Aus der Klinik für Chirurgie
Sektion Plastische und Handchirurgie
Zentrum für Schwerbrandverletzte
Der Universität zu Lübeck

Direktor: Professor Dr. Peter Mailänder

Angiogenetische Effekte von PDGF-BB nach zellbasiertem adenoviralem Gentransfer in verschiedenen Ischämiemodellen der Ratte

Inauguraldissertation

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

vorgelegt von

Christian Niedworok

aus Velbert

Lübeck 2006

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. G. Machens

2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. E. Metzen

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2007

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 06.07.2007

gez. Prof. Dr. med. W. Solbach
- Dekan der medizinischen Fakultät-

meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Kapitel	Inhalt	Seite
1	**Einleitung**	
1.1	Lappenplastiken in der Plastischen Chirurgie	6
1.2	Angiogenese und ihre Bedeutung in der Plastischen Chirurgie	8
1.3	Protein-basierte versus zell-basierte Verfahren zur Angiogeneseinduktion in der Plastischen Chirurgie	10
1.4	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	12
2	**Material und Methoden**	
2.1	Versuchsplanung	13
2.2	Material	14
2.3	Methoden	
2.3.1	Zellgewinnung	16
2.3.2	Zellkultur und –pflege	18
2.3.3	Produktion rekombinanter adenoviraler Vektoren	20
2.3.4	Transduktion	22
2.3.5	X-gal-Modell zum Vitalitätsnachweis transduzierter Zellen	24
2.3.6	Versuchstiere und operatives Vorgehen	25
2.4	Auswertung in vitro	31
2.4.1	ELISA	31
2.4.2	Transduktionsraten	32
2.5	Auswertung in vivo	33
2.5.1	Klinisch planimetrische Auswertung	34
2.5.2	Mikroangiographie	34
2.5.3	Histologie	36
2.5.4	Rt-PCR, Immunhistochemie	38
2.6	Statistik	39
3	**Ergebnisse**	
3.1	Nachweis des Überlebens der transduzierten Zellen im x-gal-Modell	40
3.2	Transduktionsraten	41
3.3	Produktion von PDGF-BB	42
3.3.1	Expression in vitro	42
3.3.2	Expression in vivo	44
3.4	Klinische Effekte der modifizierten Fibroblasten in einem etablierten Lappenmodell der Ratte	44

3.5	Histologie und Pseudotumoren		47
3.6	Mikroangiographie		52
4	**Diskussion**		
4.1	Gentransfermodell		56
4.2	Lappenmodell und Lappenüberleben		64
4.3	Pseudotumoren		74
5	**Zusammenfassung**		79
6	**Literatur**		81
7	**Anhang**		
7.1	Tabellen		94
7.1.1	Tabelle 1:	Fluoreszenzraten	94
7.1.2	Tabelle 2:	ELISA-Ergebnisse	95
7.1.3	Tabelle 3:	Lapppenauswertung, Planimetrie, Histologie, Mikroangiographie	96
7.1.4	Tabelle 4:	Pseudotumoren	100
7.1.5	Tabelle 5:	Mittelwerte und Standardabweichungen der Einzelwerte aus 7.1.3	101
7.1.6	Tabelle 6:	T-Werte	101
7.1.7	Tabelle 7:	Quantile der t-Verteilung (für $0 < \nu \leq 20$)	102
7.2	Veröffentlichungen und Kongressteilnahmen		103
8	**Danksagung**		108
9	**Lebenslauf**		109

1. Einleitung

1.1 Lappenplastiken in der Plastischen Chirurgie

Seit dem Jahr 1993 ist die Plastische Chirurgie ein selbständiges Gebiet der Chirurgie mit einem eigenständigen Katalog zur Facharztausbildung. Einige Techniken plastisch chirurgischer Operationen als solche sind jedoch bereits seit mehreren Jahrtausenden bekannt. Bereits vor 2000 Jahren erschien in Indien eine Schrift mit dem Titel „Susruta samhita“, die von der Wiederherstellung einer Nase durch Verwendung eines Schwenklappens der Stirn berichtete. Im 16. Jahrhundert gelang dies Kaspar Tagliacozzi unter Verwendung eines sogenannten gestielten Lappens aus dem Oberarm. Mit der Entwicklung mikrochirurgischer Operationstechniken wurde auch der freie Gewebetransfer denkbar. Mikrochirurgische Gefäßnähte und die damit verbundene Reanastomosierung (beispielsweise von freien autologen Muskeltransplantaten an beliebigen Stellen des Körpers) revolutionierten rekonstruktive Möglichkeiten. Von jetzt an war es denkbar, große Gewebsdefekte mit Hilfe autologen Materials zu decken. Ein gewaltiger Vorteil gegenüber allogenem Material, da es im Idealfall zu keinerlei Abstoßungsreaktionen kommt.
Der verwendete Lappen in der Plastischen Chirurgie besteht je nach Bedarf aus Haut und subkutanem Fettgewebe sowie weiteren angrenzenden Geweben (Faszie, Muskel, Knochen). Den verwendeten Geweben gemäß spricht man von fasziokutanen, myofasziokutanen und osteomyofasziokutanen Lappen.

Das Prinzip der Lappenplastik lässt sich in diverse Subtypen differenzieren, die mit der Gefäßversorgung des Gewebes in Zusammenhang stehen.

- Wird der Lappen über nicht näher definierte, zufällig einsprossende Gefäße ernährt, so spricht man von einem „Random-pattern Flap“.
- Wird er über ein anatomisch definiertes Gefäß mit arteriellem Zu- und venösem Abfluss versorgt, wird er „Axial-pattern Flap“ genannt.

Die Technik der Verlagerung des Lappens liefert eine weitere Unterscheidung.

- Bei der Verlagerung gesunden Gewebes in ein unmittelbar benachbartes, handelt es sich um einen Nahlappen.

- Bei Verlagerung in ein Gebiet, das der Entnahmestelle nicht unmittelbar anliegt, spricht man von einem Fernlappen. (Dabei bleibt der Lappen jedoch mit seiner Basis im Ursprungsgebiet befestigt.)
- Wird der Lappen komplett gehoben, seine ernährenden Gefäße durchtrennt und an anderer Stelle mikrochirurgisch reanastomosiert, so liegt ein freier Lappen vor.

Da der Random-pattern flap nicht über definierte Gefäße versorgt wird, ist hier besonders zu berücksichtigen, dass bei der Transplantation ein Verhältnis Basis/Länge von etwa 1 : 2 nicht überschritten wird, damit Randzonenareale nicht absterben. Der Axial-pattern flap kann wesentlich länger im Verhältnis zur Basis sein, ohne Schaden zu nehmen. [Chang 2003, Chen 2003]

Die Lappenplastik - und hier sei besonders der freie Lappen hervorgehoben, bei dem eine komplette Durchtrennung seiner ursprünglichen Gefäßversorgung erfolgt- kommt also Patienten zugute, bei denen große, offene Wundverhältnisse keine lokale chirurgische Lösungsmöglichkeit bieten. Oft ist auch eine Primär- oder Sekundärnaht nicht möglich, da die Weichteilsituation im Wundgebiet keine adäquaten Aussichten auf einen Heilerfolg bietet. Als Alternative diente lange Zeit die offene Wundbehandlung. Die damit verbundenen Probleme wie Schmerzen, Infektionen, Blutungen, erhebliche Einschränkungen des Alltagslebens, seelische Belastung und vieles mehr, liegen auf der Hand. Allerdings sind auch dem plastisch chirurgischen Verfahren Grenzen gesetzt. So ist beispielsweise gerade beim mikrochirurgisch reanastomosierten Muskellappen der Erfolg der Operation deutlich vom allgemeinen Gefäßzustand des Patienten abhängig. Stark vorgeschädigte Gefäße ermöglichen keinen ausreichenden Blutfluss, der für das Überleben des Transplantates jedoch essentiell wichtig ist. [Rucker 1998]

Hier befindet sich die Schnittstelle zu einem interdisziplinären Problem in der Medizin. Nicht nur dem Chirurgen werden durch den Gefäßstatus des Patienten Möglichkeiten eröffnet sowie Grenzen gesetzt. Auch in der Inneren Medizin hängt der Heilerfolg oft von oben genannten Faktoren ab. Man denke unter anderem an die Rekonvaleszenz nach einem infarzierenden Krankheitsgeschehen (Herz-, Mesenterial-, Hirninfarkt,...), an die Folgen der Kombination aus schlechtem Gefäßstatus und Polyneuropathie wie sie beim Diabetiker der Fall sind (chronisches Ulcus cruris,...) und an Schmerz- und Begleitzustände aller Art bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit. Bei all diesen Beispielen wird deutlich, wie wichtig für die Heilung vieler Krankheiten und ihrer

Folgen die Bekämpfung eines ischämischen Zustandes durch die Generierung einer kapillären Mehrversorgung sein kann. Durch die Schaffung einer Mehrversorgung des Gewebes mit Blut wäre es möglich, heute schwer therapierbare Krankheiten in ihrer Prognose zu verbessern und die Lebensqualität der betreffenden Patienten zu steigern.

1.2 Angiogenese und ihre Bedeutung in der Plastischen Chirurgie

Wachstum (sei es während der Embryonal- oder Kindheitsphase sowie in der Adoleszenz im Sinne von Wund- oder Defektverschluss) geht mit dem Begriff der Proliferation Hand in Hand. Zellvermehrung und erhöhte Syntheseleistungen sind conditio sine qua non bei reparativen Prozessen sowie embryonalem und kindlichem Wachstum. Dies alles steht im Sinne einer erwünschten Gewebsproliferation zur Wiederherstellung eines ursprünglichen Zustandes in der Wundheilung (Restitutio ad integrum), oder dem Schaffen einer körperlichen Reife im physiologischen Wachstum jedes Menschen. Neben diesen Varianten des Wachstums existiert noch eine pathologische, unkontrollierte Form, wie man sie bei Neoplasien beobachtet.

Die bereits angesprochene Zellvermehrung und erhöhte Syntheseleistung ist der Schlüssel dieser Erörterung, denn an sie ist unbedingt die Angiogenese gekoppelt. Findet eine Zellvermehrung im physiologischen Sinne statt, so geschieht dies immer zusammen mit einer Gefäßvermehrung, denn dem Prinzip der Ernährung per diffusionem sind physikalische Grenzen gesetzt. Wird die Strecke zwischen zuführender Kapillare und versorgendem Gewebe zu lang, wird das Gewebe ischämisch und unterversorgt. Die Gewebeischämie übt gleichzeitig einen angiogenetischen Effekt aus, so dass das Gewebe in der Lage ist, diesen Reiz durch die Bildung von Kapillaren zu beseitigen. [Ladoux 1993, Nomura 1995, Conway 2003] Angiogenese ist ein essentieller Vorgang, der während des gesamten Lebens unaufhörlich im Körper stattfindet und Abläufe wie Wundheilung oder Gewebsproliferation im Allgemeinen erst ermöglicht. Der erfolgte Beginn der Wundheilung ist sogar makroskopisch sichtbar: vom Wundrand her sprossen unter dem Einfluss von Zytokinen Kapillaren in den Defekt, zwischen denen Myofibroblasten proliferieren. [Sephel 1996, Olsen 1997] Der behandelnde Arzt spricht von der Bildung des sogenannten Granulationsgewebes, welches ein sicheres Zeichen dafür ist, dass Heilungsprozesse stattfinden.

Das z.B. im Rahmen einer Verletzung geschädigte oder delokalisierte, und dabei seine vaskuläre Versorgung verlierende Gewebe, wird je nach Art unterschiedlich schnell nekrotisch, stirbt also ab. Dabei können nicht nur die primäre Ischämie mit konsekutiver Hypoxie sowie sekundäre Faktoren wie Azidose und Kumulierung harnpflichtiger Substanzen für eine Zellschädigung verantwortlich gemacht werden, vielmehr besteht ein komplexer Zusammenhang zwischen den einzelnen Zelltodinduktoren. [Miyamoto 2000, Luo 2001]

An dieser Stelle wird die Frage aufgeworfen, inwiefern die Angiogenese unter diesen Gesichtspunkten für die Anwendung in der Plastischen Chirurgie bedeutsam sein kann?

Auch mit den heutigen mikrochirurgischen Methoden der modernen Medizin kann man nicht in jedem Fall absolut sicher sein, dass eine Lappenplastik problemlos anheilt. Vor allem mangelnde Blutversorgung durch Thrombosierung, Gefäßspastiken, etc. verhindern in einigen Fällen den chirurgischen Erfolg. Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass die Lappenplastik ein elektiver Eingriff ist, der Planung und Vorbereitung ermöglicht. Wünschenswert wäre es, bereits vor einer Operation die Möglichkeit zu haben deren Erfolg zu erhöhen, zum Beispiel indem die Gefäßversorgung des zu transplantierenden Gewebes verbessert wird. Wie bereits in Kapitel 1.1 beschrieben, benötigt die verwendete Lappenplastik je nach Beschaffenheit ein bestimmtes Verhältnis von Breite zu Länge. An bestimmten Stellen des Körpers, beispielsweise dem Gesicht, ist dieses Verhältnis größer, an den Extremitäten und dem Stamm erfahrungsgemäß kleiner. Das bedeutet, Lappenplastiken des Gesichtes können im Verhältnis zur gewählten Breite weiter in die Länge präpariert und eingesetzt werden. Lappenplastiken der Extremitäten und des Stammes sind dagegen kleiner und immer näher am Verhältnis 1 zu 1. Die Begründung hierfür liegt darin, dass die Anzahl der Kapillaren pro Quadratmillimeter Haut im Gesicht höher ist als die an den Extremitäten und am Stamm. Ein Prinzip, das man sich mit Hilfe der Gentechnik für elektive Eingriffe in der Chirurgie therapeutisch zunutze machen möchte. Denkbar ist es, die Gefäßversorgung eines Gewebeareals zu verbessern, um eine chirurgische Intervention in dem Operationsgebiet sicherer werden zu lassen.

Die angesprochene Tatsache, dass der Heilungserfolg bei transplantiertem Gewebe stark von dessen Blutversorgung abhängt, gilt nicht nur für die Lappenplastiken. Auch im Bereich der Versorgung von Brandverletzungen oder anderen Hautdefekten ist dieses Prinzip von großer Bedeutung. Die Transplantation von Voll- oder Spalthaut auf bradytrophes Gewebe bereitet auch heute noch große Schwierigkeiten. Auf Knochen oder Knorpel übertragen, wird ein solches Hauttransplantat nicht anwachsen, es wird

ischämisch und nekrotisch. Diese Art von Transplantat ist auf das Vorhandensein eines gefäßreichen Untergrundes angewiesen, da es auf diesem Weg versorgt wird. Leider sind solche optimalen Wundverhältnisse nicht an allen Stellen des Körpers vorhanden (beispielsweise am ventralen Unterschenkel, da hier die knöcherne Margo anterior und Facies medialis relativ oberflächlich verlaufen). Hier bietet das Prinzip der induzierten Angiogenese einen neuen therapeutischen Ansatz. Die Beobachtung einer verbesserten Heilung in einem gut mit Blut versorgten Gewebe im Vergleich zu der schlechten Heilungstendenz in bradytrophem Gewebe legt die Vermutung nah, dass gesteigertes Gefäßwachstum zu einer Verbesserung der Wundsituation führen kann. Gerade für die Plastische Chirurgie hat diese Erkenntnis einen hohen Stellenwert. Die Versorgung Schwerbrandverletzter durch den Plastischen Chirurgen erfordert gute intensivmedizinische Kenntnisse, manuelles Geschick sowie gute Wundheilung des Patienten. Letztere ist von ausschlaggebender Bedeutung für die Abwendung eines Wundinfektes. Je eher eine Wunde verheilt und gedeckt ist, desto geringer wird die Wahrscheinlichkeit der Infektion. Wird die Gefäßversorgung im Wundgebiet verbessert, so kommt es zu einer schnelleren Heilung und die Gefahr der Sepsis, an der auch heute noch viele Patienten im Bereich der Verbrennungsmedizin versterben, verringert sich. Die ersten Versuche mit lokal angewandtem rekombinantem PDGF-BB zeigten bei Patienten mit Dekubitalulzera bereits, dass zwar immer noch die operative Therapie Methode der Wahl ist, diese aber durch die Verabreichung zusätzlicher Therapeutika in ihrer Effizienz gesteigert werden kann. [Kallianinen, 2000] Auch in anderen Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass PDGF unter bestimmten Bedingungen in vivo angiogenetische Effekte zeigt. [Machens 2002, Cao 2003, Hao 2004]

1.3 Protein-basierte versus zell-basierte Verfahren zur Angiogeneseinduktion in der Plastischen Chirurgie

Auch in der Plastischen Chirurgie hat man Versuche unternommen, die Angiogenese im Gewebe unter verschiedenen Bedingungen zu verbessern. Frühere Arbeiten verwendeten noch allein protein-basierte Verfahren. Hierbei wurden angiogenetische Proteine, vor allem $VEGF^{165}$, bFGF oder PDGF-BB in hochaufgereinigter Form lokal in das Zielgewebe appliziert. Als problematisch erwies sich jedoch die Tatsache, dass alle Proteine in vivo eine oft nur auf Minuten begrenzte Halbwertzeit besitzen und somit nur

kurzfristig ihre therapeutischen Effekte entfalten können (Fig. 1). [Machens 2003] Neuere Ansätze bedienen sich deshalb zell-basierter Techniken. Hierbei werden beispielsweise Zellen appliziert, die selber die Differenzierungskapazität zu endothelialen Strukturen haben (z.B. endotheliale Vorläuferzellen, bestimmte Stammzellpopulationen). Man spricht bei einer daraus resultierenden Gefäßentwicklung in diesem Falle von Vaskulogenese. Ein anderer Ansatz zell-basierter Techniken besteht darin, ex vivo genetisch veränderte Zellen zu verwenden, die imstande sind, zumindest temporär bestimmte angiogenetische Proteine in vivo zu produzieren. Letzterer Ansatz ist erst seit wenigen Jahren experimentell angewendet worden und hat den bis dato häufiger gebrauchten direkten Gentransfer zunehmend abgelöst. Grund dafür ist die Tatsache, dass eine direkte Applikation von genveränderndem Material in vivo Ungewissheit darüber hinterlässt, welche Zellen in vivo genetisch manipuliert wurden und wie lange und in welcher Intensität die gewünschte Proteinexpression erfolgt. Hingegen erlaubt die Genmanipulation ex vivo ein Monitoring der bereits vorselektierten Zielzellen hinsichtlich ihrer Genexpression, bevor eine zweite Charge dieser Zellen in vivo transplantiert wird, um im gewünschten Zielgewebe die therapeutischen Proteine über einen definierten Zeitraum freizusetzen (Fig. 2).

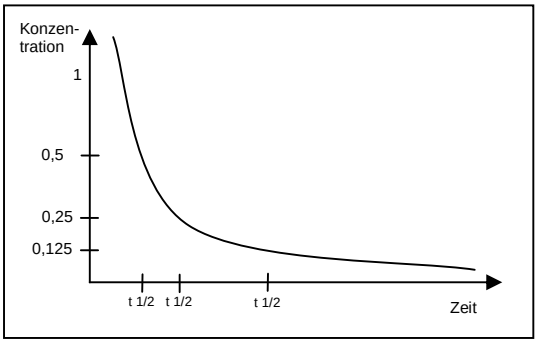


Fig. 1: Auftrag der Konzentration gegen die Zeit bei herkömmlicher Verabreichung eines Medikamentes; Medikamente mit kurzer Halbwertszeit unterliegen einem relativ schnellen Abbau; der Abbau erfolgt nicht linear sondern exponentiell.

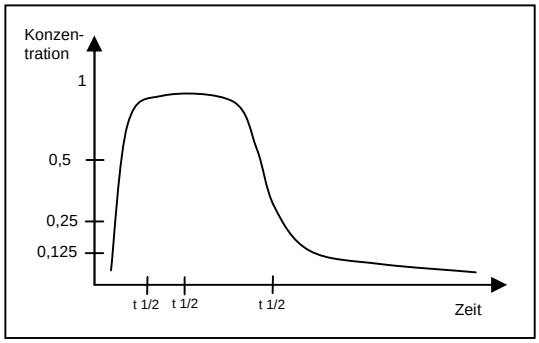


Fig. 2: Durch autologe Produktion des therapeutischen Proteins in vivo kommt es trotz gleich gebliebener Eliminationskonstante (erkennbar am steilen Kurvenabfall analog zu Fig. 1) zu einem länger anhaltenden Konzentrationsmaximum im Gewebe.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es nötig aufgrund des umfassenden experimentellen Aufbaus und Erlangens großer klinischer Datenmengen, die Auswahl der zu untersuchenden Wachstumsfaktoren sinnvoll auf einen einzelnen zu beschränken (hier PDGF-B). Klinische Ergebnisse weiterer Wachstumsfaktoren sind Bestandteil anderer Forschungsarbeiten und -gruppen.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit soll der Frage nachgegangen werden, ob es möglich ist, eine therapeutische Angiogeneseinduktion in vivo durch Zellen zu induzieren, die zu einer temporären Expression von PDGF-BB imstande sind. Solche modifizierten Zellen müssen mehrere Bedingungen erfüllen:

1. Sie müssen immunologisch kompatibel mit dem Zielgewebe sein.
2. Sie müssen eine zeitlich begrenzte Proteinexpression gewährleisten, um das Expressionssystem in vivo kontrollierbar zu machen.
3. Sie dürfen ihre Wirkung nur im therapeutisch zu behandelnden Geweben entfalten und nicht in ortsfremde Gewebestrukturen einwandern (‚trafficking').
4. Sie sollten eine therapeutische angiogenetische Wirkung entfalten können.

Um diese Anforderungen überprüfen zu können, ist es erforderlich, die lokale in vivo Wirkung solcher modifizierter Zellen im Langzeitversuch zu untersuchen sowie ein geeignetes Tiermodell zu verwenden, welches die Überprüfung eines therapeutischen angiogenetischen Effektes ermöglicht.

Fragestellung und Zielsetzung dieser tierexperimentellen Arbeit sind daher aufgeteilt in folgende Punkte:

1. Ist es möglich, körpereigene Zellen zu entnehmen, ex vivo zu kultivieren und einem isogenen Wirtsorganismus immunologisch kompatibel wieder zuzuführen?
2. Kann in vitro eine genetische Modifikation der Zellen vorgenommen und somit die Produktion eines therapeutisch wirksamen Proteins (PDGF-BB) angeregt werden?
3. Welche lokalen Gewebereaktionen werden durch die in vivo Implantation solcher genetisch modifizierter Zellen ausgelöst?
4. Gelingt es durch PDGF-BB, das transient im Körper durch diese Zellen produziert wird, die Nekrosewahrscheinlichkeit eines definierten ischämischen Gewebeareals durch therapeutische Angiogeneseinduktion herabzusetzen?

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsplanung

Zur Beantwortung der genannten Fragestellungen wird der Versuchsablauf wie folgt geplant:

1. Die zu modifizierenden Zellen sollen in vivo möglichst keine Immunreaktion hervorrufen. Aus diesem Grund werden ausschließlich isogene Fibroblasten verwendet. Diese werden in einem ersten Schritt in vivo gezüchtet.
2. Die gewonnenen Fibroblasten sollen genetisch modifiziert werden, um PDGF-BB zu produzieren. Dazu erfolgt ihre Kultivierung und Transduktion in vitro.
3. Modifizierte Fibroblasten werden in isogenes Rattengewebe transplantiert, um lokale Langzeiteffekte untersuchen zu können (Fig. 3).
4. Zum Nachweis eines klinischen Effektes wird eine Ischämiesituation am Tiermodell generiert und die modifizierten Fibroblasten werden appliziert. Dazu werden verschiedene Gruppen gebildet.

   Zielort der Untersuchungen ist chirurgisch induziertes ischämisches Gewebe, das ohne therapeutische Intervention mindestens zu 50 % nekrotisieren würde. Um standardisierte statistische Aussagen machen zu können, wird in allen Versuchstieren der gleiche Gewebedefekt provoziert. Verwendet wird hierzu der von McFarlane 1965 beschriebene myofasziokutane Hautlappen mit einer definierten Größe von 8 x 2 cm. [McFarlane 1965] Anhand dieses Vorgehens wird ein Areal generiert, das zuverlässige Abgrenzungen vitaler und avitaler Gewebeanteile erlaubt.
5. Die eingetretenen Effekte werden dokumentiert, untersucht und ausgewertet.

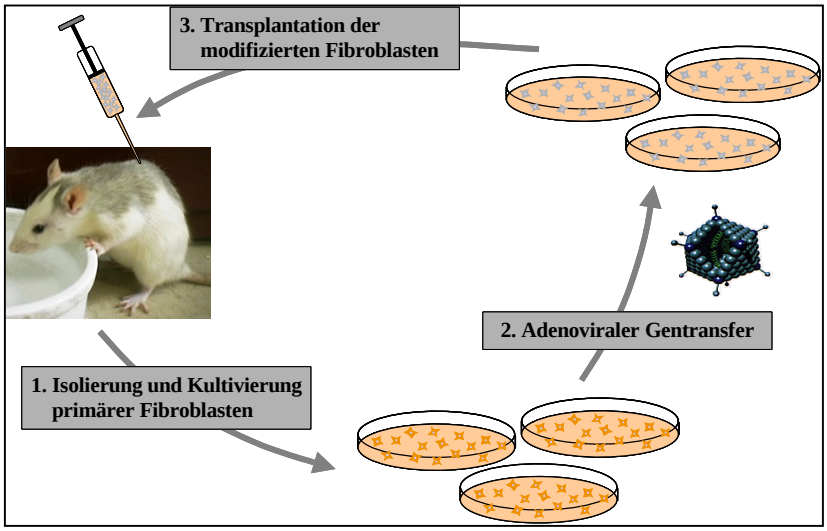


Fig. 3: Grundprinzip des angewandten Modells von Entnahme, Transduktion und Implantation isogener Zellen.

2.2 Material

a) Zellgewinn-, -kultur und genetische Modifikation

Fibroblasten Kulturmedium:

- Dulbecco`s modifiziertes Eagle Medium (DMEM, hochprozentige Glukose, L-Glutamin, Natriumpyruvat 110 mg/L von Gibco)
- FBS (fetal bovine serum = fetales Rinderkalbserum) 10% (Fa. HtClone/USA)
- Penicillin/Streptomycin 100 IU-100microl/ml (Fa. Böhringer)
- Amphotericin
- Ascorbinsäure

Das im Text genannte Vollmedium besteht aus einer Mischung im Verhältnis von 500 ml DMEM, 25 ml FBS, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 5 ml Ascorbinsäure (1:10) und 1 ml Amphotericin. Von dieser Lösung werden pro Zellkulturflasche (s.u.) 25 ml benötigt.

PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung) bestehend aus 138 mM NaCl, 2,7 M KCl, 8,1 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2PO_4, sterilisiert über ein 0,45 Mikrometer Filter

Trypsinlösung (Trypsin 1-300, Fa. ICN Biochemicals), bestehend aus 0,1% D-Dextrose (w/v) und Trypsin 0,1% (w/v) in PBS bei einem pH von 7,5. Das Gemisch wird filtersterilisiert und kann bei –20°C asserviert werden. Wiederholtes Einfrieren und Wiederauftauen ist zu vermeiden.

DMSO (Dimethyl-Sulphoxid; Fa. Sigma-Aldrich/Irvine England)

Quantikine human pdgf-bb immunoassay ELISA-Kit (R&D Systems GmbH Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)

Polyklonale Anti-PDGFb-Antikörper und Anti-Kaninchen-, bzw. Anti-Ziege IgG (R&D Systems GmbH)

Pufferlösung 0,5% Triton X100 und 3% (w/v) skim-milk in PBS

Streptavidin-Peroxidase, 3-Amino-9-ethylcarbazol und 3,3`-Diaminobenzidin in handelsüblichen Mengen

ABI Prism^{TM} 6100 NucleicAcid PrepStation und ABI^{TM} 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)

Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche, Mannheim, Deutschland)

TaqMan® Gene Expression Assay Hs00234042_m1 und TaqMan® Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems)

Weitere handelsübliche sterile Labormaterialien von nicht näher bezeichneter Herkunft (Pipetten 1, 2, 5, 10 und 25 ml, Reagenzröhrchen 10, 15 und 50 ml, Gefriercups 1,5 ml, Spritzen 1, 2, 5, 10 und 50 ml, Kanülen 20 G, Zellkulturflaschen 250 ml mit 150 cm² Bodenfläche, Eppendorf-Pipetten 100 und 1000 µl, Filter, Kompressen)

b) Versuchstiere und Operationsmaterial

Isogene Ratten (Sprague-Dawley Stamm) der Firma Charles River, Sandhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld

Alle Tierversuche erfolgen streng nach den hierfür vorgesehenen Protokollarien des Universitätsklinikum Schleswig – Holstein.

Tierversuche wurden genehmigt vom Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein (Tierversuchsnummer: 27/g/02)

Silastikfolie (0,0127mm Durchmesser; PharmElast, SF Medical Hudson MA/USA)

Operationsinstrumentarium inkl. Mikrobesteck

CO_2-Gas

Ketamin (Ketanest 100mg/ml; Fort Dodge Laboratories, Iowa/USA)

Xylazin (Rompun 20 mg/ml; Bayer Corporation, Kansas/USA)

Gelatine
Grüne Tinte
Nahtmaterial zur Hautnaht, Größe 4-0
Handelsübliche Venenverweilkatheter, Kanülen, Spritzen diverser Größen

2.3 Methoden

2.3.1 Zellgewinnung

Für das Verfahren der Transduktion und Implantation von Fibroblasten an isogenen Ratten werden isogene Fibroblasten benötigt. Diese werden in folgender Art und Weise gewonnen: Zehn Ratten werden narkotisiert (1,6 IE Xylazin und 10 IE Ketamin oben genannter Dosierung i.p. nach Vorbetäubung mit CO_2) und auf einer Wärmeplatte in Bauchlage fixiert. Pro Tier ist mit einem Gewinn von etwa 80 Millionen Fibroblasten zu rechnen. An den erwünschten Stellen erfolgt eine gründliche Rasur des Felles. Zeigt das Tier keine Schmerzreize mehr, wird im Nacken ein 1,5–2cm messender Hautschnitt in der Transversalebene gesetzt. Mit einer Präparierschere wird in der Subkutanebene eine 3-4cm² messende Aushöhlung freipräpariert und ein entsprechend großes Stück Silastikmaterial implantiert. Nach demselben Prinzip erfolgt die Implantation des Materials an 3 weiteren Hautarealen. Falls die Tiere sehr klein sind, kann alternativ auch zusätzlich auf ein Areal der Bauchhaut ausgewichen werden.
Die Hautschnitte werden mit sterilem Nahtmaterial in fortlaufender Nahttechnik vernäht und die Knoten intrakutan versenkt.
Nach der Implantation werden die Tiere eine Woche lang im Einzelkäfig gehalten.
Eine Woche post implantationem erfolgt die Gewinnung der nativen Rattenfibroblasten. Parallel zur jeweiligen Naht wird ein erneuter Hautschnitt gesetzt. Mit der Präparierschere erfolgt nun die Aufpräparierung der behandelten subkutanen Areale. Um das implantierte Material herum hat sich inzwischen eine bindegewebige Kapsel gebildet. Diese wird eröffnet, das Silastikmaterial entfernt und das umliegende Gewebe ohne Haut bis zur Muskelfaszie entnommen. Das so gewonnene Gewebe sollte frei sein von groben Verunreinigungen und wird bis zur weiteren Verarbeitung in einem 50ml Falcon mit 30ml Zellmedium gelagert. Wurde im Bereich des Bauches eine Silastikimplatation

vorgenommen, so ist bei der Präparation des Areals besonders darauf zu achten, dass es nicht zur Eröffnung der Peritonealhöhle kommt.

Alle weiteren labortechnischen Verfahren müssen unter sorgfältig zu beachtenden sterilen Kautelen vorgenommen werden.

Nach erfolgter Entnahme wird das Gewebe gewaschen. Zehn 50ml-Reagenzröhrchen werden mit je 30ml PBS gefüllt. Nacheinander wird das Gewebe in jedem der Röhrchen 3 Minuten lang geschwenkt, mit einer Pinzette entnommen und in das nächste Röhrchen gegeben.

Ist der Waschvorgang beendet, erfolgt die Isolierung der Fibroblasten aus dem Zellverband. Dazu wird das gewaschene Material mit einer Pinzette in ein Rührgefäß gebracht, das 30ml einer Kollagenaselösung (2 mg/ml) enthält. Das Gewebe wird auf einem Magnetrührer bei 200U/min und 37°C für 15 min enzymatisch behandelt.

Anschließend wird das Lysat mit Hilfe einer Kompresse in einem Glastrichter abfiltriert. Die Filtration erfolgt in ein Becherglas (100ml Volumen), in dem sich initial 50ml Vollmedium befinden, um die Reaktion der Kollagenase zu stoppen. Das dabei gewonnene Grobmaterial wird verworfen. Die gewonnene Zellsuspension wird mehrfach resuspendiert und die enthaltenen Zellen gezählt. Anschließend erfolgt die Zentrifugation für 4 min bei 37°C und 1200U/min.

Durch dieses Verfahren werden erfahrungsgemäß nicht nur Fibroblasten gewonnen. Vor allem Erythrozyten, die sich in der serösen Flüssigkeit der Bindegewebskapsel befinden werden akzessorisch isoliert. In der anschließenden Kultivierung ist aber zu beobachten, dass die Fibroblasten durch schnelles Wachstum andere Zellarten verdrängen, so dass bereits nach einer Generation mikroskopisch keine andere Zellart mehr nachweisbar ist.

Die gewonnenen Zellen können entweder direkt kultiviert, oder zum Zweck einer späteren Verwendung in flüssigem Stickstoff bei -180°C tiefgekühlt werden.

Zur direkten Zellkultur wird das abzentrifugierte Zellpellet sorgfältig in Vollmedium resuspendiert und jeweils $5x10^6$ Zellen in 25ml Vollmedium pro Zellkulturflasche verteilt.

Sollen die Zellen tiefgekühlt gelagert werden, so wird eine entsprechende Anzahl in einer Mischung aus FBS und DMSO (10:1) resuspendiert und in spezielle Gefriercups überführt. Jeder Cup enthält $5x10^6$ Zellen. Die Tiefkühlung erfolgt durch schonendes Einfrieren in einem vollisolierten Tiefkühlbehälter, welcher ein langsames Absinken der Temperatur über einen Zeitraum von mehreren Stunden gewährleistet. Nach 24 Stunden

werden die Cups in flüssigen Stickstoff gebracht und können dort über einen Zeitraum von ca. 2 Jahren problemlos gelagert werden

2.3.2 Zellkultur und –pflege

Zur Herstellung einer Zellkultur werden entweder die in Kap. 2.3.1 beschriebenen Fibroblasten direkt verwendet oder eingefrorene Fibroblasten aufgetaut. Beim Auftauen der Zellen ist darauf zu achten, dass dies rasch geschieht. Dazu werden eine entsprechende Menge Cups aus der Stickstofflagerung entnommen und direkt in ein Wasserbad mit 37°C Temperatur überführt. Auf diese Art und Weise wird der Inhalt des Cups innerhalb einer Minute flüssig. (Erfahrungsgemäß sind Fibroblasten, die langsam tiefgefroren und schnell wieder aufgetaut werden am besten zu kultivieren. Im Gegensatz dazu bewirkt zu schnelles Einfrieren, dass ein hoher Prozentsatz der Zellen abstirbt.) Die Suspension sollte nicht mehr zentrifugiert, sondern direkt in eine Zellkulturflasche mit 25ml Vollmedium als Inhalt überführt werden.
Die Zellkultivierung besteht im Wesentlichen aus der Schaffung möglichst physiologischer Umgebungsverhältnisse, das bedeutet 37°C Raumtemperatur und 5% CO_2 bei 21% O_2 in einem verdunkelten Inkubator. Es ist darauf zu achten, dass alle Flaschen plan auf der Ebene stehen, da durch Absinken eine Verankerung der Fibroblasten auf dem Boden der Kulturflasche stattfinden soll. Für die Transduktion zur Verfügung stehen die Zellen dann, wenn sie sich soweit vermehrt haben, dass sich auf dem Boden der Flasche (Fläche 150cm²) ein Monolayer von ca. $8x10^6$ Zellen gebildet hat. Es ist möglich und üblich, Zellkulturen über mehrere Passagen anzuzüchten. Die ursprünglich in vivo durch Implantation des Silastikmaterials gewonnenen Zellen können in vitro über 4 Generationen vermehrt werden, ehe man sie transduziert. Dieses Vorgehen wird standardisiert in dieser Arbeit durchgeführt. Die dem Tier entnommenen Zellen befinden sich in Passage null (P0). Nach Bildung des Monolayers können die Zellen gesplittet und im Verhältnis 1:2, 1:3 oder 1:4 wieder ausgesät werden (s.u.). Ist dies erfolgt, befindet sich die Kultur in der jeweils nächsten Passage. Es ist davon auszugehen, dass Zellkulturen in hohen Passagen eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für genetische Mutationen haben und mögliche Verunreinigungen der Kultur z.B. durch Bakterien bei einer längeren Standzeit eine erhöhte Auftrittswahrscheinlichkeiten erfahren. Aus diesem Grund und der Annahme einer damit verbundenen biochemisch relevanten Modifikation

werden Kulturen für die Transduktion nur in P4 verwendet. Aus der Stickstofflagerung entnommene Zellen befinden sich definitionsgemäß nach dem Auftauen in P1, frisch aus dem Organismus entnommene und der Kultur zugeführte Zellen in P0.

Das Splitten einer Kultur geschieht wie folgt:

Die zu bearbeitende Kultur wird mikroskopisch begutachtet. Fallen keine oder nur wenige apoptotische oder stark deformierte Zellen auf, so ist von einer ausreichend guten Qualität des Biomaterials auszugehen. Die Fibroblasten sollten konfluent dem Flaschenboden fest anliegen und nicht frei in der Flüssigkeit schwimmen (s. Fig. 4).

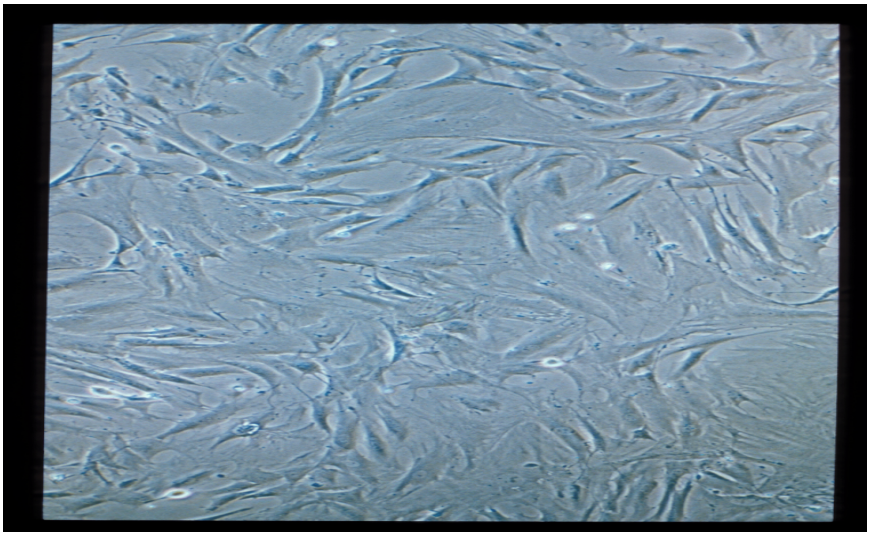


Fig. 4: Zellkultur einer Fibroblastenpopulation, wie sie vor der Transduktion gesehen wird. Die Zellen liegen dem Flaschenboden konfluent an, Zeichen einer übermäßigen Apoptose- oder Mitoserate sind nicht erkennbar.

Sind diese Grundbedingungen erfüllt, wird das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit 6ml PBS gespült. Danach werden 4ml einer Trypsin/PBS-Lösung (1:10) auf den Zellrasen pipettiert und die Flasche manuell langsam geschwenkt. Dabei ist sorgfältig darauf zu achten, dass sich die Flüssigkeit komplett über den Zellen verteilt. Nach 5-10 Minuten haben sich die Fibroblasten von der Oberfläche gelöst, was mikroskopisch an einer Einziehung der Zellfortsätze und makroskopisch an einer Trübung der Flüssigkeit auffällt. Ist unter dem Mikroskop zu erkennen, dass die Adhärenz quantitativ relevanter Anteile der Kultur am Flaschenboden noch zu groß ist, kann durch leichte Erschütterung mittels Klopfen am Flaschenrand eine Ablösung des Restbestandes erfolgen. Die Suspension wird in ein 50ml Falcon überführt, welches initial mit 30ml Vollmedium befüllt wird, um die Trypsinreaktion zu stoppen. Bei 37°C und 5 Minuten mit 1200U/min wird in der Zentrifuge das Zellmaterial von der Flüssigkeit getrennt. Der Überstand wird

abpipettiert und verworfen, der Rest entsprechend dem Splittungsverhältnis auf neue Kulturflaschen verteilt. Die Zellen befinden sich nun in der nächsthöheren Passage.
Zur Pflege der Zellkultur ist zu ergänzen, dass alle 2 Tage ein Mediumwechsel erfolgen sollte. Dabei wird das Vollmedium vor dem Kontakt mit der Zellkultur im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Makroskopisch verunreinigte Kulturen sind zu verwerfen, ebenso jene, die mikroskopisch durch eine hohe Apoptoserate auffallen. Eine relevante Veränderung des pH-Wertes ist prima vista an einem Farbumschlag des Indikators im Vollmedium zu erkennen. Auch diese Flaschen sind zu verwerfen.
Die in Kapitel 2.4.1 zu besprechende Auswertung mittels ELISA erfordert eine besondere Aufzucht der Zellen. Ziel soll es sein, aus dem Medium der Zellkultur zu verschiedenen Zeitpunkten post transduktionem die Menge des hergestellten PDGF-BB zu ermitteln. Da eine Mehrfachbestimmung der Kontroll- und Versuchsgruppen sinnvoll erscheint, werden die Zellen aus einer Kulturflasche in P3 gelöst und jeweils $2x10^5$ in ein Well einer 12-Well-Platte überführt. Diese nun in P4 befindlichen Zellen werden transduziert. Um den quantitativen Unterschied der Produktion von PDGF-BB nach Transduktion mit verschiedenen Konzentrationen des betreffenden Virus zu zeigen, erfolgt eine Transduktion der Zellen mit verschiedenen MOI. Der Ansatz enthält 12 Wells von denen drei nicht transduziert (Kontrolle), drei mit einer MOI von 10, drei mit einer MOI von 30 und drei mit einer MOI von 100 transduziert werden.

2.3.3 Produktion rekombinanter adenoviraler Vektoren

Als Vektoren werden DNA-Moleküle bezeichnet, die beim Klonieren als Träger von Fremdgenen dienen. Unter Klonieren versteht man in der Genetik den Einbau eines Gens oder eines DNA-Abschnittes in einen Vektor und dessen anschließende Vermehrung. Verschiedenste Arten von Vektoren finden Verwendung in der experimentellen Medizin. Zu diesen zählen unter anderem Vektoren aus Plasmiden, Bakteriophagen, Retroviren, Baculoviren und Adenoviren. Es zeigte sich, dass bei Säugetieren vor allem retro- und adenovirale Vektoren die größte Effizienz aufweisen. [Bramson 1995] In dieser Arbeit werden lediglich adenovirale Vektoren verwendet. Diese sind aufgebaut aus einem Replikationsursprung (origin of replication; zur Sicherstellung der Replikation der Vektorinformation unabhängig vom Wirtsgenom), der multiple cloning site (enthält Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen) und diversen Markergenen (meist beta-

Galactosidase oder ‚grün fluoreszierendes Protein' zur Unterscheidung von vektorhaltigen und vektorfreien Wirtszellen sowie zur Unterscheidung von vektorhaltigen Wirtszellen mit eingebauter Fremd-DNA bzw. ohne Fremd-DNA).
Die generelle Vorgehensweise bei der Genklonierung ist die folgende:

1. Erzeugung von DNA-Fragmenten
2. Verknüpfung der DNA-Fragmente mit der Vektor-DNA
3. Einführung der verknüpften DNA in Wirtszellen
4. Selektion auf fremd-DNA-haltige Zellen

Die Erzeugung spezieller DNA-Sequenzen erfolgt durch enzymatische Spaltung mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen. Diese spalten DNA-Stränge, indem die Phosphodiesterasebindung zwischen zwei Nukleotiden gelöst wird. Restriktionsenzyme kommen physiologischerweise im Organismus vor und dienen der Abwehr von z.B. viraler Fremd-DNA. Viele Dutzend verschiedener Endonukleasen sind mittlerweile bekannt. Jede einzelne schneidet DNA an einer für sie spezifischen Stelle im Molekül, die eine bestimmte Basenabfolge aufweist. Viele dieser DNA-Erkennungssequenzen sind so genannte Pallindrome. Je nach Enzym entstehen bei der Spaltung stumpfe oder überhängende Endungen (sticky ends). Letztere sind nach der Spaltung dazu in der Lage, sich wieder mit einem komplementären Ende eines anderen Molekülabschnittes zu verbinden. Die Verknüpfung (Ligation) von einzelnen DNA-Fragmenten wird mittels DNA-Ligasen katalysiert. Ligasen bilden Phosphodiesterasebrücken zwischen dem 5`-Phosphat- und dem 3`-Hydroxylende benachbarter Nukleotide. Nicht nur sticky ends, sondern auch stumpfe DNA-Enden sind auf diese Weise miteinander zu verknüpfen, allerdings geht dabei die Schnittstelle verloren. Die Einführung ligierter DNA-Fragmente in eine Empfängerzelle mittels nicht autoreplikativer Viruspartikel bezeichnet man als Transduktion (im Gegensatz dazu wird die Veränderung des genetischen Materials einer Zelle durch nicht virale Mediatoren als Transfektion bezeichnet). Vor der Transduktion wird empfohlen, die Zellen mit Calziumchlorid, Glycerin oder Dimethylsulfoxid (DMSO) vorzubehandeln. Dadurch wird ein temporärer Zellwandschaden erzeugt, der die Zellen kompetent für die Aufnahme der DNA werden lässt und sofort wieder regeneriert.
Grundsätzlich ist es nur möglich, einen Vektor für DNA-Transport herzustellen, wenn das verwendete Virus in der Lage ist, ein vergrößertes Genom aufzunehmen, oder nichtessentielle Regionen der viruseigenen DNA entfernt werden können, ohne die Kompetenz des Vektors wesentlich zu beeinflussen. Im adenoviralen Modell ist es

möglich, 1,8kb zusätzlich unterzubringen, was insgesamt 105% des ursprünglichen Genoms ausmacht. Zwei Regionen des Genoms können gegen Fremd-DNA ausgetauscht werden: Region E1 (kodiert für zwei Proteine, die als Transkriptionsfaktoren fungieren) und E3 (genaue Wirkweise nicht bekannt, beeinflusst jedoch die Immunreaktion im Empfängerorganismus; bei Fehlen des E3-Genproduktes kommt es zu einer merklichen Steigerung der T-Zell vermittelten Immunantwort im Empfängerorganismus). Bei der Elimination dieser beiden Genloki können zusätzlich insgesamt 9,9kb (5,2 für E1 und 4,7 für E3) eingebaut werden. Findet die Transduktion in vitro statt, so kann von vorneherein auf das E3-Genprodukt verzichtet werden, da es in der Zellkultur nicht zur T-Zell-Reaktion kommen kann.

In dieser Arbeit wird die Selektion von Zellen, die post transduktionem nicht fremdvektorhaltig sind, nicht vorgenommen. Die verwendeten Vektoren exprimieren bicistronisch für PDGF und gfp, beide Gensequenzen sind in einem Vektor vereinigt (s. Fig. 5). Die Herstellung der Vektoren erfolgte in der Gesellschaft für biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig.

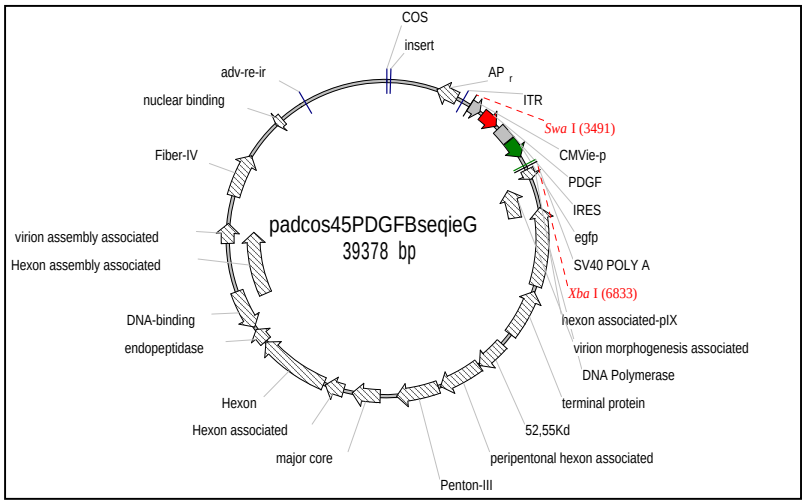


Fig. 5 Schematische Darstellung des zur Transduktion verwendeten Vektors.

2.3.4 Transduktion

Wesentlicher experimenteller Bestandteil dieser Arbeit ist die Transduktion der aus dem Nativgewebe gewonnenen Fibroblasten mit einem vektortragenden Adenovirus. Nur Zellen mit der neuen rekombinanten Kerninformation sind später dazu in der Lage, PDGF-BB in das Gewebe freizusetzen und die gewünschten klinischen Effekte hervorzubringen. Das hier zur Anwendung kommende Verfahren des zellbasierten

Gentransfers wurde von Herrn Professor Machens entwickelt und genießt internationalen Patentschutz (PTC/EP 03/01766).

Sämtliche Arbeiten erfolgen unter streng sterilen Kautelen in einem Labor der Sicherheitsstufe 2 mit einem Unterdruckluftsystem zum Absaugen der Luft an jedem Arbeitsplatz.

Die der Transduktion zur Verfügung stehenden Zellkulturen sollten folgende Merkmale aufweisen: Konfluenz des Zellrasens unter Bildung eines Monolayers, Zellzahl etwa $8x10^6$ Zellen pro Flasche, mikroskopisch unauffälliger Befund.

Grundsätzlich bestehen vielfältige Möglichkeiten der Verabreichung des rekombinanten Virus an die Zellkultur. Bewährt hat sich die Applikation der infektiösen Partikel als Suspension in PBS. Hierbei entscheidet die Konzentration der Partikel in der Lösung letztendlich über die Quantität der PDGF-BB-Produktion der Fibroblasten. Angegeben wird die Anzahl der Viren in der Lösung pro Einzelzelle der Kultur. Einheit ist hier die so genannte MOI (multiplicity of infection). Sie besagt, dass pro Zelle eine bestimmte Anzahl von Viren auf den Zellrasen pipettiert wird. Je höher dabei die MOI, desto höher auch die quantitative PDGF-BB-Produktion in linearer Steigung, bei entsprechend korrelierender Zunahme der Anzahl transduzierter Zellen. Eine MOI von 100 bedeutet demnach, dass pro Zelle eine Anzahl von 100 Viren in der Lösung vorliegt. Es ist aus anderen Vorversuchen dieser Arbeitsgruppe bekannt, dass eine geringe MOI (< 30) eine modifizierte Proteinbiosynthese kaum in Gang bringen wird, während eine zu hohe MOI (> 1000) letal auf die Zelle wirkt. Vor der Transduktion wird die Zellzahl der Kultur bestimmt und eine entsprechende Menge Viren aus der Stammlösung pipettiert und in 4 ml PBS für jede Zellkulturflasche lichtgeschützt gelagert. Das Zellkulturmedium der Flaschen wird abgesaugt und der Zellrasen mit 10ml PBS gewaschen. Anschließend erfolgt die Hinzugabe der Virussuspension. Die Flaschen sind sofort zu verschließen und lichtgeschützt eine Stunde lang vorsichtig bei Raumtemperatur zu schwenken. Dann wird die Virussuspension abgesaugt und die Kultur weitere 24 Stunden unter gewohnten Bedingungen im Inkubator gelagert. Nach Ablauf dieser Frist ist die Implantation der Zellen in den Versuchsorganismus möglich. Dazu werden die Zellen wie oben beschrieben mit Hilfe der Trypsinlösung vom Flaschenboden gelöst und anschließend zentrifugiert (bei 37°C und 1200U/min für 5min). Der Flüssigkeitsüberstand wird abgesaugt und das Zellpellet in Vollmedium resuspendiert. Jeweils $5x10^6$ Zellen werden in 1ml Medium suspendiert. Für die Applikation in das Gewebe wird die Zellsuspension

mit einer Insulinspritze und einer Kanüle aspiriert. Die Applikation ist in Kap. 2.3.6 beschrieben.

2.3.5 X-gal -Modell zum Vitalitätsnachweis transduzierter Zellen

Um im klinischen Modell einen therapeutischen Effekt nach der Applikation von genetisch modifizierten Fibroblasten beobachten zu können, ist es wichtig sicherzustellen, dass die verabreichten Zellen im Gewebe überleben. Da es sich bei den Ratten um isogene Tiere handelt, ist durch den Gebrauch ebenfalls isogener Zellen nicht unmittelbar mit einer Immunreaktion seitens des Empfängerorganismus zu rechnen. Von größerem Interesse ist daher die Überlebensrate und eine mögliche Abwanderung (‚trafficking') der verwendeten Zellen in andere Gewebegebiete. Um diese Untersuchungen durchführen zu können, wird folgende Pilotstudie durchgeführt:

Fibroblasten werden kultiviert und bei Konfluenz transduziert mit einem für beta-Galaktosidase kodierenden adenoviralen Vektor. Der adenovirale Wildtypvektor erreicht eine nahezu 100 %ige Transduktionsrate in Primärzellen und enthält das lac-Z-Gen, welches für beta-Galaktosidase codiert. Das Virus penetriert die Zellmembran und schleust sein Genom in den Nukleus (Fig. 6). Dort beginnt die Transkription, anschließend wird im Zytoplasma translatiert und die entstandene beta-Galaktosidase im Zytoplasma angereichert. Mit Hilfe einer speziellen Färbung gelingt es, die modifizierten Zellen makroskopisch blau zu färben (x-gal-Färbung). Dazu wird dem Gewebe ein synthetisiertes Substrat (5-Bromo-4-chloiro-3-indol-beta-galactopyranosid, kurz x-gal genannt) für das Enzym Galaktosidase hinzugefügt. Es kommt zu einer hydrolytischen Enzym-Substrat-Komplexbildung, aus der in einer enzymatischen Reaktion beta-Galaktosidose und 5-Bromo-4-chloroindoxyl hervorgehen (Fig. 6). Letzterer ist ein die betreffenden Zellen stark blau färbender Stoff.

Die Applikation der Zellen erfolgt unter den beschriebenen Standardbedingungen in den Panniculus carnosus. Jedem Tier werden $5x10^6$ Fibroblasten appliziert und nach 5, 10 und 20 Tagen erfolgt die Auswertung. Dabei werden Proben auch aus dem Applikationsareal entfernt gelegenen Organen (Lunge, Knochenmark, Gehirn und Leber) entnommen, um ausschließen zu können, dass ein systemisches Auswandern von modifizierten Zellen stattgefunden hat. Die x-gal-Gruppe wird nicht mit in der Statistik aufgeführt. Ihre Auswertung ist rein deskriptiv-qualitativer Natur, um sicherzugehen, dass die

Verabreichung modifizierter Zellen erfolgreich sein kann und diese -falls nötig- im Gewebe nachzuweisen sind.

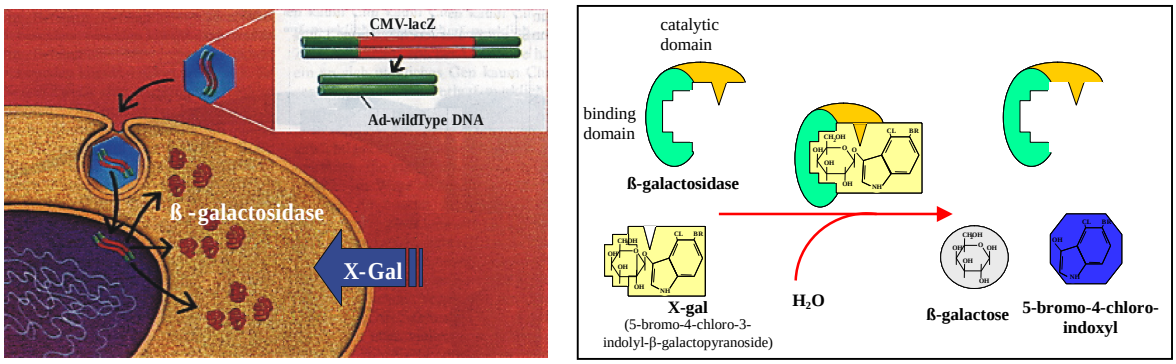


Fig. 6: Das Bild links zeigt schematisch die Einschleusung des CMV-lacZ-Gens, welches in das adenovirale Wildtyp-Genom integriert ist, in den zellulären Nukleus; die Färbung der Zellen ist rechts dargestellt (Details s. Text).

2.3.6 Versuchstiere und operatives Vorgehen

Um die Wahrscheinlichkeit einer immunologischen Reaktion auf die modifizierten Fibroblasten in vivo möglichst gering zu halten, werden ausschließlich isogene Ratten des Stammes Sprague Dawley verwendet. Alle Tiere werden unter gleichen Bedingungen in einem Stall der biologischen Sicherheitsstufe 1 gehalten. Nahrung und Wasser sind für alle Tiere vor und nach der Operation frei zugänglich. Nach der Operation werden die Tiere in Einzelkäfigen gehalten, um Kannibalismusschäden untereinander zu vermeiden.
Die Tiere werden in verschiedene experimentelle Gruppen unterteilt (s. Fig. 7). Jede Gruppe besteht aus 10 Tieren.
Die Einteilung der Gruppen beinhaltet eine Untergliederung in mehrere Settings. Tieren in Setting 1 werden die applizierten Substanzen bzw. Zellen während der Lappenoperation verabreicht (Zeitpunkt 0), die Auswertung der Tiere erfolgt 7 Tage später. Tieren im Setting II und III werden die Substanzen bzw. Zellen zum Zeitpunkt 7 Tage (Setting II) und 14 Tage (Setting III) vor der Lappenoperation verabreicht. Die Auswertung erfolgt ebenfalls 7 Tage nach der Lappenoperation. Aus diesen Zeitmodi wird ersichtlich, dass der längste stattfindende Kontakt eines Tieres mit den transplantierten Zellen 21 Tage beträgt (Tiere in Setting III).

	Setting I während Lappen-OP	**Setting II** 7 Tage vor Lappen-OP	**Setting III** 14 Tage vor Lappen-OP	**Langzeit**
1) NaCl (1ml)	Gr. 1.I	Gr. 1.II	Gr. 1.III	---
2) DMEM (1ml)	Gr. 2.I	Gr. 2.II	Gr. 2.III	---
3) nmFB ($5x10^6$ Zellen)	Gr. 3.I	Gr. 3.II	Gr. 3.III	Gr. 3.LZ
4) GFP ($5x10^6$ Zellen)	Gr. 4.I	Gr. 4.II	Gr. 4.III	---
5) PDGF-BB a) $5x10^6$ Zellen	Gr. 5a.I	Gr. 5a.II	Gr. 5a.III	Gr. 5a.LZ
5) PDGF-BB b) $10x10^6$ Zellen	Gr. 5b.I	Gr. 5b.II	Gr. 5b.III	---
6) β-gal ($5x10^6$ Zellen)	---	---	---	Gr. 6.LZ

Fig. 7: Tabelle über die Einteilung der Versuchstiere in die entsprechenden Gruppen. Die Gruppen LZ werden als zusätzliche Gruppen angesehen. Hier werden keine Lappenoperationen vorgenommen, sie dienen als Indikator für eventuelle Langzeiteffekte, während mit Hilfe der Gr. β-gal (6.LZ) der Frage nach dem grundsätzlichen Überleben der Zellen nach genetischer Modifikation nachgegangen wird.

Langzeitbeobachtung in vivo

Es erscheint jedoch unter Berücksichtigung möglicher bis dato unbekannter Neben- bzw. Wechselwirkungen wünschenswert, Tiere länger als drei Wochen zu beobachten, um Langzeitveränderungen des Gewebes dokumentieren zu können. Aus diesem Grund werden einige Sondergruppen gebildet (Langzeitgruppen 3.LZ, 5a.LZ und 6.LZ). An den Tieren dieser Gruppen wird keine Lappenoperation vorgenommen. Allen Tieren werden an demselben Tag (Tag 0) $5x10^6$ Zellen nach Standardschema (s.u.) verabreicht. Die Tiere der Gruppe 3.LZ erhalten dabei nicht modifizierte Fibroblasten, die der Gruppe 5a.LZ PDGF-BB modifizierte und die der Gruppe 6 rein gfp-modifizierte Fibroblasten. Auf diese Weise sollen mögliche Auswirkungen der modifizierten Zellen auf das Gewebe in einem Zeitrahmen von mehreren Monaten untersucht, und mit den Auswirkungen der Implantation nicht modifizierter, bzw. nur mit dem Leervektor modifizierter Zellen

verglichen werden. Die Auswertung erfolgt in definierten Zeitabständen (Tag 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 28, 35, 42, 49, 60, 80, 100, 130 und 150 nach Applikation). Bei der Auswertung erfolgen Zählungen der makroskopisch sichtbaren Pseudotumoren (s. Kap. 3.5) und eine HE- sowie Chloracetatfärbung des Gewebes (nach Standardschema s.u.) um histopathomorphologisch veränderte Areale identifizieren zu können. Da nach Anwendung der Technik der Mikroangiographie (s.u.) die Tiere nicht mehr für weitere Färbe- bzw. Untersuchungsmethoden zur Verfügung stehen, werden für jede Gruppe jeweils 5 weitere Tiere benötigt, die nur diesem Verfahren unterzogen werden. An jedem Tier, das mikroangiographisch ausgewertet wird, werden die gleichen Operationen durchgeführt, wie an jedem anderen Tier der Gruppe, das histologisch und planimetrisch begutachtet wird. Die Entnahme von Histologien und die Auswertung der Lappenoperation mit Hilfe der Planimetrie erfolgt jedoch nicht bei den Tieren der Mikroangiographie-Technik.

Lappenmodell

Die Operation zur Implantation der modifizierten Fibroblasten erfolgt unter standardisierten Bedingungen auf einer beheizten OP-Decke und in fixiertem Zustand an Tieren mit einem Gewicht von 220-260 g. Nach Vorbetäubung mit CO_2 wird eine Kombination aus Xylazin (1,6 IE/100 g KG) und Ketamin (10 IE/100 g KG) intraperitoneal verabreicht. Wichtig ist, dass die Spontanatmung während des operativen Vorganges erhalten bleibt. Da der Cornealreflex der Tiere in dieser Zeit ausbleibt, sollten während der Narkose beide Bulbi mit je einem Tropfen physiologischer Kochsalzlösung befeuchtet bleiben.

Zweck der Operation ist es, einen randomisierten myofasziokutanen Lappen der Größe 8x2 cm zu schaffen, welcher im Verlauf aufgrund der entstehenden Ischämie an seinem distalen Anteil eine Nekrosezone entwickeln wird. Mit diesem Modell ist es möglich, die benötigte intravitale Ischämiesituation zu generieren.

Initial wird die Ratte vom Okzipitalpol des Schädels bis zum Beginn des Schwanzes auf einer Breite von ca. 5 cm rasiert. In dieses Gebiet wird der Hautlappen zunächst eingezeichnet, um die Schnittführung optimieren zu können und standardisierte Größen zu erhalten (Fig. 8). Entlang dieser Linien erfolgt nun der Schnitt mittels einer geraden Schere (Fig. 9 - 13). Gestielt bleibt der Lappen am kaudalen Anteil des Rückens (Fig. 14 u. 15). Es ist darauf zu achten, nicht in die Faszie des M. erector spinae zu schneiden, der Lappen sollte frei bleiben von dessen Faszie und Muskelgewebe. Sämtliches Gewebe mit

der im Lappen befindlichen Faszie und dem Panniculus Carnosus wird durchtrennt, so dass der Lappen komplett von seiner Unterlage gehoben werden kann (Fig. 14). Um Austrocknung zu vermeiden, ist das Gewebe während der Operation stets mit physiologischer Kochsalzlösung feucht zu halten.

Den Tieren mit Setting I wird intraoperativ unter das Gewebe des Panniculus Carnosus die zu testende Substanz appliziert (Fig. 16 u. 17). Die Verabreichung erfolgt mit Kanülen der Größe 20 G (um bei den Versuchsgruppen das Zellmaterial nicht zu beschädigen) in 10 Einstichstellen jeweils links und rechts paramedian in den Lappen. Nach der Applikation sollten 20 flüssigkeitsgefüllte Quaddeln im Gewebe sichtbar sein. Danach wird der Lappen in fortlaufender Nahttechnik unter Versenkung der endständigen Knoten vernäht (Fig. 18 - 20).

Den Tieren mit Setting II und III wird während der Lappenhebung kein Therapeutikum appliziert. Dies findet bei diesen Gruppen bereits 7 bzw. 14 Tage prä operationem statt. Dazu werden die Tiere wie oben beschrieben narkotisiert und in Bauchlage fixiert. Die späteren Lappengrenzen werden auf der Rückenhaut angezeichnet und durch die Haut paramedian links und rechts an jeweils 10 Injektionsstellen insgesamt 1 ml Medium mit den darin enthaltenen Zellen appliziert. Dabei sollte die Haut an der Injektionsstelle mit einer chirurgischen Pinzette straff vom Rücken gehoben werden, damit es nicht zu einer Applikation in das autochthone Muskelgewebe des Rückens kommt (Fig. 21).

Findet eine Applikation von $10x10^6$ modifizierten Fibroblasten statt (Gruppen 5b.I – III), so werden die restlichen $5x10^6$ Zellen direkt außerhalb der Lappengrenzen appliziert (Fig. 22). Die Tiere werden anschließend unter den vorher gegebenen Standardbedingungen mit freiem Zugang zu Wasser und Nahrung gehalten. Ein Autokannibalismusschutz ist nicht nötig.

Auch die Tiere der Langzeitgruppen erfahren die Applikation der Zellen mittels transkutaner Injektion. Besonderheiten werden bei jeder Operation dokumentiert und durch Probebiopsien gesichert. Bei der Operation verstorbene Tiere, die z.B. an einem Narkosezwischenfall sterben, werden durch gleichwertige Exemplare ersetzt.

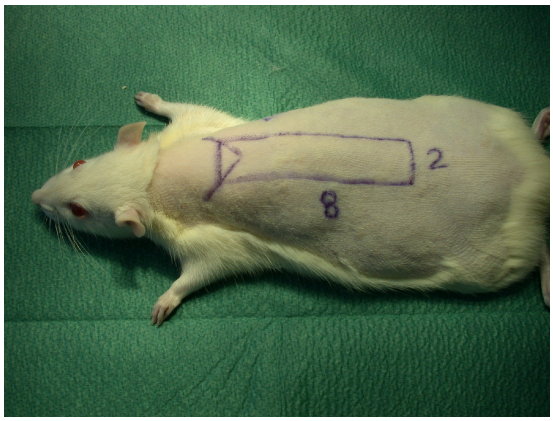


Fig. 8

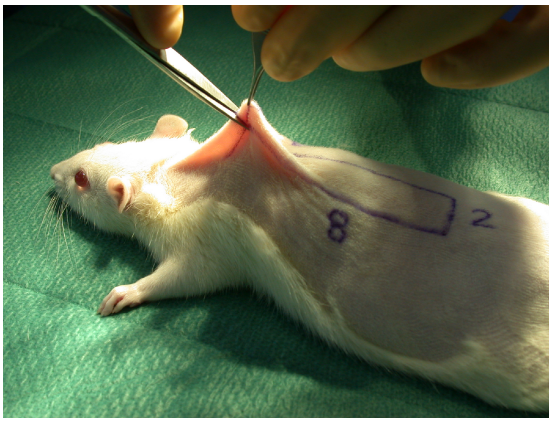


Fig. 9

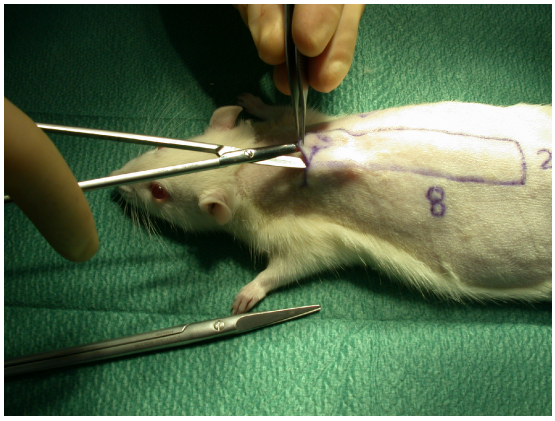


Fig. 10

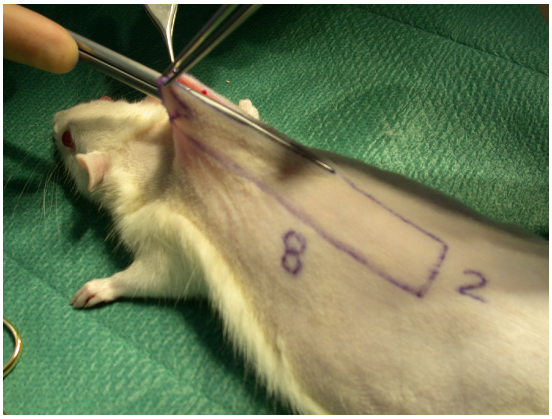


Fig. 11

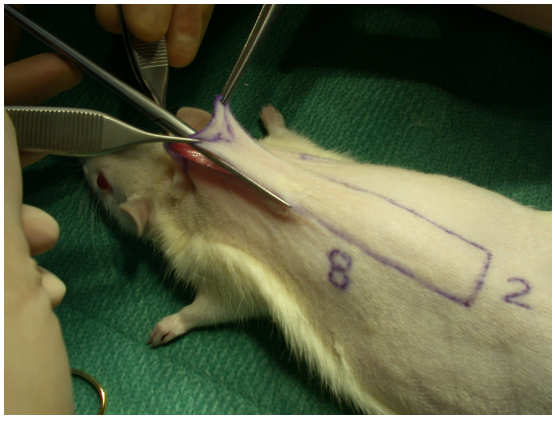


Fig. 12

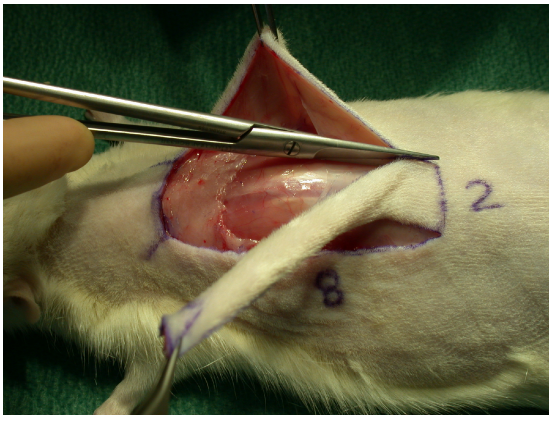


Fig. 13

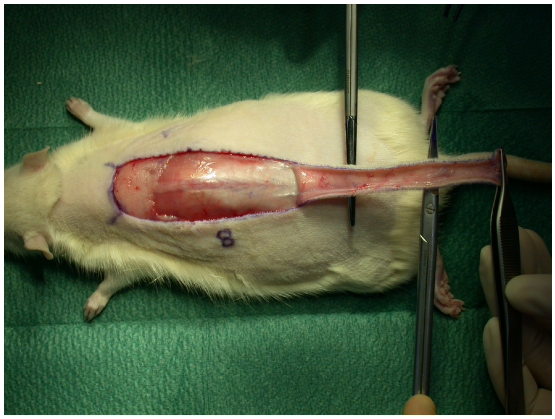


Fig. 14

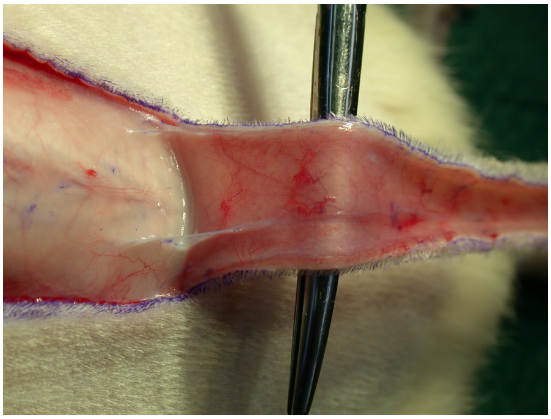


Fig. 15

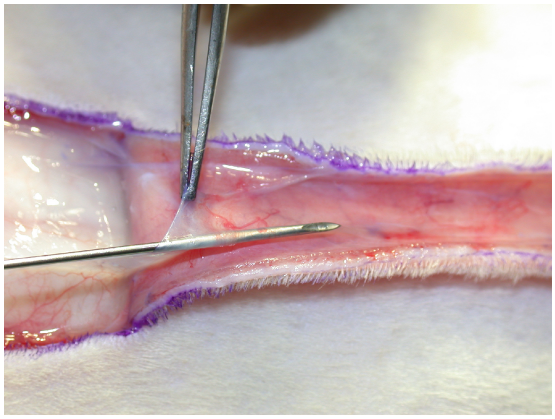


Fig. 16

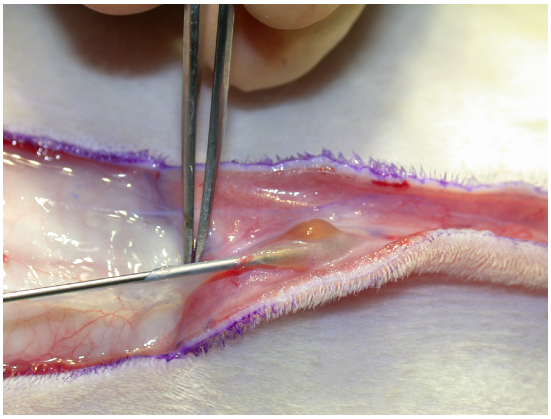


Fig. 17

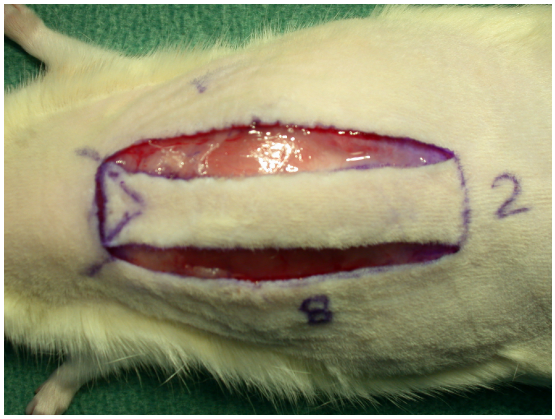


Fig. 18

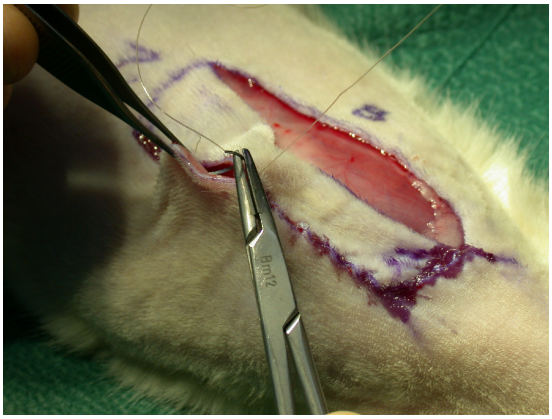


Fig. 19

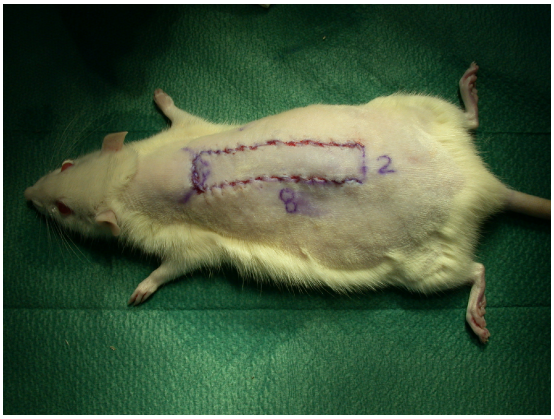


Fig. 20

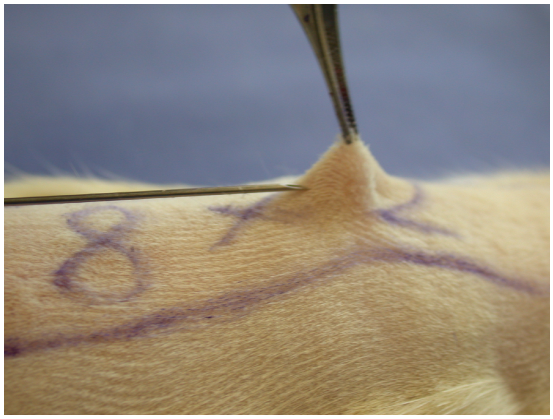


Fig. 21

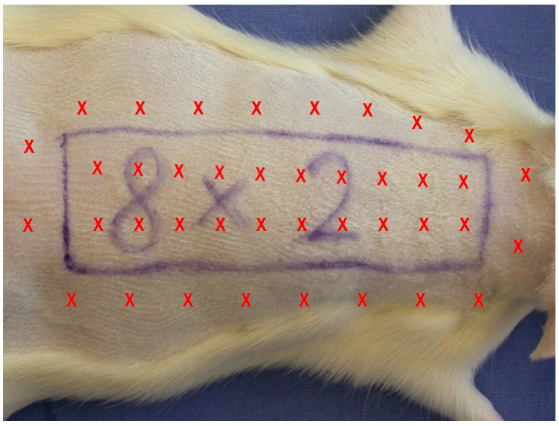


Fig. 22

2.4 Auswertung in vitro

Die in vitro Befundung umfasst die Auswertung einer ELISA-Antigen-Bestimmung und einer Fluoreszenzmikroskopie. Ziel ist es, durch die in vitro-Analyse zunächst einen quantitativen Nachweis einer PDGF-BB-Produktion durch ELISA bei verschiedenen MOIs zu führen und die erhaltene Transduktionsrate bei einer dann festgelegten MOI zu messen.

2.4.1 ELISA

Ein wichtiger Schritt vor der Arbeit im Tierexperiment ist die Beantwortung der Frage nach der Dauer und der Menge der Expression therapeutischen Proteins durch die

modifizierten Zellen. Dies gelingt im in vitro ELISA. Gemessen wird in zwei verschiedenen ELISA-Ansätzen, wovon jeder jeweils 96 Wells beinhaltet, so dass die Messungen von verschiedenen MOI zur gleichen Zeit erfolgen kann, um dadurch einen systematischen Fehler so klein wie möglich zu halten. Der experimentelle Aufbau dazu ist folgender:

Eine 12-well-Platte wird beschickt mit $2x10^5$ Fibroblasten pro well. Um sicherzustellen, dass sich nur noch vitale Zellen auf der Platte befinden, wird diese für 24 Stunden unter oben genannten Standardbedingungen kultiviert und anschließend ein Mediumwechsel durchgeführt. Dabei werden avitale Zellen und sonstiger Zelldetritus entfernt. Da alle wells voneinander isoliert sind, ist es möglich, Transduktionen mit unterschiedlicher MOI auf derselben Platte durchzuführen und so für den Versuchsablauf die bestmöglichen Vergleichsbedingungen zu erreichen. Die ersten drei wells werden nicht transduziert, sie dienen als Kontrollgruppe. Drei wells werden transduziert mit einer MOI 10, drei mit einer MOI 30 und drei weitere mit einer MOI 100. Jedes well wird befüllt mit 2ml Vollmedium und anschließend kultiviert. Jeden Tag zur selben Zeit wird ein erneuter Mediumwechsel durchgeführt. Das dabei gewonnene Medium wird gut resuspendiert und an den Tagen 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 21, 24, 28, 35, 42, 49, 56, 70, 84, 98 und 130 in Proben zu jeweils einem Milliliter pro Ansatz asserviert. Die Aufbewahrung der Proben erfolgt nach Schockgefrierung (-180°C) bei einer Temperatur von –80°C.

Zur Auswertung der Proben wird ein ELISA-Kit (s. Kap. 2.2) verwendet. Für jeden zu untersuchenden Tag wird von jeder MOI-Probe der asservierte Ansatz im Wasserbad schnell aufgetaut, 100µl des Inhaltes entnommen und der Rest in flüssigem Stickstoff wieder schockgefroren. Streng nach den Angaben des Herstellers wird der PDGF-BB-Gehalt jeder Probe nach guter Resuspendierung im ELISA gemessen.

2.4.2 Transduktionsraten

Für die Beurteilung der Effektivität des Modifikationsverfahrens und die mögliche Korrelation zwischen der Konzentration therapeutischen Proteins und der Zahl transduzierter Zellen ist es wichtig, die Transduktionsrate in der Zellkultur zu bestimmen. Teil des Genoms der verwendeten Adenoviren ist ein gfp-Gen (s.o.). Das exprimierte gfp leuchtet unter dem Fluoreszenzmikroskop grün auf. Es folgt nun die Zählung von 30 Gesichtsfeldern der Kultur jeder Flasche in der 400er Vergrößerung. Die Zahl der

gefärbten Zellen wird verglichen mit der Zellzahl der geernteten Zellen (die Zählung dieser Zellen erfolgt in der Neubauer-Zählkammer), und als prozentualer Anteil dieser angegeben.

2.5 Auswertung in vivo

Die in vivo-Befundung erfolgt durch computerassistierte klinisch-planimetrische Messung der Veränderung von Flächenverhältnissen, Histologie entnommener Biopsate (HE und PECAM für Kapillardichte), rt-PCR zum m-RNS Nachweis von produziertem PDGF-BB und eine mikroangiographische Darstellung des Gefäßbettes (>20µm).
Für die Auswertung werden alle Tiere mit einer Überdosis des Narkotikums euthanasiert. Der Lappen wird standardisiert fotografiert. Die Ränder der Nekrosezone und des vitalen Lappenteiles werden nach Auflegen einer Klarsichtfolie abgezeichnet, um ihre Größenverhältnisse bestimmen zu können. Im letzten Schritt werden Gewebeproben des Lappenareals gewonnen. Dazu muss der Lappen erneut gehoben werden. Der initiale Schnitt wird 0,5cm kaudal des Stieles geführt. Er reicht bis etwa 0,5cm außerhalb der Lappengrenzen hinaus. Diese Präparation außerhalb der Lappengrenzen ermöglicht eine spätere histologische Darstellung der Regionen, die sich distal der nekrotischen Areale befinden. Der Lappen wird bis zu seinem apikalen Ende vom Untergrund gelöst und in Längsrichtung halbiert. Die beiden Teile werden asserviert (eine Hälfte in flüssigem Stickstoff bei –196°C, die andere in Formalinlösung).
Die Tiere der Langzeitgruppen werden am jeweiligen Auswertungstag euthanasiert. Das Zielgewebe wird an seinen angezeichneten Grenzen gehoben (bei diesen Tieren ist keine Nekrosezone vorhanden) und quer halbiert. Der apikale Teil wird in sich wiederum in Längsrichtung halbiert. Ein Teil wird kryokonserviert (Schockgefrierung bei –196°C), der andere in Formalinlösung asserviert. Der basale Teil, an dem sich der Lappenstiel befindet, wird nicht als Ganzes asserviert. Mit einer Präparierschere wird hier vorsichtig die unterste Gewebsschicht gelöst. Etwa 0,5cm³ Zellmaterial sollten so gewonnen und schockgefroren werden.
Nachdem die Asservierung lokalen Zellmateriales erfolgt ist, werden jedem Tier zwei Proben aus der Lunge, der Leber, dem Knochenmark und dem Gehirn zur histologischen Aufarbeitung entnommen.

2.5.1 Klinisch planimetrische Auswertung

Die Untersuchung des entscheidenden klinischen Erfolges einer Angiogeneseinduktion erfolgt mit Hilfe einer planimetrischen Messung. Dazu wird jedes Tier, bei dem ein McFarlane Lappen gehoben wurde, standardisiert fotografiert und die Lappenumrisse mittels einer Klarsichtfolie zusätzlich separat abgezeichnet (Fig. 23). Wichtig ist die Unterscheidung von Nekroseareal, vitalem Lappengewebe und einer Intermediärzone (s. Kap.3.4). Die so entstandenen Umrisszeichnungen werden mit einem handelsüblichen Scanner digitalisiert und computerassistiert (Scion Image®) ausgewertet. Dabei werden die Flächenverhältnisse von Gesamtfläche zu Nekrosezone und der Intermediärzone bestimmt. Die Darstellung von absoluten Größenangaben erscheint nicht sinnvoll, da sich im Experiment gezeigt hat, dass es bei der Narbenbildung im Nekroseareal und an den Nahtstellen zu einer Narbenschrumpfung kommt, die bei jedem Tier individuell stark ausgeprägt ist. Dadurch kommt es zu einer Ergebnisverzerrung, die statistisch nicht verwertbar ist. Besser scheint die Angabe von Größenverhältnissen in den einzelnen Gruppen, deshalb sind die Tabellenwerte keine cm^2-, sondern Pixelangaben.

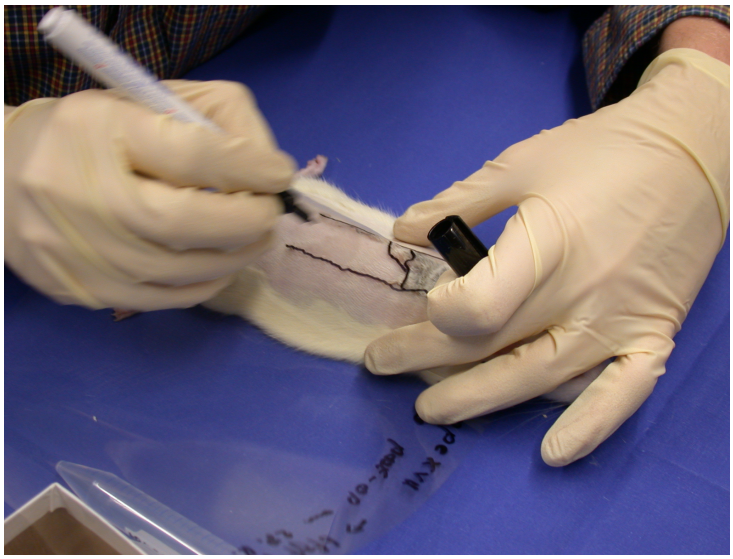


Fig. 23

2.5.2 Mikroangiographie

Für jedes Tier werden 10ml pro 100g Körpergewicht des folgenden Gemisches verwendet: Wasser, Bariumsulfat (12g / 100ml als Suspension), grüne Tinte sowie Gelatine. Das Wasser wird auf 80°C erhitzt und pro 5ml 1g Gelatine hinzugefügt. Zu

diesem Gemisch werden das Bariumsulfat und die Tinte in einem Verhältnis von insgesamt 1:2:0,05 ergänzt. Im nächsten Schritt folgt die Präparation des Tieres. Nach Betäubung wird die linke A. carotis communis freipräpariert und mit einer 22er Braunüle kanüliert (Fig. 24). 4µg Prostavasin (in 0,5ml NaCl 0,9%) / 100g Ratte werden appliziert und 30 Sekunden gewartet, es folgt die langsame Abnahme von 1ml Blut / 100g Ratte. Dann wird die oben beschriebene Menge des Gemisches langsam appliziert. Dabei ist darauf zu achten, dass sich das ganze Tier grün anfärbt (Fig. 25), um sicherzugehen, dass die Flüssigkeit im Intravasalraum bleibt und nicht durch Perforation eines großen Gefäßes in einer Körperhöhle verläuft. Durch diese Prozedur wird das tief narkotisierte Tier euthanasiert. Die Punktionsstelle wird ligiert, um einen Austritt der Suspension zu verhindern. Anschließend wird das Tier für 24 Stunden bei 5°C gelagert. Nach Ablauf dieser Zeit wird das kutane Zielgewebe inklusive Panniculus carnosus gehoben (Fig. 26 - 28) und mit Hilfe eines Mammographiegerätes (24kV bei 9mAs konventionell, Fig. 29) Röntgenaufnahmen angefertigt.

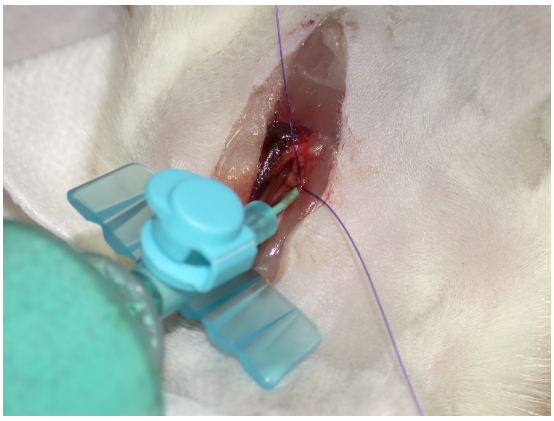


Fig. 24

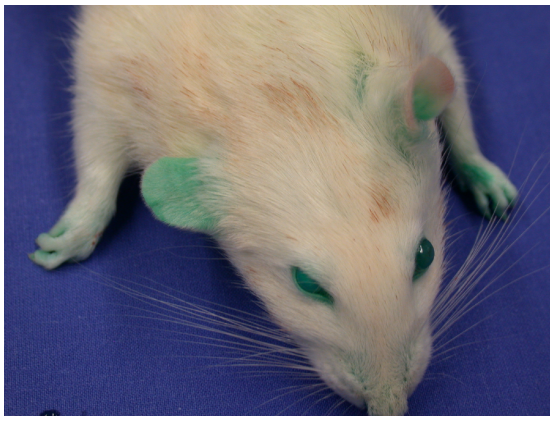


Fig. 25

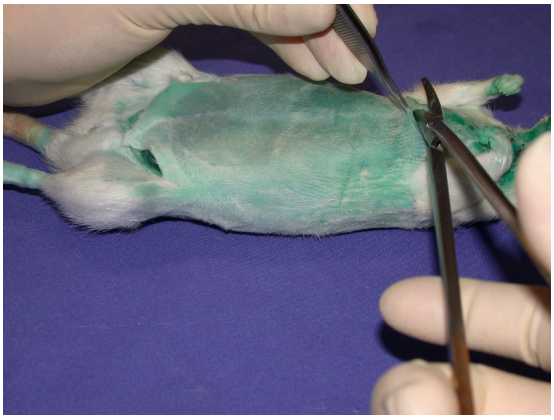


Fig. 26

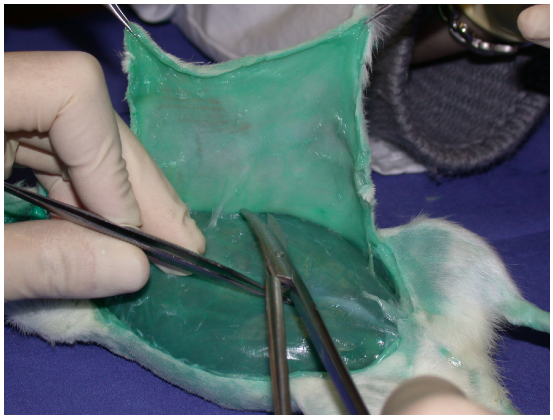


Fig. 27

Fig. 28

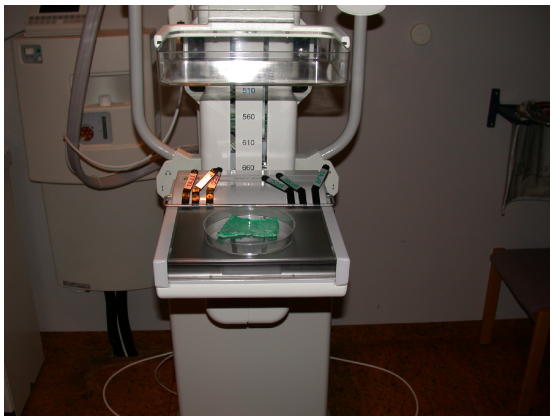


Fig. 29

Die dabei gewonnenen digitalen Röntgenaufnahmen können quantitativ ausgewertet werden. Hierzu wird zunächst die Gesamtfläche des Lappens in cm² bestimmt und anschließend die Gesamtlänge aller vorhandenen Gefäße ab einer Größe von 20µm gemessen. Die Ergebnisse werden umgerechnet auf einen Wert von mm Gefäßlänge/cm² Gewebe und als Durchschnitt des Gesamtlappens für jedes Tier angegeben. Um den Kontrast in jedem Bild individuell optimal zu gestalten, erfolgt die Darstellung zum Teil in positiver, zum Teil in negativer Graudarstellung. Dies ist auf die Bearbeitungsqualität der digitalisierten Bilder zurückzuführen und beeinträchtigt nicht die Gesamtqualität.

2.5.3 Histologie

Feingewebliche Veränderungen nach der Lappenhebung und der Applikation der Testsubstanzen sowie der zu untersuchenden Wachstumsfaktoren bedingen die histologische Untersuchung. Hierzu werden von jedem Tier an standardisierten Stellen Hautschnitte und eine HE-Färbung des daraus gewonnenen Präparates angefertigt. Zeigt sich eine relevante Gewebeveränderung, werden im Bedarfsfall noch zusätzliche Schnitte angefertigt. Die Histologien der Tiere, bei denen eine Lappenhebung erfolgte, werden gewonnen aus den folgenden Hautarealen:

- lateraler Lappenrand der Nekrosezone mit nahtübergreifendem Übergang zum Vitalgewebe (Fig. 30, Schnitt 1)
- laterale Marginalzone des Lappens mit Übergang vom Nekroseareal zum Vitalgewebe (Fig. 30, Schnitt 2)
- vitales Lappengewebe mit basisübergreifendem Übergang zum chirurgisch nicht tangierten Hautareal (Fig. 30, Schnitt 3)

Die Entnahme der Histologien der Tiere, bei denen keine Lappenhebung erfolgte (Tiere der Langzeitgruppe) geschieht an korrespondierenden Hautarealen, die mit denen der anderen Tiere vergleichbar sind.

Es kommen verschiedene Färbemethoden zum Einsatz. Zur Darstellung polymorphnukleärer Zellen wird eine gewöhnliche HE-Färbung angefertigt, die am einfachsten eine Unterscheidung der einzelnen inflammatorischen Zellarten zulässt. Die Darstellung des Gefäßbettes respektive einzelner Kapillaren in entsprechender Vergrößerung ermöglicht eine Spezialfärbung (PECAM-1-Färbung zur Darstellung des CD31 in Endothelzellen). Bei der Auswertung werden jeweils 40 Gesichtsfelder pro Schnitt begutachtet und aus dem Ergebnis der Mittelwert gebildet.

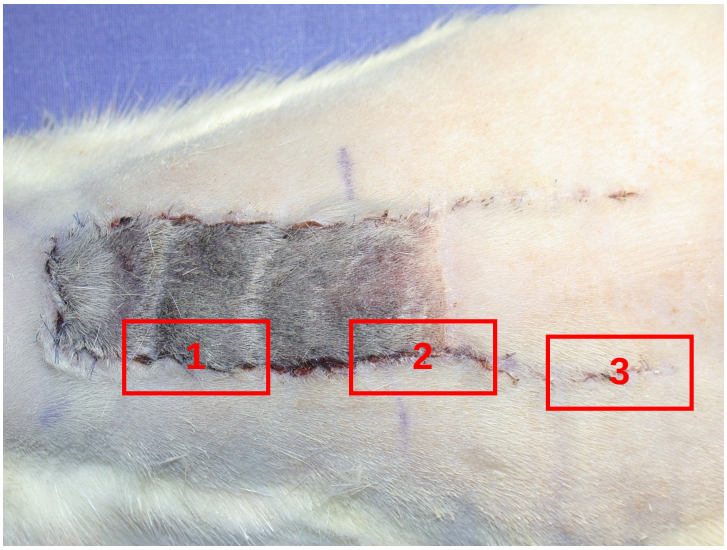


Fig. 30

Von jeder Probe werden ein Tangential- und ein Querschnitt angefertigt und diese unter dem Mikroskop untersucht. Im semiquantitativen Vergleich werden die Anzahlen von Endothelzellen, polymorphonukleären Zellen (neutrophile Granulozyten und Makrophagen) und Fibroblasten gegenübergestellt. Die interessanten Gebiete sind vor allem die Nekroserandbezirke, insbesondere die Übergangszone in Schnitt 2, Schnitt 3 in seiner Gesamtausdehnung, sowie bei den Gruppen, denen auch in die Peripherie Fibroblasten appliziert wird, der laterale Bereich von Schnitt 1.

Auch die entnommenen Proben von Lungen-, Leber-, Knochenmark- und Hirngewebe werden histologisch auf das Vorhandensein von lac-Z positivem Zellmaterial hin untersucht.

2.5.4 Rt-PCR, Immunhistochemie

Um die Proteinexpression in vivo zu quantifizieren, wird aus dem Zielgewebe jedes Tieres der Langzeitgruppen 3.LZ, 5a.LZ und 6.LZ an den Tagen der Auswertung (s.o.) eine Gewebeprobe entnommen. Diese werden schockgefroren und zu einem späteren Zeitpunkt untersucht. Die Proben werden aufgetaut und mittels eines polyklonalen Antikörpers gegen PDGF-BB immunmarkiert. Dazu werden deparaffinierte 5µm starke Gewebeblöcke in 0,5% Triton X100 und 3% (w/v) skim-milk-PBS Pufferlösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur, anschließend über Nacht bei 4°C mit Anti-PDGF-BB in einer 1:20 verdünnten Pufferlösung inkubiert. Es folgt die Inkubation mit biotinisiertem Anti-Kaninchen-, bzw. Anti-Ziege-IgG für 30 Minuten, daraufhin 15 Minuten Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase und schließlich die Zugabe von 3-Amino-9-ethylcarbazol bzw. 3,3´-Diaminobenzidin. Die Proben werden gegengefärbt mit Mayer`s Hämatoxylin.
Die Durchführung der PCR erfolgt nach den Hinweisen der Hersteller des jeweilig verwendeten Substrates bzw. Detektionsmateriales. Zur Messung des mRNA-Gehaltes werden die wie oben beschrieben präparierten Gewebeproben verwendet. Die RNA wird mittels ABI Prism^{TM} 6100 NucleicAcid PrepStation isoliert. Reverse transkribiert werden jeweils 1µg RNA durch die Verwendung des Transcriptor Reverse Transcriptase Systems. Die anschließende Quantifizierung der PDGFb-cDNA gelingt mit Hilfe des TaqMan® Gene Expression Assay (Hs00234042_m1) und TaqMan® Universal PCR Mastermix, sowie unter Verwendung eines 2-Schritt-Protokolles mit initialer Denaturierung bei 95°C für 10 Minuten und anschließendem Durchlauf von 40 Zyklen bei 95°C für jeweils 15 Sekunden und 60°C für jeweils 60 Sekunden (ABI^{TM} 7000 Sequence detection system). Als Kontrolle dient L28 Nagetier-cDNA. Der relative RNA-Gehalt wird mit der ΔCT-Methode bestimmt.
Die Durchführung dieses Versuchsteiles erfolgte durch das Institut der Physiologie der Universität zu Lübeck. Die hier beschriebene immunhistochemische Aufarbeitung dient lediglich als semiquantitatives Nachweisverfahren für PDGF-BB, um anschliessend die Quantifizierung mittels PCR durchzuführen.

2.6 Statistik

Für Vergleiche zwischen zwei einzelnen Gruppen beziehungsweise für den Ergebnisvergleich zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten wird ein modifizierter t-Test verwendet.
Dabei wird vorausgesetzt, dass die zu untersuchenden Stichproben voneinander unabhängig sind und einer normalverteilten Grundgesamtheit entstammen.
Für die Differenz bei unbekannten Varianzen lautet somit die Prüffunktion:

$$T = \frac{\overline{X} - \overline{Y}}{\sigma\sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m}}} \qquad \text{mit: } \sigma = \frac{1}{n+m-2}$$

dabei ist:

$$\sigma^2 = \frac{1}{n+m-2}\left[(n-1)\sigma^2{}_X + (m-1)\sigma^2{}_Y\right]$$

es ergibt sich:

$$\sigma^2 = \frac{1}{n+m-2}\left[\sum_{i=1}^{n}(X_i - \overline{X})^2 + \sum_{i=l}^{n}(Y_j - \overline{Y})^2\right]$$

Das Signifikanzniveau wird auf P = 0,05 festgelegt. Unter H_0 ist T t-verteilt mit ν = n+m-2 Freiheitsgraden. Der Ablehnungsbereich für t kann dem Anhang entnommen werden (s. Kap. 7.1.6, Tabelle 6).

3. Ergebnisse

3.1 Nachweis des Überlebens der transduzierten Zellen im x-gal-Modell

Wie Fig. 31 zeigt, sind eine Woche nach der Implantation modifizierter Zellen lokale Ansammlungen blau gefärbter Zellverbände nachzuweisen. Es handelt sich hierbei um die verabreichten Zellen. Durch dieses Verfahren gelingt es nachzuweisen, dass isogene Fibroblasten nach Modifikation und Transplantation in das Gewebe überleben. Im Gewebe der Tiere, die nicht-modifizierte Zellen erhalten, ist keine Blaufärbung nachweisbar. Im HE-gefärbten histologischen Präparat ist in keinem der Präparate eine Entzündungsreaktion nachweisbar. Eine Bildung von Pseudotumoren (s.u.) kann nicht beobachtet werden. Die modifizierten Zellen können auch eine Woche nach der Applikation im Bereich der Einstichstelle identifiziert werden. Eine nennenswerte Migration in umgebendes Gewebe, Lunge, Gehirn, Knochenmark oder Leber ist nicht zu bestätigen. Vielmehr fällt auf, dass außer der Blaufärbung des Gewebes keine weitere verändernde Reaktion in der Umgebung der betreffenden Hautareale erkennbar ist.

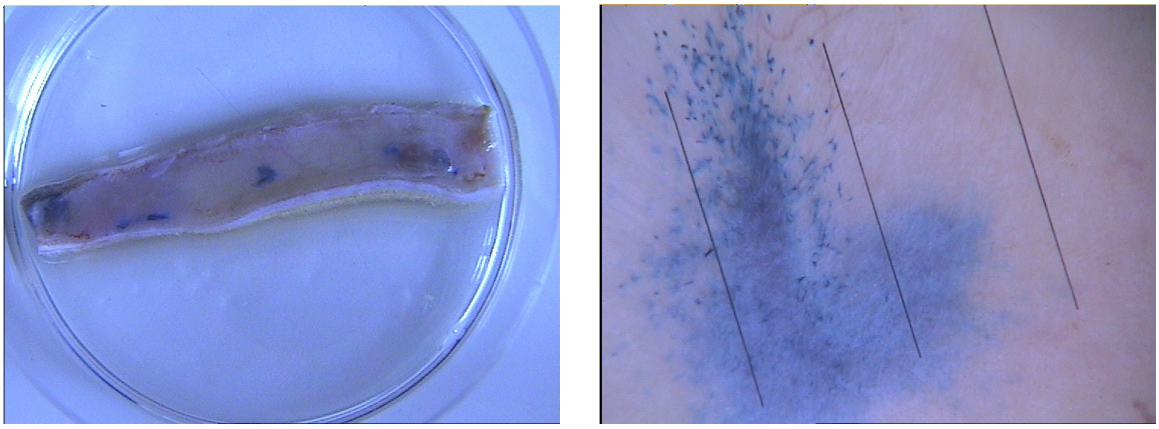


Fig. 31, Links: Makroskopische Aufsicht auf einen x-gal gefärbten Hautlappen mit im Bereich der Applikationsstellen sichtbarer Blaufärbung, die Färbung ist streng begrenzt auf das Applikationsgebiet, da nur die implantierten Fibroblasten in der Lage sind die enzymatische Farbreaktion zu katalysieren. Rechts: Stärkere Vergrößerung (10fach) eines Ausschnitts desselben Hautlappens, bereits in dieser Vergrößerung ist zu erkennen, dass die Farbreaktion von den einzelnen Zellen ausgeht, diese sind besonders stark konzentriert angefärbt.

3.2 Transduktionsraten

Der Vergleich der gezählten gefärbten Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie, verglichen mit der Zählung nativer Zellen in der Neubauer Zählkammer ergibt die Werte in Fig. 32.

Gruppe	Transduktions-rate	Gruppe	Transduktions-rate	Gruppe	Transduktions rate
4.I	93,4 %	5a.I	90,5 %	5b.I	95,3 %
4.II	92,4 %	5a.II	90,1 %	5b.II	89,5 %
4.III	94,1 %	5a.III	88,9 %	5b.III	87,2 %

Fig. 32: Transduktionsraten der einzelnen Gruppen bezogen auf den vor der Transduktion gezählten Gesamtbestand der in jeder einzelnen Flasche vorhandenen Zellen. Durchschnittswerte der Gesamtgruppe, Angaben in Prozent. Die Einzelwerte können Kap. 7.1.1 (Tabelle 1) des Anhangs entnommen werden.

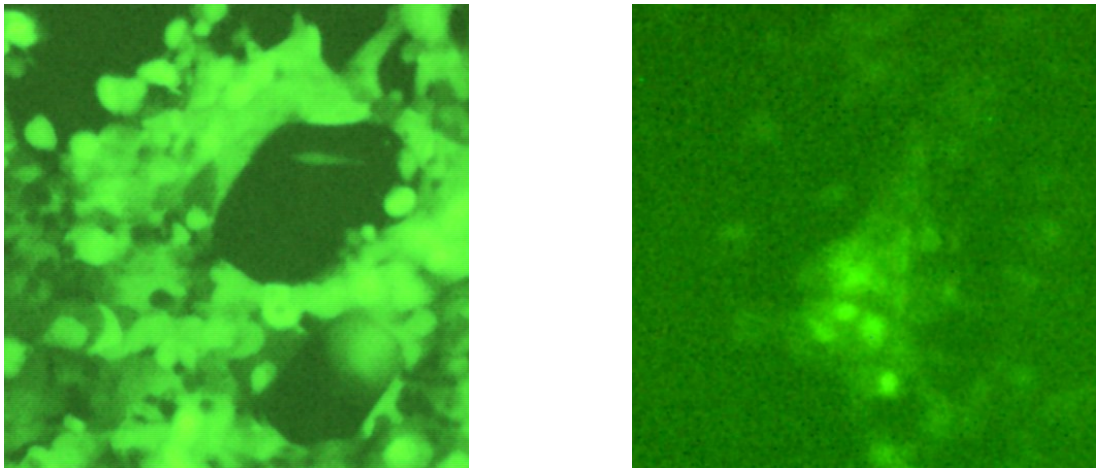


Fig. 33: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellkulturen zweier verschiedener Ansätze. Links Flasche 3.I-4, rechts 5a.I-6. Deutlich erkennbar die Unterschiede im Fluoreszenzverhalten. Links keine klaren Zellformationen identifizierbar, rechts deutliche Ansammlungen gefärbter Zellnester.

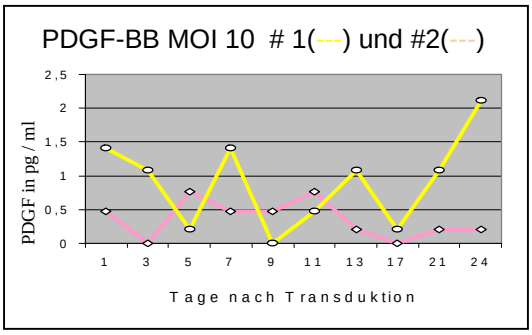
Die Begutachtung der transduzierten Zellen erfolgt zunächst unter normalem Licht, um eventuelle größere Mengen posttransduktional avitaler Zellen nicht zu übersehen. Bei keinem verwendeten Zellansatz konnte jedoch ein solches Phänomen beobachtet werden. Es kam nicht zu einem nennenswerten Absterben transduzierter Zellen. Vielmehr ist die Differenz zwischen dem angegeben Prozentwert zu der Gesamtzahl als misslungener

Transduktionsversuch zu verstehen. In Gruppe 4.I konnten beispielsweise somit 6,6% der in der Zellkultur vorhandenen Zellen nicht modifiziert werden.

3.3 Produktion von PDGF-BB

3.3.1 Expression in vitro

Es folgt zunächst die Darstellung der Ergebnisse der ersten ELISA-Messung in Form von Graphiken, um den Verlauf der Expression ersichtlich zu machen. Zu beachten sind jeweils die unterschiedlichen Konzentrationen auf der Ordinate! Die Einzelergebnisse der jeweiligen Messung können den Tabellen im Anhang entnommen werden.
Bei den Graphiken ist in den unterschiedlichen MOI-Darstellungen besonders auf die Werte der Ordinate zu achten, da diese sich zum Teil um mehrere Zehnerpotenzen unterscheiden.



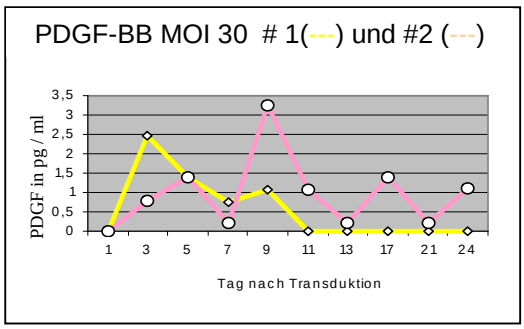


Fig. 34: Graphischer Auftrag der ELISA-Ergebnisse jeweils zweier Messungen der MOI 10 und 30 der ersten Zellcharge.

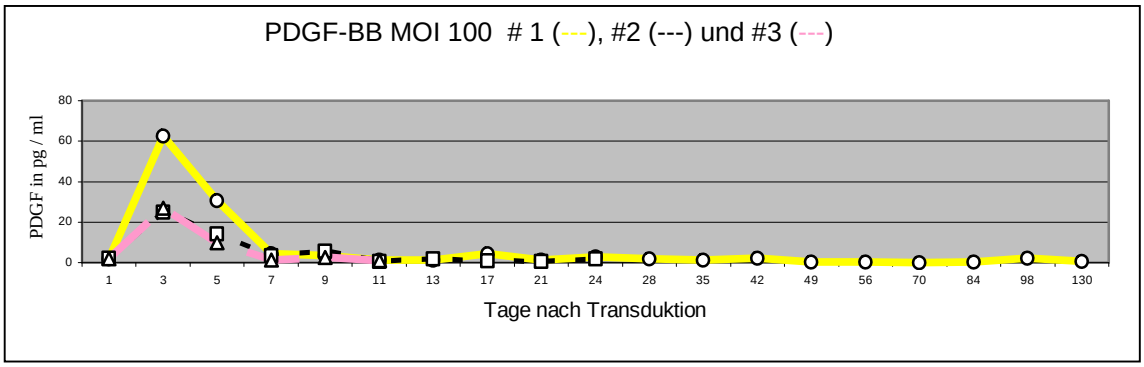
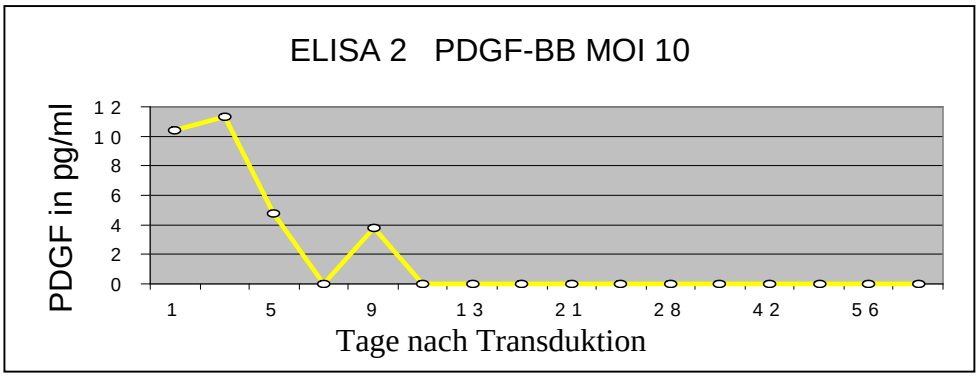
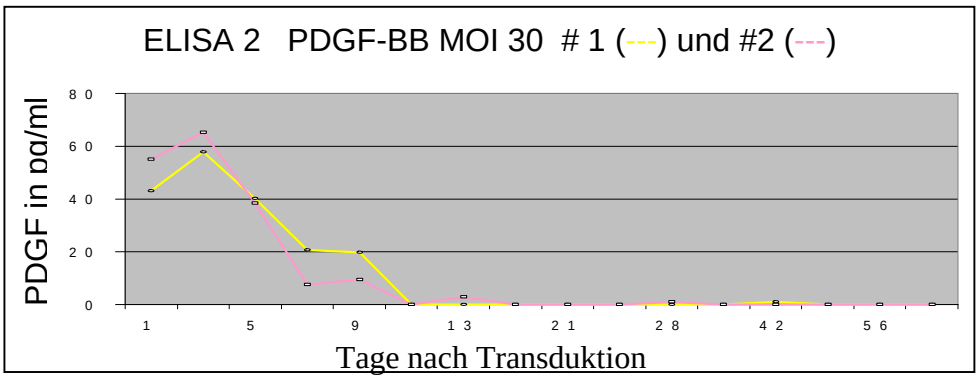


Fig. 35: Graphischer Auftrag der ELISA-Ergebnisse von drei Messungen der MOI 100 (zu beachten ist, dass die gestrichelten Kurven von Ansatz 2 und 3 nicht bis Tag 130 reichen, sondern an Tag 24

bzw. 11 enden; der Peak der Expression und die asymptotische Tendenz sind jedoch auch hier erkennbar)

Leider gelingt es nicht, für alle MOI und Ansätze eine ELISA-Messung durchzuführen, da auf der Platte nur 96 wells vorhanden sind und diese als begrenzender Faktor Einfluss auf die Anzahl der gleichzeitig zu messenden Proben hat. Sinnvoll erscheint jedoch die oben gewählte Messweise, bei der es gelingt, einen MOI 100 Ansatz über eine Dauer von 130 Tagen zu bestimmen, während bei den anderen Ansätzen ein Zeitraum von 24 Tagen beobachtet werden kann. (Dazu auch s. Diskussion)
Im Weiteren folgt die Darstellung der Ergebnisse der zweiten ELISA-Messung:





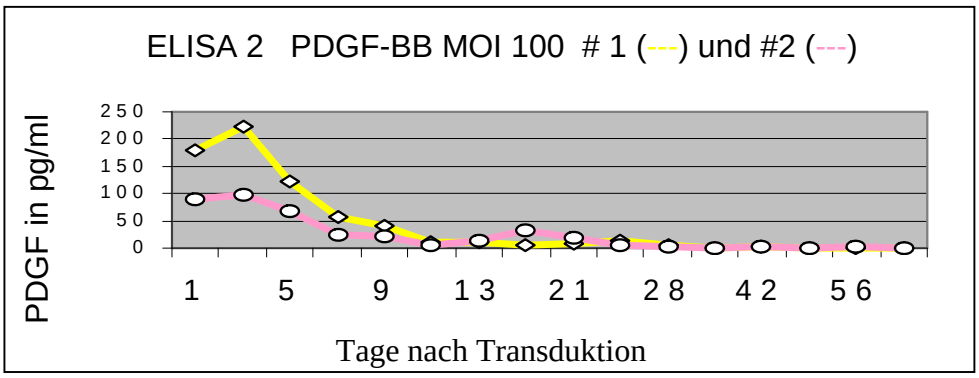


Fig. 36 - 38 zeigen einen ähnlichen Verlauf wie die Ergebnisse der ersten ELISA-Messung. Die Proben mit einer MOI von 10 und 30 enthielten Maximalwerte zwischen 11 und 65 pg/ml. Auch hier ist ein asymptotischer Kurvenverlauf zu erkennen.

Es fällt auf, dass sich vor allem im Bereich höherer MOI innerhalb der ersten Woche der Testreihe ein Peaklevel ausbildet, das anschließend wieder abfällt und gegen Null strebt. Genügend hohe Werte für den Einsatz im in vivo Tiermodell können nur in MOIs ab 30 gefunden werden.

3.3.2 Expression in vivo

Um eine Produktion von PDGF im realen Modell nachweisen zu können, wird die PCR durchgeführt. Dieses zusätzlich zu den ELISA-Untersuchungen durchgeführte Verfahren soll zeigen, dass auch unter in vivo-Bedingungen eine Proteinexpression der gewünschten Substanz stattfindet. Wie in der Darstellung von PCR-Ergebnissen üblich, werden in der folgenden Abbildung nur relative Werte angegeben.

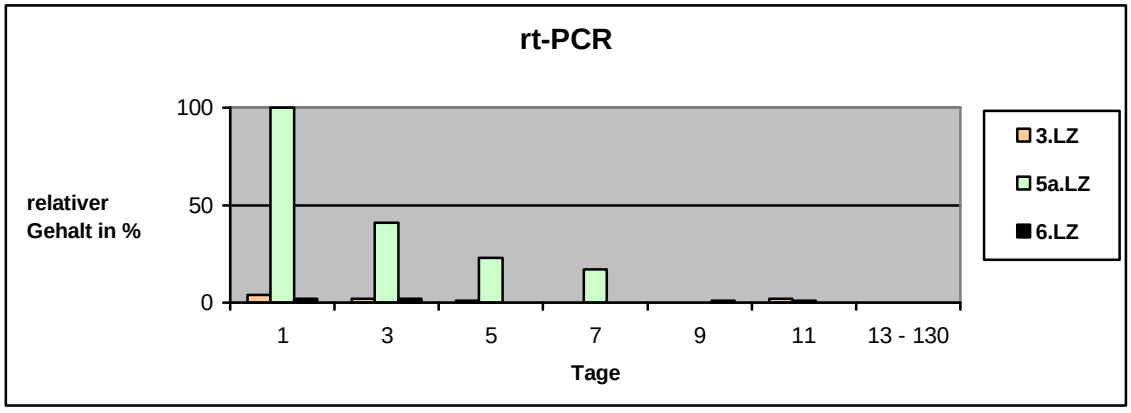


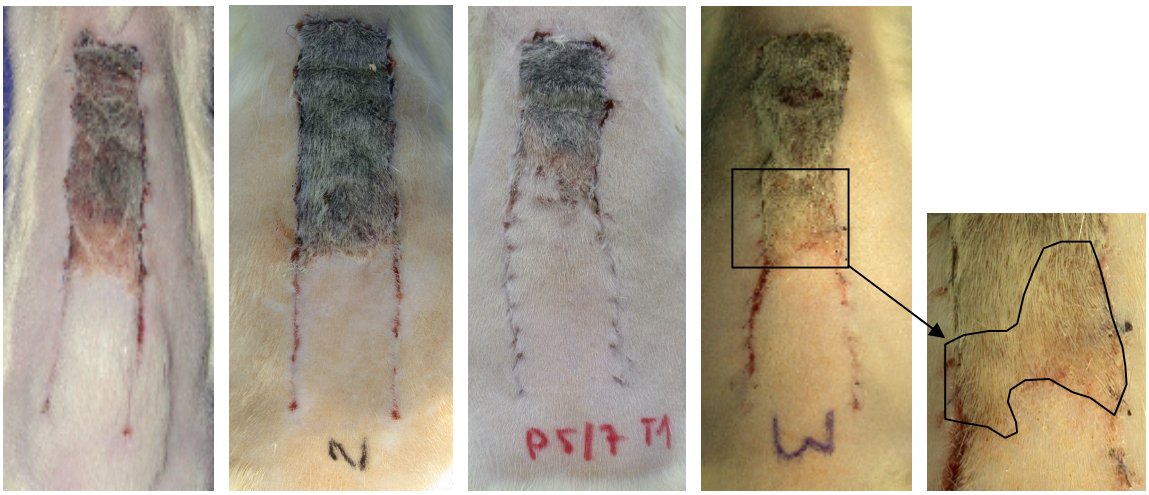
Fig. 39: Graphikergebnisses der rt-PCR als Nachweis für Produktion von PDGF-BB im Gewebe der Langzeitgruppen. Die Werte sind nicht als Absolutwerte zu sehen, sondern geben eine Relation zueinander an. Als 100% definiert wird der Ausgangswert der therapeutischen Gruppe 5a.LZ, bei dem erwartungsgemäß die ausgeprägteste Amplifikation zu beobachten ist.

3.4 Klinische Effekte der modifizierten Fibroblasten in einem etablierten Lappenmodell der Ratte

Wie bereits im Methodenteil beschrieben, ist der wichtigste Teil der Analyseergebnisse das klinische Ergebnis im Lappenmodell. Dazu werden die abgezeichneten Umrisse digitalisiert und im Computer mit Hilfe einer Angabe von Flächenverhältnissen evaluiert.

Auffallend ist bei der Auswertung, dass es in einigen der Versuchsgruppen zur Bildung einer Intermediärzone kommt (s. Fig. 40). Diese gehört nicht wie zuerst angenommen mit zur Nekrosezone und zeigt nicht die für diese typischen klinischen Charakteristika wie Schorfbildung, Nekrosenbildung und Narbenretraktion. Vielmehr ist zu beobachten, dass nach einer Zeit von ca. 3 Wochen diese Zone revitalisiert erscheint und das Überleben des Lappens in einem größeren Areal sichert als nur in dem kaudalen Bereich des Lappens, der von Beginn an klinisch ohne sichtbaren Gewebeschaden erhalten bleibt. Da ein klinischer Effekt im Rahmen eines schweren operativen Eingriffes ohnehin nicht während oder kurz nach der Akutsituation zu erwarten ist, wird die Intermediärzone in der Ergebnisauswertung zum vitalen Gewebe gerechnet. Gerechtfertigt erscheint diese Entscheidung im Rahmen des beobachteten klinischen Effektes der Revitalisierung (s.o.). Das Gewebe der Intermediärzone wird nur auf den ersten Blick manifest geschädigt und erholt sich vollständig, so dass der Begriff Revitalisierung nur für den klinischen Verlauf adäquat erscheint.

Es folgt die schematische Darstellung der klinischen Ergebnisse. Fig. 40 zeigt exemplarisch eine Auswahl von typischen Lappen einiger Gruppen 7 Tage nach Lappenhebung. Zu beachten ist nicht nur die Größe des Lappens, sondern auch die Gestalt, Intermediärzone (s. Vergrößerungsausschnitt) und Retraktionen.



a b c d e

Fig. 40a – e: Beispiele der klinischen Erscheinungsbilder von Nekrosezone, Vitalgewebe und in d und e eingezeichneter Intermediärzone (a: Tier 1.I-6, b: Tier 2.II-3, c: Tier 5a.II-1, d und e: Tier 5b.II-3). Die Abbildung macht deutlich, wie ungünstig sich die gewählte Lappengröße auf ein mögliches Überleben apikaler Lappenanteile auswirkt (s. Diskussion).

In Setting I kommt es nicht zu einer signifikanten Vergrößerung vitaler Lappenanteile. Erst durch die Implantation modifizierter Zellen eine Woche vor der Lappenoperation wie es in Setting II der Fall ist, kann signifikant mehr vitales Lappengewebe erhalten werden. In Setting II unterscheiden sich zusätzlich die Gruppen 5a und 5b im klinischen Outcome signifikant voneinander, (Vitalgewebe: 5a.II 61,56% ±6,10, $p<0,01$; 5b.II 71,59% ±5,0, $p<0,001$). Die Implantation in und um das Lappengewebe herum verbessert hier erheblich das Überleben apikaler Lappenanteile. Dieser Sacherverhalt stellt sich in Setting III anders dar. Hier ist zwar ein signifikanter Unterschied der Gruppen 5a.III und 5b.III zu allen anderen Gruppen des gleichen Settings zu beobachten, untereinander ist jedoch keine Änderung des klinischen Outcomes zu sehen (5a.III 65,92% ±10,61, 5b.III 65,94% ±4,61). Im direkten Vergleich aller Gruppen, die modifizierte Zellen erhalten, zeigt sich in Gruppe 5b.II das beste Ergebnis mit dem größten Anteil an vitalem Lappengewebe nach der Operation.

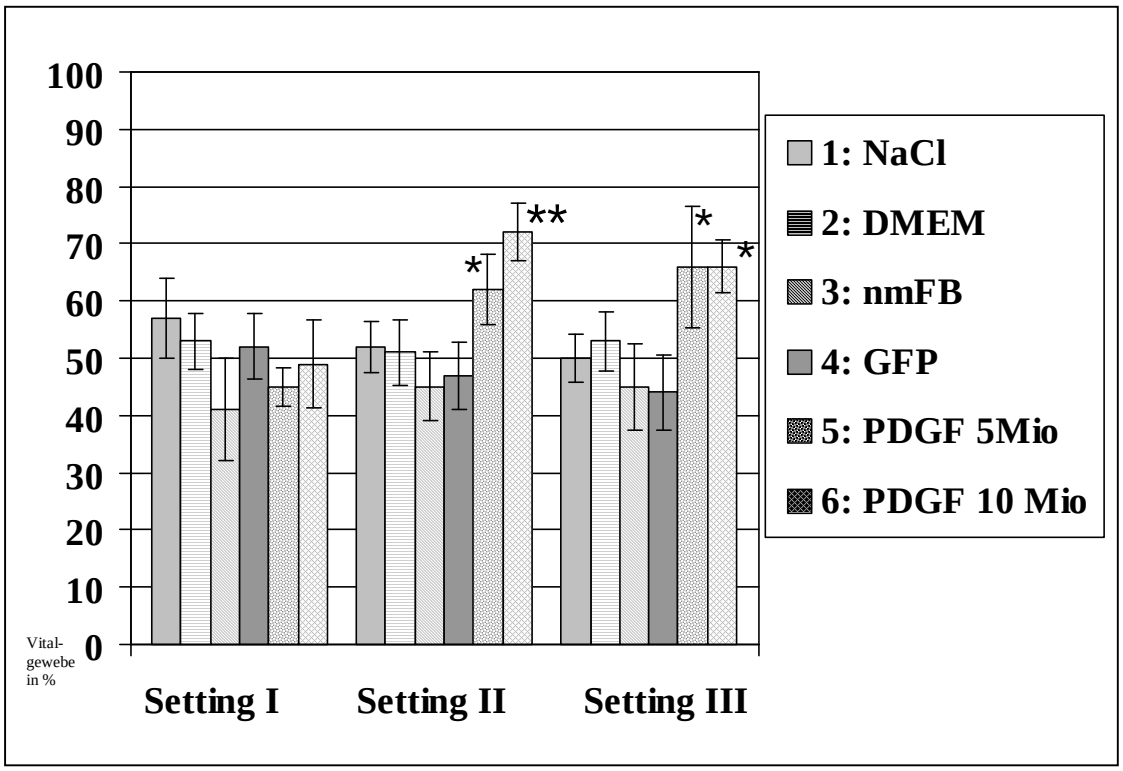


Fig. 41: vitales Lappengewebe der einzelnen Gruppen im Übersichtsdiagramm, Angaben in % der Gesamtfläche; die einzelnen Säulen setzen sich zusammen aus den Durchschnittswerten der jeweiligen Gesamtgruppe bestehend aus jeweils 10 Tieren; die Einzelergebnisse können der Tabelle im Anhang entnommen werden. (* = $p < 0,01$ und ** = $p < 0,001$ im Vergleich zu den Gruppen 1 bis 4 des gleichen Settings.)

3.5 Histologie und Pseudotumoren

Den Tieren aller Gruppen (jeweils Setting I, II und III) werden Histologien entnommen und diese semiquantitativ ausgewertet. Die Lokalisation der Entnahmestellen wird beschrieben in Kap. 2.5.3. Die Gruppen 1.I–III dienen als Kontrolle. Die Präparate werden gewonnen am Tag der Auswertung der Lappengrößen, an denen auch die Euthanasierung der Tiere erfolgt. In den Langzeitgruppen 3.LZ, 5a.LZ und 6.LZ erfolgt die Entnahme der Histologien wie in Kap. 2.3.6 beschrieben.

Die mikroskopische Auszählung nach Färbung des Gewebes erbringt die in den Fig. 42 und 43 dargestellten Ergebnisse. Die immunhistochemische PECAM-Färbung zeigt einen signifikant höheren Gewebegehalt an Endothelzellen (und somit Kapillaren) in den Gruppen 5a und 5b aller Settings verglichen mit allen anderen Gruppen. Die Gegenüberstellung zu Fig. 41 (Anteil Vitalgewebe am Gesamtlappen) zeigt einen Zusammenhang zwischen größerem Prozentsatz vitaler Lappenanteile und erhöhtem Gewebegehalt an Endothelzellen (Gr. 5a.II 27,3 ±5,10, Gr. 5b.II 36 ±4,64 sowie Gr. 5a.III 38,6 ±4,93 und Gr.5b.III 44,9 ±4,48). In Setting I zeigt sich jedoch ein Unterschied. Obwohl es in der klinischen Auswertung der Lappen nicht zu einer signifikanten Erhöhung vitaler Anteile kommt, findet sich in der histologischen Begutachtung ein signifikanter Anstieg der numerischen Anzahl von Endothelzellen (Gr. 5a.I 14,1 ±2,85 und 5b.I 21,9 ±3,21 mit $p<0,01$ im Vergleich zu den anderen Gruppen aus Setting I). Der direkte Vergleich von Gruppen, die modifizierte Zellen erhalten zeigt, dass im Unterschied zu dem klinischen Vergleich, bei dem in Gruppe 5a.II das beste Ergebnis zu sehen ist, hier die höchste Anzahl an Endothelzellen in Setting III zu finden ist (5a.II 27,3 ±5,10, 5b.II 36 ±4,64 sowie 5a.III 38,6 ±4,93 und 5b.III 44,9 ±4,48) . Mit steigender Zahl applizierter modifizierter Zellen sowie Verlängerung des Abstandes der Applikation vor der Lappenhebung steigt die Anzahl der Endothelzellen im Gewebe.

Die HE-Färbung zeigt, dass es in den Gruppen 5a und 5b von Setting I und II zu einer signifikanten Steigerung der Mengen an PMN-Zellen im Gewebe kommt (5a.I 39,9 ±19,47, 5b.I 56,8 ±18,91 sowie 5a.II 84,9 ±23,13 und 5b.II 96,9 ±32,37 mit $p<0,01$ im Vergleich zu allen anderen Gruppen des gleichen Settings). Dieser Effekt ist mit steigendem Abstand von Applikation und Auswertung rückläufig und in Setting III (Auswertung der Tiere 21 Tage nach Applikation der Zellen) nicht mehr signifikant nachweisbar (5a.III 11,8 ±6,09 und 5b.III 26,7 ±9,64). Einen Zusammenhang dieser Daten verglichen mit dem Auftreten der Pseudotumoren zeigt Fig. 50 (Erläuterung s. unten).

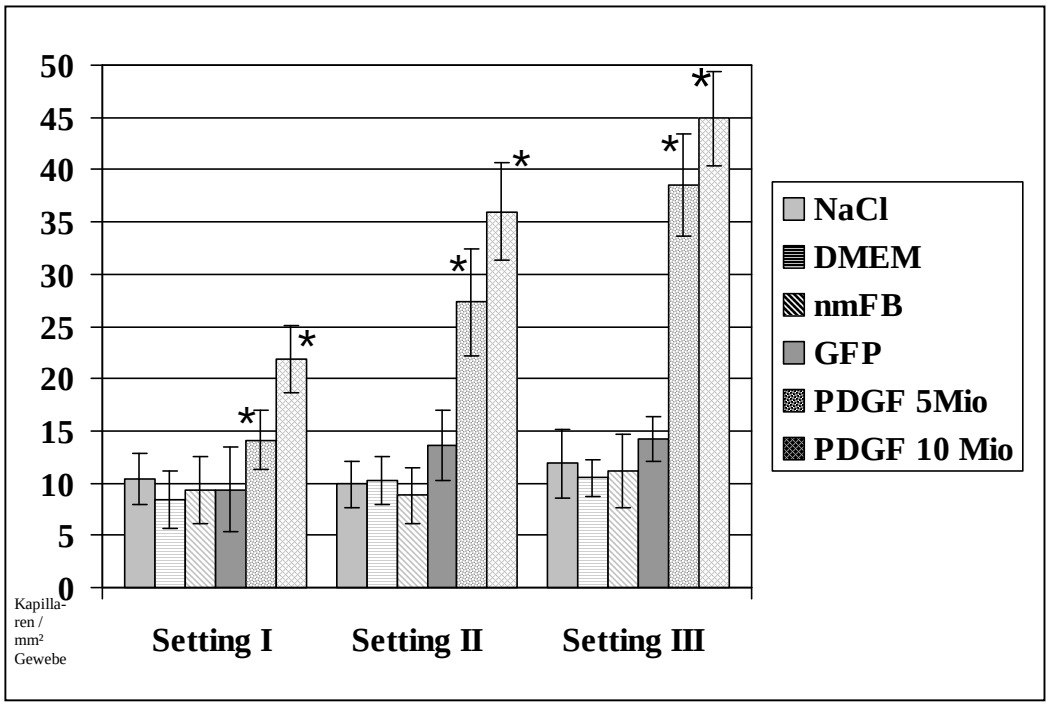


Fig. 42: Immunhistochemie (PECAM-Färbung für Endothelzellen), Anzahl der angeschnittenen Kapillaren / mm² (* = p < 0,01 im Vergleich zu den Gruppen 1 bis 4 des gleichen Settings.)

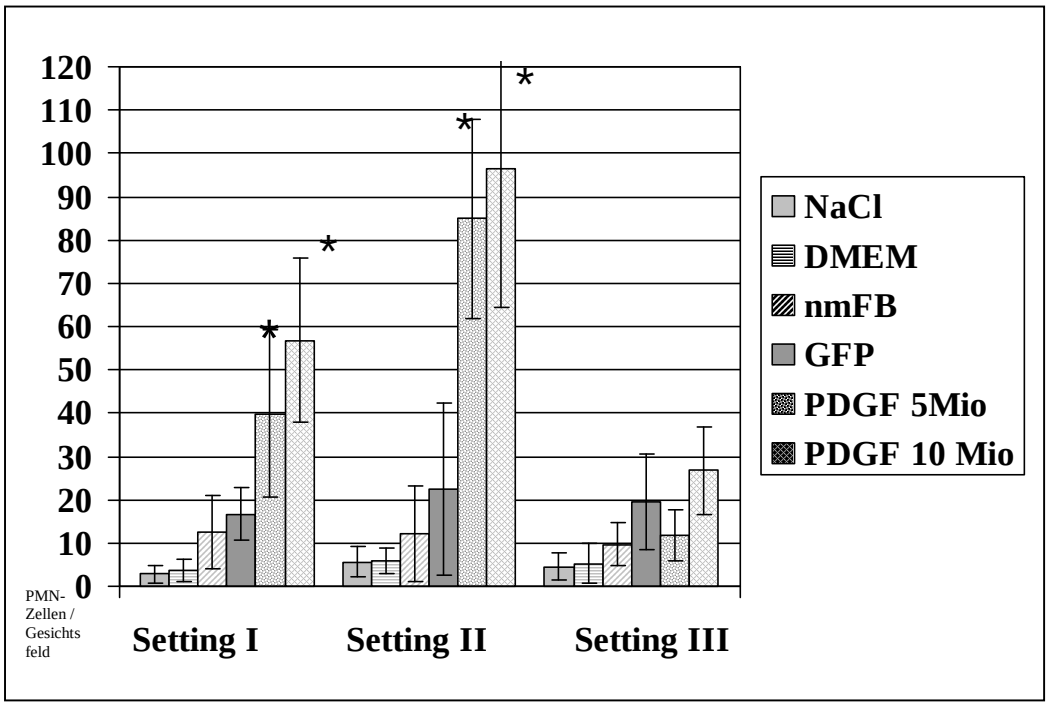


Fig. 43: Histologie, Anzahl polymorphonukleärer Zellen / Gesichtsfeld (* = p < 0,01 im Vergleich zu den Gruppen 1 bis 4 des gleichen Settings.)

Bei der Auswertung von Tieren der Gruppen 5a.I, 5b.I sowie bei der Lappenoperation der Tiere aus den Gruppen 5a.II und 5b.II fällt im Gebiet der Applikation modifizierter Zellen

das Wachstum von Pseudotumoren auf. Bei der Lappenhebung von Tieren aus Setting III und den übrigen Gruppen ist dies nicht zu beobachten. Makroskopisch imponieren die Pseudotumoren als gut vaskularisierte derbe Knötchen fester Konsistenz (s. Fig. 44 u. 45) und solider Binnenstruktur. Auch bei den Tieren der Langzeitgruppe 5a.LZ sind diese Tumoren zu beobachten, jedoch nur innerhalb der ersten neun Tage (5a.LZ-1 bis 9), danach sind sie weder mikroskopisch noch makroskopisch weiterhin nachzuweisen. In den Tieren der anderen Langzeitgruppen kann kein Wachstum von Pseudotumoren beobachtet werden. Die Auswahl der hier gezeigten Bilder erfolgt exemplarisch von Tieren verschiedener Gruppen (s. Bildunterschrift).

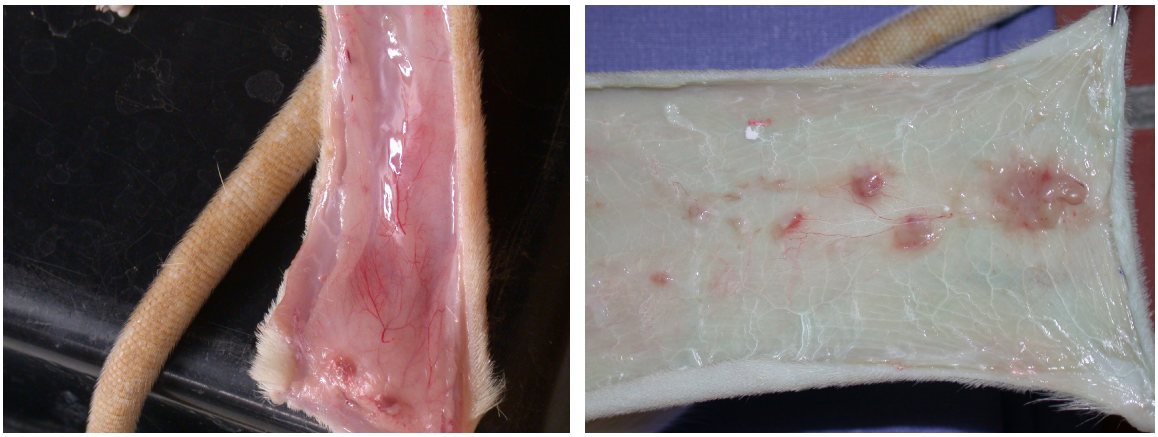


Fig. 44 : Makroskopischer Aspekt der Pseudotumoren (links: Tier 5a.LZ-3, rechts: Tier 5a.II-4, Details s. Text).

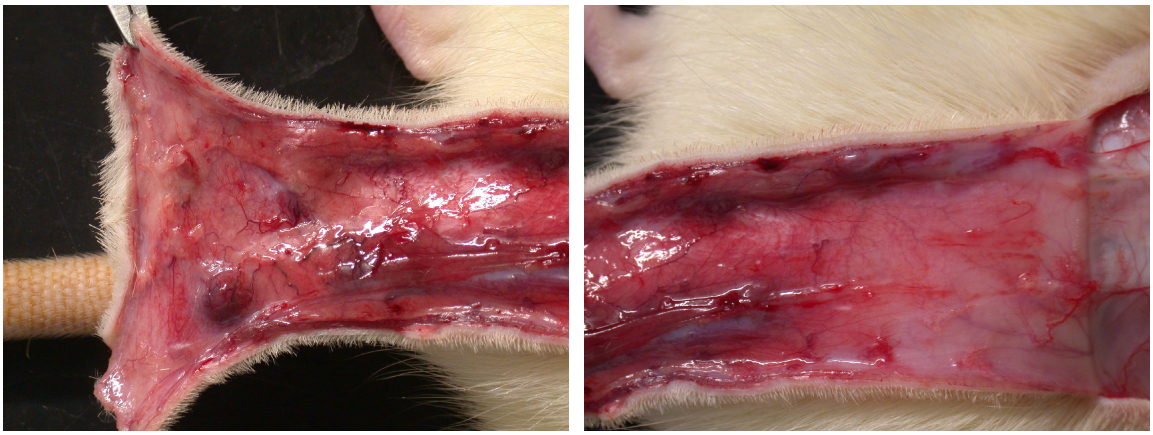


Fig. 45: Weitere Pseudotumoren (Tier 5a.LZ-5), hier besonders gut zu erkennen ist das gut vaskularisierte Gewebe im Bereich der Applikationsstellen und das durch starke Vaskularisation dunkler wirkende Erscheinungsbild der Zellkonglomerate. Wie im Text bereits beschrieben, sind die Konglomerate voll reversibel und nach einer Dauer von durchschnittlich 7 – 9 Tagen nicht mehr nachweisbar.

Neben der Entwicklung einer veränderten Gefäßstruktur im Kapillarbereich ist vor allem die histologische Beschaffenheit der entstandenen Tumoren von Interesse. Bei den Tieren der Langzeitgruppe 5a.LZ ist es möglich, die Tumoren gesondert und gezielt zu begutachten. Dabei fällt auf, dass es sich bei den Knötchen um eine Ansammlung von Entzündungszellen und Fibroblasten handelt. Die immigrierten Entzündungszellen sind vor allem neutrophile Granulozyten und Makrophagen, also polymorphonukleäre Zellen (PMN-Zellen). Im gesamten Tumorbereich sind keinerlei entartete Zellen nachzuweisen. Nach Tag 9 sind in keinem Tier mehr Tumoren nachweisbar, so dass von einem temporären Phänomen ausgegangen werden kann. Die folgenden Abbildungen zeigen die histologische Darstellung des Verlaufes der Tumorentwicklung und exemplarisch Veränderungen im Gefäßbett der Lappenstruktur.

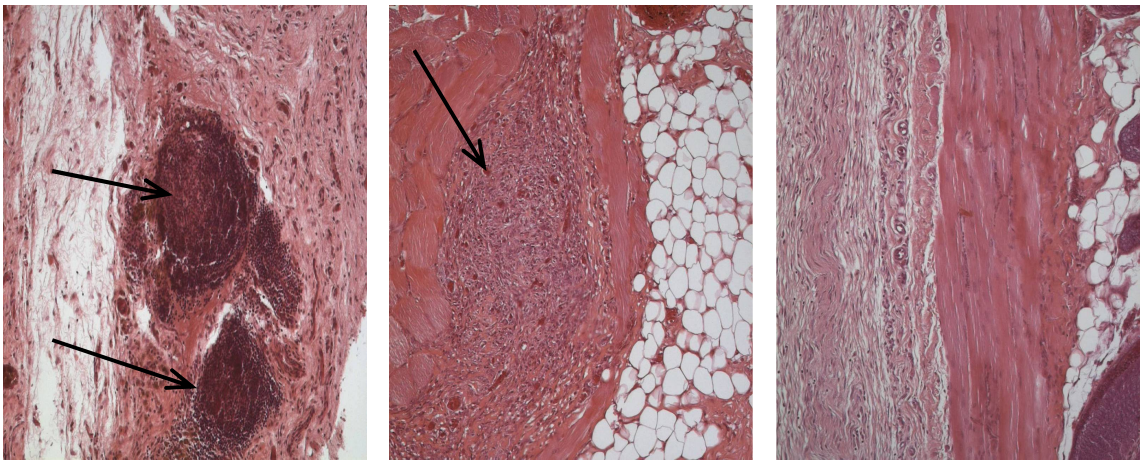


Fig. 46: Links (100fache Vergrößerung) und mittig (150fache Vergrößerung) ist der Anschnitt eines Pseudotumors (Pfeile) von Tier 5a.LZ während der Auswertung zu sehen. Im Vergleich dazu zeigt das Bild rechts einen Ausschnitt aus korrespondierendem Gewebe von Tier 2.III-4, hier sind keine Entzündungszellen nachweisbar.

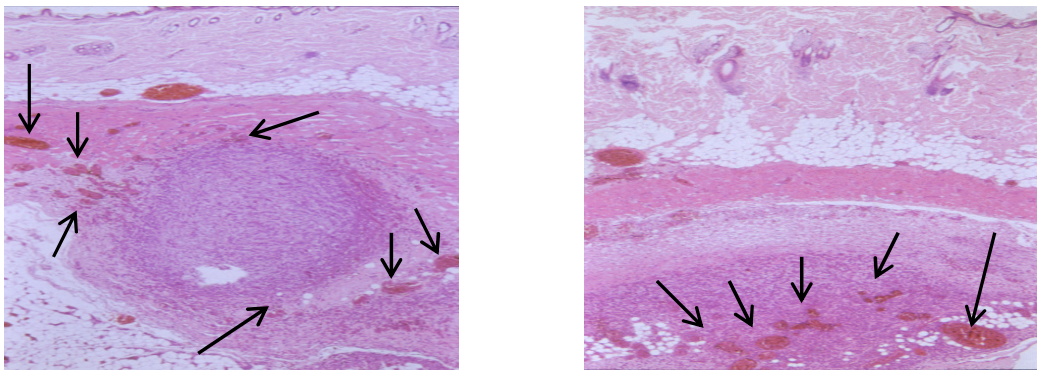


Fig. 47: Charakteristischer Aspekt der Pseudotumoren (25fache Vergrößerung). Links (Tier 5a.LZ-7) sind multiple neu gewachsene Kapillaren im Randbereich des Tumors zu erkennen, während rechts (Tier 5b.I-2) auch eingewachsene Gefäße im Bereich der zentralen Region vorhanden sind (s. Pfeile).

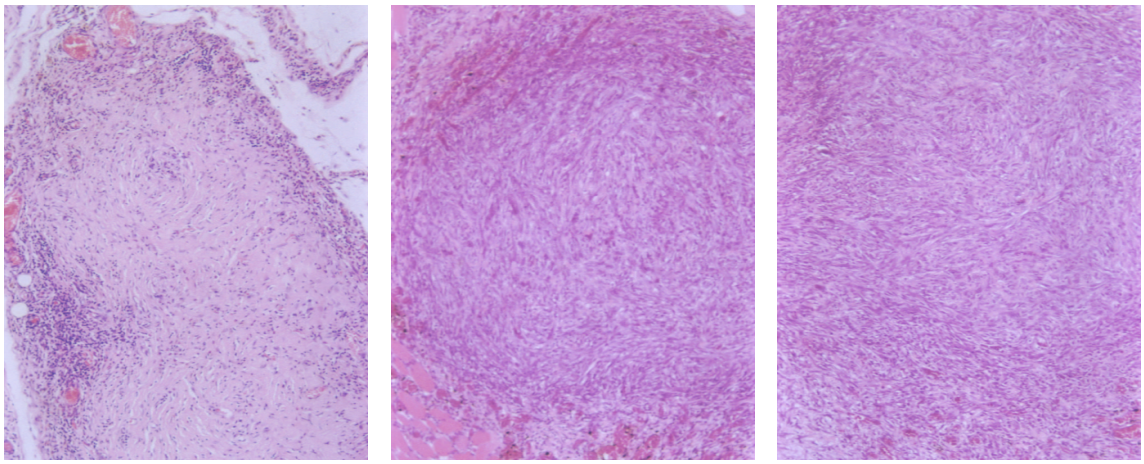


Fig. 48: Die 40fache (links), sowie 100fache Vergrößerung (Mitte und rechts) zeigt jeweils im gesamten Bild übersichtliche Teilaspekte der Pseudotumoren. Zu erkennen sind zellreiche, faserarme Konglomerate ohne maligne Zellen, es sind keine Mitosen erkennbar, innerhalb des Gebietes befinden sich zahlreiche neue Kapillaren.

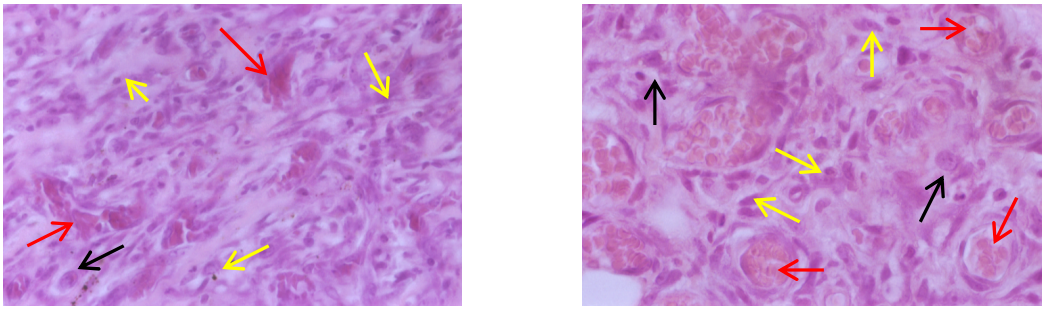


Fig. 49: In weiterer Vergrößerung (400fach, hier Teilaspekte aus dem Randbereich des Pseudotumors von Fig. 47) sind zahlreiche eng anliegende, prall mit Erythrozyten gefüllte Kapillaren zu erkennen (rot). Das umgebende Gewebe ist reich an Fibroblasten (gelb), vereinzelt sind PMN-Zellen zu erkennen (schwarz).

Bei der Auswertung der Ergebnisse fällt auf, dass es sowohl in den in vitro-, als auch in den in vivo-Resultaten zu der Ausbildung von charakteristischen Kurvenverläufen kommt. Den ELISA-Ergebnissen kann entnommen werden, dass es offensichtlich eine Anlaufphase der Produktion gibt, die in den relevanten Ansätzen in einen Produktionspeak mündet, der anschließend gegen Nullwerte absinkt. Bei der Entstehung der Pseudotumoren ist selbiges Prinzip zu beobachten: einer Latenz- und Anlaufzeit von einigen Tagen folgt die makroskopische Erscheinung der Pseudotumoren, die einige Tage persistieren, um anschließend vollständig zu verschwinden. Bei dem direkten Verlaufsvergleich lässt sich die Abbildung 50 entwickeln welche als Hinweis auf den direkten Zusammenhang zwischen Entwicklung der PDGF-BB-Produktion (in vitro Resultate) und Pseudotumorentstehung (in vivo Resultate) gedeutet werden kann.

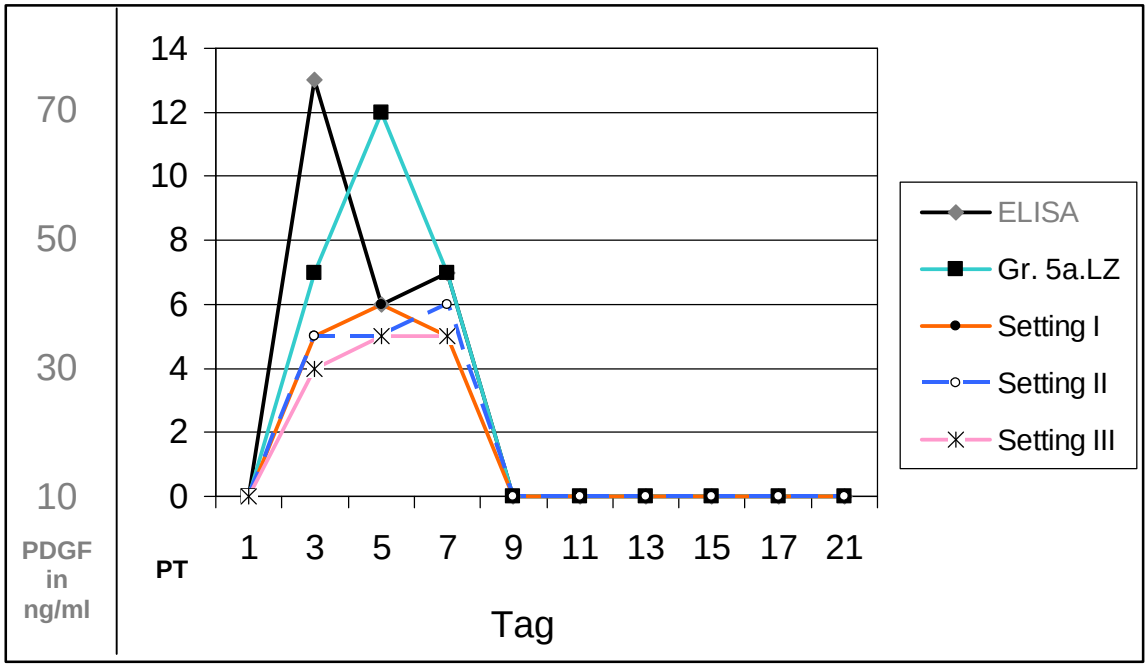


Fig. 50: Kombinationsgraphik aus dem ELISA-Ergebnis (ELISA 1, MOI 100 #1) und dem Ergebnis der Zählung der Pseudotumoren (PT) im Gewebe. In grau dargestellt wird der PDGF-BB-Gehalt (in pg/ml), schwarz dargestellt die Anzahl der PT. Beachtenswert ist der zeitliche Zusammenhang zwischen den in vitro gemessenen Ergebnissen der PDGF-BB Produktion und dem in vivo Auftreten der PT. Etwa zwei Tage nach der höchsten PDGF-BB Konzentration kann das numerische Maximum der PT beobachtet werden, welches dann, wieder analog zu den ELISA-Ergebnissen, abfällt. Bei den Tieren der Gruppe 5a.LZ erfolgt die Zählung bei Direktaufsicht auf das freipräparierte Gewebe, während die anderen Werte durch transkutane Palpation gewonnen wurden. Die dargestellten Tage entsprechen den Zeitpunkten ab der Zellapplikation in das Gewebe der betreffenden Gruppen.

Um denkbare systemische Folgeerscheinungen oder eine hämatogene Zellaussaat auszuschließen, werden die Gewebeproben aus Hirn, Lunge, Knochenmark und Leber histologisch untersucht. In keinem der Präparate kann das Vorhandensein modifizierter Zellen mit der x-gal-Methode nachgewiesen werden.

3.6 Mikroangiographie

Die Technik der Mikroangiographie erlaubt eine zweidimensionale Darstellung der Gefäßarchitektur des Gesamtlappens und gibt somit tieferen Einblick in den Ablauf und Mechanismus der Angiogenese. Während die Histologie nur Momentaufnahmen kleinster Ausschnitte aus dem Netz der Gefäße offenbart, führt die Mikroangiographie zu einem Verständnis der Anknüpfung neuer Gefäße an die alten angiostrukturellen

Beschaffenheiten. Zur Verbesserung der Darstellung und Orientierung sind die Grenzen des gehobenen Hautlappens in den dargestellten Röntgenbildern eingezeichnet. Es kann mit Hilfe dieser Bilder eine Aussage darüber gemacht werden, an welchen Schnittstellen neue und alte Gefäße zusammenkommen, wie der Lappen vor und nach der Operation an das Gefäßnetz angebunden ist und wie stabil das neue Kapillarnetz sein kann.

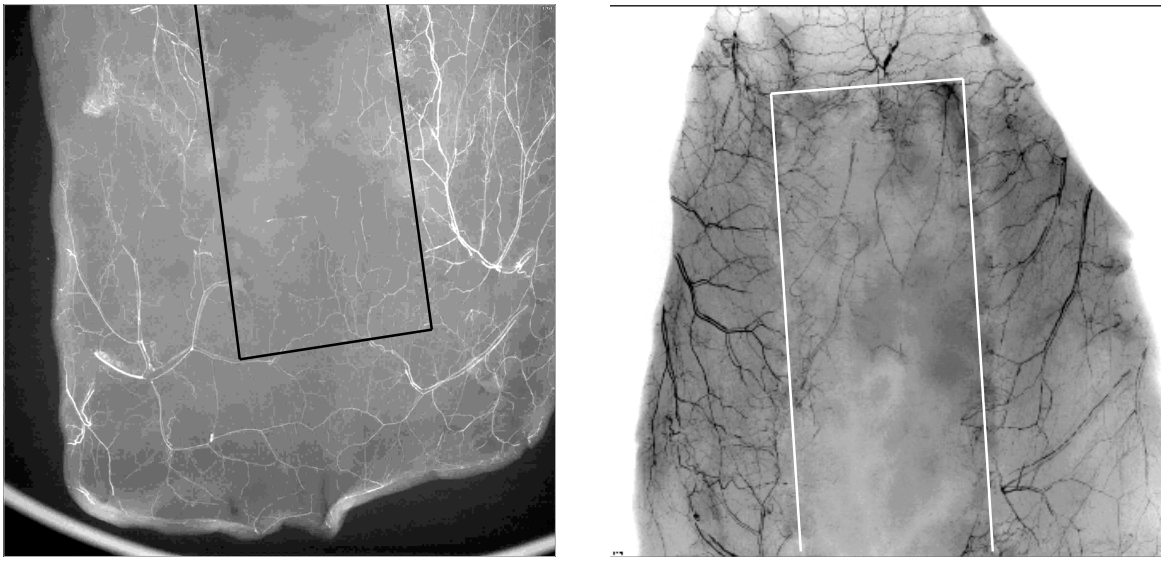


Fig. 51: Mikroangiographische Abbildung des Rückenlappens von Tier 1.II-1 (links: basaler Abschnitt, rechts: apikaler Abschnitt). Zu beachten ist das spärliche Auftreten von Kapillaren im Bereich des gesamten Lappengewebes. Im Bereich des apikalen Abschnittes kommt es zu einer diskreten Einsprossung von Gefäßen aus dem Bereich des Wundrandes während der zentrale Teil nicht vaskularisiert erscheint. Diese Beobachtung geht mit dem klinischen Bild der typischen Nekroseentwicklung einher und ist irreversibel.

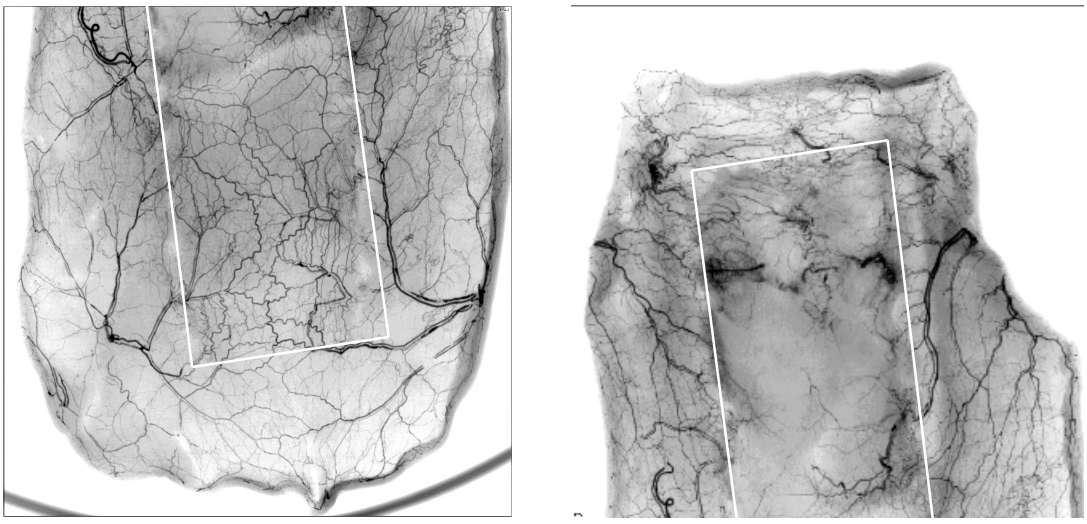


Fig. 52: Tier 4.II-9; Im Unterschied zu Fig. 51 sind hier im basalen Teil des Lappens zahlreiche Gefäße vorhanden während im zentralen und apikalen Teil das Gefäßbett stark ausgedünnt erscheint.

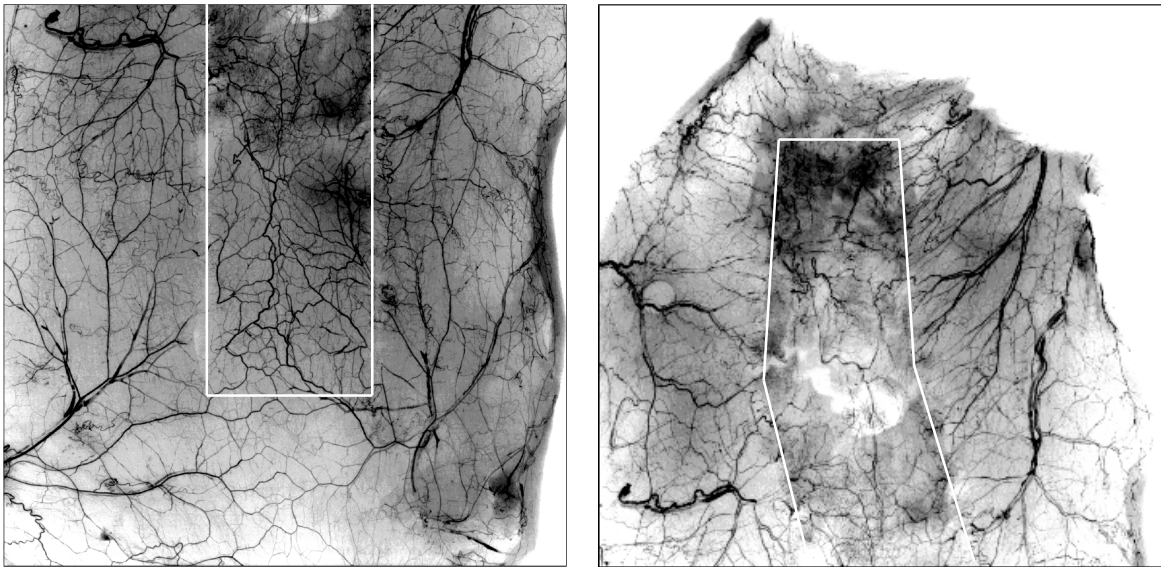


Fig. 53: Tier 5a.II-7; Im Bereich des gesamten Lappens ist stark vaskularisiertes Gewebe zu erkennen. Selbst der apikale nekrotische Teil wirkt vaskularisiert, dies wird jedoch hier zum Teil durch Kontrastmittelextravasate bedingt. Die Gefäßneubildung erfolgt über den Bereich des Wundrandes und erstreckt sich über die gesamte Längsausdehnung. Es kommt zum Wachstum sehr feiner Gefäße mit kleinstem Durchmesser.

Bei der Auswertung der Bilder der Mikroangiographie ist zu beachten, dass es nicht gelingt, den Lappen als Ganzes abzubilden. Jeder Lappen wird in zwei Teilen abgebildet, von denen einer der proximale und einer der distale Anteil ist. Die Mitte des jeweiligen Lappens überschneidet sich auf den beiden Bildern eines Tieres. Dieser Bereich wird bei der Messung nicht doppelt mitgezählt.

Die Verläufe der Gefäße unterscheiden sich innerhalb der einzelnen Gruppe nicht wesentlich, ebenso wenig wie die der Vergleichsgruppen. Die kapilläre Struktur ist in Form eines dichten Netzwerkes ausgeprägt, das nicht nur in basal-apikaler Richtung, sondern auch in horizontaler Richtung angelegt ist. Es kommt also nicht zu einer gerichteten Gefäßneubildung, sondern zu einer ungerichteten Reaktion im Sinne einer Verdichtung der Gefäßstruktur. Fig. 52 zeigt, dass viele der neuen Gefäße vom seitlichen Wundrand einsprossen. Nur wenige der Kapillaren scheinen aus basaler Richtung in den apikalen ischämischen Teil des Lappens einzuwachsen. Vielmehr bedient sich das Netzwerk neu entstandener Kapillaren der Nähe größerer Gefäße aus denen erstere offenbar gespeist werden. Das Bild eines leeren Lappens fast ohne Gefäße, wie es in Fig. 51 zu sehen ist, korreliert mit dem klinischen Bild der Nekrose. Dieses Gewebe ist unwiderruflich verloren.

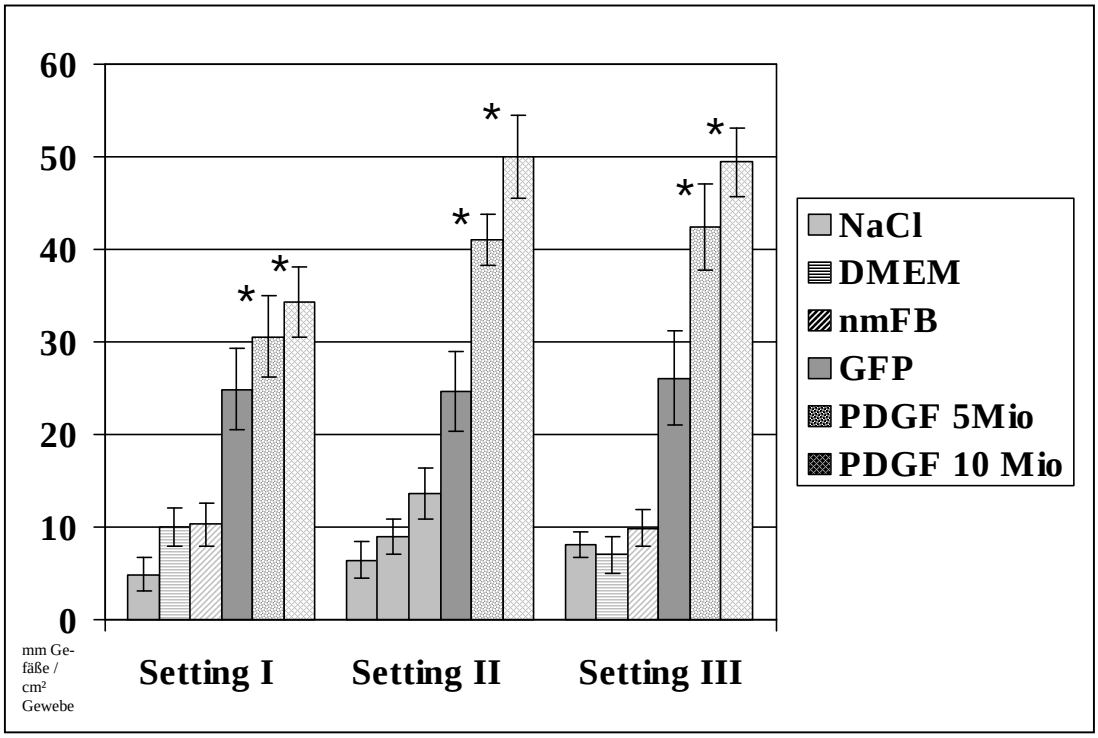


Fig. 54: Mikroangiographie, mm kleinster Blutgefäße / cm² Gewebe (* = p < 0,01 im Vergleich zu den Gruppen 1 bis 4 des gleichen Settings).

Fig. 54 zeigt quantitativ den Gefäßgehalt des Gewebes der einzelnen Gruppen nach mikroangiographischer Auswertung. Es fällt auf, dass die Gruppen, die therapeutisch modifizierte Zellen erhalten haben, in allen Settings einen signifikant höheren Gehalt an Gefäßen aufweisen, als das in den anderen Gruppen jeweils im gleichen Setting der Fall ist. Dies korreliert mit den Ergebnissen der PECAM-Färbung.

4. Diskussion

4.1 Gentransfermodell

PDGF-BB (platelet-derived growth factor) gehört zur Gruppe der Wachstumsfaktoren. Es wurde bei seiner Entdeckung aus Thrombozyten isoliert [Antoniades 1979, Deuel 1981, Raines 1982, Heldin 1989] und kommt im menschlichen Körper physiologischerweise bei Entzündungs- und Reparaturvorgängen vor. PDGF ist ein glykosyliertes, über Disulfidbrücken verknüpftes Dimer, das aus unterschiedlichen Typen von Polypeptiden aufgebaut ist. [Heldin 1999] Bis dato ist es gelungen, vier davon näher zu spezifizieren. Sie werden unterteilt in die Typen A, B, C und D. Zwei davon weisen eine nahezu 50 %ige Sequenzhomologie auf und sind mittlerweile gut bekannt: Typ A (16 kDa) und Typ B (14 kDa). Daraus ergeben sich für diese beiden Typen drei verschiedene Kombinationsmöglichkeiten: PDGF-AA, -AB und –BB. Die Halbwertzeiten des körpereigenen PDGF im Gewebe sind abhängig von dem Aufbau aus den einzelnen Polypeptiden. Die PDGF-A-Kette weist eine HWZ von etwa 2,4 Stunden, die PDGF-B-Kette eine HWZ von etwa 1,8 Stunden auf. [Gay 1991] Intensive Studien der Wachstumsfaktoren führten zu der Entdeckung der Typen C und D. [Li 2000, Bergsten 2001, LaRochelle 2001, Li 2003] Das Vorkommen der einzelnen PDGF-Fraktionen im Organismus ist abhängig von der Expression ihrer Monomere. Diese variiert in den einzelnen Zellarten, alle drei Formen des PDGF weisen jedoch überlappende biologische Effekte und Funktionen auf. Unterschiede bestehen zwischen den Typen –A und –B sowie –C und -D vor allem im molekularen Aufbau (so ist der PDGF-C Subtyp strukturell sehr mit der Klasse der VEGF verwandt [Reigstad 2003]) und in der biochemischen Induktion der Signalkaskade. PDGF-C und –D zeichnen sich durch eine CUB-Domäne (Complement subcomponents C1r/C1s, Urchin EGF-like protein und Bone morphogenic protein-1) am N-terminalen Ende aus, welche vor der Bindung an das entsprechende Rezeptormolekül abgespalten werden muss. [Bork 1991]

Es sind zurzeit zwei strukturell miteinander verwandte, aber klar voneinander abgrenzbare Rezeptorstrukturen für die einzelnen PDGF Untereinheiten bekannt. Der α-Rezeptor (PDGFR-α, 170 kDa) bindet die PDGF-A, -B, sowie die -C Einheit, während der β-Rezeptor (PDGFR-β, 190 kDa) eine Bindung zur PDGF-B und -D Einheit eingeht. [Hammacher 1989, Seifert 1989, Kanakaraj 1991, Cao 2002] Wie die signalinduzierenden

Wachstumsfaktoren, kommen auch die Rezeptoren in Form gekoppelter Dimere vor (PDGFR-αα, -αβ und –ββ). [Heldin 1998, Lindahl 1998, Kazlauskas 2000]

PDGF Isoform	PDGF-AA	PDGF-AB	PDGF-BB	PDGF-CC	PDGF-DD
Bindet an…	PDGFR-αα	PDGFR-αα PDGFR-αβ	PDGFR-αα PDGFR-αβ PDGFR-ββ	PDGFR-αα PDGFR-αβ	PDGFR-ββ

Fig. 55: Bindungsmöglichkeiten einzelner PDGF-Subtypen an die entsprechenden Rezeptoren. Die Aufteilung der Bindungsvariationen ist abhängig von der Zusammensetzung aus den einzelnen Untereinheiten. Theoretische weitere Kombinationsmöglichkeiten bleiben bis dato Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten.

Jeder Rezeptor weist eigene Variationen im Signalmechanismus auf. Die Rezeptoren gehören zur Klasse der Tyrosinkinase-Rezeptoren und werden aktiviert durch Autophosphorylierung nach erfolgter Bindung. Durch diese Vielfalt an Möglichkeiten der Rezeptorbindung, unterschiedlicher Expression von PDGF-Subtypen und komplexen intrazellulären Signalkaskaden entsteht ein breites Spektrum möglicher biologischer Funktionen von PDGF. PDGF wirkt vor allem auf Zellen mesenchymaler Herkunft als mitogener und chemotaktischer Migrationsfaktor (Endothelzellen, Myozyten der Gefäßwand, Monozyten, Granulozyten und Fibroblasten) [Ishikawa 1989, Risau 1992, Eming 1999, Lindahl 1999]; seine primäre Quelle im Blut sind die Thrombozyten. [Hammacher 1988] PDGF spielt durch Bindung an dermale Zellen, die zur Proliferation und Migration angeregt werden und konsekutiv das Granulationsgewebe bilden, eine maßgebliche Rolle in der Wundheilung [Rollman 2003] sowie bei Verdickungen der Gefäßintima und wird in Zusammenhang gebracht mit der Manifestation einer Atherosklerose [Raines 2004] und anderen Erkrankungen. [Adcock 2004, Üren 2003]

Eine der größten Herausforderung im therapeutischen Umgang mit PDGF-BB ist dessen kurze Halbwertzeit von weniger als zwei Stunden. [Gay 1991] Dies stellt den Einsatz als wirkliche therapeutische Option unter Klinikbedingungen vor Schwierigkeiten, die zu bewältigen eine lange Vorarbeit im Rahmen der Grundlagenforschung erforderlich macht. Der Grundgedanke, von der direkten Applikation von PDGF-BB in das Gewebe abzukommen und auf ein anderes Applikationsmodell auszuweichen, birgt mannigfaltige Möglichkeiten mit individuellen Vor- und Nachteilen.

Bereits Ende der achtziger Jahre wurden erste Versuche unternommen, Viren als Medium einer genetischen Information zu verwenden, um mit ihrer Hilfe Zellen im Gewebe zu verändern. Die anfänglichen Schwierigkeiten bei dem Einsatz retroviraler Medien waren gekennzeichnet durch die Notwendigkeit, cis- und transcodierende Genloki voneinander

zu trennen. Ohne den Einsatz von Helferzellen gelang dies Sorge et al. 1984. [Sorge 1984] Kurz darauf folgten erste Erfolge der Implantation von retroviral modifizierten Blastozystenzellen aus Schweinembryonen in ein weiteres Tier. [Petters 1987] Großer Nachteil der retroviralen Transduktion bleibt jedoch die Persistenz der Modifikation. Retroviral transduzierte Zellen bauen die modifizierte Information stabil in ihr Genom ein, exprimieren diese während ihrer gesamten Lebensdauer und geben sie an Tochterzellen weiter. Dies kann durch die lange Kontaktzeit des Organismus mit viralen Genprodukten zu bisher nicht abzusehenden Nebenwirkungen führen. Anders verhalten sich Zellen nach adenoviraler Transduktion. Das Ende der adenoviralen Replikation ist gekennzeichnet durch einen immunologischen Prozess seitens des Empfängerorganismus. [Yang 1994, McCray 1995] In aller Regel kommt es zu einer durchschnittlichen Dauer der Proteinexpression von ein bis zwei Wochen in vivo. [Yang 1994] Maßgeblichen Anteil an dieser Immunreaktion hat eine zelluläre T-Zell-Antwort. In Versuchen an Scid Mäusen, denen B- sowie T-Lymphozyten fehlten, wurde festgestellt, dass es zu einer deutlichen Verlängerung der Genexpression auf mehr als drei Wochen kam. Die alleinige Zufuhr von B-Lymphozyten zeigte keinen entscheidenden Effekt auf die Beendigung der Expression in Form der bekannten Immunreaktion. Erst die Zufuhr von sensibilisierten T-Zellen löste eine rapide Immunantwort aus, die schließlich zur Beendigung der Genexpression führte. [DeMatteo 1999]

Der Einsatz nackter Plasmid-DNA stellte sich als nicht effizient genug heraus, um eine genügend hohe Gentransferrate in die entsprechenden Zellen zu erreichen. Laitinen et al. umlegten die Adventitia von Gefäßen mit Silastikbändern, welche als Reservoir für verschiedene Träger der genetischen Information für das lac-Z Gen dienten und kontinuierlich den Kontakt zum Gewebe ermöglichten. 5 Tage nach der Applikation zeigte sich, dass adenovirale Medien etwa 10 ± 6 % der adventitialen Zellen transduzieren konnten, während dies im gleichen Versuchsaufbau bei Einsatz von pseudotyped vesicular stomatitis virus protein-G (VSV-G) Retroviren und Plasmid/Liposomenkomplexen in 0,05% ±0,03%, sowie beim Einsatz von moloney murine leukemia virus (MMLV) Retroviren nur in <0,01% ±0,01% der Zellen gelang. [Laitinen 1997] Bisher bekannte Ausnahme des aus Effizienzgründen eingeschränkten Einsatzes nackter Plasmid-DNA war die direkte Applikation in Myozyten von Mäusen zur Übertragung der genetischen Information für EPO. EPO war anschließend über eine Dauer von mindestens 45 Tagen im Serum signifikant erhöht nachweisbar. [Tripathy 1996]

Auch der Einsatz polykationischer Polymere ist Gegenstand früherer wie aktueller Forschungsarbeiten. Nach wie vor zeichnen sich diese Verfahren jedoch durch eine –im Vergleich zum viralen Transduktionsmodell- hohe Unzuverlässigkeit bezüglich ihrer Zytotoxizität aus. Boussif et al. konnte zeigen, dass mittels Polyethylenimin als Carrier ein Luziferase-Gen in das Gewebe von Maushirnen transduziert werden kann. Das schmale Dosisfenster zwischen therapeutischen und toxischen Mengen der verwandten Substanzen macht jedoch einen klinischen Einsatz fragwürdig, da eine leichte Überschreitung der therapeutischen Dosis zu der unmittelbaren Zerstörung der mit ihnen in Kontakt gebrachten Zellen führt. In der praktischen Anwendung birgt dieses Verfahren also hohe Risiken bezüglich des Therapieerfolges. [Boussif 1995] Auch die in neuerer Zeit erprobten niedermolekularen linearen Polyethylenimine (LPEI) konnten ein Transfektionsmaximum von 44% nicht überschreiten. Das Problem der geringen therapeutischen Breite dieser Substanzen konnte zwar reduziert aber nicht signifikant verbessert werden, um einen klinischen Einsatz sinnvoll erscheinen zu lassen. [Breunig 2005]

Obwohl zu den Retroviren gehörend, wird der Einsatz von Lentiviren wegen seiner großen Effizienz und Sicherheit in der Literatur oft gesondert erwähnt. Bereits in den ersten erfolgreichen Versuchen der Applikation von Lentiviren in das Hirngewebe adulter Ratten gelang es, hohe Transduktionsraten zu erzielen, ohne den Nachteil einer starken Zytotoxizität des Vektors in Kauf nehmen zu müssen. [Naldini 1996] Wie bereits oben erwähnt, bleibt jedoch ein Merkmal der retroviralen Transduktion von Zellen die Dauer der Expression modifizierter Proteine. So konnte nach intraparenchymaler Injektion in das Lebergewebe von Nagetieren eine GFP-Expression von über 22 Wochen nachgewiesen werden. [Kafri 1997]

Andere Methoden wie die Anwendung von Mikroprojektilen als so genannte „gen-guns“ finden bis dato gehäuft Einsatz in der Agrarindustrie (Modifikation von Pflanzen) und sind für den klinischen Einsatz noch nicht genügend erforscht und gereift.

Die Auswahl der am besten geeigneten Methode, um an einem Ischämiemodell angiogenetische Effekte mit gleichzeitig möglichst geringen Nebeneffekten und Langzeitauswirkungen zu erzielen, führt über die temporäre Transduktion. Die z.B. für Stoffwechseldefekte gewollte Langzeitproduktion von Proteinen findet nicht statt. Das Gewebe, an dem der angiogenetische Effekt dokumentiert werden soll, kommt in dem Modell der vorliegenden Arbeit nicht in direkten Kontakt mit dem Virus. Alle Versuche, die einen direkten Kontakt mit viralem Material nötig machen, finden in vitro statt.

Lediglich das therapeutische Agens, das zwar seinen Ursprung in der genetischen Zellmodifikation findet, aber bei den in vivo Versuchen getrennt von den viralen Einflüssen zum Einsatz kommt, spielt in der Direktanwendung des Modells die entscheidende Rolle. Auf diese Weise können mögliche Folgeschäden durch Kontakt eines Organismus mit einem Virus (auch wenn dieser modifiziert und nicht pathologisch aktiv ist) zumindest in der Wahrscheinlichkeit ihres Auftretens minimiert werden. Im Rahmen der klinischen Grundlagenforschung ist es bereits zu einem Todesfall gekommen, als einem Patienten zur Therapie eines hepatischen Ornithin-Transcarbamylasedefektes Adenoviren in hohen Dosen über die Pfortader injiziert wurden. [Lehrman 1999] Dies zeigt, wie wichtig der verantwortungsvolle Umgang gerade mit diesem Teilbereich der Forschung weiterhin ist und bleiben wird. Ein weiterer Vorteil des hier verwendeten adenoviralen Transduktionsmodells ist das bereits angesprochene zeitlich begrenzte Fenster der Expression und die hohe Effizienz der Transduktion.

Das Modell des zellbasierten Gentransfers bietet die Möglichkeit, sich nur in einem begrenzten und definierten Rahmen vom Faktor Zeit abhängig machen zu müssen, ist jedoch auch mit erhöhtem Aufwand bezüglich Material und Vorbereitungszeit verbunden. Deutliche Vorteile bestehen in der Auswahl von Fibroblasten als Empfängerzellen der genetischen Modifikation gegenüber anderen Zellreihen. Fibroblasten sind relativ leicht zu kultivieren und zeigen eine erhebliche Widerstandsfähigkeit gegenüber den Einwirkungen der viralen Manipulation. Die hohen Transduktionsraten im Bereich zwischen 87,2% und 95,3% (Fig. 32) machen deutlich, dass an der Effizienz der angewandten Methode kein Zweifel besteht. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen. Eine Transduktionsrate an Fibroblasten von > 95% konnte Etzion et al. bei den Experimenten zu einem myokardialen Infarktmodell der Ratte nachweisen [Etzion 2002], Teramoto et al. berichtet über Effizienzen von 100% bei der Transduktion von Lungenfibroblasten mit dem lac-Z-Gen. [Teramoto 1997] Im Rahmen der adenoviralen Transduktion anderer Zellarten kommt es zu deutlichen Unterschieden. Marsman et al. gelang es, in einem Barrett-Ösophagus Rattenmodell eine maximale Transduktionsrate an Caco-2 Zellen (Zellkulturmodell für humane Enterozyten) von 18,6% zu erreichen [Marsman 2005], während Duale et al. bei der Transfektion von Rattenhirngewebe ein Transduktionsrate von 55% ±3% für Gliazellen und 38% ±5% für neuronale Zellen feststellen konnte. [Duale 2005] Auch die Transduktion von Myoblasten erreicht lediglich Raten bis zu 40%, wie die Arbeit von

Zatloukal et al. zeigt, die sich mit der Produktion von Faktor VIII nach adenoviraler Transduktion an Mäusezellen auseinandersetzt. [Zatloukal 1994]

Die gemessenen Transduktionsraten geben primär keine Auskunft über die Quantität der Proteinproduktion in vivo oder in vitro. Als gedankliche Konsequenz wäre diese Möglichkeit nicht auszuschließen, da gfp als koexprimiertes Protein auch beim therapeutisch verabreichten bicistronischen Vektor zum Tragen kommt. Es hat sich jedoch in Vergleichsmessungen gezeigt, dass Leuchtdichtemessungen im Mikroskop mit einer zu hohen Fehlerquote behaftet sind und bei wiederholten Messungen nicht zu befriedigenden gleichwertigen und wiederholbaren Ergebnissen führen. Der Vergleich der durch Fluoreszenz bestimmten Transduktionsraten mit ELISA-Messungen, die zur genaueren Bestimmung und Quantifizierung eines Zusammenhanges zwischen Leuchtdichtemessung und tatsächlicher Proteinproduktion durchgeführt wurden zeigt, dass Flaschen, die unter dem Mikroskop nur schwach fluoreszieren, sehr wohl eine starke Expression des gewünschten therapeutischen Proteins aufweisen. Aus diesem Grund wird die Messung der Transduktionsraten in dieser Arbeit zum Nachweis einer etwaigen Expression therapeutischen Proteins nur mit geringem statistischen Aussagewert herangezogen.

Die Ergebnisse der β-gal Gruppe zeigen, dass modifizierte Fibroblasten eine Woche nach der Implantation im Zielgewebe noch vital sind. Die entsprechenden Gewebestücke sind an den Stellen der Implantation deutlich blau gefärbt (x-gal-Färbung). Beachtenswert ist, dass es offensichtlich nicht zu einer nennenswerten Migration von implantierten Fibroblasten in angrenzendes Gewebe kommt. Vielmehr sind die implantierten Zellen stets im Bereich der Applikationsstellen zu finden. Die angrenzenden Bereiche zeigen keine entsprechende Farbreaktion. Ob diese Ergebnisse direkt übertragbar sind auf die Gruppen, denen PDGF-BB produzierende Zellen implantiert wurden, lässt sich letztlich nicht vollständig klären. Wie anhand dieser Arbeit gezeigt werden kann, ist die therapeutische Wirkung von PDGF auch immer mit einer massiven Gewebereorganisation im Sinne einer Migration verschiedenster Zellarten verbunden. Dies ist bei Einsatz des lac-Z-Gens nicht der Fall. Wahrscheinlich ist aber, dass im Rahmen der PDGF-Applikation die Emigration der injizierten Zellen eine zu vernachlässigende Rolle spielt, während der Immigration neuer Zellen eine besondere Bedeutung zukommt. Wichtig ist dieser Aspekt im Hinblick auf die lokale Wirkung von PDGF. Einer der Hauptaspekte dieser Arbeit ist es zu zeigen, dass allein die lokale Applikation von PDGF-produzierenden Zellen ausreicht, um an definierten Arealen

therapeutische Effekte zu erzielen, ohne den Gesamtorganismus einer Dauerbelastung an hohen Dosen einer pharmakologisch wirksamen Substanz auszusetzen. Unvermeidlich ist sicher die Tatsache, dass es im Laufe der Zeit zu einer Einschwemmung von PDGF in die Blutbahn kommt. Dabei ist allerdings anzunehmen, dass die entsprechenden Mengen gering sein müssen, denn die Gesamtverteilung im Organismus nach Eintritt in das Gefäßsystem, kombiniert mit der kurzen HWZ machen einen Anreicherungseffekt von PDGF unwahrscheinlich. Es kann angenommen werden, dass es nur im Bereich der Applikationsstellen zu einem ausreichenden Dosisplateau kommt, um charakteristische Effekte des PDGF möglich zu machen.

Die Menge des produzierten PDGF-BB lässt sich über die Daten der ELISA-Messungen bestimmen. In beiden ELISA-Ansätzen ist die Aussage über eine Charakteristik im Verhalten des Kurvenverlaufes erst ab einer MOI von 30 möglich. Die Ansätze mit geringerer MOI verhalten sich atypisch. Möglicherweise ist dies damit zu erklären, dass die in diesen Fällen gemessenen Werte derart niedrig sind und entsprechend nah an der Nachweisgrenze liegen (vom Hersteller ungenaue Angaben zwischen 4,0 - 19,3 pg/ml [Quantikine products]), so dass sie teilweise außerhalb des Toleranzbereiches des ELISA-Kits liegen. Im Bereich der höheren MOI zeigt sich jedoch ein steiler Anstieg des PDGF-Gehaltes, welcher sein Maximum in allen Ansätzen an Tag 3 erreicht, um anschließend asymptotisch abzufallen. Etwa eine Woche nach der Transduktion ist in keinem der Ansätze mehr eine nennenswerte Produktion von PDGF nachweisbar. Dies erfüllt eine der grundsätzlichen Zielsetzungen dieser Arbeit. Die Proteinexpression von PDGF-BB ist mit Hilfe des zellbasierten Gentransfers in Fibroblasten temporär und somit kontrollier- und steuerbar. Nach Ablauf einer bereits vor Versuchsbeginn bekannten Zeitdauer kann davon ausgegangen werden, dass es im Empfängerorganismus nicht mehr zu einer unkontrollierbaren Genexpression mit den befürchteten Langzeitfolgen einer Tumorgenese oder sonstiger Folgeschäden kommt. Dies ist ein entscheidender Punkt, den klinischen Einsatz und die Relevanz der vorliegenden Methode betreffend. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten feststellen, dass PDGF am Wachstum von Tumoren –wenn auch nicht unbedingt kausal, so doch zumindest adjuvant beteiligt ist. Der intrazerebrale Progress eines Glioblastoma multiforme ist beispielsweise abhängig von der Präsenz von PDGF-Liganden und deren Rezeptoren. Alle Isoformen von PDGF können bei dieser Erkrankung als wichtiger Kofaktor nachgewiesen werden. [Uhrbom 2000, Lokker 2002] Auch andere Tumorarten sind auf das Vorhandensein von PDGF angewiesen. Die Hemmung des Signalweges der Tyrosinkinase des PDGF-Rezeptor nach Implantation

humaner Mamma-Ca Zellen in die Tibia von Mäusen kann signifikant das Tumorwachstum eindämmen. [Lev 2005] Erhöhte Mengen an PDGF-B führen durch zunehmende Angiogenese zu einem Wachstumsprogress von Kolontumoren. [Hsu 1995] Auch in Dermatofibrosarkomen [Shimizu 1999], Neurofibromen [Kadono 2000], Osteoblastomen [Sulzbacher 2000] und Osteosarkomen [Allam 1992] kann eine Beteiligung von PDGF festgestellt werden. Die Kernaussage aller dieser Arbeiten ist jedoch, dass PDGF durch seine autonome Produktion in Tumoren und die damit zusammenhängende Angiogenese dazu in der Lage ist, Tumorwachstum lokal zu beschleunigen [Bergers 2003], eine Tumorgenese von PDGF selbst jedoch nicht auszugehen scheint. Allein Uhrbohm et al. zeigte, dass der Einsatz eines PDGF-B codierenden Retrovirus dazu in der Lage ist, Glioblastome zu erzeugen. Die Produktion des PDGF ist jedoch in der zitierten Arbeit, wie für retrovirale Transduktion charakteristisch, nicht auf einen Zeitraum von einer Woche beschränkt. Zudem lässt sich nicht eindeutig klären, ob das Tumorwachstum auf die Gensequenz der PDGF-B-Kette zurückzuführen ist oder vielmehr durch das modifizierte Retrovirus per se induziert wird. [Uhrbom 1998] Die Induktion von Tumoren durch den Einfluss von PDGF allein scheint unwahrscheinlich. Die Unterscheidung zwischen Induktion eines malignen Prozesses und Aufrechterhaltung der Progression eines selbigen ist im Hinblick auf die Bewertung der Qualität von PDGF als therapeutische Option von maßgeblicher Wichtigkeit. Bei allen Wachstumsfaktoren, die in die Progression von malignem Tumorwachstum involviert sind, handelt es sich um körpereigene Substanzen. Die Theorien zur Induktion maligner Prozesse gehen aus von einem Mehrstufenmodell unter Einbeziehung einer Vielzahl beteiligter Genloki, Genprodukte und äußerer einwirkender Faktoren. Bisher wurde jedoch kein Fall beschrieben, bei dem sicher davon auszugehen war, dass ein physiologischerweise vorkommendes körpereigenes Protein dazu geführt hat, ein Malignom hervorzurufen. Auch die Verabreichung von Adenoviren alleine konnte bisher nicht in Zusammenhang mit der Entstehung von Malignomen gebracht werden. Wie Versuche im Humanexperiment zeigen, können zwar Erhöhungen der Transaminasen, Entzündungsreaktionen, Antikörperbildung und transientes Fieber beobachtet werden, Tumorwachstum wird jedoch nicht nachgewiesen. [Ylä-Herttuala 2003] Die ersten Versuche mit neuen Generationen von replikationsdefizitären adeno-assoziierten Vektoren (rAAV) zeigen viel versprechende Ergebnisse und könnten eine neue Ära des Einsatzes von Adenoviren als gentherapeutische Trägermedien begründen. Ihr Vorteil liegt darin, dass bis zu 96% des Wildtyp-Genoms entfernt werden und lediglich die

Gensequenzen für die äußere Hülle und die Zellintegration belassen werden. Die Wahrscheinlichkeit der de novo-Synthese viraler Proteine und das damit verbundene Restrisiko einer Pathogenität gehen damit gegen null. [Tsai 2002]

4.2 Lappenmodell und Lappenüberleben

Ziel der Suche nach dem besten klinischen Erfolg des Einsatzes von Wachstumsfaktoren ist ein Modell, das den physiologischen Bedingungen der körpereigenen Ausschüttung dieser Substanzen möglichst nahe kommt. Es wird nicht gelingen, ein Modell unter vollständig physiologischen Bedingungen zu generieren, da die Applikation einer beliebigen exogenen Substanz immer einen unphysiologischen Vorgang darstellt. Es ist jedoch möglich, die bisher bekannten Kriterien der Produktion von Wachstumsfaktoren so weit es eben geht nachzuahmen. Der wichtigste bekannte Faktor ist die Wundheilung. Um einen angiogenetischen Reiz im Zusammenhang mit der Wundheilung in einem Modell zu kreieren, muss ein standardisierbares Verfahren (wie im Falle dieser Arbeit) vorliegen. Ein weiterer wichtiger Faktor schließt die zeitliche Dimension mit ein. Das nur relativ kurz wirksame PDGF-BB sollte, um unter relativen physiologischen Bedingungen effektiv werden zu können, über einen längeren Zeitraum im Gewebe freigesetzt werden. Die bisher beschriebenen Arbeiten mit implantierbaren Fremdkörpern, welche die gewünschte Substanz freisetzen, weisen diverse Nachteile auf: zum einen besteht immer der zusätzliche Reiz eines Fremdkörpers (Pellets aus diversen Materialien wie Kunststoffen oder synthetischen Matrizes (s.o.)), zum anderen wird das Protein per diffusionem aus dem Trägermedium freigesetzt. Dies resultiert in einer diskontinuierlichen exponentiellen Konzentrationskurve mit ihrem Maximum bei Implantation und einem stetigen Konzentrationsgefälle im Zielgewebe (Fig. 1). Die Situation der physiologischen Wundheilung weist jedoch andere Verhältnisse auf. Die Zellen, welche PDGF-BB freisetzen, müssen erst in das Wundgebiet gelangen. Dies geschieht nicht zum Zeitpunkt null der Wundentstehung sondern mit einer Latenzzeit von einigen Stunden bis Tagen, je nachdem um welche Zellart es sich handelt. Einige Nachteile der bisher angewandten Verfahren sind durch die Anwendung des in dieser Arbeit gezeigten Verfahrens umgangen worden. Durch die in vitro Transduktion von isogenen Zellen gelingt es, PDGF-BB vor Ort über einen im ELISA messbaren Zeitraum

produzieren zu lassen. Werden isogene Zellen, welche kein therapeutisches Protein produzieren, dem Gewebe zugefügt, so kommt es nicht zu einer Immunreaktion, wie durch Auswertung der Gruppen 3.I-III und 4.I-III gezeigt wird. Hier sind histologisch lediglich Zellkonglomerate diversen Ausmaßes zu beobachten, welche aus den Fibroblasten bestehen, die dem Gewebe zugeführt werden. In diesen Ansammlungen gleicher Zellen kommt es nicht zu einer nennenswerten Bildung von Kapillaren, vielmehr scheinen diese eher isoliert und werden als akzessorische Gewebebestandteile durch das umgebende Gewebe ernährt. Bei der Auswertung waren die Zellen vital und zeigten keine überzufällig häufigen Mitose- oder Apoptosezeichen.

Dem klinischen Erscheinungsbild des Überlebens von Lappenanteilen wird in dieser Arbeit die größte Bedeutung zugemessen. Verschiedenste Anforderungen müssen an das Design einer geeigneten Methode gestellt werden, um nachvollziehbares Gefäßwachstum in einer Ischämiesituation zu generieren. Es muss gewährleistet sein, dass die stattgehabte Angiogenese einen klinischen Effekt hat. In einem Ischämiemodell liegt nahe, dazu die Größe der zwangsläufig auftretenden Nekrosezone zu beurteilen. McFarlane kreierte bereits im Jahre 1965 ein diesen Anforderungen genügendes Modell. [McFarlane 1965] Mit dem 8x2 cm messenden fasziomyokutanen Lappen auf dem Rücken der Ratte wird eine Situation geschaffen, wie sie aus klinischer Sicht günstiger für Aussagen über die Beständigkeit und Qualität eines Gefäßnetzes nicht sein könnte. Die Schnittführung an dem Lappen führt dazu, dass sämtliche Gefäße, welche lateralen Ursprungs sind, durchtrennt werden. Der Lappen wird nun in seiner gesamten Ausdehnung ausschließlich von der Basis her randomisiert versorgt. Das gewollt ungünstige Verhältnis von Länge zu Basis (4:1) resultiert in einer großen Nekrosezone. Die Kontrolltiere, denen NaCl 0,9 % injiziert wird, entwickeln unter den gegebenen Umständen eine Nekrose in mehr als der Hälfte der gesamten Lappenfläche (Gr. 1.I Lappenüberleben 56,83% ±7,03). Fig. 40 zeigt den makroskopischen Aspekt einiger ausgewählter Lappen. Ein markantes Charakteristikum in der Unterscheidung zwischen PDGF-Gruppen und den Kontrollen ist die Tatsache, dass es bei letzteren zu der Ausbildung einer scharfen Nekrosezone kommt, während der Übergang von vitalem zu avitalem Gewebe bei den PDGF-Gruppen nicht immer eindeutig zu definieren ist. Es kommt hier zu der Ausbildung eines in seinem makroskopischen Aspekt der Nekrose ähnlichen Areales, das sich jedoch in seiner klinischen Charakteristik deutlich von dieser unterscheidet. Diese so genannte Intermediärzone kann dem Bereich des Vitalgewebes zugerechnet werden. Fortführende Experimente unserer Arbeitsgruppe belegen, dass sich die Intermediärzone nach weiteren

7 Tagen vollständig von der Ischämie erholt. An den distalen Lappengrenzen ist ein solches Phänomen nicht zu beobachten. Hier kommt es während der frühen Ischämiephase zu einem Absterben von Endothelzellen. In diesem Bereich distal der so genannten letzten Wiese führt nicht zuletzt eine Thrombosierung von Gefäßen dazu, dass diese nach der Akutsituation nicht mehr an das Gefäßnetz aus anderen Regionen anbinden können. Eine Verkleinerung des Nekrosebereiches ist nur möglich durch ein Verdichtung des Gefäßnetzes innerhalb der Lappenstruktur, und zwar auf venöser wie auf arterieller Seite, welches dazu in der Lage ist, in der akuten Ischämie zumindest einen Minimalstoffwechsel aufrecht zu erhalten. Nach der Akutsituation einwachsende Gefäße können zwar eine schnellere Revitalisierung und Wundheilung betroffener Areale ermöglichen, die einmal stattgefundene Nekrotisierung jedoch nicht mehr rückgängig machen. Die Verabreichung PDGF-BB modifizierter Fibroblasten während der Lappenoperation führt daher zu keiner signifikanten Verbesserung des Überlebens von Lappenanteilen (45,14% ±7,65 in Gruppe 5a und 48,87% ±7,71 in Gruppe 5b, jeweils Setting I). Eher kommt es zu einer Verringerung der Überlebenswahrscheinlichkeit des Gewebes bezogen auf den Gesamtlappen, was am wahrscheinlichsten mit zusätzlichem Stress auf das Gewebe durch die verlängerte Operationszeit und der Zufuhr von Zellmaterial zu erklären ist. Eine Erhöhung der Zellzahl im Gewebe während der frühen Ischämiesituation erhöht gleichermaßen die Sauerstoffausschöpfung in den kaudalen Anteilen des Lappens. Erst die Zellinjektion eine bzw. zwei Wochen vor der Lappenoperation bringt den gewünschten klinischen Effekt. Eine signifikante Vergrößerung vitaler Lappenanteile gelingt erst in Setting II (61,56% ±6,10 für Gruppe 5a und 71,59% ±5,0 für Gruppe 5b) und Setting III (65,92% ±10,61 für Gruppe 5a und 65,94% ± 4,61 für Gruppe 5b). Zwei mögliche Erklärungen liegen diesem Ergebnis zugrunde. Zum einen zeigt der Vergleich mit den Daten der ELISA-Messungen, dass der höchste Wert der Produktion von PDGF an Tag 3 erreicht wird. Bei Applikation der Zellen direkt nach deren Transduktion ist eine genügend hohe Gewebekonzentration an PDGF daher noch nicht zu erwarten. Der angiogenetische Effekt des PDGF kommt in dieser Situation erst 3 Tage nach Einsetzen der Ischämie zum Tragen. Die wichtige Phase der frühen Ischämie ist zu diesem Zeitpunkt längst überschritten und die Nekrotisierung zu weit fortgeschritten, als dass sie in diesem Modell zu revidieren wäre. Zum anderen wird selbst eine hohe Konzentration an PDGF ab dem Zeitpunkt des Ischämiebeginns keine Verkleinerung avitaler Gewebeareale zeigen. Das Design des Lappenmodelles kann nur einen positiven klinischen Effekt zulassen, bei zum Zeitpunkt der akuten Ischämie

bereits vorhandener Verdichtung der Gefäßstruktur (s.o.), welche einige Tage in Anspruch nimmt. Auch anderen Arbeitsgruppen gelang es zu zeigen, dass die Applikation von PDGF in einem Lappenmodell unter ischämischen Bedingungen (bzw. zu einem definierten Zeitpunkt vor Einsetzen der Ischämie) zu einer Steigerung der Lappenvitalität führt. So konnte Wang zeigen, dass nach der Verabreichung eines Plasmid Vektors, welcher die cDNA für PDGF enthält, eine signifikante Vergrößerung vitaler Hautlappenanteile im Vergleich zu den Kontrollen zu erreichen ist. [Wang 2006] Ähnliche gute Ergebnisse zeigte auch eine Arbeit von Hijjawi. PDGF-BB Plasmid-DNA wird, gebettet in eine Kollagen-Matrix, auf das Gewebe eines zu hebenden TRAM-Lappens der Ratte gebracht und kann das Lappenüberleben um 130% steigern. [Hijjawi 2004] Aber nicht nur Plasmid-DNA, auch die direkte Applikation von modifizierten Adenoviren zur PDGF-Produktion im Gewebe war Gegenstand weiterer Arbeiten. So verabreichte Gu direkt modifizierte Adenoviren, die zur PDGF-Produktion befähigten, in einem Hautwundenmodell des Kaninchens, und dokumentierte die Ausbildung und Beschaffenheit des sich anschließend entwickelnden Granulationsgewebes. Zwar konnte eine Beschleunigung und dichtere Ausprägung der Bildung des Granulationsgewebes beschrieben werden, ohne dass es zu einer signifikanten Immunreaktion des Empfängerorganismus kam oder etwa die Ausbildung von neoplastischen Veränderungen beobachtet werden konnte, letztlich bleibt jedoch unklar, inwieweit die vitalen Viren bei direkter Applikation langfristig mit dem Gewebe interagieren. [Gu 2004] Auch bei der Verabreichung anderer Wachstumsfaktoren kann die direkte Applikation von veränderten Adenoviren in das Gewebe zu einem klinischen Erfolg im Lappenmodell führen. An einem epigastrischen Hautlappenmodell der Ratte führte eben diese direkte Applikation von VEGF transduzierenden Adenoviren dazu, dass signifikant mehr Lappengewebe überlebte. Wieder bleibt allerdings die Frage unbeantwortet, mit welchen mittelbaren Auswirkungen die direkte Applikation vitaler Viren auf das Gewebe verbunden ist. [Gurunluoglu 2002] Mittels zellbasierten Gentransfers lassen sich zumindest die Einflüsse einer direkten Virenlast auf das Gewebe ausschalten.

Weitere Besonderheiten des PDGF können nicht allein, aber zusätzlich zur Erklärung des vermehrten Lappenüberlebens herangezogen werden. Kodama et al. konnten in einem in vitro Modell an isolierten Kapillaren nachweisen, dass es bei der chemisch induzierten Ischämie in diesem Modell (ATP-Inhibition durch Verabreichung von Iodoacetat und Antimycin) gelingt, nach Gabe von PDGF-BB eine signifikant höhere Anzahl von Zellen am Leben zu erhalten, als es in den Vergleichsgruppen der Fall ist. Dieser zellprotektive

Effekt des PDGF wird induziert durch eine Aktivation von K_{ATP}-Kanälen und die Blockade spannungsabhängiger Kalzium-Kanäle [Kodama 2001], sowie die Stabilisierung und DNA-Bindung des antiapoptotisch wirkenden Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktors-α (HIF-α). [Zhang 2003] Eine weitere zytoprotektive Besonderheit des PDGF, die nicht abhängig von der angiogenetischen Potenz ist, konnte in einer Arbeit von Zheng nachgewiesen werden. Nach der Applikation von rekombinantem PDGF in das Myokard von Ratten einen Tag vor der Ligatur der LAD (left anterior descending artery) zeigten EKG und Echokardiographie sowie die körperliche Leistungsfähigkeit der Tiere eine deutliche Verbesserung des klinischen Aspektes im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Diese single-shot Dosierung des PDGF führt über einen – möglicherweise auch durch die oben beschriebenen Mechanismen herbeigeführten- cardioprotektiven Effekt zu einer Schonung myokardialen Gewebes. Ein signifikantes Wachstum von Gefäßen konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. [Zheng 2004] Der therapeutische Effekt genetisch modifizierter Fibroblasten ist also an eine Korrelation zwischen Ischämiebeginn und Applikation der genetisch modifizierten Fibroblasten gekoppelt. Wie alle Stoffwechselvorgänge, Reaktionen und Kreisläufe braucht auch das Wachstum von Gefäßen, die Formation neuer Zellen und die Reorganisation eines (im Verhältnis zum Gesamtkörper) großen Gewebeareals seine entsprechende Zeit. Diese ist in Setting I nicht gegeben. Hier fallen Ischämiebeginn und angiogenetischer Reiz zeitlich zusammen. Die Verabreichung angiogenetischer Substanzen macht offenbar nur dann Sinn, wenn diese früher wirken, als eine einsetzende Ischämie das Gewebe zerstört. Das zeitliche Fenster ist also sehr eng und es ist fraglich, ob zum heutigen Zeitpunkt Substanzen bekannt sind, die innerhalb kürzester Zeit eine solch effektive Angiogenese bewirken können. Der angesprochene Zeitraum ist bei verschiedenen Gewebearten unterschiedlich lang, jedoch nicht länger als einige Stunden, bevor eine irreversible ischämische Schädigung einsetzt. Innerhalb dieser wenigen Stunden müsste also nach Applikation einer angiogenetisch wirksamen Substanz die Angiogenese abgeschlossen oder zumindest weit fortgeschritten sein, um einer gleichzeitig beginnenden Ischämie entgegenzuwirken. Dies scheint vom heutigen Standpunkt aus nicht möglich. Denkbar ist eine anders ablaufende Reorganisation ischämischen Gewebes, das zu Ischämiebeginn mit PDGF-BB behandelt wurde. In dieser Arbeit kann dieser Effekt jedoch nicht überprüft werden, da die Tiere am siebten Tag nach der Lappenhebung bereits euthanasiert werden, der Beobachtungszeitraum für diese Art der Fragestellung also zu kurz ist. Die Anwendung dieses Modells in einer Akutsituation, wie sie z.B. im Rahmen

eines Traumas oder eines Infarktes gegeben ist, sollte demnach kritisch bewertet werden, wie auch eine Arbeit von Edelberg zeigt. In einem Infarktmodell an Rattenherzen konnte nach der Gabe von PDGF-AB bei der Verabreichung zu einem Zeitpunkt vor der Ligatur der LAD eine Verkleinerung des Infarktareales auf 10,0% ±7 im Vergleich zu den Kontrollen (17,6 ±5,6) erreicht werden. Eine Verabreichung zu demselben Zeitpunkt wie die Ligatur des Gefäßes zeigte keinen positiven Effekt (15,7% ±3,1). [Edelberg 2001]
Machens et al. konnten an einem epigastrischen Lappenmodell der Ratte zeigen, dass auch PDGF-AA einen angiogenetischen Effekt aufweist. Im Bereich der Bauchhaut wurde nach Durchtrennung eines Teiles der dieses Areal versorgenden epigastrischen Gefäße ein 7x7 cm messender ischämischer myofasziokutaner Lappen kreiert und Fibroblasten nach retroviraler Transduktion appliziert. Die Auswertung 7 Tage postoperativ zeigt, dass im Vergleich zu den Kontrollen signifikant mehr Gewebe überlebt, wenn PDGF-AA produzierende Zellen verabreicht werden. Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit stellte Machens fest, dass der klinische Effekt größer ist, wenn die Zellen zum Zeitpunkt der Lappenoperation injiziert werden. Die Applikation eine Woche präoperativ führte zwar zu geringer ausgeprägten klinischen Ergebnissen, konnte jedoch als einzige signifikante histologische und immunhistochemische Beweise für gesteigerte Angiogenese liefern. Das Gefäßversorgungssystem für das Lappengewebe folgte jedoch einer anderen Anatomie als in den hier durchgeführten Experimenten. Die epigastrischen Lappen haben ein Verbindungssystem, welches komplett auch nur von einer einzelnen Arterie (anstatt von vier) gespeist werden kann. Der Perfusionsdruck ist jedoch bei Erhalt nur einer einzelnen Arterie nicht ausreichend, was zu der Ausbildung von Ischämien und Gewebenekrosen führt. [Machens 2002] Vergleichbare Ergebnisse zu der vorliegenden Arbeit zeigen die Daten von Brown, wenn auch in einem anderen Lappenmodell. An Ratten wurde bilateral ein ventraler, durch die epigastrischen Gefäße versorgter Inselhautlappen (3x6 cm) gehoben. In das Wundbett wurde eine mit rekombinantem PDGF-BB getränkte Kollagenmatrix gelegt, welche kontinuierlich PDGF freigab. An verschiedenen Tagen erfolgte die Okklusion der ernährenden Gefäße und die Auswirkungen auf das Lappenüberleben wurden untersucht. Bei bereits während der Lappenoperation verschlossenen Gefäßen, sowie bei Verschluss an den postoperativen Tagen eins und zwei zeigte sich keine Veränderung im Lappenüberleben, verglichen mit den Kontrollen. Erst ab dem dritten postoperativen Tag wurde eine Verkleinerung der Nekrosezone beobachtet. Drei Wochen postoperativ bildeten sich im Bereich der okkludierten Arterie zahlreiche Kollateralen. Zusätzlich wird über das Entstehen von

Parallelgefäßen berichtet, die ein zu der ursprünglichen Arterie vergleichbares Lumen aufwiesen. [Brown 1995] Wie in der vorliegenden Arbeit wird jedoch ersichtlich, dass die Angiogenese einer Vorlaufzeit von einigen Tagen bedarf, um klinisch relevant in Erscheinung treten zu können. Im frühen Stadium der Ischämie konnte kein positiver Effekt von PDGF-BB auf das Überleben größerer Anteile im Ischämiemodell demonstriert werden.

Viel versprechend im Hinblick auf das Überleben von Gewebe im ischämischen Lappenmodell sind die Ergebnisse einer Arbeit von Cao et al. In einem hind-limb Modell (Ligatur der Arteria femoralis) an Ratten und Kaninchen konnte gezeigt werden, dass eine Kombination von PDGF-BB und FGF-2 (fibroblast growth factor) signifikant mehr Gefäßwachstum stimuliert als eine Monotherapie. Zu erwähnen ist auch die Tatsache, dass es unter der Kombinationstherapie vor allem zur Bildung von Gefäßen relativ großer Lumina (> 700 µm²) kam. Bei der Verabreichung nur eines Wachstumsfaktors war die Angiogenese vor allem kleinerer Gefäße (< 400µm²) zu beobachten. [Cao 2003] Im Unterschied zu dem Modell des McFarlane Lappens liegt bei dem hind-limb Modell kein random pattern flap vor. In diesem weitaus größeren Ischämieareal ist die gesamte untere Extremität angewiesen auf die Existenz großer versorgender Gefäße oder der Ausbildung suffizienter Kollateralen, die zusätzlich zu den ohnehin vorhandenen definierten Kollateralgefässen entstehen. Es kommt also bei der Unterbindung eines großen Gefäßes zwar zu einer ausgeprägten Ischämie, zumindest für den proximalen Femurabschnitt wird jedoch eine komplette Unterbrechung der Blutzufuhr schon durch die physiologische makroskopische Gefäßarchitektur verhindert. Im McFarlane Lappen werden die zuführenden Gefäße des lateralen Schnittrandes sämtlich durchtrennt und stehen in der akuten Ischämiesituation der Aufrechterhaltung der Zirkulation nicht zur Verfügung. Lediglich die Dichte des gesamten Kapillarnetzes innerhalb der Lappenstruktur spielt hier die entscheidende Rolle über die Größe der Nekrosezone. Bei der engeren Vernetzung kleinster Gefäße im random pattern flap scheint die Größe des Lumens keine entscheidende Rolle zu spielen, denn im Gegensatz zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Cao konnte in der vorliegenden Arbeit sehr wohl ein suffizienter klinischer Effekt der Monotherapie im Ischämiemodell nachgewiesen werden. Zu dem kombinatorischen Einsatz mehrerer Wachstumsfaktoren gleichzeitig liegen jedoch insgesamt widersprüchliche Daten vor. Eine Studie am Infarktmodell von Rattenherzen führte zu dem Ergebnis, dass die kombinierte intramyokardiale Gabe von PDGF-BB und bFGF (basic fibroblast growth factor) zu einer deutlichen Steigerung des Überlebens

myokardialen Gewebes führt, verglichen mit den Vergleichsgruppen, die entweder PDGF, oder bFGF oder Placebo erhielten. [Hao 2004]

Ein anderes Modell, das es erlaubt, Angiogenese direkt sichtbar zu machen, ist die Verwendung der Chorioallantois-Membran von Hühnerembryonen. Hier wird ein befruchtetes Hühnerei so präpariert, dass eine Direktsicht auf die unter der Schale gelegene Eihaut sichtbar wird. Die Verabreichung von Wachstumsfaktoren kann direkt auf diese Haut geschehen, in der unter Durchleuchtung die einzelnen Gefäße sehr deutlich erkennbar sind. Kommt es zu einer Angiogenese, können Gefäße in der Aufsicht direkt gezählt werden. DeMarchis demonstrierte, dass in diesem Modell die gleichzeitige Gabe von PDGF-BB und bFGF die Einzelwirkungen inhibiert, eine kombinatorische Gabe also keinen besseren Effekt zeigt sondern zu einer Verschlechterung des Resultates führt. [DeMarchis 2002] Auch in vitro konnte eine direkte und spezifische Interaktion von PDGF-BB mit bFGF nachgewiesen werden. [Russo 2002] Dass an dem komplexen Mechanismus der PDGF-Wirkung auch andere Wachstumsfaktoren beteiligt sind, zeigte Petersen et al.. In einem in vitro Modell an Tenozyten von Rattensehnen wurde eine erhöhte Ausschüttung von VEGF nach Stimulation der Zellkultur mit PDGF nachgewiesen. [Petersen 2003] Inwieweit die zeitliche Abfolge und die jeweilige Konzentration des Auftretens verschiedener Wachstumsfaktoren bei einem Angiogeneseprozess eine Rolle spielt bleibt noch zu klären.

Die Betrachtung der Ergebnisse der Mikroangiographie (Fig. 54) und der PECAM-Färbung für Endothelzellen (Fig. 42) zeigt ein zueinander analoges Bild. Bei den PDGF-Tieren der Gruppen 5a.II und 5b.II sowie 5a.III und 5b.III ist zu erkennen, dass es zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl der mm Gefäße pro cm² Gewebe, bzw. zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl an angeschnittenen Kapillaren pro mm² (s.u., jeweils im Vergleich zu den Kontrollgruppen) kommt. In Setting I ist für die Mikroangiographie zu beachten, dass es hier zwar zu einem signifikanten Anstieg der kleinsten Blutgefäße kommt, der klinische Effekt, der bei diesem Ergebnis zu erwarten wäre, jedoch ausbleibt. Wie bereits oben erwähnt, findet das Gefäßwachstum in diesen Gruppen zu einem Zeitpunkt statt, da das klinische Outcome nicht mehr zu beeinflussen ist.

Die Auswertungsmodalität der mikroangiographischen Ergebnisse in Form der Angabe von mm Gefäße / cm² Gewebe ist nur eine von mehreren Darstellungsmöglichkeiten. Auf die Darstellung der Gefäßanteile mit der Pixelmethode, wie sie bei der Planimetrie der Lappen erfolgt, wird hier verzichtet. Erstere kann die kontrastierten Gefäße im digitalen Bild von dem Rest des Gewebes unterscheiden und macht eine Angabe in Prozentanteil

der Gefäße an der Gesamtlappenfläche. Entscheidend bei der Auswahl einer der Methoden ist die Frage, welche die Ergebnisse am wenigsten verzerrt wiedergibt. Kommt es im Gefäßbett zu einer Extravasation von Kontrastmittel, so hat die Pixelmethode erhebliche Nachteile, da sie fälschlicherweise das Extravasat dem Gefäßnetz zurechnet. Extravasation als Merkmal erhöhter Gefäßfragilität ist gehäuft in den PDGF-Gruppen zu beobachten. Die Vermutung liegt nahe, dass eine Erhöhung der Anzahl an formierten Endothelzellen nicht ausreicht, um eine genügende Stabilität der Gefäßwände zu erreichen. Das komplizierte Zusammenspiel zwischen Endothel, Basallamina und stützendem Perizytengerüst ist 14 Tage nach Zellapplikation noch nicht vollständig ausgereift. [Jain 2003] Die nach diesen Beobachtungen mögliche Annahme, dass eine Einwirkung von PDGF auf das Gewebe die Gefäße eher schädigt als eine Angiogenese zu induzieren, wird durch unsere klinischen Ergebnisse sowie durch eine Arbeit von Cleaver entkräftigt. In der Zusammenfassung von Ergebnissen mehrerer Arbeitsgruppen kann sogar im Gegensatz geschlossen werden, dass PDGF als erster potenter Mediator für die Chemotaxis an Gefäßwandzellen überhaupt in Frage kommt. [Cleaver 2003] Käme es zu einer vermehrten Ausbildung sehr großer Gefäße (> 1mm), so unterschätzt die Methode der Quantifizierung in Gefäßstrecke pro Flächeneinheit die Bedeutung dieser Muttergefäße (Arteriogenese). Dieses Phänomen ist jedoch nicht zu beobachten. Vielmehr kommt es insgesamt zu einer stärkeren Vernetzung im Bereich kleinster Gefäße. Die neu entstandenen Kapillaren knüpfen an bereits bestehende Gefäße an und führen zu einer Verdichtung der kapillären Grundstruktur. Auffallend dabei ist, dass es hierbei oft zu einer Formation der neuen Gefäße in Richtung der ischämischen Zone kommt. Die Angiogenese scheint nicht wahllos und ungerichtet stattzufinden, sondern ist sichtbar darauf ausgerichtet, sich in einer bestimmten Richtung zu vollziehen. Das Kapillarbett sollte nicht als statische Struktur verstanden werden (auch wenn durch Abbildungen, die nur eine Momentaufnahme darstellen, dieser Eindruck erweckt werden kann), sondern ist eine äußerst dynamisches Struktur, die sich ändernden Verhältnissen anpassen kann. Endothelzellen sind fragile Zellen, deren Spezialisierung vor allem darin besteht, nicht kollabierende tubuläre Strukturen zu bilden, um Blutfluss möglich zu machen. Bei Triggerung durch ein entsprechendes Signal sind sie jedoch dazu in der Lage, innerhalb kürzester Zeit zu proliferieren und koordiniert in gerichteter Art und Weise auszusprossen. [Carmeliet 2003] PDGF ist auch imstande, die durchschnittliche Migrationsdistanz von Zellen zu erhöhen. In einem in vitro Modell kam es nach der Abrasion des Teils einer Zellkultur zu der Vergrößerung der Distanz, die von den Zellen

pro Zeiteinheit zurückgelegt wurde, also zu einer Erhöhung der durchschnittlichen Migrationsgeschwindigkeit. [Thommen 1997]

In Setting II und III ist in den Gruppen 5a und 5b eine Steigerung der Dichte des Kapillarbettes um etwa das 4-5fache im Vergleich zu den Gruppen 1-3.II und 1-3.III zu beobachten (Gr. 5a.II 42 mm/cm², 5b.II 48 mm/cm² zu im Vergleich 6, 9 und 15 mm/cm² der Gruppen 1-3.II; Gr. 5a.III 45 mm/cm², Gr. 5b.III 51 mm/cm² zu im Vergleich 8, 6 und 12 mm/cm² der Gruppen 1-3.III). Davon ausgenommen sind die Tiere der Gruppen 4, die gfp-modifizierte Zellen erhalten. Diese unterscheiden sich durch eine ungewöhnlich hohe Gefäßdichte (Gr. 4.II 25 mm/cm², Gr. 4.III 27 mm/cm²) von den anderen Vergleichsgruppen. In Setting I ist eine Steigerung der Dichte des Kapillarbettes der PDGF-BB-Gruppen (Gr. 5a.I 33 mm/cm², Gr. 5b.I 36 mm/cm²) nur um das 3-3,5fache der Kontrollgruppen (5, 10 und 11 mm/cm² in den Gruppen 1-3.I) möglich. Dieses Ergebnis ist immer noch statistisch signifikant, erreicht jedoch nicht das Niveau von Setting II und III. Trotz der Verdichtung des Kapillarnetzes zum Zeitpunkt der Auswertung kommt es in den entsprechenden Gruppen nicht zu einer Verbesserung des klinischen Ergebnisses. Auch hier muss davon ausgegangen werden, dass die Angiogenese zu einem Zeitpunkt einsetzt, den zwar die Auswertung erfasst, da sie eine Woche nach Applikation PDGF-modifizierter Zellen stattfindet, der jedoch zu spät für die entscheidende Phase der frühen Ischämie einsetzt. Durch die zusätzliche Injektion von Zellen in den Wundrand außerhalb des Lappengewebes, wie sie in den Gruppen 5b.I-III vorgenommen wird, ist insgesamt von einer verbesserten Rekonnektierung an neu gebildete Blutgefässe des Lappenrandes auszugehen. Von der Lappenseite her ist ein solcher Vorgang auch denkbar, das Gewebe wird allerdings während der Ischämie so stark geschädigt, dass die Dichte des Kapillarnetzes und der Blutfluss im Gewebe nicht ausreichen, um weit entfernte Strukturen wie den distalen Lappenrand dauerhaft vor der Nekrotisierung zu schützen. Die Kapillardichte hat sich zwar auch außerhalb des Lappenareales erhöht, weitaus limitierender für eine Vergrößerung des Vitalareales scheinen allerdings die im Lappen vorhandenen Bedingungen zu sein, daher die Ähnlichkeit der Ergebnisse der Gruppen 5a.II-III und 5b.II-III. Grundsätzlich zu bedenken ist, dass das Überleben zusätzlicher Lappenanteile immer stark abhängig ist von der Gesamtbeschaffenheit des Lappens, vor allem von der Gefäßstruktur proximal der Nekrose. Je weiter distal der Rand der Nekrosezone gelegen ist, desto dichter muss das Gefäßsystem des Gesamtlappens beschaffen sein, da nicht nur der Nekroserand, sondern auch das gesamte Gewebe proximal dieser Grenze versorgt werden muss. Das Architekturprinzip des Lappens

erlaubt es nicht, dass in der Initialphase der Ischämie eine Versorgung des Lappens aus dessen Marginalbereich stattfinden kann. Sämtliche vitale Lappenanteile müssen von der Basis des Lappens her ernährt werden, seien dies 41% (Gr. 3.I) oder 72% (Gr. 5b.II) des Gesamtlappens. Dies ist bei der Berücksichtigung des klinischen Ergebnisses unbedingt zu beachten und ein zentraler Aspekt dieses Modells. Ein Zugewinn an Lappenüberleben bereits um wenige Prozent ist somit als großer Erfolg zu werten. Nicht nur die längeren Versorgungswege, sondern auch arterio-venöse Shunts, wie sie auf kapillärer Ebene gehäuft vorkommen, die Ausschöpfung des Sauerstoff- und Nährstoffangebotes auf dem Weg der verlängerten vitalen Lappenanteile und das veränderte Druckverhältnis zwischen Intra- und Extravasalraum in den distalen Lappenbereichen müssen für die Erklärung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Während die immunhistochemische Auswertung der Kontrollgruppen 1-4 aller Settings relativ gleich verteilte Werte zwischen 7 und 15 Kapillaren/mm² ergibt, zeigen die PDGF-BB-Gruppen deutlich höhere Werte. So sind die Werte in Setting II (5a.II 28/mm², 5b.II 37/mm²) um fast das 3fache und die Werte in Setting III (5a.III 39/mm², 5b.III 45/mm²) um fast das 4fache erhöht. Nicht so deutlich erhöht ist das Ergebnis in Setting I (5a.I 15/mm², 5b.I 21/mm²). Auch diese Beobachtung kann in Einklang gesetzt werden mit dem klinischen Ergebnis.

4.3 Pseudotumoren

Zwar finden sich in der Literatur zahlreiche Hinweise darauf, dass PDGF einen chemotaktischen Reiz auf inflammatorische Zellen ausübt [Wahl 1989], eine lokale Ansammlung in Form von PT (Pseudotumoren) wurde bisher jedoch nicht beschrieben. Der Begriff des PT wurde 1973 geprägt von Bahadori. Per definitionem ergibt sich das histologische Bild eines dermalen knotenförmigen Infiltrates mit Lymphozyten, Plasmazellen und reaktiven Keimzentren sowie vereinzelt eosinophilen und neutrophilen Granulozyten mit der Tendenz zur Fibrosierung. [Bahadori 1973] Die in diesem Modell nach der Applikation von PDGF-BB obligat auftretenden PT sind eng gekoppelt an die Präsenz polymorphonukleärer Zellen und enthalten zahlreiche Fibroblasten. Offensichtlich ist die Entstehung der PT nicht abhängig von einer Ischämiesituation, wie

die Ergebnisse der Gruppe 5a.LZ zeigen. Hier kann –im Unterschied zu den anderen Langzeitgruppen- das Auftreten von PT beobachtet werden und zwar unabhängig von einer Ischämiesituation. Wichtig ist in diesem Zusammenhang eine Differenzierung zwischen unspezifischem Entzündungsreiz und spezifischer PDGF-BB-abhängiger Reaktion des Gewebes bei der Entstehung der Pseudotumoren und der Neovaskularisation. Bei der Verabreichung adenoviraler Vektoren, die nur das lac-Z-Gen enthalten (Gr. 6.LZ), kommt es zu einer weit weniger stark ausgeprägten Entzündungsreaktion im Vergleich zu der, bei der auch PDGF im Genom des Virus enthalten sind. Adenoviral modifizierte Zellen können demnach zwar eine leichte Entzündungsreaktion auslösen, diese ist jedoch als schwächer zu beurteilen als in einem Zusammenhang mit PDGF. Zu der Entstehung von Pseudotumoren reicht der unspezifische Reiz des Leervektors oder die Gabe von nicht modifizierten Zellen nicht aus. Ähnlich stellt sich dieser Sachverhalt in einem Vergleich der Gruppen dar, bei denen die Tiere einer Lappenoperation unterzogen werden. Polymorphonukleäre Zellen sind in den Gruppen 5a und 5b von Setting I und –stärker ausgeprägt- Setting II in signifikant höherem Maße vorhanden als in allen anderen Gruppen (Fig. 43). Zum Zeitpunkt der Auswertung in Setting III kann keine Erhöhung der Anzahl inflammatorischer Zellen im Lappengewebe mehr festgestellt werden. Auch PT kommen in diesem Setting dann nicht mehr vor. In der ersten Woche nach Injektion der modifizierten Zellen ist das Auftreten von PT jedoch sehr wohl zu beobachten. Diese wölben das Lappengewebe sichtbar hervor, sind von außen tastbar und können somit quantifiziert werden (Fig. 50). Insgesamt scheint ein direkter zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten der PT im Gewebe und der Produktion von PDGF zu bestehen. In Fig. 50 werden zwei verschiedene Datentypen in einer gemeinsamen Graphik übereinander gelegt, um diese Beziehung deutlich zu machen. Während das dargestellte ELISA-Ergebnis beispielhaft die Chronologie der PDGF Produktion zeigt, assoziiert der Kurvenverlauf des Auftretens der PT die zeitlichen Parallelen. Etwa zwei Tage nach dem höchsten ELISA-Wert ist auch die größte PT-Anzahl im Gewebe festzustellen. Bemerkenswert hierbei ist, dass nicht nur in dem Erscheinen, sondern auch in dem Verschwinden der PT ein direkter zeitlicher Zusammenhang zu finden ist. Sämtliche PT waren vollständig reversibel. Der erhöhte Gewebegehalt an inflammatorischen Zellen in Setting III weist zu einem Zeitpunkt, da die PT bereits nicht mehr nachweisbar waren darauf hin, dass zwar diese lokale Ansammlung polymorphonukleärer Zellen nicht mehr beobachtet werden kann, jedoch der Gewebegehalt an diesen Zellen noch nicht vollständig den Ausgangsverhältnissen

angepasst ist. Das Gewebe ist dabei, eine restitutio ad integrum –zumindest was den Gehalt an PMN Zellen angeht- zu vollziehen. Über den Grund des hier erstmalig beschriebenen Auftretens von PT kann an Hand der erbrachten Ergebnisse ein klare Hypothese formuliert werden: am ehesten ist das temporäre Auftreten der PT demnach auf die chemotaktischen Eigenschaften von PDGF-BB für PMN Zellen zu erklären. Auch Arbeitsgruppen, die wesentlich höhere Konzentrationen an PDGF verwendeten, konnten einen solchen Effekt jedoch nicht dokumentieren. Möglicherweise deshalb, weil solche Untersuchungen bisher nicht im Focus bisheriger Arbeiten standen. Affleck beschreibt die Applikation von rekombinantem PDGF-BB in das Myokard von Kaninchen, um eine Veränderung der anschließenden Konzentration und des Subtypmusters an VEGF festzustellen, ohne das Auftreten von PT festgestellt zu haben. Die verwendeten Konzentrationen an PDGF-BB lagen hier bei 50 ng/ml, also etwa 1000fach höher als in der vorliegenden Arbeit. [Affleck 2002] Wesentlich höhere Konzentrationen verwendete Hao in seiner Arbeit über angiogenetische Effekte von PDGF-BB im Myokardinfarktmodell an Ratten. Hier wurde, selbst bei der Applikation von Plasmiden in einer Konzentration von 20µg (10^6 fach höhere Konzentration) das Auftreten von PT nicht beschrieben. [Hao 2004] Die direkte Applikation von humanem Adenovirus Typ 5 Vektor in das Striatum von Ratten hatte in Untersuchungen von Byrnes et al. an den Applikationsstellen eine massive Entzündungsreaktion zur Folge. Maßgeblich anteilig waren hier Makrophagen und T-Zellen. Der Großteil der Entzündungsreaktion ging von Viruspartikeln per se aus. Der intraneuronale Transport von Viren und Viruspartikeln zu Hirnbereichen, die weit von dem Applikationsort entlegen waren (Substantia nigra) führte zu einer weitaus schwächeren Reaktion. Hier waren keine Viruspartikel im Gewebe nachweisbar und lediglich Proteine, die der viralen Produktion zuzuordnen sind, konnten für diese Reaktion verantwortlich sein. [Byrnes 1995] Ähnlich verhält es sich bei den vorliegenden Ergebnissen des zellbasierten Gentransfermodelles. Zwar ist eine inflammatorische Reaktion hier vorhanden, diese ist jedoch lokal beschränkt und vollständig reversibel, da davon auszugehen ist, dass das Zielgewebe nicht in direkten Kontakt mit dem Virus oder viralen Partikeln kommt. Weder alleine die Tatsache, modifizierte Zellen in das Gewebe eingebracht zu haben (lac-Z-transduzierte Fibroblasten der Gruppe 6.LZ), noch das alleinige Vorhandensein von isogenen Fibroblasten (nicht-modifizierte Fibroblasten der Gruppe 3.LZ) kann also die Entstehung der PT als lokale Reaktion erklären. Vielmehr scheint nur die Kombination aus verwendetem Vektor und

PDGF den entscheidenden Reiz auf das Gewebe ausüben zu können, mit der Entstehung von PT auf die Gewebestimulation zu reagieren.

Die systemische Verabreichung von Adenoviren hat auch eine systemische Reaktion des Organismus zur Antwort. Nach der intravenösen Injektion von Adenoviren, die β-Galaktosidase von Escherichia Coli exprimieren, kam es im Mäusemodell innerhalb von 6 Stunden zur Ausschüttung von IL-6, IL-12 und Tumornekrosefaktor-α (TNF-α). Als Ort der stärksten Reaktion des Organismus auf die virale Infektion konnte die Milz identifiziert werden. Vor allem Gewebsmakrophagen und dendritische Zellen spielten bei der Auslösung einer spezifischen Abwehrreaktion die entscheidende Rolle. PT wurden auch hier nicht beobachtet. [Zhang 2001] Ob sich die systemische Injektion von Viren als therapeutische Option durchsetzen wird, bleibt daher fraglich. In einer Studie am Menschen konnte Harvey zeigen, dass die individuelle Reaktion auf eine adenovirale Provokation des Organismus sehr unterschiedlich ausfällt. 15 Patienten mit cystischer Fibrose wurden inhalativ Adenoviren verabreicht, die für das gesunde Gen des CF Transmembranregulatorproteins codierten. 5 Patienten mit metastasiertem Colon-Ca wurden Adenoviren, die das Escherichia Coli Cytosin Desaminase Gen exprimierten, direkt in Lebermetastasen injiziert und 11 Patienten mit ischämischer Myopathie erhielten VEGF exprimierende Adenoviren direkt intramyokardial. Bei Patienten, die bereits vor der Applikation der Adenoviren einen hohen Anti-Ad Antikörper-Titer hatten, kam es zu einer weitaus stärkeren Steigerung der Titerlevel als bei Individuen, die bereits vorher niedrige Titer aufwiesen. Dieser Effekt war nicht abhängig von der Gesamtzahl der verabreichten Viren, sondern scheint ein individueller Prozess zu sein. [Harvey 1999] Dies zeigt, wie kritisch der Einsatz von Viren sein kann, wenn er einen direkten Kontakt zu dem Organismus eingeht (s. dazu auch Kap. 4.1). Trotz Modifikation der Viren in apathogene Stämme, bleibt bei einigen Individuen eine starke Immunreaktion immer vorhanden. Dies kann zum einen das therapeutische Ergebnis verfälschen, zum anderen auch eine Gefahr für den jeweiligen Betroffenen darstellen. Bei dem Einsatz von Viren als Trägermedien für genetische Modifikation in vivo muss eine solche Möglichkeit immer in Betracht gezogen werden! Ein solches Modell wurde aus diesen Gründen in der vorliegenden Arbeit nicht gewählt.

Die Tatsache, dass bei den Tieren der Gruppen 5a und 5b als einzigen das Auftreten der Pseudotumoren beobachtet werden kann, lässt auf Zusammenhänge zum Wirkmechanismus von PDGF schließen. Offensichtlich übt PDGF-BB einen stark chemotaktischen Reiz auf umgebendes Gewebe aus. Die Zellen, die durch diese Art der

Rekrutierung gehäuft zu beobachten sind, sind neutrophile Granulozyten und Makrophagen, aber auch Fibroblasten. [Waller 2004] Während der Wundheilung sind diese maßgeblich an der Gewebeorganisation und der Ausschüttung von Interleukinen, Zytokinen und anderer Faktoren beteiligt. In unserem Modell lässt sich derselbe Effekt nachweisen. Zusätzlich kommt es zu einer Rekrutierung von Endothelzellen, Perizyten und glatten Muskelzellen. Dass dieser Effekt nicht nur mit einer Rekrutierung dieser Zellen aus einem bereits vorhanden Pool zu begründen ist, sondern offenbar auch mit einer gesteigerten Proliferation einhergeht, konnte bereits Hellström zeigen. In einem Modell an Mäuseembryonen, die homozygot PDGF-$\beta^{-/-}$ deletär gezüchtet wurden, konnte festgestellt werden, dass ein suffizientes Gefäßwachstum nicht stattfindet. Es kommt zu der Ausbildung stark dilatierter Gefäße, denen ein stabilisierendes Perizytengerüst fehlt. [Hellström 1999] PDGF-BB als Wachstumsfaktor im Rahmen einer Monotherapie zugeführt, führt über bisher nicht bekannte Zwischenprodukte oder selbst (über Stimulation der PDGFR-β Rezeptoren [Yu 2001]) dazu, dass gewebeferne Zellen in das Zielgewebe einwandern und offensichtlich zu der Initiierung einer Kette von Stoffwechselvorgängen führt, in deren Abfolge ein wichtiges Bindeglied die PMN-Zellen zu sein scheinen. Inwieweit andere bekannte Wachstumsfaktoren, andere Proteine oder Hormone an diesem Prozess beteiligt sind, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Klar wird jedoch, dass PDGF-BB nicht nur direkt, d.h. über die chemotaktische Zellrekrutierung, sondern ebenso indirekt über Zwischenschritte oder Regelkreisläufe wirkt. Zahlreiche Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass eine massive Einwirkung von Wachstumsfaktoren zur Tumorentstehung führen kann. In den Tieren der Langzeitgruppe konnte dies bis zu einem Zeitraum von 150 Tagen bei den entsprechenden Tieren in diesem Modell ausgeschlossen werden. In keinem der Tiere kommt es, weder lokal an den Applikationsstellen, noch an anderen Stellen des Körpers zu dem Auftreten von Malignomen.

Die Grenzen des angewandten Verfahrens sind sicher in der nicht vollständig verstandenen komplexen Wirkweise der Wachstumsfaktoren zu suchen. Nicht alle Zwischenprodukte, Nebenprodukte und einwirkenden Faktoren sind bekannt, um die optimalen Therapieoptionen bestimmen und eventuell regulierend in ablaufende Prozesse eingreifen zu können.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser tierexperimentellen methodologischen Arbeit war es, ein Verfahren zum zell-basierten Gentransfer isogener Fibroblasten der Ratte zwecks temporärer Expression von PDGF-BB zu etablieren. Dazu wurde ein spezieller bicistronischer adenoviraler Vektor in der GBF Braunschweig hergestellt (padcos45PDGFsequieG) und in einem S2 Labor der KEF/Campus Lübeck verwendet. Isogene Sprague-Dawley Fibroblasten wurden verwendet und zunächst das Transduktionsverfahren in vitro optimiert. Dafür wurden bei verschiedenen MOIs die Transduktionsraten der Zielzellen und die resultierende Expression von PDGF-BB in vitro bestimmt. Es zeigte sich, dass bei einer MOI von 100 das optimale Expressions-, Transduktionsverhältnis bei erhaltener Zellvitalität zu erreichen war. Das Expressionsmaximum lag bei 3-5 Tagen nach Transduktion bei einer Gesamtexpressionsdauer von 7 Tagen. Für die folgenden in vivo Experimente wurde daher eine MOI von 100 genutzt.

Um ein ‚trafficking' transplantierter Fibroblasten in vivo besser untersuchen zu können, wurden Zellchargen zunächst mit einem hoch effektiven lac-Z Adenovirus (Labor Prof. Wickham/Fa. Genentech/USA) zur temporären Expression von ß-Galaktosidase transduziert und in das später zu untersuchende Zielgewebe im Rattenmodell dorsal unter den Panniculus Carnosus transplantiert. Nach 7 Tagen wurden die Tiere sakrifiziert und einer x-gal Färbung im Zielgewebe unterzogen. Es fanden sich bis auf die deutlich erkennbaren Zellen keine weiteren pathohistomorphologischen Veränderungen im Zielgewebe. Weitere Gewebeproben von Leber, Lunge, Knochenmark und Gehirn ergaben keinen Hinweis auf lac-Z positive Zellen.

Um die Langzeiteffekte nach Transplantation von padcos45PDGFsequieG transduzierten Zellen untersuchen zu können, wurden 3 Gruppen von Tieren gebildet. In der Gruppe 3.LZ wurden genetisch nicht-modifizierte Zellen verwendet, in Gruppe 6.LZ waren es Zellen, die allein gfp als Markierungsvektor exprimierten und in Gruppe 5a.LZ Zellen mit dem kompletten Transduktionsmaterial, bestehend aus gfp und PDGF-BB. Jede Gruppe bestand aus 40 Tieren, von denen jeweils 2 Tiere an Tag 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 28, 35, 42, 49, 60, 80, 100, 130 und 150 nach Zelltransplantation sakrifiziert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass nur in der Gruppe 5a.LZ Pseudotumoren im Zielgebiet aus polymorphonukleären Zellen entstanden, die sich innerhalb von 7-9 Tagen wieder vollständig zurückbildeten.

In einem 2 x 8 cm dorsal gelegenen Mc Farlane Lappenmodell wurden alle weiteren Tierexperimente durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Transplantation PDGF-BB exprimierender Zellen 7 (Setting II) und 14 Tage (Setting III) vor Lappenhebung eine Angiogenese induziert werden kann, die ihren größten therapeutischen Effekt bei Transplantation der Zellen in den Bereich des Lappenrandes und des lateralen Grenzgebietes hat. Die Bildung therapeutisch effektiver Blutgefäße ließ sich dabei sowohl immunhistochemisch als auch mittels der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten und bereits publizierten Mikroangiographietechnik quantifizieren. Bei Transplantation zum Zeitpunkt der Lappenhebung (Setting I) war kein therapeutischer Effekt durch den zellbasierten Gentransfer mehr zu erreichen. In allen Settings konnten in der Gruppe der PDGF-BB transduzierten Tiere wiederum Pseudotumoren in dem beschriebenen Zeitfenster nachgewiesen werden.

Zusammenfassend bietet das hier erstmals dargestellte Verfahren des zellbasierten Gentransfers die Möglichkeit, sowohl in vitro als auch in vivo verschiedene biologische Effekte von PDGF-BB näher untersuchen zu können. Die erbrachten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass eine pharmakologische Konditionierung von potentiell ischämisch gefährdetem Gewebe mit der hier dargestellten Technik möglich ist.

6. Literatur

1. Adcock, K.G., Martin, J., Loggins, J., Kruger, T.E., Baier, R.J. Elevated platelet-derived growth factor-BB concentrations in premature neonates who develop chronic lung disease. *BMC Pediatr (England)* 4: p10 (2004)

2. Affleck, D.G., Bull, D.A., Bailey, S.H., Albanil, A., Connors, R., Stringham, J.C., Karwande, S.V. PDGF-BB increases myocardial production of VEGF: shift in VEGF mRNA splice variants after direct injection of bFGF, PDGF-BB and Pdgf-AB. *J Surg Res* 107: p203-209 (2002)

3. Allam, M., Martinet, N., Martinet, Y. Differential migratory response of U-2 OS osteosarcoma cell to the various forms of platelet-derived growth factor. *Biochemie* 74: p183-186 (1992)

4. Antoniades, H.N., Scher, C.D., Stiles, C. D. Purification of human platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: p1809–1812 (1979)

5. Bahadori, M., Liebow, A.A. Plasma cell granulomas of the lung. *Cancer* 31: p191-208 (1973)

6. Bergers, G., Benjamin, L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer (England)* 3: p401-410 (2003)

7. Bergsten, E., Uutela, M., Li, X., Pietras, K., Östman, A., Heldin, C.-H., Alitalo, K., Eriksson, U. PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nat Cell Biol* 3: p512–516 (2001)

8. Bork, P. Complement components C1r/C1s, bone morphogenic protein 1 and Xenopus laevis developmentally regulated protein UVS.2 share common repeats. *FEBS Lett* 282: p9–12 (1991)

9. Boussif, O., Lezoualch, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J.P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: p7297-7301 (1995)

10. Bramson, J.L., Graham, F.L., Gauldie, J. The use of adenoviral vectors for gene therapy and gene transfer in vivo. *Curr Opin Biotechnol* 6: p590-595 (1995)

11. Breunig, M., Lungwitz, U., Liebl, R., Fontanari, C., Klar, J., Kurtz, A., Blunk, T., Goepferich, A. Gene delivery with low molecular weight linear polyethylenimines. *J Gene Med* 7: p1287-1298 (2005)

12. Brown, D.M., Hong, S.P., Farrell, C.L., Pierce, G.F., Khouri, R.K. Platelet-derived growth factor BB induces functional vascular anastomoses in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: p5920-5924 (1995)

13. Byrnes, A.P., Rusby, J.E., Wood, M.J., Charlton, H.M. Adenovirus gene transfer causes inflammation in the brain. *Neuroscience* 66: p1015-1024 (1995)

14. Cao, R., Brakenhielm, E., Li, X., Pitras, K., Widenfalk, J., Östman, A., Eriksson, U., Cao, Y. Angiogenesis stimulated by PDGF-CC, a novel member in the PDGF family, involves activation of PDGF-αα and –ββ receptors. *FASEB J* 16: p1575-1583 (2002)

15. Cao, R., Brakenhielm, E., Pawliuk, R., Wariaro, D., Post, M.J., Wahlberg, E., Leboulche, P., Cao, Y. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat Med* 5: p604-613 (2003)

16. Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med (United States)* 9: p653-660 (2003)

17. Chang, S.M., Hou, C.L., Zhang, F., Lineaweaver, W.C., Chen, Z.W., Gu, Y.D. Distally based radial forearm flap with preservation of the radial artery: anatomic, experimental, and clinical studies. *Microsurgery (United States)* 23: p328-337 (2003)

18. Chen, I.C., Lin, C.Y., Yen, R.S., Ou, L.F., Tan, Y.W. The extended lateral arm flap in head and neck reconstruction. *J Chin Med Assoc (China)* 66: p544-550 (2003)

19. Cleaver, O., Melton, D.A. Endothelial signaling during development. *Nat Med (United States)* 9: p661-668 (2003)

20. Conway, E.M., Zwerts, F., Van Eygen, V., De Vriese, A., Nagai, N., Luo, W., Collen, D. Survivin-dependent angiogenesis in ischemic brain: molecular mechanisms of hypoxia-induced up-regulation. *Am J Pathol (United States)* 163: p935-946 (2003)

21. De Marchis, F., Ribatti, D., Gianpetri, C., Lentini, A., Faraone, D., Scoccianti, M., Capogrossi, M.C., Facchiano, A. Platelet-derived growth factor inhibits basic fibroblast growth factor angiogenic properties in vitro and in vivo through its α receptor. *Blood* 99: p2045-2053 (2002)

22. DeMatteo, R.P., Yeh, H., Friscia, M., Caparrelli, D., Burke, C., Desai, N., Chu, G., Markmann, J.F., Raper, S.E., Barker, C.F. Cellular Immunity delimits adenoviral gene therapy strategies for the treatment of neoplastic diseases. *Ann Surg Oncol* 6: p88-94 (1999)

23. Deuel, T. F., Huang, J.S., Proffit, R.T., Baenziger, J.U., Chang, D., Kennedy, B. B.. Human platelet-derived growth factor: purification and resolution into two active protein fractions. *J Biol Chem* 256: p8896–8899 (1981)

24. Duale, H., Kasparov, S., Paton, J.F., Teschemacher, A.G. Differences in transductional tropism of adenoviral and lentiviral vectors in the rat brainstem. *Exp Physiol* 90: p71-78 (2005)

25. Edelberg, J.M., Lee, S.H., Kaur, M., Tang, L., Feirt, N.M., McCabe, S., Bramwell, O., Wong, S.C., Hong, M.K. Platelet-derived growth factor-AB limits the extend of myocardial infarction in a rat model. *Circulation* 104: p46-51 (2001)

26. Eming, S.A., Yarmush, M.L., Krueger, G.G., Morgan, J.R. Regulation of the spatial organization of mesenchymal connective tissue: effects of cell-associated versus

released isoforms of platelet-derived growth factor. *Am J Pathol (United States)* 154: p281-289 (1999)

27. Etzion, S., Barbash, I.M., Feinberg, M.S., Zarin, P., Miller, L., Guetta, E., Holbova, R., Kloner, R.A., Kedes, L.H., Leor, J. Cellular cardiomyoplasty of cardiac fibroblasts by adenoviral delivery of MyoD ex vivo: an unlimited source of cells for myocardial repair. *Circulation* 106: p125-130 (2002)

28. Gay, C.G., Winkles, J.A. The half-lives of platelet-derived growth factor A- and B-chain mRNAs are similar in endothelial cells and unaffected by heparin-binding growth factor-1 or cycloheximide. *J Cell Physiol* 147: p121-127 (1991)

29. Gu, D.L., Nguyen, T., Gonzalez, A.M., Printz, M.A., Pierce, G.F., Sosnowski, B.A., Phillips, M.L., Chandler, L.A. Adenovirus encoding human platelet-derived growth factor-B delivered in collagen exhibits safety, biodistribution and immunogenicity profiles favorable for clinical use. *Mol Ther* 9: p699-711 (2004)

30. Gurunluoglu, R., Ozer, K., Skugor, B., Lubiatowski, P., Carnevale, K., Siemionow, M. Effect of transfection time on the survival of epigastric skin flaps pretreated with adenovirus encoding the VEGF gene. *Ann Plast Surg* 49: p161-169 (2002)

31. Hammacher, A., Hellman, U., Johnsson, A., Östman, A., Gunnarson, K., Westermark, B., Wasteson, Å., Heldin, C.-H. A major part of platelet-derived growth factor purified from human platelets is a heterodimer of one A and one B chain. *J Biol Chem* 263: p16493–16498 (1988)

32. Hammacher, A., Mellström, K., Heldin, C.-H., Westermark, B. Isoform-specific induction of actin reorganization by platelet-derived growth factor suggests that the functionally active receptor is a dimer. *EMBO J* 8: p2489–2495 (1989)

33. Hao, X., Mansson-Broberg, A., Gustaffson, T., Grinnemo, K.H., Blomberg, P., Siddiqui, A.J., Wärdell, E., Sylven, C. Angiogenic effedts of dual gene transfer of

bFGF and PDGF-BB after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun (United States)* 315: p1058-1063 (2004)

34. Harvey, B.G., Hackett, N.R., El-Sawey, T., Rosengart, T.K., Hirschowitz, E.A., Lieberman, M.D., Lesser, M.L., Crystal, R.G. Variability of humoral immune responses to adenovirus gene transfer vectors administered to different organs. *J Virol* 73: p6729-6742 (1999)

35. Heldin, C.H., Ostman, A., Ronnstrand, L. Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochem Biophys Acta* 1378**:** p79–113 (1998)

36. Heldin, C.-H., Westermark, B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev (United States)* 79: p1283-1301 (1999)

37. Heldin, P., Laurent, T.C., Heldin, C.-H. Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts. *Biochem J* 258: p919–922 (1989)

38. Hellström, M., Kalen, M., Lindahl, P., Abramsson, A., Betsholtz, C. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* 126: p3047-3055 (1999)

39. Hijjawi, J., Mogford, J.E., Chandler, L.A., Cross, K.J., Said, H., Sosnowski, B.A., Mustoe, T.A. Platelet-derived growth factor B, but not fibroblast growth factor 2, plasmid DNA improves survival of ischemic myocutaneous flaps. *Arch Surg* 139: p142-147 (2004)

40. Hsu, S., Huang, F., Friedman, E. Platelet-derived growth factor-B increases colon cancer cell growth in vivo by a paracrine effect. *J Cell Physiol* 165: p239-245 (1995)

41. Ishikawa, F., Miyazono, K., Hellman, U., Drexler, H., Wernstedt, C., Hagiwara, K., Usuki, K., Takaku, F., Risau, W., Heldin, C.H. Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature* 338: p557–562 (1989)

42. Jain, R.K. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med (United States)* 9: p685-691 (2003)

43. Kadono, T., Kikuchi, K., Nakagawa, H., Tamaki, K. Expressions of various growth factors and their receptors in tissues from neurofibroma. *Dermatology* 201: p10-14 (2000)

44. Kafri, T., Blomer, U., Peterson, D.A., Gage, F.H., Verma, I.M. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet* 17: p314-317 (1997)

45. Kallianinen, L.K., Hirshberg, J., Marchant, B., Rees, R.S. Role of PDGF as an adjunct to surgery in the management of pressure ulcers. *Plast Reconstr Surg (United States)* 106: p1243-1248 (2000)

46. Kanakaraj, P., Raj, S., Khan, S.A., Biashayee, S. Ligand-induced interaction between a- and b-type platelet derived growth factor (PDGF) receptors: role of receptor heterodimers in kinase activation. *Biochemistry* 30: p1761–1767 (1991)

47. Kazlauskas, A. A new member of an old family. *Nat Cell Biol (England)* 2: p78-79 (2000)

48. Kodama, T., Oku, H., Kawamura, H., Sakagami, K., Puro, D.G. Platelet-derived growth factor-BB: a survival factor for the retinal microvasculature during periods of metabolic compromise. *Curr Eye Res* 23: p93-97 (2001)

49. Ladoux, A., Frelin, C. Hypoxia is a strong inducer of vascular endothelial growth factor mRNA expression in the heart. *Biochem Biophys Res Commun (United States)* 195: p1005-1010 (1993)

50. Laitinen, M., Pakkanen, T., Donetti, E., Baetta, R., Luoma, J., Lehtolainen, P., Viita, H., Agrawal, R., Miyanohara, A., Friedmann, T., Risau, W., Martin, J.F., Soma, M., Yla-Herttuala, S. Gene transfer into the carotid artery using an adventitial collar:

comparison of the effectiveness of the plasmid-liposome complexes, retroviruses, pseudotyped retroviruses, and adenoviruses. *Hum Gene Ther* 8: p1645-1650 (1997)

51. LaRochelle, W.J., Jeffers, M., McDonald, W.F., Chillakuru, R.A., Giese, N.A., Lokker, N.A., Sullivan, C., Boldog, F.L., Yang, M., Vernet, C., Burgess, C.E., Fernandes, E., Deegler, L.L., Rittman, B., Shimkets, J., Shimkets, R.A., Rothberg, J.M., Lichenstein, H.S. PDGF-D, a new protease-activated growth factor. *Nat Cell Biol* 3**: p**517–521 (2001)

52. Lehrmann, S. Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature (England)* 401: p517-518 (1999)

53. Lev, D.C., Kim, S.J., Onn, A., Stone, V., Nam, D.H., Yazici, S., Fidler, I.J., Price, J.E. Inhibition of platelet-derived growth factor receptor signaling restricts the growth of human breast cancer in the bone of nude mice. *Clin Cancer Res* 11: p306-314 (2005)

54. Li, H., Fredriksson, L., Li, X., Eriksson, U. PDGF-D is a potent transforming and angiogenic growth factor. *Oncogene* 22: p1501-1510 (2003)

55. Li, X., Ponten, A., Aase, K., Karlsson, L., Abramsson, A., Uutela, M., Backstrom, G., Hellstrom, M., Bostrom, H., Li, H., Soriano, P., Betsholtz, C., Heldin, C. H., Alitalo, K., Ostman, A., Eriksson, U. PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nat Cell Biol* 2**: p**302–309 (2000)

56. Lindahl, P., Hellstrom, M., Kalen, M., and Betsholtz, C. Endothelial-perivascular cell signaling in vascular development: lessons from knockout mice. *Curr Opin Lipidol* 9: p407–411 (1998)

57. Lindahl, P., Bostrom, H., Karlsson, L., Hellstrom, M., Kalen, M., Betsholtz, C. Role of platelet-derived growth factors in angiogenesis and alveogenesis. *Curr Top Pathol* 93: p27–33 (1999)

58. Lokker, N.A., Sullivan, C.M., Hollenbach, S.J., Israel, M.A., Giese, N.A. Platelet-derived growth factor (PDGF) autocrine signaling regulates survival and mitogenic

pathways in glioblastoma cells: evidence that the novel PDGF-C and PDGF-D ligands may play a role in the development of brain tumors. *Cancer Res* 62: p3729-3735 (2002)

59. Luo, X., Lambrou, G.N., Sahel, J.A., Hicks, D. Hypoglycemia induces general neuronal death, whereas hypoxia and glutamate transport blockade lead to selective retinal ganglion cell death in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci (United States)* 42: p2695-2705 (2001)

60. Machens, H.G., Morgan, J.R., Berthiaume, F., Stefanovich, P., Siemers, F., Krapohl, B., Berger, A., Mailander, P. Platelet-derived growth factor-AA-mediated functional angiogenesis in the rat epigastric island flap after genetic modification of fibroblasts is ischemia dependent. *Surgery (United States)* 131: p393-400 (2002)

61. Machens, H.G., Salehi, J., Weich, H., Munch, S., Siemers, F., Krapohl, B.D., Herter, K.H., Kruger, S., Reichert, B., Berger, A., Vogt, P., Mailänder, P. Angiogenic effects of injected VEGF165 and sVEGFR-1 (sFLT-1) in a rat flap model. *J Surg Res* 111: p136-142 (2003)

62. Marsman, W.A., Buskens, C.J., Wesseling, J.G., Van Lanschot, J.J., Bosma, P.J. Gene therapy for barrett's esophagus: adenoviral gene transfer in different intestinal models. *Cancer Gene Ther* 12: p778-786 (2005)

63. McCray, P.B., Armstrong, K., Zabner, J., Miller, D.W., Koretzky, G.A., Couture, L., Robillard, J.E., Smith, A.E., Welsh, M.J. Adenoviral-mediated gene transfer to fetal pulmonary epithelia in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 95: p2620-2632 (1995)

64. McFarlane, R.M., Deyoung, G., Henry, R.A. The Design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. *Plast Reconstr Surg (United States)* 35: p177-182 (1965)

65. Miyamoto, O., Auer, R.N. Hypoxia, hyperoxia, ischemia, and brain necrosis. *Neurology (United States)* 54: p362-371 (2000)

66. Naldini, L., Blomer, U., Gage, F.H., Trono, D., Verma, I.M. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: p11382-11388 (1996)

67. Nomura, M., Yamagishi, S., Harada, S., et al. Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes. *J Biol Chem (United States)* 270: p28316-28324 (1995)

68. Olsen, L., Sherratt, J.A., Maini, P.K., Arnold, F. A mathematical model for the capillary endothelial cell-extracellular matrix interactions in wound-healing angiogenesis. *IMA J Math Appl Med Biol (England)* 14: p261-281 (1997)

69. Petersen, W., Pufe, T., Zantop, T., Tillmann, B., Mentlein, R. Hypoxia and PDGF have a synergistic effect that increases the expression of the angiogenetic peptide vascular endothelial growth factor in Achilles tendon fibroblasts. *Arch Orthop Trauma Surg* 123: p485-488 (2003)

70. Petters, R.M., Shuman, R.M., Johnson, B.H., Mettus, R.V. Gene transfer in swine embryos by injection of cells infected with retrovirus vectors. *J Exp Zool* 242: p85-88 (1987)

71. Quantikine® Products, Catalog Number MBB00, Mouse/Rat PDGF-BB Immunoassay

72. Raines, E.W., Ross, R. Platelet-derived growth factor. I. High yield purification and evidence for multiple forms. *J Biol Chem* 257: p5154–5160 (1982)

73. Raines, E.W. PDGF and cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev (England)* 15: p237-254 (2004)

74. Reigstad, L.J., Sande, H.M., Fluge, Ø., Bruland, O., Muga, A., Varhaug, J.E., Martinez, A., Lillehaug, J.R. Platelet-derived growth factor (PDGF)-C, a PDGF family member with a vascular endothelial growth factor-like structure. *J Biol Chem* 278: p17114-17120 (2003)

75. Risau, W., Drexler, H., Mironov, V., Smits, A., Siegbahn, A., Funa, K., Heldin, C.H. Platelet-derived growth factor is angiogenic in vivo. *Growth Factors* 7: p261–266 (1992)

76. Rollman, O., Jensen, U.B., Östman, A., Bolund, L., Gustafsdottir, S.M., Jensen, T. Platelet derived growth factor (PDGF) responsive epidermis formed from human keratinocytes trasnduced with the PDGFbeta receptor gene. *J Invest Dermatol* 120: p742-749 (2003)

77. Rucker, M., Strobel, O., Vollmar, B., Rosken, F., Menger, M.D. Significance of blood flow for vascular pedicled multi-tissue flaps in critical perfusion conditions. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 115: p249-250 (1998)

78. Russo, K., Ragone, R., Facchiano, A.M., Capogrossi, M.C., Facchiano, A. Platelet-derived growth factor-BB and basic fibroblast growth factor directly interact in vitro with high affinity. *J Biol Chem* 277: p1284-1291 (2002)

79. Seifert, R.A., Hart, C.E., Philips, P.E., Forstrom, J.W., Ross, R., Murray, M., Bowen-Pope, D.F. Two different subunits associate to create isoform-specific platelet-derived growth factor receptors. *J Biol Chem* 264: p8771–8778 (1989)

80. Sephel, G.C., Kennedy, R., Kudravi, S. Expression of capillary basement membrane components during sequential phases of wound angiogenesis. *Matrix Biol (Germany)* 15: p263-279 (1996)

81. Shimizu, A., O'Brien, K.P., Sjoblom, T., Pietras, K., Buchdunger, E., Collins, V.P., Heldin, C.H., Dumanski, J.P., Ostman, A. The dermatofibrosarcoma protuberans-associated collagen type Ialpha1/platelet-derived growth factor (PDGF) B-chain fusion gene generates a transforming protein that is processed to functional PDGF-BB. *Cancer Res*. 59: p3719-3723. (1999)

82. Sorge, J., Wright, D., Erdman, V.D., Cutting, A.E. Amphotropic retrovirus vector system for human cell gene transfer. *Mol Cell Biol* 4: p1730-1737 (1984)

83. Sulzbacher, I., Traxler, M., Mosberger, I., Lang, S., Chott, A. Platelet-derived growth factor-AA and -alpha receptor expression suggests an autocrine and/or paracrine loop in osteosarcoma. *Mod. Pathol*. 13: p632-637 (2000)

84. Teramoto, S., Matsuse, T., Ohga, E., Nagase, T., Fukuchi, Y., Ouchi, Y. Kinetics of adenovirus-mediated gene transfer to human lung fibroblasts. *Life Sci* 61: p891-897 (1997)

85. Thommen, R., Humar, R., Misevic, G., Pepper, M.S., Hahn, A.W.A., John, M., Battegay, E.J. PDGF-BB increases endothelial migration and cord movements during angiogenesis in vitro. *J Cell Biochem* 64: p403-413 (1997)

86. Tripathy, S.K., Svensson, E.C., Black, H.B., Goldwasser, E., Margalith, M., Hobart, P.M., Leiden, J.M., Long-term expression of erythropoietin in the systemic circulation of mice after intramuscular injection of a plasmid DNA vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: p10876-10880 (1996)

87. Tsai, T.-H., Chen, S.-L., Xiao, X., Liu, D.-W., Tsao, Y.-P. Gene therapy for treatment of cerebral ischemia using defective recombinant adeno-associated virus vectors. *Methods* 28: p253-258 (2002)

88. Uhrbom, L., Hesselager, G., Nister, M., Westermark, B. Induction of brain tumors in mice using a recombinant platelet-derived growth factor B-chain retrovirus. *Cancer Res* 58: p5275-5279 (1998)

89. Uhrbom, L., Hesselager, G., Ostman, A., Nister, M., Westermark, B. Dependence of autocrine growth factor stimulation in platelet-derived growth factor-B-induced mouse brain tumor cells. *Int J Cancer* 85: p398-406 (2000)

90. Üren, A., Merchant, M.S., Sun, C.J., Vitolo, M.I., Sun, Y., Tsokos, M., Illei, P.B., Ladanyi, M., Passanti, A., Mackall, C., Toretsky, J.A. Beta-platelet derived growth factor receptor mediates motility and growth of Ewing`s sarcoma cells. *Oncogene* 22: p2334-2342 (2003)

91. Wahl, S.M., Wong, H., McCartney-Francis, N. Role of growth factors in inflammation and repair. *J Cell Biochem* 40: p193-199 (1989)

92. Waller, W., Lee, J., Zhang, F., Lineaweaver, W.C. Gene therapy in flap survival. *Microsurgery (United States)* 24: p168-173 (2004)

93. Wang, X.T., Liu, P.Y., Tang, J.B. PDGF gene therapy enhances expression of VEGF and bFGF genes and activates the NF-kappaB gene in signal pathways in ischemic flaps. *Plast Reconstr Surg* 117: p129-139 (2006)

94. Yang, Y., Nunes, F.A., Berencsi, K., Furth, E.E., Gonczol, E., Wilson, J.M. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: p4407-4411 (1994)

95. Ylä-Herrtuala, S., Alitalo, K. Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med* 9: p694-701 (2003)

96. Yu, J., Moon, A. Both platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)-α and PDGFR-β promote murine fibroblast cell migration. *Biochem Biophys Res Commun* 282: p697-700 (2001)

97. Zatloukal, K., Cotten, M., Berger, M., Schmidt, W., Wagner, E., Birnstiel, M.L. In vivo production of human factor VII in mice after intrasplenic implantation of primary fibroblasts transfected by receptor-mediated, adenovirus-augmented gene delivery. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: p5148-5152 (1994)

98. Zhang, S.X.L., Gozal, D., Sachleben, L.R.JR., Rane, M., Klein, J.B., Gozal, E. Hypoxia induces an autocrine-paracrine survival pathway via platelet-derived growth factor (PDGF)-B/PDGF-beta receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in RN46A neuronal cells. *FASEB J (United States)* 17: p1709-1711 (2003)

99. Zhang, Y., Chirmule, N., Gao, G.P., Qian, R., Croyle, M., Joshi, B., Tazelaar, J., Wilson, J.M. Acute cytokine response to systemic adenoviral vectors in mice is mediated by dendritic cells and macrophages. *Mol Ther* 3: p697-707 (2001)

100. Zheng, J., Shin, J.H., Xaymardan, M., Chin, A., Duigan, I., Hong, M.K., Edelberg, J.M. Platelet-derived growth factor improves cardiac function in a rodent myocardial infarction model. *Coron Artery Dis* 15: p59-64 (2004)

7. Anhang

7.1 Tabellen

7.1.1 Tabelle 1: Fluoreszenzraten

Fl = Nummer der Flasche (entsprechend der Nummer des Versuchstieres; für die Tiere der Gruppen 5b.I – III waren je zwei Flaschen à 5 Mio Zellen erforderlich, s. Tabelle)

fZ = Anzahl der fluoreszierenden Fibroblasten in Millionen

ges = Gesamtanzahl der in der Flasche enthaltenen Fibroblasten in Millionen

% = Prozentsatz der fluoreszierenden Zellen an der Gesamtpopulation

Fl	fZ	ges	%	Fl	fZ	ges	%	Fl	fZ	ges	%
4.I-1	4,9	5,3	92	5a.II-1	4,4	4,6	96	5b.II-1°	4,7	5,2	90
4.I-2	4,5	4,9	92	5a.II-2	4,3	4,8	90	5b.II-1	4,8	5,3	91
4.I-3	4,5	4,8	94	5a.II-3	4,8	5,3	91	5b.II-2°	4,5	5,1	88
4.I-4	4,4	4,8	92	5a.II-4	5,0	5,4	93	5b.II-2	4,4	4,7	94
4.I-5	4,5	4,7	96	5a.II-5	4,3	4,9	88	5b.II-3°	4,2	4,9	86
4.I-6	5,1	5,5	93	5a.II-6	4,2	4,7	89	5b.II-3	5,0	5,6	89
4.I-7	5,1	5,6	91	5a.II-7	4,2	5,3	79	5b.II-4°	4,8	5,5	87
4.I-8	5,0	5,1	98	5a.II-8	4,5	5,1	88	5b.II-4	5,2	6,0	87
4.I-9	4,8	5,2	92	5a.II-9	5,2	5,6	93	5b.II-5°	4,6	5,2	88
4.I-10	4,7	5,0	94	5a.II-10	4,6	4,9	94	5b.II-5	4,6	4,7	98
4.II-1	5,1	5,4	94	5a.III-1	5,1	5,5	93	5b.II-6°	4,9	5,3	92
4.II-2	4,7	5,1	92	5a.III-2	5,0	5,6	89	5b.II-6	4,7	5,3	89
4.II-3	4,5	4,8	94	5a.III-3	5,0	5,7	88	5b.II-7°	4,8	5,6	86
4.II-4	5,0	5,5	91	5a.III-4	4,8	5,4	89	5b.II-7	3,9	4,5	87
4.II-5	4,6	5,0	92	5a.III-5	4,1	5,1	80	5b.II-8°	4,1	4,8	85
4.II-6	4,5	4,7	96	5a.III-6	4,9	5,6	88	5b.II-8	4,5	5,1	88
4.II-7	4,5	5,1	88	5a.III-7	4,6	5	92	5b.II-9°	4,5	5,0	90
4.II-8	4,7	5,1	92	5a.III-8	4,2	4,8	88	5b.II-9	4,8	5,4	89
4.II-9	4,9	5,4	91	5a.III-9	5,0	5,4	93	5b.II-10°	4,8	5,1	94
4.II-10	4,4	4,7	94	5a.III-10	4,9	5,5	89	5b.II-10	4,3	4,7	91
4.III-1	4,8	5,1	94	5b.I-1°	5,1	5,5	93	5b.III-1°	4,5	5,1	88
4.III-2	4,8	5,2	92	5b.I-1	5,5	5,8	95	5b.III-1	4,6	5,3	87
4.III-3	4,7	5,0	94	5b.I-2°	5,0	5,3	94	5b.III-2°	4,1	4,9	84
4.III-4	4,6	4,8	96	5b.I-2	4,8	5,0	96	5b.III-2	4,0	4,7	85
4.III-5	5,5	5,7	96	5b.I-3°	5,5	6,0	92	5b.III-3°	4,2	4,8	88
4.III-6	5,1	5,5	93	5b.I-3	5,0	5,2	96	5b.III-3	4,8	5,5	87
4.III-7	5,1	5,3	96	5b.I-4°	4,5	4,7	96	5b.III-4°	4,8	5,4	89
4.III-8	4,5	4,8	94	5b.I-4	4,7	4,9	96	5b.III-4	4,5	5,2	87
4.III-9	5,1	5,5	93	5b.I-5°	5,0	5,3	94	5b.III-5°	4,6	5,2	88
4.III-10	5,2	5,6	93	5b.I-5	5,0	5,2	96	5b.III-5	4,6	5,4	85
5a.I-1	5,0	5,3	94	5b.I-6°	5,3	5,5	96	5b.III-6°	5,1	5,8	88
5a.I-2	4,8	5,4	89	5b.I-6	5,3	5,6	95	5b.III-6	4,4	5,2	85
5a.I-3	4,4	4,8	92	5b.I-7°	5,2	5,6	93	5b.III-7°	4,1	4,7	87
5a.I-4	4,4	5,0	88	5b.I-7	5,1	5,4	94	5b.III-7	4,3	4,7	91
5a.I-5	4,3	4,9	88	5b.I-8°	5,3	5,5	96	5b.III-8°	4,6	5,3	87
5a.I-6	5,0	5,6	89	5b.I-8	5,1	5,2	98	5b.III-8	4,5	5,2	87
5a.I-7	5,0	5,3	94	5b.I-9°	5,0	5,1	98	5b.III-9°	4,3	5,0	86
5a.I-8	4,5	5,1	88	5b.I-9	5,0	5,2	96	5b.III-9	5,1	5,6	91
5a.I-9	4,2	4,7	89	5b.I-10°	4,7	5,0	94	5b.III-10°	4,2	5,1	82
5a.I-10	4,9	5,2	94	5b.I-10	5,0	5,1	98	5b.III-10	4,6	5,0	92

7.1.2 Tabelle 2: ELISA-Ergebnisse

Die Ergebnisse werden im folgenden gekennzeichnet als: a.1, a.3, …, a.24 bis l.1, l.3, …, l.70. Dabei stehen die Buchstaben für:

a = ELISA 1, MOI 10, #1 e = ELISA 1, MOI 100, #1 i = ELISA 2, MOI 30, #1
b = ELISA 1, MOI 10, #2 f = ELISA 1, MOI 100, #2 j = ELISA 2, MOI 30, #2
c = ELISA 1, MOI 30, #1 g = ELISA 1, MOI 100, #3 k =ELISA 2, MOI 100, #1
d = ELISA 1, MOI 30, #2 h = ELISA 2, MOI 10 l = ELISA 2, MOI 100, #2

Die Zahlen hinter den Buchstaben geben an, um welchen Tag der Probenentnahme nach Anfertigung des Ansatzes es sich handelt. So kennzeichnet Nummer f.21 die Probe der zweiten Reihe (#2) von Tag 21 des ersten ELISA mit einer MOI von 100 (100 Viren pro Zelle).
OD = optische Dichte
pdgf = PDGF-BB in pg/ml

ELISA	OD	pdgf	ELISA	OD	pdgf	ELISA	OD	pdgf	ELISA	OD	pdgf
a.1	0,002	0,469	e.1	0,006	1,753	h.3	0,012	11,35	j.24	-0,001	0
a.3	-0,003	0	e.3	62,74	62,74	h.5	0,005	4,765	j.28	0,001	0,966
a.5	0,003	0,763	e.5	0,065	30,66	h.7	-0,007	0	j.35	-0,006	0
a.7	0,002	0,469	e.7	0,013	4,437	h.9	0,004	3,819	j.42	-0,003	0
a.9	0,002	0,469	e.9	0,011	3,63	h.11	-0,008	0	j.49	-0,01	0
a.11	0,003	0,763	e.11	0,005	1,408	h.13	0	0	j.56	-0,007	0
a.13	0,001	0,204	e.13	0,005	1,408	h.17	-0,003	0	j.70	-0,006	0
a.17	-0,001	0	e.17	0,013	4,437	h.21	-0,002	0	k.5	0,133	123,3
a.21	0,001	0,204	e.21	0,005	1,408	h.24	0	0	k.7	0,06	56
a.24	0,001	0,204	e.24	0,009	2,853	h.28	0	0	k.9	0,043	40,25
b.1	0,005	1,408	e.28	0,006	1,753	h.35	-0,007	0	k.11	0,011	10,41
b.3	0,004	1,077	e.35	0,005	1,408	h.42	-0,002	0	k.13	0,012	11,35
b.5	0,001	0,204	e.42	0,007	2,11	h.49	-0,008	0	k.17	0,006	5,709
b.7	0,005	1,408	e.49	0,002	0,469	h.56	-0,006	0	k.21	0,009	8,535
b.9	0,000	0	e.56	0,001	0,204	h.70	-0,005	0	k.24	0,013	12,29
b.11	0,002	0,469	e.70			i.1	0,046	43,03	k.28	0,006	5,709
b.13	0,004	1,077	e.84	0,002	0,469	i.3	0,062	57,85	k.35	-0,003	0
b.17	0,001	0,204	e.98	0,007	2,11	i.5	0,043	40,25	k.42	0,004	3,819
b.21	0,004	1,077	e.130	0,003	0,763	i.7	0,022	20,71	k.49	-0,004	0
b.24	0,007	2,11	f.1	0,007	2,11	i.9	0,021	19,77	k.56	-0,004	0
c.1	0,004	1,077	f.3	0,055	25,08	i.11	-0,001	0	k.70	-0,006	0
c.3	0,008	2,477	f.5	0,034	14,08	i.13	-0,001	0	l.1	0,095	88,32
c.5	0,005	1,408	f.7	0,011	3,63	i.17	-0,003	0	l.3	0,106	98,46
c.7	0,003	0,763	f.9	0,016	5,694	i.21	-0,003	0	l.5	0,072	67,1
c.9	0,004	1,077	f.11	0,003	0,763	i.24	-0,001	0	l.7	0,025	23,51

c.11	-0,001	0	f.13	0,006	1,753	i.28	-0,001	0	l.9	0,024	22,57
c.13	-0,001	0	f.17	0,004	1,077	i.35	-0,009	0	l.11	0,006	5,709
c.17	-0,001	0	f.21	0,003	0,763	i.42	0,001	0,966	l.13	0,014	13,23
c.21	-0,001	0	f.24	0,006	1,753	i.49	-0,007	0	l.17	0,035	32,81
c.24	-0,001	0	g.1	0,006	1,753	i.56	-0,006	0	l.21	0,02	18,84
d.1	0	0	g.3	0,058	26,74	i.70	-0,002	0	l.24	0,005	4,765
d.3	0,003	0,763	g.5	0,025	9,731	j.1	0,059	55,07	l.28	0,003	2,871
d.5	0,005	1,408	g.7	0,005	1,408	j.3	0,07	65,25	l.35	-0,008	0
d.7	0,001	0,204	g.9	0,008	2,477	j.5	0,041	38,39	l.42	0,004	3,819
d.9	0,01	3,238	g.11	0,004	1,077	j.7	0,008	7,594	l.49	-0,002	0
d.11	0,004	1,077	g.13	fehlt	fehlt	j.9	0,01	9,475	l.56	0,003	2,871
d.13	0,001	0,204	g.17	fehlt	fehlt	j.11	-0,004	0	l.70	0	0
d.17	0,005	1,408	g.21	fehlt	fehlt	j.13	0,003	2,871			
d.21	0,001	0,204	g.24	fehlt	fehlt	j.17	-0,004	0			
d.24	0,004	1,077	h.1	0,011	10,41	j.21	-0,002	0			

7.1.3 Tabelle 3: Lappenauswertung, Planimetrie, Histologie, Mikroangiographie

Nekr. = Nekrosezone (Angabe in Pixel)

Int. = Intermediärzone (Angabe in Pixel)

ma/cm² = mikroangiographisch ermittelte Gesamtlänge kleinster Blutgefäße in mm / cm² Gewebe

ic K = immunhistochemisch ermittelte Kapillaren / mm²

ic P = immunhistochemisch ermittelte PMN-Zellen / Gesichtsfeld

Tier Nr.	gesamt	Nekr.	%	Int.	%	vital	%	ma/cm²	ic K	ic P
1.I-1	252374	108482	43,0	-	-	143892	57,0	7	10	1
1.I-2	219786	88632	40,3	-	-	131154	59,7	3	8	3
1.I-3	233070	80469	34,5	-	-	152601	65,5	5	15	1
1.I-4	251506	104999	41,7	-	-	146507	58,3	5	7	2
1.I-5	258124	109958	42,6	-	-	148166	57,4	3	11	4
1.I-6	226152	120826	53,4	-	-	105326	46,6	6	10	5
1.I-7	199519	99614	49,9	-	-	99905	50,1	8	8	3
1.I-8	218620	115877	53,0	-	-	102743	47,0	6	10	7
1.I-9	220128	72657	33,0	-	-	147471	67,0	5	12	2
1.I-10	221183	89111	40,3	-	-	132072	59,7	8	13	0
1.II-1	217895	115478	53,0	-	-	102417	47,0	5	12	4
1.II-2	203687	89654	44,0	-	-	114033	56,0	3	12	5
1.II-3	198526	102547	51,7	-	-	95979	48,3	6	11	1
1.II-4	236951	112547	47,5	-	-	124404	52,5	10	7	7
1.II-5	241589	115209	47,7	-	-	126380	52,3	8	6	2
1.II-6	196258	98658	50,3	-	-	97600	49,7	7	10	9

1.II-7	228954	100248	43,8	-	-	128706	56,2	9	9	2
1.II-8	268475	125409	46,7	-	-	143066	53,3	6	9	7
1.II-9	236587	125904	53,2	-	-	110683	46,8	8	10	11
1.II-10	269854	106857	39,6	-	-	162997	60,4	6	13	9
1.III-1	195201	108482	55,6	-	-	86719	44,4	10	12	8
1.III-2	201540	98632	48,9	-	-	102908	51,1	9	15	5
1.III-3	175628	80269	45,7	-	-	95359	54,3	7	16	2
1.III-4	185249	95219	51,4	-	-	90030	48,6	8	11	3
1.III-5	205920	89589	43,5	-	-	116331	56,5	7	13	3
1.III-6	188529	88594	47,0	-	-	99935	53,0	8	8	19
1.III-7	197025	102695	52,1	-	-	94330	47,9	11	7	2
1.III-8	182395	101541	55,7	-	-	80854	44,3	10	7	1
1.III-9	195048	95862	49,1	-	-	99186	50,9	8	9	2
1.III-10	199589	94275	47,2	-	-	105314	52,8	9	11	1
2.I-1	241437	102391	42,4	-	-	139046	57,6	11	5	6
2.I-2	226384	110970	49,0	-	-	115414	51,0	10	7	4
2.I-3	250571	104665	41,8	-	-	145906	58,2	9	11	5
2.I-4	235606	124060	52,7	-	-	111546	47,3	8	10	0
2.I-5	301812	135094	44,8	-	-	166718	55,2	13	13	3
2.I-6	219115	97933	44,7	-	-	121182	55,3	12	7	2
2.I-7	268202	145912	54,4	-	-	122290	45,6	10	6	2
2.I-8	224492	115452	51,4	-	-	109040	48,6	8	9	4
2.I-9	256648	104707	40,8	-	-	151941	59,2	9	11	4
2.I-10	227313	114211	50,2	-	-	113102	49,8	6	5	7
2.II-1	269204	125089	46,5	-	-	144115	53,5	9	9	3
2.II-2	287300	152095	52,9	-	-	135205	47,1	10	12	12
2.II-3	285439	170243	59,6	-	-	115196	40,4	5	15	9
2.II-4	260188	132059	50,8	-	-	128129	49,2	8	11	5
2.II-5	250924	110460	44,0	-	-	140464	56,0	9	12	3
2.II-6	281309	127345	45,3	-	-	153964	54,7	12	9	3
2.II-7	277192	144205	52,0	-	-	132987	48,0	8	7	4
2.II-8	301587	162046	53,7	-	-	139541	46,3	10	9	5
2.II-9	262370	102416	39,0	-	-	159954	61,0	10	9	7
2.II-10	251067	124785	49,7	-	-	126282	50,3	8	9	8
2.III-1	215630	102548	47,6	-	-	113082	52,4	7	11	6
2.III-2	235159	110249	46,9	-	-	124910	53,1	9	14	2
2.III-3	222059	130492	58,8	-	-	91567	41,2	4	10	5
2.III-4	252036	102957	40,9	-	-	149079	59,1	9	12	5
2.III-5	196048	98589	50,3	-	-	97459	49,7	9	10	9
2.III-6	240573	120486	50,1	-	-	120087	49,9	5	9	1
2.III-7	260148	120573	46,3	-	-	139575	53,7	7	12	16
2.III-8	232588	102498	44,1	-	-	130090	55,9	10	11	1
2.III-9	211690	98869	46,7	-	-	112821	53,3	9	9	2
2.III-10	237082	99154	41,8	-	-	137928	58,2	9	8	5
3.I-1	279983	121033	43,2	-	-	158950	56,8	13	8	35
3.I-2	271337	168624	62,1	-	-	102713	37,9	11	5	10
3.I-3	250547	143260	57,2	-	-	107287	42,8	10	5	12
3.I-4	230142	170072	73,9	-	-	60070	26,1	12	9	17
3.I-5	225106	145228	64,5	-	-	79878	35,5	7	7	11
3.I-6	265204	141255	53,3	-	-	123949	46,7	7	10	8
3.I-7	250183	163282	65,3	-	-	86901	34,7	11	13	6
3.I-8	232045	153682	66,2	-	-	78363	33,8	12	11	9
3.I-9	255037	148269	58,1	-	-	106768	41,9	10	10	8

3.I-10	213571	105800	49,5	-	-	107771	50,5	7	15	8
3.II-1	195268	122894	62,9	-	-	72374	37,1	13	9	5
3.II-2	265299	152276	57,4	-	-	113023	42,6	14	13	3
3.II-3	212059	125200	59,0	-	-	86859	41,0	15	10	9
3.II-4	235048	135203	57,5	-	-	99845	42,5	18	7	10
3.II-5	242398	111582	46,0	-	-	130816	54,0	15	10	9
3.II-6	198526	124068	62,5	-	-	74458	37,5	9	11	42
3.II-7	199044	98659	49,6	-	-	100385	50,4	11	5	11
3.II-8	221598	104552	47,2	-	-	117046	52,8	10	6	8
3.II-9	240378	133508	55,5	-	-	106870	44,5	12	6	10
3.II-10	230192	120410	52,3	-	-	109782	47,7	11	11	15
3.III-1	285698	136520	47,8	-	-	149178	52,2	10	9	6
3.III-2	272592	145542	53,4	-	-	127050	46,6	7	9	5
3.III-3	252049	144520	57,3	-	-	107529	42,7	12	15	12
3.III-4	293205	162359	55,4	-	-	130846	44,6	6	10	18
3.III-5	301256	162036	53,8	-	-	139220	46,2	11	7	9
3.III-6	252049	135477	53,8	-	-	116572	46,2	11	8	13
3.III-7	277506	159625	57,5	-	-	117881	42,5	10	16	15
3.III-8	252986	188504	74,5	-	-	64482	25,5	11	10	2
3.III-9	295043	158106	53,6	-	-	136937	46,4	12	11	10
3.III-10	269258	125406	46,6	-	-	143852	53,4	9	17	7
4.I-1	238100	95044	39,9	-	-	143056	60,1	32	10	29
4.I-2	219999	119674	54,4	-	-	100325	45,6	28	7	15
4.I-3	242894	106795	44,0	-	-	136099	56,0	27	14	23
4.I-4	198921	115182	57,9	-	-	83739	42,1	19	10	12
4.I-5	225997	107063	47,4	-	-	118934	52,6	25	9	18
4.I-6	216433	118108	54,6	-	-	98325	45,4	22	7	13
4.I-7	213598	97593	45,7	-	-	116005	54,3	21	6	15
4.I-8	261392	123667	47,3	-	-	137725	52,7	18	14	9
4.I-9	241545	107187	44,4	-	-	134358	55,6	21	2	16
4.I-10	275738	122715	44,5	-	-	153023	55,5	23	15	17
4.II-1	225639	99527	44,1	-	-	126112	55,9	32	17	12
4.II-2	231059	125482	54,3	-	-	105577	45,7	19	9	74
4.II-3	252049	152049	60,3	-	-	100000	39,7	24	11	24
4.II-4	244109	132043	54,1	-	-	112066	45,9	23	12	19
4.II-5	201652	110457	54,8	-	-	91195	45,2	26	13	10
4.II-6	198206	124820	63,0	-	-	73386	37,0	24	10	8
4.II-7	244106	117259	48,0	-	-	126847	52,0	21	16	14
4.II-8	213590	104824	49,1	-	-	108766	50,9	27	15	17
4.II-9	246208	142049	57,7	-	-	104159	42,3	22	13	10
4.II-10	261059	129513	49,6	-	-	131546	50,4	17	20	37
4.III-1	195637	98526	50,4	-	-	97111	49,6	33	18	29
4.III-2	198246	142059	71,7	-	-	56187	28,3	29	13	16
4.III-3	172468	102458	59,4	-	-	70010	40,6	21	19	32
4.III-4	185026	99528	53,8	-	-	85498	46,2	30	12	35
4.III-5	201587	122590	60,8	-	-	78997	39,2	22	9	21
4.III-6	219531	124800	56,8	-	-	94731	43,2	19	12	23
4.III-7	200153	111837	55,9	-	-	88316	44,1	18	15	17
4.III-8	196520	105286	53,6	-	-	91234	46,4	29	14	16
4.III-9	185309	99829	53,9	-	-	85480	46,1	24	15	2
4.III-10	152097	96204	63,3	-	-	55893	36,7	26	15	5
5a.I-1	220553	104599	47,4	-	-	115954	52,6	37	18	61
5a.I-2	236450	111864	47,3	-	-	124586	52,7	33	15	21

5a.I-3	202876	106434	52,5	-	-	96442	47,5	30	17	69
5a.I-4	206191	120780	58,6	-	-	85411	41,4	21	12	51
5a.I-5	210016	111982	53,3	-	-	98034	46,7	30	11	43
5a.I-6	184059	100853	54,8	-	-	83206	45,2	31	9	57
5a.I-7	192336	141496	73,6	-	-	50840	26,4	28	13	27
5a.I-8	202551	114205	56,4	-	-	88346	43,6	32	14	35
5a.I-9	223624	125016	55,9	-	-	98608	44,1	35	16	9
5a.I-10	191869	93585	48,8	-	-	98284	51,2	34	16	26
5a.II-1	275049	102392	37,2	20442	7,4	152215	62,8	43	31	73
5a.II-2	283019	152814	54,0	0	0,0	130205	46,0	38	23	124
5a.II-3	252190	98604	39,1	15428	6,1	138158	60,9	42	37	107
5a.II-4	310248	95348	30,7	19557	6,3	195343	69,3	39	30	69
5a.II-5	295307	102595	34,7	0	0,0	192712	65,3	35	26	88
5a.II-6	271365	93268	34,4	14659	5,4	163438	65,5	44	24	100
5a.II-7	286897	109043	38,0	9850	3,4	168004	62,0	41	19	91
5a.II-8	323860	124600	38,5	0	0,0	199260	61,5	38	25	42
5a.II-9	268945	102596	38,1	12536	4,7	153813	61,9	40	31	87
5a.II-10	240896	95347	39,6	11354	4,7	134195	60,4	37	27	68
5a.III-1	246851	74976	30,4	0	0,0	171875	69,6	42	49	14
5a.III-2	222604	79399	35,7	30682	13,8	112523	64,3	47	42	25
5a.III-3	213157	101450	47,6	0	0,0	111707	52,4	48	37	9
5a.III-4	193840	67244	34,7	26351	13,6	100245	65,3	31	33	5
5a.III-5	242136	45031	18,6	32708	13,5	164397	81,4	42	32	8
5a.III-6	184559	72987	39,5	0	0,0	111572	60,5	39	35	4
5a.III-7	148760	21534	14,5	0	0,0	127226	85,5	43	38	15
5a.III-8	175267	65015	37,1	21508	12,3	88744	62,9	42	39	10
5a.III-9	215207	78519	36,5	15489	7,2	121199	63,5	44	41	13
5a.III-10	211969	97831	46,2	0	0,0	114138	53,8	43	40	15
5b.I-1	198367	111618	56,3	-	-	86749	43,7	41	28	69
5b.I-2	214464	133456	62,2	-	-	81008	37,8	36	22	71
5b.I-3	266628	114895	43,1	-	-	151733	56,9	35	25	32
5b.I-4	245872	135632	55,2	-	-	110240	44,8	33	23	56
5b.I-5	210358	99526	47,3	-	-	110832	52,7	31	17	41
5b.I-6	240122	120597	50,2	-	-	119525	49,8	39	22	28
5b.I-7	268349	142587	53,1	-	-	125762	46,9	28	18	62
5b.I-8	237608	96598	40,7	-	-	141010	59,3	33	21	78
5b.I-9	227386	95845	42,2	-	-	131541	57,8	35	23	82
5b.I-10	177945	108543	61,0	-	-	69402	39,0	33	20	49
5b.II-1	229751	51800	22,5	24154	10,5	153797	77,5	54	44	58
5b.II-2	245132	51593	21	41986	17,1	151553	79,0	49	36	117
5b.II-3	261423	75351	28,8	23989	9,2	162083	71,2	52	37	129
5b.II-4	219175	67267	30,7	22280	10,2	129628	69,3	58	39	68
5b.II-5	236272	56696	24	29665	12,6	149911	76,0	44	33	79
5b.II-6	225348	63257	28,1	31259	13,9	130832	71,9	49	32	167
5b.II-7	195216	60259	30,9	22581	11,6	112376	69,1	50	29	90
5b.II-8	256338	73548	28,7	12574	4,9	170216	71,3	52	33	81
5b.II-9	224854	70122	31,2	23598	10,5	131134	68,8	43	42	93
5b.II-10	240092	91828	38,2	25095	10,5	123169	61,8	51	35	87
5b.III-1	195429	69235	35,4	31258	16,0	94936	64,6	54	39	42
5b.III-2	185249	63210	34,1	20159	10,9	101880	65,9	51	37	35
5b.III-3	195204	65258	33,4	11483	5,9	118463	66,6	57	42	21
5b.III-4	210259	75487	35,9	16249	7,7	118523	64,1	49	47	29
5b.III-5	215874	63019	29,2	22168	10,3	130687	70,8	48	44	22

5b.III-6	252039	58613	23,3	18741	7,4	174685	76,7	45	52	14
5b.III-7	214952	78549	36,5	20685	9,6	115718	63,5	51	47	13
5b.III-8	185498	69259	37,3	13548	7,3	102691	62,7	50	48	24
5b.III-9	236049	86570	36,7	12566	5,3	136913	63,3	47	46	30
5b.III-10	185549	72015	38,8	10201	5,5	103333	61,2	46	47	37

7.1.4 Tabelle 4: Pseudotumoren

Zählung erfolgte bei den Tieren der Langzeitgruppe (LZ) sowie bei den Tieren der Versuchsgruppen, die ebenfalls $5x10^6$ Zellen erhielten (Gr. 5a.I – III). Gezählt wurde bei den Gruppen 5a.I – III transkutan mittels Palpation, bei den Tieren der Gruppe LZ wurde an jedem bestimmten Tag ein Tier euthanasiert und mittels Direktaufsicht auf das freipräparierte Gewebe gezählt. Da in Setting I die Tiere bereits 7 Tage nach der Implantation euthanasiert werden, liegen Daten nur bis zu diesem Zeitpunkt vor (analog dazu Setting II).

	Tag 1	Tag 3	Tag 5	Tag 7	Tag 9	Tag 11	Tag 13	Tag 15	Tag 17	Tag 21
5a.I-1	0	6	8	7	-	-	-	-	-	-
5a.I-2	0	4	5	5	-	-	-	-	-	-
5a.I-3	0	2	4	4	-	-	-	-	-	-
5a.I-4	0	6	6	6	-	-	-	-	-	-
5a.I-5	0	6	7	6	-	-	-	-	-	-
5a.I-6	0	3	3	3	-	-	-	-	-	-
5a.I-7	0	1	3	3	-	-	-	-	-	-
5a.I-8	0	4	5	4	-	-	-	-	-	-
5a.I-9	0	5	5	5	-	-	-	-	-	-
5a.I-10	0	5	6	6	-	-	-	-	-	-
5a.II-1	0	4	6	5	0	0	0	-	-	-
5a.II-2	0	6	6	4	0	0	0	-	-	-
5a.II-3	0	7	7	5	1	0	0	-	-	-
5a.II-4	0	3	4	4	0	0	0	-	-	-
5a.II-5	0	8	8	7	2	0	0	-	-	-
5a.II-6	0	3	4	4	0	0	0	-	-	-
5a.II-7	0	6	6	6	0	0	0	-	-	-
5a.II-8	0	4	5	5	0	0	0	-	-	-
5a.II-9	0	5	7	7	1	0	0	-	-	-
5a.II-10	0	6	6	5	0	0	0	-	-	-
5a.III-1	0	2	4	4	0	0	0	0	0	0
5a.III-2	0	5	5	5	0	0	0	0	0	0
5a.III-3	0	7	6	7	2	0	0	0	0	0
5a.III-4	0	5	5	6	1	0	0	0	0	0
5a.III-5	0	4	4	6	0	0	0	0	0	0
5a.III-6	0	6	6	5	0	0	0	0	0	0
5a.III-7	0	3	5	7	1	0	0	0	0	0
5a.III-8	0	4	4	6	0	0	0	0	0	0
5a.III-9	0	5	6	6	0	0	0	0	0	0
5a.III-10	0	7	7	5	0	0	0	0	0	0
5a.LZ	0	7	12	7	0	0	0	0	0	0

7.1.5 Tabelle 5: Mittelwerte und Standardabweichungen der Einzelwerte aus 7.1.3

MW VG = Mittelwerte Vitalgewebe der Gesamtgruppe (mit SA = Standardabweichung)
MW icK = Mittelwerte der Anzahl immunhistochemisch ermittelten Kapillaren / mm² der Gesamtgruppe (SA analog zu s.o.)
MW icP = Mittelwerte der Anzahl immunhistochemisch ermittelter PMN / Gesichtsfeld der Gesamtgruppe (SA analog zu s.o.)
MW MA = Mittelwerte der mikroangiographisch ermittelten Gesamtlänge kleinster Blutgefäße in mm / cm² Gewebe der Gesamtgruppe (SA analog zu s.o.)

	MW VG	SA VG	MW icK	SA icK	MW icP	SA icP	MW MA	SA MA
1.I	56,83	7,03	10,4	2,46	2,8	2,10	5,6	1,78
2.I	52,78	4,91	8,4	2,80	3,7	2,06	9,6	2,07
3.I	40,67	9,0	9,3	3,23	12,4	8,50	10	2,26
4.I	51,99	5,73	9,4	4,12	16,7	5,72	23,6	4,38
5a.I	45,14	7,65	14,1	2,85	39,9	19,47	31,1	4,43
5b.I	48,87	7,71	21,9	3,21	56,8	18,91	34,4	3,75
1.II	52,25	4,43	9,9	2,23	5,7	3,43	6,8	2,04
2.II	50,65	5,83	10,2	2,30	5,9	3,03	8,9	1,85
3.II	45,01	6,01	8,8	2,66	12,2	10,96	12,8	2,74
4.II	46,5	5,87	13,6	3,41	22,5	20,03	23,5	4,25
5a.II	61,56	6,10	27,3	5,10	84,9	23,13	39,7	2,83
5b.II	71,59	5,0	36	4,64	96,9	32,37	50,2	4,41
1.III	50,38	4,06	11,9	3,18	4,6	5,48	8,7	1,34
2.III	52,65	5,08	10,5	1,78	5,2	4,57	7,8	1,99
3.III	44,63	7,60	11,2	3,52	9,7	4,90	9,9	2,02
4.III	43,84	6,17	14,2	2,94	19,6	10,79	25,1	5,09
5a.III	65,92	10,61	38,6	4,93	11,8	6,09	42,1	4,68
5b.III	65,94	4,61	44,9	4,48	26,7	9,64	49,8	3,68

7.1.6 Tabelle 6: T-Werte

z.v. Gru. = zu vergleichende Gruppen
VG = T-Wert berechnet bezüglich der Durchschnittswerte der vitalen Lappenanteile
icK = T-Wert berechnet bezüglich der Durschschnittswerte der immunhistochemisch ermittelten Anzahl der Kapillaren / mm² Gewebe
icP = T-Wert berechnet bezüglich der Durchschnittswerte der immunhistochemisch ermittelten Anzahl an PMN

MA = T-Wert berechnet bezüglich der Durchschnittswerte der mikroangiographisch ermittelten Kapillaren

z.v. Gru.	VG	icK	icP	MA	z.v. Gru.	VG	icK	icP	MA
2.I – 1.I	1,49	1,70	0,97	4,64	5b.III - 2.III	6,13	22,49	6,37	31,78
3.I – 1.I	4,48	0,86	3,47	4,84	4.I – 3.I	3,36	0,06	1,33	8,73
4.I – 1.I	1,69	0,66	7,22	12,05	5a.I - 3.I	1,20	3,52	4,09	13,41
5a.I – 1.I	3,56	3,11	5,99	16,88	5b.I - 3.I	2,19	8,74	6,77	17,63
5b.I – 1.I	2,41	9,00	8,98	21,96	4.II – 3.II	0,56	3,51	1,43	6,69
2.II – 1.II	0,69	0,30	0,14	2,41	5a.II - 3.II	6,11	10,17	8,98	21,59
3.II – 1.II	3,07	1,00	1,79	5,55	5b.II - 3.II	10,75	16,08	7,84	22,75
4.II – 1.II	2,47	2,87	2,61	11,20	4.III – 3.III	0,84	2,07	2,64	8,78
5a.II – 1.II	3,90	9,88	10,71	29,80	5a.III - 3.III	5,16	14,31	0,85	19,98
5b.II – 1.II	9,16	16,02	8,86	28,20	5b.III - 3.III	7,58	18,69	4,97	30,07
2.III – 1.III	1,10	0,26	0,27	1,19	5a.I - 4.I	2,27	2,97	3,61	3,81
3.III – 1.III	2,11	0,2	2,19	1,56	5b.I - 4.I	1,03	7,57	6,42	5,93
4.III – 1.III	3,57	2,41	3,92	9,86	5a.II - 4.II	5,62	7,06	6,45	10,03
5a.III – 1.III	4,32	14,94	2,78	21,71	5b.II - 4.II	10,29	12,30	6,18	13,78
5b.III – 1.III	8,01	19,56	6,31	33,23	5a.III - 4.III	6,15	13,45	1,99	7,78
3.I - 2.I	3,74	0,67	3,15	0,41	5b.III - 4.III	9,81	18,11	1,55	12,45
4.I - 2.I	0,33	0,64	6,77	9,15	5a.I – 5b.I	1,09	6,75	1,97	1,80
5a.I - 2.I	2,66	4,52	5,85	13,90	5a.II – 5b.II	4,02	3,99	0,95	6,33
5b.I - 2.I	1,35	10,02	8,83	18,33	5a.III – 5b.III	0,01	2,99	4,13	4,09
3.II - 2.II	2,13	1,26	1,75	3,73	5a.I – 5a.II	5,31	7,15	4,71	5,17
4.II - 2.II	1,59	2,62	2,59	9,96	5a.I – 5a.III	5,02	13,62	4,36	5,40
5a.II - 2.II	4,09	9,67	10,71	28,80	5a.II – 5a.III	1,13	5,04	9,67	1,39
5b.II - 2.II	8,62	15,75	8,85	27,27	5b.I – 5b.II	7,82	7,90	3,38	8,63
3.III - 2.III	2,77	0,48	2,12	2,34	5b.I – 5b.III	6,01	13,19	4,48	9,28
4.III - 2.III	4,20	3,32	3,89	10,02	5b.II – 5b.III	2,63	4,36	6,57	0,22
5a.III - 2.III	3,57	16,91	2,74	21,34					

7.1.7 Tabelle 7: Quantile der t-Verteilung (für $0 < \nu \leq 20$)

	0,600	**0,700**	**0,800**	**0,900**	**0,950**	**0,975**	**0,990**	**0,995**	**0,999**
1	0,325	0,727	1,376	3,078	6,314	12,71	31,82	63,66	318,3
2	0,289	0,617	1,061	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	22,33
3	0,277	0,584	0,978	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	10,21
4	0,261	0,569	0,941	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	7,173
5	0,267	0,559	0,920	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	5,893
6	0,265	0,553	0,906	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,208
7	0,263	0,549	0,896	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	4,785
8	0,262	0,546	0,889	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	4,501
9	0,261	0,543	0,883	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,297
10	0,260	0,542	0,879	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,144

11	0,259	0,540	0,876	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,025
12	0,259	0,539	0,873	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	3,930
13	0,258	0,538	0,870	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	3,852
14	0,258	0,537	0,868	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	3,787
15	0,258	0,536	0,866	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	3,733
16	0,257	0,535	0,865	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	3,686
17	0,257	0,534	0,863	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,646
18	0,257	0,534	0,862	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,610
19	0,257	0,533	0,861	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,579
20	0,257	0,533	0,860	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,552
21	0,256	0,532	0,859	1,3233	1,721	2,080	2,518	2,831	3,527
22	0,256	0,532	0,858	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,505
23	0,256	0,532	0,858	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,485
24	0,256	0,531	0,857	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,467
25	0,256	0,531	0,856	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,450
26	0,256	0,531	0,856	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,435
27	0,256	0,531	0,855	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,421
28	0,256	0,530	0,855	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,408
29	0,256	0,530	0,854	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,396
30	0,256	0,530	0,854	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,385

7.2 Veröffentlichungen und Kongressteilnahmen

Im Rahmen der laufenden Arbeiten, nach Abschluß des experimentellen Teils wurden viele der Ergebnisse bereits auf verschiedenen Kongressen, Meetings und Tagungen vorgestellt. Die folgende Auflistung zeigt die jeweilige Veranstaltung, die Art der Präsentation und den Titel des eingereichten Abstracts:

PUBLIKATIONEN

A technique to detect and to quantify fasciocutaneous blood vessels in small laboratory animals ex vivo.
Machens HG, Grzybowski S, Bucsky B, Spanholtz T, Niedworok C, Maichle A, Stockelhuber B, Condurache A, Liu F, Egana JT, Kaun M, Mailander P, Aach T. J Surg Res 131: 91-6 (2006)

Pseudotumors develop after cell-based gene transfer of PDGF-BB expressing isogenic fibroblasts.
Machens HG, Niedworok C, Spanholtz T, Maichle A, Lindenmaier W. Plast Reconstr Surg 118(3): 820 (2006)

A cell-based gene transfer model to induce angiogenesis in tissue and matrices.
Machens HG, Spanholtz T, Niedworok C, Maichle A, Grzybowski S, Bucsky B, Xie WG, Liu F, Egana T, Herbort-Brand S, Jasmund I, Witting K, Stöckelhuber B, Krüger S, Wedel T, Harder Y, Amon M, Menger M, Condurache A, Aach T, Middeler G, Hellwig-Bürgel T, Krengel S, Müller O, Franz W, Bader A, Wünsch L, Krapohl BD, Kaun M, Siemers F, Mailänder P, Lindenmaier W. Circulation: submitted.

PUBLIZIERTE VORTRÄGE

Ein neues gentechnologisches Modell zur Angiogeneseinduktion mittels ex vivo transfizierter isogener Fibroblasten.
Machens HG, Spanholtz T, Maichle A, Niedworok C, Lindenmaier W, Herbort-Brand S, Görg G, Kropf K, Stöcklhuber B, Reichert B, Siemers F, Krapohl BD, Mailänder P
Chirurgisches Forum 2003 für experimentelle und klinische Forschung, Band 32, Seite 237-40 (2003)

A new model to induce angiogenesis by ex vivo transfected isogenic fibroblasts based on gene transfer.
Machens HG, Jasmund I, Spanholtz T, Maichle A, Niedworok C, Lindenmaier W, Herbort-Brand S, Görg S, Kropf K, Stöckelhuber BM, Hellwig-Bürgel T, Krüger S, Reichert B, Siemers F, Krapohl BD, Mailänder P
Proceedings of the 2. Congress for Reconstructive Microsurgery (Editor: G. Germann); pp.213-216,
Monduzzi Editione, (2003)

Synergistische therapeutische Effekte von bFGF und VEGF^{165} nach Transplantation isogener adenoviral transfizierter Fibroblasten im ischämischen Lappenmodell der Ratte.
Spanholtz T, Niedworok C, Maichle A, Lindenmaier W, Krüger S, Stöckelhuber B, Mailänder P, Machens HG
Chirurgisches Forum 2004 für experimentelle und klinische Forschung. Band 33, S. 421-23 (2004)

Timing und Target der temporären Genexpression von VEGF^{165} im ischämischen Lappenmodell der Ratte.
Maichle A, Niedworok C, Spanholtz T, Lindenmaier W, Herbort-Brand S, Krüger S, Stöckelhuber B, Krapohl BD, Mailänder P, Machens HG
Chirurgisches Forum 2004 für experimentelle und klinische Forschung. Band 33, S. 17-20 (2004)

PUBLIZIERTE ABSTRACTS

Nachweis isogener Rattenfibroblasten durch adenoviralen Gentransfer im Transplantationsmodell.
Machens HG, Behling S, Spanholz T, Maichle A, Niedworok Ch, Middeler G, Franz W, Wickham T, Krüger S, Katus HA, Mailänder P
Abstractband Jahreskongress der VDPC und VDÄPC 2001: 11; Congress Compact Verlag Berlin;
ISBN 3-9806898-9-1 (2001)

A microangiographic technique for quantification of fasciocutaneous blood vessels in laboratory animals.
Spanholtz T, Maichle A, Niedworok C, Stöcklhuber B, Mailänder P, Machens HG
Langenbeck's Arch Surg 387: 261 (2002)

Detection of isogenic functional rat fibroblasts by adenoviral gene transfer in a transplantation model.
Machens HG, Behling S, Spanholtz T, Maichle A, Niedworok C, Middeler G, Franz W, Krüger S, Wickham T, Katus HA, Mailänder P
Eur J Plast Surg 25: 55 (2002)

A microangiographic technique for quantification of fasciocutaneous blood vessels in laboratory animals.
Machens HG, Maichle A, Spanholtz T, Niedworok C, Siemers F, Krapohl B, Herter KH Stöckelhuber B
Plastic Surgical Forum 2002 (San Antonio): 104 (2002)

Detection of isogenic functional rat fibroblasts by adenoviral gene transfer in a transplantation model.
Machens HG, Spanholtz T, Maichle A, Niedworok C, Middeler G, Mailänder P, Katus HA, Krüger S, Wickham T
Plastic Surgical Forum 2002 (San Antonio): 298 (2002)

Temporär exprimiertes PDGF-BB induziert Pseudotumoren auch unter Ischämiebedingungen im Lappenmodell der Ratte.
Niedworok C, Maichle A, Spanholtz T, Lindenmaier W, Herbort-Brand S, Krüger S, Hellwig-Bürgel T, Reichert B, Krapohl BD, Mailänder P, Machens HG
Plastische Chirurgie 3 (Suppl.1): 30 (2003)

Timing und Target der temporären Genexpression von VEGF165 im ischämischen Lappenmodell der Ratte.
Maichle A, Niedworok C, Spanholtz T, Lindenmaier W, Herbort-Brand S, Krüger S, Stöckelhuber B, Krapohl BD, Mailänder P, Machens HG
Plastische Chirurgie 3 (Suppl.1): 31 (2003)

Eine mikroangiographische Technik zur Quantifizierung fasziokutaner Blutgefäße im athymischen Mausmodell.
Grzybowski S, Spanholtz T, Niedworok C, Maichle A, Jasmund I, Witting K, Stöckelhuber B, Xie WG, Hartmannn A, Bucsky B, Mailänder P, Machens HG
Plastische Chirurgie 3 (Suppl.1): 53 (2003)

Synergistische therapeutische Effekte von bFGF und VEGF165 nach Transplantation isogener adenoviral transfizierter Fibroblasten im ischämischen Lappenmodell der Ratte.
Spanholtz T, Niedworok C, Maichle A, Lindenmaier W, Herbort-Brand S, Krüger S, Stöckelhuber B, Krapohl BD, Mailänder P, Machens HG
Plastische Chirurgie 3 (Suppl.1): 59 (2003)

Gene modification to improve angiogenesis of bioartificial dermis grafted on nude mice.
Xie WG, Grzybowski S, Maichle A, Spanholtz T, Niedworok C, Hartmann A, Bucsky B, Jasmund I, Witting K, Krengel S, Wünsch L, Lindemaier W, Krüger S, Mailänder P, Machens HG
Plastische Chirurgie 3 (Suppl.1): 61 (2003)

VORTRÄGE

Nachweis isogener Rattenfibroblasten durch adenoviralen Gentransfer im Transplantationsmodell
Machens HG, Behling S, Spanholtz T, Maichle A, Niedworok C, Middeler G, Franz W, Wickham T, Krüger S, Katus HA, Mailänder P
32. Jahrestagung der VDPC in Frankfurt am 27.09.2001

Nachweis isogener funktioneller Rattenfibroblasten durch adenoviralen Gentransfer im Transplantationsmodell.
Machens HG, Spanholtz T, Maichle A, Niedworok C, Middeler F, Siemers F, Franz W, Krüger S, Wickham T, Katus HA, Mailänder P
20. Jahrestagung der DAV in Majola /Schweiz am 08.01.2002

In vitro Produktion von PDGF-BB und VEGF165 nach adenoviralem Gentransfer in isogenen Fibroblasten.
Maichle A, Spanholtz T, Niedworok C, Lindenmaier W, Machens HG
33. Jahrestagung der VDPC in Heidelberg am 19.09.2002

Histomorphologische Langzeiteffekte von PDG-BB, bFGF und VEGF 165 nach Transplantation isogener adenoviral transfizierter Fibroblasten im Rattenmodell.
Niedworok C, Spanholtz T, Maichle A, Lindenmaier W, Machens HG
33. Jahrestagung der VDPC in Heidelberg am 19.09.2002

In vitro production and histomorphologic long-term effects of PDGF-BB, bFGF and VEGF165 after adenoviral gene transfer of isogenic rat fibroblasts.
Niedworok C, Spanholtz T, Maichle A, Lindemaier W, Krüger S, Hellwig-Bürgel T, Siemers F, Mailänder P, Machens HG
6 annual ECSAPS meeting in Wien am 28.09.2002

Angiogenic effects of bFGF and VEGF165 after adenoviral gene transfer of isogenic rat fibroblasts in an ischemic flap model.
Spanholtz T, Maichle A, Niedworok C, Lindemaier W, Krüger S, Hellwig-Bürgel T, Siemers F, Mailänder P, Machens HG
6 annual meeting der ECSAPS in Wien am 28.09.2002

A microangiographic technique for detection of fasciocutaneous blood vessels in laboratory animals.
Machens HG, Maichle A, Spanholtz T, Niedworok C, Siemers F, Krapohl BD, Herter KH, Stoeckelhuber B
Annual meeeting der ASPS in Orlando am 04.11.2002

A new model to increase therapeutic angiogenesis in bioartificial dermis.
Xie WG, S Gryzybowski, C Niedworok, A Maichle, T Spanholtz, F Siemers, S Krengel, L Wünsch, W Lindenmaier, S Krüger, P Mailänder, HG Machens.
21. Tagung der DAV in Kitzbühel/Österreich am 08.01.2003

Angiogenic effects of bFGF and VEGf 165 after adenoviral gene transfer of isogenic rat fibroblats in an ischemic flap model.
Machens HG, Maichle A, Niedworok C, Spanholtz T, Krüger S, Hellwig-Bürgel, Stöckelhuber S, Mailänder P
48. meeting of the Plastic Surgery Research Counsil in Las Vegas/USA am 25.04.2003

Ein neues gentechnologisches Modell zur Angiogeneseinduktion mittels ex vivo transfizierter isogener Fibroblasten.
Machens HG, Spanholtz T, Maichle A, Niedworok C, Lindenmaier W, Siemers F, Krapohl BD, Mailänder P
Deutscher Chirurgenkongress 2003 in München am 29.04.2003

A new model to induce angiogenesis by ex vivo transfected fibroblasts based on gene transfer.
Machens HG, Spanholtz T, Maichle A, Niedworok C, Lindenmaier W
WSRM – Meeting in Heidelberg am 12.06.2003

Temporarily expressed PDGF-BB induces pseudotumors under ischemic conditions in a flap model of the rat.
Niedworok C, Maichle A, Spanholtz T, Lindermaier W, Herbort-Brand S, Krüger S, Hellwig-Bürgel T, Reichert B, Krapohl BD, Mailänder P, Machens HG
7th ECSAPS Meeting in Genf am 19.09.2003

Synergistic therapeutic effects of bFGF and VEGF after transplantation of adenovirally modified fibroblasts in an ischemic rat flap model.
Maichle A, Niedworok C, Spanholtz T, Lindermaier W, Herbort-Brand S, Krüger S, Stöckelhuber B, Krapohl BD, Mailänder P, Machens HG
7th ECSAPS Meeting in Genf am 19.09.2003

VEGF165 gene modification improves angiogenesis of bioartificial skin grafts in nude mice.
Grzybowski S, Xie WG, Maichle A, Spanholtz T, Niedworok C, Jasmund I, Siemers F, Krengel S, Wünsch L, Lindenmaier W, Krüger S, Mailänder P, Machens HG
7th ECSAPS Meeting in Genf am 20.09.2003

Temporär exprimiertes PDGF-BB induziert Pseudotumoren auch unter Ischämiebedingungen im Lappenmodell der Ratte.
Niedworok C, Maichle A, Spanholtz T, Lindermaier W, Herbort-Brand S, Krüger S, Hellwig-Bürgel T, Reichert B, Krapohl BD, Mailänder P, Machens HG
34. Jahrestagung der VDPC in Freiburg am 03.10.2003

Timing und Target der temporären Genexpression von VEGF165 im ischämischen Lappenmodell der Ratte.
Maichle A, Niedworok C, Spanholtz T, Lindermaier W, Herbort-Brand S, Krüger S, Stöckelhuber B, Krapohl BD, Mailänder P, Machens HG
34. Jahrestagung der VDPC in Freiburg am 03.10.2003

A new bioactive dermal matrix based on cell-based gene transfer technology.
Grzybowski S, Xie WG, Maichle A, Spanholtz T, Niedworok C, Jasmund I, Siemers F, Krengel S, Wünsch L, Lindenmaier W, Krüger S, Mailänder P, Machens HG
1rst World Congress on Regenerative Medicine in Leipzig am 23.10.2003

Synergistische Effekte von bFGF und VEGF165 nach Transplantation isogener adenoviral transfizierter Fibroblasten im ischämischen Lappenmodell der Ratte.
T. A. Spanholtz, C. Niedworok, A. Maichle, W. Lindenmaier, S. Krüger, B. Stöckelhuber, P. Mailänder, H.-G. Machens
Deutscher Chirurgenkongress 2004 in Berlin am 29.05.2003

Synergistic Therapeutic Effects of bFGF and VEGF165 after Transplantation of Genetically Modified Fibroblasts in an Ischemic Rat Flap Model.
T. A. Spanholtz, C. Niedworok, A. Maichle, W. Lindenmaier, S. Krüger, B. Stöckelhuber, P. Mailänder, H.-G. Machens
Plastic surgery Research Council, 49th Annual Meeting, Ann Arbour, Michigan, USA, 08.06. – 13.06.2004

Temporary Expressed PDGF-BB Induces Pseudotumors under Ischemic Conditions in an Ischemic Flap Model of the Rat.
C. Niedworok, A. Maichle, T. Spanholtz, W. Lindenmaier, S. Krüger, T. Hellwig-Bürgel, B. Stöckelhuber, P. Mailänder, H.-G. Machens
Plastic surgery Research Council, 49th Annual Meeting, Ann Arbour, Michigan, USA, 08.06. – 13.06.2004

Timing and Target of VEGF165 Gene Expression in an Ischemic Flap Model of the Rat.
A. Maichle, T. Spanholtz, Ch. Niedworok, W. Lindenmaier, S. Herbort-Brand, S. Krüger, B. Stöckelhuber, B.-D. Krapohl, P. Mailänder, H.-G. Machens
Plastic surgery Research Council, 49th Annual Meeting, Ann Arbour, Michigan, USA, 08.06. – 13.06.2004

POSTER

Detection of isogenic functional rat fibroblasts by adenoviral gene transfer in a transplantation model.
Machens HG, Spanholtz T, Maichle A, Niedworok C, Middeler F, Siemers F, Franz W, Krüger S, Wickham T, Katus HA, Mailänder P
1rst biennial meeting of the ETES in Freiburg, 7.-10.10.2001

Eine mikroangiographische Technik zur Quantifizierung fasziokutaner Blutgefäße im Rattenmodell.
Spanholtz T, Niedworok C, Maichle A, Stöcklhuber B, Machens HG
33. Jahrestagung der VDPC in Heidelberg, 18. – 21.09.2002

Detection of isogenic functional rat fibroblasts by adenoviral gene transfer in a transplantation model.
Machens HG, Spanholtz T, Maichle A, Niedworok C, Middeler F, Siemers F, Franz W, Krüger S, Wickham T, Katus HA, Mailänder P
Annual Meeting der American Society for Plastic Surgeons in San Antonio, 01. – 06.11.2002

In vivo Effekte von PDGF-BB, VEGF165 und bFGF nach adenoviralem Gentransfer isogener Rattenfibroblasten.
Niedworok C, Spanholtz T, Maichle A, Siemers F, Mailänder P, Machens HG
6. Chirurgische Forschungstage in Köln, 28. – 30.11.2002

Eine mikroangiographische Technik zur Quantifizierung fasziokutaner Blutgefäße in Labortieren.
Spanholtz T, Maichle A, Niedworok C, Stöcklhuber B, Mailänder P, Machens HG
6. Chirurgische Forschungstage in Köln, 28. – 30.11.2002

In vitro Produktion von PDGF-BB VEGF165 nach adenoviralem Gentransfer in isogenen Rattenfibroblasten.
Maichle A, Niedworok C, Spanholtz T, Lindenmaier W, Mailänder P, Machens HG
1. Chirurgische Forschungstage in Köln, 28. – 30.11.2002

In vitro production and histomorphologic long-term effects of PDGF-BB, bFGF and VEGf 165 after adenoviral gene transfer of isogenic rat fibroblasts.
Machens HG, Maichle A, Niedworok C, Spanholtz T, Krüger S, Hellwig-Bürgel, Stöckelhuber S, Mailänder P
48. meeting of the Plastic Surgery Research Counsil in Las Vegas/USA, 23. – 26.04.2003

Eine mikroangiographische Technik zur Quantifizierung fasziokutaner Blutgefäße im athymischen Mausmodell.
Grzybowski S, Maichle A, Spanholtz T, Niedworok C, , Jasmund I, Witting K, Stöckelhuber B, Xie WG, Hartmann A, Bucsky B, Mailänder P, Machens HG
34. Jahrestagung der VDPC in Freiburg, 30.09. – 05.10.2003

Synergistische therapeutische Effekte von bFGF und VEGF165 nach Transplantation isogener adenoviral transfizierter Fibroblasten im ischämischen Lappenmodell der Ratte.
Spanholtz T, Niedworok C, Maichle A, Lindenmaier W, Herbort-Brand S, Krüger S, Stöckelhuber B, Krapohl B, Mailänder P, Machens HG
34. Jahrestagung der VDPC in Freiburg, 30.09. – 05.10.2003

Gene modification to improve angiogenesis of bioartificial dermis grafted on nude mice.
Xie WG, Grzybowski S, Maichle A, Spanholtz T; Niedworok C, Hartmann A, Bucsky B, Jasmund I, Witting K, Krengel S, Wünsch L, Lindenmaier W, Krüger S, Mailänder P, Machens HG
34. Jahrestagung der VDPC in Freiburg, 30.09. – 05.10.2003

Timing and Target of VEGF165 Gene Expression in an Ischemic Flap Model of the Rat.
A. Maichle, T. Spanholtz, Ch. Niedworok, W. Lindenmaier, S. Herbort-Brand, S. Krüger, B. Stöckelhuber, B.-D. Krapohl, P. Mailänder, H.-G. Machens
Plastic surgery Research Council, 49th Annual Meeting, Ann Arbour, Michigan, USA, 08.06. – 13.06.2004

Temporary Expressed PDGF-BB Induces Pseudotumors under Ischemic Conditions in an Ischemic Flap Model of the Rat.
C. Niedworok, A. Maichle, T. Spanholtz, W. Lindenmaier, S. Krüger, T. Hellwig-Bürgel, B. Stöckelhuber, P. Mailänder, H.-G. Machens
Plastic surgery Research Council, 49th Annual Meeting, Ann Arbour, Michigan, USA, 08.06. – 13.06.2004

8. Danksagung

Herzlichen Dank allen Personen, die maßgeblichen Anteil an der Fertigstellung dieser Arbeit hatten, ob fachlicher oder privater Natur.

Prof. Dr. Machens, Initiator dieser Arbeit, der stets ein guter Ansprechpartner war und mit schier unendlicher Geduld beiseite stand

Dr. Krüger für seine Hilfe bei der Anfertigung der Histologien und deren fachliche Begutachtung

Dr. Stöckelhuber für ihre freundliche Hilfe bei der Aufnahme der Radiologien und ihre Vermittlung bei der Bearbeitung der Bilder

Dr. Lindenmaier für die Bereitstellung der Adenoviren und seine Hilfe bei Fragen der in-vitro-Arbeiten

Frau Inga Jasmund und Frau Karen Witting für die gute Zusammenarbeit

Dem Institut für Klinische Chemie und den dort arbeitenden MTAs für ihre Hilfe bei der Anfertigung der ELISAs

Herrn Professor Dr. R. Diepenbrock (angewandte Mathematik und Statistik der Bergischen Universität Wuppertal) für die Hilfe bei der statistischen Auswertung

Der gesamten Abteilung für Plastische Chirurgie der Universität Lübeck für die Unterstützung und das Aushelfen mit diversen Materialien (Nahtmaterial und Kuchen)

Meinen Kodoktoranden Timo Spanholtz und Alexandra Maichle, es hat immer viel Spaß gemacht mit Euch zusammen zu arbeiten

Meinen Freunden

Ganz besonders meinen Eltern, meiner Schwester Julia und meiner Cousine Silke ohne die mir diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre

9. Lebenslauf

Name:	Christian Niedworok
Geburtsdatum:	11.November 1977
Geburtsort:	Velbert
Eltern:	Hubert Niedworok, Pensionär Irene Niedworok, Hausfrau
Geschwister:	Julia Niedworok, Schülerin
Schule:	1984 – 88 Gemeinschafts-Grundschule Werdener Str.,Velbert 1988 – 97 Geschwister-Scholl-Gymnasium, Velbert
Zivildienst:	1997 – 98 Rettungssanitäter bei der Johanniter-Unfallhilfe, Essen
Studium:	1998 – 2004 Universität zu Lübeck Zeitraum des experimentellen Teiles der vorliegenden Dissertation: 08/2000 bis 05/2003
Praktisches Jahr:	Universitätsklinikum Essen, Urologie Kantons- und Regionalspital Menziken, Schweiz, Innere Medizin Kilimanjaro Christian Medical Center, Tansania, Chirurgie
	Abschluß des Studiums 2005.
Stipendien:	2002 – 2003 Promotionstipendium „experimentelle Medizin“ der Universität zu Lübeck
Klinische Tätigkeit:	11/2005 – 05/2006 Assistenzarzt der Abteilung für Innere Medizin Kantons- und Regionalspital Menziken, Schweiz, Seit 06/2006 Assistenzarzt der Abteilung für Urologie Universitätsklinikum Essen