

---

Aus dem Julius Wolff Institut  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Sicherheitsnachweis zum Ausschluss einer systemischen  
Genexpression nach lokaler Applikation wachstumsfaktor-  
spezifischer Plasmide am Kaninchenmodell**

**Molekularbiologische Untersuchung**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Yvonne Funke  
aus Oschatz

Datum der Promotion: 26.02.2016

---

*„Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen,  
dass die Dinge sind, wie sie sind.“*

*Aristoteles*

**MEINER FAMILIE**

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Einführung .....	1
1.2 Medizinischer Hintergrund .....	1
1.3 Stand der Wissenschaft .....	3
1.3.1 Revision .....	3
1.3.2 Klinische Relevanz .....	4
1.3.3 Aseptische Lockerung .....	4
1.3.4 Osteointegration .....	6
1.3.5 Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) .....	8
1.3.6 Gentherapie.....	10
1.3.7 Die physiologischen Barrieren der Gentherapie.....	13
1.3.8 Vektoren .....	15
1.3.9 Copolymer-Protected Gene Vectors (COPROGs) .....	17
1.3.10 Luciferase-Plasmid .....	18
1.3.11 Fibrinkleber .....	19
1.4 Ziele der Arbeit .....	20
<b>2 Methodik</b> .....	<b>21</b>
2.1 Tiermodell.....	21
2.2 Implantat, Trägermaterial und COPROGs.....	22
2.3 Operatives Vorgehen .....	23
2.3.1 OP-Vorbereitung und Anästhesie .....	23
2.3.2 Operationstechnik .....	24
2.3.3 Radiologische Untersuchung.....	26
2.3.4 Untersuchungen und Nachsorge.....	27
2.4 Tötung und Probenentnahme .....	28
2.5 Molekularbiologisches Vorgehen .....	29
2.5.1 Aufarbeitung der Proben für die molekularbiologische Analyse .....	29
2.5.2 mRNA-Isolation aus Knochen und Gewebe .....	31
2.5.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (rt-PCR).....	32
2.5.4 PCR und Agarose-Gelelektrophorese.....	33
2.5.5 Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) .....	35

---

<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>37</b>
3.1 OP-Toleranz .....	37
3.2 Körpergewicht und Körpertemperatur .....	37
3.3 Blut- und Serumanalyse .....	38
3.4 Radiologische Untersuchung .....	39
3.5 Molekularbiologische Untersuchung .....	39
3.5.1 PCR und Agarose-Gelelektrophorese .....	39
3.5.2 Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) .....	47
3.6 Biomechanische Untersuchung .....	53
3.7 Histologische Untersuchung .....	53
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>54</b>
4.1 Diskussion der Ergebnisse .....	54
4.1.1 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung .....	56
4.1.2 Ergebnisse der Analyse von Blut, Gewicht und Körpertemperatur .....	64
4.2 Diskussion der Methodik .....	65
4.2.1 Tiermodell .....	65
4.2.2 Untersuchte Zeitpunkte .....	65
4.2.3 Fibrin .....	67
4.2.4 COPROGs und PEI .....	68
4.2.5 Luciferase-Plasmid .....	71
4.2.6 Applikationsdosis .....	71
4.2.7 Probenentnahme und Aufarbeitung .....	73
4.2.8 Molekularbiologisches Vorgehen .....	74
4.3 Ausblick .....	77
<b>5 Anhang</b> .....	<b>79</b>
5.1 Literaturverzeichnis .....	79
5.2 Abkürzungsverzeichnis .....	93
5.3 Abbildungsverzeichnis .....	95
5.4 Tabellenverzeichnis .....	96
5.5 Verzeichnis der verwendeten Materialien .....	97
<b>6 Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>101</b>
<b>7 Curriculum vitae</b> .....	<b>103</b>
<b>8 Publikationsverzeichnis</b> .....	<b>104</b>
<b>9 Danksagung</b> .....	<b>105</b>

## Abstrakt

Der weltweit zunehmende endoprothetische Gelenkersatz hat die Lebensqualität vieler Patienten verbessert, wobei die aseptische Lockerung der Implantate die häufigste Komplikation darstellt. Die resultierenden aufwendigen Wechseloperationen gehen einher mit erhöhten Komplikations- und Mortalitätsraten. Ein experimenteller Therapieansatz zur Verbesserung der Osteointegration ist die Applikation osteoinduktiver Wachstumsfaktoren wie dem seit 2002 für die Frakturbehandlung klinisch zugelassenen BMP-2. Geringe Bioverfügbarkeiten, kurze Halbwertszeiten, hohe Kosten und dosisabhängige Nebenwirkungen begrenzen jedoch seine Einsatzmöglichkeiten.

Ein neuartiger Therapieansatz ist der non-virale Gentransfer von BMP-2 mittels polymerbasierten Vektorsystem (Copolymer-Protected Gene Vectors, COPROGs), um eine lokale und zeitlich limitierte Expression des therapeutischen Proteins zu erreichen. Hierzu wird eine Plasmid-DNA mit Polyethylenimin komplexiert und von einem Schutzpolymer ummantelt.

In einer tierexperimentellen Studie wurde die Effizienz und Sicherheit dieses Vektorsystems nach intramedullärer Applikation mit einer Fibrinmatrix und einem Titanelastischen Nagel in die Tibia beidseits im Kaninchenmodell untersucht. Drei Gruppen (n=16/Gruppe) wurden biomechanisch und histomorphometrisch analysiert. Die vierte Gruppe (n=12) war Gegenstand der vorliegenden Arbeit mit dem Ziel, die lokale Transfektionseffizienz und systemische Transfektion zu beurteilen. Hierzu wurde anstelle des BMP-2- ein Luciferase-Plasmid als Reportergen verwendet. Nach 4, 7 und 28 Tagen (n=4/Tag) wurden mittels PCR und qRT-PCR die lokale Transfektionseffizienz in beiden Tibiae sowie die systemische Transfektion in applikationsfernen Organproben analysiert. Blut- und Serum-Analysen sowie Röntgenuntersuchungen der Tibiae postoperativ und post mortem waren unauffällig.

Die Daten zeigten eine effiziente lokale Transfektion in allen Bereichen der Tibia beidseits. Mittels PCR wurde in 22/24 und mittels qRT-PCR in 19/24 Tibiaproben eine Luciferase-Expression nachgewiesen, mit höchster Expression nach 28 Tagen. Jedoch wurde auch eine systemische Luciferase-Expression detektiert - mittels PCR in 22/88 und mittels qRT-PCR in 16/88 applikationsfernen Proben. Alle untersuchten Organe waren betroffen, initial mehr als nach 28 Tagen, am häufigsten Humerus, Lunge und Leber, jedoch mit relativ geringer Luciferase-Expression im Vergleich zum Applikationsgebiet (Tibia).

Somit konnte mit dieser Sicherheitsstudie eine systemische Verteilung der Plasmide nachgewiesen werden, welche möglicherweise durch die Erhöhung des intramedullären Druckes während der Implantation des Nagels und die damit verbundene venöse Verteilung zu Stande kam.

Hingegen gelang der lokale Gentransfer mittels COPROGs als Beschichtung eines intramedullären Kraftträgers in einer anderen Studie ohne systemischen Genexpressionsnachweis. Demnach scheint die systemische Transfektion von der Applikationsmethode abhängig zu sein. Einflüsse der Applikationsdosis und Fibrinogenkomponente der Fibrinmatrix sind nicht auszuschließen.

Die parallel durchgeführten biomechanischen und histomorphometrischen Analysen zur Effektivität dieses non-viralen BMP-2-Gentransfers konnten allerdings keine Verbesserung der Osteointegration zeigen.

Diese Erkenntnisse bedürfen weiterer Forschung, um zukünftig eine effiziente und sichere Transfektion mit COPROGs zu ermöglichen.

## Abstract

Worldwide expanding joint replacement has improved patient's quality of life but the most common complication is aseptic implant loosening. Resulting complex revisions are accompanied by higher morbidity and mortality rates. Application of osteoinductive growth factors like BMP-2 (clinically approved for fracture healing since 2002) is an experimental therapy approach to improve osseointegration. Practical applicability is limited by poor bioavailability, short half-lives, high costs and dose-dependent systemic side effects.

Non-viral gene transfer of BMP-2 via a polymer-based vector system (Copolymer-Protected Gene Vectors, COPROGs) is a novel therapy approach to achieve a temporary and locally expression of the therapeutic protein. Therefore plasmid-DNA is complexed with polyethyleneimine and coated by protective polymers.

A rabbit-based study was performed to determine the efficiency and safety of this new vector system using a fibrin matrix for local intramedullary application and bilateral implantation of titanium tibia nails. Three groups (n=16/group) served for biomechanical and histomorphometrical tests. Subject of this present thesis was group four (n=12) to determine both local transfection efficiency and systemic distribution respectively safety. A luciferase-plasmid was used as reporter gene instead of BMP-2. The local transfection efficiency in both tibiae and systemic transfection in heterotopic organ samples were analyzed by PCR and qRT-PCR (after 4, 7, 28 days, n=4/day). Additional blood analyzes, postoperative and post-mortem tibia X-ray examinations were unobtrusive.

An efficient local transfection in the whole tibia was shown bilaterally. In 22/24 tibia samples Luciferase-expression was determined by PCR and in 19/24 by qRT-PCR with highest expression after 28 days. However, a systemic Luciferase-expression was detected, too - in 22/88 heterotopic samples by PCR and in 16/88 by qRT-PCR. All examined organs were affected, the most humerus, lung and liver, but showing lower Luciferase-expression than the target (tibiae) and expression was decreasing over time.

Thus, a systemic distribution of plasmids was demonstrated with this safety study. This might result from increased pressure conditions intramedullary during nail implantation with consecutive venous distribution.

Whereas in another study, local gene transfer using COPROGs-coated intramedullary devices succeeded without systemic gene expression. The systemic transfection seems to depend on

types of application and influences through dosage and fibrinogen component of fibrin matrix cannot be excluded.

Moreover neither biomechanical nor histomorphometrical tests to evaluate efficiency could show an increased osseointegration using this specific non-viral BMP-2 gene transfer via COPROGs.

Thus, more investigation needs to be performed to allow a safe and efficient transfection with COPROGs.



# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung

Im Rahmen degenerativer und entzündlicher Erkrankungen wie Osteoarthrose und rheumatoider Arthritis oder durch Verletzungen sowie durch Fehlbildungen, idiopathisch und toxisch bedingt, kann es zur Gelenkdestruktion kommen. Oft ist die Funktion eines solchen Gelenkes nur durch die Implantation einer Endoprothese wiederherstellbar. Weltweit werden jährlich durchschnittlich 1,5 Millionen humane Gelenke durch eine Total- oder Hemi-Endoprothese ersetzt, wobei die primäre Osteoarthrose mit über 75 % die führende Indikation darstellt.<sup>1, 2</sup> Der chirurgische Gelenkersatz hat die Lebensqualität vieler Patienten wesentlich verbessert. Er ist eine der wirksamsten und kosteneffizientesten Prozeduren zur Linderung von Schmerzen sowie zur Wiederherstellung der Gelenkfunktion.<sup>1, 3</sup> Demographische Daten sprechen weltweit für eine Zunahme der Indikationen zum Gelenkersatz. Dem Qualitätsreport der Bundesgeschäftsstelle für Qualitätssicherung zufolge wurden 2008 allein in Deutschland 156.877 totale Hüft-Endoprothesen implantiert.<sup>4</sup> Die mittlere 10-Jahres-Überlebensrate dieser Implantate beträgt über 95 %.<sup>5</sup> Dennoch ist die Haltbarkeit der Prothesen begrenzt, oft nicht zufriedenstellend und stellt ein Problem dar. Ein Teil der Patienten wird mit Komplikationen nach totalem Gelenkersatz konfrontiert, die zu einem vorzeitigen Prothesenausfall und damit zur Revision führen. Der Fokus der Forschung liegt daher derzeit auf der aseptischen Lockerung, da sie die Hauptursache aller Revisionen darstellt, sowie auf einer Verbesserung der Osteointegration der Endoprothesen.<sup>3, 6</sup>

## 1.2 Medizinischer Hintergrund

Den Grundstein der heutigen Endoprothesentechnik legte der Berliner Chirurg Themistocles Gluck 1890 mit dem ersten totalen Gelenkersatz an einem tuberkulotischen Kniegelenk.<sup>7</sup> Seitdem erfolgten, neben der Verbesserung des perioperativen Hygienemanagements und der Einführung einer Antibiotikaprophylaxe, zahlreiche Entwicklungen auf dem Gebiet der Endoprothesentechnik. Ziel war es, Komplikationen zu reduzieren und die Haltbarkeit der Prothesen zu steigern, um die Zahl der Implantatwechsel zu senken. Die initial hohe Rate an Materialermüdungen und Implantatbrüchen konnte durch den Einsatz neuer Materialien wie Titan, Edelstahl und diverser Edelmetall-Legierungen sowie durch die Entwicklung neuer Prothesentypen und -formen gesenkt werden.<sup>2, 8, 9</sup> Der Implantatausfall durch Infektionen,

Frakturen und Dislokationen konnte stark reduziert werden, wohingegen die aseptische Lockerung der Implantate zunehmend in den Mittelpunkt der Forschung gerückt ist.<sup>1</sup> Die Einführung neuer Zementiertechniken und die Steigerung der Implantatsicherheit durch Veränderungen in der Biomechanik und Biokompatibilität der Prothesen verbesserten die primäre Implantatverankerung im Knochen und führten zu einer Reduktion der Rate ernsthafter Komplikationen sowie der Revisionsrate um 20 %.<sup>2, 8, 9</sup> Durch die Entwicklung von Implantaten mit porösen Oberflächen wurde das Einwachsen von Knochen in die Implantatoberfläche ermöglicht. Somit konnte auch mit der unzementierten Technik bereits früh postoperativ eine größere Primärstabilität erreicht werden.<sup>10, 11</sup> Eine zusätzliche Stabilisierung gelang durch den Einsatz von Tricalciumphosphat Granulat, einem osteokonduktiven Interpositionsmaterial zwischen Implantat und Knochen. Allerdings konnte eine sichere Stabilität erst nach sechs Monaten erreicht werden.<sup>12</sup> Die bioaktiven Oberflächenbeschichtungen der zementlosen Implantate wie Tricalciumphosphat und Hydroxylapatit (HAP) wurden im Verlauf weiterentwickelt und zeigten im Vergleich zu unbeschichteten Prothesenteilen eine bessere und schnellere Osteointegration.<sup>13, 14</sup> All diese Entwicklungen führten zu einer Verbesserung der Implantateinheilung in den Knochen, weisen ihrerseits aber auch Probleme auf, die bisher nicht gelöst werden konnten. Die bioaktiven Beschichtungen lösen sich mit der Zeit ab und das Aufsintern von Metallnetzwerken oder Kugeln führt zur erhöhten Materialbrüchigkeit. Bei den abrasiven Methoden sowie der Lasertechnik zur Strukturierung der Implantatoberflächen kommt es zur erhöhten Freisetzung von Metallionen.<sup>11, 15, 16</sup> Demnach ist die Haltbarkeit eines Implantates weiterhin begrenzt. Die Implantatlockerung, hervorgerufen durch massiven Knochenverlust, und die aseptische Lockerung bei zementierten und zementfreien Prothesen sind weiterhin die Hauptkomplikationen, und stellen nach wie vor ein ungelöstes Problem dar.<sup>1, 6, 17</sup> Die momentanen Bestrebungen zur Senkung der Zahl der Revisionen auf diesem Gebiet basieren hauptsächlich auf dem Versuch, die Osteointegration zu verbessern und die Haltbarkeit der Prothesen zu steigern. Potentielle Lösungen wären die Applikation rekombinanter Wachstumsfaktoren und der Gentransfer von Wachstumsfaktor-Plasmiden mit gezielter Manipulation endogener Zellen, um spezifische Proteine zu generieren.<sup>18</sup>

## 1.3 Stand der Wissenschaft

### 1.3.1 Revision

Skutek *et al.* gaben 2006 ein Revisions Burden (Verhältnis Anzahl der Revisionen zu der Gesamtanzahl implantierter Endoprothesen) in Deutschland von 11,6 % an.<sup>19</sup>

Es gibt zahlreiche Ursachen, die nach totalem Gelenkersatz zu einer Revision führen. Die häufigste Komplikation nach der Implantation totaler Endoprothesen ist die aseptische Lockerung. Sie stellte laut dem „Annual Report 2012“ des Schwedischen Hüftregisters mit 55,1 % die Hauptursache aller Hüftgelenks-Revisionen im Zeitraum von 1979 bis 2012 dar<sup>20</sup> und Sadoghi *et al.* zufolge mit 29,8 % aller Kniegelenks-Revisionen.<sup>6</sup> Die erste Revision nach primärem totalem Hüft-Gelenkersatz erfolgt im Durchschnitt bei 71,1 % der Patienten aufgrund einer aseptischen Lockerung. In der Regel tritt diese erst relativ spät auf. Im ersten bis dritten Jahr nach Primärimplantation sind es lediglich 38 %, während es nach vier bis sechs Jahren 78,7 %, nach sieben bis zehn Jahren schon 84,5 % und nach über zehn Jahren 84,7 % sind.<sup>20</sup> Besonders bei endoprothetisch versorgten Patienten mit destruierenden Erkrankungen im Endstadium wie Osteoarthritis oder entzündliche Arthritis kommt es im Verlauf zu periprothetischen Gewebeerstörungen. Aufgrund fehlender Symptome und Früherkennungsmethoden wird dies oft erst im Spätstadium oder bei komplettem Funktionsverlust des Implantates erkannt.<sup>21</sup>

Gründe für Frühkomplikationen in den ersten drei Jahren nach der Primärimplantation sind Infektionen, die zur septischen Lockerung führen (12,9 %) oder Implantat-bezogene Probleme wie periprothetische Frakturen (8,3 %), Delamination poröser Oberflächenbeschichtungen oder herstellungsbedingte Probleme. Eine inadäquate chirurgische Technik wie die Malpositionierung von Einzelkomponenten oder technische Probleme können zu rezidivierenden Luxationen führen und ebenfalls eine frühe Wechseloperation erforderlich machen (11,9 %). Die Gründe für eine frühzeitige Revision machten im Zeitraum von 1979 bis 2012 zusammen 44,9 % aller Revisionen aus.<sup>6, 20</sup>

Klinische Zeichen für eine Wechsel-Indikation sind Schmerzen, klinische und laborchemische Entzündungszeichen sowie ein korrelierender pathologischer Röntgenbefund.

### 1.3.2 Klinische Relevanz

Die Wechseloperation einer Endoprothese erfordert eine deutlich längere Operationszeit. Dies ist bedingt durch die Explantation des primären Implantates. Verwachsungen infolge der Primäroperation erschweren die Operationsbedingungen und führen zu einer wesentlich höheren Komplikationsrate. Dabei korrelieren viele Komplikationen wie Verletzungen von Gefäßen und Nerven, verbunden mit massivem Blutverlust und bleibendem Funktionsverlust, Kompartmentsyndrome, Infektionen oder Implantat-Dislokationen am Ende direkt mit der Behandlungsdauer.<sup>22</sup> Haas zeigte zudem 1997, dass eine lange Immobilisation bei 30-50 % der Patienten zu einer tiefen Beinvenenthrombose führt und durchschnittlich 5 % davon an einer Lungenarterienembolie sterben. Aus diesen Komplikationen resultieren längere Krankenhaus-Aufenthaltszeiten und in Verbindung damit höhere Kosten, höhere Infektions- und Dislokationsraten sowie eine höhere Mortalität.<sup>23</sup>

Assmann *et al.* zeigen in ihren aktuellen Daten von 2014, dass die Kosten für eine Revision nach totalem Gelenkersatz in Deutschland im Durchschnitt 4380,00 Euro betragen.<sup>24</sup> Dies sind lediglich die Kosten für die Operation und die Krankenhausbehandlung. Hinzu kommen unter anderem Kosten für die Weiterbehandlung, Rehabilitation und den Arbeitsausfall sowie für benötigte Heil- und Hilfsmittel. Der Implantatausfall führt somit zu einer sozioökonomischen Belastung für den Patienten und das Gesundheitssystem. Bisher gibt es keine Therapieoptionen, um periprothetische Osteolysen und den Prozess der aseptischen Lockerung der Prothesen zu verhindern. Am Ende bleibt nur die chirurgische Revision.<sup>1</sup>

### 1.3.3 Aseptische Lockerung

Als Ursache für die aseptische Lockerung kommen verschiedene Faktoren in Betracht. Initial entscheidend ist die chirurgische Technik, da eine inadäquate Fixierung zementfreier Endoprothesen zu einer schlechten Osteointegration<sup>1, 21</sup> und dadurch in der Regel zum frühzeitigen Versagen des Implantates mit nachfolgender Revision führt.<sup>5</sup>

Über die Zeit kann ein mechanischer Verlust der Fixation eintreten, welcher zu periprothetischen Frakturen, Osteolysen und konsekutiv zu einer Lockerung des Implantates führt. Der biologische Verlust der Fixation kann durch partikelinduzierte Osteolysen um das Implantat herum entstehen. Dabei beruht die Pathogenese der aseptischen Lockerung auf inflammatorischen und osteolytischen Prozessen. Der Implantatoberflächenabrieb, welcher durch mechanische Belastung und Reibungskräfte bei der Gelenkbewegung sowie durch kleinste Bewegungen im

Knochen-Implantat-Interface in Folge von Korrosionsprozessen und durch oxidative Reaktionen entsteht, führt zur Akkumulation von Partikeln. Deren Art, Anzahl und Größe sowie die Beschaffenheit des Gelenkraumes, Flüssigkeitsströmung und das Implantat-Design beeinflussen ihre Verteilung und die resultierende pathologische Immunantwort. Die Menge des Abriebs scheint dabei mit dem Grad der aseptischen Lockerung zu korrelieren. Die initiale Antwort auf die Abriebpartikel führt zur Bildung von synovialen Flüssigkeiten, faserförmigen Geweben um das Implantat, Auskleidungsmembranen und zum Aufbau von periprothetischem Granulationsgewebe, was auch als Interface-Membran bezeichnet wird.<sup>1, 21, 25</sup> Diese Veränderungen verhindern die stabile Fixation des Implantates und führen zu einer insuffizienten Osteointegration der Prothese. Die periprothetischen Membranen sind gering durchblutet und bestehen vorwiegend aus Fibroblasten, Makrophagen und vielkernigen Riesenzellen, welche Proteasen, proinflammatorische Mediatoren und Gelatinasen sekretieren, die die periprothetischen Osteolysen und damit die aseptische Lockerung vorantreiben. Polymethylmethacrylat- (PMMA) und Polyethylen-Partikel lösen eine sehr hohe inflammatorische Zytokinantwort aus. Infolgedessen werden osteoklastische und proinflammatorische Zytokine und Matrix-Metalloproteinase sekretiert. Diese führen zur Osteoklastendifferenzierung sowie zur Steigerung der Aktivität der Osteoklasten und dadurch letzten Endes zur Osteolyse.<sup>1, 21</sup> Das Ergebnis ist eine gestörte Balance zwischen der Knochenbildung und der Knochenresorption.<sup>26</sup> Der Prozess der aseptischen Lockerung ist in Abbildung 1 dargestellt.

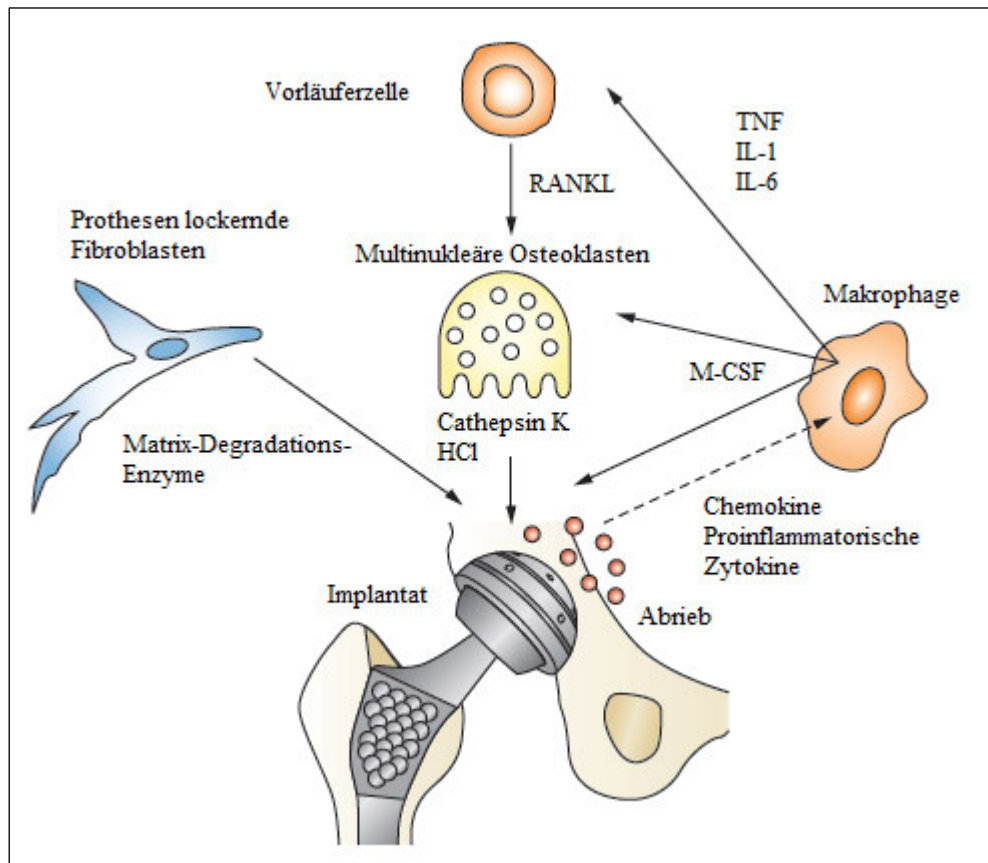


Abbildung 1: Prozess der aseptischen Lockerung, induziert durch Abriebpartikel (modifiziert nach Drees P 2007). M-CSF = macrophage colony stimulating factor, RANKL = Receptor Activator of NF-kappa Ligand, TNF = Tumornekrosefaktor, IL-1 und IL-6 = Interleukin 1 und 6.<sup>1</sup>

### 1.3.4 Osteointegration

Bei der Integration von Implantaten spielen drei Prozesse eine Rolle. Der erste, die Osteoinduktion, entspricht der physiologischen Knochenheilung. Durch Stimulation der Zellmigration und osteoblastären Differenzierung entsteht neuer Knochen aus undifferenzierten mesenchymalen Zellen. Dabei spielen die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) aufgrund ihrer osteoinduktiven Eigenschaften eine bedeutsame Rolle. Im zweiten Prozess, der Osteokonduktion, erfolgt ein Knochenwachstum auf der Oberfläche sowie in Poren eingebrachter Implantate.<sup>27</sup> Der dritte Prozess, die Osteointegration, beschreibt das Vorgehen der Osteoinduktion und Osteokonduktion. Er stellt eine klinisch asymptotische, biologische und dauerstabile Verankerung eines Implantates dar, welche während einer funktionellen Belastung erreicht und aufrechterhalten wird. Morphologisch wird erst dann von einer Osteointegration gesprochen, wenn ein direkter Implantat-Knochen-Kontakt ohne bindegewebige Zwischenschicht besteht.<sup>28</sup>

Die Haltbarkeit des Knochen-Implantat-Interfaces, auf das bei Bewegung die größten Scherkräfte wirken, ist gleichzusetzen mit dem Ausmaß der Osteointegration und abhängig von verschiedenen Faktoren. Diese können durch die Bildung einer bindegewebigen Zwischenschicht die Osteointegration vermindern oder sogar verhindern, was radiologisch an einer Trennschicht zwischen dem Implantat und dem Knochen erkennbar ist.<sup>29, 30</sup> Grundvoraussetzung für die Osteointegration ist eine gute Knochenqualität mit ausreichender Vaskularisation. Das Material und Design der Implantate sind ebenfalls von großer Bedeutung, denn diese bestimmen letztendlich die Implantatoberfläche. Die chemische Zusammensetzung und die physikalischen Eigenschaften des Materials beeinflussen entscheidend die Biokompatibilität.<sup>31, 32</sup> Des Weiteren spielen Faktoren wie die Größe des Operationstraumas und eine adäquate postoperative Belastungseinschränkung eine große Rolle.<sup>29, 30</sup> Bei zementfreien Endoprothesen ist eine maximale Primärstabilität, mit Vermeidung von Relativ- und Mikrobewegungen, essentiell. Das Einschlagen des Implantates in das Knochenbett führt idealerweise zu einer Verklebung der Grenzflächen. Dieses Prinzip der Passgenauigkeit wird als „press-fit-Technik“ bezeichnet und führt zu einem initialen Formschluss unter einer gewissen Druckvorspannung. Diese wird durch funktionelle Anpassungsprozesse des Knochens im Verlauf abgebaut. Nach Anwachsen von Knochen an den Prothesenkörper wird durch die Osteointegration sekundär ein dauerhaft stabiler Sitz des Implantates gewährleistet.<sup>33</sup> Durch die Entwicklung von Prothesen mit poröser Oberflächenstruktur konnte der Knochen-Implantat-Kontakt deutlich gesteigert werden, aber 100 % sind nicht möglich.<sup>30</sup> Eine Verbesserung der Materialien sowie der Geometrie der Kontaktflächen der Implantate führte zu einer Reduktion des mechanischen Stresses auf das Implantat-Knochen-Interface. Die Anzahl der akkumulierenden Abriebpartikel im Knochen-Implantat-Interface konnte somit gesenkt<sup>21, 34</sup> und die Osteointegration verbessert werden.<sup>35</sup> Dennoch gibt es bisher noch keine adäquate alternative Behandlungsmethode zur Revision bei aseptischer Lockerung.<sup>34</sup> Da der Pathomechanismus der aseptischen Lockerung teilweise bekannt ist, wird derzeit intensiv an der Identifizierung von potentiellen Angriffspunkten für pharmazeutische sowie gentherapeutische Behandlungen geforscht.<sup>1</sup> Einige Strategien haben die direkte Beeinflussung der zellulären Prozesse zum Ziel.<sup>21</sup> Einen potentiellen Angriffspunkt stellt die gestörte Balance von osteoblastärer Knochenbildung und osteoklastärer Knochenresorption dar.<sup>36</sup> Eine Interventionsmöglichkeit, neben der Hemmung der Osteoklastendifferenzierung und -aktivität könnte die Verschiebung der Balance zur Seite der Knochenbildung durch Förderung der Osteoblastendifferenzierung und -aktivität mit osteoinduktiven Substanzen sein. So zeigten Thorey *et al.* 2010, dass mit Bone Morphogenetic

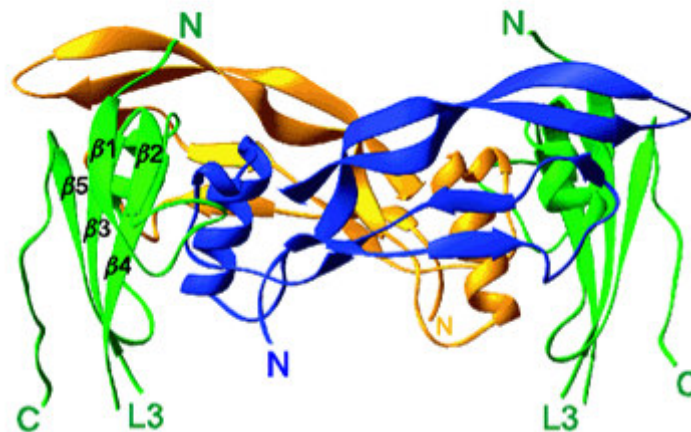
Protein-2 (BMP-2) beschichtete Titanimplantate die Knochenbildung um die Implantate herum stimulieren und somit osteointegrativ wirken können.<sup>35</sup> Eine Erhöhung der Integrität des Knochen-Implantat-Interfaces minimiert zudem die Bewegungen innerhalb des Interfaces und hat eine Reduktion der Migration der akkumulierenden Partikel zur Folge.<sup>21</sup>

### **1.3.5 Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2)**

Die Entdeckung der osteoinduktiven Kapazitäten von demineralisierter Knochenmatrix und die nachfolgende Identifizierung der BMPs gelang Marshall Urist 1965.<sup>37</sup> Aufgrund ihrer Struktur wurden die Wachstumsfaktoren BMP 2-9 zur Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) Superfamilie zugeordnet. Sie kommen vorwiegend in der Knochenmatrix sowie im Lungen-, Milz- und Kolongewebe vor.<sup>38, 39</sup> Der Fortschritt in der Proteinisolierung und im Bereich der molekularen Klon-Techniken ermöglichte später die Isolierung dieser löslichen Wachstumsfaktoren und deren Herstellung.<sup>40, 41</sup>

BMPs sind pleiotrope Morphogene, die an der Regulation vielfältiger Effekte wie der Proliferation, der Differenzierung und der Migration von Zellen sowie der Stimulation der extrazellulären Matrixsynthese über einen Konzentrationsgradienten beteiligt sind. Sie spielen eine Schlüsselrolle in der Hämatopoese und beeinflussen die Apoptose.<sup>42, 43</sup> Eine zentrale Rolle kommt ihnen im Verlauf der enchondralen Osteogenese zu und als chemotaktischer Botenstoff für mesenchymale Stammzellen aus dem Markraum. Diese differenzieren im Verlauf der Frakturheilung zu Chondrozyten und Osteoblasten.<sup>44, 45, 46</sup> Besonders das BMP-2 besitzt eine hohe osteoinduktive Signalwirkung und ist an der Regulation einer Reihe von Signalwegen sowie der Proliferation und Differenzierung der mesenchymalen Vorläuferzellen zu Osteoblasten beteiligt.<sup>47, 48, 49, 50</sup> Die nachfolgende Abbildung 2 zeigt das Disulfid-verbrückte Homodimer BMP-2.





**Abbildung 2:** Die Struktur des BMP-2-BRIA ectodomain complex. Zwei BMP-2-Monomere (gelb und blau) sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. An die Epitope dieses Dimers werden zwei BMP-Rezeptor-IA-Ketten (BRIAec) (grün), Typ I der extrazellulären Domänen des transmembranösen Rezeptors Serin/Threonin-Kinase-Komplexes, gebunden und bilden somit den BMP-2-BRIA ectodomain complex. Durch zusätzlich Bindung von BMP-Rezeptor-Ketten vom Typ II wird die BMP-2-Signalkaskade aktiviert.<sup>51</sup>

1999 wurde erstmals rekombinantes BMP-2-Protein in einem Frakturmodell eingesetzt und führte nach intravenöser Injektion durch Stimulation der Knochen- und Knorpelbildung zu einer beschleunigten Kallusbildung.<sup>52</sup> Dies wurde in diversen Tierversuchsmodellen mit verschiedenen BMPs und Applikationsmethoden bestätigt.<sup>53-58</sup>

Der erste klinische Einsatz erfolgte zur Förderung der Knochenheilung von Tibiadefekten nach Osteotomie und Tibia-Pseudarthrosen durch das rekombinante BMP-7 (auch osteogenic protein-1 oder OP-1 genannt). Dies wurde der erste auf dem US-Markt als Medikament zugelassene Wachstumsfaktor zur Behandlung von Pseudarthrosen langer Röhrenknochen.<sup>59</sup> Nachfolgend konnte durch den Einsatz von BMP-2, gekoppelt an eine adsorbierbare Kollagenschwamm-Matrix, im Rahmen der BESTT-Studie (BMP-2 Evaluation in Surgery for Tibial Trauma) die Rate an Sekundärintervention um 44 % reduziert werden. Eine bessere Wund- und Frakturheilung sowie eine geringere Infektionsrate wurden gezeigt.<sup>60</sup>

Trotz der Erfolge und guten Zukunftsaussichten für BMP-Applikationen<sup>59-61</sup> konnte bisher kein ideales Carrier-System identifiziert werden. Ihre Anwendbarkeit ist durch Applikationsprobleme eingeschränkt.<sup>46, 62-63</sup> Aufgrund der kurzen biologischen Halbwertszeiten in vivo und der inhärenten Instabilität werden supraphysiologische Dosen von BMP verwendet.<sup>63-66</sup>

Aus diesem Grund wurde an der Entwicklung anhaltender und kontrollierter Release-Technologien, einschließlich implantierbarer Biomaterialien und biodegradierbarer Oberflächen geforscht.<sup>67</sup> Die „controlled release“-Ansätze bieten eine praktikable Lösung zur lokalen oder

systemischen Applikation von Wachstumsfaktoren in Proteinform, die die Knochenheilung unterstützen.<sup>68-72</sup> 2000 entwickelten Schmidmaier *et al.* Poly-(D,L-Laktid)-beschichtete Osteosynthesematerialien<sup>71</sup>, die gleichzeitig der Stabilisierung des traumatisierten Knochens und als lokaler Wirkstoffträger zur Applikation von Wachstumsfaktor-Proteinen dienen. Durch die Applikation von BMP-2 über dieses System wurde eine verbesserte und beschleunigte Knochenheilung ohne Verlust der Implantatstabilität erreicht.<sup>54-55, 73-74</sup> Trotz dieser Erfolge der „controlled release“-Ansätze waren hohe Dosen der Wachstumsfaktoren erforderlich.<sup>65</sup>

Bei hohen Applikationsdosen gibt es Bedenken hinsichtlich der Langzeitsicherheit, da sie zu einer systemischen Exposition und damit zu potentiellen Nebenwirkungen führen können.<sup>46, 60, 75-76</sup> Die Food and Drug Administration (FDA) veröffentlichte 2012 einen Artikel zu unerwünschten Wirkungen nach der Applikation von rekombinantem humanen BMP-2 im Rahmen von orthopädischen Eingriffen, basierend auf den Berichten an die Datenbank der FDA. Am häufigsten wurde über Wundinfektionen, Wundheilungsstörungen, heterotrope Knochenbildung, Pseudarthrosenbildung und lokale Inflammationsreaktionen berichtet. Allerdings traten die meisten dieser Komplikationen nach off-label use der BMP-2-Proteine auf.<sup>77</sup> Des Weiteren wurden nach lokaler Applikation hoher BMP-2-Dosen diffuse Weichteilschwellungen, inflammatorische Infiltrate und die Bildung von strukturell abnormem, zystenartigen und potentiell instabilen Knochengewebe<sup>78-79</sup> sowie ektopische Knochenbildungen beschrieben.<sup>76-78, 80</sup> Zudem ist die Herstellung rekombinanter Wachstumsfaktor-Proteine sowohl aufwändig als auch kostenintensiv und die Lagerungsmöglichkeiten sind schwierig und daher begrenzt.<sup>46, 81</sup> Aus den genannten Gründen wird sowohl an der Optimierung der Proteindosierung und -applikation als auch an gentherapeutischen Ansätzen geforscht.

### 1.3.6 Gentherapie

Sowohl die virale als auch die non-virale lokale Gentherapie von BMP-2-Plasmiden stellen eine vielversprechende Alternative zur Applikation von rekombinantem BMP-2 mit einer anhaltenden BMP-Expression im Zielgebiet *in vivo* dar.<sup>82-83</sup> Sie haben das Potential, Applikationsprobleme wie die kurze biologische Halbwertszeit und die supraphysiologischen Dosen der BMPs sowie die potentiellen Nebenwirkungen, die mit der Verwendung der rekombinanten Proteine verbunden sind, zu überwinden.<sup>84</sup>

Mit dem Abschluss der Sequenzierung des humanen Genoms hat eine neue Ära der humanen Medizin begonnen<sup>85</sup>, und die Gentherapie ist eine neue Form der molekularen Medizin

geworden, die einen enorm wichtigen Einfluss auf die menschliche Gesundheit im neuen Jahrtausend haben könnte. In den letzten Jahren haben sich die Gentherapietechniken zu einer potentiellen, alternativen Behandlungsmethode verschiedener genetischer und erworbener Erkrankungen entwickelt.

Traditionell wurde die Gentherapie als Behandlungsmodalität für angeborene genetisch bedingte Erkrankungen und eine limitierte Anzahl komplexer lebensbedrohlicher Erkrankungen gesehen.<sup>86</sup>

Die erste anerkannte regelrechte Gentherapie an Patienten erfolgte bereits 1990 durch Blaese *et al.* Zwei Schwestern mit genetisch bedingtem schweren kombinierten Immundefekt (SCID) durch Adenosin-Desaminase (ADA)-Mangel in B- und T-Lymphozyten wurden mittels retroviral-vermitteltem *ex vivo* Gentransfer eines ADA-Genes in selektiv entnommene T-Lymphozyten erfolgreich behandelt.<sup>87</sup>

Diese Anwendungsgebiete wurden allerdings durch eine geringe Effektivität und ethische Bedenken eingeschränkt.<sup>88</sup> Mittlerweile ist ein anderes Ziel in den Mittelpunkt der Gentherapieforschung gerückt. Die Gentherapie konzentriert sich nicht länger allein auf den Ersatz von defekten Genen. Durch den Transfer von spezifischen Genen, welche therapeutische Proteine kodieren, kann die Zellfunktion so moduliert werden, dass die Zelle Proteine synthetisiert, die sie normalerweise nicht oder nur in geringen Mengen produzieren würde.<sup>89</sup>

Die gewünschte genetische Information wird in Form von nackter Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder als Plasmid, gekoppelt an Vektoren, zu den Zielzellen transferiert. Wird dabei ein viraler Vektor verwendet, so spricht man von Transduktion, bei Einsatz eines non-viralen Vektors handelt es sich um eine Transfektion. *In vivo* wird dann durch die Transduktion oder Transfektion im Zielgebiet die „natürliche“ Produktion von Proteinen ausgelöst.<sup>90</sup> Im Idealfall resultiert daraus eine konstante lokale Überexpression der endogen synthetisierten Proteine, welche zeitlich auf Tage bis Monate begrenzt ist.<sup>91-92</sup> Somit kann beispielsweise durch die Applikation der genetischen Information eines Wachstumsfaktors lokal eine prolongierte Expression mit hoher Konzentration erreicht werden.<sup>89</sup> Die Gensequenzen der Wachstumsfaktoren sind seit Jahren bekannt. Die Herstellung der Wachstumsfaktor-Plasmide ist einfach und kostengünstig.<sup>81</sup>

Der erste Einsatz der Gentransfer-Methode zur Förderung der Knochenneubildung gelang Fang *et al.* 1996 mit der Implantation einer Kollagenmatrix in Kombination mit nackter Plasmid-DNA, die für BMP-4 und Parathyroidhormon kodierte.<sup>93</sup> Diesem Meilenstein folgte eine

intensive Forschung zur Applikation von Wachstumsfaktoren durch viralen und non-viralen Gentransfer. In der letzten Dekade zeigte die lokale Applikation von Wachstumsfaktor-Genen einige vielversprechende Ergebnisse.<sup>83, 94-95</sup>

Damit besitzt die Gentherapie das Potential, die medizinische Behandlung einer Vielzahl von muskuloskelettalen Erkrankungen zu revolutionieren sowie bestehende orthopädisch-chirurgische Therapien zu erweitern und zu verbessern.<sup>90, 96-97</sup>

Grundsätzlich gibt es zwei Methoden für den Gentransfer von komplementärer DNA (cDNA), den direkten *in vivo* und den indirekten *ex vivo* Gentransfer. Anfangs wurde überwiegend die *ex vivo* Gentransfermethode verwendet. Nach Entnahme der gewünschten spezifischen Zellen wurden diese außerhalb des Körpers transduziert und anschließend in das Zielgebiet reimplantiert. Dies ist eine komplexe, sehr kostenintensive Methode. *In vivo* Methoden bieten kostengünstigere, einfachere, schnellere und weniger invasive Modalitäten. Dabei wird der Vektor systemisch oder lokal appliziert, und die Transduktion oder Transfektion der Zellen erfolgt *in vivo*. Die Schwierigkeit liegt hier beim Erreichen einer ausreichend hohen Transduktions- bzw. Transfektionseffizienz sowie im Targeting spezifischer Zielzellen.<sup>46, 86, 98</sup>

Die systemische Applikationsmethode ist häufig mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden.<sup>90</sup> Die Wahl der Gentransfermethode ist von diversen Bedingungen abhängig, wie dem zu übertragenden Gen, dem verwendeten Vektor und der zu behandelnden Erkrankung.<sup>99</sup>

Der experimentelle Fortschritt auf diesem Gebiet ist durch Faktoren wie die Komplexität der Vektorauswahl und -herstellung, die Gentransfertechnik, den Applikationsweg sowie den strukturellen und funktionellen Nachweis gekennzeichnet.<sup>97</sup> Neue Vektoren mit geringerer Immunogenität und verbesserter Steuerbarkeit sowie einer erhöhten Transfersicherheit wurden entwickelt.<sup>96</sup> Dennoch sind weitere Studien erforderlich, um die Sicherheit und Effektivität dieser Techniken weiter zu entwickeln. Der Fokus der Forschung liegt dabei auf dem Applikationsweg.

Ein sehr vielversprechendes Konzept, welches die Methoden der Gentherapie zur Geweberegeneration mit einem anhaltenden Release-Konzept verbindet und zusätzlich das Wachstum der Zielzellen mit einer Matrix unterstützt, ist das Konzept der „genaktivierten Matrix“ (GAM). Es wurde 1996 entwickelt und geht auf Fang und Bonadio *et al.* zurück.<sup>81, 93, 100</sup> Eine GAM besteht aus einem biodegradierbaren Implantat, in welches nackte DNA oder Plasmid-Vektor-Komplexe eingearbeitet wurden. Nach Platzierung im Gewebe ermöglicht sie eine kontinuierliche Freisetzung von Plasmid-DNA. Zellen, die auf dieser Matrix oder in sie

hinein wachsen, nehmen die DNA-Plasmide auf und werden durch sie transfiziert oder transduziert, was im Idealfall zur Induktion der gewünschten Genexpression führt.<sup>67, 100</sup> Dies resultiert dann in einer lokalen auto- oder parakrinen Stimulation des gezielten Differenzierungsprozesses.<sup>67</sup> Dabei regulieren die Oberfläche des Biomaterials, der verwendete Vektor und die DNA-Dosis sowohl das Ausmaß als auch die Dauer der transgenen Expression.<sup>101</sup>

Im Bereich des Tissue Engineering ist der Gentransfer mit Hilfe von Biomaterialien zu einem erfolgversprechenden Werkzeug geworden. Beispiele sind GAMs basierend auf Plasmid-DNA und Polymeren<sup>81, 93</sup>, Alginat-Gel<sup>102</sup> oder Chitosan-Gelatingel<sup>103</sup> und GAMs basierend auf Kollagen und Polyethylenimin-(PEI)-DNA-Polyplexen<sup>104</sup>, sowie Fibrin, Copolymer-Protected Gene Vectors (COPROGs) und BMP-2-Plasmiden.<sup>67</sup> Dennoch gilt es, durch eine gezieltere, effektivere Gentherapie die Effizienz und Sicherheit dieser non-viralen Strategie noch zu steigern.

### **1.3.7 Die physiologischen Barrieren der Gentherapie**

Es sind zwei Gruppen von physiologischen Barrieren bekannt, die extra- und die intrazellulären, die bei jeder in vivo Gentherapie-Methode zu Problemen während des Gentransfers führen können.

Nach seiner Applikation wird jeder Vektor im Extrazellularraum mit den extrazellulären Barrieren konfrontiert. Zirkulierende Serumproteasen und -nukleasen können die Vektoren inaktivieren und aus dem Blutstrom eliminieren. Die Opsonierung durch Blutproteine kann konsekutiv zur Destruktion von DNA-Sequenzen führen. Bei Reapplikation eines viralen Vektors besteht zudem die Gefahr der direkten Neutralisation durch zirkulierende Antikörper mit Aktivierung des Komplementsystems. Für non-virale Vektoren stellt die extrazelluläre Matrix mit ihrer hohen Konzentration polyanionischer Moleküle ein Hindernis dar. Ihre negative Ladung kann zur Dissoziation der Vektoren führen.<sup>101, 105-106</sup> Des Weiteren können darin enthaltene polyanionische Glycosaminoglycane negativ geladene DNA-Komplexe binden und damit deren Aufnahme oder intrazellulären Transport beeinflussen. Dadurch kann die Transfektionsfähigkeit der Komplexe modifiziert werden.<sup>107</sup>

Das zweite Problem ist der intrazelluläre Gentransfer. Bei dem Transport eines Vektors in die Zelle und zum Nucleus muss dieser verschiedene Grenzschichten überwinden. Die erste Barriere wird durch die Zellmembran gebildet. Sie kann durch Endozytose oder Membranfusion penetriert werden, was als Internalisierung bezeichnet wird. Danach ist der Vektor in ein

Endosom inkorporiert. Die Fusion von Endosom und Lysosom durch lysosomale Enzyme kann zur Dekomposition des Vektors führen, was die nachfolgende Expression vermindert. Daher ist eine schnelle Liberation des genetischen Materials ins Zytoplasma erforderlich, was für non-virale Vektoren problematisch ist. Virale Vektoren hingegen besitzen Mechanismen, das genetische Material aus dem Endosom direkt freizusetzen. Im Zytoplasma sind die non-viralen Vektoren den Nukleasen ausgesetzt, und die Degradation unkomplexierter DNA erfolgt sehr schnell.<sup>101, 108-109</sup> Beispielsweise beträgt die Halbwertszeit einer Plasmid-DNA nach Mikroinjektion ins Zytoplasma lediglich 50-90 Minuten.<sup>110</sup> Die Überwindung der letzten Grenzschicht, die Permeation exogener DNA in den Nucleus, erfolgt aktiv oder passiv über einen Nuclear Pore Complex, in Abhängigkeit von der Molekülgröße.<sup>101, 105-106, 111</sup>

Abbildung 3 zeigt den Transfektionsprozess und die physiologischen Barrieren.

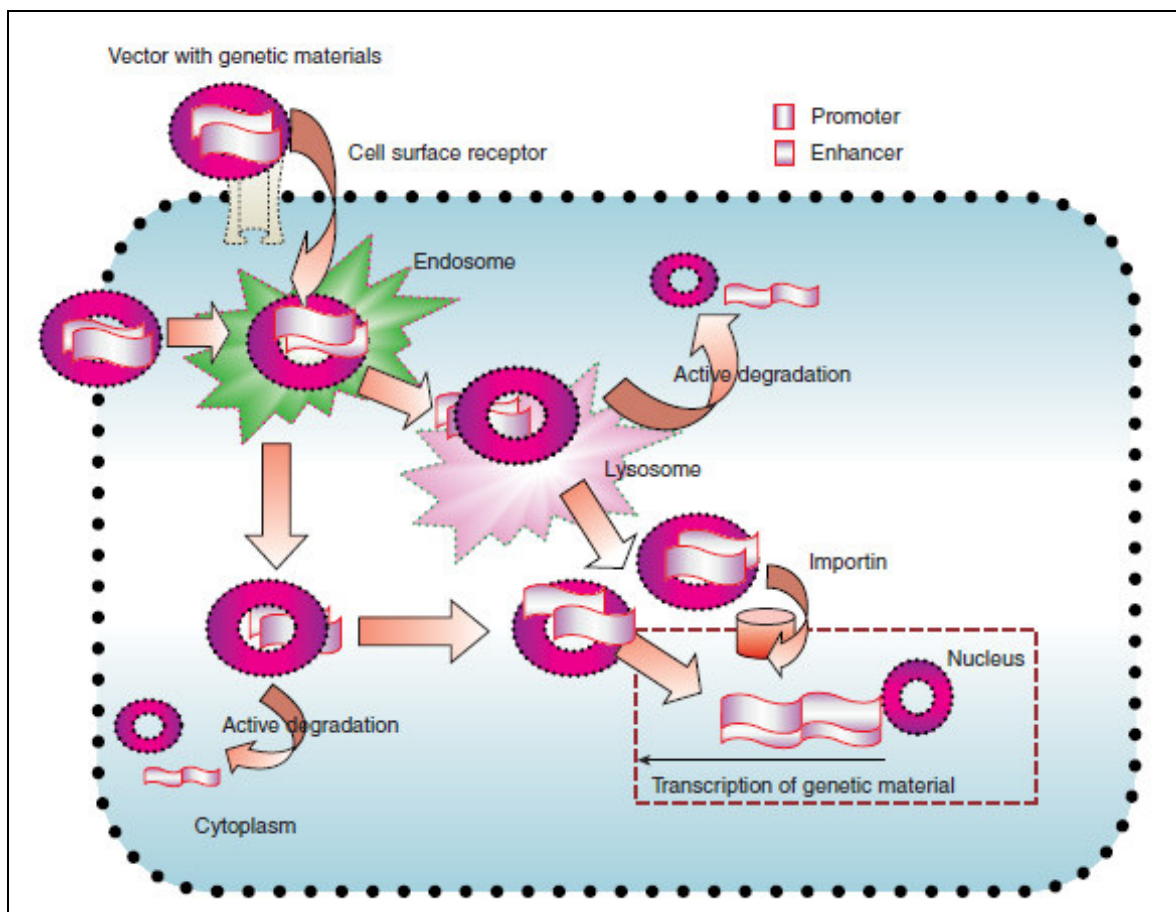


Abbildung 3: Transfektionsprozess (modifiziert nach Tan *et al.* 2005). Durch Endozytose oder Membranfusion penetriert der Vektor mit dem genetischen Material die Zellmembran und ist nachfolgend in ein Endosom inkorporiert. Nach Fusion mit einem Lysosom ist zur Verhinderung der Dekomposition des Vektors durch lysosomale Enzyme eine schnelle Liberation ins Zytoplasma erforderlich, wo die Degradation durch Nukleasen droht. Als letztes erfolgt die Permeation in den Nucleus passiv oder aktiv über Nuclear Pore Complex in der Kernmembran zur Transkription des therapeutischen Gens.<sup>85</sup>

Der Erfolg der Gentherapie ist letztendlich erheblich von der Entwicklung eines Vektors abhängig, der selektiv und effizient Gene auf verschiedene Zielzellen übertragen und diese Hürden überwinden kann, ohne toxische, inflammatorische oder immunogenetische Wirkungen nach sich zu ziehen. Die Kenntnis der extra- und intrazellulären Barrieren schafft Möglichkeiten zur Entwicklung von neuartigen non-viralen Vektoren, die Interaktionen mit dem extrazellulären Milieu zeigen, während sie mit spezifischen intrazellulären Prozessen zurechtkommen.<sup>101</sup>

### 1.3.8 Vektoren

Vektoren werden benötigt, um genetisches Material auf Zellen zu übertragen. Die Möglichkeit des Transfers und der Expression von Genen, die für spezifische Moleküle kodieren, ist abhängig von der Verfügbarkeit und Effektivität dieser Gentransfer-Vektoren.<sup>99</sup> Sie können generell in zwei Gruppen unterteilt werden, die viralen und die non-viralen Vektoren.<sup>86</sup>

Die Mehrheit der Gentherapie-Experimente bevorzugte bisher virale Vektoren aufgrund ihrer Bindungsspezifität, der natürlichen Fähigkeit, effizient Zellen zu infizieren und Nukleinsäuren in spezifische Zelltypen zu transferieren sowie aufgrund ihrer Zellinteraktion.<sup>99, 107, 112</sup> Am häufigsten werden Adenoviren, adenoassoziierte Viren, Herpes simplex-Viren und Retroviren verwendet. Allerdings ist ihre humane Anwendung aufgrund der Induktion immunologischer Antworten, ihrer Toxizität und der potentiellen Onkogenität *in vivo* weiterhin bedenklich. Zudem ist die Produktion in biologischen Systemen aufwendig und teuer.<sup>90, 113</sup>

Dies macht die non-viralen Vektoren zu einer attraktiven Alternative. Ihre Herstellung in großen Mengen ist einfacher und technisch weniger aufwendig. Sie sind einfach zu manipulieren und stabil während ihrer Lagerung.<sup>88, 98, 105</sup> Zudem sind sie sicherer und lediglich mit einer minimalen unspezifischen Immunogenität verbunden, was eine wiederholte Applikation ermöglicht. Es besteht keine Pathogenität, da keine viralen Proteine erforderlich sind. Die Gefahr einer Mutation des Genoms der Zielzelle ist ausgeschlossen.<sup>90</sup>

Die einfachste und sicherste non-virale Methode ist der direkte Gentransfer von nackter Plasmid-DNA. Aber gleichzeitig wird damit die geringste Transfektionseffizienz erreicht.<sup>90, 105</sup> Dies gründet sich auf eine erschwerte Zellpenetration durch die Molekülgröße und die elektrische Ladung der Plasmid-DNA<sup>112</sup> sowie ihre Instabilität, die zu einer rapiden Degeneration durch zytosolische Nukleasen führt.<sup>110</sup> Durch Biolistics, also das Beschießen der Zellmembran mit DNA-Mikroprojektilen mittels spezieller Gene-Guns<sup>90</sup>, sowie Elektroporation, also den Transfer der Plasmid-DNA mit Hilfe eines kurzen elektrischen Impulses, kann die Zellmembran direkt

penetriert werden. Endo- und Lysosomen werden umgangen, und die enzymatische Degradation kann vermieden werden.<sup>105</sup> Dies ist allerdings technisch schwierig umsetzbar.<sup>101</sup>

Eine weitere Form non-viraler Vektoren sind Liposomen, mikroskopische Vesikel aus einer Phospholipiddoppelschicht analog einer Zellmembran. Durch ihre Verschmelzung mit den Zielzellen gelingt die Internalisierung des genetischen Materials ohne große Probleme. Sie sind nicht zytotoxisch, weisen Stabilität auf und können mit Zellmembranen interagieren.<sup>112</sup> Die Verwendung dieser Methode in Kombination mit dem rezeptorvermittelten Gentransfer ist einfach, aber ihre Transfektionseffizienz relativ gering.<sup>90</sup>

Am häufigsten werden kationische Lipide und Polymere verwendet. Durch die Bildung elektrostatischer Komplexe mit der Plasmid-DNA<sup>107</sup> und deren Kondensation bieten sie Schutz vor der enzymatischen Degradation durch Nukleasen. Sie unterstützen die Internalisierung sowie den intrazellulären Transport und dienen in vivo als Depot-System. Dies ermöglicht die Freisetzung der DNA über eine bestimmte Zeit.<sup>101, 105</sup> Durch ihre extrem positive Ladung bestehen starke Interaktionen mit Proteinen des Blutes, Erythrozyten und der extrazellulären Matrix. Daraus können ein unkoordiniertes Vektor-Targeting, Komplementaktivierung, Vektorinaktivierung sowie die Clearance des Vektors resultieren.<sup>106</sup> Zudem wird die Verwendung der Lipoplexe durch die Zellaufnahme und der Polyplexe durch den Kern-Import limitiert.<sup>101</sup>

Durch Modifikationen mit funktionellen Gruppen und PEG-Gruppen sowie Rezeptorliganden konnte ein Teil der physiologischen Barrieren des Gentransfers überwunden und die non-viralen Vektoren optimiert werden.<sup>101</sup> Jedoch ist ihre Transfektionseffizienz mit weniger als 2 % im Vergleich zu beispielsweise adenoviralen Vektoren (90 %) und retroviralen Vektoren (44 %) deutlich geringer.<sup>113</sup>

Aufgrund ihrer zahlreichen Vorteile, insbesondere des Sicherheitsaspektes und der einfachen Handhabung, gibt es dennoch weitere Bemühungen zur Verbesserung der non-viralen Vektoren. Die neuartigen und im vorliegenden Versuch verwendeten Copolymer-Protected Gene Vectors sind eine Weiterentwicklung und Optimierung der beschriebenen non-viralen Gentransfermethoden. Die essentiellen Eigenschaften non-viraler Vektoren wie Partikelgröße, Ladung, Empfindlichkeit gegenüber Opsonierung und Toxizität konnten mit der Hilfe von COPROGs kontrolliert, die physiologischen Barrieren des Gentransfers überwunden und die Transfektionseffizienz erhöht werden.<sup>67, 106</sup> Damit stellen sie eine vielversprechende Alternative zu den bekannten non-viralen Vektoren dar.



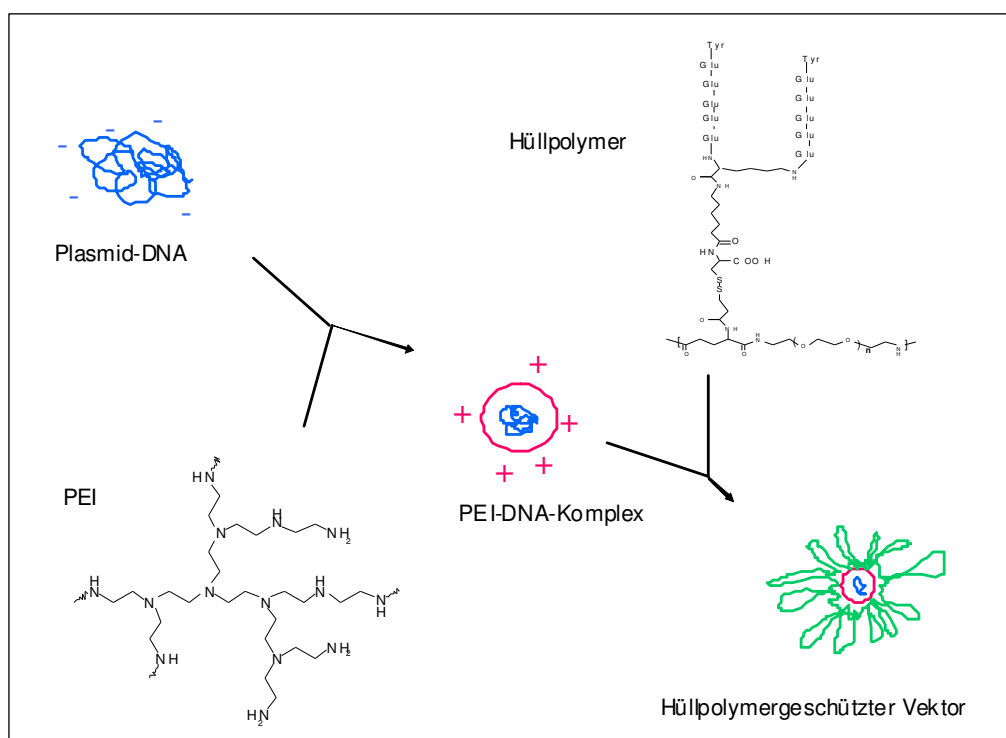
### 1.3.9 Copolymer-Protected Gene Vectors (COPROGs)

Die Copolymer-Protected Gene Vectors wurden 2000 von einer Arbeitsgruppe um Prof. Dr. C. Plank und Prof. Dr. A. Stemberger an der Technischen Universität (TU) München zur lokalen und kontrollierten Transfektion Wachstumsfaktoren-kodierender Plasmide entwickelt.<sup>67, 106</sup> Sie bestehen aus Polykation-DNA-Nanopartikel und einem neuen anionischen Peptid-PEG-Copolymer, dem Protective Copolymer (PROCOP) P6YE5C. Dieses ist in der Lage, die physiologischen extrazellulären Barrieren der Gentherapie zu umgehen. PROCOPs werden aus Polyethylenglykol 6000 (PEG) und reaktiven Verbindungen synthetisiert, die nach Polymerisation mit anionischen Peptiden derivatisiert werden.<sup>67, 106</sup> Die anionischen, protektiven Copolymerderivate werden verwendet, um positiv geladene non-virale Vektoren durch elektrostatische Interaktion zu ummanteln. Der Copolymer-Mantel gewährleistet während der extrazellulären Einschleusungsphase den Polyelektrolyt-Kolloiden der DNA und den Polykationen eine sterische Stabilität in ihrer kleinsten Größe und verhindert die Albumin-induzierte Salz- und Serum-Aggregation. Des Weiteren werden die Aktivierung des Komplementsystems, die Opsonierung sowie die Interaktionen mit Serumproteinen verhindert. Zusätzlich ermöglicht die elektrostatische Begrenzungsschicht die Lyophilisation des Vektors mit nur geringem Aktivitätsverlust.<sup>67</sup>

Zur Überwindung der intrazellulären Barrieren der Gentherapie ist die PEI-DNA erforderlich. Hierzu wird die negativ geladene Plasmid-DNA mit Polyethylenimin (PEI) formuliert. Dies führt zu einer Kompaktierung der DNA – ein natürlicher Prozess, der auch in Viren und eukaryontischen Zellen vorkommt. Eine Verwendung von natürlich vorkommenden Polykationen, wie Protamin oder Histonen, in molekularen Konjugaten ist nicht möglich, da sie schlecht extrahierbar sind und die Gefahr einer Fremdkörperreaktion bestünde.<sup>114</sup> Synthetische Polykationen wie das PEI sind hingegen in gebundener Form nicht toxisch, immunologisch unbedenklich sowie in großen Mengen kostengünstig und einfach herstellbar. Durch die nach außen hin positive Ladung werden die kompaktierten PEI-DNA Moleküle an die negativ geladene Zellmembran angezogen. Die Endozytose erfolgt durch den Kontakt der PEI-DNA mit den Zelloberflächenproteinen. Hierdurch gelingt die Inkorporation des Vektors in die Zelle. Intrazellulär ist die DNA durch die Kompaktierung stabiler und vor Nukleasen geschützt.<sup>106, 115</sup> PEI hat endosomolytische Fähigkeiten, um die DNA-Komplexe aus den Endosomen zu befreien. Durch Protonierung von Aminostickstoff entsteht pH-unabhängig eine Art „Protonenschwamm“. Die Erhöhung der Protonenlast hat einen passiven Einstrom von Chlorid zur Folge. Da dies nur

zu Lasten einer osmotischen Imbalance erfolgen kann, kommt es konsekutiv zum Platzen des Endosomens und zur Freisetzung der DNA.<sup>116-117</sup>

Zur Herstellung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten hüllpolymergeschützten Vektoren (COPROGs) wurden Plasmid-DNA, kodierend für das Reporter-gen Luciferase, und PEI miteinander gemischt. Die entstandenen stark positiv geladenen PEI-DNA-Komplexe wurden mit dem neuartigen, negativ geladenen, protektiven Copolymer (PROCOP) P6YE5C inkubiert. Dies resultierte in der Bildung eines Mantels aus PEG-Loops um den cDNA-Polyplex-Kern herum – dem sogenannten Copolymer-Protected Gene Vector. Der Herstellungsprozess ist in Abbildung 4 dargestellt.<sup>106</sup>



**Abbildung 4: Copolymer-Protected Gene Vectors (modifiziert nach Finsinger *et al.* 2000). Plasmid-DNA und PEI werden komplexiert. Die resultierenden PEI-DNA-Komplexe werden von Hüllpolymeren (PROCOPs) ummantelt, und es entstehen hüllpolymergeschützte Vektoren (COPROGs).<sup>106</sup>**

### 1.3.10 Luciferase-Plasmid

Das Reporter-gen Luciferase kodiert für ein Biolumineszenz-Enzym und ist ein sehr nützliches Werkzeug zur Determinierung der Effizienz der Transfektion von Plasmid-DNA und des Gentransfers *in vivo*.<sup>118</sup>

In zahlreichen Studien zum Gentransfer von Wachstumsfaktoren wurden Luciferase-Plasmide als Reporter-gen eingesetzt. Schließlich wäre es aufgrund der Homologie zwischen den exogenen,

lokal induzierten Wachstumsfaktoren und den endogenen, auf physiologischem Wege produzierten Wachstumsfaktoren, nicht möglich, zwischen beiden Formen zu unterscheiden. So bietet das Luciferase-Plasmid die Möglichkeit, die Transfektion im Körper nachzuvollziehen.

### 1.3.11 Fibrinkleber

Fibrinkleber findet in der modernen operativen Medizin schon seit Jahren breite Anwendung. Er ist ein biodegradierbares komplexes Plasmaprodukt<sup>119-120</sup>, welches aus zwei Komponenten besteht. Die Fibrinkomponente enthält Fibrinogen, Plasma-Fibronectin, Faktor XIII, Plasminogen, Aprotinin und humanes Albumin. Die Thrombinkomponente setzt sich aus Thrombin und Calciumchlorid zusammen.<sup>121</sup> Mittlerweile wird nur noch humanes Thrombin verwendet, wodurch allergische Reaktionen und die Übertragung infektiöser Agentien vom Tier auf den Menschen ausgeschlossen sind. Es ist nicht toxisch und induziert weder Inflammation, Fremdkörperreaktionen noch Gewebsnekrosen oder ausgedehnte Fibrosen.<sup>119, 122</sup>

Die positiven Eigenschaften des Fibrinklebers haben den breiten Einsatz in der Chirurgie und Orthopädie in den letzten zwei Dekaden ermöglicht und geprägt.<sup>119, 122</sup> Er findet unter anderem regelmäßig Anwendung zur Abdichtung oder zum Verschluss von Geweben wie dem Hautverschluss. Durch Nachahmung der letzten Stufe der Gerinnungskaskade kann er intraoperativ effektiv zur Blutstillung eingesetzt werden.<sup>119, 120, 122</sup> Die postoperative Wundheilung wird durch die hohe Konzentration an Wachstumsfaktoren in Thrombozyten, die nach ihrer Aktivierung mit Thrombin freigesetzt werden, sowie durch die stimulierende Wirkung von Thrombin und Faktor XIII von Fibrinkleber gefördert. Dabei kommt es zur Bildung von Granulationsgewebe, zu einer gesteigerten Kollagenproduktion und Angiogenese sowie zur Stimulation der Fibroblastenproliferation und extrazellulären Matrixsynthese.<sup>119, 123</sup>

Aufgrund der nachgewiesenen guten Biokompatibilität, Biodegradierbarkeit und Zellbindungskapazität ist der Fibrinkleber ein geeignetes biologisches Trägermaterial für die Transplantation von Zellen.<sup>119, 122</sup> Im Tissue-Engineering-Bereich avancierte er zu einem interessanten Arzneimittel- und Zelltransfersystem für verschiedene Applikationsmethoden. Er wurde als geeignetes Hilfsmittel zur Platzierung und Sicherung von biologischen Implantaten sowie als ideales natürliches Reservoir zur Bindung und Abgabe verschiedener Wachstumsfaktoren erkannt.<sup>67, 72, 124-125</sup> Zudem besitzt der Fibrinkleber potentielle osteoinduktive Eigenschaften, beeinflusst aber nicht die osteoinduktiven Eigenschaften der BMPs oder anderer Wachstumsfaktoren, sondern wirkt synergistisch.<sup>126-127</sup>

## 1.4 Ziele der Arbeit

Versuche der Arbeitsgruppen um Prof. Dr. C. Plank und Prof. Dr. A. Stemberger an der TU München haben gezeigt, dass das neu entwickelte non-virale Vektorsystem COPROGs in Kombination mit Fibrinkleber als Trägermaterial zum effektiven non-viralen Gentransfer einer Plasmid-DNA in den Knochen geeignet ist.<sup>67, 106, 128-130</sup>

Ziel der eigenen Arbeitsgruppe war es nun, die Wirksamkeit und Sicherheit dieses neuartigen, non-viralen Vektorsystems COPROGs zur Applikation eines BMP-2-Plasmids mittels Fibrinkleber als Trägermaterial auf die Osteointegration eines Implantates am Kaninchenmodell biomechanisch, histomorphometrisch und molekularbiologisch zu untersuchen.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist dabei ausschließlich der molekularbiologische Teil, um die Effizienz und Sicherheit des Systems zu testen. Hierzu wurde statt des BMP-2-Plasmids als Reportergen ein Luciferase-Plasmid verwendet. Dieses wurde zusammen mit den COPROGs und Fibrinkleber als Trägermaterial lokal intramedullär appliziert und anschließend ein Titanelastischer Nagel (TEN) in die rechte und linke Tibia der Versuchstiere eingebracht. Nach einer definierten Standzeit erfolgten die molekularbiologischen Analysen mittels konventioneller PCR und quantitativer Real-Time-PCR.

Ausgehend von der Hypothese, dass es durch den non-viralen Gentransfer eines Luciferase-Plasmids unter der Verwendung von COPROGs zu einer lokal nachweisbaren Genexpression im Applikationsgebiet kommt, wurden Proben des Applikationsgebietes der Versuchstiere zur Bestimmung der Transfektionseffizienz molekularbiologisch untersucht.

Als weitere Hypothese für diese Arbeit wurde angenommen, dass es nach lokaler Applikation eines Luciferase-Plasmids unter der Verwendung von COPROGs zu keiner nachweisbaren systemischen Genexpression kommt. Um dies zu überprüfen, wurden verschiedene applikationsferne Organe und Gewebe molekularbiologisch untersucht.

## 2 Methodik

Alle verwendeten Materialien sind im Kapitel 5.5 gelistet.

### 2.1 Tiermodell

Als Versuchstiere dienten 70 ca. acht Monate alte, durchschnittlich 3-4 Kilogramm schwere, männliche New Zealand White Rabbits (Harlan Winkelmann, Borcheln). Alle Tiere erhielten vom Züchter zur Markierung eine Nummer, welche am Ohr angebracht wurde und im weiteren Versuchsablauf als Kennzeichnung diente.

Zur Gewöhnung an die neue räumliche Umgebung und das Pflegepersonal sowie den künstlichen zweimal 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus standen die Kaninchen vor der Operation sieben Tage in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité. Sie wurden einzeln, in Käfigen aus Kunststoff, bei freier Futteraufnahme und einer artgerechten Umgebungstemperatur von ca. 22 °C gehalten. Alle Tiere standen unter tierärztlicher und tierpflegerischer Obhut.

Die Durchführung dieser Versuche wurde vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin unter der Nummer G0010/05 genehmigt und durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert (SCHM 1436/5-1).

Zur Prüfung und Etablierung der Operationsmethode sowie der biomechanischen, histologischen und molekularbiologischen Auswertung wurden zehn Tiere für einen Vorversuch verwendet. Die 60 Tiere für den Hauptversuch wurden randomisiert je einer von insgesamt vier Gruppen zugeteilt. Dazu wurden den ersten drei Gruppen jeweils 16 Tiere zugeordnet. Für acht Tiere pro Gruppe wurde eine Standzeit von 28 Tagen definiert und für die übrigen 56 Tage. Den Tieren der ersten Kontrollgruppe wurde in die Tibia beidseits nur ein intramedullärer Titaneleastischer Nagel (TEN) ohne Zusatz von Fibrin oder Plasmiden implantiert. In der zweiten Kontrollgruppe wurde zusätzlich zum TEN Fibrinkleber appliziert. Die Tiere der eigentlichen Versuchsgruppe erhielten den TEN, Fibrinkleber und die zu testende BMP-2-Plasmidformulierung. Bei allen Tieren der drei Gruppen erfolgten nach Ablauf der definierten Standzeit eine biomechanische Testung der Implantatintegration in die rechte Tibia mittels „push-out“ Verfahren sowie eine histomorphometrische Analyse der linken Tibia mittels digitaler Bildanalyse. Diese Untersuchungen sind Bestandteile weiterer Promotionsarbeiten und wurden von Julius Höhne (Biomechanik) und Christian Hain (Histomorphometrie) durchgeführt.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die vierte Gruppe, die Luciferasegruppe. Sie diente dem Transfektions- und Sicherheitsnachweis. Dazu wurden zwölf Kaninchen in drei Untergruppen zu je vier Tieren eingeteilt, wobei sich die einzelnen Untergruppen lediglich in der Standzeit unterschieden. Eine schematische Übersicht ist in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1: Gruppeneinteilung und Versuchsplan**

Gruppe		Tag 0	Tag 4	Tag 7	Tag 28	Methode
<b>I</b>	4-Tage-Gruppe (n=4)	Blutentnahme Operation Röntgen	Blutentnahme Tötung Probenentnahme			Analyse lokaler Transfektion  und Analyse systemischer Transfektion
<b>II</b>	7-Tage-Gruppe (n=4)			Blutentnahme Tötung Probenentnahme		
<b>III</b>	28-Tage-Gruppe (n=4)				Blutentnahme Tötung Probenentnahme	

Am Tag 0 erfolgte die Implantation eines Titannagels in die rechte und linke Tibia. Die zusätzliche Applikation von Fibrinkleber diente dabei zur Reduzierung der intraoperativen Blutungsneigung aus dem Knochenmark und gleichzeitig als Trägermaterial für die Plasmidformulierung. Um den Reporter-gen-Nachweis führen zu können und somit eine lokale Transfektion nachweisen und eine systemische Transfektion ausschließen zu können, wurde lokal statt des BMP-2-Plasmides ein Luciferase-Plasmid unter der Verwendung von COPROGs als Vektorsystem intramedullär appliziert (*siehe Kap. 2.3.2 Operationstechnik*). Postoperativ wurden Röntgenbilder beider Tibiae angefertigt (*siehe Kap. 2.3.3 Radiologische Untersuchung*). Für jedes Tier gab es zwei Untersuchungszeitpunkte (*siehe Kap. 2.3.4 Untersuchungen und Nachsorge*).

Nach Ablauf der definierten Standzeit erfolgte die Tötung der Tiere. Anschließend wurden die Proben für den systemischen Luciferase-Nachweis entnommen und für den lokalen Transfektionsnachweis beide Tibiae explantiert (*siehe Kap. 2.4 Tötung und Probenentnahme*).

## 2.2 Implantat, Trägermaterial und COPROGs

Als Implantat dienten Titanelastische Nägel mit einem Durchmesser von 2,5 mm und einer Länge von 440 mm der Firma Synthes. Während der Operation wurden die Implantate auf die individuelle Länge zugeschnitten.

Das Luciferase-Plasmid wurde direkt intramedullär appliziert. Hierzu wurde das Vektorsystem COPROGs verwendet. Als Trägermaterial für die COPROGs diente die Fibrinogenkomponente des Fibrinklebers von TISSUCOL<sup>®</sup> der Firma Baxter. Die verwendeten Luciferase-COPROGs wurden, wie eingangs erwähnt, von der Technischen Universität München in Deutschland hergestellt, dort mit der Fibrinogenkomponente des Fibrinklebers TISSUCOL<sup>®</sup> formuliert und zur Lagerung lyophilisiert.<sup>67, 129</sup> Das Lyophilisat ist in Abbildung 5 dargestellt. Präoperativ wurden die mit der Fibrinogenkomponente formulierten Luciferase-COPROGs des Fibrinklebers als steriles Lyophilisat nach Herstellerangabe in 210 µl H<sub>2</sub>O rehydriert. Intraoperativ wurde dieses Fibrinogen-Vektor-Gemisch zeitgleich mit der Thrombinkomponente in den Markraum der Tibia appliziert. In situ formte dieses Material dann Vektoren-enthaltende Clots, die dem Gentransfer des Reportergens Luciferase dienen.



Abbildung 5: Lyophilisierte Luciferase-COPROGs

## 2.3 Operatives Vorgehen

### 2.3.1 OP-Vorbereitung und Anästhesie

Auf eine präoperative Nüchternheit wurde verzichtet, weil Kaninchen aus physiologischen Gründen nicht zum Erbrechen fähig sind. Da die Tiere oft Futter und Wasser im Mund- und Rachenraum sammeln und dies zu Komplikationen bei der Intubation führen kann, insbesondere zur Aspiration, wurde eine einstündige Nahrungskarenz sichergestellt. Präoperativ erfolgte die Bestimmung des Körpergewichtes mit einer Präzisionswaage und nachfolgend erhielten die Kaninchen eine intramuskuläre Anästhesie mittels Injektion von 0,25 mg/kg KG Medetomidin und 25 mg/kg KG Ketamin in den M. quadriceps femoris dexter.<sup>131-132</sup>

Nach erfolgter Sedierung wurde die Blutentnahme durchgeführt. Anschließend wurden beide Hinterläufe des Kaninchens vom oberen Sprunggelenk bis zur Spina iliaca anterior superior mit einem elektrischen Schergerät rasiert (Abbildung 6). Um verbleibende Haare und daran haftende Keime sicher zu entfernen, wurde zusätzlich eine Enthaarungscreme aufgetragen.



**Abbildung 6: Scheren und Enthaarung beider Tibiae**    **Abbildung 7: Endotracheale Intubation**

Im Anschluss erfolgte zur zusätzlichen Analgesie eine subcutane Injektion von 0,04 mg/kg KG Buprenorphinhydrochlorid. Als perioperative Antibiotika-Prophylaxe wurden direkt vor OP-Beginn 7,5 mg/kg KG Enrofloxacin verabreicht.

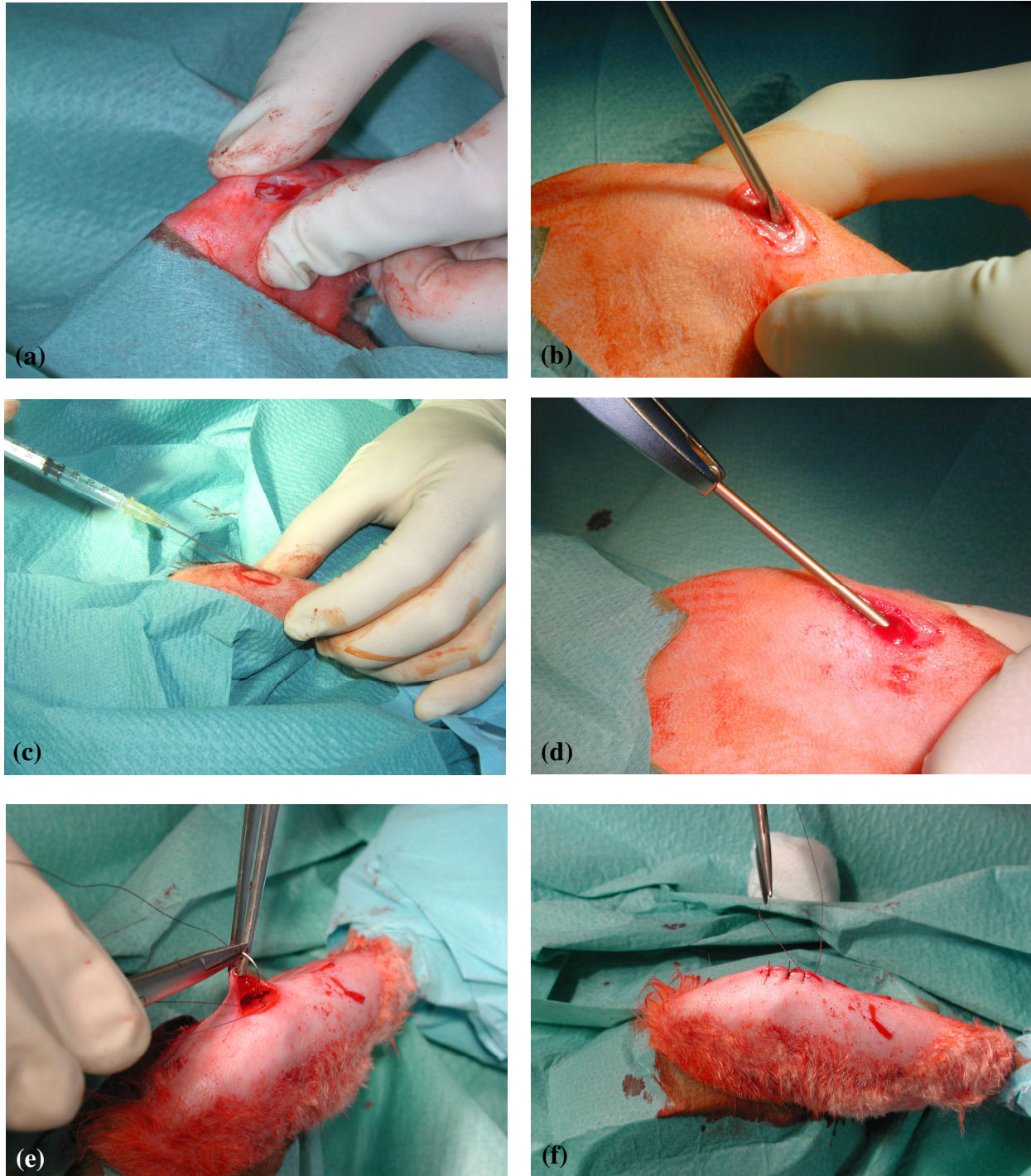
Die Lagerung des Tieres im OP-Saal erfolgte in Rückenlage auf einem Heizkissen, welches einem intraoperativen Wärmeverlust vorbeugt. Des Weiteren wurde Bepanthen Augensalbe auf beide Augen aufgetragen, um die Austrocknung der Corneae zu verhindern.

Es folgte die blinde endotracheale Intubation mittels 2,5er Magill-Tubus ohne Blockung (Abbildung 7). Nach durchgeführter Lagekontrolle und Fixation des Tubus wurde ein Dräger Sulla 800 V Beatmungsgerät angeschlossen. Die Narkose wurde mit einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch mit 3 l/min aufrechterhalten.

### **2.3.2 Operationstechnik**

Die gesamte Operation wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Operationstechnik ist in den Abbildungen 8 a-f dargestellt.





**Abbildung 8: Operationstechnik.** (a) Hautinzision medial der Tuberositas tibiae, (b) Eröffnung des Markraumes der Tibia mittels Handbohrer, (c) Applikation des Fibrinogen-Luciferase-COPROGs-Gemisches, (d) Implantation des Titannagels, (e) Periostnaht, (f) Wundverschluss.

Zunächst wurden die zu operierenden Hinterläufe im rasierten Bereich mit einem Hautdesinfektionsmittel desinfiziert und nachfolgend der Körper unter Aussparung der Operationsfelder mit sterilen OP-Tüchern abgedeckt. Dann erfolgte eine ca. 10 mm lange Hautinzision medial der Tuberositas tibiae mit nachfolgender stumpfer Präparation zur

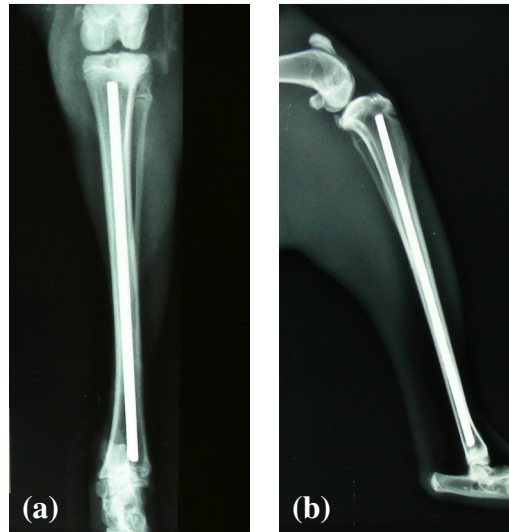
Freilegung der Tibia. Mit Hilfe eines Handbohrers ( $\varnothing$  3,2 mm) wurde die Kortikalis in Richtung Knochenmarkkanal durchbohrt und somit die Markhöhle der Tibia eröffnet. Unter Bildwandlerkontrolle wurde der Markraum anterograd bis wenige mm vor das obere Sprunggelenk mit einem Handbohrer ( $\varnothing$  2,0 mm) vorgebohrt und anschließend mit Bohrern verschiedener Stärke bis zu einem Durchmesser von 2,8 mm erweitert. Um eine vollständige Ummantelung des Implantates mit Fibrinkleber zu erreichen, wurde der Durchmesser des Bohrkanals 0,3 mm größer als der des Implantates gewählt. Nachfolgend wurde das 2,5 mm starke Titanimplantat von proximal in den Markraum eingebracht und unter Bildwandlerkontrolle bis zum oberen Sprunggelenk vorgeschoben. Nach korrekter Platzierung und Längenbestimmung des Implantates wurde dieses wieder entfernt und mit einem Seitenschneider auf die entsprechende Länge zugeschnitten. Anschließend erfolgte die Applikation von 0,2-0,3 ml Fibrinogen-Luciferase-COPROGs-Gemisch und 0,2-0,3 ml Thrombin (notwendige Menge abhängig von der maximalen Befüllbarkeit des Markraumes) in den Knochenmarkkanal sowie die endgültige Implantation des Titannagels. Nach Verschluss der Markhöhle mittels Periostnaht, wurden die Wundränder adaptiert und durch drei Hautnähte mit 3-0 Vicryl verschlossen. Abschließend wurden die Wundflächen erneut desinfiziert und mit Sprühpflaster abgedeckt.

Die Operation der kontralateralen Tibia erfolgte analog. Nach Beendigung der Inhalationsnarkose und dem Wiedereintreten einer suffizienten Spontanatmung wurde das Tier extubiert.

### **2.3.3 Radiologische Untersuchung**

Zur Lagekontrolle des Implantates und zum Ausschluss einer Fraktur wurden unmittelbar postoperativ konventionelle Röntgenbilder auf Digitalkassetten mit einem mobilen Röntgengerät angefertigt. Die operierten Tibiae des jeweiligen Tieres wurden in zwei Ebenen – lateral und posterior-anterior (p.a.) – geröntgt (Abbildung 9). Hierzu wurde das Kaninchen postoperativ im analgesierten und sedierten Zustand mit Leukosilk<sup>®</sup> auf der Röntgenplatte fixiert. Für die laterale Aufnahme wurde in Seitenlage das Bein im Hüftgelenk abduziert und außenrotiert sowie im Kniegelenk flektiert. Für die p.a. Aufnahme wurde das Tier in Bauchlage gebracht und beide Beine parallel zueinander in Dorsalextension an den Fersen fixiert.

Die radiologische Untersuchung wurde mit einem standardisierten Film-Fokus-Abstand von 60 cm, einer Strahlenhärte von 52 keV und einer Belichtungszeit von 1,8 mAs durchgeführt.



**Abbildung 9: Röntgenaufnahmen der Tibia in 2 Ebenen. (a) p.a. (b) lateral**

Die Auswertung der Bilder erfolgte rein deskriptiv und wurde von drei verschiedenen Personen unabhängig voneinander durchgeführt.

### **2.3.4 Untersuchungen und Nachsorge**

Präoperativ am Tag 0 wurde das Gewicht des Kaninchens ermittelt und das Tier klinisch auf äußere Verletzungen und Auffälligkeiten untersucht. Die Blutentnahme erfolgte präoperativ zur Feststellung der Ausgangswerte des Tieres und direkt vor der Tötung zur Kontrolle der Entzündungsparameter. Hierzu wurde das sedierte Tier in Seitenlage gebracht und die V. auricularis mit einer Butterfly-Kanüle punktiert. Das Blut wurde mit Hilfe einer Kapillare in ein Serum- und ein Blutbildröhrchen geleitet. Im Labor des Institutes für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charite (Virchow-Klinikum, Berlin) wurde anschließend ein Blutbild (Leukozyten, Thrombozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, MCH, MCHC, MCV, MPV und RDW) angefertigt. Zusätzlich wurden im Serum die Elektrolyte (Natrium, Kalium, Chlorid) und das C-reaktive Protein (CRP) bestimmt.

Um mögliche Komplikationen frühzeitig zu erkennen, wurden die Tiere postoperativ einmal täglich auf lokale Wundinfektionen kontrolliert und der postoperative Verlauf dokumentiert. Weiterhin wurden im Tagesverlauf regelmäßig das Verhalten, die Aktivität, die Nahrungsaufnahme und der Gesamtzustand der Tiere beobachtet. Am Tötungstermin wurde abschließend nochmals eine gründliche Untersuchung auf Entzündungszeichen im Wundgebiet durchgeführt.

## **2.4 Tötung und Probenentnahme**

Das Tier erhielt zunächst eine intramuskuläre Anästhesie mittels Medetomidin und Ketamin. Nach der Blutentnahme und einer abschließenden klinischen Untersuchung erfolgte die Tötung durch intravenöse Injektion von 10 mg/kg KG Thiopental und nachfolgend 10 ml Kaliumchlorid 14,9 % über eine Butterfly-Kanüle in die V. auricularis. Nach wenigen Sekunden war keine Herzaktion mehr detektierbar und der Kreislaufstillstand an dem Verblassen der Ohrgefäßzeichnung sowie am Eintrüben der Augen erkennbar. Anschließend wurde zügig weitergearbeitet, um postmortale Autolyse-Prozesse zu vermeiden.

### **Probengewinnung zum systemischen Transfektionsausschluss**

Unter sterilen Kautelen wurden Thorax und Abdomen mit einem Skalpell und einer Präparierschere durch einen ca. 10 cm langen medianen Schnitt eröffnet und nach Freipräparation der Organe Proben von Lunge, Leber und Milz entnommen. Für die Entnahme der Gehirnprobe wurde die Haut über dem Os frontale inzidiert, der Schädelknochen mit Hilfe eines Handbohrers ( $\varnothing$  3,2 mm) eröffnet und die Trepanation mit dem Luer erweitert. Anschließend konnte die Hirnprobe problemlos herausgelöst werden. Nachfolgend wurde der Hoden dargestellt und eine Probe entnommen. Des Weiteren wurde auf beiden Seiten der proximale Teil des Humerus freigelegt und mit dem Luer eine Knochenprobe gewonnen. Als Muskelprobe diente der mittlere Anteil des Musculus tibialis anterior, welcher vor der Präparation der rechten oder linken Tibia freigelegt und entnommen wurde.

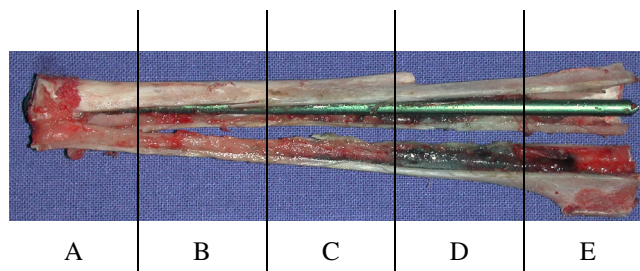
Unmittelbar nach Probenentnahme kommt es durch spezifische und unspezifische RNA-Abbauprozesse sowie durch die Induktion der Transkription zu Veränderungen im Genexpressionsmuster. Um dies zu verhindern und die RNA in den Zellen zu stabilisieren, wurden alle Proben nach Gewinnung in ein beschriftetes 1,5 ml Eppendorfcap gegeben und mit 500  $\mu$ l RNAlater<sup>®</sup> bedeckt. Bis zur Beendigung der Probenentnahme wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend im Tiefkühlschrank bei -80 °C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

### **Probengewinnung zum lokalen Transfektionsnachweis**

Zunächst wurde die Haut zirkulär am oberen Sprunggelenk inzidiert und das Fell mit einem Skalpell von distal nach proximal bis über das Kniegelenk abgelöst. Dann wurde die Tibia im oberen Sprunggelenk exartikuliert. Nach Durchtrennen der Sehnen der Unterschenkelmuskulatur konnte der Fuß abgetrennt werden. Der Knochen wurde von distal nach proximal von allen

Muskeln, Sehnen und Bändern freipräpariert und das restliche Weichteilgewebe entfernt. Danach erfolgten die Exartikulation im Kniegelenk und die Entfernung der Fibula. Anschließend wurden die Tibiae in fünf Abschnitte unterteilt, was schematisch in Abbildung 10 dargestellt ist.

Bei den ersten vier Versuchstieren wurde nicht auf diese Weise verfahren. Ihnen wurde nur eine Knochenprobe aus der Tibia beidseits entnommen. Eine Entnahme von Humerusproben erfolgte ebenfalls nicht.



**Abbildung 10: Probeneinteilung der Tibia.** Zum Transfektionsnachweis wurden jeweils fünf Knochenproben der rechten Tibia (A<sub>1</sub> - E<sub>1</sub>) und linken Tibia (A<sub>2</sub> - E<sub>2</sub>) nach obigem Schema entnommen.

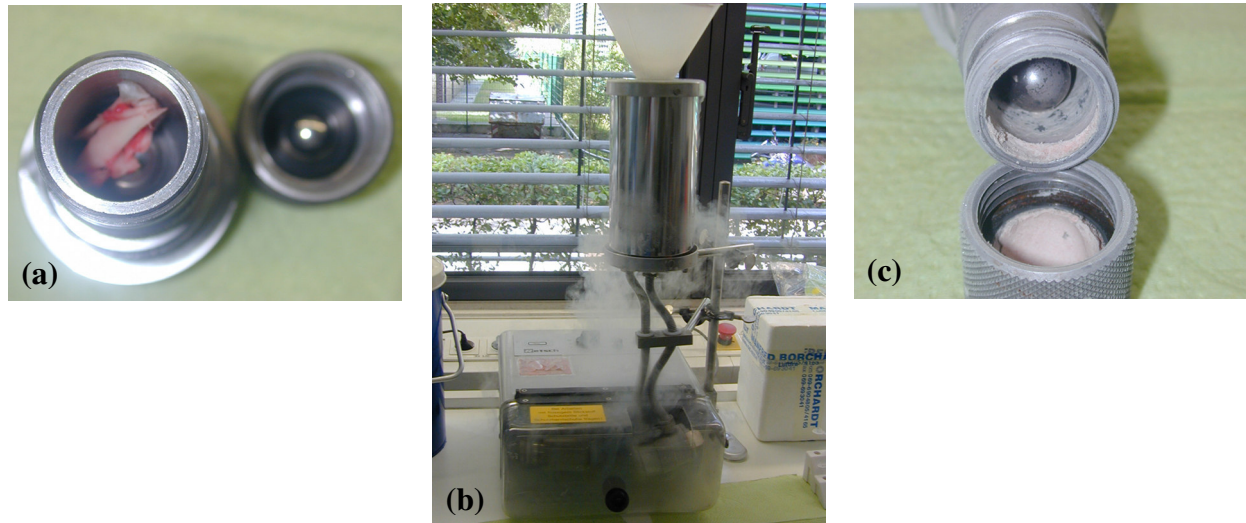
## 2.5 Molekularbiologisches Vorgehen

Alle folgenden Arbeiten wurden mit Einmalhandschuhen, autoklavierten RNase-freien sterilen Gefäßen und Pipettenspitzen mit Filter durchgeführt, um eine Kontamination mit Fremd-RNA oder eine Zerstörung der RNA durch RNasen zu verhindern. Während der Aufarbeitung der Proben wurde darauf geachtet, dass es zu keiner Erwärmung über 4 °C kam, denn dies könnte zu einer Schädigung oder zum Zerfall der RNA führen. Die Aufarbeitung der Proben und die RNA-Isolation erfolgten mit Hilfe des RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit 50 und orientierten sich an den Protokollen des Benutzerhandbuches von QIAGEN.<sup>133</sup>

### 2.5.1 Aufarbeitung der Proben für die molekularbiologische Analyse

#### Aufarbeitung des Knochens

Zunächst wurden die gefrorenen Knochenproben mit einer Retsch Schwingmühle kryogen vermahlen (Abbildung 11).



**Abbildung 11:** In der Mahlkammer (a) der Retsch Schwingmühle (b) wurde der Knochen (a) zu Knochenpulver (c) gemahlen.

Die radiale Schwingung des Mahlsystems betrug 8-9 Hz. Nach 2 bis 3 Minuten war die Pulverisierung des Knochens durch die Schlagwirkung der beiden Kugeln im Mahlbecher und die Homogenisierung durch die Schüttelbewegung erreicht. Das Mahlsystem wurde nach jeder Probe gründlichst gesäubert und mit Sterilium desinfiziert, um alle Pulverrückstände zu entfernen. Zusätzlich wurde es vor Aufarbeitung der Proben eines anderen Tieres autoklaviert. Anschließend wurde das Knochenmehl in tarierte 2 ml Eppendorfcaps gefüllt und mit einer Präzisionswaage auf 50 mg Portionen abgewogen. Das restliche Pulver wurde zur Lagerung, nach Zugabe von 10  $\mu$ l RNAlater<sup>®</sup> pro mg Knochenmehl, wieder bei -80 °C eingefroren.

Zum Lysieren der Zellen wurde 1 ml QIAzol, eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Thiocyanat, auf das abgewogene Pulver pipettiert. QIAzol inaktiviert die RNasen und wurde entwickelt, um die Lyse von fettreichem Gewebe durch eine Zerstörung der Plasmamembran von Zellen und Zellorganellen zu ermöglichen.<sup>134</sup> Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur mit gelegentlichem Vortexen, wurden 200  $\mu$ l Chloroform zur Homogenisierung des Lysates hinzugegeben. Nach 15 Sekunden vorsichtigem Schütteln und einer 3-minütigen Inkubation entstand ein homogenes Gemisch. Dieses wurde zur Auftrennung 15 Minuten mit 14.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Dadurch entstanden eine obere wässrige Phase, welche RNA enthielt, eine DNA-haltige intermediäre Phase und eine untere organische Phase mit Proteinen. Die obere RNA-haltige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5 ml Eppendorfcap überführt. Dabei wurde darauf geachtet nichts von der intermediären Phase mitzunehmen, um die Probe nicht mit DNA zu kontaminieren.

## **Aufarbeitung der Gewebeproben**

Alle folgenden Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt, um einer Erwärmung auf über 4 °C entgegenzuwirken. Die einzelnen Organ- und Gewebeproben wurden zunächst mit Pinzette und Skalpell in einer sterilen Zellkulturschale zerkleinert. Nachfolgend wurden sie in ein tariertes 2 ml Eppendorfcap gefüllt und auf 50 mg Portionen abgewogen. Das übrige Gewebe verblieb im RNAlater<sup>®</sup> und wurde zur Lagerung wieder bei -80 °C eingefroren.

Die Lyse der Zellen erfolgte, im Gegensatz zur Lyse der Knochenproben, durch die Zugabe von 600 µl RLT-Puffer (+10 µl β-Mercaptoethanol/1 ml RLT), welcher einen stark denaturierenden Guanidin-Isothiocyanat-Puffer enthielt. Dieser führte unmittelbar nach Zugabe zur Inaktivierung der RNasen und ermöglichte somit die Isolation von intakter RNA. Um ein homogenes Lysat zu erhalten, wurden die Proben je nach Konsistenz des Gewebes 1-3 Minuten mit dem Ultra-Turrax bei 19.000 U/min im RLT-Puffer homogenisiert. Pro Tier fand ein frisch autoklavierter Aufsatz Verwendung und zwischen den einzelnen Gewebeproben eines Tieres wurde der Aufsatz in destilliertem Wasser gründlichst gesäubert und danach in Ethanol (70 %) gespült. Nach 20 Minuten Zentrifugation des Lysates mit 10.000 rpm bei 4 °C zur Auftrennung in die einzelnen Phasen, wurde der RNA-haltige Überstand abgenommen und in ein neues 1,5 ml Eppendorfcap überführt.

### **2.5.2 mRNA-Isolation aus Knochen und Gewebe**

Alle folgenden Arbeiten wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Isolation der mRNA wurde eine RNeasy Säule des RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit von QIAGEN verwendet. Durch das darin enthaltene spezialisierte und salzreiche Puffersystem ist es möglich, über 100 µg RNA mit einer Länge von über 200 Nukleotiden an die RNeasy Silica Membran zu binden. Dadurch gelingt es, speziell die mRNA zu isolieren und die rRNA sowie die tRNA selektiv auszuschließen.<sup>133</sup>

Um adäquate Bedingungen für die RNA-Bindung zu schaffen, wurde die Probe zunächst mit einem Volumen Ethanol (70 %) versetzt, gemischt und maximal 700 µl dieser Probe auf eine RNeasy-Säule im 2 ml Collection-Tube gegeben. Nach 30 Sekunden Zentrifugation mit 10.000 rpm war die RNA an die Silica-Membran gebunden. Der Durchlauf wurde verworfen, die Säule auf ein frisches Tube gesetzt und der Vorgang mit der restlichen Probe wiederholt. Zum Waschen der Silica-Membran wurden 700 µl RW1-Puffer und zweimal 500 µl RPE-Puffer, beide auf Ethanolbasis, zugegeben und der Durchlauf jeweils nach Zentrifugation verworfen. Nachfolgend wurde die Silica-Membran durch Zentrifugation mit maximaler Geschwindigkeit

getrocknet und anschließend die Säule auf ein frisches RNase-freies Eppendorfcab gesetzt. Nach Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser wurden die Bedingungen für die RNA-Bindung an der Silica-Membran aufgehoben, und es entstand nach abschließender 2-minütiger Zentrifugation das mRNA-Eluat. Dieses wurde bis zum Umschreiben der mRNA in cDNA bei -80 °C gelagert.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration in den Proben erfolgte direkt vor der rt-PCR mittels photometrischer Messung in ng/µl. Das Absorptionsmaximum lag bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Kalibrierung des Photometers auf den Nullwert erfolgte jeweils zu Beginn mit 100 µl RNase-freiem Wasser. Die RNA-Konzentration wurde in 60 µl Probe gemessen, dabei wurde auf das Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm geachtet. Dies erlaubte eine Aussage über mögliche Verunreinigungen der RNA-Probe mit Proteinen.

### 2.5.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (rt-PCR)

Zum Nachweis von mRNA war es erforderlich, komplementäre DNA-Kopien (cDNA) von der isolierten mRNA herzustellen, da sich RNA nicht direkt durch den Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion amplifizieren lässt. Dies erfolgte mit Hilfe der rt-PCR. Je nach RNA-Gehalt des mRNA-Eluats wurden hierzu 1-8 µl der Probe eingesetzt, da zum Umschreiben der mRNA in cDNA mindestens 80 ng mRNA benötigt wurden.

Zunächst erfolgte die Herstellung eines 10 mM dNTP-Mixes aus 100 mM dATP, dGTP, dTTP, dCTP durch eine 1:10 Verdünnung mit destilliertem Wasser (dH<sub>2</sub>O). Die Proben und Reagenzien wurden nun nach dem in Abbildung 12 dargestellten Pipettierschema in 0,2 ml PCR-Tubes pipettiert.

Ansatz pro Probe:	1-8 µl mRNA-Eluat 1 µl 10 mM dNTP-Mix 1 µl Randomprimer 0-7 µl dH <sub>2</sub> O
Ansatz insgesamt:	10 µl

**Abbildung 12: Pipettierschema Probenansatz**

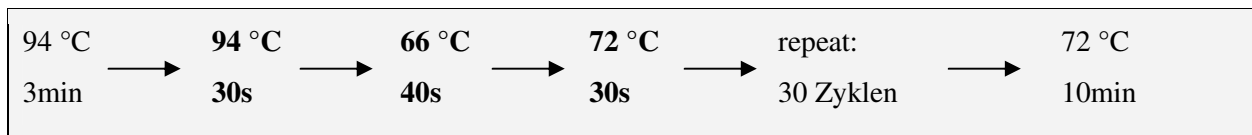
Nachfolgend wurden die Ansätze in einer Spectrafuge mini C1301 kurz zentrifugiert und für 5 Minuten bei 65 °C im Mastercycler gradient 5331 inkubiert. Dadurch wurden die Sekundärstrukturen der mRNA aufgelöst und das Annealing der Randomprimer an den mRNA-





Die PCR wurde unter der Verwendung von 12,5 µl iQ™ Supermix durchgeführt, welcher Taq-Polymerase, dNTPs und PCR-Puffer bereits enthält. Durch die Zugabe von 10,5 µl destilliertem Wasser sowie je 0,5 µl der Primer GAPDH-F und GAPDH-R zu diesem Supermix wurde der GAPDH-Reaktionsmix für ein Template hergestellt. Die Erzeugung des Luciferase-Reaktionsmixes erfolgte analog dazu durch Verwendung der Primer Luc-S und Luc-A.

Zunächst wurden von jeder Probe zweimal je 1 µl cDNA abgenommen und in getrennte 0,2 ml PCR-Tubes pipettiert. Auf den ersten Teil der Probe wurde GAPDH-Reaktionsmix und auf den zweiten Teil Luciferase-Reaktionsmix gegeben. Für jeden verwendeten Primer wurde eine Negativkontrolle ohne Zugabe von Template mitgeführt. Anschließend wurden alle PCR-Tubes im Mastercycler gradient 5331 platziert und im Rabbit-PCR-Programm inkubiert. Der Ablauf des Programms ist in Abbildung 14 dargestellt.



**Abbildung 14: Rabbit-PCR-Programm. Die fett gedruckten Schritte stellen einen Programm-Zyklus dar.**

Die PCR läuft in verschiedenen Phasen ab und setzt sich aus mehreren Zyklen zusammen. In der ersten Phase erfolgt durch Erhöhen der Temperatur auf 94 °C die Denaturierung des DNA-Doppelstranges, indem die Wasserstoffbrückenbindungen der Basenpaare gelöst werden. Nach raschem Abkühlen auf 66 °C lagern sich die Oligonukleotid-Primer komplementär an die entstandenen DNA-Einzelstränge an, was als Annealing bezeichnet wird. Im letzten Schritt kommt es bei 72 °C zur Elongation, hierbei werden die DNA-Einzelstränge durch die DNA-Taq-Polymerase unter der Verwendung von dNTPs zum jeweiligen Doppelstrang komplementiert, welcher der ursprünglichen Template-DNA exakt gleicht. Dieser Reaktionszyklus wird 30mal durchlaufen, sodass die amplifizierte DNA exponentiell zunimmt.

Nach Beendigung der PCR wurde das Ergebnis der Amplifizierung elektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurde ein 1,5 %iges Agarosegel mit 1,5 mg Agarose pro 100 ml Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) hergestellt und in der Mikrowelle aufgeköcht. Nachfolgend wurden 0,05 µl/ml des fluoreszierenden Farbstoffes Ethidiumbromid hinzugegeben, um die DNA später im Gel sichtbar zu machen. Nach Abkühlung des Gels auf ca. 60 °C wurde es in eine Gelkammer gegossen und zwei 20er Kämmen eingesteckt. Nach ca. 20 Minuten war das Gel ausgehärtet und wurde nach Entfernen der Kämmen in eine Elektrophorese-Kammer mit TAE-Laufpuffer gelegt.

Während der Zeit des Aushärtens wurden mit Hilfe einer Multipipette alle Proben mit 4 µl Loading-Dye versetzt und in der Spectrafuge 5 Sekunden zentrifugiert. In die erste Gel-Tasche der beiden Reihen eines Gels wurden jeweils 6 µl Größen-Marker (DNA-Leiter) pipettiert. In die nachfolgenden Taschen der oberen Reihe wurden je 6 µl der Proben mit den Luciferase-Produkten und in die Taschen der unteren Reihe je 6 µl der Proben mit den GAPDH-Produkten pipettiert. Nach ca. 20 Minuten Elektrophorese bei 110 V waren die Proben ca. 2-3 cm im Gel gelaufen und die DNA-Fragmente aufgetrennt. Diese stellten sich ihrer Größe entsprechend nach Anzahl der Basenpaare als Bande dar. Das Gel wurde unter UV-Licht im Eagle Eye™ visualisiert und digital fotografiert. Das Ethidiumbromid, welches sich vorher in die DNA eingelagert hatte, fluoreszierte nun im UV-Licht.

### **2.5.5 Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)**

Des Weiteren wurde die hergestellte cDNA als Ausgangsmaterial für die quantitative Beurteilung der mRNA-Synthese des Referenzgenes GAPDH und des Reportergenes Luciferase verwendet. Für diese Beurteilung wurden die cDNA-Sequenzen mittels qRT-PCR exponentiell vervielfacht. Hierzu wurden die gleichen Primer wie bei der konventionellen PCR eingesetzt (*siehe Kap. 2.5.4 PCR und Agarose-Gelelektrophorese*). Der entscheidende Unterschied zur konventionellen PCR mit Agarose-Gelelektrophorese ist, dass mit der qRT-PCR Aussagen über die Ausgangs-cDNA-Verhältnisse bzw. -RNA-Verhältnisse in den Proben zum Entnahmepunkt gemacht werden können – demnach ist eine Quantifizierung möglich.

Die qRT-PCR wurde unter der Verwendung von 12,5 µl iQ™-Supermix durchgeführt, welcher iTaq-DNA-Polymerase, dNTPs, Kaliumchlorid, Tris-HCl, Magnesiumchlorid und Stabilisatoren bereits enthält. Durch Zugabe von 9,5 µl destilliertem Wasser und 1 µl Absolute™ Max QRT-PCR Sybr® Green Fluorescein Mix sowie von jeweils 0,5 µl der Primer GAPDH-F und GAPDH-R zu diesem Supermix wurde der GAPDH-Reaktionsansatz für eine Probe hergestellt. Die Erzeugung des Luciferase-Reaktionsansatzes erfolgte analog dazu durch die Verwendung der Primer Luc-S und Luc-A. Anschließend wurden dem Ansatz je 2 µl des entsprechenden Templates hinzugefügt. Nachfolgend wurde eine 1:10 Verdünnung hergestellt, die in eine 96-Loch-Platte pipettiert und mit Ultra Clear Cap Strips verschlossen wurde. Nach 30 Sekunden Zentrifugation bei 60 xg und 20 °C mit der Universal 32R wurde die Platte in ein iCycler-System gegeben. Zur Amplifizierung erfolgte zunächst eine initiale Denaturierung von viereinhalb Minuten bei 95 °C, an die sich 30 PCR-Zyklen anschlossen. Ein Zyklus unterteilte sich dabei in

30 Sekunden Denaturierung bei 95 °C, 30 Sekunden Annealing bei 66 °C und 30 Sekunden Elongation bei 72 °C. Für jeden verwendeten Primer wurde eine Negativkontrolle ohne Zugabe von Template zum Nachweis von Primerdimeren und zum Ausschluss einer Kontamination mit Fremd-DNA mitgeführt.

Der Fluoreszenzfarbstoff Sybr<sup>®</sup>Green lagert sich unspezifisch in die Doppelstrang-DNA ein und bildet einen DNA-fluorescent-dye-complex. Dieser absorbiert blaues Licht der Wellenlänge  $\lambda_{\max} = 498$  nm und emittiert grünes Licht der Wellenlänge  $\lambda_{\max} = 552$  nm. Dadurch kommt es bei fortschreitender PCR-Reaktion zu einem exponentiellen Fluoreszenzanstieg. Dieser Anstieg wird im iCycler gemessen. Auf diese Weise kann die Expression des Zielgenes bestimmt werden. Die Basis der PCR-Quantifizierung ist die Berechnung des Fluoreszenzschwellenwertes – der sogenannte Cycle Threshold (Ct-Wert). Dieser Ct-Wert entspricht jenem PCR-Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal erstmals über den festgelegten Hintergrundwert (Threshold) ansteigt. Der Ct-Level ist umgekehrt proportional zum Expressionsniveau des Zielgenes in der Probe.<sup>135</sup>

Für die Auswertung der qRT-PCR-Ergebnisse wurde die Methode der relativen Quantifizierung von Genexpressionen gewählt. Zunächst erfolgte für jede untersuchte Probe eine Normalisierung. Hierzu wurde vom Ct-Wert des Reporter-genes Luciferase der Ct-Wert des Referenz-genes GAPDH subtrahiert, mit dem  $\Delta$ Ct-Wert als Ergebnis. Des Weiteren wurde ein Kalibrator- $\Delta$ Ct-Wert (Standard- $\Delta$ Ct-Wert) ermittelt. Dieser Standard- $\Delta$ Ct-Wert ergab sich aus allen ermittelten  $\Delta$ Ct-Werten als Median und wurde mit einem Wert von 7,38 definiert.

Nachfolgend wurde die Differenz aus dem  $\Delta$ Ct-Wert der Probe und dem  $\Delta$ Ct-Wert des Kalibrators berechnet, welche negativiert den Exponenten zur Basis 2 nach folgender arithmetischen Formel bildet:  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ .<sup>135</sup> Mit Hilfe dieser Berechnung konnten die Unterschiede in der Genexpression zwischen den einzelnen Proben quantitativ dargestellt werden.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 OP-Toleranz

Die Operation wurde von allen Tieren gut toleriert. Die Tiere belasteten die operierten Extremitäten innerhalb eines Tages nach Abklingen des Wundschmerzes bereits voll. Das Verhalten und die Aktivität der Tiere zeigten keine Auffälligkeiten, und postoperativ gab es keinerlei Anzeichen einer lokalen oder systemischen Infektion. Ein Tier mit 28 Tagen Standzeit verstarb aus ungeklärten Gründen am 20. Tag, daher wurde es aus der regulären Gruppenwertung herausgenommen. Hinweise für eine lokale oder systemische Infektion, welche todesursächlich in Frage kommen könnten, gab es nicht. Die ermittelten Laborparameter zeigten keinerlei Auffälligkeiten. Eine Autopsie des verstorbenen Tieres wurde nicht durchgeführt.

Somit standen für die molekularbiologische Untersuchung in der 4-Tage-Gruppe und in der 7-Tage-Gruppe jeweils vier zu testende Tiere zur Verfügung und in der 28-Tage-Gruppe waren es drei Tiere. Das vorzeitig verstorbene Tier wurde gesondert ausgewertet.

### 3.2 Körpergewicht und Körpertemperatur

Zu allen Standzeiten konnte eine geringe Gewichtszunahme verzeichnet werden. Die Mittelwerte und ihre Standardabweichung sind in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2: Körpergewicht der Versuchstiere zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten (Mittelwerte und Standardabweichung)**

Standzeit	4 Tage (n=4)		7 Tage (n=4)		28 Tage (n=3)		20 Tage (n=1)	
Zeitpunkt der Untersuchung	Tag 0	Tag 4	Tag 0	Tag 7	Tag 0	Tag 28	Tag 0	Tag 20
Gewicht (kg)	4,0 ± 0,3	4,1 ± 0,3	3,4 ± 0,4	3,6 ± 0,4	3,7 ± 0,1	4,0 ± 0,1	4,1	4,3

Die Körpertemperatur lag beständig ohne große Abweichung bei 37 °C. Es konnten keine wesentlichen Schwankungen als Zeichen einer beginnenden oder bestehenden systemischen Infektion nachgewiesen werden.

### 3.3 Blut- und Serumanalyse

Die prä- und postoperativ ermittelten Laborparameter aus der Blut- und Serumanalyse zeigten im gesamten Untersuchungszeitraum keine Auffälligkeiten. Die Mittelwerte und ihre Standardabweichung sind in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3: Ergebnisse der Blut- und Serumanalyse (Mittelwerte und Standardabweichung)**

Laborparameter	4 Tage (n=4)		7 Tage (n=4)	
	Tag 0 (Operation)	Tag 4 (Tötung)	Tag 0 (Operation)	Tag 7 (Tötung)
Natrium (mmol/l)	144,25 ± 2,63	142,25 ± 2,06	143,50 ± 1,29	142,25 ± 1,89
Kalium (mmol/l)	3,65 ± 0,14	3,90 ± 0,18	3,85 ± 0,39	4,13 ± 0,22
CRP (mg/dl)	0,02 ± 0	0,02 ± 0	0,02 ± 0	0,02 ± 0
Leukozyten (/nl)	5,26 ± 2,59	6,62 ± 2,50	3,04 ± 0,15	4,05 ± 0,08
Erythrozyten (/pl)	5,84 ± 1,16	6,93 ± 0,57	5,48 ± 0,18	6,17 ± 0,77
Hämoglobin (g/dl)	12,63 ± 1,93	14,37 ± 0,47	11,90 ± 0,71	12,65 ± 0,78
Hämatokrit (l/l)	0,39 ± 0,07	0,44 ± 0,71	0,35 ± 0,58	0,39 ± 0,03
MCH (pg)	21,80 ± 1,15	20,80 ± 1,11	21,60 ± 1,03	20,65 ± 1,34
MCHC (g/dl)	32,90 ± 0,87	32,57 ± 0,51	34,20 ± 0,93	32,30 ± 0,28
MCV (fl)	56,00 ± 10,68	63,70 ± 2,52	63,25 ± 1,71	63,50 ± 3,54
RDW (%)	15,27 ± 1,53	15,79 ± 1,69	14,70 ± 0,92	12,90 ± 0,71
Thrombozyten (/nl)	435,70 ± 180,79	322,00 ± 19,67	439,75 ± 49,63	296,50 ± 123,75
MPV (fl)	6,00 ± 0	5,67 ± 0,58	4,67 ± 0,58	6,50 ± 2,12

Laborparameter	28 Tage (n=3)		20 Tage (n=1)	
	Tag 0 (Operation)	Tag 28 (Tötung)	Tag 0 (Operation)	Tag 20 (Tod)
Natrium (mmol/l)	143,00 ± 1,00	144,00 ± 1,00	132,00	143,00
Kalium (mmol/l)	3,83 ± 0,06	3,80 ± 0,37	3,70	4,20
CRP (mg/dl)	0,02 ± 0	0,02 ± 0	0,02	0,02
Leukozyten (/nl)	6,45 ± 0,67	6,70 ± 0,39	6,23	5,92
Erythrozyten (/pl)	6,74 ± 0,34	6,78 ± 0,23	5,42	6,70
Hämoglobin (g/dl)	14,73 ± 1,34	14,55 ± 0,64	11,50	14,20
Hämatokrit (l/l)	0,44 ± 0,03	0,44 ± 0,03	0,34	0,43
MCH (pg)	21,85 ± 1,00	21,50 ± 0,14	21,20	21,20
MCHC (g/dl)	33,27 ± 0,93	33,20 ± 0,36	33,70	33,20
MCV (fl)	65,70 ± 2,08	65,00 ± 1,00	60,00	64,00
RDW (%)	14,97 ± 1,21	14,15 ± 1,06	15,10	14,70
Thrombozyten (/nl)	297,70 ± 9,26	300,50 ± 2,12	339,00	255,00
MPV (fl)	5,34 ± 1,16	5,50 ± 0,71	8,00	8,00

Laborchemische Hinweise für eine lokale oder systemische Infektion fanden sich nicht. Alle Parameter befanden sich im Referenzbereich. Es konnten weder Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren einer Gruppe noch zwischen den verschiedenen Gruppen nachgewiesen werden.<sup>136</sup>

### **3.4 Radiologische Untersuchung**

Die postoperativ durchgeführten radiologischen Kontrollen zeigten bei allen Tieren eine korrekte Platzierung der Implantate mit vergleichbarem Sitz im Markraum der Tibia. Es gab keinerlei Hinweise auf Implantatdislokationen oder -brüche. Frakturen der Tibia oder angrenzender Gelenke konnten bei allen Tieren ausgeschlossen werden. Entzündungs- oder Lockerungszeichen wie zum Beispiel Osteolysen fanden sich nicht. Es wurde weder eine ektopische Knochenbildung in den radiographisch abgebildeten Körperabschnitten beobachtet, noch zeigte sich makroskopisch ein übermäßiger Knochenzuwachs.

Die radiologische Auswertung der Osteointegration der Implantate, im Vergleich Versuchsgruppe versus Kontrollgruppe, wurde von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe durchgeführt. Die Ergebnisse sind hier nicht dargestellt und besitzen für die vorliegende Arbeit keinerlei Relevanz.

### **3.5 Molekularbiologische Untersuchung**

Zur Ermittlung der Transfektion wurde zunächst eine PCR mit Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt und anschließend durch eine quantitative Real-time PCR ergänzt.

In die Auswertung gingen zwölf Tiere mit unterschiedlicher Standzeit ein. Die Ergebnisse der beiden Verfahren werden im Folgenden getrennt dargestellt.

#### **3.5.1 PCR und Agarose-Gelelektrophorese**

Bei der konventionellen PCR-Analyse wurde im ersten Schritt die lokale Transfektionseffizienz des neuen Vektorsystems in den Knochenproben der Tibia analysiert. Im zweiten Schritt wurden zur Beurteilung der systemischen Transfektion des Luciferase-Plasmids verschiedene applikationsferne Gewebeproben auf eine mögliche mRNA-Synthese des Reportergens Luciferase untersucht.

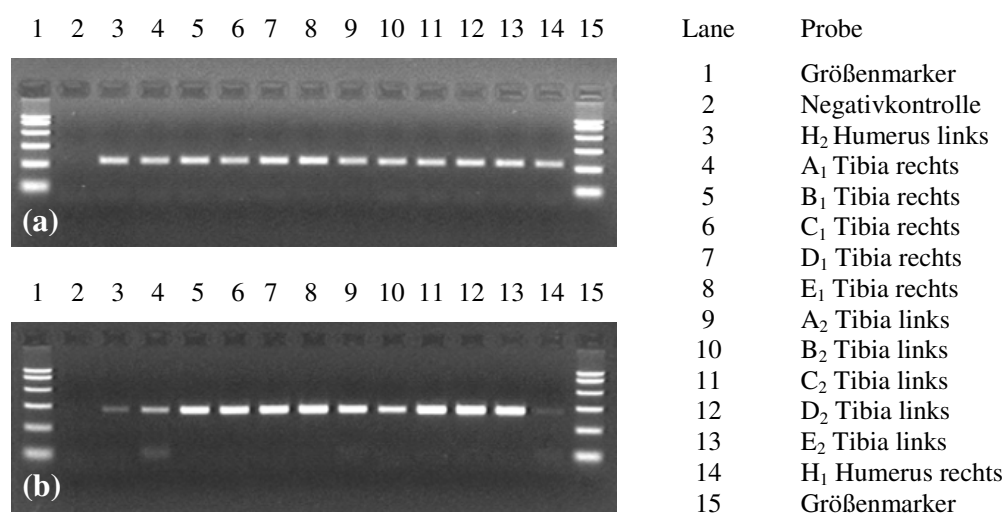
## Untersuchung der lokalen Transfektion

Der detaillierte lokale Transfektionsnachweis erfolgte anhand der Knochenproben beider Tibiae eines Tieres mit 28 Tagen Standzeit. Wie in *Kapitel 2.4 Tötung und Probenentnahme* beschrieben, wurde die rechte Tibia in die Bereiche A<sub>1</sub> bis E<sub>1</sub> und die linke Tibia in A<sub>2</sub> bis E<sub>2</sub> eingeteilt.

In allen Proben der rechten und linken Tibia konnte mittels photometrischer Messung isolierte mRNA nachgewiesen werden. Dabei wurden Konzentrationen von 117,02 ng/μl (A<sub>1</sub>) bis 326,46 ng/μl (E<sub>1</sub>) gemessen. Der Mittelwert und die Standardabweichung betragen in den Proben der rechten Tibia  $203,3 \pm 93,2$  ng/μl und in den Proben der linken Tibia  $186,8 \pm 37,0$  ng/μl.

Die Auswertung der PCR mit Agarose-Gelelektrophorese zeigt, dass in allen untersuchten Knochenproben der Tibia eine mRNA-Synthese des Referenzgenes GAPDH nachgewiesen werden konnte. Dies ist erkennbar an den GAPDH-Banden in den Lanes 3 bis 14 in der Abbildung 15 a.

Des Weiteren konnte mit Hilfe der konventionellen PCR in allen untersuchten Tibiaproben eine mRNA-Synthese des Reportergenes Luciferase nachgewiesen werden. Damit wurde gezeigt, dass die Transfektion des Luciferase-Plasmids in allen Bereichen beider Tibiae stattgefunden hat. Erkennbar ist dies in der Abbildung 15 b an den Luciferase-Banden in den Lanes 4 bis 13, welche den Knochenproben der rechten Tibia A<sub>1</sub> bis E<sub>1</sub> und der linken Tibia A<sub>2</sub> bis E<sub>2</sub> entsprechen.



**Abbildung 15:** Analyse der mRNA-Synthese des Referenzgenes GAPDH (a) und des Reportergenes Luciferase (b) in der rechten und linken Tibia eines Tieres mit 28 Tagen Standzeit mittels PCR. Nachweis einer Luciferase-Expression in allen Proben (Lanes) der Tibia bds. (4-13) sowie im Humerus bds. (3, 14).



Zusätzlich stellten sich in Abbildung 15 b Luciferase-Banden in Lane 3 (H<sub>2</sub> – rechter Humerus) und Lane 14 (H<sub>1</sub> – linker Humerus) dar, was als Hinweis auf eine systemische Transfektion gewertet wurde und im nächsten Kapitel genauer erörtert wird. Steriles destilliertes Wasser in Lane 2 diente als Negativkontrolle.

Im weiteren Verlauf wurde der lokale Transfektionsnachweis mittels PCR bei allen zwölf Tieren mit unterschiedlichen Standzeiten nur in den Proben C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> durchgeführt, die den diaphysären Bereich der rechten und linken Tibia repräsentieren. In allen Proben konnte mittels photometrischer Messung isolierte mRNA nachgewiesen werden. Dabei wurden Konzentrationen von 17,04 ng/μl bis 1111,59 ng/μl gemessen. Die Mittelwerte und Standardabweichung sind in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4: mRNA-Konzentration (ng/μl) in den Tibiaproben der zwölf Tiere unterschiedlicher Standzeiten (Mittelwerte und Standardabweichung)**

Standzeit	4 Tage (n=4)	7 Tage (n=4)	28 Tage (n=3)	20 Tage (n=1)
C <sub>1</sub> (rechte Tibia)	380,3 ± 497,9	144,3 ± 68,4	126,1 ± 55,1	120,73
C <sub>2</sub> (linke Tibia)	190,6 ± 254,6	184,3 ± 155,0	212,9 ± 167,1	131,08

Die Auswertung der PCR mit Agarose-Gelelektrophorese zeigte, dass in 22 von 24 untersuchten Tibiaproben (92 %) eine mRNA-Synthese des Reportergenes Luciferase nachgewiesen werden konnte. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die genaue Verteilung. GAPDH konnte in allen Proben detektiert werden. Diese Ergebnisse sind hier nicht dargestellt.

**Tabelle 5: Übersicht zum Transfektionsnachweis in den Tibiaproben aller Tiere nach PCR**

Standzeit	4 Tage				7 Tage				28 Tage			20 Tage
	pos.	<i>neg.</i>	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
C <sub>1</sub> (rechte Tibia)	pos.	<i>neg.</i>	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
C <sub>2</sub> (linke Tibia)	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	<i>neg.</i>

mRNA des Reportergens Luciferase nachgewiesen (pos.) und nicht nachgewiesen (*neg.*).

In der Knochenprobe C<sub>1</sub> der rechten Tibia eines Tieres mit vier Tagen Standzeit und in der Knochenprobe C<sub>2</sub> der linken Tibia des Tieres mit 20 Tagen Standzeit fanden sich bei vorhandenen GAPDH-Banden keine Luciferase-Banden, was Tabelle 5 zu entnehmen ist. Dies zeigt, dass sich eine ausreichend hohe mRNA-Konzentration in der Knochenprobe befand, aber keine mRNA des Reportergens Luciferase enthalten war. Diese beiden Tiere zählen zu den

Versuchstieren, bei denen nur jeweils eine Knochenprobe aus der rechten und linken Tibia entnommen worden ist, sodass das Ergebnis nicht weiter verifiziert werden konnte.

### Untersuchung der systemischen Transfektion

Die Beurteilung einer möglichen systemischen Transfektion erfolgte anhand verschiedener applikationsferner Organ- und Gewebeproben der zwölf Tiere unterschiedlicher Standzeiten. Als Untersuchungsmaterial dienten Proben vom rechten und linken Humerus sowie Proben von Muskel, Hirn, Lunge, Leber, Milz und Hoden. Insgesamt wurden 88 Gewebeproben mittels konventioneller PCR analysiert.

Die Mittelwerte und Standardabweichung der photometrisch gemessenen Konzentration der isolierten mRNA in den verschiedenen Organ- und Gewebeproben sind in Tabelle 6 dargestellt. In allen entnommenen Proben konnte mRNA nachgewiesen werden. Aus den Muskelproben konnte, insgesamt betrachtet, die geringste Menge mRNA isoliert werden. Es wurden Konzentrationen von 8,3 ng/ $\mu$ l (Muskel) bis 4140,3 ng/ $\mu$ l (Milz) gemessen.

**Tabelle 6: mRNA-Konzentration (ng/ $\mu$ l) in den Organ- und Gewebeproben der zwölf Tiere unterschiedlicher Standzeiten (Mittelwerte und Standardabweichung)**

Standzeit	4 Tage (n=4)	7 Tage (n=4)	28 Tage (n=3)	20 Tage (n=1)
<b>Hirn</b>	181,4 $\pm$ 107,4	268,9 $\pm$ 165,4	164,1 $\pm$ 111,6	228,1
<b>Lunge</b>	921,5 $\pm$ 121,1	633,3 $\pm$ 538,9	671,4 $\pm$ 577,5	271,5
<b>Leber</b>	660,9 $\pm$ 525,2	1558,1 $\pm$ 1678,0	2067,8 $\pm$ 1061,0	248,2
<b>Milz</b>	2087,9 $\pm$ 1480,7	1810,7 $\pm$ 1601,6	661,3 $\pm$ 718,9	460,9
<b>Hoden</b>	2068,5 $\pm$ 807,1	2008,7 $\pm$ 398,6	2396,9 $\pm$ 487,5	1215,1
<b>Muskel</b>	30,8 $\pm$ 34,4	13,9 $\pm$ 5,4	10,2 $\pm$ 2,1	9,0
<b>H<sub>1</sub></b> (rechter Humerus)	92,5	179,0 $\pm$ 55,1	121,1 $\pm$ 52,6	n.v.
<b>H<sub>2</sub></b> (linker Humerus)	114,2	225,2 $\pm$ 123,2	169,4 $\pm$ 71,4	n.v.

Bei vier Tieren erfolgte keine Entnahme von Humerusproben. Drei davon gehörten zur 4-Tage-Gruppe, daher sind an dieser Stelle keine Mittelwerte und Standardabweichung angegeben, sondern die RNA-Konzentration. Bei dem vierten Tier, welches nach 20 Tagen vorzeitig verstarb, wurde dies mit n.v. (Probe nicht verfügbar) gekennzeichnet.

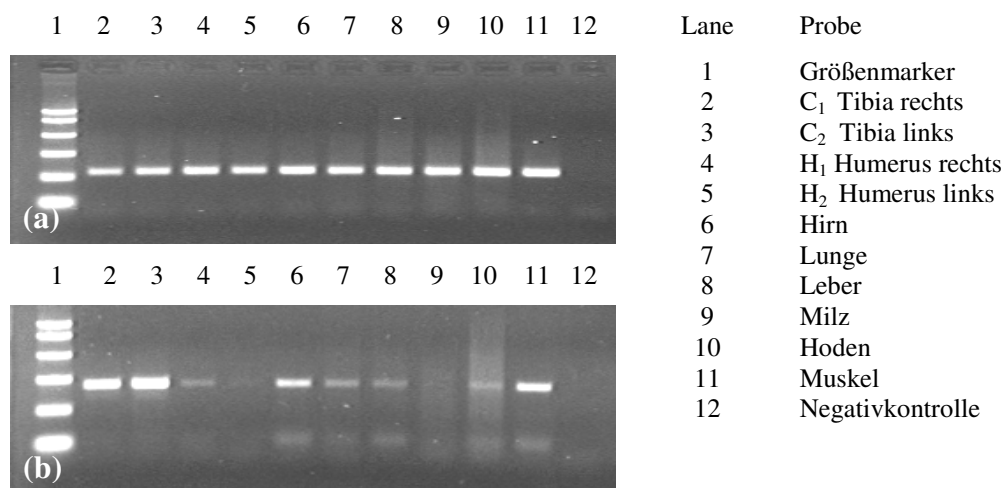
Mit Hilfe der PCR und Agarose-Gelelektrophorese konnte in allen untersuchten Gewebeproben der zwölf Tiere eine mRNA-Synthese des Referenzgenes GAPDH nachgewiesen werden. Bei der Auswertung der digitalen Gel-Bilder fand sich die schwächste GAPDH-Bande in einer Muskelprobe.

Die Auswertung der konventionellen PCR-Analyse bezüglich der systemischen Transfektion zeigte, dass bei acht von zwölf Tieren, jeweils in mindestens einer der untersuchten Gewebeprobe, eine mRNA-Synthese des Reportergenes Luciferase nachgewiesen werden konnte. Dies ist in Tabelle 7 dargestellt, aus der zudem die Verteilung der positiv getesteten Tiere auf die einzelnen Gruppen hervorgeht.

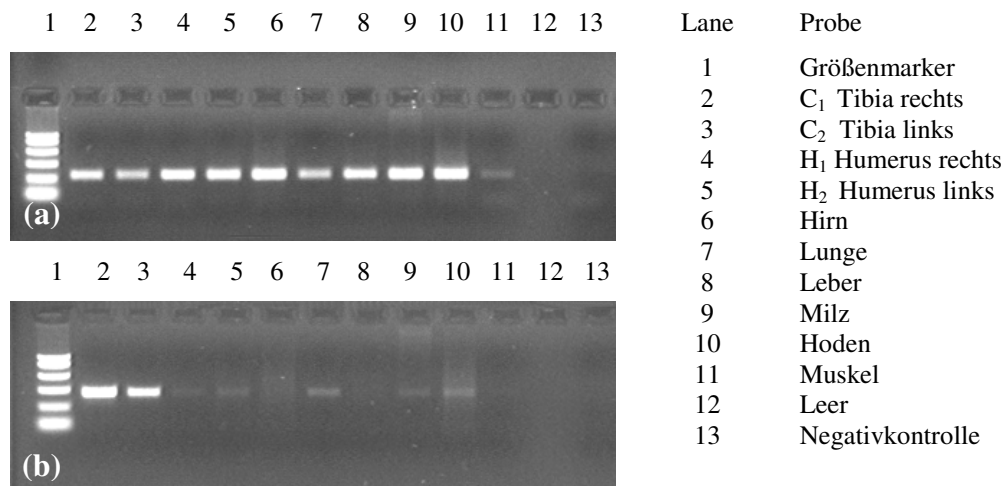
**Tabelle 7: Nachweis einer systemischen Transfektion nach konventioneller PCR - Gruppenverteilung**

Standzeit	4 Tage	7 Tage	28 Tage	20 Tage	Total
Tiere pro Gruppe	4	4	3	1	12
Tiere mit systemischer Transfektion	2	3	3	0	8

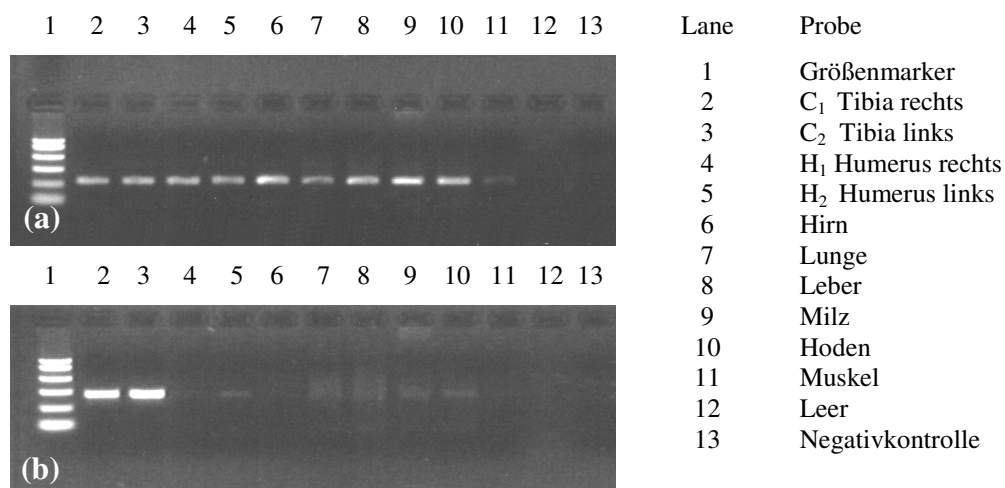
Im Folgenden sind in den Abbildungen 16-19 exemplarisch einige Gel-Bilder dargestellt. Hierzu wurde aus jeder Gruppe ein Tier ausgewählt.



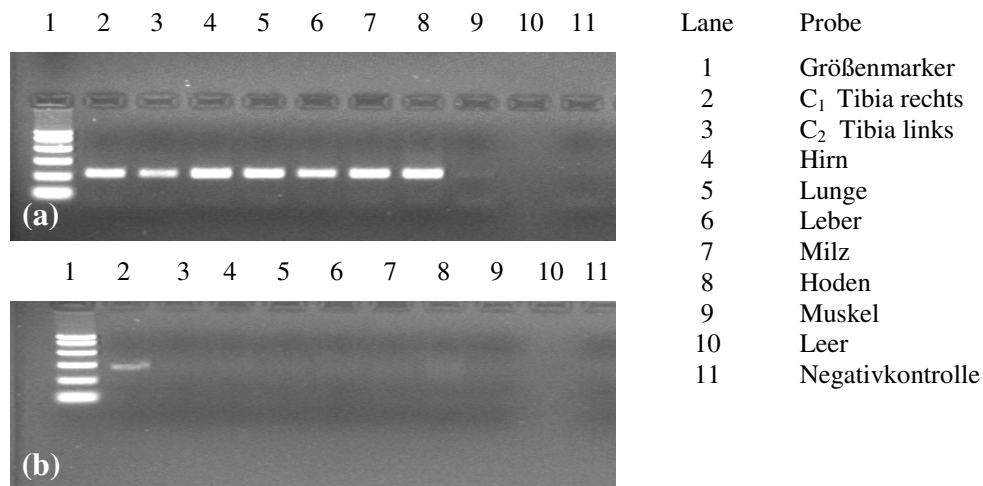
**Abbildung 16: Systemische Analyse der mRNA-Synthese des Referenzgenes GAPDH (a) und des Reportergenes Luciferase (b) mittels PCR am Beispiel eines Tieres mit 4 Tagen Standzeit - Nachweis einer Luciferase-Expression in den Proben (Lanes) von Tibia bds. (2, 3), Humerus rechts (4), Hirn (6), Lunge (7), Leber (8), Hoden (10) und Muskel (11)**



**Abbildung 17:** Systemische Analyse der mRNA-Synthese des Referenzgenes GAPDH (a) und des Reportergenes Luciferase (b) mittels PCR am Beispiel eines Tieres mit 7 Tagen Standzeit - Nachweis einer Luciferase-Expression in den Proben (Lanes) von Tibia bds. (2, 3), Humerus bds. (4, 5), Lunge (7), Milz (9), Hoden (10) sowie Schlieren in der Hirnprobe (6)



**Abbildung 18:** Systemische Analyse der mRNA-Synthese des Referenzgenes GAPDH (a) und des Reportergenes Luciferase (b) mittels PCR am Beispiel eines Tieres mit 28 Tagen Standzeit - Nachweis einer Luciferase-Expression in den Proben (Lanes) von Tibia bds. (2, 3), Humerus links (5), Milz (9) und Hoden (10) sowie Schlieren in den Lungen- (7) und Leberproben (8)



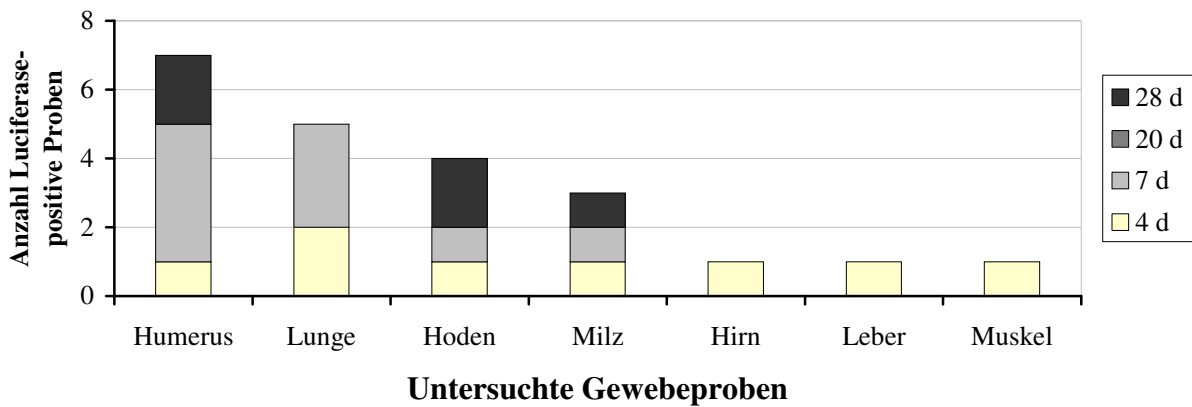
**Abbildung 19: Systemische Analyse der mRNA-Synthese des Referenzgenes GAPDH (a) und des Reportergenes Luciferase (b) mittels PCR am Beispiel des Tieres mit 20 Tagen Standzeit - Nachweis einer Luciferase-Expression in der rechten Tibia, aber kein systemischer Nachweis**

In Abbildung 20 ist zur Übersicht graphisch dargestellt, in wie vielen Proben der applikationsfernen Organ- und Gewebeproben der zwölf Tiere eine eindeutige mRNA-Synthese des Reportergenes Luciferase mittels PCR und Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen werden konnte. Schwache Banden oder Schlieren wurden als negativ gewertet.

Bei sechs von acht Tieren konnte eine eindeutige mRNA-Synthese des Reportergenes Luciferase im Humerus nachgewiesen werden (davon rechter Humerus: vier Tiere und linker Humerus: drei Tiere). Des Weiteren fanden sich bei fünf von zwölf Tieren Luciferase-Banden in den Lungenproben. In den Hodenproben war bei vier von zwölf Tieren eine mRNA-Synthese des Reportergenes Luciferase nachweisbar und in den Milzproben zeigten sich bei drei von zwölf Tieren Luciferase-Banden. In den Hirn-, Leber- und Muskelproben war jeweils bei einem von zwölf Tieren eine mRNA-Synthese des Reportergenes Luciferase zu verzeichnen.

Bei vier Tieren standen zur Untersuchung der systemischen Transfektion keine Proben des rechten und linken Humerus zur Verfügung, da sie nicht entnommen worden sind.

### Nachweis einer systemischen Transfektion in applikationsfernen Geweben mittels PCR



**Abbildung 20: Konventioneller PCR-Nachweis der systemischen Transfektion in applikationsfernen Geweben in Abhängigkeit von der jeweiligen Standzeit (d) der Tiere**

Es zeigte sich, dass in 22 von insgesamt 88 applikationsfernen Gewebeproben (25 %) eine systemische Transfektion des Luciferase-Plasmids erfolgt ist. Alle untersuchten Gewebearten waren ohne Ausnahme betroffen.

In der 4-Tage-Gruppe wurde bei zwei von vier Tieren eine mRNA-Synthese des Reporter genes Luciferase in der Lunge detektiert. Zudem zeigten sich bei einem dieser beiden Tiere in allen Proben außer der Milz Luciferase-Banden, wohingegen bei dem anderen lediglich eine Luciferase-Bande in der Milz detektiert werden konnte.

In der 7-Tage-Gruppe konnte bei drei von vier Tieren eine mRNA-Synthese des Reporter genes Luciferase in der Lunge und im Humerus nachgewiesen werden. Des Weiteren fanden sich bei jeweils einem von vier Tieren Luciferase-Banden in den Proben von Milz und Hoden.

In der 28-Tage-Gruppe konnte bei zwei von drei Tieren eine mRNA-Synthese des Reporter genes Luciferase im Hoden und im Humerus nachgewiesen werden. Des Weiteren fand sich bei einem von drei Tieren eine Luciferase-Bande in der Milzprobe.

Bei dem Tier mit einer Standzeit von 20 Tagen konnte in keiner Gewebeprobe eine mRNA-Synthese des Reporter genes Luciferase nachgewiesen werden.

Insgesamt betrachtet fällt auf, dass nach vier Tagen Standzeit eine mRNA-Synthese des Reporter genes Luciferase in jeder Gewebeart mindestens bei einem Tier der Gruppe nachweisbar war. Hingegen zeigten sich nach sieben Tagen Standzeit nur noch in den Lungen-, Milz-, Hoden-

und Humerusproben Luciferase-Banden und nach 28 Tagen Standzeit nur noch in den Milz-, Hoden- und Humerusproben.

Bei 16 von insgesamt 88 Proben zeigten sich nach der PCR und Agarose-Gelelektrophorese im Gelbild in den entsprechenden Lanes sehr schwache Signale bzw. Schlieren. Dadurch war eine eindeutige Differenzierung nicht immer sicher möglich. Dies ist in Tabelle 8 dargestellt.

**Tabelle 8: Nachweis einer mRNA-Synthese des Reportergenes Luciferase in den applikationsfernen Organ- und Gewebeproben aller Tiere mittels konventioneller PCR**

Proben	Hirn	Lunge	Leber	Milz	Hoden	Muskel	H <sub>1</sub> (rechter Humerus)	H <sub>2</sub> (linker Humerus)
4 Tage	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	n.v.	n.v.
	[pos.]	[pos.]	neg.	neg.	[pos.]	neg.	n.v.	n.v.
	neg.	<i>pos.</i>	neg.	<i>pos.</i>	[pos.]	neg.	n.v.	n.v.
	<i>pos.</i>	<i>pos.</i>	<i>pos.</i>	[pos.]	<i>pos.</i>	<i>pos.</i>	<i>pos.</i>	neg.
7 Tage	neg.	neg.	neg.	neg.	[pos.]	neg.	neg.	neg.
	neg.	<i>pos.</i>	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>pos.</i>
	neg.	<i>pos.</i>	[pos.]	[pos.]	[pos.]	neg.	<i>pos.</i>	neg.
	[pos.]	<i>pos.</i>	neg.	<i>pos.</i>	<i>pos.</i>	neg.	<i>pos.</i>	<i>pos.</i>
28 Tage	neg.	[pos.]	[pos.]	<i>pos.</i>	<i>pos.</i>	neg.	neg.	neg.
	neg.	neg.	[pos.]	neg.	[pos.]	neg.	neg.	<i>pos.</i>
	neg.	neg.	[pos.]	[pos.]	<i>pos.</i>	neg.	<i>pos.</i>	neg.
20 Tage	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	n.v.	n.v.
<b>Total: neg.</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>11</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Total: <i>pos.</i></b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>3</b>
<b>Total: [pos.]</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

mRNA des Reportergens Luciferase nachgewiesen (*pos.*) und nicht nachgewiesen (*neg.*). [pos.] entspricht einem sehr schwachen Signal oder einer Schliere.

### 3.5.2 Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)

Zur Beurteilung der lokalen und systemischen Transfektion des Luciferase-Plasmids wurde die konventionelle PCR durch eine quantitative Analyse in Form der Real-time PCR ergänzt.

#### Untersuchung der lokalen Transfektion

Der Nachweis der gewünschten lokalen Transfektion erfolgte mittels qRT-PCR und wurde bei allen zwölf Tieren in den Proben C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub>, die den diaphysären Bereich der rechten und linken Tibia repräsentieren, durchgeführt. Die Auswertung zeigte, dass in 19 von 24 untersuchten

Tibiaprobe (79 %) mit Hilfe dieser Methode eine mRNA-Synthese des Reportergenes Luciferase nachgewiesen werden konnte. Es wurden in diesen Knochenproben Ct-Werte von 14,42 bis 32,19 ermittelt (hier nicht dargestellt) und eine relativ quantifizierte Luciferase-Expression ( $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ ) von 0,13 bis 98647,85 mit Hilfe der in Kapitel 2.5.5 *Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)* beschriebenen Formel errechnet (Tabelle 9).

**Tabelle 9: Übersicht zum Transfektionsnachweis in den Tibiaproben aller Tiere nach qRT-PCR – relativ quantifizierte Luciferase Expression  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$**

Gruppe	4 Tage				7 Tage				28 Tage			20 Tage
C <sub>1</sub> (rechte Tibia)	–	148,06	8,28	60,55	74,29	334,30	1917,49	–	98647,85	3628,10	–	7,09
C <sub>2</sub> (linke Tibia)	2256,70	40,93	67,88	86,22	–	–	0,13	0,36	23739,47	1423,28	3373,43	0,19

In der Knochenprobe C<sub>1</sub> der rechten Tibia von drei Tieren sowie in der Knochenprobe C<sub>2</sub> der linken Tibia von zwei Tieren konnten, bei vorhandenen Ct-Werten für GAPDH, keine Ct-Werte für Luciferase ermittelt und somit auch kein ( $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ )-Wert berechnet werden. Demnach war in diesen Proben keine mRNA-Synthese des Reportergens Luciferase detektierbar. Bei drei Tieren lagen in den Proben der linken Tibia die ermittelten Ct-Werte über 30, was die geringe relativ quantifizierte Luciferase-Expression ( $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ ) in diesen Proben erklärt. Die höchste relative Luciferase-Expression fand sich in der 28-Tage-Gruppe. Das vorzeitig verstorbene Tier zeigte in beiden Tibiae eine geringe relative Expression. Die Daten sind Tabelle 9 zu entnehmen.

### Untersuchung der systemischen Transfektion mittels qRT-PCR

Zur quantitativen Real time-PCR wurden die gleichen 88 applikationsfernen Organ- und Gewebeproben der zwölf Tiere unterschiedlicher Standzeiten wie bei der konventionellen PCR analysiert.

Die Auswertung der quantitativen Analyse bezüglich der systemischen Transfektion zeigte, dass bei sieben von zwölf Tieren (58 %) jeweils in mindestens einer der untersuchten Gewebeproben eine mRNA-Synthese des Reportergens Luciferase nachgewiesen werden konnte. Dies ist in Tabelle 10 dargestellt.

Des Weiteren geht aus der Tabelle 10 die Verteilung der positiv getesteten Tiere auf die einzelnen Gruppen hervor. Es waren alle Gruppen ausnahmslos betroffen.

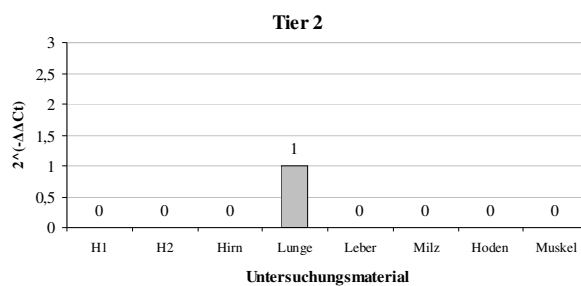


**Tabelle 10: Nachweis einer systemischen Transfektion nach quantitativer RT-PCR - Gruppenverteilung**

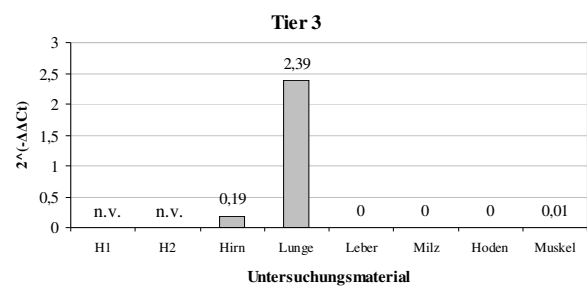
Gruppe	4 Tage	7 Tage	28 Tage	20 Tage	Total
Tiere pro Gruppe	4	4	3	1	12
Tiere mit systemischer Transfektion	3	1	2	1	7

In den nachfolgenden Abbildungen 21-27 sind die relativ quantifizierten Luciferase-Expressionen ( $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ ) der Organ- und Gewebeprobe der Tiere mit einer systemischen Luciferase-Expression, nach Gruppen gegliedert, graphisch dargestellt.

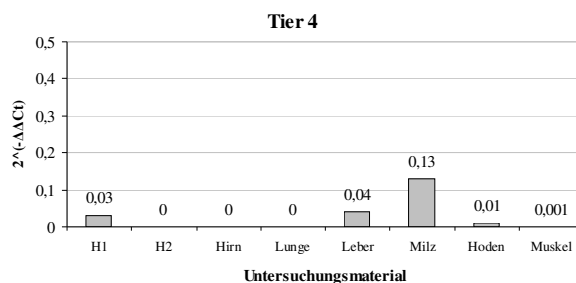
#### 4-Tage- Gruppe



**Abbildung 21: Relativ quantifizierte Luciferase-Expression der Proben von Tier 2**

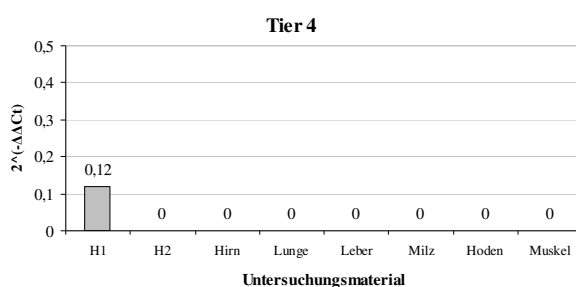


**Abbildung 22: Relativ quantifizierte Luciferase-Expression der Proben von Tier 3**



**Abbildung 23: Relativ quantifizierte Luciferase-Expression der Proben von Tier 4**

#### 7-Tage-Gruppe



**Abbildung 24: Relativ quantifizierte Luciferase-Expression der Proben von Tier 4**

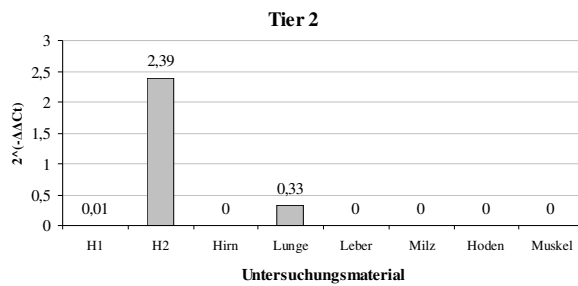
28-Tage-Gruppe

Abbildung 25: Relativ quantifizierte Luciferase-Expression der Proben von Tier 2

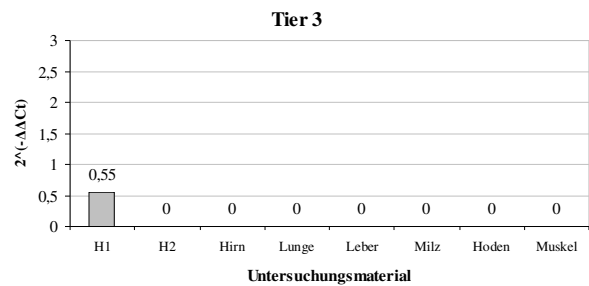


Abbildung 26: Relativ quantifizierte Luciferase-Expression der Proben von Tier 3

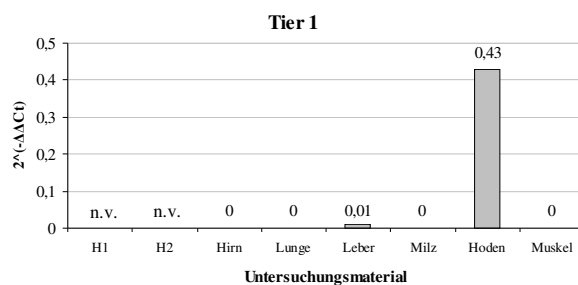
Vorzeitig verstorbenes Tier (20 Tage)

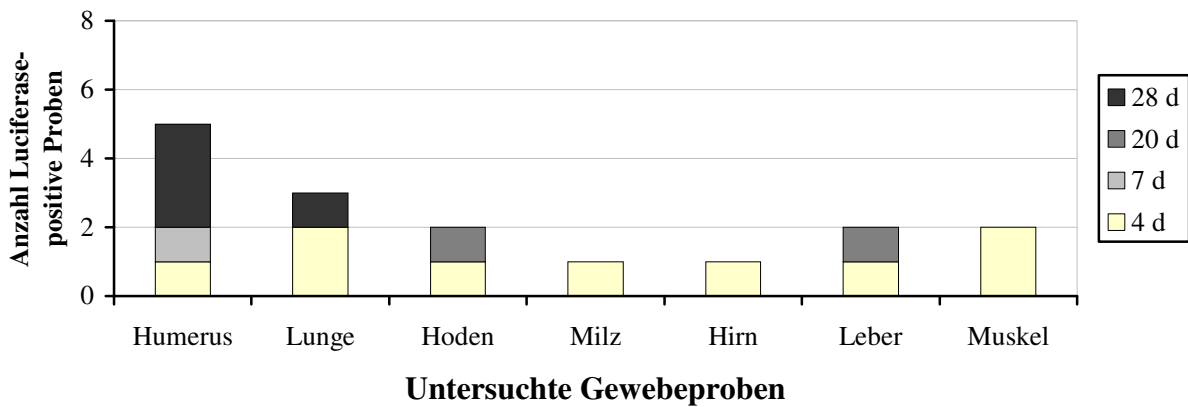
Abbildung 27: Relativ quantifizierte Luciferase-Expression der Proben von Tier 1

Die Proben des rechten und linken Humerus (H<sub>1</sub> und H<sub>2</sub>) wurden bei Tier 1-3 der 4-Tage-Gruppe, Tier 3 der 7-Tage-Gruppe und bei dem vorzeitig verstorbenen Tier nicht entnommen. Sie wurden in den entsprechenden dargestellten Diagrammen aus Gründen der Übersicht mit aufgeführt, aber als nicht verfügbar (n.v.) gekennzeichnet.

Die höchsten relativen Luciferase-Expressionen fanden sich mit einem ( $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ )-Wert von 2,39 in der Lunge eines Tieres aus der 4-Tage-Gruppe und im linken Humerus eines Tieres der 28-Tage-Gruppe.

Die nachfolgende Abbildung 28 gibt einen graphischen Überblick, in wie vielen Proben der applikationsfernen Organ- und Gewebeproben der zwölf Tiere eine mRNA-Synthese des Reportergenes Luciferase mittels quantitativer PCR nachgewiesen werden konnte.

### Quantitativer Nachweis einer systemischen Transfektion in applikationsfernen Geweben mittels qRT-PCR



**Abbildung 28:** qRT-PCR-Nachweis der systemischen Transfektion in applikationsfernen Geweben in Abhängigkeit von der jeweiligen Standzeit.

Bei vier von acht Tieren konnte eine mRNA-Synthese des Reportergenes Luciferase im Humerus nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte bei drei von zwölf Tieren in den Lungenproben eine relativ quantifizierte Luciferase-Expression ermittelt werden. In den Hoden-, Leber- und Muskelproben war jeweils bei zwei von zwölf Tieren eine mRNA-Synthese des Reportergenes Luciferase nachweisbar. In den Milz- und Hirnproben war jeweils bei einem von zwölf Tieren eine Luciferase-Expression zu verzeichnen.

Anhand dieser Auswertung wurde gezeigt, dass in 16 von 88 applikationsfernen Organ- und Gewebeproben (18 %) eine systemische Transfektion des Luciferase-Plasmids erfolgt ist. Alle untersuchten Gewebearten waren ohne Ausnahme betroffen.

In der 4-Tage-Gruppe konnte bei zwei von vier Tieren eine mRNA-Synthese des Reportergenes Luciferase in der Lunge und im Muskel mittels qRT-PCR nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden bei jeweils einem von vier Tieren Ct-Werte in den Proben von Leber, Hirn, Milz, Hoden und Humerus ermittelt.

In der 7-Tage-Gruppe wurde bei einem von vier Tieren eine mRNA-Synthese des Reportergenes Luciferase in einer der beiden Humerusproben detektiert.

In der 28-Tage-Gruppe konnte bei drei von drei Tieren eine mRNA-Synthese des Reportergenes Luciferase im Humerus nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde bei jeweils einem von drei Tieren ein Ct-Wert in der Lungenprobe ermittelt.

Bei dem Tier mit einer Standzeit von 20 Tagen konnte sowohl in der Leber- als auch in der Hodenprobe eine mRNA-Synthese des Reportergenes Luciferase nachgewiesen werden.

Insgesamt betrachtet fällt auch bei der quantitativen RT-PCR auf, dass nach vier Tagen Standzeit eine mRNA-Synthese des Reportergenes Luciferase in jeder Gewebeart mindestens einmal in der gesamten Gruppe nachweisbar war. Hingegen konnte nach sieben Tagen Standzeit nur noch ein Ct-Wert in einer der Humerusproben ermittelt werden. Nach 20 Tagen Standzeit konnte wiederum eine mRNA-Synthese des Reportergenes Luciferase in jeweils einer der Leber- und Hodenproben nachgewiesen werden und nach 28 Tagen Standzeit in den Humerus- und Lungenproben.

### **3.6 Biomechanische Untersuchung \***

Die biomechanische Untersuchung mittels push-out Test zeigte eine signifikante Zunahme der Festigkeit der Implantatfixation in der Kontrollgruppe (Titannagel) von Tag 28 zu Tag 56. Auch bei der BMP-2-Plasmid-Gruppe (Titannagel + Fibrinkleber + BMP-2-Plasmid) und der Fibrin-Gruppe (Titannagel + Fibrinkleber) war dies zu erkennen, jedoch weniger ausgeprägt.

Der push-out Test zeigte außerdem, dass die BMP-2-Applikation mit dem neu entwickelten non-viralen Vektor zusammen mit Fibrinkleber als Trägermaterial zu keiner Verbesserung der Implantatintegration führt. Verglichen mit der Fibrin- und der Kontrollgruppe wurde das Implantat in der BMP-2-Versuchsgruppe sowohl nach 28 als auch nach 56 Tagen deutlich schlechter inkorporiert. Resultat war eine signifikant verminderte biomechanische Festigkeit des Implantates im Knochen in der BMP-2-Gruppe.

Die prinzipielle Anwendbarkeit von Fibrinkleber wurde demonstriert, da kein retardierender Effekt auf die Einheilungsdauer und keine verminderte Festigkeit festgestellt wurde. Der Vergleich von Kontroll- und Fibrin-Gruppe lieferte keinen signifikanten Einheilungsunterschied.

### **3.7 Histologische Untersuchung \***

Die histomorphometrische Untersuchung nach entsprechender Aufarbeitung, Einbettung und Färbung des Knochens zeigte nach 28 Tagen Standzeit den höchsten direkten und indirekten Knochen-Implantat-Kontakt in der Kontrollgruppe. In der BMP-2-Gruppe hingegen war der indirekte Knochen-Implantat-Kontakt signifikant geringer als in der Kontrollgruppe, was die Ergebnisse der biomechanischen Untersuchung mit signifikant verminderter Implantatfixation nach 28 Tagen stützt.

Im Gegensatz dazu wiesen alle Gruppen nach 56 Tagen Standzeit einen vergleichbaren direkten und indirekten Knochen-Implantat-Kontakt auf.

Insgesamt zeigte sich sowohl in der Fibrin- als auch in der BMP-2-Gruppe eine Zunahme des direkten und indirekten Knochen-Implantat-Kontaktes von Tag 28 zu Tag 56.

\* Wie bereits erwähnt, sind die histologische sowie die biomechanische Untersuchung Bestandteile von weiteren Promotionsarbeiten und wurden an dieser Stelle verständnis- und vollständigkeithalber aufgeführt.

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Ergebnisse

Seit vielen Jahrzehnten stehen degenerative, entzündliche und traumatische Knochen- und Gelenkerkrankungen und ihre Behandlungsstrategien im Fokus der Forschung. Der künstliche Gelenkersatz, besonders des Knie- und Hüftgelenkes, ist eine der größten Entwicklungen des 20. Jahrhunderts und stellt in der heutigen Zeit eine der erfolgreichsten Operationen im Bereich der Orthopädie und Unfallchirurgie dar. Doch sowohl aktuelle Studien als auch der klinische Alltag zeigen, dass trotz aller therapeutischen Fortschritte die aseptische Lockerung noch immer die häufigste Komplikation in der Endoprothetik ist. Sie stellt mit 55,2 % die Hauptursache aller Revisionen von Hüft-Endoprothesen dar und mit 29,8 % die der Knie-Endoprothesen. Bisher konnte keine medikamentöse Therapie identifiziert werden, um periprothetische Osteolysen zu verhindern oder effektiv zu reduzieren.<sup>1, 6</sup> Sowohl diese Tatsachen als auch der Wunsch der Patienten nach lang anhaltendem Therapieerfolg mit schnellstmöglicher Rehabilitation, ohne Funktionsverlust des entsprechenden Gelenkes nach endoprothetischer Versorgung, begründen auch heutzutage noch die Grundlagenforschung zum besseren Verständnis der Knochenheilung. Der Fortschritt in der Proteinisolierung und im Bereich der molekularen Techniken ermöglichte die Herstellung von Wachstumsfaktorproteinen für die therapeutische Anwendung. Die rekombinanten humanen Wachstumsfaktorproteine BMP-2 und BMP-7 sind seit 2002 für die Behandlung von offenen Tibiafrakturen, Pseudarthrosen bei Tibiaschaftfrakturen und anterioren Fusionen im Bereich der Lendenwirbelsäule klinisch zugelassen. Die eingangs dargelegten Probleme der hohen Kosten, geringen Bioverfügbarkeit in vivo, kurzen Halbwertszeiten sowie der notwendigen hohen Dosen sind weiterhin persistent und begrenzen somit deren Einsatzmöglichkeiten. Klinische und präklinische Studien haben außerdem das Potential einer ektopen Knochenbildung sowie die Gefahr zahlreicher Nebenwirkungen wie Ödem- und Pseudarthrosenbildung, Wundheilungsstörungen und -infektionen sowie lokale Inflammationsreaktionen durch diese rekombinanten Wachstumsfaktoren aufgezeigt.<sup>60, 65, 77, 137</sup>

Eine lokale Applikation mit kontrollierter kontinuierlicher Abgabe der Wachstumsfaktoren von einem Trägermaterial, ohne Auslösung unerwünschter systemischer Effekte, oder ein gentherapeutischer Ansatz mit anhaltender Expression des Wachstumsfaktors könnten eine Lösung darstellen. Die Kombination eines Wachstumsfaktorgens mit einem non-viralen Vektor und die Einbindung in die Matrix eines Trägermaterials ermöglichen eine einmalige Applikation

des Plasmids mittels Trägermaterial und gewährleisten somit eine einfache klinische Anwendung. Im Zielgewebe könnte nach erfolgreicher Transfektion durch diesen gentherapeutischen Ansatz eine prolongierte Expression des eingebrachten Gens erreicht werden und auf diesem Wege eine Stimulierung von Zelldifferenzierung und -wachstum erfolgen.

Hierzu wurde ein Versuch zum Gentransfer eines BMP-2-Plasmides mittels eines neu entwickelten non-viralen Vektors, den COPROGs, auf der Basis von Fibrinkleber als Trägersubstanz am Kaninchenmodell durchgeführt. Es wurden für diesen Versuch insgesamt 60 New Zealand White Rabbits verwendet. Nach Implantation eines Titannagels in beide Tibiae wurde die biomechanische Festigkeit der Implantateinheilung im Auspressversuch (Push-out Test) gemessen und der Knochen-Implantat Kontakt histomorphometrisch analysiert. Diese beiden Untersuchungen sind nicht Gegenstand dieser Arbeit und die Ergebnisse wurden nur zusammenfassend aufgeführt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirksamkeit und Sicherheit der Transfektion mittels COPROGs zur Applikation des BMP-2-Plasmids am Kaninchenmodell zu untersuchen. Hierzu wurde, statt des BMP-2- ein Luciferase-Plasmid als Reportergen, zusammen mit dem non-viralen Vektorsystem COPROGs mit Fibrinkleber als Trägersubstanz, lokal intramedullär appliziert und anschließend ein Titannagel in die rechte und linke Tibia der zwölf Versuchstiere implantiert. Die Gruppenunterteilung definierte sich über die postoperativen Standzeiten von 4, 7 und 28 Tagen. Nach Ablauf der jeweiligen Standzeit wurden zur Untersuchung der lokalen Transfektionseffizienz Proben der Tibiae und zum Ausschluss einer systemischen Transfektion Proben verschiedener applikationsferner Organe und Gewebe entnommen. Diese wurden molekularbiologisch mittels konventioneller PCR analysiert. Als Ergänzung erfolgte zusätzlich eine qRT-PCR.

Die eingangs formulierte Hypothese, dass es durch den non-viralen Gentransfer eines Luciferase-Plasmids, unter der Verwendung von COPROGs, zu einer lokal nachweisbaren Genexpression im Applikationsgebiet kommt, konnte bestätigt werden. Mittels PCR wurde in allen untersuchten Knochenproben der Tibiae eine mRNA-Synthese des Reportergens Luciferase nachgewiesen.

Zahlreiche Autoren haben berichtet, dass bei unilateraler Applikation von Wachstumsfaktoren durch viralen oder non-viralen Gentransfer eine lokale Genexpression nachweisbar sei, aber kein applikationsferner Effekt, im Sinne einer systemischen Transfektion oder Transduktion, beobachtet werden konnte.<sup>46, 81-83, 112, 138-140</sup>

Die daraufhin formulierte zweite Hypothese, dass es nach lokaler Applikation eines Luciferase-Plasmids, unter der Verwendung von COPROGs, zu keiner nachweisbaren systemischen Genexpression kommt, konnte nicht verifiziert werden. Sowohl die konventionelle PCR-Analyse, als auch die quantitative Analyse mittels qRT-PCR zeigten nach lokaler Transfektion eine Luciferase-Genexpression in verschiedenen applikationsfernen Organ- und Gewebeproben nach unterschiedlichen Standzeiten.

Werden die Ergebnisse der vorliegenden Studie mit den Ergebnissen der Studie von der Arbeitsgruppe um PD Dr. med. P. Schwabe verglichen, in der ein identisches non-virales Vektorsystem zur Transfektion von BMP-2 mit einer anderen lokalen Applikationsmethode am Rattenmodell zur Anwendung kam, so zeigt sich ein divergierendes Ergebnis. Die lokale Transfektion wurde in beiden Studien nach molekularbiologischer Analyse bestätigt und damit bewiesen, dass durch die Verwendung von COPROGs als non-virales Vektorsystem eine Transfektion von Zellen *in vivo* möglich ist. Aber im Gegensatz zur vorliegenden Studie kam es in der Studie von Schwabe *et al.* unter Verwendung einer Implantatbeschichtung zur lokalen Vektorapplikation zu keiner systemischen Transfektion nach lokalem non-viralem Gentransfer eines Luciferase-Plasmids.<sup>83</sup> Mögliche Erklärungsansätze sind in der Methodik zu sehen und werden im Folgenden erörtert.

#### **4.1.1 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung**

Aufgrund der Möglichkeit systemischer Effekte durch eine systemische Genexpression nach lokaler Applikation non-viraler Vektoren besteht ein großes Interesse an einer sicheren lokalen Gentransfermethode, also einer Methode, die das Risiko einer Biodistribution minimiert sowie gleichzeitig mit geringsten DNA-Dosen die gewünschte lokale Transfektion erreicht und somit als sicher betrachtet werden kann. Daher wurden in der vorliegenden Studie sowohl ein lokaler als auch ein systemischer Transfektionsnachweis durchgeführt.

##### **Lokaler Transfektionsnachweis**

Die vorliegende Studie zeigt, dass unabhängig von der PCR-Methode, eine lokale Transfektion des Luciferase-Plasmids nach dessen intramedullärer Applikation in der Tibia der Kaninchen detektiert werden konnte. Mittels konventioneller PCR gelang in allen Bereichen der rechten und linken Tibia eines Kaninchens der Nachweis des Reportergens Luciferase nach 28 Tagen Standzeit. Bei allen weiteren Tieren wurde daher der lokale Transfektionsnachweis lediglich in



einer Probe aus dem diaphysären Bereich der rechten und linken Tibia geführt. Mit Hilfe der konventionellen PCR war in 22 von 24 Tibiae (92 %) eine mRNA-Synthese des Reportergens zu verzeichnen. Die Analyse der gleichen Proben mittels quantitativer RT-PCR wies in 19 von 24 Tibiae (79 %) eine lokale Transfektion des Luciferase-Plasmids nach. Diese Methode bestätigte und ergänzte gleichzeitig die Ergebnisse der konventionellen PCR-Analyse. Bei den zwei Tieren, bei denen in einer der beiden Tibiaproben qualitativ eine lokale Transfektion nicht gezeigt werden konnte, gelang letztlich quantitativ der Nachweis unter Verwendung des identischen Probenmaterials. Demzufolge gelang der Transfektionsnachweis in allen Knochenproben im gesamten Untersuchungszeitraum (4, 7, 20 und 28 Tage). Somit schien die gewählte Applikationsart zunächst eine geeignete Methode zur Transfektion der wachstumsfaktor-spezifischen Plasmide zu sein.

Diese Ergebnisse stehen im Konsens mit der Literatur. Schwabe *et al.* wiesen eine uneingeschränkte Expression des Luciferase-Plasmids zu allen untersuchten Zeitpunkten in allen Knochenproben nach. Zu den frühen Zeitpunkten war die Transfektion am höchsten, an Tag 28 und 42 waren nur noch geringe Mengen an Luciferase-RNA detektierbar. In den Zellkulturversuchen dieser Arbeitsgruppe konnte über 21 Tage eine Luciferase-Expression mit Peak am 6. Tag und nachfolgendem konstanten Abfall in primären Rattenosteoblasten verzeichnet werden.<sup>83</sup> Auch Scherer *et al.* zeigten 2002 in Versuchen zum Carrier-vermittelten Gentransfer mittels Vektor-geladener Kollagen-Schwämme nach subkutaner Applikation in Wistar Ratten ähnliche Ergebnisse. Bei der Verwendung von Copolymer-Protected PEI-DNA als Vektor war eine 14 Tage anhaltende transgene Expression von Luciferase zu verzeichnen. In der Zellkultur mit NIH 3T3 Mausfibroblasten wurde im gesamten Beobachtungszeitraum von 56 Tagen eine Expression des Reportergens nachgewiesen.<sup>128</sup> In einer weiteren Studie wurden humane Keratinozyten und artikuläre Chondrozyten von Kaninchen mit COPROGs-Formulierungen in Verbindung mit Fibrinkleber transfiziert. In den humanen Keratinozyten wurde eine Luciferase Expression bis zum Tag 13 (Ende der Messung) mit initialem Peak detektiert und in den artikulären Chondrozyten bis Tag 21 mit Peak am 3. Tag.<sup>67</sup> In der vorliegenden Studie wurde hingegen mittels der qRT-PCR die höchste relativ quantifizierte Luciferase-Expression nach 28 Tagen ermittelt.

## Systemischer Transfektionsnachweis

Eine Expression von Transgenen außerhalb ihres Zielgebietes könnte schwerwiegende systemische Nebenwirkungen verursachen und würde damit ein ernsthaftes Sicherheitsproblem für den lokalen non-viralen Gentransfer darstellen.

Bei dem Gros der Studien zum lokalen Gentransfer von Wachstumsfaktoren wurde bisher nicht von systemischen Effekten berichtet, sofern ein mögliches Auftreten dieser überhaupt analysiert wurde. Lediglich vereinzelte Studien sind dieser Problematik auf den Grund gegangen, obwohl bereits vor Jahren die ektopische transgene Expression als möglicher Nachteil der Gentherapie erkannt wurde.<sup>141</sup> Bevor Gentherapie-Tools eine sichere klinische Anwendung finden können, ist ein besseres Verständnis der Biodistribution der viralen und non-viralen Vektoren essentiell.

Jeschke *et al.* detektierten beispielsweise nach lokalem liposomalem Gentransfer von IGF-1 durch wöchentliche intradermale Injektionen im Rattenmodell weder im Blut noch in Leber, Milz oder Nieren eine systemische Transgenexpression.<sup>112</sup> Allerdings stellten die Autoren ihre Ergebnisse selbst in Frage, denn schon 1991 zeigten Palmer *et al.*<sup>142</sup> und vier Jahre später Li und Hoffman<sup>143</sup> das Gegenteil. Laut Jeschke *et al.* wurden Chemolumineszenz- und radioaktive Immuno-Assays verwendet, mit deren Hilfe zwar geringe Proteinmengen detektiert werden können, deren Sensitivität aber wahrscheinlich zu gering war.<sup>112</sup> In der vorliegenden Studie wurde im Gegensatz dazu die systemische Transfektion auf RNA-Ebene analysiert, was in Biodistributionsstudien ein etabliertes Nachweisverfahren darstellt.<sup>144</sup>

Auch in den Vorarbeiten zu der vorliegenden Arbeit wurde kein systemischer Effekt beobachtet. Im Rattenmodell konnte nach subkutaner Implantation von COPROGs-Kollagenschwämmen mit 50 µg DNA applikationsfern in Herz, Lunge, Leber, Milz und Nieren keine transgene Expression nachgewiesen werden.<sup>128</sup> Nach lokalem non-viralem Gentransfer von 40 µg Luciferase-Plasmid mittels COPROGs-beschichteten intramedullären TENs zeigte sich ebenfalls kein systemischer Effekt. In den Proben von Hirn, Lunge, Leber, Milz, Nieren und Ovarien sowie dem ipsilateralen M. tibialis anterior und der kontralateralen Tibia wurde weder in der konventionellen PCR, noch in der qRT-PCR ein transgenes Produkt detektiert.<sup>83</sup>

Diesen beiden Studien stehen die Ergebnisse des Sicherheitsnachweises zum Ausschluss einer systemischen Genexpression in der vorliegenden Arbeit kontrovers gegenüber. Die Daten der konventionellen PCR belegen, dass bei acht von zwölf Tieren in mindestens einer applikationsfernen Probe eine mRNA-Synthese des Reportergens Luciferase detektiert werden konnte. Dies steht im Konsens mit denen der qRT-PCR, wo bei sieben von zwölf Tieren der

Nachweis einer transgenen Expression gelang. Alle untersuchten Organe und Gewebe waren ausnahmslos betroffen. In beiden Studien wurden im Vergleich zur vorliegenden Arbeit zwar die gleichen Vektoren (COPROGs) verwendet, aber es kam eine andere Applikationsmethode und -dosis zum Einsatz.<sup>83, 128</sup>

Der Ausschluss einer systemischen Transfektion in diesen beiden Studien lässt vermuten, dass die Applikationsmethode einen entscheidenden Einfluss auf das differierende Ergebnis in der vorliegenden Arbeit hatte. Es wird angenommen, dass der Fibrinkleber als Trägermaterial des non-viralen Vektorsystems in der vorliegenden Studie intraoperativ, während der Implantation des TENs, durch den erhöhten intramedullären Druck in die Blutgefäße gepresst wurde. Es könnte eine Art „Embolie-Effekt“ entstanden sein, der zu einer Verteilung des Fibrin-Vektor-Plasmid-Gemisches im Gefäßsystem geführt hat und die systemische Transfektion erklären würde. Der sogenannte „Embolie Effekt“ basiert auf Untersuchungen zur femoralen Zementieretechnik. Durch die Injektion von Zement über eine Druckzementierpistole baut sich intramedullär ein gewisser Druck auf, wodurch nachfolgend der Markrauminhalt – Blut, Knochenmark und Debris – als Totraumvolumen nach distal in das drainierende Venensystem verdrängt wird.<sup>8</sup> In der vorliegenden Studie wurde zwar keine Zementierungstechnik verwendet, aber das Fibrin-Vektor-Plasmid-Gemisch wurde vor der Implantation des TENs direkt in den Markraum injiziert und dann der Tibianagel mittels Press-Fit-Technik eingebracht. Die dadurch im Markraum entstandenen Drücke könnten zu einer Verdrängung des Markrauminhaltes in das venöse System und dadurch zu einer systemischen Verteilung geführt haben. Bei der Applikation mittels COPROGs-Kollagenschwämmen<sup>128</sup> oder COPROGs-beschichteten intramedullären TENs<sup>83</sup> ist diese Art von „Embolie-Effekt“ aufgrund der nicht vorhandenen flüssigen Komponente nicht zu erwarten.

Hinsichtlich der Gesamtverteilung der systemischen Transfektion im eigenen Versuch korrelieren die Ergebnisse beider Nachweismethoden miteinander. Im Humerus war am häufigsten eine mRNA-Synthese des Reportergenes Luciferase zu verzeichnen – mittels PCR bei sechs von acht Tieren und mittels qRT-PCR bei der Hälfte der Tiere. An dieser Stelle könnte eine gewisse systemische ossäre Affinität des non-viralen Vektorsystems vermutet werden, aber eine eindeutige Erklärung findet sich hierzu auch nach ausführlichem Studium der Literatur nicht. An zweiter Position rangieren die Proben aus der Lunge, in denen sich konventionell bei fünf und quantitativ bei drei von zwölf Tieren eine Genexpression des Luciferase-Plasmids nachweisen ließ. Daran schließt sich der Nachweis einer relativ quantifizierten Luciferase-Expression in den Leber- und Hodenproben mittels qRT-PCR bei zwei von zwölf Tieren an

(transgene Expression in der konventionellen PCR: in der Leber bei einem von zwölf Tieren und im Hoden bei vier von zwölf Tieren). Bei den übrigen Organ- und Gewebeproben konnte mit beiden PCR-Verfahren nur bei einem geringen Anteil eine mRNA-Synthese des Reportergens Luciferase detektiert werden.

Bereits 1998 wurde im Mausmodell gezeigt, dass nach systemischer intravenöser Injektion adenoviraler Vektoren eine systemische Verteilung in verschiedenen Organen wie Leber, Lunge, Nieren und Testis mittels PCR detektiert werden konnte.<sup>145-146</sup> Hiltunen *et al.* kamen zwei Jahre später mit einem ähnlichen Versuchsaufbau zum gleichen Ergebnis.<sup>141</sup> Die Lunge und die Leber zählen bei Säugetieren, neben dem Herz, zu den am besten perfundierten Organsystemen. Bei einer angenommenen systemischen Verteilung im vorliegenden Versuch auf venösem Wege, wären diese beiden Organe nach der Applikation und dem Eindringen ins venöse System die ersten Passagestationen für das non-virale Vektorsystem. Eine transgene Expression in der Lunge, dem ersten posthepatischen Organ im Kreislaufsystem, wurde nach lokaler intrahepatischer Applikation von PEI-DNA und nackter DNA im fetalen Mausmodell nachgewiesen.<sup>147</sup> Diese Studien stehen im Konsens mit Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und stützen den Erklärungsansatz einer systemischen Verteilung des non-viralen Vektorsystems auf venösem Wege. Allerdings findet sich auch hier kein Aufschluss darüber, warum im applikationsfernen Knochengewebe (Humerus beidseits) die häufigste Genexpression des Luciferase-Plasmids detektiert wurde, denn in den genannten Studien wurden keine Knochenproben analysiert.

Des Weiteren zeigten die ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )-Werte der qRT-PCR in der vorliegenden Studie, dass nur ein geringer Teil des non-viralen Vektorsystems zirkuliert, denn in den applikationsfernen Proben konnte im Vergleich zum Applikationsgebiet nur eine sehr geringe relativ quantifizierte Luciferase-Expression nachgewiesen werden. Eine ähnliche Beobachtung machten Baltzer *et al.* nach lokalem adenoviralem Gentransfer von BMP-2, TGF- $\beta$  und Luciferase mittels Injektion in segmentale Femurdefekte von Kaninchen. Weder in der Lunge, noch in der Milz und im kontralateralen Femur war eine Luciferase-Expression detektierbar, was im Widerspruch zu den vorliegenden Ergebnissen steht. Jedoch wurde in der Leber ebenfalls eine geringe transiente Genexpression nachgewiesen. Diese wurde auf einen Austritt von viralen Vektoren während der Injektion mit nachfolgender systemischer Zirkulation zurückgeführt und für technikbedingt erklärt.<sup>91, 148-149</sup> Auch nach periadventitialem adenoviralem Gentransfer wurde eine transgene Expression in zahlreichen applikationsfernen Organen nachgewiesen. Ein direktes Eindringen der Adenoviren durch die Gefäßwand ins Gefäßsystem war mangels Nachweis positiver Zellen

in der Intima und Adventitia sehr unwahrscheinlich. Daher wurde vermutet, dass die Vektoren den periadventitiellen Raum durch die Vasa vasorum oder über das Lymphsystem verlassen haben.<sup>141</sup> Die Erkenntnisse dieser Studien stützen die Ergebnisse sowie den damit verbundenen Erklärungsansatz der Verteilung auf venösem Wege der vorliegenden Arbeit und sind zudem in gewissem Maße mit den Erkenntnissen zum systemischen Gentransfer non-viraler Vektoren mittels intravasaler Injektion vergleichbar. Dieser führt ebenfalls zu einer limitierten Genexpression in allen Hauptorganen. Dabei beeinflussen der Applikationsweg, die Geschwindigkeit der intravasalen Injektion sowie die Art des Vektors den Level der systemischen Genexpression.<sup>105, 150</sup>

Des Weiteren wiesen Baltzer *et al.* eine hohe Expression von Luciferase im Muskel nach, welche mit der starken Perfusion des den segmentalen Knochendefekt umgebenden Muskels begründet wurde.<sup>149</sup> In der vorliegenden Studie konnte in den Muskelproben ebenfalls mit beiden PCR-Verfahren eine mRNA-Synthese des Luciferase-Plasmids detektiert werden. Allerdings war die relativ quantifizierte Luciferase-Expression mittels qRT-PCR nur gering und lediglich in zwei Muskelproben nachweisbar, was im Kontrast zur Erläuterung von Baltzer *et al.* steht. Im Vergleich zu den anderen Proben wurden in den Muskelproben die geringsten mRNA-Konzentrationen gemessen (8,3-24,7 ng/µl mRNA). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Menge an isolierter mRNA für einen Nachweis des Reportergens Luciferase hier nicht immer ausgereicht hat (*siehe Kap. 4.2.8 Molekularbiologisches Vorgehen*).

Bei genauerer Analyse der Literatur zum Thema des lokalen Gentransfers fällt auf, dass auch in weiteren Genthapiestudien vereinzelt über eine systemische Distribution, eine ektope Knochenbildung oder kontralaterale Effekte, welche häufig zufällig beobachtet wurden, berichtet wurde.

1995 wurde erstmals eine systemische Zirkulation eines Genproduktes nach lokalem non-viralem Gentransfer mittels DNA-Liposomen-Komplexen auf die Haut von Mäusen geschildert.<sup>151</sup> Dies zeigt, dass bereits vor Jahrzehnten ein systemischer Effekt nach lokaler Applikation non-viraler Vektoren erkannt wurde.

Drei Jahre später wiesen Miagkov *et al.* nach non-viraler intraartikulärer Applikation von NF-kappaB-Decoy-Desoxyoligonukleotiden mittels liposomaler Komplexe im Rattenmodell eine Reduktion der Streptococcal cell wall Arthritis (SCW-Arthritis) in den behandelten Kniegelenken nach. Zudem wurde zufällig ein kontralateraler therapeutischer Effekt in den unbehandelten Gelenken der Gegenseite festgestellt, für den es zunächst keine Erklärung gab.<sup>152</sup>

Die gleiche Beobachtung machten Ghivizzani *et al.* im selben Jahr nach lokalem intraartikulären adenoviralem Gentransfer von Interleukin-1- und Tumornekrosefaktor-(TNF)- $\alpha$ -Rezeptor-IgG im Kaninchen-Arthritis-Modell. Im Serum und der Lavage-Flüssigkeit der Gelenke konnte hingegen kein signifikanter Level von TNF- $\alpha$ -Inhibitor Molekülen detektiert werden. Eine Migration adenoviraler Partikel oder bestimmter transduzierter Zellen vom Ort der Transduktion zum kontralateralen Kniegelenk und zu anderen Organen wurde postuliert. Der Versuch wurde mittels einseitigem, intraartikulären Gentransfer des Reportergens Luciferase wiederholt. Nach sieben Tagen wurde eine Luciferaseaktivität im regionalen Lymphgewebe sowie in Leukozyten und im synovialen Gewebe beider Kniegelenke und somit ein systemischer Effekt nachgewiesen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie, wurde in den Organproben von Lunge, Leber und Milz keine Luciferase detektiert. Daraus wurde gefolgert, dass ein Teil der transduzierten Leukozyten über die zugehörigen Lymphknoten oder das Kreislaufsystem zum kontralateralen Kniegelenk migrieren und für den kontralateralen bzw. systemischen Effekt verantwortlich sein könnte.<sup>153</sup> Diese Migrationstheorie wurde gestützt von Versuchen zum lokalen adenoviralem<sup>154-155</sup> und retroviralem<sup>156</sup> Gentransfer. Im Kontrast dazu stehen die Ergebnisse von Boyle *et al.*, die trotz erhöhter IL-4-Protein-Level im Serum und beidseits intraartikulär, auf der kontralateralen Seite keinen therapeutischen Effekt nachweisen sowie keine Migration beobachten konnten.<sup>157</sup> Der mehrfach in der Literatur beschriebene kontralaterale Effekt<sup>152-156, 158</sup> ist weder auf einen bestimmten Vektor noch auf eine spezielle Gentransfermethode oder ein spezifisches Genprodukt oder ein bestimmtes Arthritis-Modell begrenzt. Sein genauer zu Grunde liegender Mechanismus ist bis heute nicht vollständig geklärt. Verschiedene Mechanismen wurden diskutiert, wie beispielsweise „...das Entweichen des Virus aus dem injizierten Gelenk, generalisierte Immunsuppression durch Überexpression des transgenen Produktes, Migration von genetisch modifizierten oder funktionell veränderten Zellen oder neurogene Pfade ...“.<sup>155</sup> Die von Ghivizzani geschilderte Migrationstheorie als Begründung für den kontralateralen Effekt ist durchaus denkbar. Doch die Ergebnisse hinsichtlich der systemischen Transfektion des Luciferase-Plasmids in verschiedenen applikationsfernen Organen und Geweben in der vorliegenden Studie lassen sich allein durch diese Theorie nicht ausreichend erklären. Die im Vorangegangenen beschriebene systemische Verteilung auf venösem Wege durch im Gefäßsystem zirkulierende Vektor-Plasmid-Komplexe oder transgene Produkte scheint ein guter Erklärungsansatz zu sein. Auch Lechmann *et al.* postulierten dies 2003.<sup>155</sup> Zudem finden sich in der Literatur Gentransferversuche, in denen nach lokalem Gentransfer hohe Level transgener Produkte systemisch beobachtet wurden.<sup>157, 105</sup>

Zum kontralateralen Effekt selbst kann in der vorliegenden Arbeit keine Aussage getroffen werden. Da die Implantation des Titannagels und die Applikation des Fibrinogen-Luciferase-COPROGs-Gemisches in die Tibia der Versuchstiere beidseitig erfolgten, gibt es keine direkte kontralaterale Vergleichsmöglichkeit. Hierzu wäre ein veränderter Versuchsaufbau erforderlich. Beispielsweise könnte die Implantation eines Titannagels mit Applikation des Fibrinogen-Luciferase-COPROGs-Gemisches unilateral erfolgen, während die kontralaterale Seite nur den Titannagel erhält und als Kontrolle dient. Alternativ kann man in der vorliegenden Studie die Ergebnisse der PCR-Analyse der Humerusproben beidseits zum indirekten Vergleich heranziehen. In diesen Proben war am häufigsten eine mRNA-Synthese des Reportergens Luciferase zu verzeichnen, was durchaus im Konsens mit den genannten Studien steht.

Des Weiteren wurde in zahlreichen Studien gezeigt, dass die Wachstumsfaktoren der BMP-Familie ektope Ossifikationen in extraskelettalem Gewebe wie Muskel und Subkutangewebe induzieren können. Diese Knochenneubildung wurde in der Regel im umgebenden Weichteilgewebe nachgewiesen, sowohl nach der Applikation von rekombinanten Wachstumsfaktor-Proteinen als auch nach lokalem Gentransfer von Wachstumsfaktor-Plasmiden. Auf der Grundlage dessen wurde eine Diffusion der Wachstumsfaktor-Proteine bzw. -Plasmide in das umliegende Weichteilgewebe als ursächlich für die ektope Knochenbildung diskutiert.<sup>46, 92, 159-163</sup> BMP-2 kann die myogene Differenzierung inhibieren und ist in der Lage, die Differenzierung der Myoblasten zur osteoblastischen Linie zu konvertieren.<sup>149</sup> In der Arbeitsgruppe wurde im Gegensatz zu den genannten Studien bei keinem der Tiere, die das BMP-2-Plasmid erhielten, makroskopisch eine ektope Knochenbildung beobachtet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass dies die erste experimentelle Studie ist, die eine erfolgreiche Transfektion mit Nachweis einer lokalen Transfektionseffizienz in allen untersuchten Bereichen der Tibia in einem Kaninchenmodell der Implantateinheilung, unter Verwendung des non-viralen Vektorsystems COPROGs, in Kombination mit Fibrinkleber als Trägermatrix, beweist. Demzufolge ist prinzipiell die Verwendung der COPROGs für den direkten Gentransfer in den Knochen vielversprechend. Jedoch zeigen die Daten auch, dass ein lokaler non-viraler Gentransfer des Reportergens Luciferase mit Hilfe der COPROGs nicht nur zu einer lokalen Expression des Luciferase-Plasmids, sondern auch zu einer systemischen Transfektion führt. In diversen Organ- und Gewebeproben war mit Hilfe von zwei unterschiedlichen PCR-Verfahren eine mRNA-Synthese des Reportergens Luciferase nachweisbar. Aufgrund der in diesem Zusammenhang bestehenden Sicherheitsbedenken scheint die verwendete Applikationsmethode daher keine geeignete Methode zur Beschleunigung und

Verbesserung der Osteointegration und prospektiv keine geeignete Therapiemethode für die Behandlung von aseptischen Lockerungen in der Endoprothetik zu sein.

Da aber der lokale Gentransfer von BMP-2 mittels der COPROGs als Beschichtung eines intramedullären Kraftträgers im Rattenmodell ohne Nachweis einer systemischen Genexpression gelang<sup>83</sup>, gibt es weiter Hoffnung für die zukünftige Anwendung der COPROGs in der Genterapie der aseptischen Lockerung und anderer Erkrankungen des osteologischen Komplexes.

#### **4.1.2 Ergebnisse der Analyse von Blut, Gewicht und Körpertemperatur**

Einige Autoren haben lokale und systemische Nebenwirkungen wie Elektrolytentgleisungen, Konzentrationsänderungen von Hormonen oder Tachykardien nach systemischer Applikation von Wachstumsfaktoren beschrieben.<sup>164-166</sup>

In der vorliegenden Arbeit wurden, trotz Nachweis einer systemischen Transfektion, weder lokale noch systemische unerwünschte Wirkungen bei den zwölf Versuchstieren beobachtet. Laborchemisch wurden keine erhöhten Entzündungsparameter, keine Elektrolytentgleisungen oder andere Auffälligkeiten im Blutbild nachgewiesen. Innerhalb der Gruppen unterschiedlicher Standzeiten und zwischen den verschiedenen Gruppen sind bezüglich der erhobenen Blutparameter keine Unterschiede festgestellt worden. Im gesamten Untersuchungszeitraum fanden sich bei den zwölf Tieren makroskopisch keine Infektionszeichen. Die lokale Applikation der Wachstumsfaktor-Plasmide mittels COPROGs und Fibrinkleber als Trägersubstanz hatte keinen Einfluss auf die Körpertemperatur und das Gewicht der Tiere. Bei allen Tieren war eine physiologische geringe Gewichtszunahme im beobachteten Zeitraum zu verzeichnen. Demnach ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen, die auf die lokale Applikation zurückzuführen sein könnten. Auch bei dem nach 20 Tagen vorzeitig verstorbenen Tier waren keine Abweichungen feststellbar.

Gemäß den veröffentlichten Daten von Julius Höhne, die Gegenstand einer anderen Dissertation sind, fanden sich auch bei den Tieren der Kontroll-, Fibrin- und BMP-2-Gruppe weder Auffälligkeiten bei der Auswertung der laborchemischen Parameter und der Daten von Körpergewicht und -temperatur noch makroskopische Infektionszeichen.<sup>167</sup>



## 4.2 Diskussion der Methodik

### 4.2.1 Tiermodell

Das Kaninchen hat sich als geeignetes Tiermodell bei Fragen zum osteologischen Themenkomplex etabliert.<sup>91, 148-149, 168-169</sup> Vom Netzwerk Regenerative Orthopädie (NRO) der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie (DGOU) wird unter anderem das Kaninchenmodell für die Forschung zur Regeneration von Knorpel und Knochen empfohlen.<sup>170</sup>

Die Haltung von Kaninchen ist kostengünstig und problemlos. Bei geringem Haltungsaufwand ist eine größere Anzahl der Tiere jederzeit leicht verfügbar. Im vorliegenden Versuch konnten bis zu vier Tiere pro Tag operiert werden.

Zur Implantation eines intramedullären Kraftträgers mit anschließender biomechanischer, histologischer und molekularbiologischer Auswertung wurde mit den New Zealand White Rabbits ein Tiermodell gewählt, das in Studien zur Untersuchung von vitalem Knochen unter physiologischen Lastbedingungen etabliert ist.<sup>171</sup> Zahlreiche Studien haben zudem gezeigt, dass es problemlos möglich ist, Knochengewebe dieser Tiere non-viral zu transfizieren.<sup>172-174</sup> Der Markraum der New Zealand White Rabbits bot mit durchschnittlich 320 mm<sup>3</sup> ein ideales Volumen zur Implantation des 240 mm<sup>3</sup> messenden Titannagels und zur Applikation der Fibrinogen-COPROGs-Formulierung.

Prinzipiell konnte die Anwendbarkeit dieses Versuchsaufbaus am Kleintiermodell gezeigt werden, was die Übertragung auf ein größeres Tiermodell in der Zukunft ermöglicht. Bei der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen müssen allerdings aufgrund von Unterschieden in der Struktur<sup>175-176</sup> und Regenerationsdauer<sup>65</sup> des Kaninchenknochens sowie in der biomechanischen Belastung, bedingt durch die Lage der Extremitäten zur Tragachse, Einschränkungen gemacht werden.

### 4.2.2 Untersuchte Zeitpunkte

Die FDA empfiehlt seit 2007 bei den Analysen zur Biodistribution, Persistenz und Integration von Vektoren und DNA-Plasmiden im Rahmen von Gentherapie-Studien eine Untersuchung der Proben zu multiplen Zeitpunkten, in Form von Tagen bis Monaten nach Administration.<sup>177</sup> In der vorliegenden Studie wurden drei Zeitpunkte untersucht, um eine mögliche systemische Transfektion nach lokalem Gentransfer mit Beurteilung des zeitlichen Verlaufs zu analysieren. Ein Tier mit 28 Tagen Standzeit starb vorzeitig und wurde am 20. Tag untersucht. Nach 4 und 7

Tagen wurden jeweils vier Tiere und nach 28 Tagen drei Tiere getötet und anschließend untersucht. Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse zu den drei Zeitpunkten demonstriert, dass die Standzeit der Tiere bei allgemeiner Betrachtung keine Rolle bei der systemischen Transfektion zu spielen scheint. Mit beiden PCR-Methoden konnte nach Ablauf der Standzeit in jeder Gruppe bei mindestens einem Tier eine Luciferase-Expression applikationsfern nachgewiesen werden. Betrachtet man jedoch die Daten genauer, so fällt auf, dass die Dauer der Transfektion und damit indirekt auch die Standzeit einen gewissen Einfluss auf die Verteilung der systemischen Transfektion des Luciferase-Plasmids gehabt haben könnte. Initial, 4 Tage nach Transfektion, wurde mit Hilfe der qRT-PCR in neun und mit der konventionellen PCR in acht Proben eine Luciferase-Expression nachgewiesen, wohingegen dies 28 Tage nach Transfektion nur noch in vier (qRT-PCR) und in fünf Proben (konventionelle PCR) gelang. Demnach scheint kurze Zeit nach der lokalen Applikation, nach vermutlicher Verteilung des non-viralen Vektorsystems auf venösem Wege, eine ausgeprägtere systemische Transfektion zu bestehen als zum Ende des Versuches. Zudem war zum ersten Untersuchungszeitpunkt mittels konventioneller PCR eine mRNA-Synthese des Reportergenes Luciferase ubiquitär in jeder untersuchten Organ- und Gewebeart bei mindestens einem Tier der 4-Tages-Gruppe nachweisbar. Hingegen zeigten sich nach sieben Tagen Standzeit nur noch in den Humerus-, Hoden-, Milz- und Lungenproben Luciferase-Banden in der Gelelektrophorese. Zum letzten Untersuchungszeitpunkt an Tag 28 war eine Luciferase-Expression lediglich im Humerus und Hoden sowie in der Milz detektierbar. Die Auswertung der Ergebnisse der qRT-PCR lässt allerdings diesbezüglich kein eindeutiges Muster erkennen.

In den in der Diskussion im *Kapitel 4.1.1 Ergebnisse der Molekularbiologischen Untersuchung* bereits erwähnten Studien, in denen eine systemische Transfektion/Transduktion nach lokalem Gentransfer nachgewiesen wurde, war diese mindestens 2 und maximal 14 Tage detektierbar gewesen.<sup>91, 141, 147-149, 151-153</sup> Nur Baltzer *et al.* beschrieben nach adenoviralem Gentransfer im Kaninchenmodell eine geringe transiente Genexpression von Markergenen im Weichteilgewebe, Muskel und in der Leber, die erst nach 26 Tagen Standzeit nicht mehr nachweisbar war.<sup>91</sup> Betrachtet man die Ergebnisse dieser Studien, scheint die maximale Standzeit von 28 Tagen in der vorliegenden Studie gerade ausreichend zu sein. Allerdings zeigen die eigenen Ergebnisse, dass für weiterführende Aussagen zum Einfluss der Standzeit auf die systemische Transfektion weitere Untersuchungen mit längeren Standzeiten erforderlich sind.

Der detaillierte Nachweis der lokalen Transfektion erfolgte bei einem Tier mit 28 Tagen Standzeit in fünf verschiedenen Bereichen beider Tibiae. Zu diesem Zeitpunkt war in allen

Bereichen eine mRNA-Synthese des Reportergens Luciferase mittels PCR nachweisbar. Bei den übrigen Tieren wurden nur Proben aus dem diaphysären Bereich der Tibia mittels PCR und qRT-PCR analysiert. Auch in diesen Proben wurde nach 28 Tagen Standzeit mittels konventioneller PCR bei sechs von sechs Proben und mittels qRT-PCR bei fünf von sechs Proben eine transgene Luciferase-Expression detektiert. Dabei war die relativ quantifizierte Luciferase-Expression in den Tibiaproben der 28-Tage-Gruppe am höchsten. Dies steht eindeutig im Kontrast zu den Ergebnissen der bisherigen COPROGs-Studien<sup>67, 83, 128</sup>, in denen initial eine ausgeprägte und nachfolgend eine bis zu 21 Tage persistierende geringe Genexpression des Reportergens Luciferase detektierbar war. In der Zellkultur-Studie an NIH 3T3 Mausfibroblasten konnte nach Carrier-vermittelten Gentransfer im COPROGs-Kollagen-Schwamm-Modell über die gesamte Versuchsdauer von 56 Tagen eine Luciferase-Expression detektiert werden.<sup>128</sup> Daraus geht hervor, dass auch für Aussagen zur Expressionsdauer weitere Versuche mit längeren Standzeiten erforderlich sind.

### 4.2.3 Fibrin

In der Gentherapieforchung werden viele Trägermaterialien für den Gentransfer untersucht. Es werden hohe Ansprüche an die Carrier gestellt, die als Matrix für die Wirksubstanz dienen und eine kontrollierte transiente Abgabe dieser ermöglichen sollen. Des Weiteren sollte die Matrix die Funktion eines Gerüsts übernehmen und damit die Zellmigration im Bereich der Gewebsregeneration steuern. Zudem ist ein gut gewebeverträgliches Trägermaterial ohne systemische Nebenwirkungen wünschenswert.<sup>178</sup>

Fibrin kommt natürlicherweise im Menschen und auch im Kaninchen vor und kann in Form des Fibrinklebers durch dessen fehlende Toxizität, der nachgewiesenen guten Biokompatibilität, Biodegradierbarkeit und Zellbindungskapazität die Funktion als biologisches Trägermaterial übernehmen.<sup>119, 122</sup> In der Regel ist das Fibringerüst einer Fibrinmatrix nach drei bis vier Wochen abgebaut.<sup>179, 180</sup> Bis dahin dient es als provisorische extrazelluläre Matrix, die eine Migration und die Differenzierung von Zellen ermöglicht, bis diese das Fibrin ersetzt haben.<sup>181</sup> 2001 kam erstmals ein solches Fibrin-vermitteltes Gentransfersystem zum Einsatz. Zur Transduktion humaner Keratinozyten wurde herkömmlicher kommerziell verfügbarer Fibrinkleber als Fibrinmatrix mit einem pCMVhEGF-Plasmid zusammen in vitro und in vivo verwendet und als gut biodegradierbar, nicht immunogen und nicht inflammatorisch beschrieben.<sup>121</sup> In verschiedenen Studien wurde der therapeutische Benefit des Fibrinmatrix-vermittelten

---

Gentransfers nachgewiesen und die mit der Anwendung von Fibrinkleber verbundenen Möglichkeiten der Wirkung von Wachstumsfaktoren ausführlich beschrieben. Seine Effizienz als Trägersubstanz zum kontrollierten Transfer von Wachstumsfaktoren wurde demonstriert. Er wurde als ideales natürliches Reservoir zur Bindung und Abgabe verschiedener Wachstumsfaktoren sowie als gutes Hilfsmittel zur Platzierung und Sicherung von biologischen Implantaten identifiziert.<sup>67, 72, 124-125, 182</sup>

Die grundlegenden Arbeiten zur Kombination von Fibrinogen und dem in der vorliegenden Studie verwendeten non-viralen Vektorsystem COPROGs wurden an der TU München durchgeführt. Die Fibrinkleber-COPROGs-Formulierung diente dabei als Carrier-Matrix. Ihre Wirksamkeit zur Transfektion von Wachstumsfaktor-Plasmiden wurde in diversen Zellkulturen demonstriert.<sup>67, 129, 180</sup> Aus diesen Studien und den Ergebnissen der eigenen Arbeitsgruppe geht hervor, dass kommerziell verfügbarer Fibrinkleber ein geeignetes Trägermaterial für COPROGs und ein hocheffizientes Mittel zur Applikation von Genen zu sein scheint. Die hämostatischen Eigenschaften des Fibrins konnten intraoperativ zur Reduktion der intramedullären Blutung aus der Tibia genutzt werden.

In Vorarbeiten zur dieser Arbeit wurde jedoch eine durch die COPROGs verursachte, dosisabhängige Verlängerung der Zeit bis zum Beginn der Thrombusbildung beobachtet.<sup>67</sup> Dies könnte in der vorliegenden Studie als Erklärungsansatz zur systemischen Verteilung des Reportergens Luciferase durchaus eine zusätzliche Rolle spielen.

#### **4.2.4 COPROGs und PEI**

Seit dem ersten erfolgreichen non-viralen Gentransfer 1987 durch Felgner *et al.* hat es viele Fortschritte gegeben. Es wurden zahlreiche neue non-virale Vektoren entwickelt, welche in erster Linie die viral-induzierten Probleme wie Immunogenität, Toxizität und Kanzerogenität vermeiden und trotzdem eine akzeptable Transfektionseffizienz erreichen sollten. Doch all den Studien zum non-viralen Gentransfer der letzten drei Dekaden ist eines gemeinsam: die geringe Transfektionseffizienz. Die Lösung des Problems könnten die in der vorliegenden Studie verwendeten COPROGs von der Münchner Arbeitsgruppe um Prof. Dr. C. Plank und Prof. Dr. A. Stemberger darstellen.<sup>106</sup> Das Konzept dieser neuartigen non-viralen Vektoren zum Gentransfer von Wachstumsfaktoren basiert auf den seit 1995 erfolgreich angewandten Polyethylenimin-(PEI)-Verbindungen. Boussif *et al.* demonstrierten PEI als vielseitiges Polykation mit pH-unabhängiger Protonenschwamm-Wirkung und geringer Toxizität. Durch

seine lysosomalen Puffereigenschaften ermöglicht es die Liberation der DNA aus den Lysosomen ins Zytoplasma. Der PEI-vermittelte Gentransfer wurde in vitro anhand von Zellkulturen mit verschiedenen Zelltypen und in vivo ausführlich untersucht. Eine Reduktion von unerwünschten Nebenwirkungen wie Immunogenität, unspezifische Interaktionen und Degradation konnte gezeigt werden.<sup>116, 130, 183</sup>

Erste Versuche zu den COPROGs demonstrierten, dass das protektive Copolymer die sterische Stabilität der PEI-DNA-Komplexe gewährleistet und vor Opsonierung und Komplementaktivierung schützt.<sup>106</sup> In der Zellkultur wurden NIH-3T3 Mausfibroblasten mit COPROGs-beladenen Kollagenschwämmen erfolgreich transfiziert. Im Tiermodell dienten subkutan implantierte genmodifizierte Schwämme als Carrier für die Vektoren. Die Barrieren der Genterapie konnten mit Hilfe der COPROGs überwunden werden (*siehe Kap. 1.3.8 Die physiologischen Barrieren der Genterapie und Kap. 1.3.10 Copolymer-Protected Gene Vectors*), ohne dass sie den eigentlichen Gentransfer störten. Durch ihre Vektorstabilität erhöhten sie, im Vergleich zu freier und ungeschützter DNA, die Transfektionseffizienz deutlich.<sup>128, 130, 183</sup>

Im Rahmen der biophysikalischen Charakterisierung der COPROGs wurde gezeigt, dass nur ein geringer Teil der PROCOPs die PEI-DNA-Komplexe in kleiner Größe stabilisiert, der Hauptanteil aggregiert hingegen mit dem freien PEI und formt sogenannte „Geisterpartikel“. Dies führt zu einer signifikanten Reduktion der freien PEI-Moleküle, die in großer Menge toxisch sind, und wurde gleichzeitig als Erklärung für den Schutz vor Opsonierung gewertet.<sup>130</sup> Im Vergleich dazu wurde erst kürzlich in einer Studie zum non-viralen Gentransfer mittels Fibrin-GAM und BMP-2/BMP-7 eine Verringerung des therapeutischen Effektes bei zusätzlicher Verwendung eines anderen kationischen Polymers (Poly(hydroxylalkylene)imine), das diese Fähigkeit der COPROGs nicht besitzt, beobachtet. Als zu Grunde liegender Effekt wurden zytotoxische Wirkungen des PEIs diskutiert.<sup>182</sup>

Fibrinkleber ist mit non-viralen Vektoren gut kombinierbar.<sup>121</sup> Bisher existieren allerdings nur zwei Studien, bei denen die COPROGs ko-lyophilisiert mit Fibrinogen, wie in der vorliegenden Arbeit, Anwendung fanden. Damit gelang eine deutlich effizientere Transfektion von Mausfibroblasten als bei der Verwendung von nackter PEI-DNA. Hierbei ist besonders die Freisetzung der Vektoren aus der Matrix zu beachten. Im Gegensatz zur nackten DNA mit 80 % Freisetzung in 20 Tagen, zeigten die in der Fibrin-Matrix immobilisierten COPROGs eine deutlich geringere, von der Fibrinogenkonzentration unabhängige, annähernd lineare Freisetzungskinetik von 0,29 % pro Tag. Dies entspricht weniger als 10 % in 20 Tagen.<sup>67, 129</sup>

Diese lang anhaltende *in vitro* Freisetzung kann somit auch die nachgewiesene *in vivo* Transfektion nach 28 Tagen noch erklären.

In einigen weiteren Transfektionsversuchen konnte durch die Applikation von verschiedenen COPROGs-Plasmid-Formulierungen in Zellkulturen mit primären humanen Keratinozyten und primären Chondrozyten von New Zealand White Rabbits nach indirektem Gentransfer eine effiziente Genexpression demonstriert werden. Zudem gelang elektronenmikroskopisch der Nachweis von COPROGs in Vesikeln im Zytoplasma von transfizierten Chondrozyten mit hoher endozytotischer Aktivität, was auf eine erfolgreiche Transfektion zurückgeführt werden konnte. Insgesamt konnte jedoch *in vivo* keine Langzeitexpression erreicht werden. Dies ist möglicherweise auf ein zu geringes Expressionslevel und eine nicht ausreichende Expressionskinetik zurückzuführen. Damit unterstreichen diese Versuche, dass weitere Verbesserungen der Transgenexpression mittels COPROGs nötig sind.<sup>67, 129</sup>

Am ehesten konvergent mit der vorliegenden Arbeit, wenn auch unterschiedlich im Versuchsdesign, sind die Untersuchungen der Arbeitsgruppe Schwabe *et al.* Bezug nehmend auf deren Ergebnisse<sup>83</sup>, die im Rahmen der Diskussion des lokalen und systemischen Transfektionsnachweises ausführlich dargestellt wurden, und die von De Laporte *et al.* 2006 formulierten Anforderungen an ein optimales Vektorgrundgerüst<sup>101</sup>, scheinen die COPROGs ideal als Vektor für den non-viralen Gentransfer geeignet zu sein. Sie haben funktionelle Gruppen zur Interaktion mit ihrer Umgebung und den intrazellulären Transportprozessen. Damit können sie die Barrieren des Gentransfers problemlos überwinden. Der Vektorkomplex bildet nicht nur einen stabilen Komplex mit der Nukleinsäure, sondern ist auch in der Lage, die Nukleinsäure wieder freizugeben. Zytotoxizität besteht nicht, es wird sogar die Toxizität des freien PEIs reduziert. Zudem besteht die Möglichkeit zur Gefriertrocknung der hüllpolymergeschützten Vektoren mit geringem Aktivitätsverlust und zur Ko-Lyophilisation mit Fibrinogen.<sup>67, 130</sup> Demzufolge könnten die COPROGs in der verwendeten Form problemlos als Fibrinogen-COPROGs-Plasmid-Gemisch analog zum häufig verwendeten Fibrinkleber eingesetzt werden. Allerdings zeigten die vorab geschilderten Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass eine klinische Anwendung aufgrund des Sicherheitsrisikos durch den Nachweis einer systemischen Transfektion zum gegenwärtigen Zeitpunkt undenkbar ist.

#### 4.2.5 Luciferase-Plasmid

In der vorliegenden Studie wurde zum non-viralen Gentransfer eine Formulierung, bestehend aus Fibrinkleber, COPROGs und einer Plasmid-DNA verwendet. Das Plasmid p55pCMV-IVS-luc<sup>+</sup> kodierte für die Firefly Luciferase als Reporter gen, unter der Kontrolle des Promotors CMV, und wurde von dem Institut für Experimentelle Onkologie der TU-München bereitgestellt. Das BMP-2-Plasmid wurde für den Sicherheitsnachweis nach lokalem non-viralem Gentransfer nicht verwendet, da die Homologie zwischen lokal induzierten und endogen produzierten Wachstumsfaktoren eine Differenzierung zwischen beiden unmöglich gemacht hätte. Die Wahl fiel auf das Reporter gen Luciferase, da es zur Determinierung der Transfektions- oder Transduktionseffizienz nach dem Gentransfer etabliert ist.<sup>82, 91, 148-149, 184</sup>

Ursprünglich sollte zur Detektion der Luciferase-Expression in der vorliegenden Studie ein Luciferase-Lumineszenz-Assay verwendet werden. Allerdings gelang es in den Vorarbeiten nicht, mit dieser Methode die Luciferase in den Organ- und Gewebeproben zuverlässig nachzuweisen. Beinhalten die zu untersuchenden Proben Hämoglobin, so kann die Detektion der Luciferase-Aktivität mittels Luciferase-Lumineszenz-Assay maskiert werden. Eine Unterschätzung des Luciferase-Levels wäre die Folge. Die einzige effektive Methode, das Hämoglobin aus den Organen zu entfernen, wäre die intrakardiale Perfusion des noch lebenden Tieres mit beispielsweise Natriumchlorid. Die Detektion des exprimierten Proteins mittels Luciferase-Assay wäre allen anderen Nachweisverfahren vorzuziehen, da diese den vollen Umfang der induzierten Expression aller Transgene demonstrieren könnte.<sup>118</sup> Aber auf Grund des beschriebenen Sachverhaltes, und nicht zuletzt aus ethischen Gründen, wurde von dieser Methode Abstand genommen. Als alternative Nachweismethode wurde die PCR gewählt. Sie findet in Biodistributionsstudien und zur Bestätigung einer Vektor-Expression regelmäßig Anwendung und ist als äußerst wichtiges Forschungs- und Diagnostik-Instrument etabliert.<sup>144</sup>

#### 4.2.6 Applikationsdosis

Die Frage nach der adäquaten Applikationsdosis für eine erfolgreiche Transfektion, ohne das Risiko einer systemischen Transfektion zu erhöhen, ist bisher ungeklärt. Im vorliegenden Versuch wurden in jede Tibia 84 µg Luciferase-COPROGs, ko-lyophilisiert mit Fibrinogen, nach Rehydrierung zusammen mit der Thrombinkomponente appliziert. Diese Menge stellte herstellungsbedingt die maximale Beladungskapazität der Fibrinogenkomponente dar, ohne die Maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) des Fibrinklebers zu beeinträchtigen.

Nach Sichtung der Literatur zu diesem Thema wurde deutlich, dass ein Vergleich der verwendeten Mengen zur Bestimmung der adäquaten Dosis sehr schwierig und nur eingeschränkt möglich ist. Unterschiedlichste Dosen wurden in diversen Tiermodellen mit verschiedenen Applikations- und Gentransfermethoden untersucht. Fang *et al.* zeigten beispielsweise nach non-viralem Gentransfer eines BMP-4-Plasmids mittels GAM im Rattenmodell und Bonadio *et al.* mit einem ähnlichen Versuchsaufbau eine dosisabhängige Expression der Plasmid-DNA. Dabei kamen Dosen von 0,5-100 mg Plasmid-DNA zum Einsatz.<sup>81, 93</sup> Zudem wurden in diversen Studien dosisabhängige BMP-2-Expressionen nach viralem und non-viralem Gentransfer festgestellt.<sup>46, 76, 78, 94, 185</sup> In der Studie von Schwabe *et al.* wurden 40 µg Plasmid-DNA appliziert. Auf der Grundlage der Ergebnisse wurde gefolgert, dass die Dosis zu gering war und eine höhere Applikationsdosis den Effekt auf die Frakturheilung verbessern könnte. Gleichzeitig wurde auf die Gefahr einer systemischen Distribution oder einer inflammatorischen Reaktion verwiesen.<sup>83</sup> Diese Sicherheitsbedenken und die Tatsache, dass die Applikation von 84 µg Luciferase-COPROGs im eigenen Versuch zu einer systemischen Transfektion geführt hat, lassen eine weitere Überlegung zu: Die Applikationsdosis könnte zu hoch gewesen sein und konsekutiv zum Auftreten einer systemischen Distribution geführt haben. Ein dosisabhängiger Effekt wurde auch in einem Schafmodell diskutiert, wo nach lokalem adenoviralem Gentransfer eine systemische Expression in verschiedenen Organ- und Gewebeproben nachgewiesen wurde, die in Kleintiermodellen nicht detektierbar war.<sup>184</sup> Auch Oh *et al.* stellten dosisabhängige Nebenwirkungen nach systemischer Applikation von PEI-Plasmid-DNA fest. Bei zweimal wöchentlicher Applikation über drei Wochen zeigte sich eine Inflammationsreaktion im Bereich der Leber, die bei einmaliger Gabe pro Woche nicht zu verzeichnen war.<sup>183</sup> Zwar erfolgte in der vorliegenden Studie weder eine systemische noch eine wiederholte Applikation, aber eine Verteilung auf venösem Wege wird angenommen, deren Auswirkungen im Endeffekt durchaus mit denen einer systemischen Applikation vergleichbar sind.

Des Weiteren werden speziesspezifische Dosen zur Auslösung einer zellulären Antwort unter der Annahme unterschiedlicher Knochenumbauraten diskutiert.<sup>66</sup> Die Relation zwischen Applikationsdosis und Gewicht des Tieres sowie Größe des zu behandelnden Defektes könnte ebenfalls ein relevanter Faktor sein. Aber auch die optimale Dauer der transgenen Expression spielt eine Rolle und ist bisher unklar. Aus einer zu kurzen Expression würde eine insuffiziente Knochenbildung resultieren, wohingegen bei zu langer Transgenexpression die Gefahr lokaler



oder systemischer Nebenwirkungen bestünde. Für jede Vektor-Formulierung müssen demnach individuell das adäquate Zeitintervall und die geeignete DNA-Menge identifiziert werden.

Anhand der vorausgegangenen Ausführungen wird klar, dass die in dieser Studie verwendete Applikationsmethode und -dosis für COPROGs mittels Fibrin zur lokalen Applikation des BMP-2-Plasmides nicht als geeignet angesehen werden kann. Daher sind bezüglich der Applikationsdosis von Vektor und Plasmid weitere experimentelle Untersuchungen erforderlich, um eine effiziente und sichere Transfektion mit den COPROGs zu ermöglichen.

#### **4.2.7 Probenentnahme und Aufarbeitung**

Die Probenentnahme erfolgte zügig nach der Tötung der Tiere. Unter sterilen Kautelen wurden Proben von Lunge, Leber, Milz, Hirn, Hoden und Muskel sowie die Tibia beidseits entnommen. Nach den ersten Ergebnissen mit dem Nachweis einer systemischen Transfektion wurde die Probenentnahme mit der zusätzlichen Entnahme von Humerusproben beidseits erweitert. Die DNA-/RNA-Extraktion erfolgte schnellstmöglich nach Entnahme, damit die Konzentration der Taq Polymerase Inhibitoren und die Wirkung der RNasen minimiert werden konnten.<sup>144, 186</sup> Daher wurden die Proben entnommen, sofort mit RNAlater<sup>®</sup> bedeckt, schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Der Nutzen der RNAlater<sup>®</sup>-Applikation wurde erst kürzlich in einer Studie zur Optimierung der RNA-Extraktion aus RNase-reichem Pankreasgewebe demonstriert. Durch Versetzen der Proben mit RNAlater<sup>®</sup> gelang auch nach 24 Stunden Lagerung noch der Nachweis von RNA hoher Qualität.<sup>187</sup>

Der Sicherheitsnachweis zum Ausschluss einer systemischen Genexpression nach lokaler Applikation von Plasmiden ist mit einer Biodistributions-Studie vergleichbar. Das Ziel ist, die Distribution eines Vektors in applikationsfernen Organen und Geweben zu beurteilen. Somit können Aussagen zur potentiellen Toxizität und Beständigkeit des Vektors in vivo getroffen werden. Welche Proben entnommen und analysiert werden, hängt vom Vektortyp und von der Applikationsart ab. Meist sind Proben von gut vaskularisierten Organen wie Hirn, Lunge, Leber, Milz und Nieren sowie drainierende Lymphknoten von Interesse. Wegen eines möglichen Transfers von DNA in die Keimbahn werden in Biodistributionsstudien für gewöhnlich auch Proben der Gonaden entnommen.<sup>144, 186</sup> Die in der vorliegenden Studie entnommenen Proben entsprechen den Empfehlungen zu Biodistributionsstudien, mit Ausnahme der fehlenden Nieren- und Lymphknotenproben. Da bei nicht eindeutig geklärtem Verteilungsweg der Vektoren eine systemische Transfektion nachgewiesen wurde, wäre eine weiterführende Analyse mit der

Untersuchung weiterer Proben erforderlich. Bei vermuteter systemischer Verbreitung auf der Grundlage des beschriebenen „Embolie-Effektes“ wäre in erster Linie eine Analyse von Blutproben wichtig. Darauf wurde in der vorliegenden Studie verzichtet, da bereits in den Vorversuchen der RNA-Nachweis mit dem RNeasy Mini Kit im Blut nicht gelang. Mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode kann nur RNA detektiert werden. Somit konnten die Luciferase COPROGs, welche aus DNA bestehen, nicht direkt nachgewiesen werden. Bei einer systemischen Verteilung der COPROGs über das Gefäßsystem werden diese allerdings nicht unbedingt von im Blut zirkulierenden Zellen aufgenommen und in RNA umgeschrieben. Somit gestaltet sich der RNA-Nachweis aus dem Blut schwierig.

Des Weiteren sollten in Biodistributionstudien mit gentherapeutischen Vektoren ausreichend Proben, laut FDA mindestens drei separate von jedem Gewebe<sup>177, 188</sup>, entnommen werden, um die Heterogenität der Strukturen und Funktionen innerhalb eines Organs auszugleichen und um mögliche lokale Vaskularisationsunterschiede zu kompensieren. Mit Beginn der vorliegenden Studie lagen die aktuellen Empfehlungen der FDA noch nicht vor, somit konnten sie nicht berücksichtigt werden. Mit Ausnahme der Tibia wurde jeweils nur eine Probe entnommen. Dies könnte zu den sehr unterschiedlichen photometrisch gemessenen mRNA-Konzentrationen in den Organ-, Gewebe- und Humerusproben einiger Tiere beigetragen haben. Dennoch war in zahlreichen Proben eine mRNA-Synthese des Reportergens Luciferase nachweisbar. Es ist anzunehmen, dass bei Befolgen der FDA-Empfehlungen noch mehr Proben eine systemische Genexpression gezeigt hätten.

Aufgrund der Erwartung, in den applikationsfernen Organen sowie Knochen und anderen Geweben sei im Gegensatz zur Tibia das Reportergen Luciferase nicht nachweisbar, erfolgte die Explantation der Tibiae zum Schluss, um eine Kontamination zu vermeiden. Es wurde unter sterilen Kautelen gearbeitet, aber eine Kreuzkontamination bei der Probenentnahme kann nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden.

#### **4.2.8 Molekularbiologisches Vorgehen**

Die Isolation der RNA erfolgte mittels RNeasy® Mini Kit 50. Von den Organ- und Gewebeproben wurden jeweils 50 mg Material eingesetzt, welches sich hinsichtlich seiner Konsistenz und Struktur wesentlich unterschied. Diese Tatsache schlug sich in der photometrischen Messung der RNA-Menge nieder, welche zum Teil sehr große Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben zeigte. Es wurden Konzentrationen von 8,3 ng/µl im Muskel

bis 4140,3 ng/ $\mu$ l in der Milz gemessen. In den parenchymatösen Organen wurden die höchsten Konzentrationen an mRNA nachgewiesen, was der Erwartung entsprach. Die RNA-Isolation aus Muskelgewebe hingegen ist schwierig, da dieses sehr faserreich ist. Vor der RNA-Isolation wurde auf eine vollständige Homogenisierung der Muskelproben geachtet, da eine unvollständige Homogenisierung und inkomplette Lyse bei faserigem Ausgangsmaterial die RNeasy-Säulen verstopfen und zu einer geringeren RNA-Ausbeute führen kann. In Anbetracht der sehr geringen gemessenen RNA-Konzentration in den Muskelproben wäre eine Erhöhung der eingesetzten Ausgangsmenge auf 100 mg oder die RNA-Isolation nach einem anderen Protokoll oder mit einem anderen RNeasy Kit überlegenswert gewesen. Befindet sich im Gegensatz dazu sehr viel RNA in einer Probe, besteht wiederum die Gefahr, dass die Bindungskapazität der RNeasy-Säulen überschritten wird, und dadurch nur eine geringe RNA-Menge isoliert werden kann.<sup>189</sup>

In der sich anschließenden rt-PCR zur Umschreibung der mRNA in cDNA wurde versucht, die RNA-Konzentrationsunterschiede durch die Verwendung einer angepassten mRNA-Menge auszugleichen. Aufgrund der enormen Konzentrationsunterschiede gelang dies bei einigen Proben nicht. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte in RNase-freiem Wasser. Dieses ist sauer und kann dadurch zur Messung falsch niedriger RNA-Konzentrationen führen, was bei der Verwendung von TE-Puffer nicht passiert. Bei der Messung wurde auf das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm geachtet – die sogenannte Ratio, welche für die Reinheit der Proben steht. Diese lag in 95,8 % der Proben im Zielbereich von 1,8 bis 2,2. Bei Über- oder Unterschreitung dieses Bereiches können in der Probe, neben der isolierten RNA, andere Zellbestandteile wie Proteine als Verunreinigung nachgewiesen werden. Die Reinheit ist wichtig für den nachgeschalteten Amplifizierungsprozess, denn die Anwesenheit von Inhibitor-Enzymen führt häufig zum Scheitern der PCR. Zudem können kleinste Mengen an DNA, die trotz der effizienten Silica-Membran-Technologie in der Probe verbleiben, sehr sensitive Experimente wie die RT-PCR-Analyse stören. Um dies zu vermeiden, müsste zusätzlich ein DNase-Verdau in das RNA-Isolations-Protokoll integriert werden.<sup>188-189</sup> Bei der RNA-Isolation aus den Tibiaproben eines Tieres wurde der DNase-Verdau in der vorliegenden Studie ergänzt. Da sich nachfolgend die photometrisch gemessene RNA-Konzentration aber bei sechs von zehn Proben aus ungeklärten Gründen verminderte, wurde im weiteren Verlauf darauf verzichtet.

Nach Isolierung der RNA erfolgten eine reverse Transkriptase-PCR, sowie eine PCR mit nachfolgender Agarose-Gelelektrophorese. Bereits die Untersuchung der ersten applikationsfernen Organ- und Gewebeproben zeigte Luciferase-Banden in der

Gelelektrophorese. Zudem kamen in einigen Gelbildern „Schlieren“ in den Luciferase- und GAPDH-Lanes zur Darstellung, die sich bei 16 von 88 Proben, vorwiegend in den Leber-, Milz- und Hodenproben, im Gel abzeichneten. Sie machten eine eindeutige Identifizierung der Luciferase-Banden zum Teil unmöglich. Als Ursache konnten Verunreinigungen der Proben oder Reagenzien durch Wiederholung der rt-PCR und der PCR ausgeschlossen werden. Störende DNA-Fragmente in den Proben kamen ebenfalls nicht in Frage. Sie hätten sich im Gel direkt unter der Tasche als Bande abgezeichnet. Unspezifische Primer-Reaktionen mit RNA-Fragmenten hingegen könnten die Schlierenproblematik erklären, die eine korrekte Auswertung der Gelelektrophorese-Ergebnisse deutlich limitiert hat. Eine endgültige Klärung dieser Frage hätte eine Überprüfung der Qualität der isolierten RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese erbracht.<sup>188, 190</sup> Da im Verlauf der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit einer qRT-PCR zur Verfügung stand, fiel aus den genannten Gründen, und weil die konventionelle PCR lediglich eine semiquantitative Methode ist, die Entscheidung zur Ergänzung des molekularbiologischen Nachweisverfahrens durch die qRT-PCR mit der Möglichkeit zur Quantifizierung. Mit Hilfe der qRT-PCR wurde die Expression des Luciferase-Plasmids in der Tibia beidseits sowie in den applikationsfernen Organ- und Gewebeproben relativ quantifiziert. Die Expression des zu untersuchenden Gens Luciferase wurde auf das zweite ubiquitär und homogen exprimierte Gen GAPDH bezogen und nicht die absolute Ausgangskonzentration bestimmt. Die relative Quantifizierung bietet im Vergleich zur absoluten den Vorteil, dass Inhomogenitäten im Ausgangsmaterial (beispielsweise die Menge oder Qualität der Proben sowie die RNA-Qualität betreffend) ausgeglichen werden können. Des Weiteren ist im Gegensatz zur absoluten Quantifizierung eine Reduktion variabler Ergebnisse durch Effizienzunterschiede der reversen Transkription und Amplifikation möglich. Da sich sowohl die Ziel-mRNA als auch die interne Kontroll-RNA im gleichen Tube befinden, wirkt sich ein in der Probe vorhandener Inhibitor des Amplifikationsprozesses auf die Amplifikations-Effizienz der Ziel- und der Kontroll-RNA gleich aus.<sup>191</sup>

In der vorliegenden Studie unterschieden sich bei einigen Proben die Ergebnisse der konventionellen PCR und die der qRT-PCR sowohl beim lokalen als auch beim systemischen Transfektionsnachweis. Dies lässt sich einerseits durch die geschilderte Schlierenproblematik in der konventionellen PCR mit konsekutiver eingeschränkter Beurteilbarkeit des Vorhandenseins von Luciferase-Banden erklären. Andererseits besitzt die qRT-PCR eine höhere Präzision<sup>192</sup>, eine hohe Reproduzierbarkeit sowie eine hohe Sensitivität, welche die Detektion der Genexpression geringster RNA-Mengen erlaubt<sup>193-194</sup> und deutlich höher ist als die der

konventionellen PCR.<sup>192</sup> Zudem erhöhen die bereits 1996 von Gibson und 2000 von Schmittgen beschriebenen „post-PCR Manipulationen“, die bei der konventionellen PCR zur Detektion der PCR-Produkte nötig sind (beispielsweise zusätzliche Pipettierschritte sowie die Beladung der Gele), das Risiko der Kontaminationen der Proben mit Nukleinsäuren. Daher sind sie als Erklärungsansatz für die differierenden Ergebnisse mit in Betracht zu ziehen.<sup>191-192</sup>

Die Vorgaben der FDA zur Durchführung einer PCR wurden erfüllt. Insbesondere wurden replikative Tests durchgeführt und bei jeder PCR Negativkontrollen mitgeführt. Dies diente dem Ausschluss von Kontaminationen, deren Möglichkeit bei dem Nachweis einer Luciferase-Expression stets in Betracht gezogen wurde. Kreuzkontaminationen von Proben während der PCR können sich negativ auf die Validität der Ergebnisse auswirken und sind oft schwer zu detektieren und zu kontrollieren.<sup>144</sup> Durch die Ergänzung der konventionellen PCR mit der qRT-PCR wurde demnach das Risiko falscher Ergebnisse durch Kontamination reduziert und die Möglichkeit zur Quantifizierung genutzt.

### 4.3 Ausblick

In der vorliegenden Studie wurden erstmals ein BMP-2- und ein Luciferase-Plasmid mit Hilfe von COPROGs als non-viraler Vektor und Fibrinkleber als Trägermatrix zusammen mit einem intramedullären Titannagel lokal appliziert. Mit der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass durch die lokale Applikation des Fibrinogen-Vektor-Plasmid-Gemisches nicht nur eine lokale Transfektion im Bereich der Tibia, sondern auch eine systemische Transfektion stattgefunden hat. Mittels konventioneller PCR erfolgte in 22 von 88 (25 %) und mittels qRT-PCR in 16 von 88 (18 %) applikationsfernen Organ- und Gewebeproben der Nachweis einer Luciferase-Expression. Es wird angenommen, dass der Fibrinkleber als Trägermaterial des non-viralen Vektorsystems COPROGs, während der Implantation des TENs in den Markraum der Tibia, durch den erhöhten intramedullären Druck in die Blutgefäße gepresst wurde. Dies könnte nachfolgend die systemische Verteilung des Luciferase-Plasmids auf venösem Wege bewirkt und damit zu einer systemischen Transfektion geführt haben. Daraus lässt sich schließen, dass die systemische Transfektion abhängig von der Applikationsmethode erfolgt. Zudem sind gewisse Einflüsse durch die Applikationsdosis und die Ko-Lyophilisation der Fibrinogenkomponente mit den COPROGs nicht auszuschließen. Aufgrund der in diesem Zusammenhang bestehenden Sicherheitsbedenken scheint das verwendete Applikationsverfahren

in der angewandten Form keine geeignete Methode für die Verbesserung der Osteointegration in der Endoprothetik zu sein.

Zudem konnten die parallel zu der vorliegenden Arbeit durchgeführten biomechanischen und histomorphometrischen Analysen zur Effektivität des beschriebenen neuartigen non-viralen Gentransfers von BMP-2 mittels COPROGs keine Verbesserung der Osteointegration zeigen.

Die vorliegende Studie entspricht einer Konzeptstudie. Daher bestehen Limitierungen bei der Erklärung der exakten zugrunde liegenden Mechanismen der beobachteten Ergebnisse. Um die Ursache der systemischen Transfektion im vorliegenden Modell genauer zu analysieren sind weitere Versuchsreihen erforderlich, gegebenenfalls mit einem direkten Vergleich unterschiedlicher Applikationsmethoden und -dosen, längeren Standzeiten, verschiedenen Tiermodellen mit größeren Versuchsgruppen und mehr Gewebeproben zur genaueren Differenzierung.

Dessen ungeachtet wurde die Verwendbarkeit der COPROGs als non-virales Vektorsystem zum lokalen Gentransfer im Kaninchenmodell demonstriert. Die Erkenntnis, dass eine intramedullär applizierte Fibrinklebermatrix als Depot für die Produktion von Wachstumsfaktoren, infolge eines non-viralen Gentransfers mit COPROGS, dienen kann, könnte in Zukunft im Bereich der non-viralen Gentherapieforschung noch eine wichtige Rolle spielen.

Wenn zusätzlich zur Applikation rekombinanter Wachstumsfaktor-Proteine mit ihren bekannten Applikationsproblemen und potentiellen Nebenwirkungen in Zukunft eine sichere und effiziente non-virale Gentransfermethode zur Verfügung stünde, so könnte nicht nur eine anhaltende Expression des therapeutischen Gens im Zielgebiet in vivo erreicht werden, sondern auch ein Sicherheitsgewinn für den Patienten.

---

## 5 Anhang

### 5.1 Literaturverzeichnis

- 1 Drees P, Eckardt A, Gay RE, Gay S, Huber LC. Mechanisms of disease: Molecular insights into aseptic loosening of orthopedic implants. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2007 Mar;3(3):165-71.
- 2 Herberts P, Malchau H. Long-term registration has improved the quality of hip replacement: a review of the Swedish THR Register comparing 160,000 cases. *Acta Orthop Scand*. 2000 Apr;71(2):111-21.
- 3 Yan Y, Hu J, Lu H, Wang W. Genetic susceptibility to total hip arthroplasty failure: a case-control study on the influence of MMP 1 gene polymorphism. *Diagn Pathol*. 2014 Sep 26;9(1):177.
- 4 BQS Qualitätsreport. Deutschland: BQS-Institut, 2009. (Accessed August 23, 2010, at [http://www.bqs-qualitaetsreport.de/2008/ergebnisse/leistungsbereiche/hueft\\_endo\\_erst/uebersicht.htm](http://www.bqs-qualitaetsreport.de/2008/ergebnisse/leistungsbereiche/hueft_endo_erst/uebersicht.htm).)
- 5 Ulrich SD, Seyler TM, Bennett D, Delanois RE, Saleh KJ, Thongtrangan I, Kuskowski M, Cheng EY, Sharkey PF, Parvizi J, Stiehl JB, Mont MA. Total hip arthroplasties: what are the reasons for revision? *Int Orthop*. 2008 Oct;32(5):597-604.
- 6 Sadoghi P, Liebensteiner M, Agreiter M, Leithner A, Böhler N, Labek G. Revision surgery after total joint arthroplasty: a complication-based analysis using worldwide arthroplasty registers. *J Arthroplasty*. 2013 Sep;28(8):1329-32.
- 7 Eynon-Lewis NJ, Ferry D, Pearse MF. Themistocles Gluck: an unrecognised genius. *BMJ*. 1992 Dec 19-26;305(6868):1534-6.
- 8 Ungethuem S, Lehner B, Reitzel T, Buckley PJ, Mau H, Breusch SJ. Einfluss der femoralen Zementiertechnik auf das Zementierergebnis. Vergleich von retrograder Technik und Vakuumtherapie. *Orthopäde*. 2005 Jul;34(7):690-7.
- 9 Ungethüm M, Plitz W. Implantate und Biomaterialien, Normung und Prüfung. *Unfallchirurgie*. 1995;4:167-174.
- 10 Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res*. 1991 Jul;25(7):889-902.
- 11 Cooper LF. A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. *J Prosthet Dent*. 2000 Nov;84(5):522-34.
- 12 Eschenroeder HC Jr, McLaughlin RE, Reger SI. Enhanced stabilization of porous-coated metal implants with tricalcium phosphate granules. *Clin Orthop Relat Res*. 1987 Mar;(216):234-46.

- 
- 13 Hara T, Hayashi K, Nakashima Y, Kanemaru T, Iwamoto Y. The effect of hydroxyapatite coating on the bonding of bone to titanium implants in the femora of ovariectomised rats. *J Bone Joint Surg Br.* 1999 Jul;81(4):705-9.
- 14 Thanner J. The acetabular component in total hip arthroplasty. Evaluation of different fixation principles. *Acta Orthop Scand Suppl.* 1999 Aug;286:1-41.
- 15 Jinnou T, Goldberg VM, Davy D, Stevenson S. Osseointegration of surface-blasted implants made of titanium alloy and cobalt-chromium alloy in a rabbit intramedullary model. *J Biomed Mater Res.* 1998 Oct;42(1):20-9.
- 16 Lacefield WR. Materials characteristics of uncoated/ceramic-coated implant materials. *Adv Dent Res.* 1999 Jun;13:21-6.
- 17 Gravius S, Mumme T, Delank KS, Eckardt A, Maus U, Andereya S, Hansen T. Immunohistochemical analysis of periprosthetic osteolysis in aseptic loosening of hip arthroplasty. *Z Orthop Unfall.* 2007 Mar-Apr;145(2):169-75.
- 18 Oakes DA, Lieberman JR. Osteoinductive applications of regional gene therapy: ex vivo gene transfer. *Clin Orthop Relat Res.* 2000 Oct;(379 Suppl):S101-12.
- 19 Skutek M, Bourne RB, Mac Donald SJ. International epidemiology of revision THR. *Current Orthopaedics* 2006;(20):157-161.
- 20 Garellick G, Rogmark C, Kärrholm J, Rolfson O. Swedish Hip Arthroplasty Register – Annual Report 2012, 2012 (Accessed October 4, 2014, at <http://www.shpr.se/en/Publications/DocumentsReports.aspx>.)
- 21 Abu-Amer Y, Darwech I, Clohisy JC. Aseptic loosening of total joint replacements: mechanisms underlying osteolysis and potential therapies. *Arthritis Res Ther.* 2007;9 Suppl 1:S6.
- 22 Mahomed NN, Barrett JA, Katz JN, Phillips CB, Losina E, Lew RA, Guadagnoli E, Harris WH, Poss R, Baron JA. Rates and Outcomes of Primary and Revision Total Hip Replacement in the United States Medicare Population. *J Bone Joint Surg.* 2003;85-A(1):27-32.
- 23 Haas S. Prävention, Diagnostik und Therapie von Thrombosen in der Orthopädie und Unfallchirurgie. *Orthopäde.* 1997 Dec;26(12):1062-74.
- 24 Assmann G, Kasch R, Hofer A, Schulz AP, Kayser R, Lahm A, Merk H, Flessa S. An economic analysis of aseptic revision hip arthroplasty: calculation of partial hospital costs in relation to reimbursement. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2014 Mar;134(3):413-20.
- 25 Cooper HJ, Ranawat AS, Potter HG, Foo LF, Koob TW, Ranawat CS. Early reactive synovitis and osteolysis after total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res.* 2010 Dec;468(12):3278-85.
- 26 Rao AJ, Gibon E, Ma T, Yao Z, Smith RL, Goodman SB. Revision joint replacement, wear particles, and macrophage polarization. *Acta Biomater.* 2012 Jul;8(7):2815-23.
- 27 Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001 Oct;10 Suppl 2:S96-101.



- 
- 28 Boss JH. Osseointegration. *J Long Term Eff Med Implants*. 1999;9(1-2):1-10.
- 29 Søballe K, Hansen ES, Brockstedt-Rasmussen H, Pedersen CM, Bünger C. Hydroxyapatite coating enhances fixation of porous coated implants. A comparison in dogs between press fit and noninterference fit. *Acta Orthop Scand*. 1990 Aug;61(4):299-306.
- 30 Schenk RK, Buser D. Osseointegration: a reality. *Periodontol 2000*. 1998 Jun;17:22-35.
- 31 Donath K. Integration of bone substitutes in the jawbone. Morphologic findings. *Dtsch Zahnarztl Z*. 1988 Jan;43(1):16-21.
- 32 Fritz ME. Two-stage implant systems. *Adv Dent Res*. 1999 Jun;13:162-9.
- 33 Engh CA, Bobyn JD, Glassman AH. Theory and practice of cementless revision total hip arthroplasty. *Hip*. 1987:271-317.
- 34 Cordova LA, Stresing V, Gobin B, Rosset P, Passuti N, Gouin F, Trichet V, Layrolle P, Heymann D. Orthopaedic implant failure: aseptic implant loosening – the contribution and future challenges of mouse models in translational research. *Clin Sci (Lond)*. 2014 Sep;127(5):277-93.
- 35 Thorey F, Menzel H, Lorenz C, Gross G, Hoffmann A, Windhagen H. Enhancement of endoprosthesis anchoring using BMP-2. *Technol Health Care*. 2010;18(3):217-29.
- 36 Kadoya Y, Kobayashi A, Ohashi H. Wear and osteolysis in total joint replacements. *Acta Orthop Scand Suppl*. 1998 Feb;278:1-16.
- 37 Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965 Nov 12;150(3698):893-9.
- 38 Rosen V, Thies RS. The BMP proteins in bone formation and repair. *Trends Genet*. 1992 Mar;8(3):97-102.
- 39 Chang H, Brown CW, Matzuk MM. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev*. 2002 Dec;23(6):787-823.
- 40 Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*. 1988 Dec 16;242(4885):1528-34.
- 41 Trippel SB. Growth factors as therapeutic agents. *Intr Course Lect*. 1997;46:473-6.
- 42 Kim DJ, Moon SH, Kim H, Kwon UH, Park MS, Han KJ, Hahn SB, Lee HM. Bone morphogenetic protein-2 facilitates expression of chondrogenic, not osteogenic, phenotype of human intervertebral disc cells. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2003 Dec 15;28(24):2679-84.
- 43 Yang IH, Kim H, Kwon UH, Lee KI, Jun JA, Kim JH, Yun CO, Park SY, Lee HM, Moon SH. De novo osteogenesis from human ligamentum flavum by adenovirus-mediated bone morphogenetic protein-2 gene transfer. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005 Dec 15;30(24):2749-54.
- 44 Abe E, Yamamoto M, Taguchi Y, Lecka-Czernik B, O'Brien CA, Economides AN, Stahl N, Jilka RL, Manolagas SC. Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin. *J Bone Miner Res*. 2000 Apr;15(4):663-73.

- 
- 45 Suzawa M, Takeuchi Y, Fukumoto S, Kato S, Ueno N, Miyazono K, Matsumoto T, Fujita T. Extracellular matrix-associated bone morphogenetic proteins are essential for differentiation of murine osteoblastic cells in vitro. *Endocrinology*. 1999 May;140(5):2125-33.
- 46 Betz OB, Betz VM, Nazarian A, Pilapil CG, Vrahas MS, Bouxsein ML, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, Evans CH. Direct percutaneous gene delivery to enhance healing of segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*. 2006 Feb;88(2):355-65.
- 47 Würzler KK, Emmert J, Eichelsbacher F, Kübler NR, Sebald W, Reuther JF. Evaluation of the osteoinductive potential of genetically modified BMP-2 variants. *Mund Kiefer Gesichtschir*. 2004 Mar;8(2):83-92.
- 48 Wozney JM. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2002 Aug 15;27(16 Suppl 1):S2-8.
- 49 Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H. Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol*. 2001 Jun;187(3):265-76.
- 50 Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, LaPan P, *et al*. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990 Mar;87(6):2220-4.
- 51 Kirsch T, Sebald W, Dreyer MK. Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. *Nat Struct Biol*. 2000 Jun;7(6):492-6.
- 52 Bax BE, Wozney JM, Ashhurst DE. Bone morphogenetic protein-2 increases the rate of callus formation after fracture of the rabbit tibia. *Calcif Tissue Int*. 1999 Jul;65(1):83-9.
- 53 Schmidmaier G, Wildemann B, Cromme F, Kandziora F, Haas NP, Raschke M. Bone morphogenetic protein-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodeling in fracture treatment: a biomechanical and histological study in rats. *Bone*. 2002 Jun;30(6):816-22.
- 54 Faßbender M, Minkwitz S, Strobel C, Schmidmaier G, Wildemann B. Stimulation of bone healing by sustained bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) delivery. *Int J Mol Sci*. 2014 May 14;15(5):8539-52.
- 55 Schmidmaier G, Lucke M, Schwabe P, Raschke M, Haas NP, Wildemann B. Collective review: bioactive implants coated with poly(D,L-lactide) and growth factors IGF-I, TGF-beta1, or BMP-2 for stimulation of fracture healing. *J Long Term Eff Med Implants*. 2006;16(1):61-9.
- 56 Zellin G, Linde A. Treatment of segmental defects in long bones using osteopromotive membranes and recombinant human bone morphogenetic protein-2. An experimental study in rabbits. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 1997 Jun;31(2):97-104.
- 57 Zellin G, Linde A. Importance of delivery systems for growth-stimulatory factors in combination with osteopromotive membranes. An experimental study using rhBMP-2 in rat mandibular defects. *J Biomed Mater Res*. 1997 May;35(2):181-90.
- 58 Wildemann B, Lange K, Strobel C, Fassbender M, Willie B, Schmidmaier G. Local BMP-2 application can rescue the delayed osteotomy healing in a rat model. *Injury*. 2011 Aug;42(8):746-52.

59 Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Ciorny G, Muschler GF, Zych GA, Calhoun JH, LaForte AJ, Yin S. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83-A Suppl 1(Pt 2):S151-8.

60 Govender S *et al.* Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am.* 2002 Dec;84-A(12):2123-34.

61 Kanakaris NK, Calori GM, Verdonk R, Burssens P, De Biase P, Capanna R, Vangosa LB, Cherubino P, Baldo F, Ristiniemi J, Kontakis G, Giannoudis PV. Application of BMP-7 to tibial non-unions: a 3-year multicenter experience. *Injury.* 2008 Sep;39 Suppl 2:S83-90.

62 Hong SJ, Kim CS, Han DK, Cho IH, Jung UW, Choi SH, Kim CK, Cho KS. The effect of a fibrin-fibronectin/beta-tricalcium phosphate/recombinant human bone morphogenetic protein-2 system on bone formation in rat calvarial defects. *Biomaterials.* 2006 Jul;27(20):3810-6.

63 Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M. Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part A: Current challenges in BMP delivery. *Biotechnol Lett.* 2009 Dec;31(12):1817-24.

64 Gamradt SC, Lieberman JR. Genetic modification of stem cells to enhance bone repair. *Ann Biomed Eng.* 2004 Jan;32(1):136-47.

65 Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am.* 2002 Jun;84-A(6):1032-44.

66 Luginbuehl V, Meinel L, Merkle HP, Gander B. Localized delivery of growth factors for bone repair. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004;58:197-208.

67 Schillinger U, Wexel G, Hacker C, Kullmer M, Koch C, Gerg M, Vogt S, Ueblacker P, Tischer T, Hensler D, Wilisch J, Aigner J, Walch A, Stemberger A, Plank C. A fibrin glue composition as carrier for nucleic acid vectors. *Pharm Res.* 2008 Dec;25(12):2946-62.

68 Blanquaert F, Saffar JL, Colombier ML, Carpentier G, Barritault D, Caruelle JP. Heparan-like molecules induce the repair of skull defects. *Bone.* 1995 Dec;17(6):499-506.

69 Fakhry A, Ratisoontorn C, Vedhachalam C, Salhab I, Koyama E, Leboy P, Pacifici M, Kirschner RE, Nah HD. Effects of FGF-2/-9 in calvarial bone cell cultures: differentiation stage-dependent mitogenic effect, inverse regulation of BMP-2 and noggin, and enhancement of osteogenic potential. *Bone.* 2005 Feb;36(2):254-66.

70 Lee KY, Peters MC, Anderson KW, Mooney DJ. Controlled growth factor release from synthetic extracellular matrices. *Nature.* 2000 Dec 21-28;408(6815):998-1000.

71 Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H, Lucke M, Fuchs T, Stemberger A, Flyvbjerg A, Haas NP, Raschke M. Local application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1) from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. *Bone.* 2001 Apr;28(4):341-50.

72 Woodruff MA, Rath SN, Susanto E, Haupt LM, Hutmacher DW, Nurcombe V, Cool SM. Sustained release and osteogenic potential of heparan sulfate-doped fibrin glue scaffolds within a rat cranial model. *J Mol Histol*. 2007 Oct;38(5):425-33.

73 Pauly S, Luttosch F, Morawski M, Haas NP, Schmidmaier G, Wildemann B. Simvastatin locally applied from a biodegradable coating of osteosynthetic implants improves fracture healing comparable to BMP-2 application. *Bone*. 2009 Sep;45(3):505-11.

74 Schmidmaier G, Schwabe P, Strobel C, Wildemann B. Carrier systems and application of growth factors in orthopaedics. *Injury*. 2008 Sep;39 Suppl 2:S37-43.

75 Schmoekel HG, Weber FE, Schense JC, Grätz KW, Schawalder P, Hubbell JA. Bone repair with a form of BMP-2 engineered for incorporation into fibrin cell ingrowth matrices. *Biotechnol Bioeng*. 2005 Feb 5;89(3):253-62.

76 Boerckel JD, Kolambkar YM, Dupont KM, Uhrig BA, Phelps EA, Stevens HY, García AJ, Guldberg RE. Effects of protein dose and delivery system on BMP-mediated bone regeneration. *Biomaterials*. 2011 Aug;32(22):5241-51.

77 Woo EJ. Adverse events after recombinant human BMP2 in nonspinal orthopaedic procedures. *Clin Orthop Relat Res*. 2013 May;471(5):1707-11.

78 Zara JN, Siu RK, Zhang X, Shen J, Ngo R, Lee M, Li W, Chiang M, Chung J, Kwak J, Wu BM, Ting K, Soo C. High doses of bone morphogenetic protein 2 induce structurally abnormal bone and inflammation in vivo. *Tissue Eng Part A*. 2011 May;17(9-10):1389-99.

79 Sciadini MF, Johnson KD. Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model. *J Orthop Res*. 2000 Mar;18(2):289-302.

80 Wong DA, Kumar A, Jatana S, Ghiselli G, Whong K. Neurologic impairment from ectopic bone in the lumbar canal: a potential complication of off-label PLIF/TLIF use of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). *Spine J*. 2008 Nov-Dec;8(6):1011-8.

81 Bonadio J, Smiley E, Patil P, Goldstein S. Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. *Nat Med*. 1999 Jul;5(7):753-9.

82 Feeley BT, Conduah AH, Sugiyama O, Krenek L, Chen IS, Lieberman JR. In vivo molecular imaging of adenoviral versus lentiviral gene therapy in two bone formation models. *J Orthop Res*. 2006 Aug;24(8):1709-21.

83 Schwabe P, Greiner S, Ganzert R, Eberhart J, Dähn K, Stemberger A, Plank C, Schmidmaier G, Wildemann B. Effect of a novel nonviral gene delivery of BMP-2 on bone healing. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:560142.

84 Kofron MD, Laurencin CT. Orthopaedic applications of gene therapy. *Curr Gene Ther*. 2005 Feb;5(1):37-61.

85 Tan PH, Chan CL, Chan C, George AJ. The evolving role of gene-based treatment in surgery. *Br J Surg*. 2005 Dec;92(12):1466-80.

- 
- 86 Lieberman JR. Orthopaedic gene therapy. Fracture healing and other nongenetic problems of bone. *Clin Orthop Relat Res.* 2000 Oct;(379 Suppl):S156-8.
- 87 Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P, Greenblatt JJ, Rosenberg SA, Klein H, Berger M, Mullen CA, Ramsey WJ, Muul L, Morgan RA, Anderson WF. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science.* 1995 Oct 20;270(5235):475-80.
- 88 Pelinkovic D, Lee JY, Adachi N, Fu FH, Huard J. Muscle-based gene therapy and tissue engineering. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2001;11(1-3):121-9.
- 89 Evans CH, Ghivizzani SC, Robbins PD. The 2003 Nicolas Andry Award. Orthopaedic gene therapy. *Clin Orthop Relat Res.* 2004 Dec;(429):316-29.
- 90 Hannallah D, Peterson B, Lieberman JR, Fu FH, Huard J. Gene therapy in orthopaedic surgery. *Instr Course Lect.* 2003;52:753-68.
- 91 Baltzer AW, Lattermann C, Whalen JD, Ghivizzani S, Wooley P, Krauspe R, Robbins PD, Evans CH. Potential role of direct adenoviral gene transfer in enhancing fracture repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2000 Oct;(379 Suppl):S120-5.
- 92 Musgrave DS, Bosch P, Ghivizzani S, Robbins PD, Evans CH, Huard J. Adenovirus-mediated direct gene therapy with bone morphogenetic protein-2 produces bone. *Bone.* 1999 Jun;24(6):541-7.
- 93 Fang J, Zhu YY, Smiley E, Bonadio J, Rouleau JP, Goldstein SA, McCauley LK, Davidson BL, Roessler BJ. Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996 Jun 11;93(12):5753-8.
- 94 Betz OB, Betz VM, Nazarian A, Egermann M, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, Vrahas MS, Bouxsein ML, Evans CH. Delayed administration of adenoviral BMP-2 vector improves the formation of bone in osseous defects. *Gene Ther.* 2007 Jul;14(13):1039-44.
- 95 Evans CH, Ghivizzani SC, Robbins PD. Getting arthritis gene therapy into the clinic. *Nat Rev Rheumatol.* 2011 Apr;7(4):244-9.
- 96 Oberholzer A, Stahel P, Tschöke SK, Ertel W. Stellenwert der Genterapie in Unfallchirurgie und Orthopädie. *Unfallchirurg.* 2006 Jul;109(7):521-7.
- 97 Madry H, Kohn D, Cucchiari M. Genterapie in der Orthopädie. *Orthopäde.* 2006 Nov;35(11):1193-202.
- 98 Baltzer AW, Lieberman JR. Regional gene therapy to enhance bone repair. *Gene Ther.* 2004 Feb;11(4):344-50.
- 99 Oligino TJ, Yao Q, Ghivizzani SC, Robbins P. Vector systems for gene transfer to joints. *Clin Orthop Relat Res.* 2000 Oct;(379 Suppl):S17-30.
- 100 Levy RJ, Goldstein SA, Bonadio J. Gene therapy for tissue repair and regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998 Aug 3;33(1-2):53-69.

---

101 De Laporte L, Cruz Rea J, Shea LD. Design of modular non-viral gene therapy vectors. *Biomaterials*. 2006 Mar;27(7):947-54.

102 Madry H, Kaul G, Cucchiaroni M, Stein U, Zurakowski D, Remberger K, Menger MD, Kohn D, Trippel SB. Enhanced repair of articular cartilage defects in vivo by transplanted chondrocytes overexpressing insulin-like growth factor I (IGF-I). *Gene Ther*. 2005 Aug;12(15):1171-9.

103 Guo T, Zeng X, Hong H, Diao H, Wangrui R, Zhao J, Zhang J, Li J. Gene-activated matrices for cartilage defect reparation. *Int J Artif Organs*. 2006 Jun;29(6):612-21.

104 Tierney EG, Duffy GP, Cryan SA, Curtin CM, O'Brien FJ. Non-viral gene-activated matrices: next generation constructs for bone repair. *Organogenesis*. 2013 Jan-Mar;9(1):22-8.

105 Li S, Huang L. Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther*. 2000 Jan;7(1):31-4.

106 Finsinger D, Remy JS, Erbacher P, Koch C, Plank C. Protective copolymers for nonviral gene vectors: synthesis, vector characterization and application in gene delivery. *Gene Ther*. 2000 Jul;7(14):1183-92.

107 Ruponen M, Honkakoski P, Rönkkö S, Pelkonen J, Tammi M, Urtti A. Extracellular and intracellular barriers in non-viral gene delivery. *J Control Release*. 2003 Dec 5;93(2):213-7.

108 Kirby AJ, Camilleri P, Engberts JB, Feiters MC, Nolte RJ, Söderman O, Bergsma M, Bell PC, Fielden ML, García Rodríguez CL, Guédat P, Kremer A, McGregor C, Perrin C, Ronsin G, van Eijk MC. Gemini surfactants: new synthetic vectors for gene transfection. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2003 Apr 4;42(13):1448-57.

109 Zhou X, Huang L. DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta*. 1994 Jan 19;1189(2):195-203.

110 Lechardeur D, Sohn KJ, Haardt M, Joshi PB, Monck M, Graham RW, Beatty B, Squire J, O'Brodovich H, Lukacs GL. Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther*. 1999 Apr;6(4):482-97.

111 Panté N, Aebi U. Toward the molecular dissection of protein import into nuclei. *Curr Opin Cell Biol*. 1996 Jun;8(3):397-406.

112 Jeschke MG, Barrow RE, Hawkins HK, Tao Z, Perez-Polo JR, Herndon DN. Biodistribution and feasibility of non-viral IGF-I gene transfers in thermally injured skin. *Lab Invest*. 2000 Feb;80(2):151-8.

113 Stiehler M, Duch M, Mygind T, Li H, Ulrich-Vinther M, Modin C, Baatrup A, Lind M, Pedersen FS, Bünger CE. Optimizing viral and non-viral gene transfer methods for genetic modification of porcine mesenchymal stem cells. *Adv Exp Med Biol*. 2006;585:31-48.

114 Schwartz B, Ivanov MA, Pitard B, Escriou V, Rangara R, Byk G, Wils P, Crouzet J, Scherman D. Synthetic DNA-compacting peptides derived from human sequence enhance cationic lipid-mediated gene transfer in vitro and in vivo. *Gene Ther*. 1999 Feb;6(2):282-92.

- 
- 115 Garnett MC. Gene-delivery systems using cationic polymers. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1999;16(2):147-207.
- 116 Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995 Aug 1;92(16):7297-301.
- 117 Kichler A, Leborgne C, Coeytaux E, Danos O. Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J Gene Med.* 2001 Mar-Apr;3(2):135-44.
- 118 Colin M, Moritz S, Schneider H, Capeau J, Coutelle C, Brahimi-Horn MC. Haemoglobin interferes with the ex vivo luciferase luminescence assay: consequence for detection of luciferase reporter gene expression in vivo. *Gene Ther.* 2000 Aug;7(15):1333-6.
- 119 Schlag G, Redl H. Fibrin sealant in orthopedic surgery. *Clin Orthop Relat Res.* 1988 Feb;227:269-85.
- 120 Currie LJ, Martin R, Sharpe JR, James SE. A comparison of keratinocyte cell sprays with and without fibrin glue. *Burns.* 2003 Nov;29(7):677-85.
- 121 Andree C, Voigt M, Wenger A, Erichsen T, Bittner K, Schaefer D, Walgenbach KJ, Borges J, Horch RE, Eriksson E, Stark GB. Plasmid gene delivery to human keratinocytes through a fibrin-mediated transfection system. *Tissue Eng.* 2001 Dec;7(6):757-66.
- 122 Radosevich M, Goubran HI, Burnouf T. Fibrin sealant: scientific rationale, production methods, properties, and current clinical use. *Vox Sang.* 1997;72(3):133-43.
- 123 Huh JY, Choi BH, Zhu SJ, Jung JH, Kim BY, Lee SH. The effect of platelet-enriched fibrin glue on bone regeneration in autogenous bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Apr;101(4):426-31.
- 124 Wong C, Inman E, Spaethe R, Helgerson S. Fibrin-based biomaterials to deliver human growth factors. *Thromb Haemost.* 2003 Mar;89(3):573-82.
- 125 Patel VV, Zhao L, Wong P, Pradhan BB, Bae HW, Kanim L, Delamarter RB. An in vitro and in vivo analysis of fibrin glue use to control bone morphogenetic protein diffusion and bone morphogenetic protein-stimulated bone growth. *Spine J.* 2006 Jul-Aug;6(4):397-403.
- 126 Hattori T. Experimental investigations of osteogenesis and chondrogenesis by implant of BMP-fibrin glue mixture. *Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi.* 1990 Sep;64(9):824-34.
- 127 Ren WH, Yang LJ, Dong SZ. Induction of reparative dentin formation in dogs with combined recombinant human bone morphogenetic protein 2 and fibrin sealant. *Chin J Dent Res.* 1999 Dec;2(3-4):21-4.
- 128 Scherer F, Schillinger U, Putz U, Stemberger A, Plank C. Nonviral vector loaded collagen sponges for sustained gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med.* 2002 Nov-Dec;4(6):634-43.
- 129 Hacker C, Brandt S, Plank C, Stemberger A. Fibrin – a new tool for gene delivery. *AnnHematol.* 2003;82:33.

130 Hönig D, DeRouchey J, Jungmann R, Koch C, Plank C, Rädler JO. Biophysical Characterization of Copolymer-Protected Gene Vectors(COPROGs). *Biomolecules*. 2010 July 12;11(7):1802-09.

131 van Praag E. Narkose-Medikamente Kaninchen, 2003. (Accessed Februar 10, 2005, at [http://www.medirabbit.com/GE/Safe\\_medication/Anesthetics/Anesthetic\\_agents\\_ge.htm](http://www.medirabbit.com/GE/Safe_medication/Anesthetics/Anesthetic_agents_ge.htm).)

132 Cantwell SL. Ferret, rabbit, and rodent anesthesia. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*. 2001 Jan;4(1):169-91.

133 RNeasy<sup>®</sup> Mini Handbook, Forth Edition, 2006, QIAGEN.

134 QIAZOL Handbook, Oktober 2006, QIAGEN.

135 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.

136 Lehmanns Media. Labordiagnostische Referenzwerte in der Tiermedizin. Schattauer Verlag, 2014. (Accessed Januar 11, 2015, at <http://www.lehmanns.de/pdf/referenzwertetiermedizin.pdf?PHPSESSID=04bc5199c34c4ca68f6b3200a7cd7068.htm>.)

137 Gamradt SC, Abe N, Bahamonde ME, Lee YP, Nelson SD, Lyons KM, Lieberman JR. Tracking expression of virally mediated BMP-2 in gene therapy for bone repair. *Clin Orthop Relat Res*. 2006 Sep;450:238-45.

138 Alden TD, Pittman DD, Hankins GR, Beres EJ, Engh JA, Das S, Hudson SB, Kerns KM, Kallmes DF, Helm GA. In vivo endochondral bone formation using a bone morphogenetic protein 2 adenoviral vector. *Hum Gene Ther*. 1999 Sep 1;10(13):2245-53.

139 Imboden M, Shi F, Pugh TD, Freud AG, Thom NJ, Hank JA, Hao Z, Staelin ST, Sondel PM, Mahvi DM. Safety of interleukin-12 gene therapy against cancer: a murine biodistribution and toxicity study. *Hum Gene Ther*. 2003 Jul 20;14(11):1037-48.

140 Rundle CH, Strong DD, Chen ST, Linkhart TA, Sheng MH, Wergedal JE, Lau KH, Baylink DJ. Retroviral-based gene therapy with cyclooxygenase-2 promotes the union of bony callus tissues and accelerates fracture healing in the rat. *J Gene Med*. 2008 Mar;10(3):229-41.

141 Hiltunen MO, Turunen MP, Turunen AM, Rissanen TT, Laitinen M, Kosma VM, Ylä-Herttuala S. 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*. 2000 Nov;14(14):2230-6.

142 Palmer TD, Rosman GJ, Osborne WR, Miller AD. Genetically modified skin fibroblasts persist long after transplantation but gradually inactivate introduced genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991 Feb 15;88(4):1330-4.

143 Li L, Hoffman RM. The feasibility of targeted selective gene therapy of the hair follicle. *Nat Med*. 1995 Jul;1(7):705-6.

144 Haworth R, Pilling AM. The PCR assay in the preclinical safety evaluation of nucleic acid medicines. *Hum Exp Toxicol*. 2000 May;19(5):267-76.



145 Ye X, Gao GP, Pabin C, Raper SE, Wilson JM. Evaluating the potential of germ line transmission after intravenous administration of recombinant adenovirus in the C3H mouse. *Hum Gene Ther.* 1998 Sep 20;9(14):2135-42.

146 Raper SE, Haskal ZJ, Ye X, Pugh C, Furth EE, Gao GP, Wilson JM. Selective gene transfer into the liver of non-human primates with E1-deleted, E2A-defective, or E1-E4 deleted recombinant adenoviruses. *Hum Gene Ther.* 1998 Mar 20;9(5):671-9.

147 Gharwan H, Wightman L, Kircheis R, Wagner E, Zatloukal K. Nonviral gene transfer into fetal mouse livers (a comparison between the cationic polymer PEI and naked DNA). *Gene Ther.* 2003 May;10(9):810-7.

148 Baltzer AW, Lattermann C, Whalen JD, Braunstein S, Robbins PD, Evans CH. A gene therapy approach to accelerating bone healing. Evaluation of gene expression in a New Zealand white rabbit model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 1999;7(3):197-202.

149 Baltzer AW, Lattermann C, Whalen JD, Wooley P, Weiss K, Grimm M, Ghivizzani SC, Robbins PD, Evans CH. Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the BMP-2 gene. *Gene Ther.* 2000 May;7(9):734-9.

150 Delépine P, Guillaume C, Floch V, Loisel S, Yaouanc J, Clément J, Des Abbayes H, Férec C. Cationic phosphonolipids as nonviral vectors: in vitro and in vivo applications. *J Pharm Sci.* 2000 May;89(5):629-38.

151 Alexander MY, Akhurst RJ. Liposome-mediated gene transfer and expression via the skin. *Hum Mol Genet.* 1995 Dec;4(12):2279-85.

152 Miagkov AV, Kovalenko DV, Brown CE, Didsbury JR, Cogswell JP, Stimpson SA, Baldwin AS, Makarov SS. NF-kappaB activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998 Nov 10;95(23):13859-64.

153 Ghivizzani SC, Lechman ER, Kang R, Tio C, Kolls J, Evans CH, Robbins PD. Direct adenovirus-mediated gene transfer of interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha soluble receptors to rabbit knees with experimental arthritis has local and distal anti-arthritic effects. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998 Apr 14;95(8):4613-8.

154 Lechman ER, Jaffurs D, Ghivizzani SC, Gambotto A, Kovesdi I, Mi Z, Evans CH, Robbins PD. Direct adenoviral gene transfer of viral IL-10 to rabbit knees with experimental arthritis ameliorates disease in both injected and contralateral control knees. *J Immunol.* 1999 Aug 15;163(4):2202-8.

155 Lechman ER, Keravala A, Nash J, Kim SH, Mi Z, Robbins PD. The contralateral effect conferred by intra-articular adenovirus-mediated gene transfer of viral IL-10 is specific to the immunizing antigen. *Gene Ther.* 2003 Nov;10(24):2029-35.

156 Whalen JD, Lechman ER, Carlos CA, Weiss K, Kovesdi I, Glorioso JC, Robbins PD, Evans CH. Adenoviral transfer of the viral IL-10 gene periarticularly to mouse paws suppresses development of collagen-induced arthritis in both injected and uninjected paws. *J Immunol.* 1999;162:3625-3632.

157 Boyle DL, Nguyen KH, Zhuang S, Shi Y, McCormack JE, Chada S, Firestein GS. Intra-articular IL-4 gene therapy in arthritis: anti-inflammatory effect and enhanced th2activity. *Gene Ther.* 1999 Dec;6(12):1911-8.

158 Kim SH, Lechman ER, Kim S, Nash J, Oligino TJ, Robbins PD. Ex vivo gene delivery of IL-1Ra and soluble TNF receptor confers a distal synergistic therapeutic effect in antigen-induced arthritis. *Mol Ther.* 2002 Nov;6(5):591-600.

159 Kandziora F, Pflugmacher R, Scholz M, Knispel C, Hiller T, Schollmeier G, Bail H, Schmidmaier G, Duda G, Raschke M, Haas NP. Comparison of BMP-2 and combined IGF-I/TGF-ss1 application in a sheep cervical spine fusion model. *Eur Spine J.* 2002 Oct;11(5):482-93.

160 Aspenberg P, Turek T. BMP-2 for intramuscular bone induction: effect in squirrel monkeys is dependent on implantation site. *Acta Orthop Scand.* 1996 Feb;67(1):3-6.

161 Nakagawa T, Sugiyama T, Kamei T, Murata T, Tagawa. An immuno-light andelectro-microscopic study of the expression of bone morphogenetic protein-2 during the process of ectopic bone formation in the rat. *Arch. Oral Biol.* 2001;46:403-411.

162 Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, Konishi Y, Kusumoto K, Ogawa Y, Iizuka T. Osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 at intramuscular, intermuscular, subcutaneous and intrafatty sites. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2000;29:62-66.

163 Yoshida K, Bessho K, Fujimura K, Ogawa K, Tani Y, Iizuka T. Osteoinduction capability of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in intramuscular and subcutaneous sites: an experimental study. *J. Craniofac. Surg.* 1998;26:439-458.

164 Wilton P. Treatment with recombinant human insulin-like growth factor I of children with growth hormone receptor deficiency (Laron syndrome). *Acta Paediatr Suppl.* 1992;383:137-142.

165 Terrell TG, Working PK, Chow CP, Green JD. Pathology of recombinant human transforming growth factor-beta 1 in rats and rabbits. *Int Rev Exp Pathol.* 1993;34 Pt B:43-67.

166 Vasconez O, Martinez V, Martinez AL, Hidalgo F, Diamond FB, Rosenbloom AL, Rosenfeld RG, Guevara-Aguirre J. Heart rate increases in patients with growth hormone receptor deficiency treated with insulin-like growth factor I. *Acta Paediatr Suppl.* 1994;399:137-139.

167 Höhne SJ. Untersuchung des Einflusses eines nicht-viralen BMP-2-Genstransfers auf die Implantateinheilung am Kaninchenmodell – Biomechanische Untersuchung, 2009. (Accessed March 26, 2015, at [http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS\\_thesis\\_000000011641.htm](http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000011641.htm).)

168 Götz HE, Müller M, Emmel A, Holzwarth U, Erben RG, Stangl R. Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants. *Biomaterials.* 2004 Aug;25(18):4057-64.

169 Brunski JB. In vivo bone response to biomechanical loading at the bone/dental-implant interface. *Adv Dent Res.* 1999 Jun;13:99-119.

170 Marzi I. Forschung in der Unfallchirurgie: Grundlagenforschung und translationale klinische Forschung. Orthopädie und Unfallchirurgie - Mitteilungen und Nachrichten. 2011 Okt;104-106.

171 Sumner DR, Turner TM, Urban RM. Animal models relevant to cementless joint replacement. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2001 Jun;1(4):333-45.

172 Xu X, Yang J, Ding L, Li J. Bone Morphogenetic Protein-2-Encapsulated Grafted-Poly-Lactic Acid-Polycaprolactone Nanoparticles Promote Bone Repair. Cell Biochem Biophys. 2015 Jan;71(1):215-25.

173 Zhang WB, Zheng LW, Chua DT, Cheung LK. Treatment of irradiated mandibles with mesenchymal stem cells transfected with bone morphogenetic protein 2/7. J Oral Maxillofac Surg. 2012 Jul;70(7):1711-6.

174 Ono I, Yamashita T, Jin HY, Ito Y, Hamada H, Akasaka Y, Nakasu M, Ogawa T, Jimbow K. Combination of porous hydroxyapatite and cationic liposomes as a vector for BMP-2 gene therapy. Biomaterials. 2004 Aug;25(19):4709-18.

175 Eitel F, Klapp F, Jacobson W, Schweiberer L. Bone regeneration in animals and in man. A contribution to understanding the relative value of animal experiments to human pathophysiology. Arch Orthop Trauma Surg. 1981;99(1):59-64.

176 Hörner K, Loeffler K, Holtzmann M. Vergleich der histologischen Struktur der Kompakta der langen Röhrenknochen bei Maus, Hamster, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Katze und Hund während der Altersentwicklung. Anat Histol Embryol. 1997 Dec;26(4):289-95.

177 FDA. Guidance for Industry – Considerations for Plasmid Vaccines for Infectious Disease Indications, 2007. (Accessed Januar 24, 2014, at: <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>.)

178 Wozney JM, Li RH. Engineering what comes naturally. Nat Biotechnol. 2003 May;21(5):506-8.

179 Ye Q, Zünd G, Benedikt P, Jockenhoevel S, Hoerstrup SP, Sakyama S, Hubbell JA, Turina M. Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. Eur J Cardiothorac Surg. 2000 May;17(5):587-91.

180 Stange R, Wildemann B, Stemberger A, Hacker C, Plank C, Haas NP, Raschke M, Schmidmaier G. A new non-viral vector delivered in a fibrin glue matrix for local osteoblast transfection, Poster 50<sup>th</sup> Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 31<sup>st</sup> European Symposium on Calcified Tissues 2004.

181 Abiraman S, Varma HK, Umashankar PR, John A. Fibrin glue as an osteoinductive protein in a mouse model. Biomaterials. 2002 Jul;23(14):3023-31.

182 Kaipel M, Schützenberger S, Hofmann AT, Ferguson J, Nau T, Redl H, Feichtinger GA. Evaluation of fibrin-based gene-activated matrices for BMP2/7 plasmid codelivery in a rat nonunion model. Int Orthop. 2014 Dec;38(12):2607-13.

---

183 Oh YK, Kim JP, Yoon H, Kim JM, Yang JS, Kim CK. Prolonged organ retention and safety of plasmid DNA administered in polyethylenimine complexes. *Gene Ther.* 2001 Oct;8(20):1587-92.

184 Egermann M, Lill CA, Griesbeck K, Evans CH, Robbins PD, Schneider E, Baltzer AW. Effect of BMP-2 gene transfer on bone healing in sheep. *Gene Ther.* 2006 Sep;13(17):1290-9.

185 Ramasubramanian A, Shiigi S, Lee GK, Yang F. Non-viral delivery of inductive and suppressive genes to adipose-derived stem cells for osteogenic differentiation. *Pharm Res.* 2011 Jun;28(6):1328-37.

186 Pilling AM, Harman RM, Jones SA, McCormack NA, Lavender D, Haworth R. The assessment of local tolerance, acute toxicity, and DNA biodistribution following particle-mediated delivery of a DNA vaccine to minipigs. *Toxicol Pathol.* 2002 May-Jun;30(3):298-305.

187 Dastgheib S, Irajie C, Assaei R, Koohepeima F, Mokarram P. Optimization of RNA extraction from rat pancreatic tissue. *Iran J Med Sci.* 2014 May;39(3):282-8.

188 Udvardi MK, Czechowski T, Scheible WR. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell.* 2008 Jul;20(7):1736-7.

189 miRNeasy® Mini Handbook, 2013, QIAGEN.

190 Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *J Mol Endocrinol.* 2005 Jun;34(3):597-601.

191 Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 1996 Oct;6(10):995-1001.

192 Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem.* 2000 Oct 15;285(2):194-204.

193 Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1;29(9):e45.

194 Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques.* 1999 Jan;26(1):112-22,124-5.

---

## 5.2 Abkürzungsverzeichnis

ADA	Adenosin-Desaminase
BESTT	BMP-2 Evaluation in Surgery for Tibial Trauma
BMP/BMP-2	Bone Morphogenetic Protein / Bone Morphogenetic Protein 2
BwKrhs	Bundeswehrkrankenhaus
bzw.	beziehungsweise
COPROGs	Copolymer-Protected Gene Vectors
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CRP	C-reaktives Protein
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DGOU	Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat von Adenin (dATP), Guanin (dGTP), Thymin (dTTP), Cytosin (dCTP)
FDA	Food and Drug Administration
GAM	Genaktivierte Matrix
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IL-1, IL-6	Interleukin-1, Interleukin-6
Kap.	Kapitel
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MCF	Maximal Clotting Firmness (Maximale Gerinnsel-Festigkeit)
MCH	mean corpuscular haemoglobin
MCHC	mean corpuscular haemoglobin concentration
MCS-F	macrophage colony stimulating factor
MCV	mean cell volume

---

MPV	mean platelet volume
NRO	Netzwerk Regenerative Orthopädie
n.v.	nicht verfügbar
OP-1	osteogenetic protein 1, rekombinantes Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP-7)
p.a.	posteriore-anteriore
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
pDNA	Plasmid-Desoxyribonukleinsäure
PEI	Polyethylenimin
PEG	Polyethylenglycol
PMMA	Polymethylmethacrylat
PROCOPs	Protected Copolymers
qRT-PCR	quantitative Real-time-Polymerase Chain Reaction
RANKL	Receptor Activator of NF-kappa Ligand
RDW	red cell distribution width
Rh	recombinant human
rt-PCR	reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction
SCID	Severe combined immunodeficiency
SCW	Streptococcal cell wall
TEN	Tintanelastischer Nagel
TGF- $\beta$	Transforming growth factor-beta
TNF	Tumornekrosefaktor
TU	Technische Universität
WHO	World Health Organisation

Die verwendeten Einheiten entsprechen dem internationalen Einheitensystem (SI-Einheiten) oder sind gebräuchliche Nicht-SI-Einheiten und daher hier nicht aufgeführt.

### 5.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozess der aseptischen Lockerung.....	6
Abbildung 2: Struktur des BMP-2-BRIA ectodomain complex .....	9
Abbildung 3: Transfektionsprozess.....	14
Abbildung 4: Copolymer-Protected Gene Vectors .....	18
Abbildung 5: Lyophilisierte Luciferase-COPROGs .....	23
Abbildung 6: Scheren und Enthaarung beider Tibiae .....	24
Abbildung 7: Endotracheale Intubation .....	24
Abbildung 8 a-f: Operationstechnik.....	25
Abbildung 9 a-b: Röntgenaufnahmen der Tibia in 2 Ebenen.....	27
Abbildung 10: Probeneinteilung der Tibia.....	29
Abbildung 11 a-c: Aufarbeitung des Knochens mittels Retsch Schwingmühle .....	30
Abbildung 12: Pipettierschema Probenansatz.....	32
Abbildung 13: Pipettierschema Reaktionsmix.....	33
Abbildung 14: Rabbit-PCR-Programm.....	34
Abbildung 15 a-b: Analyse der mRNA-Synthese des Referenzgenes GAPDH und des Reporter genes Luciferase in der rechten und linken Tibia mittels PCR .....	40
Abbildung 16 a-b: Systemische Analyse der mRNA-Synthese des Referenzgenes GAPDH und des Reporter genes Luciferase mittels PCR am Beispiel eines Tieres mit 4 Tagen Standzeit.....	43
Abbildung 17 a-b: Systemische Analyse der mRNA-Synthese des Referenzgenes GAPDH und des Reporter genes Luciferase mittels PCR am Beispiel eines Tieres mit 7 Tagen Standzeit.....	44
Abbildung 18 a-b: Systemische Analyse der mRNA-Synthese des Referenzgenes GAPDH und des Reporter genes Luciferase mittels PCR am Beispiel eines Tieres mit 28 Tagen Standzeit.....	44
Abbildung 19 a-b: Systemische Analyse der mRNA-Synthese des Referenzgenes GAPDH und des Reporter genes Luciferase mittels PCR am Beispiel des Tieres mit 20 Tagen Standzeit.....	45
Abbildung 20: Konventioneller PCR-Nachweis der systemischen Transfektion in applikationsfernen Geweben in Abhängigkeit von der jeweiligen Standzeit (d) der Tiere .....	46
Abbildung 21: Relativ quantifizierte Luciferase-Expression der Proben von Tier 2.....	49
Abbildung 22: Relativ quantifizierte Luciferase-Expression der Proben von Tier 3.....	49

Abbildung 23: Relativ quantifizierte Luciferase-Expression der Proben von Tier 4.....	49
Abbildung 24: Relativ quantifizierte Luciferase-Expression der Proben von Tier 4.....	49
Abbildung 25: Relativ quantifizierte Luciferase-Expression der Proben von Tier 2.....	50
Abbildung 26: Relativ quantifizierte Luciferase-Expression der Proben von Tier 3.....	50
Abbildung 27: Relativ quantifizierte Luciferase-Expression der Proben von Tier 1.....	50
Abbildung 28: qRT-PCR-Nachweis der systemischen Transfektion in applikationsfernen Geweben in Abhängigkeit von der jeweiligen Standzeit. ....	51

## 5.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppeneinteilung und Versuchsplan .....	22
Tabelle 2: Körpergewicht der Versuchstiere zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten ...	37
Tabelle 3: Ergebnisse der Blut- und Serumanalyse .....	38
Tabelle 4: mRNA-Konzentration (ng/μl) in den Tibiaproben der zwölf Tiere unterschiedlicher Standzeiten .....	41
Tabelle 5: Übersicht zum Transfektionsnachweis in den Tibiaproben aller Tiere nach PCR .....	41
Tabelle 6: mRNA-Konzentration (ng/μl) in den Organ- und Gewebeproben der zwölf Tiere unterschiedlicher Standzeiten.....	42
Tabelle 7: Nachweis einer systemischen Transfektion nach konventioneller PCR - Gruppenverteilung.....	43
Tabelle 8: Nachweis einer mRNA-Synthese des Reportergenes Luciferase in den applikationsfernen Organ- und Gewebeproben aller Tiere mittels konventioneller PCR. ....	47
Tabelle 9: Übersicht zum Transfektionsnachweis in den Tibiaproben aller Tiere nach qRT-PCR – relativ quantifizierte Luciferase Expression $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ .....	48
Tabelle 10: Nachweis einer systemischen Transfektion nach quantitativer RT-PCR - Gruppenverteilung.....	49



---

## 5.5 Verzeichnis der verwendeten Materialien

### Operatives Vorgehen (2.3)

Blutentnahme:

- Butterfly-Kanülen
- Kapillarröhrchen
- Serum- und Blutbildröhrchen (Kabe Labortechnik, D-51588 Nümbrecht-Elsenroth)

Anästhesie:

- 1-Chlor-2,2,2-trifluorethyldifluormethylether (Isofluran 2,5 Vol%); Forene<sup>®</sup> (Abbot GmbH & Co. KG, D-65205 Wiesbaden)
- Ketaminhydrochlorid 10 %; Ursotamin<sup>®</sup> (Serumwerk Bernburg AG, D-06406 Bernburg)
- Medetomidinhydrochlorid; Domitor<sup>®</sup> (Pfizer Pharma GmbH, D-76139 Karlsruhe)
- Xylocain-Gel 2 % (AstraZeneca GMBH, D-22880 Wedel)
- 2,5er Magill-Tubus (WILLY RÜSCH Hospital Vertriebs GmbH, D-71032 Böblingen)
- Buprenorphinhydrochlorid; Temgesic<sup>®</sup> (Essex Pharma GmbH, D-81737 München)
- Enrofloxacin; Baytril<sup>®</sup> (Bayer AG, D-51368 Leverkusen)

Implantat:

- Titannagel  $\varnothing$  2,5 mm (Synthes GmbH, 4500 Solothurn, Schweiz)
- Fibrinkleber (Baxter Deutschland GmbH, D-69126 Heidelberg)
- Luciferase COPROGs [84  $\mu$ g DNA + 0,3 ml Ampuwa] (TU-München, D-81675 München)

OP-Besteck:

- Präparierschere
- Chirurgische und Anatomische Pinzetten, verschiedene Größen
- Klemmchen
- Nadelhalter
- Seitenschneider
- Luer
- Handbohrer  $\varnothing$  2,0/2,5/2,8/3,2 mm (Aesculap AG & Co. KG, D-78532 Tuttlingen)
- Disposable Scalpel No. 15 (Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan)
- Ethicon Vicryl 3-0 (Johnson & Johnson Intl., New Brunswick, U.S.A.)

Radiologische Untersuchung:

- Digital-Cassetten (Fuji Photo Film Co., LTD. Japan) inkl. Röntgenzahlen
- Filme (Fuji Photo Film Co., LTD. Japan)

---

**Geräte:**

- Narkosegerät, Dräger Sulla 800 V (Drägerwerk AG Lübeck, D-23542 Lübeck)
- Waage, Kilomat-Präzisionswaage Typ 2106 (Sartorius AG, D-37075 Göttingen)
- Rasierapparat Favorita II GT 104 (Aesculap AG & Co. KG, D-78532 Tuttlingen)
- Röntgengerät, Mobilett Plus (Siemens AG, D-80333 München)
- Bildwandler, Siemens Siremobil Iso C mit Monitor N44 (Siemens AG, D-80333 München)
- Heizgerät, Thermomaquet (Stierlen-Maquet, D-7550 Rastatt)

**Sonstiges:**

- Sterile OP-Kleidung und Abdeckung
- Braunol<sup>®</sup> (B. Braun Melsungen AG, D-34209 Melsungen)
- Injektionszubehör
- Verbandmaterial
- Enthaarungscreme
- Bepanthen<sup>®</sup> Augensalbe (Bayer Vital, D-51368 Leverkusen)

**Tötung und Probenentnahme (2.4)****Anästhesie:**

- Wie 6.5.1 Verzeichnis der verwendeten Materialien - Operatives Vorgehen

**OP-Besteck:**

- Präparierschere
- Chirurgische und Anatomische Pinzetten, verschiedene Größen
- Disposable Scalpel No. 11 (Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan)
- Luer
- Handbohrer (ø 2,8 mm)

**Blutentnahme:**

- Wie 6.5.1 Verzeichnis der verwendeten Materialien - Operatives Vorgehen

**Sonstiges:**

- Injektionszubehör
- Thiopental-Natrium (Trapanal<sup>®</sup>, Byk Gulden)
- Kaliumchlorid 14,9 % (B. Braun, D-34209 Melsungen)
- Pipettierzubehör
- RNAlater<sup>®</sup> (QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden)
- Flüssig-Stickstoff

## Molekularbiologisches Vorgehen (2.5)

Aufarbeitung der Proben:

- Disposable Scalpel No. 15 (Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan)
- Anatomische Pinzette
- Zellkulturschale, Falcon® Integrid™ (Becton Dickinson and Company, New York, USA)
- RLT-Puffer +10 µl β-Mercaptoethanol/1 ml RLT (QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden)
- Flüssig-Stickstoff
- RNeasy® (QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden)
- QIAzol™ RNA Stabilization Reagent (QIAGEN Sciences, Maryland, USA)
- Chloroform (Merck KG aA, D-64271 Darmstadt)

RNA-Isolation aus Knochen und Organen:

- RNeasy® Mini Kit 50 Cat.No. 74104 (QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden) beinhaltet:
  - Buffer RW1
  - RNase-free Water
  - RNeasy Mini Spin Column
  - Buffer RLT (+10 µl β-Mercaptoethanol/1 ml RLT)
  - Buffer RPE (+ 4 Vol. 96-100 % EtOH)
  - Collection Tubes (1,5 ml und 2 ml)

Umschreiben der mRNA in cDNA:

- 100 mM dGTP, dATP, dTTP, dCTP (Invitrogen™ GmbH, D-76131 Karlsruhe)
- Random Primers (Invitrogen™ GmbH, D-76131 Karlsruhe)
- M-MLV RT 5x Reaktionspuffer (Promega Corporation, Madison, USA)
- Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor 40 U/µl (Promega Corporation, Madison, USA)
- M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus, Point Mutant (M-MLV RT H-) 200 U/µl (Promega Corporation, Madison, USA)
- Ribonuclease H (RNase H) 1,5 U/µl (Promega Corporation, Madison, USA)

PCR:

- iQ™ Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) beinhaltet:
  - Hot-iTaq™ DNA-Polymerase 50 U/ml
  - 1,6 mM dNTPs
  - Reaktionspuffer (100 mM KCl + 40 mM Tris-HCl + pH 8,4 + 6 mM MgCl<sub>2</sub> + stabilizers)
- Absolute™ Max QRT-PCR Sybr® Green Fluorescein Mix (Abgene Inc., D-20097 Hamburg)
- Luciferaseprimer (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, D-12103 Berlin)
- GAPDH-Primer (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, D-10829 Berlin)

---

Agarose-Gelelektrophorese:

- Agarose Serva for DNA electrophoresis (SERVA Electrophoresis GmbH, D-69115 Heidelberg)
- Tris-Acetat-EDTA Puffer (Ultra Pure™ Agarose, Life Technologies, Paisley, Schottland)
- Ethidiumbromid (Merck KG aA, D-64271 Darmstadt)
- PCR Markers (Promega Corporation, Madison, USA)
- Loading-Dye (Promega Corporation, Madison, USA)
- Elektrophoresekammer inkl. Schlitten und Kämme

Sonstiges:

- Pipettierzubehör
- Ultra Clear Cap Strips (Abgene Inc., D-20097 Hamburg)
- Ethanol 70 % und 100 % (Herbeta-Arzneimittel, D-12099 Berlin)
- Aqua ad iniectabilia Braun 10 ml (B. Braun Melsungen AG, D-34209 Melsungen)

Geräte:

- Spectrafuge mini C1301 (neoLab® Laborspezialprodukte, D-69123 Heidelberg)
- Eppendorf Mini Spin plus Centrifuge 5453 (Eppendorf AG, D-22331 Hamburg)
- Vortexer VV3 (VWR International GmbH, D-64295 Darmstadt)
- Retsch Schwingmühle Typ MM2 (Retsch GmbH, D-42781 Haan)
- Sartorius Waage CP 153 (Sartorius AG, D-37075 Göttingen)
- T 10 basic und T 25 basic ULTRA-TURRAX® mit Dispergierwerkzeug (IKA® Werke GmbH & Co. KG, D-79219 Staufen)
- GeneQuant II RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech GmbH, D-79111 Freiburg)
- Eagle Eye™ II (Stratagene® Europe, Amsterdam, Niederlande)
- Universal 32R (Hettich Zentrifugen GmbH & Co. KG, D-78532 Tuttlingen)
- iCycler-System (Bio-Rad Laboratories, D-80939 München)
- Mastercycler gradient 5331 (Eppendorf AG, D-22331 Hamburg)
- Abzug Wariolab, Mosilien W98 (Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, D-88231 Wangen)
- Mikrowelle

## **6 Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Yvonne Funke, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Sicherheitsnachweis zum Ausschluss einer systemischen Genexpression nach lokaler Applikation wachstumsfaktor-spezifischer Plasmide am Kaninchenmodell – Molekularbiologische Untersuchung“ selbständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik und Resultaten entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den 25.06.2015

Yvonne Funke

**Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Yvonne Funke hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Faensen B, Wildemann B, Schwabe P, Stemberger A, Plank C, Funke Y, Hain C, Höhne J, Schmidmaier G. Applikation von BMP-2 spezifischem Plasmid in Fibrinkleber fördert nicht die Implantateinheilung, Poster 72. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, 94. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie, 49. Tagung des Berufsverbandes der Fachärzte für Orthopädie 2008.

Beitrag im Einzelnen: OP-Assistenz, Probengewinnung und -aufarbeitung, laborexperimentelle Arbeiten (molekularbiologische Analysen) und deren Auswertung, Zuarbeit der Daten zum Manuskript

Publikation 2: Faensen B, Wildemann B, Hain, Höhne JC, Funke Y, Plank C, Stemberger A, Schmidmaier G. Local Application of BMP-2 Specific Plasmids in Fibrin Glue does not Promote Implant Fixation. BMC Musculoskeletal Disorders 2011;12:163.

Beitrag im Einzelnen: OP-Assistenz, Probengewinnung und -aufarbeitung, laborexperimentelle Arbeiten (molekularbiologische Analysen) und deren Auswertung, Mitarbeit an der Erstellung und Korrektur des Manuskriptes

Berlin, den 25.06.2015

Prof. Dr. rer. nat. Britt Wildemann

Berlin, den 25.06.2015

Yvonne Funke

## **7 Curriculum vitae**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 8 Publikationsverzeichnis

Faensen B, Wildemann B, Schwabe P, Stemberger A, Plank C, **Funke Y**, Hain C, Höhne J, Schmidmaier G. Applikation von BMP-2 spezifischem Plasmid in Fibrinkleber fördert nicht die Implantateinheilung, Poster 72. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, 94. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie, 49. Tagung des Berufsverbandes der Fachärzte für Orthopädie 2008.

Faensen B, Wildemann B, Hain, Höhne JC, **Funke Y**, Plank C, Stemberger A, Schmidmaier G. Local Application of BMP-2 Specific Plasmids in Fibrin Glue does not Promote Implant Fixation. BMC Musculoskeletal Disorders 2011;12:163.

**Funke Y**, Krapohl BD, Lieber A. Hyperhidrosis. Wehrmed Mschr 2011;55:235-239.



## 9 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Univ.- Prof. Dr. med. Norbert P. Haas und Herrn Prof. Dr.-Ing. Georg N. Duda für die Möglichkeit der Durchführung der Experimente.

Für die Überlassung des Themas gilt mein besonderer Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. rer. nat. Britt Wildemann und meinem ehemaligen Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Gerhard Schmidmaier (seit 01.02.2010 Leiter Unfall- und Wiederherstellungschirurgie Department für Orthopädie, Unfallchirurgie und Paraplegiologie Universitätsklinikum Heidelberg). Überdies bedanke ich mich ganz besonders bei Frau Wildemann für die hervorragende, stets fachkundige, überaus motivierende und außerordentlich geduldige Betreuung und wissenschaftliche Unterstützung meiner Arbeit. Sie stand mir jederzeit für meine unendlichen Fragen und bei allen Problemen im Rahmen der Durchführung der Arbeit zur Verfügung und las sämtliche Entwürfe der vorliegenden Arbeit Korrektur.

Erst durch die Förderung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) wurde der vorliegende Versuch ermöglicht (SCHM 1436/5-1), dafür möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinem Promotionsbetreuer Dr. med. Benjamin Faensen für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche, welche diese Form der Dissertation erst möglich gemacht hat.

Mein Dank gilt ferner meinen Promotionskollegen Dr. med. Julius Höhne und Christian Hain, die an Teilen der Arbeit mitgewirkt haben, für die kollegiale Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Tierexperimente, sowie den Mitarbeitern der tierexperimentellen Einrichtung des Campus Virchow Klinikums der Charité.

Für die stetige Unterstützung und geduldige Betreuung, regelmäßige Aufmunterung und fortwährende Hilfsbereitschaft bei der Aufarbeitung der Proben und den molekularbiologischen Analysen im Labor möchte ich vor allem Frau Anke Kadow-Romacker und Frau Nicole Bormann ganz besonders danken sowie allen übrigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe FIBRIN. Ohne sie wäre ich so manchen Tag verzweifelt.

Mein größter Dank für ihre liebevolle Unterstützung sowie für ihre unermüdliche Geduld und Aufbauarbeit, mit deren Hilfe ich dies alles schaffen konnte, gilt meinen Eltern Regina und Ulrich Funke, die mir diesen Werdegang erst ermöglichten. Danke, dass Ihr an mich geglaubt habt!

Ein weiterer ganz besonderer Dank gilt meiner Schwester, die mich über all die Jahre immer wieder motiviert, mir mit Rat und Tat stets zur Seite gestanden, mich vorangetrieben sowie mir ein Ultimatum gesetzt hat, was ich leider nicht in der Lage war einzuhalten, und mich trotzdem bis zum unerbittlichen Schluss unterstützt hat. Danke! Danke! Danke!

Weiterhin großartig unterstützt und immer wieder motiviert haben mich Dr. med. Stefan Lenz, Dr. med. Uwe Kohn, Dr. med. Romy Meißner, Dr. med. Susanne Brechtel, Dr. med. Melanie Muth, Dr. med. Fabian Spies, Dr. med. Dorothee Wolff, Dr. med. Catharina Thüre, Anne Köhler und Bernhard Trömer, denen ich an dieser Stelle ganz herzlich danken möchte.

Auch danke ich meinem Computer, dass er mich nur einmal in Form eines Total-Crashes mit anschließender kostenintensiver Datenwiederherstellung zur Verzweiflung gebracht hat und nachfolgend vor größeren Abstürzen bewahrte.

Außerdem möchte ich mich an dieser Stelle bei den kleinen weißen Kaninchen bedanken ohne die es meine Doktorarbeit so nicht gegeben hätte.

Yvonne Funke