

## **C. Prophylaxe der Immunreaktion durch Gentherapie**

### **1. Mögliche Ansatzpunkte der Gentherapie an den immunologischen Mechanismen der Abstoßungsreaktion**

#### - An der Abstoßung beteiligte immunologische Mechanismen:

Wie bereits in Abschnitt A und B dieser Arbeit dargestellt, ist die Regulation der Hornhauttransplantatabstoßung komplex und schließt wie im Fall anderer Transplantationsformen mehrere sich z.T. überlagernde immunologische Mechanismen ein. Die in den letzten Jahrzehnten entstandene Literatur belegt übereinstimmend, dass eine zellvermittelte Immunantwort im Vordergrund dieser Reaktionsform steht (Nieder Korn 1999, Nieder Korn 2001, Streilein 2003), wobei der Beteiligung von Antikörpern nur eine geringe Bedeutung zukommt. Sowohl indirekte als auch direkte Antigenpräsentation sind an der primären Aktivierung der Immunantwort beteiligt, ebenso wie sowohl "Major-" als auch "Minor-" Histokompatibilitätsantigene als Ziele des Abstoßungsprozesses dienen können. Die genaue anatomische Lokalisation, an der die primäre Sensibilisierung des Empfängers auftritt, ist letztendlich noch unklar. Aus den letzten Jahren gibt es aber Belege, dass unreife Antigenpräsentierende Zellen aus dem Auge auf Aggregationen lymphatischer Zellen in der Konjunktiva oder in den regionalen Lymphknoten treffen, wo sie reifen und mit T-Lymphozyten in Kontakt treten. (Liu 2002, Hamrah 2002, Brissette-Storkus 2002). Die Immunantwort gegen ein Hornhauttransplantat scheint durch CD4<sup>+</sup>T-Zellen kontrolliert zu werden (Ayliffe 1992, He 1991), aber das entzündliche Infiltrat in einem akut abgestoßenen Transplantat ist in der Regel heterogen und besteht aus CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen und in geringerem Ausmaß aus polymorphkernigen Granulozyten (Larkin 1997). Die Abstoßung des kornealen Endothels ist die wesentlichste, das Transplantatüberleben bedrohende Form der Abstoßung, bedingt durch die zentrale Funktion des Endothels bei der Aufrechterhaltung der Hornhauttransparenz und die fehlende Regenerationsfähigkeit des humanen Endothels.

#### - Das Potential der Gentherapie zur Verhinderung oder Modulation der Abstoßungsreaktion:

Nach Meinung zahlreicher Autoren können Hornhauttransplantate ausgezeichnete Ziele zur Modulation der Abstoßung durch Gentransfer sein (George 2000, Jun 2003, Borrás 2003). Spenderhornhäute werden in der Regel vor der Transplantation in einer Bank kultiviert und

sind in diesem Zeitraum für gentherapeutische ex vivo Behandlungen leicht zugänglich. Das Hornhautendothel ist eine leicht erreichbare einschichtige Zelllage, die durch eine Reihe von gentherapeutischen Vektoren transfiziert werden kann. (virale und nichtvirale Vektoren). Keratozyten und Epithelzellen können ebenfalls von einigen Vektoren transduziert werden. Gentransfer in ein Gewebe ex vivo ist theoretisch sicherer als Gentransfer in vivo, weil überschüssiger Vektor vor der Implantation des Gewebes an den Zielort bzw. der Transplantation entfernt werden kann und die Gefahr der Vektoraussaat im Organismus geringer ist. Allerdings ist der Nutzen des ex vivo Gentransfers abhängig von der Annahme, dass ein lokal im Spendergewebe exprimiertes oder lokal in die Vorderkammer sezerniertes Protein die Immunantwort ausreichend modulieren kann. Die Expression eines therapeutischen Proteins nur lokal innerhalb der Hornhaut könnte jedoch unzureichend sein, wenn die entscheidenden Schritte der Immunantwort als systemische Reaktion ablaufen.

- Zur Modulation der Hornhauttransplantatabstoßung geeignete therapeutische Transgene:

Die Analyse der Besonderheiten der poly- und monoklonalen Antikörper, die zur Verhinderung oder Therapie der Hornhauttransplantatabstoßung in experimentellen und klinischen Studien eingesetzt worden sind, liefert nützliche Schlüssel für die Auswahl von möglichen therapeutischen Transgenen (Thiel 2003). Dazu gehören Moleküle, die die Sensibilisierung, Aktivierung oder klonale Expansion von T-Zellen blockieren, sowie Hemmstoffe der kornealen Neovaskularisation. Darüber hinaus kommen immunmodulatorische Zytokine und Rezeptorantagonisten für proinflammatorische Zytokine als Ziel einer gentherapeutischen Beeinflussung in Frage.

- Blockade der T-Zellsensibilisierung, -aktivierung oder -expansion:

Da vor allem T-Zellen an der Steuerung und Modulation der zellvermittelten Immunantwort auf ein Hornhauttransplantat beteiligt sind, scheinen Moleküle, die die Interaktion zwischen Antigen-präsentierenden Zellen und T-Zellen blockieren, für eine Unterdrückung der Transplantatabstoßung besonders geeignet zu sein. Mögliche Ziele umfassen den CD4-Rezeptor (Ayliffe 1992, He 1992, Thiel 2000), den T-Zellrezeptor (Yamagami 1999) sowie kostimulatorische Moleküle wie CD80, CD86, CTLA4 und CD154 (Kagya 2002, Hoffmann 1997, Qian 2001, Qian 2002). Darüber hinaus kann die Blockade von CD25 aufgrund der Rolle dieses Rezeptors bei der T-Zellaktivierung und -expansion Ziel einer immunsuppressiven Strategie sein (Hoffmann 1994).

- Anti-angiogenetische Faktoren:

Die Begründung zum Einsatz von anti-angiogenetischen Molekülen als Transgene liegt in der gut bekannten Wechselwirkung von kornealer Neovaskularisation und nachfolgender Transplantatabstoßung (Cursiefen 2004). Darüber hinaus konnte experimentell ein verlängertes Transplantatüberleben durch die topische Applikation eines Antikörpers gegen VEGF („vascular endothelial growth factor“) nachgewiesen werden.(Yatoh 1998).

- Immunmodulatorische Zytokine, Rezeptorantagonisten:

Gentransfer mittels cDNA von Zytokinen oder Zytokinrezeptorantagonisten ist ein geeigneter gentherapeutischer Ansatz für Therapie und Prophylaxe der Hornhauttransplantatabstoßung, da Zytokinen eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Immunantwort zukommt und diese Botenstoffe gleichzeitig vor allem lokal wirken. Viele Zytokine werden innerhalb von Hornhaut und Kammerwasser während der Hornhauttransplantatabstoßung (Sana 1998, Torres 1996, King 2000) exprimiert. Besondere Aufmerksamkeit ist den immunmodulatorischen Zytokinen zuteil geworden, die die Funktion der Antigen-präsentierenden Zellen modulieren und die entzündliche Reaktionen herabregulieren können. (Nickerson 1997, Piccotto 1997). Zu den besonders interessanten Faktoren gehören dabei Interleukin 4 (Il-4) (Nelms 1999), Interleukin 10 (Il-10) (Moore 1993) und die Untereinheit p40 von Interleukin 12 (Il-12), ein Rezeptorantagonist (Gately 1998).

## **2. Mögliche Vehikel und Vektoren: physikalische Gentransfermethoden, virale Vektoren, nicht-virale Vektoren**

Die Möglichkeiten des Gentransfers in die Hornhaut sind bereits in einer Reihe von Arbeiten dargestellt worden (George 2000, Pleyer 2002, Borras 2003, Jun 2003). Potenziell therapeutische Gene können auf verschiedenste Weise in okuläre Gewebe und insbesondere die Hornhaut eingeschleust werden. Dazu gehören die Applikation von nackter DNA, der Elektropuls-vermittelte Gentransfer und der ballistische Gentransfer mittels "Gene Gun", außerdem können Gene mit Hilfe von zahlreichen nicht-viralen Vektoren wie Liposomen oder replikationsdefizienten Viren in die Zellen der Hornhaut eingeschleust werden.

### ***2.1 physikalische Gentransfermethoden***

#### **- Transfer nackter DNA**

Der Transfer von nackter DNA in Form eines Plasmids in okuläre Zellen hat den Vorteil der relativ umschriebenen, lokal begrenzten Zielzelltransduktion ohne Induktion einer begleitenden Entzündung. Der Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, dass in der Regel nur eine kurzzeitige Transgenexpression erreichbar ist. Im Jahr 2001 wurde von Stechschulte gezeigt, dass ein effektiver Reportergentransfer durch manuelle Plasmidinjektion in die Rattenhornhaut mittels Spritze möglich ist (Stechschulte 2001). Das Reportergen wurde daraufhin von den kornealen Epithelzellen und den Keratozyten über einen Zeitraum von 10 Tagen exprimiert. Der Transfer eines Plasmids mit dem VEGF-Gen auf diese Weise rief die Ausbildung von kornealen Neovaskularisationen hervor, während der Transfer eines Plasmids, das das Gen eines VEGF-Rezeptorantagonisten enthielt, die Ausbildung neuer Gefäße inhibierte. In einer anderen Studie konnte ein therapeutischer Erfolg durch diese Art der Genübertragung erreicht werden, indem ein Plasmid, das ein Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) Glycoprotein D-Interleukin-2 -Fusionsprotein codierte, in den Bindehautsack von Mäusen injiziert wurde. Die Tiere wurden anschließend mit HSV-1 infiziert. Eine herpetische stromale Keratitis wurde so unterdrückt, wohingegen die epitheliale Erkrankung nicht beeinflusst wurde (Inoue 2002). In einer weiteren Untersuchung führte die Injektion von nackter DNA, die einen Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten codiert, in verletzte Rattenhornhäute zu einer Transgenexpression von bis zu zwei Wochen (Moore 2002). Die in diesen Studien eingesetzte DNA Menge lag zwischen 1 und 100 µg/Auge.

#### - Elektroporation und Iontophorese

Ein Gentransfer mittels Elektroporation basiert auf einer Zelltransduktion mit Plasmid-DNA, indem die Zellen einem starken Elektropuls ausgesetzt werden, der Poren in der Zellmembran hervorruft (Davies 2003). Die Iontophorese unterscheidet sich von der Elektroporation dadurch, dass bei dieser Form des Gentransfers geladene, das Transgen enthaltende Plasmide eingesetzt werden. Diese werden durch ein elektrisches Feld in das Zielgewebe transportiert. Diese Methoden sind effektiver als die Applikation von nackter DNA. Es wurde gezeigt, daß DNA-Moleküle bis zu einer Größe von 8000kDa mittels Iontophorese durch die Sklera geschleust werden können (Davies 2003). Die Elektroporation ist ebenso effektiv. Ein therapeutischer Effekt dieser Methode konnte an einem Rattenmodell zur intraokularen Fibrinbildung gezeigt werden. Ein das Gewebe-Plasminogen-Aktivator (TPA)-Gen enthaltendes Plasmid wurde in die Vorderkammer der Tiere injiziert, und die Hornhaut wurde einem elektrischen Feld durch Platzierung einer Sonde auf der okulären Oberfläche ausgesetzt. Nach Anlage eines Stromes konnte eine Genexpression in den Endothelzellen nachgewiesen werden (Sakamoto 1999). Durch Injektion von Plasmiden in eine Hornhaut-Stromatasche wurde auch eine Transfektion der Keratozyten durch diese Technik erreicht (Oshima 2002). Die Transgenexpression konnte für 4 - 10 Tage aufrechterhalten werden. In einer weiteren Untersuchung konnte ein therapeutischer Effekt einer subkonjunktivalen Plasmidinjektion und nachfolgender Elektroporation gezeigt werden. Das Plasmid codierte die humane Kringle-5-Domäne von Plasminogen. Durch die Transduktion dieses Gens wurde eine Inhibition der kornealen Neovaskularisation in einem Modell der Laugenverätzung der okulären Oberfläche an der Ratte gezeigt (Yu 2003). Die DNA-Menge, die für die Elektroporation und Iontophorese eingesetzt wurde, liegt zwischen 2,5 ng und 50 µg pro Auge. Die durch diese Technik erzielte Transgenexpression ist im Allgemeinen als transient anzusehen.

#### - Ballistischer Gentransfer

Unter ballistischem Gentransfer versteht man, Plasmid-DNA, die an Gold oder Tungsten Mikropartikel adhärent ist, mechanisch durch die hohe Beschleunigung einer "Gene Gun" in das Zielgewebe einzuschleusen. Diese "Genkanonen" arbeiten in der Regel auf Heliumbasis. Dieses Verfahren ist mit einigem Erfolg zur Transduktion von kornealen Epithelzellen eingesetzt worden. Dabei wurden sowohl in vitro als auch in vivo Versuche durchgeführt (Tanelian 1997, Shiraishi 1998, Zhang 2002, Müller 2002). Mit weniger Erfolg wurden

Versuche zur Transduktion des kornealen Endothels durchgeführt (Klebe 2000). Der Beschuß der kornealen Oberfläche kann Epithelzellschäden hervorrufen. Diese konnten durch bessere Kontrolle des Abstands zwischen Kanone und Hornhautoberfläche sowie durch Reduktion der Masse der Goldpartikel reduziert werden (Zhang 2002). Dennoch scheint der Einsatz dieser Technik zu einer Makrophageninfiltration in das Hornhautstroma zu führen, die als Zeichen der Stimulation einer Entzündungsreaktion gewertet werden kann (Müller 2002). Der Versuch der endothelialen Transduktion von von Schafen stammenden Hornhäuten mittels ballistischem Gentransfer führte zu geringer Transduktionsrate und zu einem hohem Maß an Zellschädigungen (Klebe 2000). Zusammenfassend ausgedrückt stellt der ballistische Gentransfer eine Möglichkeit der Transduktion kornealer Zellen dar, der Nutzen ist aber durch das Risiko der Zellschädigung und nachfolgender Induktion einer Entzündung limitiert, insbesondere da die Entzündungsinduktion im Hinblick auf die Reduktion des Abstoßungsrisikos nach Keratoplastik kontraproduktiv ist.

## ***2.2. Virale Vektoren***

Die Vor- und Nachteile des Einsatzes von viralen Vektoren für die Gentherapie sind bereits in der Literatur zusammenfassend dargestellt worden (Somia 2000). Für den Einsatz an der Hornhaut sind bisher replikationsdefiziente Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren, Herpes-simplex-Viren, Retroviren und weitere Lentiviren verwendet worden.

### **2.2.1 Replikationsdefiziente adenovirale Vektoren**

Adenovirale Vektoren können zu hohen Titern gezüchtet werden, sind verhältnismäßig leicht zu reinigen und können relativ große Transgene aufnehmen. Darüber hinaus haben sie ein großes Spektrum an Zielzellen, sind nicht integrativ und können sowohl sich teilende als auch ruhende Säugetierzellen effektiv infizieren (Somia 2000). Demgegenüber besteht das Risiko, dass die Adenoviren eine Immunreaktion auslösen, außerdem ist die Expression der Transgene nicht immer von langer Dauer. Im Jahr 1998 wurde von Vogelstein und Mitarbeitern ein vereinfachtes Shuttle-Vektor-System zur Herstellung von rekombinanten Adenoviren vorgestellt (He 1998). Dieses System wurde auch kommerziell unter dem Namen "AdEasy™" System von der Firma Qbiogene Inc vertrieben. Die Verfügbarkeit dieser Technologie, die einfache Handhabbarkeit und die hohen Infektionsraten, die mit dieser

Technik erreichbar sind, sind wesentlich für das bleibende Interesse an diesen Vektoren für Transfektionsuntersuchungen am Auge verantwortlich.

Der erste Einsatz eines adenoviralen Vektors für Transfektionsversuche am Auge erfolgte 1995. Dabei wurde ein replikations-defizientes adenovirales Konstrukt, das ein Reportergen codierte, in die Vorderkammer von Mäusen injiziert und eine Transfektion der Endothelzellen erreicht (Budenz 1995). Kurz danach wurden auch die Hornhäute von Kaninchen (Larkin 1996) und Ratten (Fehervari 1997) sowie humane Hornhäute (Oral 1997) ex-vivo mittels dieses Vektors transfiziert. Eine Transgenexpression konnte dabei nur über kürzere Zeiträume bis zu einem Monat detektiert werden (Oral 1997). Adenovirale Vektoren infizieren typischerweise 80-100% der kornealen Endothelzellen nach Inkubationszeiten von etwa 2 Stunden. Das korneale Epithel ist im allgemeinen schwerer zu infizieren, obwohl auch hier mit hohen Virustitern Erfolge möglich sind (Tsubota 1998). Für die erfolgreiche Infektion von Säugetierzellen durch Adenoviren ist das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin notwendig. Dieses wird sowohl in humanen Epithel- als auch Endothelzellen exprimiert (Rayner 1998). Inzwischen sind auch bereits mehrere Nicht-Reportergene (therapeutische Gene) mittels Adenoviren in die Hornhaut transferiert worden. Dazu gehören das CTLA4-Ig Fusionsprotein (Oral 1997) sowie das Interleukin 4 Gen (Ritter 1999). Darüber hinaus wurden ein VEGF Rezeptor Antagonist, lösliches Flt-1 sowie Antisense-VEGF-RNA mittels adenoviralem Vektor erfolgreich in die Hornhäute in einem experimentellen Rattenmodell transferiert und dadurch die korneale Neovaskularisation inhibiert (Lai 2001, Lai 2002).

### 2.2.2 Adeno-assoziierte virale Vektoren

Das Adeno-assoziierte Virus (AAV) ist ein integratives DNA Virus, das eine Langzeit-Expression eines Transgens erzeugen kann, wenn es als gentherapeutischer Vektor verwendet wird (Somia 2000). AAV ist schwieriger zu kultivieren und hohe Titer sind weniger leicht erreichbar als im Fall von Adenoviren. Die Aufnahmefähigkeit für exogene cDNA ist begrenzt. Es konnte gezeigt werden, daß mit rekombinanten Adeno-assoziierten Viren in vitro etwa 2 % von Kaninchen- und auch humanen Endothelzellen transduziert werden können. Eine Transgenexpression war danach über 3-4 Wochen nachweisbar (Hudde 2000). Bei in vivo Versuchen an Kaninchen konnte die Transfektionseffizienz erheblich gesteigert werden, indem gleichzeitig mit der Transfektion ein Entzündungsreiz durch eine intracamerale Endotoxin-Injektion ausgelöst wurde. Das eingeschleuste Reportergen war bei dieser Versuchsanordnung in 90 % der kornealen Endothelzellen nachweisbar (Tsai 2002). Die

Höhe der Expression wurde über 2 Wochen aufrechterhalten und konnte durch eine weitere Endotoxin-Injektion erneut ausgelöst werden. AAV wurde außerdem zur Transfektion von Keratozyten des Kaninchens eingesetzt. Dabei wurde die Virussuspension in eine stromale "Tasche" der Kornea nach Präparation eines Flaps gegeben (Mohan 2003).

### 2.2.3 Herpes-simplex-Virus Vektoren

Herpes-simplex-Viren (HSV) können eine lebenslange latente Infektion beim Menschen hervorrufen. Bekannterweise infizieren Herpes-simplex Viren postmitotische Zellen.

Attenuierte oder rekombinante HSV wurden zur Anwendung an okulären Geweben bereits sehr früh in der Entwicklung der Gentherapie am Auge vorgeschlagen (PePOSE 1994).

Tatsächlich erreicht man jedoch eine recht geringe Transfektionseffizienz. Der Anteil der mit diesem Vektortyp infizierbaren kornealen Endothelzellen reicht von einzelnen Zellen z.B., beim Schaf (Klebe 2001) bis zu 5 % beim Kaninchen oder beim Menschen (Hudde 2000). Außerdem wurden zytotoxische Effekte bei Einsatz dieses Vektors dokumentiert (Hudde 2000).

### 2.2.4. Retrovirale und lentivirale Vektoren

Replikations-defiziente Retroviren und Lentiviren sind integrative Vektoren, die eine über längere Zeit stabile Transgenexpression in den Zielzellen hervorrufen können (Somia 2000).

Beide Typen können pseudotypisiert werden, so dass eine große Vielfalt von Zielzellen erreicht werden kann (Somia 2000). Retrovirale Vektoren sind nicht in der Lage, effektiv postmitotische Zellen zu infizieren. Lentiviren können dagegen sowohl mitotisch aktive als auch inaktive Zellen transduzieren. Retroviren sind daher theoretisch zur Transfektion von kornealen Epithelzellen und Keratozyten geeignet, während das nicht-proliferierende Endothel von diesen Viren nicht erreicht wird. Lentiviren sind dagegen für alle Zelltypen der Hornhaut geeignet.

Humane Keratozyten in Kultur und korneale Epithelvorläuferzellen sind bereits mit einem replikations-defizienten Moloney Ratten-Leukämie retroviralen Vektor erfolgreich transduziert worden (Seitz 1998, Bradshaw 1999). In einem experimentellen Modell für Excimer-Lasertherapie-induzierten kornealen Haze am Kaninchen wurden Keratozyten mit einem retroviralen Vektor transduziert. Dieser enthielt ein Konstrukt mit einer dominant negativen Mutante des Cyclin G1 (Behrens 2002). Außerdem konnte gezeigt werden, daß mit einem auf dem Humanen Immundefizienzvirus 1 (HIV-1) basierenden lentiviralen Vektor



humane korneale Endothelzellen, Epithelzellen und Keratozyten mit einem Reportergen transduziert werden können. Dieses wird in einer verlängerten Organkultur bis zu 60 Tage lang exprimiert (Wang 2000). Die Injektion dieses Vektors in die Vorderkammer von neugeborenen Mäusen führte zu einer stabilen Infektion der kornealen Endothelzellen (Bainbridge 2001). Mit der Verwendung von auf HIV basierenden lentiviralen Vektoren sind verständlicherweise die größten Befürchtungen hinsichtlich einer nicht absolut sicher auszuschließenden Infektion mit replikations-kompetenten Viren verbunden. In diesem Zusammenhang ist die Untersuchung von Takahashi aus dem Jahr 2002 interessant. Die Autoren transduzierten korneale Endothelzellen mit einem replikations-defizienten bovinen Immundefizienz-Lentivirus, der für Menschen nicht pathogen ist (Takahashi 2002).

### ***2.3 Nicht-virale Vektoren***

Nicht-virale Vektoren sind eine heterogene Gruppe von Molekülen. Ein Teil dieser Verbindungen besteht aus Lipiden oder Dendrimeren, während andere Vehikel die zellangreifenden Eigenschaften von Integrinen oder Antikörpern nutzen. Zu den Vorteilen dieser Verbindungen gehört, daß sie große Mengen an DNA aufnehmen können. Außerdem werden sie als verhältnismäßig sicher angesehen, da keine potentiell infektiösen Partikel Verwendung finden. Zu den auf der anderen Seite bestehenden Nachteilen gehören eine häufig geringere Transfektionseffizienz und eine sehr variable Dauer der Expression des Transgens. Inzwischen ist auch eine Reihe von Hybridvektoren bei Transfektionsversuchen getestet worden. Dabei ließ sich zum Teil eine Verbesserung der Transduktionseffizienz nachweisen.

#### **2.3.1 Auf Lipiden oder Dendrimeren basierende nicht-virale Vektoren**

Der Nutzen sowie die Vor- und Nachteile von liposomalen Vektoren wurden in einer Übersicht aus dem Jahr 2002 dargestellt. Die höchsten Transfektionsraten werden mit kationischen Liposomen erzielt, die die DNA durch Endozytose und nicht durch Fusion der Liposomen mit der Zellmembran in die Zelle abgeben. Die Toxizität von Liposomen für die Zellmembran ist sehr variabel, eine Reihe von Verbindungen ist aber in geeigneter Konzentration für die Zellmembran der kornealen Endothelzellen nicht toxisch.

Transfektionsraten von bis zu 5 –10 % können mit dieser Technik erreicht werden (Pleyer

2002). Liposomen können topisch am Auge appliziert werden, können aber auch direkt intraokular injiziert werden. In einer Studie aus dem Jahr 1996 wurden Liposomen/Reporter-gen-DNA-Komplexe in die Vorderkammer von Ratten injiziert. Anschließend war eine Markergenexpression im kornealen Epithel sowie im Ziliarkörper-epithel nachweisbar, jedoch nicht im kornealen Endothel (Masuda 1996). In der Höhe der Transfektionseffizienz gibt es speziesspezifische Unterschiede. An einem Schaf-Modell waren 6 getestete liposomale Formulierungen uneffektiv, d.h. die beste Formulierung erreichte eine Transfektionsrate von  $< 0,01\%$  der Zellen (Klebe 2001).

Aktivierte Polyamidoamin-Dendrimere sind alternative nicht-virale Vektoren. Diese bilden ebenfalls Komplexe mit negativ geladenen DNA-Molekülen. Mit Dendrimern wurden Transfektionsraten von 6 – 10 % erreicht. Dabei wurden sowohl korneale Endothelzellen des Kaninchens als auch humane korneale Endothelien untersucht. In vitro wurde dabei das Maximum der Transgenexpression am 3. Tag nach der Transfektion erreicht (Hudde 1999). Aktivierte Dendrimer-Vektoren benötigen für die Wirksamkeit im Gegensatz zu anderen nicht-viralen Vektoren kein Chloroquin und sind intraokular verhältnismäßig wenig toxisch. Zusammenfassend werden Liposomen und Dendrimere als wirksame, aber im Vergleich zu viralen Vektoren weniger effiziente Vehikel für den Gentransfer in die Hornhaut angesehen. Die von diesen Vektoren erzielte Transgenexpression ist in der Regel transient.

### 2.3.2 Auf Integrinen oder Antikörpern basierende nicht-virale Vektoren

Einer der ersten Berichte über effizienten nicht-viralen Gentransfer in okuläre Gewebe bezieht sich auf den Einsatz eines neuen synthetischen Peptids, das eine Integrin bindende Sequenz aus dem Gift (mit dem Namen Molossin) der Grubenviper, einer amerikanischen Schlangenart, einschließt sowie eine Poly-L-Lysin-Sequenz, um die Bindung an die genomische DNA zu ermöglichen (Shewring 1997).

Wenn dieser sogenannte Molossin-Vektor mit einem für ein Reporter-gen codierenden Plasmid komplexiert wird, wird die Transfektion von etwa 30 % der kornealen Endothelzellen des Kaninchens 3 Tage nach Applikation der Vektoren erreicht. Der Komplexlösung muß bei dieser Technik Chloroquin zugesetzt werden.

Keratozyten und korneale Epithelzellen werden auf diese Weise nicht transfiziert. Der gleiche Vektor wurde auch effektiv zur Transfektion von humanen und vom Schwein stammenden

Endothelien eingesetzt. Ein verwandter Vektor, der das Integrin-bindende Motiv RGD (Arginin/Glycin/Asparaginsäure) gekoppelt an einen Poly-Lysin Schwanz enthält, war geeignet, Plasmid-DNA in 25 % der Endothelzellen des Kaninchens *in vitro* zu transferieren. Dieser Vektor enthielt außerdem ein kationisches Liposom (Hart 1998).

### 2.3.3 Hybrid Vektoren

Unter Hybridvektoren versteht man die Kombination unterschiedlicher Vektorsysteme zur Erhöhung der Transfektionseffizienz oder der Spezifität der Infektion bestimmter Zellen. Bei der Lipoadenofektion handelt es sich um eine Technik, bei der zunächst die das Transgen enthaltende cDNA mit einer Lipidformulierung zu einem DNA/Liposomenkomplex komplexiert wird. Diesem wird dann ein Adenovirus zugegeben. Mit dieser Technik wurden bis zu 50 % Transfektionsraten an den kornealen Endothelzellen des Kaninchens erreicht (Arancibia-Carcamo 1998). Die Lipofektion mit einem Komplex aus einem Liposom und dem Transferrin-Rezeptor war ebenfalls zur Transfektion von kornealen Endothelzellen effektiv. Bei dieser Technik muß der Liposomensuspension allerdings Chloroquin zugegeben werden. (Tan 2001). Immunoliposomen sind ursprünglich Liposomen, an die monoklonale Antikörper gekoppelt werden. Ein Vektor mit einem Antikörper gegen den Transferrin-Rezeptor transfizierte erfolgreich humane korneale Endothelzellen *in vitro* (Tan 2003). In den meisten dieser Arbeiten wurden die Vektoren intraokular oder periokulär appliziert. In der Studie von Zhu aus dem Jahr 2002 wurden Immunoliposomen, die ebenfalls einen Transferrin-Rezeptor-Agonisten enthielten, intravenös bei Mäusen injiziert. Nach 48 Stunden wurde die Genexpression in Transferrin-Rezeptor-positiven okulären Geweben (Epithelien) gefunden und damit auch im kornealen Epithel (Zhu 2002).

### **3. Einsatz der Gentherapie zur Prophylaxe der Immunreaktion nach Keratoplastik**

#### ***3.1. Verlängerung des Transplantatüberlebens durch Gentransfer***

Es gibt nur wenige Berichte, die eine Verlängerung des Transplantatüberlebens durch gentherapeutische Ansätze in experimentellen Keratoplastikmodellen zeigen. Bei Einsatz eines Lentivirus, das ein Endostatin-5-Kringle-Fusionsprotein codierte, konnte in einem Kaninchenmodell das Ausmaß der kornealen Neovaskularisationen verringert und das Transplantatüberleben verlängert werden (Murthy 2003).

Durch Einsatz von adenoviraler Gentransfertechnik wurde ein für löslichen Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor codierendes Transgen in Kaninchenhornhäute transferiert. Dadurch wurde das Transplantatüberleben geringfügig verlängert (Rayner 2001). Die Transduktion von Rattenhornhäuten *ex-vivo* mit dem CTLA4-Ig-Fusionsprotein, das von einem replikationsdefizienten adenoviralen Vektor codiert wurde, verlängerte das Überleben von Hornhauttransplantaten der Ratte leicht, während das Überleben der Transplantate durch systemische Applikation des Vektors deutlich anstieg (Comer 2002).

Ballistischer Gentransfer von Interleukin-4 oder CTLA4 in die Spenderhornhaut am 10.Tag nach der Transplantation führte zu einem verlängerten Transplantatüberleben. (Konig-Merediz 2000). Ebenso hatte der ballistische Gentransfer von IL-4 und CTLA4 in die Empfängerhornhaut am Tag vor der Transplantation einen günstigen Effekt auf das Transplantatüberleben (Müller 2002). Schließlich zeigte auch der ballistische Transfer dieser Transgene in das Unterlid der transplantierten Augen einen günstigen Effekt (Zhang 2003).

Am Keratoplastikmodell des Schafs wurde eine Verlängerung des Transplantatüberlebens durch adenoviralen Interleukin-10-Gentransfer gezeigt (Klebe 2001), während adenoviraler Interleukin-4-Gentransfer bei der Ratte keine Verlängerung des Transplantatüberlebens bewirkte (Pleyer 2002).

#### ***3.2. Gentherapie zur Prophylaxe der Keratoplastik selbst***

Gentherapeutische Ansätze können auch zur Therapie originärer Hornhautpathologien eingesetzt werden, um somit die Notwendigkeit einer Hornhauttransplantation zu reduzieren. Die Ausgangsbedingungen können dabei sowohl systemisch als auch auf das Auge

beschränkt sein. Beispiele für die erste Situation können die lysosomalen Speicherkrankheiten sein, die zu Hornhauteintrübungen durch intrazelluläre Ablagerungen von nicht-abgebauten Glycosaminoglykanen in sekundären Lysosomen führen. Eine gentherapeutische Behandlung von hämatopoetischen Stammzellen, um die Hornhautpathologie zu verbessern, war allerdings in einem experimentellen Modell für die Mucopolysaccharidose (MPS) VII eher enttäuschend (Wolfe 1992, Xu 2002). Erfolgreicher waren die Resultate bei Therapie von neugeborenen Mäusen in einem Modell für MPS, wenn die Therapie vor Ausbildung der okulären Symptome einsetzte (Kamata 2003).

## 4. Möglichkeiten und Grenzen der klinischen Anwendbarkeit

### 4.1. Aktuelle gentherapeutische Studien

Derzeit gibt es noch keinen gut etablierten klinischen Ansatz zur Modulation oder Prävention der humanen Hornhauttransplantatabstoßung. Darüber hinaus sind derzeit auch noch keine klinischen Studien für diese Indikation in Vorbereitung. Dennoch gibt es bereits einige Ansätze für klinische Untersuchungen zur Gentherapie bei okulären Erkrankungen. In der „Gene Therapy Clinical Trials Worldwide database“ des „Journal of Gene Medicine“ werden zwei Phase I-Studien aufgeführt. Diese betreffen den Einsatz gentherapeutischer Optionen bei der Therapie der Retinitis pigmentosa und beim Glaukom ([www.wiley.co.uk/Genemed/clinical](http://www.wiley.co.uk/Genemed/clinical) 2005).

### 4.2. Gentherapie-assoziierte Gefahren

Die grössten Sicherheitsbedenken entstehen üblicherweise im Hinblick auf den Einsatz von viralen Vektoren zu gentherapeutischen Zwecken. Im Jahr 1999 starb ein 18 jähriger Patient an den Folgen der systemischen Therapie mit einem adenoviralen Vektor (Marshall 1999). Im Jahre 2002 wurde von einer französischen Gruppe über mehrere Fälle von Leukämie berichtet, die infolge einer systemischen Therapie mit retroviralen Vektoren bei Patienten mit schwerer X-Chromosomal-assoziiierter kombinierter Immundefizienz auftraten (Hacein-Bey-Abina 2002, Cavazzano-Calvo 2004). Der erste Fall scheint durch adenovirale Toxizität bedingt gewesen zu sein, während in der zweiten Situation eine induzierte Mutagenese für die ungünstige klinische Wendung ausschlaggebend war.

Die Risiken schwerwiegender oder gar tödlicher Komplikationen müssen abgewogen werden gegen die Ernsthaftigkeit bzw. Gefährlichkeit der zu behandelnden Erkrankung. Eine irreversible Hornhauttransplantatabstoßung ist in keinem Fall lebensbedrohlich, so dass die Anforderungen an die Sicherheit einer für diese Indikation eingesetzten Gentherapie ungleich höher sein müssen als bei anderweitig unbehandelbaren, tödlich verlaufenden malignen Erkrankungen. Eine größere Zahl von Studien hat inzwischen gezeigt, dass durch virale Vektoren die höchste Transfektionseffizienz in der Hornhaut erreicht werden kann. Die Mehrzahl der Studien, die ein verlängertes Transplantatüberleben nach Gentransfer zeigen konnten, setzten virale Vektoren für diesen Zweck ein (Klebe 2001, Rayner 2001, Comer 2002, Murthy 2003). Allerdings ist auch eine Verzögerung der Transplantatabstoßung nach

Gentransfer in das Hornhautepithel mittels ballistischer Verfahren gezeigt worden (König Merediz 2000, Zhang 2003).

Der Vorteil des Einsatzes der Gentherapie am Hornhauttransplantat liegt in der Möglichkeit der Transfektion ex vivo am kultivierten Transplantat (siehe oben). Gemessen am Gesamtorganismus muss außerdem nur eine sehr kleine Zahl von Zellen transfiziert werden und überschüssiger Vektor kann vor der Transplantation verworfen werden. Diese Faktoren haben zur Folge, dass der Körper mit nur einer sehr kleinen Zahl von (viralen) Vektoren in Kontakt kommt. Dennoch sind die Hürden, die vor dem klinischen Einsatz von genterapeutischen Strategien zur Reduktion des Abstoßungsrisikos des Hornhauttransplantats und zur Verlängerung des Transplantatüberlebens überwunden werden müssen, noch erheblich.

## **5. Eigene Untersuchungen des liposomalen / adenoviralen Interleukin-10- Gentransfers ex vivo**

### **5.1. Einführung**

Auf die zentrale Rolle der T-Lymphozyten bei der kornealen Transplantatabstoßung wurde in dieser Arbeit bereits mehrfach hingewiesen. Es gibt eine Reihe von Studien, die zeigen, dass die Transplantatabstoßung im wesentlichen von CD4-positiven T-Zellen vermittelt wird (He 1991). Die von diesen Zellen sezernierten Zytokine spielen bei der Regulation dieses Prozesses eine wesentliche Rolle. Insbesondere die  $T_{H1}$ -vermittelte Reaktion wird mit der Abstoßung der Hornhauttransplantate in Verbindung gebracht (Torres 1996, Sano 1998, Yamagami 1999). Auf der anderen Seite scheint die Auslösung einer  $T_{H2}$ -vermittelten Antwort innerhalb des Transplantats mit einer Toleranzinduktion in Verbindung zu stehen (Lehmann 1997, Yamada 1999). Vor allem das  $T_{H2}$ -Zytokin Interleukin-10 scheint immunmodulierende Eigenschaften zu haben (Moore 1993), die zur Reduktion der kornealen Transplantatabstoßung beitragen könnten.

Die immunsuppressiven Eigenschaften von Interleukin-10 wurden folgendermaßen charakterisiert:

- Inhibition der Aktivierung von Makrophagen durch Blockade der Gamma-Interferon-Produktion von  $T_{H1}$ -Zellen
  - Reduktion der Expression von MHC-II-Molekülen auf der Oberfläche von Monozyten
  - konsekutive Reduktion der antigenspezifischen Proliferation von  $T_H$ -Zellen (Moore 1993).
- Im Genom des Epstein-Barr-Virus wurde ein Gen mit > 80 % iger Homologie zum humanen IL-10 Gen entdeckt (Moore 1990). Das von diesem Gen codierte Protein teilt wesentliche immunsuppressive Eigenschaften des humanen Zytokins, hat aber im Gegensatz zum humanen IL-10 keine immunstimulierenden Nebenwirkungen (DeWaal Malefyt 1991).

Gentherapeutische Ansätze sind die vielversprechendsten Strategien, die intrakorneale Zytokinverfügbarkeit zu erhöhen, da sich Zytokine durch kurze Halbwertszeit, hohe Turn-over-Rate und eng begrenzte lokale Wirkungsentfaltung auszeichnen. Als wesentliche Ziele der kornealen Abstoßungsreaktion (Larkin 1994) bieten sich die kornealen Endothelzellen mehr als die anderen kornealen Zelltypen für die Transfektion mit Zytokingenen an. Wie im vorausgegangenen Kapitel dargestellt, gibt es bereits eine Reihe von Untersuchungen zum



Gentransfer in das korneale Endothel mittels rekombinanten Adenoviren (Fehervari 1997, Oral 1997, Ritter 1999). Dennoch haben die weitverbreiteten adenoviralen Vektoren auch bestimmte unerwünschte Nebenwirkungen. Insbesondere die immunstimulatorischen Effekte dieser Viren sind dabei problematisch und im Falle der Prophylaxe der Abstoßungsreaktion besonders kontraproduktiv (Yang 1994).

Zur Vermeidung dieses Problems besteht daher weiterhin ein Bedarf an alternativen gentherapeutischen Strategien. Auf der anderen Seite ist eine ausreichende Transfektionseffizienz der Vektoren und Vehikel erforderlich, um ausreichende therapeutische Wirkstoffspiegel der eingesetzten Zytokine in der Hornhaut zu erreichen.

In dieser Untersuchung verglichen wir die Transfektionseffizienz von 2 alternativen Strategien des Gentransfers in die Hornhaut, und zwar die Transduktion des Endothels mit einem rekombinanten adenoviralen Vektor und die Transfektion mit Liposomen. Dabei wurden sowohl bovine Endothelzellkulturen (BCEC) als auch organkultivierte humane Hornhäute (HC) untersucht. Bei dem eingesetzten Zytokin handelte es sich um das virale Interleukin-10 (vIL-10).

Seit der Erstbeschreibung der liposomalen Transfektion (Felgner 1987) sind eine Vielzahl von Lipidverbindungen bei Experimenten zum Gentransfer in verschiedenste Gewebe getestet worden. Bei den für diesen Zweck eingesetzten Liposomen handelt es sich um positiv geladene Phospholipidverbindungen, die neutrale Komplexe mit der negativ geladenen DNA bilden. Diese Komplexe haben die Fähigkeit, Zell- und Zellkernmembranen durch einen nicht letztlich geklärten Mechanismus zu passieren. Zu den beteiligten Phänomenen gehören Endozytose, Membranfusion und Lipidaustausch zwischen Liposom und Membran (Blumenthal 1982, New 1990). Die Interaktionen zwischen Liposomen und den Zellmembranen okulärer Zellen sind bereits in einer früheren Arbeit untersucht worden (Pleyer 1995). In den letzten Jahren sind mehrere Studien zur Optimierung des liposomalen Gentransfers in verschiedene humane Gewebe veröffentlicht worden (Armeanu 2000, Chan 2000).

Ziel der in diesem Abschnitt dargestellten Untersuchungen war die Analyse, ob Liposomen geeignete Alternativen für den Zytokingentransfer in die Hornhaut und insbesondere das Endothel darstellen. Für diese Untersuchungen wurde das virale Interleukin-10 Gen eingesetzt, da vIL-10-Spiegel leicht im Überstand mittels spezifischem ELISA gemessen werden können. Der erfolgreiche Transfer von Markergenen ( $\beta$ -Galactosidase) mittels

Liposomen in okuläre Gewebe wurde bereits früher gezeigt (Masuda 1996). Auch die Optimierung des liposomalen Gentransfers in das korneale Endothel ist bereits in einer früheren Untersuchung dargestellt worden (Pleyer 2001). Diese Studien haben aber weder unterschiedliche Vektoren direkt an Zellkulturen und humanen Hornhäuten verglichen, noch die Wirkung des Transfers eines therapeutischen Zytokins auf die Zelltoxizität bzw. Störung der Gewebeintegrität analysiert. Daher war Ziel dieser Untersuchung, die Effizienz des Gentransfers von vIL-10 in bovine korneale Endothelzellen in Kultur (BCEC) und in organkultivierte humane Hornhäute (HC) mittels Liposomen und Adenoviren direkt zu vergleichen.

## **5.2. Material und Methoden**

### **- Bovine korneale Endothelzellen**

Bovine korneale endotheliale Zellen ("Bovine corneal endothelial cells": BCEC) wurden isoliert und kultiviert wie in der Literatur bereits vor fast 30 Jahren beschrieben wurde (Gospadorowicz 1977). Zusammengefasst dargestellt wurden Rinderaugen zunächst in PVP-Iod desinfiziert, dann wurde das Iod durch Natriumthiosulfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) zu Iodid reduziert ("abgebaut"). Dann wurden die Bulbi in Phosphat-gepufferter Salzlösung ("phosphate buffered saline": PBS) abgespült. Anschließend wurden Korneoskleralscheiben durch Trepanation aus den Bulbi gewonnen und die Endothelzellschicht durch vorsichtiges Abstreifen mit einem Hockeymesser isoliert. Um verbliebene Zelladhäsionen zu lösen, wurden die Zellen in Trypsinlösung gegeben und dann in 12-Well-Zellkulturschalen ausgesät. Als Kulturmedium wurde DMEM-Zellkulturmedium mit Zusatz von 5 % fetalem Kälberserum ("fetal calf serum": FCS) verwendet. Das Zellkulturmedium enthielt außerdem HEPES-Puffer, Penicillin und Streptomycin. Nachdem die Endothelzellen bis zur Subkonfluenz gewachsen waren, was am 10. Tag nach Aussaat der Fall war, wurden die Zellen in 96-Well-Zellkulturschalen überführt. Dabei wurde eine Zellzahl von 5000 Endothelzellen pro Well ausgesät. Dann ließ man die Zellen erneut bis zur Subkonfluenz (70 % Konfluenz) wachsen (5 Tage). Die liposomale Transfektion wurde in DMEM mit Zusatz von 2,5 % FCS ausgeführt. Nach der Transfektion wurden die Zellen in DMEM 10 % FCS weiterkultiviert.

- Humane organkultivierte Hornhäute ("Human corneas":HC)

Die eingesetzten humanen Hornhäute stammten aus der Hornhautbank Berlin. Die Hornhäute waren für einen klinischen Einsatz ungeeignet aufgrund von systemischen viralen Infektionen mit Hepatitis-B-Virus (HBV) oder Hepatitis-C-Virus (HCV), hatten aber eine normale Endothelzellzahl (durchschnittlich 2200 Zellen / mm<sup>2</sup>). Die Präparation der isolierten Spenderbulbi erfolgte nach den Grundsätzen der Hornhautbank Berlin. Die enukleierten Augen wurden zunächst in PVP-Iod desinfiziert. Dann wurde das Iod durch Zusatz von Natriumthiosulfat (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) zu Iodid reduziert und in PBS-Lösung abgespült. Anschließend wurden die Korneoskleralscheiben mit einem 15 mm Trepan trepaniert und gegebenenfalls mit einer Vannasschere nachgeschnitten. Die Kultivierung der Korneoskleralscheiben erfolgte in DMEM-Organokulturmedium unter Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS), Penicillin, Streptomycin und Amphotericin B. Dabei handelte es sich um das gleiche Medium, das auch zur Kultivierung der für die Transplantation vorgesehenen Hornhäute verwendet wird. Die Hornhäute wurden im Brutschrank bei 31 ° C für einen Zeitraum von 2 Wochen kultiviert, bevor sie für die Transfektionsexperimente eingesetzt wurden.

- Liposomen

Für diese Experimente wurden zwei Lipid-Formulierungen eingesetzt, die in vorausgegangenen Experimenten zur liposomalen Markergentransfektion in bovine Endothelzellkulturen (BCEC) die höchste Transfektionseffizienz gezeigt hatten. Dabei handelte es sich um DDAB/DOPE 30/70 und SP-Chol/DOPE 20/80 (Pleyer 2001). Die anderen in der genannten vorausgegangenen Arbeit getesteten Formulierungen waren: DAC/Chol, DOSGA, DMRIE, SP-SIT, DOAPβAla, DOTMA, Superfect, Unifectin, DOCSPER and Lipofectin. Die DDAB/DOPE 30/70 Lipidformulierung besteht aus Dimethyldioctadecyl-ammoniumbromid (DDAB) (SIGMA) and dem neutralen Helferlipid Dioleoylphosphatidyl-ethanolamin (DOPE) in einem molaren Verhältnis von 30:70, die zweite in dieser Studie eingesetzte Verbindung besteht aus Dicarbobenzoxy-spermin-carbamoyl-cholesterol (SP-CHOL) and DOPE in einem molaren Verhältnis von 20:80. Zusammengefaßt erfolgte die Präparation der Liposomen folgendermaßen: Die Lipide wurden in Trichlormethan gelöst, dann ließ man das organische Lösungsmittel verdampfen. Der resultierende Lipidfilm wurde dann im Vakuum getrocknet. Dann wurden die Lipide in

deionisiertem Wasser resuspendiert, die Liposomen bilden sich dann unter Schütteln über mehrere Stunden aus. Letztendlich lag die Lipidkonzentration der Suspension bei 1 mg/ml. Beide verwendeten Lipidformulierungen bilden kationische Liposomen aus.

#### - Plasmid

Bei dem verwendeten Plasmid, das das virale Interleukin-10-Gen BCRF-1 unter der Kontrolle eines SV-40-Promotors enthielt, handelte es sich um pcDSRa-BCRF-1. Es wurde von Dr. R. de WaalMalefyt, Dept. of Immunobiology, DNAX, Palo Alto, Ca, USA freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Reinigung des Plasmids war nach Standardverfahren erfolgt.

#### - Liposomale Transfektion von BCEC und HC

Die Lipide wurden in unterschiedlichen Konzentrationen mit der Plasmid DNA für 20 min. inkubiert, so dass sich Lipid/DNA-Komplexe bilden konnten. Dann wurden die Liposomen zu den bovinen Endothelzellkulturen transferiert. Die eingesetzten Lipidkonzentrationen reichten von 1,25 mg pro Well bis zu 40 mg pro Well der Kulturschale. Die Plasmidkonzentration betrug 1,0 mg pro Well. Als Kontrolle dienten Zellen, denen nur das Plasmid ohne Lipide zugesetzt wurde, und außerdem Zellen, die mit Leer-Liposomen (ohne DNA) behandelt wurden. Die Zellen wurden für 4 Stunden mit den Liposomen inkubiert. Während des Transfektionsprozesses war eine Serumkonzentration von 2,5 % in dem Zellkulturmedium eingestellt worden. Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen und frisches Kulturmedium (DMEM 10 % FCS) zugegeben (0,2 ml pro Well). Die Zellen wurden dann für weitere 44 Stunden kultiviert. Dann wurde das Kulturmedium von den Zellen abgenommen. Schließlich wurde die vIL-10 Konzentration in diesem Überstand mittels ELISA-Technik bestimmt. Das verwendete Testsystem war spezifisch für vIL-10 und IL-10 (Immunotech, Hamburg). Alle Transfektionsversuche wurden dreifach ausgeführt.

Für die liposomale Transfektion der organkultivierten Hornhäute wurden die DNA/Liposomen-Komplexe auf die gleiche Weise, wie für den Einsatz bei den Zellkulturen beschrieben, hergestellt. Die Hornhäute wurden geviertelt und auf 24 Well-Zellkulturplatten verteilt. Dann wurden die Hornhäute mit der DNA/Liposomenkomplex-Suspension inkubiert. Die Inkubationszeit betrug wiederum 4 h, die Serumkonzentration während der Transfektion wurde auf 2,5 % eingestellt. Die Hornhäute wurden dann mit PBS abgespült und mit frischem

Organkulturmedium versehen. Nach 4 h wurde die vIL-10 Konzentration mittels ELISA im Überstand gemessen.

#### - Rekombinanter Adenovirus

Für die hier dargestellten Versuche wurden rekombinante Adenoviren, die das virale Interleukin-10 (vIL-10) Gen kodierten, hergestellt. Dazu wurde die cDNA von vIL-10 in ein pACCMV Genkonstrukt eingebaut. Dieses enthält 1,3 Map-Einheiten der Sequenz des linken Endes eines adenoviralen Genoms (Ad5). Außerdem enthält das Konstrukt den frühen CMV-Promotor, den pUC19Polylinker, SV40-Poly(A)-Signalsequenzen und die Map-Einheiten 9 – 17 des Ad5 Genoms. Das Ad-Plasmid wurde in die Zelllinie 911 (Fallaux 1996) kotransfiziert zusammen mit dem großen adenoviralen Plasmid pJM 17, indem die Standard-Calciumphosphat Fällungstechnik verwandt wurde.

Das adenovirale Genkonstrukt, das durch homologe Rekombination zwischen dem pJM17Vektor und dem pACCMV-Vektor gebildet wurde, enthielt die vIL-10 cDNA, war Replikations-defizient und war effektiv gepackt, um infektiöse Viren zu bilden. Ad-Plaques wurden aufgenommen und in 60 mm-Platten mit 911-Zellen propagiert (Graham 1991). Für die Propagierung und Reinigung der rekombinanten Ad wurden die 911-Zellen in DMEM/ 10 % FCS, 1% Penicillin und Streptomycin auf 15-cm-Platten kultiviert und in einer Multiplizität von 5 – 10 infiziert. Nach 36 –48 Stunden, wenn der zytopathische Effekt vollständig war, wurden die Zellen aufgenommen, und die Viren wurden durch 5-maliges Frieren und Auftauen freigesetzt. Dann wurden die Viren mittels eines Cäsiumchlorid-(CsCl)-Gradienten gereinigt. Das Virusband wurde aufgenommen und über Sepharose CL6B (Pharmacia, Freiburg) spin-dialysiert. Anschließend wurde das Virus aliquotiert und bei – 80 °C nach Zugabe von 10 % Glycerol aufbewahrt. Um die endgültige Präparation zu titrieren, wurde ein Teil der Virussuspension seriell verdünnt und auf die Fähigkeit, Plaques in 911-Zell-Monolayern zu bilden, getestet. Die Plaquebildungsfähigkeit lag bei unterschiedlichen Viruspräparationen zwischen  $1 \times 10^{10}$  und  $1 \times 10^{11}$  Plaque-Bildungs-Einheiten, „Plaque-forming units“ (PFU) pro Milliliter.

#### - Adenovirale Transduktion

Zur Ad-Transduktion von bovinen kornealen Endothelzellen (BCEC) wurde ein bereits früher publiziertes Protokoll angewendet (Ritter 1999). Die Ad-Vorratslösung wurde seriell in DMEM / 2 % FCS verdünnt. Die Endothelzellen wurden auf eine Konzentration von  $2 \times 10^4$

Zellen pro Well einer 96-Loch Zellkulturplatte eingestellt. Die Zellen wurden nun mit verschiedenen Konzentrationen des Virus inkubiert, und zwar mit einer Infektionsvervielfachung („Multiplicity of infection“ MOI) von 1 bis 1000. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37 ° C. Nachdem die Zellen in DMEM/10% FCS gewaschen worden waren, wurden sie in DMEM für 2 weitere Tage kultiviert. Nach 44 Stunden (gleicher Zeitraum wie bei der liposomalen Transfektion) wurden die Überstände abgenommen und mittels ELISA (Immunotech, Hamburg) auf den Gehalt an vIL-10 untersucht.

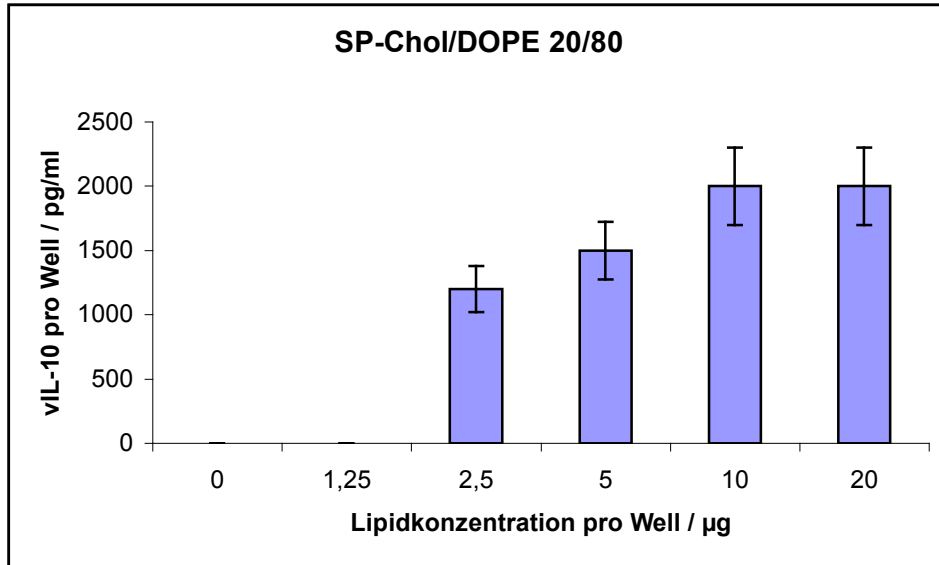
- Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung der erzielten vIL-10 Sekretion nach der liposomalen und der adenoviralen Transfektion wurde der ungepaarte t-Test eingesetzt.

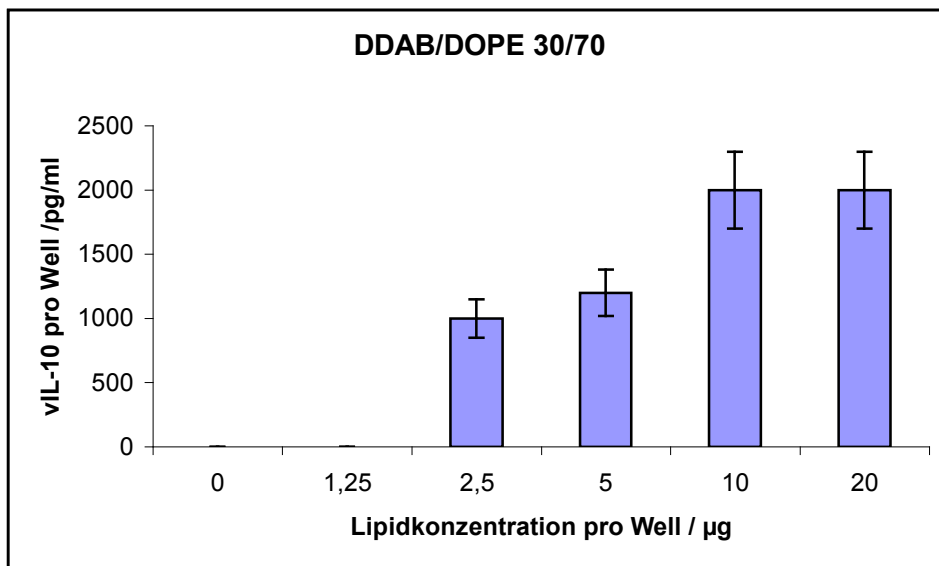
### ***5.3. Ergebnisse***

Ziel der in diesem Abschnitt dargestellten Untersuchungen war es, die Transfektionseffizienz von Liposomen und Adenoviren direkt zu vergleichen und zwar an Endothelzellkulturen (BCEC ) und an organkultivierten humanen Hornhäuten. Die Transfektion der kultivierten bovinen Endothelzellen mit dem vIL-10 exprimierenden Vektor führte bei beiden getesteten liposomalen Formulierungen zu gut meßbaren Konzentrationen von vIL-10 im Überstand nach 44 Stunden.(Abbildung 30).

a)



b)



**Abbildung 30: vIL-10 Sekretion von BCEC nach liposomaler vIL-10 Gen-Transfektion mit unterschiedlicher Liposomenkonzentration und 2 verschiedenen Lipiden a: SP-Chol/Dope; b: DDAB/Dope**

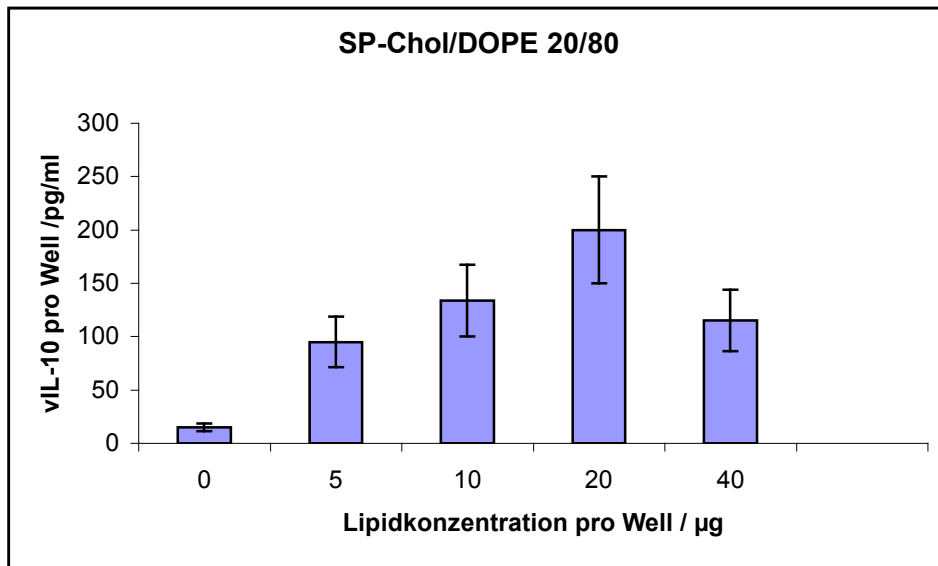
Die erzielten vIL-10 Konzentrationen reichten von 0,6 bis > 2 ng /ml im Überstand von 5000 BCEC, die initial in jedes Well der Zellkulturplatte ausgesät worden waren. Die Transfektionseffizienz und die vIL-10 Produktion erhöhte sich mit steigender Konzentration der eingesetzten Lipide. Die optimale Lipidkonzentration, die zur höchsten Zytokinexpression bei niedrigster liposomaler Toxizität führte, lag bei 10 µg Lipid /Well. In den Kontroll-Wells, in denen entweder reines Plasmid oder leere Liposomen ohne DNA zugegeben worden waren, war kein vIL-10 messbar.

Ebenso wie in früheren Studien zum liposomalen Markergentransfer (Pleyer 2001) erwiesen sich Lipidkonzentrationen von 1,25 bis 10,0 µg/ 5000 Zellen als gut verträglich, ohne daß die Zellen morphologische oder im Wachstumsverhalten Anzeichen toxischer Beeinträchtigung zeigten. Toxizitätstests, bei denen die Freisetzung saurer Phosphatase bestimmt wurde (Martin 1991, Groth 1998), zeigten bei Zellen, die mit  $\leq 10$  µg Lipid /5000 Zellen behandelt wurden, keine signifikanten Unterschiede zu unbehandelten Kontrollzellen. Liposomale Konzentrationen über 20 µg/5000 Zellen wiesen allerdings eine deutliche Toxizität auf.

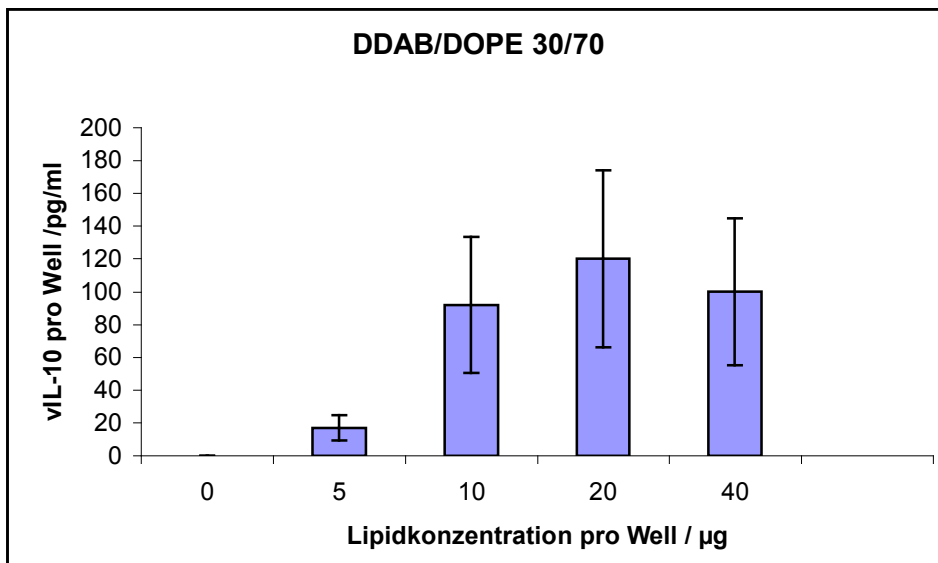
Im Gegensatz zu den bovinen kultivierten Endothelzellen wiesen die organkultivierten humanen Hornhäute nach liposomaler Transfektion nur eine sehr geringe vIL-10 Zytokinsekretion auf (Abbildung 31). In allen eingesetzten liposomalen Konzentrationen (5 – 40 µg/Well) lag die resultierende vIL-10 Konzentration bei unter 250 pg / 5000 Zellen (Durchschnitt 95 pg/ 5000 Zellen).



a)

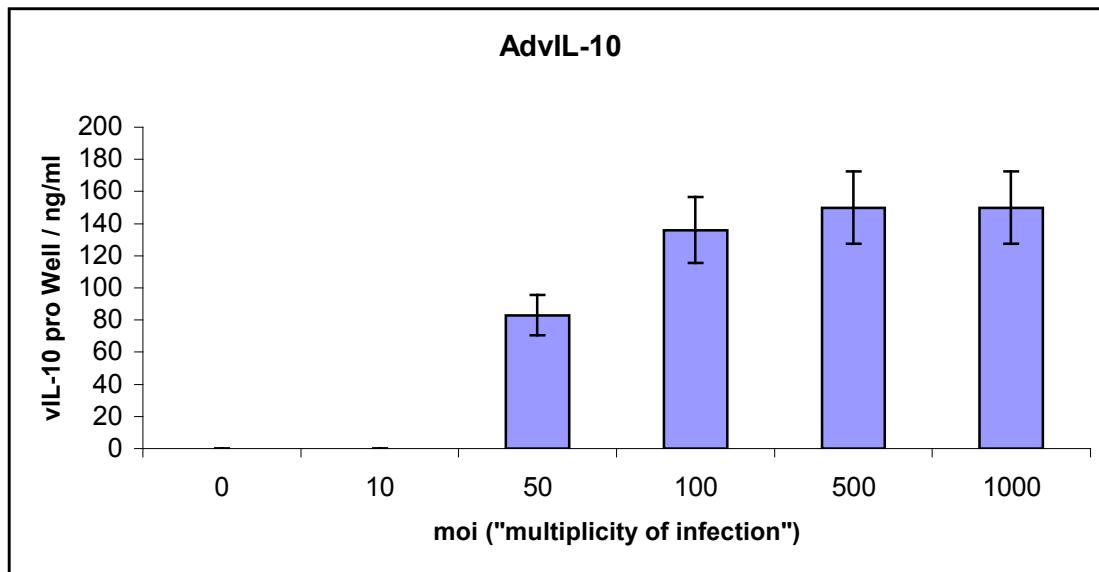


b)



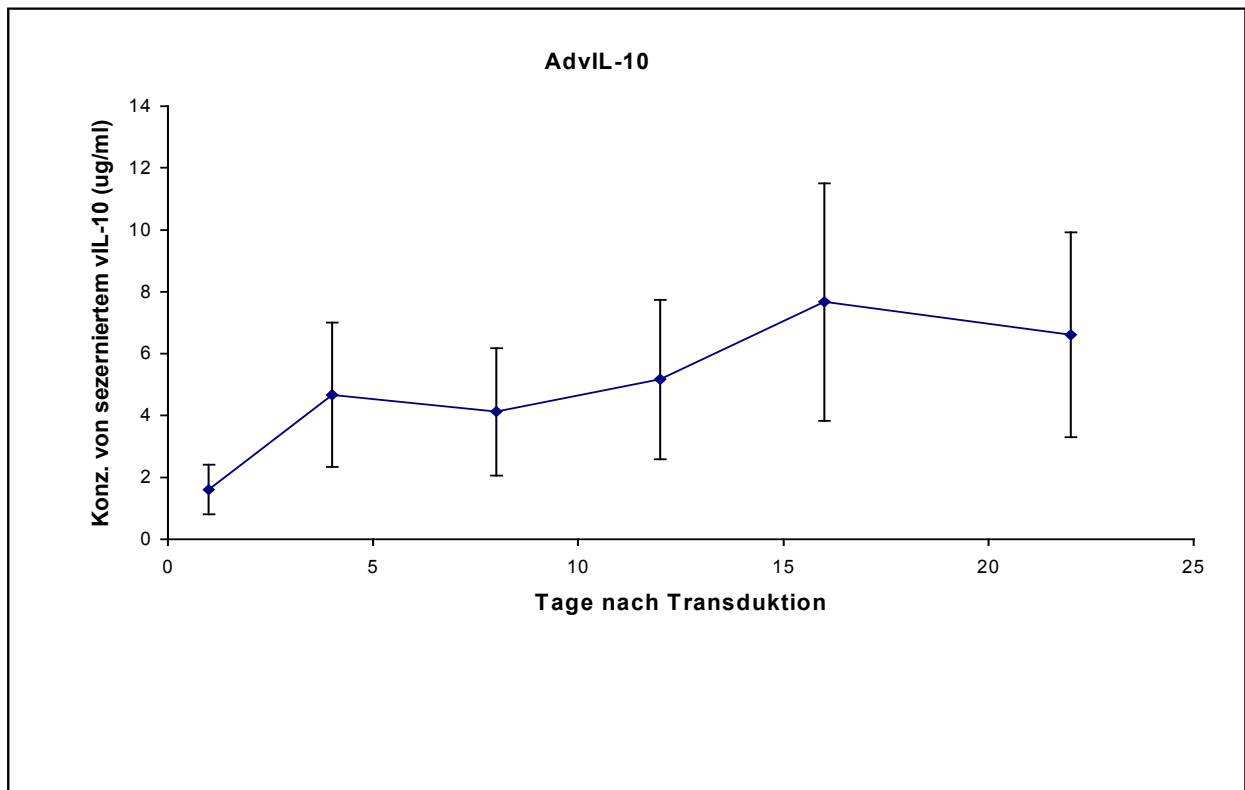
**Abbildung 31: vIL-10 Sekretion von organokultivierten humanen Hornhäuten nach liposomaler Transfektion mit 2 Lipiden A: Sp-Chol/Dope; B: DDAB/ Dope**

Um die Effizienz des durch rekombinante Adenoviren vermittelten Gentransfers zu untersuchen, wurden kultivierte bovine korneale Endothelzellen (BCEC) und organokultivierte humane Hornhäute mit dem Vektor AdvIL-10 transduziert und die Menge des produzierten vIL-10 im Kulturmedium durch ELISA gemessen. Zunächst wurden BCEC auf ihre Fähigkeit, vIL-10 nach Ad-vermitteltem Gentransfer zu sezernieren, getestet. Die Konzentrationen von vIL-10 im Überstand von BCEC (jeweils dreifach gemessen) 44 Stunden nach der Transduktion sind in Abbildung 32 gezeigt. Eine hohe Konzentration von eingesetzten Adenoviren (moi 500 und 1000) führte zu sehr hohen Konzentrationen von produziertem vIL-10 in den transduzierten Zellen ( $> 150$  ng / ml). Auch bei geringeren eingesetzten Virusmengen (moi 50) konnten noch hohe Konzentrationen von vIL-10 im Überstand erreicht werden. Erst bei sehr kleiner eingesetzter Virusmenge (moi 10) wurde keine signifikante vIL-10-Produktion mehr gemessen. Die durch hohen Viruseinsatz (moi 100 oder 500) erzielte vIL-10 Konzentration war signifikant höher als die höchste, durch liposomalen Gentransfer erreichbare vIL-10 Konzentration ( $p < 0,01$ ). Untersuchungen zur geringen Toxizität des eingesetzten adenoviralen Konstrukts in den verwendeten Konzentrationen in Form von Vitalfärbungen der Zellen sind bereits in einer früheren Publikation dargestellt worden (Ritter 1999).



**Abbildung 32: Ad-vermittelter vIL-10 Gentransfer in BCEC**

Darüber hinaus wurde der AdvIL-10-Gentransfer an humanen organkultivierten Hornhäuten ausgeführt. Für diesen Zweck wurden die Hornhäute nach der Trepanation in Viertel geteilt, auf 24-Well-Zellkulturschalen verteilt und jeweils mit AdvIL-10 in einer Konzentration von  $2 \times 10^8$  pfu/ml transduziert. Wie bereits bei den BCEC gezeigt werden konnte, führt der AdvIL-10-Gentransfer zu einer äußerst hohen vIL-10-Produktion. Diese Sekretion wurde im Überstand mittels ELISA bestimmt. Die Abbildung 33 zeigt die Menge des sezernierten vIL-10 im Kulturmedium nach adenoviraler vIL-10 Transduktion bis zu 22 Tagen nach dem Gentransfer.



**Abbildung 33: Ad-vermittelter Gentransfer in organkultivierte humane Hornhäute**

Die vIL-10 Konzentration im Überstand der organkultivierten humanen Hornhäute ist nach der adenoviralen Transduktion signifikant höher als nach der liposomalen Transfektion ( $p < 0,01$ ). Darüber hinaus blieb die vIL-10 Produktion in den Ad-vIL-10 transduzierten Hornhäuten konstant über den gesamten Untersuchungszeitraum.

#### **5.4. Diskussion**

In dieser Studie wurde die Effektivität von Liposomen und rekombinanten Adenoviren zum Transfer des immunmodulatorischen Zytokins Interleukin-10 (vIL-10) in BCEC und HC untersucht. Es konnte erstmalig demonstriert werden, daß Zytokingene durch Liposomen erfolgreich in BCEC eingeschleust werden können. In früheren Studien ist ein erfolgreicher liposomaler Markergentransfer in das korneale Endothel bereits gezeigt worden. In diesen Studien wurden Ratten- (Masuda 1996), Kaninchen- (Arancibia-Carcamo 1998) und Rinder-Endothelien (Pleyer 2001) untersucht. Als Markergenkonstrukte wurden entweder das Lac-Z-

Gen (codiert die Escherischia coli  $\beta$ -Galaktosidase) oder das CAT-Gen (codiert Chloramphenicol-acetyl-Transferase) verwendet. Die liposomale Transfektion eines therapeutischen Gens wurde nur in einer Arbeit gezeigt (Tan 2001).

Liposomen haben als Vehikel für den Gentransfer verschiedene Vorteile. Dazu gehören Sicherheitsaspekte, geringe Toxizität, geringe Kosten und einfache Handhabbarkeit (Masuda 1996, Pleyer 2001). Darüber hinaus können Liposomen problemlos wiederholt angewendet werden. Den entscheidenden Vorteil gegenüber Adenoviren stellt die Tatsache dar, daß sicher keine Immunreaktion durch das Vehikel selbst ausgelöst werden kann, da es kein Protein enthält. Auf der anderen Seite scheint zu den wesentlichen Nachteilen der Liposomen zu gehören, daß die Rate der Transfektionseffizienz deutlich geringer als bei Adenoviren ist. Insbesondere kommt dieser Faktor bei ruhenden, nicht proliferierenden Zellen (wie den humanen Endothelzellen) zum Tragen. In der bereits erwähnten Markergenstudie wurde eine Transfektionsrate von 7 % am Kaninchenendothel beobachtet (Arancibia-Carcamo 1997).

In früheren Untersuchungen in der eigenen Klinik bezüglich Markergentransfer wurden gleichartige Ergebnisse erzielt (Pleyer 2001). Im Hinblick auf diese verhältnismäßig niedrige Transfektionsrate sind die Ergebnisse dieser Untersuchung bemerkenswert, da sie zeigen, dass eine relativ kleine Zahl stabil transfizierter Zellen ausreicht, um signifikante Mengen eines gewünschten Zytokins zu produzieren. Bezogen auf den liposomalen Gentransfer in humane Hornhäute mit therapeutischer Zielsetzung existieren bisher keine Ergebnisse. Dennoch zeigten die Ergebnisse dieser Untersuchung, dass, im Gegensatz zu den vielversprechenden an den Zellkulturen erzielten Ergebnissen, an humanen Hornhäuten mittels Liposomen eine wesentlich geringere Transfektionseffizienz erreicht wird (Abbildung 31).

Die gleiche wie für die Zellkulturen verwendete liposomale Formulierung führte bei den organkultivierten humanen Hornhäuten nur zur Produktion sehr geringer Mengen von vIL-10 (Faktor  $10^{-6}$  niedriger als die durch Adenoviren erzielte Produktionsmenge). Zuvor selbst durchgeführte Versuche zum Markergentransfer (LacZ) an organkultivierten humanen Hornhäuten passen insofern zu diesen Ergebnissen, als auch mit dem Markergen nur wenige Endothelzellen transfiziert wurden. Die Transfektion des Markergens zeigte darüber hinaus, dass die Transfektion exklusiv auf das Endothel beschränkt blieb und keine Epithelien oder Keratozyten mit den verwendeten Vehikeln (Sp-Chol/Dope, DDAB/Dope) transfiziert wurden.

Die Differenz in der Transfektionseffizienz von Liposomen zwischen Endothelzellkulturen und organkultivierten Hornhäuten bestätigt die Hypothese, daß die Effizienz der liposomalen Transfektion von der Proliferationsaktivität der Zielzellen abhängt, insofern als humane adulte korneale Endothelzellen keine Proliferationsaktivität zeigen. Obwohl die beiden Lipidformulierungen, die in vorausgegangenen Versuchen zur Optimierung der liposomalen Transfektion die höchste Transfektionsaktivität gezeigt hatten (Pleyer 2001), eingesetzt wurden, kann nicht ganz ausgeschlossen werden, daß weitere, bisher nicht getestete Lipidverbindungen möglicherweise doch höhere Transfektionsraten am humanen Endothel erzielen könnten. Zukünftige, noch detailliertere Studien zur liposomalen Transfektion am humanen Endothel sollten hier in Zukunft anschließen. Nichtsdestoweniger zeigen die hier dargestellten Ergebnisse, daß Liposomen eine sichere und bequeme Alternative zu anderen Techniken des Gentransfers in korneale Endothelzellen darstellen können, zumindest insoweit als Untersuchungen an Zellkulturen durchgeführt werden.

Der Gentransfer mit rekombinanten Adenoviren ist als effektive Technik an verschiedensten Geweben und Zielzellen - ruhende oder proliferierende - dokumentiert worden. (Tan 2001, Qin 1997). Die intraokulare Anwendung von rekombinanten Adenoviren ist zur Therapie des Aderhautmelanoms untersucht worden. (Boehler 1998). Die ex-vivo Transduktion von organkultivierten Hornhäuten führte zu hoher Transgenexpression (Larkin 1996). Die ex-vivo Transduktion von BCEC und organkultivierten Hornhäuten der Ratte führte zu einer hohen Sekretion des transferierten Zytokins Interleukin-4. (IL-4) (Ritter 1999). Ein direkter Vergleich verschiedener Vektorsysteme ist allerdings am kornealen Endothel bisher nicht durchgeführt worden. In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, daß rekombinante Adenoviren im Gegensatz zu den gering effektiven Liposomen in der Lage sind, das Endothel von organkultivierten humanen Hornhäuten erfolgreich zu transduzieren (Abbildung 33). Die Transduktion führte bereits nach 24 Stunden zu einer hohen Zytokinsekretion, die über einen Zeitraum von über 3 Wochen aufrechterhalten werden konnte. Diese Ergebnisse unterstützen die zuvor durch Markergenuntersuchungen erzielten Resultate (T. Ritter unpubliziert), daß durch Adenoviren eine sehr hohe Rate an transduzierten Endothelzellen von organkultivierten humanen Hornhäuten erreicht werden kann. Diese sehr hohen Mengen an sezerniertem Zytokin erlauben es, in zukünftigen Tests die eingesetzte Viruskonzentration erheblich zu reduzieren. Im Hinblick auf potentielle immunstimulierende Effekte der adenoviralen Konstrukte (Yang 1994) ist die Möglichkeit, die eingesetzte Virusmenge minimieren zu können, von erheblichem Vorteil. Eine Reduktion

des für den ex-vivo Gentransfer eingesetzten Ad-Titers sollte demnach zur Reduktion der Nebenwirkungen des Therapeutikums und zur Verlängerung des Transplantatüberlebens beitragen. Die hier dargestellten Ergebnisse legen nahe, dass die adenovirale Transduktion humaner Hornhäute bevorzugt werden sollte, wenn hohe Konzentrationen des eingesetzten therapeutischen Genprodukts angestrebt werden.

Die Beobachtung, dass der Gentransfer immunmodulatorischer Zytokine wie vIL-10 in die Hornhaut das Risiko einer Immunreaktion tatsächlich vermindert, ist nicht abschließend geklärt. In einer Untersuchung an einem Schafmodell konnte eine Verlängerung des Transplantatüberlebens durch IL-10 Gentransfer gezeigt werden (Klebe 2001). In zwei älteren Studien wurde ein immunsupprimierender Effekt von IL-10 bei der stromalen Herpes-Keratitis gezeigt. Dabei wurde IL-10 als rekombinantes Protein bzw. als Zytokin-exprimierendes Plasmid topisch appliziert (Tumpey 1994, Dahesia 1997).

Eine Unterdrückung der stromalen Entzündung wurde in beiden Studien gesehen.

Interessanterweise fanden die Autoren der zweiten erwähnten Studie auch eine IL-10 Expression, wenn das nackte Plasmid auf die Hornhaut bei abradierem Epithel getropft wurde. Versuche zum Markergentransfer im Rahmen dieser Studie zeigten eine Transgenexpression nur in Iris und Ziliarkörper. In unseren Untersuchungen zeigte die Applikation des nackten Plasmids an den endothelialen Zellkulturen keine messbare vIL-10 Produktion.

In einer ebenfalls älteren Studie wurde die Wirkung der Applikation von rekombinatem exogenem IL-10 auf die korneale Immunreaktion bei der Ratte untersucht. Dabei wurde das Zytokin subkonjunktival injiziert. Die Transplantatüberlebensrate wurde durch diese Therapie nicht verlängert (Torres 1999). Durch die Form der Applikation jeden 2. Tag sind Dosisschwankungen des Zytokins mit kurzer Halbwertszeit zu erwarten, außerdem ist der Applikationsort nicht mit dem potentiellen Wirkort identisch. Genau diese Nachteile können durch einen genterapeutischen Ansatz vermieden werden.

Letztendlich ist die optimale Konzentration eines immunmodulatorischen Zytokins wie vIL-10, um den gewünschten maximalen immunsuppressiven Effekt zu erzielen, unbekannt. In diesem Zusammenhang ist es möglich, dass sogar eine milde Expression des Zytokins geeigneter ist als eine sehr hohe Expression, die auch zu einer unerwünschten „Überdosierung“ des Zytokins führen könnte.

Schlussfolgernd konnte in dieser Untersuchung gezeigt werden, dass sowohl Liposomen als auch Adenoviren in der Lage sind, bovine korneale Endothelzellen in Kultur effektiv zu transfizieren. Werden organkultivierte humane Hornhäute betrachtet, sind nur Adenoviren in der Lage, eine ausreichende Zytokinexpression zu erzielen. Diese Ergebnisse zeigen, dass zur Transfektion von sich nicht-teilenden Zellen Adenoviren deutlich effektiver sind als Liposomen. Um die optimale zu transduzierende Rate von Endothelzellen zu ermitteln, die zu einem optimalen immunmodulatorischen Effekt im Hinblick auf die Prophylaxe der Immunreaktion führen, sind weitere Untersuchungen erforderlich.



## 6. Zusammenfassung Teil C

Durch die Möglichkeit der ex-vivo-Transfektion des organkultivierten Transplantats ist die Hornhaut ein zur Gentherapie besonders geeignetes Gewebe. Entsprechend den an der Regulation der Immunreaktion beteiligten immunologischen Mechanismen kommen als mögliche Ansatzpunkte für die Gentherapie folgende Regulationsschritte in Frage: Blockade der Sensibilisierung, Aktivierung und der klonalen Expansion von T-Zellen, Blockade der kornealen Neovaskularisation, Bereitstellung immunmodulatorischer Zytokine und Rezeptorantagonisten. Zu den an der Hornhaut eingesetzten genterapeutischen Verfahren gehören mechanische Verfahren, wie der ballistische Gentransfer sowie der Einsatz von viralen und nichtviralen Vektoren. Zu den Vorteilen der viralen Vektoren zählen die in der Regel höhere Transfektionseffizienz, zu den Nachteilen die theoretisch nicht vollständig auszuschließende Replikationsfähigkeit und die Auslösung von immunologischen Reaktionen gegen die eingesetzten Viren. Eine Besonderheit der Transfektion von humanen, kornealen Endothelzellen liegt darin, dass es sich um postmitotische nicht-proliferierende Zellen handelt.

In unseren eigenen Untersuchungen wurde erstmals ein immunmodulatorisches Zytokinen (das  $T_{H2}$ -Zytokin Interleukin-10) mittels Liposomen in korneale Endothelzellen transferiert. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sowohl Liposomen als auch Adenoviren in der Lage sind, bovine korneale Endothelzellen in Kultur effektiv zu transfizieren. Werden organkultivierte humane Hornhäute betrachtet, sind nur Adenoviren in der Lage, eine ausreichende Zytokinexpression zu erzielen. Diese Ergebnisse zeigen, dass zur Transfektion von sich nicht-teilenden Zellen Adenoviren deutlich effektiver sind als Liposomen. Um die optimale zu transduzierende Rate von Endothelzellen zu ermitteln, die zu einem optimalen immunmodulatorischen Effekt im Hinblick auf die Prophylaxe der Immunreaktion führen, sind nachfolgende Untersuchungen erforderlich.

Während für bestimmte ophthalmologische Indikationen erste Schritte eines klinischen Einsatzes der Gentherapie absehbar erscheinen (Retinitis pigmentosa), sind bis zum klinischen Einsatz der Gentherapie zur Prophylaxe der Immunreaktion nach Keratoplastik noch weitere Hürden zu überwinden.

## **D. Zusammenfassung aller vorgestellten Arbeiten und Schlussfolgerung**

In dieser Arbeit wurden auf breiter Basis aktuelle Ansätze zur Prophylaxe der Immunreaktion nach Keratoplastik untersucht. Die Abstoßungsreaktion stellt neben dem chronischen Endothelzellverlust die größte Bedrohung für das klare Transplantatüberleben und damit für den Erfolg der Keratoplastik im Hinblick auf eine visuelle Rehabilitation dar.

Im ersten Abschnitt wurden klinische Daten aus dem Patientenkollektiv unserer Klinik analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Glaukom einen schwerwiegenden Risikofaktor für den chronischen Endothelzellverlust darstellt. Daneben konnten unsere Daten erstmalig belegen, dass der chronischen subklinischen Immunreaktion eine wesentliche Bedeutung für den chronischen Endothelzellverlust nach homologer Keratoplastik zukommt. Klinische Konsequenzen dieser Ergebnisse sind die sehr kritische Indikationsstellung zur Keratoplastik bei Patienten mit Glaukom (insbesondere wenn Schwierigkeiten oder Unsicherheiten bei der Druckeinstellung auftreten), die Verwendung möglichst kleiner Transplantate bei gesundem peripheren Empfängerendothel, die dauerhafte Beibehaltung einer niedrigdosierten lokalen Immunsuppression (Steroide) sowie die Nutzung der Option der autologen Keratoplastik bei geeigneter Ausgangssituation (umschriebene Narbe).

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurden umfangreiche experimentelle Untersuchungen zum topischen Einsatz von Immunsuppressiva dargestellt. Im Hinblick auf die zum Teil schwerwiegenden Nebenwirkungen der systemischen Gabe dieser Substanzen kommt der Ausweitung der lokalen Einsatzmöglichkeiten dieser Wirkstoffe eine besondere klinische Bedeutung zu. Explizit wurden im Rahmen dieser Arbeit lokale Präparationen von Mycophenolat Mofetil sowie von Sirolimus / Everolimus erstmalig hergestellt und untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass für alle 3 Verbindungen geeignete, lokal anwendbare Formulierungen herstellbar sind. Für MMF ist dabei eine Cyclodextrinformulierung die geeignetste Präparation, während Sirolimus / Everolimus am günstigsten in einer Mikroemulsion lokal angewendet werden. Mit topisch appliziertem MMF lassen sich hohe Konzentrationen des eigentlichen Wirkstoffs Mycophenolsäure (MPA) im Kammerwasser erzielen, dagegen penetriert Sirolimus die Hornhaut nur bei abradiertem Epithel. Da MMF

und MPA über verschiedene Penetrationswege nach intraokular gelangen (MPA transkorneal, MMF parakorneal), lassen sich die Anteile der beiden Penetrationswege näherungsweise durch den Vergleich von MMF und MPA intraokular und intrakorneal bestimmen.

Bei der experimentellen Keratoplastik sind topisch appliziertes MMF und Sirolimus im Hinblick auf eine Verlängerung des Transplantatüberlebens unwirksam. Everolimus zeigt eine eingeschränkte Wirksamkeit. Die lokale Verträglichkeit von MMF-Cyclodextrin-Komplex-Formulierung ist im Kaninchenmodell gut. Die Option, eine Kombination zweier lokaler Immunsuppressiva zur Prophylaxe der Immunreaktion nach Keratoplastik einzusetzen (z.B. CSA + MMF oder Everolimus + MMF), sollte nach unserer Ansicht weiter verfolgt werden. Darüber hinaus sind MMF-Cyclodextrinformulierung und Sirolimus/Everolimus-Mikroemulsion vielversprechende lokale Präparationen dieser neuen Immunsuppressiva auch für andere Indikationen. Die Wirksamkeit dieser Präparate bei Erkrankungen der okulären Oberfläche wie z.B. dem immunologischen Hornhautulcus oder der atopischen Keratokonjunktivitis sollte weiter untersucht werden.

Im dritten Abschnitt dieser Arbeit wurden die Möglichkeiten des Einsatzes der Gentherapie zur Prophylaxe der Immunreaktion nach Keratoplastik analysiert. In den eigenen Untersuchungen zu diesem Themenkomplex konnte erstmalig gezeigt werden, dass ein Zytokingentransfer mittels Liposomen in korneale Endothelzellen in Kultur möglich ist. Angesichts der immunstimulatorischen Nebenwirkungen des adenoviralen Gentransfers kommt der liposomalen Transfektion eine Bedeutung im Hinblick auf die Suche nach Alternativen zum Einsatz von Adenoviren zu. Im direkten Vergleich des liposomalen mit dem adenoviralen Gentransfer an der organkultivierten Hornhaut zeigt sich der virale Gentransfer im Hinblick auf die Transfektionseffizienz überlegen. Durch die Option, das organkultivierte Hornhauttransplantat ex vivo transfizieren zu können, stellt der Einsatz der Gentherapie einen vielversprechender Ansatz zur Prophylaxe der Immunreaktion nach Keratoplastik dar, wenn auch auf dem Weg zum konkreten klinischen Einsatz noch weitere Probleme gelöst werden müssen.