster von Stress- und Toxizitätsgenen im injizierten Muskelgewebe an Tag 7 nach Injektion
21	85	Rattenfibroblasten
22	85	2%iges Agarosegel, Auftragung der PCR Produkte
23	86	Graphische Darstellung der mittleren Expressionsstabilität (M) verschiedener Housekeeping Gene.

Tabelle	Seite	Titel
1	3	Überblick über klinische Gentherapiestudien
2	5	Charakteristika von viralen Gentherapievektoren
3	8	Faktoren mit angiogenetischen Eigenschaften
4	13	Phasen der klinischen Prüfung und deren Hauptziele
5	26	Übersicht der Versuchstiere für das Ligationsexperiment
6	46	Apoptosetest nach Elektroporation
7	53	<i>In vivo</i> Proteinexpression (ELISA) an der Injektionsstelle
8	55	Nachweis der Plasmid-DNA <i>in vivo</i> in peripheren Gewebeproben mittels Real-Time PCR
9	86	Vergleich der relativen Expression verschiedener Housekeeping Gene

7.5 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin	GenTG	Gentechnikgesetz
AAV	Adenoviral assoziiertes Virus	GFP	Green Fluorescent Protein
Abb.	Abbildung	GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
abFGF/bFGF	Acidic/Basic Fibroblast Growth Factor	GMP	Good Manufacturing Practice
Abs.	Absatz	GTMP	Gene Therapy Medicinal Products
ATMP	Advanced Therapy Medicinal Products	GVO	gentechnisch veränderter Organismus
bp	Basenpaar	hbFGF	Humanes bFGF
BSA	Bovines Serum Albumin	He	Herz
bzw.	Beziehungsweise	HGF	Hepatocyte Growth Factor
C	Cytosin	HIF	Hypoxia-Inducible Transcription Factor
CAT	Committee for Advanced Therapies	Ho	Hoden
Ccl	Chemokin (C-C Motiv) Ligand	hrbFGF	Isoformen des humanen und Ratten-bFGF
cDNA	Komplementäre DANN	hrVEGF	Isoformen des humanen und Ratten-VEGF
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use	Hspa1l	Heat Shock 70 kD Protein 1-like
CMV	Cytomegalie Virus	HUVEC	Humane Nabelschnurvenenendothelzellen
Ct/Cq	Threshold Cycle/Cycle of Quantification	hVEGF	Humanes VEGF
Cxcl	Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand	i.m.	Intramuskulär
CXCR	Chemokin C-X-C Motiv Rezeptor	i.v.	Intravaskulär
D	Deutschland	ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
DD	Dünndarm	IGF	Insulin-like Growth Factor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Il	Interleukin
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Ko	Kontrollmuskel
DNase	Desoxyribonuklease	Le	Leber
dNTP	2-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat	Lu	Lunge
DTT	Dithiothreitol	MCP-1	Monocyte Chemo-Attractant Protein 1
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	Mi	Milz
EET	Epoxyeicostrirenische Säure	MIP	Macrophagen Inflammatory Protein
Egr1	Early Growth Response 1	mMol	Millimolar, mmol/l
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	MMP	Matrixmetalloprotease
EMA	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products	Mol	Molar, mol/l
eNOS/iNOS	Endothelial/inducible Nitric Oxid Synthase	mRNA	Messenger RNA
Ephx2	Epoxide Hydrolase 2	MW	Mittelwert
ER	Endoplasmatisches Retikulum	NGF	Nerve Growth Factor
Ercc1	Excision Repair Cross-Complementing Rodent Repair Deficiency, Complementation Group 1	Ni	Niere
ESchG	Embryonenschutzgesetz	NO	Stickstoffmonoxid
et al.	Et alteri	NTC	Kontrolle ohne Template
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung	OD	Optische Dichte
Faslg	Fas Ligand	OS	Oberschenkel
FBS	Fetales bovines Serum	PAR	Proteinase-Activated Receptors
Fmo1	Flavin Containing Monooxygenase 1	PBS	Phosphat gepufferte Saline
for	Forward	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energietransfer	PDGF-BB	Plated-Derived Growth Factor-BB
FRZ	Frizzled	PEI	Paul Ehrlich Institut
G	Guanosin	PI	Propidiumiodid
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	PIGF	Placental Growth Factor
GCP	Good Clinical Practice	rev	Revers
Ge	Gehirn		

ANHANG

rhVEGF	rekombinantes humanes VEGF
RL	Richtlinie
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Stabw	Standardabweichung
T	Thymidin
TE	Tris-EDTA

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UK-SH	Universitätsklinikum Schleswig Holstein
usw.	Und so weiter
VEGF	Vascular endothelial Growth Factor
x g	Zentrifugalkraft
XPF	Xeroderma Pigmentosum Group F
z.B.	zum Beispiel

8. Danksagung

Ich möchte mich hiermit sehr herzlich bei den zahlreichen Menschen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinem Doktorvater Prof. Mailänder danke ich, dass er die Betreuung meiner Arbeit übernommen hat.

Zudem danke ich Prof. Machens, der das Projekt „Therapeutische Angiogenese“ ins Leben gerufen und mir die Möglichkeit gegeben hat, in dieser Arbeitsgruppe zu arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Alex Slobodianski für die fachliche Betreuung, die vielen konstruktiven Diskussionen und Ratschläge sowie die Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des ehemaligen KTE für die tolle Atmosphäre im Labor und die Hilfsbereitschaft bei vielen fachlichen und alltäglichen Problemen herzlich bedanken.

Insbesondere danke ich Dr. Zhang Ziyang und Christoph Hartog für die Unterstützung bei den tierexperimentellen Arbeiten und Jessica Nehlsen, auf die ich mich stets verlassen konnte und durch die die vielen Stunden an der Bench nie langweilig wurden.

Mein Dank gilt zudem Dr. Tillman Vollbrandt für die Durchführung der Durchflusszytometrie und Alexandra Tiedtke für die Agarose-Gelelektrophorese.

Ganz herzlich bedanke ich mich auch bei meinen Freunden und meiner Familie, die mich die letzten Jahre unterstützt und mich stets motiviert haben. Mein besonderer Dank gilt hierbei meinem Mann Stefan, der mir mit viel Verständnis die Kraft für diese Arbeit gegeben hat.