Untersuchungen zum Gentransfer in die Lunge mittels nicht-viraler Pulveraerosole und viraler Vektoren basierend auf dem Adeno-assoziierten Virus (AAV) 2/9

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Corinna Pfeifer aus Lindenfels

Dezember 2010

1. Gutachter: PD Dr. Carsten Rudolph

2. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Müller

Disputation am: 04.02.2011



Inhaltsverzeichnis

1	Einl	Einleitung		
	1.1	Die Lu	unge als Zielorgan der Gentherapie	3
	1.2	Nicht-	-viraler Gentransfer	4
		1.2.1	Nukleinsäuren	4
		1.2.2	Kationische Lipide für den nicht-viralen Gentransfer	7
		1.2.3	Polymere für den nicht-viralen Gentransfer	8
	1.3	Appli	kation von nicht-viralen Genvektoren in die Lunge	11
		1.3.1	Limitationen der Aerosolapplikation	12
		1.3.2	Pulveraerosole als alternative Applikationsform	12
		1.3.3	Methoden zur Herstellung von Pulveraerosolen	13
	1.4	Virale	r Gentransfer	17
		1.4.1	Retro- und Lentiviren	17
		1.4.2	Adenoviren	19
		1.4.3	Adeno-assoziierte Viren	19
	1.5	AAV2	/9 für den viralen Gentransfer in die Lunge	20
	1.6	Zielse	tzung der Arbeit	23
2	Mate	erialier	1	25
	2.1	Reage	nzien und Chemikalien	25
	2.2	Enzyn	ne	27
	2.3	Kits .		28
	2.4	Medie	en und Medienzusätze	28
	2.5	Geräte	e und Chromatographiesäulen	28
	2.6	Oligo	nukleotide	30

	2.7	Arzne	eistoffe	31
	2.8	Zusar	nmensetzung von Puffern	32
3	Met	hoden		33
	3.1	Zellkı	ıltur	33
		3.1.1	Zelllinien	33
		3.1.2	Kultivierungsbedingungen	33
	3.2	Plasm	id-DNA	34
		3.2.1	Verwendete Plasmid-DNA Konstrukte	34
		3.2.2	Klonierung von pCB6-Luc und pCB7-Luc	34
		3.2.3	Amplifizierung von Plasmid-DNA	36
		3.2.4	Produktion von AAV2/9	36
	3.3	Herst	ellung von Pulveraerosolen	37
	3.4	Partik	elcharakterisierung	38
		3.4.1	Partikelgrößenmessung mittels Photonenkorrelationsspek-	
			troskopie	38
		3.4.2	Zetapotenzialmessung	38
		3.4.3	DNA-Freisetzungsassay	39
	3.5	Pulve	rcharakterisierung mittels Andersen-Kaskaden-Impaktor	39
	3.6	Transf	fektion mittels kationischer Polymere und Lipide	40
	3.7	Messu	ung der Luciferase- und β -Galactosidase-Aktivität	41
	3.8	Tierve	ersuche	41
		3.8.1	Versuchstiere	42
		3.8.2	Applikation von Pulveraerosolen	42
		3.8.3	Applikation von AAV-Vektoren	4 3
		3.8.4	Messung der <i>in vivo</i> Luciferase-Aktivität	4 4
		3.8.5	Blutentnahme und Serumgewinnung	44
		3.8.6	Assay auf neutralisierende Antikörper	45
		3.8.7	Organentnahme und Aufbereitung	45
		3.8.8	Histologische Lungenschnitte	46
		3.8.9	Messung der Luciferase-Aktivität im Lungenhomogenisat .	46

		3.8.10	Isolierung von Fluorescein aus dem Lungenhomogenisat	47
		3.8.11	Isolierung der Gesamt-DNA aus Geweben	47
		3.8.12	Quantifizierung mittels Real-Time PCR	47
4	Entv	wicklun	g eines Pulveraerosols für den nicht-viralen Gentransfer	49
	4.1	Versuc	che zur Partikel-Charakterisierung	49
		4.1.1	Partikelgrößenmessung	50
		4.1.2	Bestimmung des Zetapotenzials	52
		4.1.3	DNA-Freisetzungs-Assay	52
	4.2	Chara	kterisierung des Pulveraerosols	56
	4.3	In vitro	Charakterisierung	57
		4.3.1	Einfluss von Disacchariden auf die Transfektion	57
		4.3.2	Einfluss der Lyophilisation auf die Transfektion	59
		4.3.3	Einfluss der Pulverisierung	59
	4.4	In vivo	Charakterisierung	63
		4.4.1	Versuche mit Luciferase	63
		4.4.2	Versuche mit Erythropoetin	67
	4.5	Zusam	nmenfassende Betrachtung und Diskussion der Ergebnisse .	69
5	Unte	ersuchi	ungen von AAV2/9 für den Gentransfer in die Lunge	76
	5.1	Einflus	ss des Introns auf die Expression	76
	5.2	Einflus	ss der Applikationsroute	78
		5.2.1	Langzeit-Expression	78
		5.2.2	Entwicklung neutralisierender Antikörper	80
		5.2.3	Biodistribution	81
	5.3	Einflus	ss der Dosisreduktion	83
		5.3.1	Langzeit-Expression	83
		5.3.2	Entwicklung neutralisierender Antikörper	84
		5.3.3	Biodistribution	86
	5.4	Einflu	ss des Mausstammes auf die Expression	87
	5.5	Einflu	ss von Geschlecht und Immunsuppression	89
		5.5.1	Langzeit-Expression	89

		5.5.2 Entwicklung neutralisierender Antikörper	94
	5.6	Applikation der AAV-Luc Vektoren in entzündeten Lungen von	
		konditionellen SPB-Knockout-Mäusen	99
	5.7	Zusammenfassende Betrachtung und Diskussion der Ergebnisse .	103
6	Zus	ammenfassung	109
7	Sun	nmary	113
Ak	okürz	ungsverzeichnis	117
Αł	bildu	ungsverzeichnis	121
Та	belle	nverzeichnis	124
Literaturverzeichnis 125			125
Da	anksa	ngung	140
Pι	ıblika	ationen	142

1 Einleitung

Die Gentherapie beschäftigt sich nach Definition der Deutschen Forschungsgemeinschaft mit dem Einbringen von Genen in Gewebe oder Zellen mit dem Ziel, durch die Expression und Funktion dieser Gene therapeutischen oder präventiven Nutzen zu erlangen. Der Vorgang, mit dem Gene in Zellen eingebracht werden, wird Gentransfer genannt. Unterschieden wird dabei zwischen dem Gentransfer in Körperzellen, der sogenannten somatischen Gentherapie (griechisch soma= der Körper), und dem Gentransfer in Keimzellen (Keimbahntherapie), der in Deutschland allerdings durch das Embryonenschutzgesetz verboten ist. Die somatische Gentherapie lässt sich wie folgt unterteilen:

- Genkorrektur (Reparatur eines defekten Gens),
- Genaddition (Kompensation defekter Gene durch Einbringen einer intakten Genkopie) und
- Inaktivierung pathologisch veränderter Gene (Antisense-Therapie, RNA-Interferenz)

Das Einbringen genetischer Informationen mittels nicht-viraler Vektoren wird als Transfektion, mittels viraler Vektoren als Transduktion bezeichnet. Bisher steht die symptomatische Behandlung von Krankheiten im Vordergrund. Oftmals stellt diese auch die einzig potenziell verfügbare Therapieform dar. Die Gentherapie bietet durch das Einschleusen funktioneller Gene grundsätzlich die Möglichkeit einer kausalen Behandlung monogenetisch bedingter Erkrankungen. Außerdem besteht die Möglichkeit, durch Hoch- oder Herabregulierung bestimmter Gene in einen pathologischen Vorgang im Körper einzugreifen. In

den letzten Jahren hat diese relativ neue Technologie weltweit großes Interesse geweckt. Aus diesem Grund hat sich die Gentherapie zu einem sehr schnell fortschreitenden Forschungsgebiet entwickelt.

Bei der Gentherapie gibt es zwei unterschiedliche Möglichkeiten Zellen eines Organismus zu verändern. Bei der *in vivo* Gentherapie werden Zellen innerhalb des Körpers, z.B. durch Injektion oder Inhalation der Genvektoren, behandelt. Im Gegensatz dazu werden bei der *ex vivo* Gentherapie Zellen aus einem Körper entnommen, in einem künstlichen Nährmedium weiter kultiviert und mit Genvektoren behandelt. Nach erfolgreicher Manipulation der Zellen werden diese in den Körper rückimplantiert. Entstammen die Zellen demselben Organismus in den sie in veränderter Form auch wieder eingebracht werden, spricht man von "autogenetisch". Weiterhin können körperfremde Zellen *ex vivo* modifiziert und anschließend in einen Körper verabreicht werden. In diesem Fall unterschiedet man die beiden Begriffe "allogenetisch", wobei die Zellen aus einem Organismus der gleichen Spezies stammen und "xenogenetisch", wobei die Zellen aus einem Organismus einer anderen Spezies stammen.

Die Gentherapie als Kausaltherapie birgt ein vielversprechendes Potenzial bei der Behandlung verschiedener Krankheiten. Zu Beginn der Forschung standen primär monogene Erbkrankheiten im Fokus. Durch die Korrektur eines einzelnen Gens könnte die betreffende Krankheit geheilt werden. Zu den schweren monogenen Erberkrankungen zählen unter anderem die Zystische Fibrose oder die schwere Störung des Immunsystems SCID (engl. Severe Combined Immundeficiency). Daher wurde die erste klinische Studie mit Gentherapeutika auch ex vivo an Patienten, die an Adenosindeaminase-Defizienz litten, einer schweren kombinierten Immundefizienz (ADA-SCID), durchgeführt (Blaese et al., 1995). Seither wurden über 1500 klinische Studien realisiert oder initiiert (www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/). Der Großteil der Studien fand in den USA (64%) und in Europa (30%) statt. Inzwischen hat sich ihr Fokus weg von den monogenen Krankheiten hin zur Onkologie entwickelt. Bereits 65% der klinischen Studien befassen sich mit der Behandlung verschiedener Krebserkrankungen. Ferner werden Studien bei kardiovaskulären Krankheiten, Infektions-

krankheiten und monogenetischen Erbkrankheiten durchgeführt. Da die meisten gentherapeutischen Ansätze noch in der Entwicklungsphase sind, finden über 95% der Studien in Phase I und II statt, wobei es sich meist um Dosisfindungsund Verträglichkeitsstudien handelt. Nur 3% der Studien befinden sich in der klinischen Phase III und ermitteln damit zulassungsrelevante Daten. Bis heute gibt es, abgesehen von China, wo Gendicine[®] und Oncorine[®] zugelassen sind, kein zugelassenes gentherapeutisches Arzneimittel. Die Zulassung des in Europa und USA zugelassenen Antisense Medikaments Vitravene[®] wurde 2002 aus kommerziellen Gründen wieder zurückgezogen.

1.1 Die Lunge als Zielorgan der Gentherapie

Es gibt viele vererbte und erworbene Lungenkrankheiten, die bis jetzt noch nicht zufriedenstellend behandelt werden können. Daher eignet sich die Lunge als Zielorgan für die Gentherapie. Ein Beispiel für eine monogenetisch bedingte Lungenerkrankung ist die Zystische Fibrose (Mukoviszidose). Es handelt sich dabei um einen vererbbaren Gendefekt, bei dem es durch Mutationen im CFTR-Gen (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) zum Fehlen oder zu einer eingeschränkten Funktion des CFTR-Proteins kommt. Das CFTR-Protein, welches einen Chlorid-Kanal bildet, reguliert den Wasser- und Salztransport in den Epithelzellen. Trotz guter Behandlungsfortschritte ist die Therapie bis jetzt nur symptomatisch und greift nicht an der Ursache der Erkrankung an. Durch das Einbringen des funktionellen CFTR-Gens in die betroffenen Zellen könnte die Krankheit ursächlich behandelt werden. Weitere Lungenerkrankungen, die von der Entwicklung einer effektiven Gentherapie profitieren könnten, sind der Alpha-1-Antitrypsinmangel, Surfactant-Protein Mängel oder Lungenkrebs.

Anatomisch betrachtet kann die Lunge grob in zwei Abschnitte unterteilt werden: in einen luftführenden Teil (Trachea, Bronchien und Bronchiolen) und einen Teil, in dem der tatsächliche Gasaustausch (Alveolen) stattfindet. Grundvoraussetzung eines erfolgreichen Gentransfers in die Lunge ist das effektive Einbringen des applizierten Gens in die Zielzellen. Hier stellen die pulmonale Architektur,

Clearance-Mechanismen, das Immunsystem und die Anwesenheit von Mucus die größten Hindernisse dar.

1.2 Nicht-viraler Gentransfer

Die Gentransfermethoden können in zwei große Bereiche aufgeteilt werden. Ein Bereich umfasst nicht-virale Vektoren, der andere befasst sich mit viralen Vektoren (siehe Abschnitt 1.4). Beim nicht-viralen Gentransfer werden Nukleinsäuren, die in Kapitel 1.2.1 näher beschrieben werden, durch Transfektion in Zellen eingebracht. Die verschiedenen physikalischen Methoden, die verwendet werden können, sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst. Die Nukleinsäure kann auch in Form von Lipo- oder Polyplexen, komplexiert mit Lipiden oder Polymeren, oder als "nackte"Nukleinsäure in Zellen eingebracht werden. Die Lipide und Polymere werden in den Abschnitten 1.2.2 und 1.2.3 genauer beschrieben.

1.2.1 Nukleinsäuren

Als nicht-virale Gentherapeutika werden derzeitig hauptsächlich

- Plasmid-DNA (pDNA),
- messenger RNA (mRNA) und
- *small interfering* RNA (siRNA)

eingesetzt. Dabei ist die Plasmid-DNA die am häufigsten verwendete Nukleinsäure, da sie einfach und kostengünstig hergestellt werden kann. Im Folgenden werden die drei Therapeutika näher erläutert.

Plasmid-DNA (pDNA)

Plasmid-DNA kann linear, offenkettig-zirkulär oder kovalent-geschlossen-zirkulär vorliegen, wobei die zirkulär geschlossene Form als einzige auch in Bakterien vorliegt. Die in der Gentherapie verwendete pDNA besteht meist aus einer Expressionskassette (meist eukaryontischen Ursprungs) und einem bakteriellen

Tabelle 1.1: Physikalische Methoden für den Gentransfer

Technik	Prinzip	Material	Vorteile	Nachteile
Magneto- fektion	Magnetfeld- gesteuerte Aufnahme in Zellen	Magnetische Nanopar- tikel/ Transfek- tionsreagenz, Magnetfeld	Hohe Effizienz, sowohl für virale als auch nicht-virale Vektoren anwendbar	Magnetisches Feld nimmt mit der Di- stanz stark ab
Elektro- poration	Elektrisches Feld indu- ziert Zell- membran- Permeabi- lisierung	Elektoden und Elektro- porator	Hohe Effizienz, kein Gentransfer- reagenz nötig	Toxizität, Metho- de durch Elektroden invasiv
Sonoporation	Ultraschall indu- ziert Zell- membran- Permeabi- lisierung	Ultraschall Probe ± Gas Microbub- bles	Imaging während der Behandlung	Effizienz, To- xizität

Plasmid-Rückgrad. Von großer Bedeutung ist der Promotor, über den das Transgen reguliert wird. Am häufigsten werden starke virale Promotoren eingesetzt, um eine hohe Expression des Transgens zu erreichen. Es können aber auch gewebespezifische Promotoren verwendet werden, die die Expression des Transgens auf einen bestimmten Zelltypen beschränken. Die pDNA stellt keine Wirkform dar und wird somit als Prodrug bezeichnet. Nach erfolgreicher Transkription im Zellkern und anschließender Translation im Zytosol kann diese in ihre Wirkform, das Protein, umgewandelt werden. Durch Verwendung von pDNA anstelle von Proteinen können hohe Herstellungskosten, verbunden mit Stabilitätsproblemen bei Proteinen, vermieden werden. Die Limitation bei der Verwendung von pDNA liegt dagegen in der Notwendigkeit, in den Zellkern zu gelangen. Plasmid-DNA ist ein sehr großes Molekül und kann nur über einen aktiven Transportmechanismus in den Zellkern sich nicht teilender Zellen transportiert werden. Es konnte

gezeigt werden, dass nur 0,01% der ins Cytosol applizierten pDNA in den Nukleus gelangt (Capecchi, 1980). Der Transport in sich teilende Zellen ist einfacher. Bei der Mitose kann die pDNA gut im Nukleus aufgenommen werden, da die Zellkernhülle bei diesem Prozess aufgelöst wird. Im Gegenzug kann sie aber auch bei der Zellteilung wieder aus dem Zellkern verloren gehen, weshalb es bei der Verwendung von pDNA meist nur zu einer transienten Expression kommt.

Messenger RNA (mRNA)

Eine Alternative zur pDNA stellt die mRNA dar. Sie muss nicht wie die pDNA in den Nukleus der Zelle eindringen, sondern kann im Zytosol in ihre Wirkform, das Protein, translatiert werden. Daraus ergeben sich eine Reihe von Vorteilen:

- höhere Effizienz
- keine genomische Integrationsgefahr
- Reduktion von insertioneller Mutagenese und damit von Nebenwirkungen

Neben diesen Vorteilen hat die Verwendung von mRNA aber auch einige Nachteile, die neben der aufwendigeren und kostenintensiveren Herstellung im Großmaßstab auch die geringe Stabilität der mRNA umfassen. Durch verschiedene Modifikationen konnte die Stabilität allerdings verbessert werden (Yamamoto et al., 2009).

Small interfering RNA (siRNA)

Die RNA-Interferenz (RNAi) Technologie wurde Ende der 1990er Jahre erstmals von Craig Mello und Andrew Fire für den Fadenwurm *C. elegans* beschrieben (Fire et al., 1998). *Small interfering* RNAs (siRNAs) setzen sich aus 21-28 Nukleotiden zusammen, die auf natürliche Weise im Zytoplasma der Zelle durch Zerschneiden von doppelsträngiger RNA durch das Enzym Dicer entstehen. Es ist aber auch möglich die siRNA von außen mittels Transfektion in die Zellen einzubringen. Die siRNAs werden anschließend in einen Proteinkomplex RISC

(RNA-induced silencing complex) eingebaut. Mit Hilfe der inkorporierten RNA-Fragmente bindet RISC komplementär an der Ziel-mRNA, was in der Folge zum Abbau der mRNA führt. Für die Arzneimittelentwicklung werden synthetisch hergestellte siRNAs eingesetzt, um durch RNAi die Expression spezifischer Zielgene zu verringern, die bei verschiedenen pathologischen Veränderungen eine Rolle spielen.

1.2.2 Kationische Lipide für den nicht-viralen Gentransfer

Kationische Lipide sind amphiphile Moleküle mit einer hydrophoben Schwanzgruppe und einer positiv geladenen Kopfgruppe, welche mit der negativ geladenen pDNA interagieren kann (Marshall et al., 2000). Sie wurden zuerst von Felgner et al. für den Gentransfer in Zellen verwendet. Das Mischen von pDNA und kationischen Lipiden führt zur spontanen Bildung von Lipoplexen, bei denen davon ausgegangen werden kann, dass die pDNA komplett von kationischen Lipiden umgeben ist und somit die negative Ladung der pDNA neutralisiert wird. Letztendlich bilden sich positiv geladene Lipoplexe, die mit der negativ geladenen Zelloberfläche interagieren und so die pDNA in die Zelle transportieren können (Felgner et al., 1987). Neben dem zunächst verwendeten DOTMA (N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride) wird vor allem DOTAP (N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride) (Leventis and Silvius, 1990) für den Gentransfer verwendet, welches aufgrund der Estergruppe zwar etwas instabiler im Vergleich zur Etherbindung bei DOTMA ist, aber dafür eine geringere Toxizität zeigt. Die erfolgreiche Transfektion von Lungenzellen in vivo konnte durch intravenöse Applikation der Lipoplexe demonstriert werden (Li and Huang, 1997). Der Gentransfer von kationischen Lipiden nach i.v. Verabreichung beruht hauptsächlich auf einem passiven Mechanismus, bei dem es durch den Kontakt mit anionischen Serumproteinen des Blutes zur Aggregation der Lipoplexe kommt. Da das alveolare Kapillarsystem das erste und größte Kapillarsystem darstellt, in das die aggregierten Lipoplexe gelangen, kommt es zur Transfektion der Lunge (Kuruba et al., 2009). Werden innerhalb von 60 Minuten anionische Lipide appliziert, kann der Gentransfer inhibiert werden (Barron et al., 1999). Die Transfektion der Lunge *in vivo* konnte weiterhin durch intratracheale Applikation von Liposomen gezeigt werden (Fortunati et al., 1996).

Nachteile der kationischen Lipide sind ihre geringe Effizienz *in vivo* und ihr proinflammatorisches Potenzial (Noone et al., 2000). Die Toxizität ist wahrscheinlich auf die CpG-Motive in den Plasmiden zurückzuführen, die durch Aktivierung des Toll-like Rezeptors 9 (TLR 9) die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , TNF- α und IL-12 stimulieren (Hemmi et al., 2000). Außerdem ist ein spezifisches Zelltargeting durch die unspezifische Membranaktivität der Lipoplexe kaum möglich und daneben kann es durch Bindung an negativ geladene Plasmaproteine zur Inaktivierung der Lipoplexe kommen (Urtti et al., 2000).

1.2.3 Polymere für den nicht-viralen Gentransfer

Neben den kationischen Lipiden werden für den Gentransfer hauptsächlich kationische Polymere eingesetzt. Diese Gruppe von Polymeren umfasst natürliche DNA-bindende Proteine (z.B. Histone), synthetische Aminosäure-Polymere (z.B. Poly-L-Lysin), Dendrimere und Kohlenhydrat-basierende Polymere (z.B. Chitosan) und andere kationische Polymere, wie Polyethylenimin (PEI). Die Verwendung eines Polymers zum nicht-viralen Gentransfer setzt voraus, dass es zusammen mit der negativ geladenen Nukleinsäure unter physiologischen Bedingungen spontan durch Selbstassoziation einen Komplex bildet. Das positive Zetapotenzial der Polymere resultiert aus der Anwesenheit von primären, sekundären oder tertiären Aminogruppen. Die Komplexierung führt zur Aufhebung der negativen Ladung der Nukleinsäure und netto entstehen positiv geladene Komplexe. Wie bei den Lipiden erlaubt die positive Ladung der Polyplexe die Adsorption an die negativ geladene Zelloberfläche, worauf die Aufnahme der Komplexe durch Endozytose erfolgt. Die Komplexe haben meist eine Größe von 50 bis 500 nm, wobei sie tendenziell kleiner und in der Regel stabiler sind als Lipoplexe (De Smedt et al., 2000). Bei der Komplexierung mittels kationischer Lipide spielt das Verhältnis von Nukleinsäure zu Polymer eine wichtige Rolle und wird als N/P-Verhältnis angegeben. Dabei beschreibt N die Stoffmenge an Aminogrup-

Abbildung 1.1: Strukturformeln verzweigtes (a) und lineares (b) Polyethylenimin. Primäre (blau), sekundäre (rot) und tertiäre (schwarz) Aminogruppen

pen im Polymer und P die Stoffmenge an Phosphatgruppen, die im Rückgrad der Nukleinsäure vorhanden sind.

Im Folgenden werden die drei am häufigsten eingesetzten kationischen Polymere Polyethylenimin, Poly-L-Lysin und Chitosan näher vorgestellt.

Polyethylenimin

Der Goldstandard unter den kationischen Polymeren ist das Polyethylenimin (PEI). Es wurde erstmals 1995 zum Zwecke des Gentransfers in verschiedene Zelllinien in vitro und auch für in vivo Versuche in Gehirnen von neugeborenen Mäusen erfolgreich eingesetzt (Boussif et al., 1995). Es wird je nach Verzweigung zwischen linearem (l-PEI) und verzweigtem (branched) PEI (br-PEI) unterschieden. Das l-PEI besteht fast ausschließlich aus sekundären Aminogruppen, wohingegen im br-PEI primäre, sekundäre und auch tertiäre Aminogruppen vorliegen (vergl. Abbildung 1.1). Für den Gentransfer werden hauptsächlich 25 kDa branched und 22 kDa lineares PEI eingesetzt. Verschiedene Publikationen konnten aber auch die erfolgreiche Verwendung von niedermolekularem PEI demonstrieren (Shin et al., 2005; Thomas et al., 2005). Bei PEI ist jedes dritte Atom der Polymerkette Stickstoff und somit protonierbar. Daraus resultiert eine starke Pufferkapazität, womit sich die hohe Transfektionseffizienz erklären lässt (Boussif et al., 1995). Die Transfektion von Zellen mit PEI startet mit der Adsorption der Komplexe an die Zelloberfläche. Es folgt die Endozytose der Komplexe. Im Endosom sinkt der pH-Wert auf 5 ab, wodurch der Protonierungsgrad des PEI steigt. Durch das darauf folgende Einströmen von Chloridionen und Wasser erhöht sich der osmotische Druck im Endosom. Dies führt schließlich zur Ruptur des Endosoms und setzt die PEI/pDNA-Komplexe ins Zytosol frei. Diese Eigenschaft wird auch als Protonenschwammeffekt (engl. *proton sponge effect*) bezeichnet (Boussif et al., 1996). Die positive Ladung von Stickstoffatomen bedingt allerdings auch die Toxizität, die vor allem bei der *in vivo* Anwendung von Nachteil ist. Die Verwendung von br-PEI für die pulmonale Applikation führte zu einer 9-fach höheren Expression im Lungengewebe im Vergleich zu 1-PEI (Rudolph et al., 2005). Bei der Verwendung von br-PEI als Aerosol hat ein N/P-Verhältnis von 10 den effektivsten Gentransfer geliefert (Gautam et al., 2000).

Poly-L-Lysin

Poly-L-Lysin (PLL) ist ein kationisches Polymer, das als eines der ersten zum Gentransfer eingesetzt wurde. Es handelt sich um ein lineares Polymer aus Lysin-Bausteinen. PLL ist bioabbaubar und eignet sich deshalb besonders gut für die *in vivo* Anwendung. Trotz der ähnlich effizienten Aufnahme der PLL/pDNA-Komplexe in die Zelle, ist die Expression im Vergleich zu PEI/pDNA-Komplexen niedriger. Dieses Phänomen wird auf den fehlenden Protonenschwammeffekt zurückgeführt (Merdan et al., 2002), wodurch die Freisetzung der pDNA ins Zytosol vermindert ist. Die zusätzliche Gabe von Chloroquin, das den pH-Wert innerhalb der endosomalen Vesikel neutralisiert, kann die Effizienz steigern (Pouton et al., 1998).

Chitosan

Chitosan ist ein lineares Biopolymer, welches sich von Chitin ableitet. Es besteht aus β-1,4-glykosidisch verknüpften N-Acetylglucosaminresten. Je nach Molekulargewicht kann Chitosan zusammen mit Nukleinsäuren stabile, etwa 100 nm große Komplexe bilden (MacLaughlin et al., 1998). Wie PLL ist Chitosan bioabbaubar und somit weniger toxisch als PEI. Im direkten Vergleich der beiden Polymere konnte jedoch nach intratrachealer Applikation für PEI eine höhere Genexpression in der Lunge gezeigt werden. Dies wird darauf zurückgeführt,

dass pDNA aus PEI-Komplexen schneller freigesetzt wird. Die Expression, die mit Chitosan erreicht werden kann, ist vergleichbar zu derjenigen die mit Lipoplexen erreicht wird (Koping-Hoggard et al., 2001).

1.3 Applikation von nicht-viralen Genvektoren in die Lunge

Es gibt zwei Applikationswege in die Lunge:

- (1) die systemische Applikation über die Blutbahn
- (2) die lokale Applikation mit Aerosolen

Sowohl mit Lipoplexen als auch mit Polyplexen konnte die erfolgreiche Transfektion des Lungengewebes *in vivo* durch intravenöse Gabe erreicht werden (Li and Huang, 1997; Goula et al., 1998). Die systemische Gabe hat verschiedene Nachteile, so müssen z.B. intravenös applizierte Partikel auf ihrem Weg zur Lunge verschiedene physikalische und biologische Hürden überwinden. Dadurch erreicht in der Regel nur ein Bruchteil des eingesetzten Materials das Zielorgan. Folglich müssen hohe Substanzmengen eingesetzt werden, was insbesondere hinsichtlich der Toxizität Probleme birgt (Chollet et al., 2002).

Die lokale Applikation von Gentherapeutika bietet eine attraktive Alternative zur intravenösen Verabreichung. Ein großer Vorteil dieser Methode besteht darin, dass der Eingriff nicht invasiv und somit schonender ist. Die Verminderung von schwerwiegenden Nebenwirkungen durch systemische Entzündungsreaktionen ist als weiterer Vorteil hervorzuheben (Gautam et al., 2000). Es stehen bereits gut entwickelte Methoden zur Verfügung, wie beispielsweise die Applikation als Aerosol (Rudolph et al., 2005) oder die lokale Applikation mittels MicroSprayer® Aerosolizer (Bivas-Benita et al., 2005). In beiden Fällen werden die Gentransfer-Komplexe mittels Ultraschall beziehungsweise Druck zu kleinen Aerosoltröpfchen mit einem Durchmesser von ca. 0,5-5,0 µm vernebelt oder versprüht und so in die Lunge von Versuchstieren appliziert.

1.3.1 Limitationen der Aerosolapplikation

Mit der Vernebelung von PEI/pDNA-Polyplexen konnte bereits *in vivo* die erfolgreiche Transfektion von Atemwegsepithelzellen gezeigt werden (Rudolph et al., 2005). Trotzdem gibt es bei der lokalen Applikation der Genvektoren verschiedene Limitationen. So wird die Effizienz des Gentransfers durch die Anwesenheit von alveolaren Makrophagen reduziert. Diese führen durch Phagocytose der Genvektor-Partikel zu einer schnellen alveolären Elimination (Lombry et al., 2004; Dames et al., 2007). Durch den Einsatz von modifizierten Polymeren mit zielgerichteten Liganden konnte der Gentransfer in die Lunge effektiver gestaltet werden (Elfinger et al., 2009; Geiger et al., 2009). Dank des Einbringens von Liganden kommt es wahrscheinlich zu einer schnelleren Internalisierung der Komplexe, wodurch sie für extrazelluläre Abwehrmechanismen nicht mehr sichtbar sind und die Effizienz gesteigert ist.

Der größte Nachteil bei der Verwendung von Aerosolen ist die geringe Stabilität der Genvektor-Komplexe in wässrigen Lösungen (Anchordoquy and Koe, 2000). Es kommt schon nach kurzer Zeit zur Aggregation der Partikel (Mahato et al., 1997). Weiterhin entsteht ein Verlust bei der Transfektions-Effizienz (Cherng et al., 1997), mit der Folge, dass die Genvektor-Komplexe direkt vor der Verabreichung hergestellt werden müssen, um einen maximalen Effekt zu erzielen (Caplen et al., 1995). Aus diesem Grund müssen Formulierungen gefunden werden, die über eine erhöhte Stabilität verfügen.

1.3.2 Pulveraerosole als alternative Applikationsform

Die Stabilitätsprobleme, die bei wässrigen Genvektor Formulierungen auftreten, können durch die Formulierung als Pulveraerosol überwunden werden. Pulveraerosole bieten eine Reihe von Vorteilen gegenüber wässrigen Formulierungen (Li et al., 2003):

- erhöhte Stabilität
- verminderter Arzneistoffverlust während der Applikation

• verbesserte Mobilität bei der Applikation

Pulveraerosole sind weitestgehend frei von Wasser, wodurch die Gefahr von hydrolytischen Spaltungen der einzelnen Pulverbestandteile minimiert wird. Die Verneblung z.B. mit einem Pariboy (PARI GmbH, Starnberg) erfordert den Einsatz großer Volumina, wobei ein Rest der Formulierung in der Vernebelungskammer zurückbleibt. Dies kann bei Pulveraerosolen verhindert werden, da das Pulver aus seinen einzelnen Reservoirs komplett in die Lunge aufgenommen wird, wodurch der Arzneistoffverlust vermindert wird. Einen weiteren Vorteil bietet die handlichere Form eines Pulverinhalators. Es ist möglich, das Pulver an jedem Ort ohne großen Aufwand zu applizieren, was bei einem Vernebler nicht zwangsläufig der Fall ist.

Zum Veröffentlichungszeitpunkt dieser Arbeit liegen nur wenige Studien vor, die sich mit Pulveraerosolen für den nicht-viralen Gentransfer beschäftigen. In einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung wurde der erfolgreiche Einsatz eines durch Sprüh-Gefriertrocknung hergestellten Pulvers, bestehend aus pDNA, Chitosan und Mannitol, im Tierversuch demonstriert (Mohri et al., 2010). In einer vergleichenden Studie zwischen Genvektorlösungen, bestehend aus PEI und Chitosan, konnte gezeigt werden, dass PEI zu einer höheren Transfektions-Effizienz führt (Koping-Hoggard et al., 2001). Deshalb würde die in dieser Arbeit angestrebte Entwicklung eines Pulveraerosols mit PEI/pDNA-Partikeln einen Fortschritt darstellen.

1.3.3 Methoden zur Herstellung von Pulveraerosolen

Zur Herstellung von Pulveraerosolen für Genvektor-Komplexe stehen drei verschiedene Verfahren zur Verfügung:

- (1) Gefriertrocknung
- (2) Sprühtrocknung
- (3) Sprüh-Gefriertrocknung

Gefriertrocknung

Die Gefriertrocknung, die auch als Lyophilisation oder Sublimationstrocknung bezeichnet wird, ist ein schonendes Verfahren zur Trocknung flüssiger Formulierungen. Die Eiskristalle sublimieren bei diesem Verfahren direkt ohne den Übergang in den flüssigen Zustand. Das Endprodukt der Gefriertrockung wird als Lyophilisat bezeichnet. In der aus zwei Kammern bestehenden Lyophilisations-Apparatur steht die zu trocknende Formulierung auf einer beheiz- und kühlbaren Stellfläche und wird zuerst bei Normaldruck eingefroren. In der zweiten Kammer ist ein Kondensator eingebaut, der auf eine niedrigere Temperatur als die Formulierung eingestellt ist. Im ersten Trocknungsschritt wird das im Gut enthaltene Wasser durch Anlegen eines Vakuums sublimiert. Diesem Vorgang liegt die Eigenschaft des Wassers zugrunde, auch im gefrorenen Zustand einen ausreichend hohen Dampfdruck zu haben, um direkt vom gefrorenen in den gasförmigen Zustand übergehen zu können. Der sublimierte Wasserdampf schlägt sich als Eis auf dem kälteren Kondensator nieder. Die Sekundärtrocknung entfernt durch Erwärmen stärker gebundenes Wasser aus der Formulierung.

Die Gefriertrocknung ist die am häufigsten verwendete Methode zur Herstellung von trockenen Protein- oder Genvektor-Formulierungen. Eine Reihe von Studien hat die Eignung der Lyophilisation zur Stabilisierung von nichtviralen Genvektor-Systemen, wie Lipid-pDNA-Komplexen (del Pozo-Rodriguez et al., 2009; Maitani et al., 2008; Molina et al., 2004), PEGylierten Lipid-pDNA-Komplexen (Armstrong et al., 2002) und PEI/pDNA-Komplexen (Brus et al., 2004; Talsma et al., 1997) gezeigt. Zur Erhaltung von Partikelgröße und Transfektions-Effizienz mussten unterschiedliche Lyoprotektoren eingesetzt werden (Packhaeuser et al., 2009; Reinisalo et al., 2006; Anchordoquy et al., 2005; Talsma et al., 1997). Für Protein-Formulierungen konnte gezeigt werden, dass Lyoprotektoren, die als Hilfsstoffe bei der Gefriertrocknung eingesetzt werden, Wasserstoffbrückenbindungen zum Protein ausbilden (Carpenter and Crowe, 1989). Weiterhin spielen die verwendeten Hilfsstoffe eine wichtige Rolle im getrockneten Gut, indem sie direkte Wechselwirkungen mit dem getrockneten Protein eingehen (Carpenter et al., 1993). Liegen Protein und Hilfsstoff beide amorph

vor, bindet der Hilfsstoff an das in gleicher Phase vorliegende Protein und stabilisiert die Proteinstruktur (Carpenter and Crowe, 1988). Da der Hilfsstoff in diesem Fall als Wasserersatz fungiert, wird diese Theorie auch als *water replacement theory* bezeichnet. Der protektive Effekt der Lyoprotektoren bei Genvektor-Formulierungen wird kontrovers diskutiert. Crowe et al. postulierten, dass die Vitrifizierung (Glasbildung) wahrscheinlich nötig sei, um die Partikelgröße von Lipid/pDNA-Komplexen beizubehalten, allerdings nicht alleine ausreiche, um dieses Ziel zu erreichen (Crowe et al., 1994). Allison et al. haben dagegen die Hypothese aufgestellt, dass die Beibehaltung der Partikelgröße nicht auf die "Glasbildung"mit den Disacchariden zurückzuführen sei, sondern vielmehr auf die Separation von einzelnen Komplexen innerhalb der nicht gefrorenen Fraktionen der Formulierung. Diese Theorie wird als *particle isolation hypothesis* bezeichnet (Allison et al., 2000).

Bei der Lyophilisation von Genvektor-Komplexen werden am häufigsten Disaccharide, wie Saccharose und Trehalose, oder Zuckeralkohole, wie Mannitol, als Lyoprotektoren verwendet (Packhaeuser et al., 2009; Brus et al., 2004; Molina et al., 2001; Cherng et al., 1999). Vor kurzem wurden eine Studie veröffentlicht, in der Hyaluronsäure als Lyoprotektor eingesetzt wurde (Ito et al., 2010). Außerdem führt der Einsatz niedrig molekularer Dextrane zur Stabilisierung nichtviraler Formulierungen (Anchordoquy et al., 2005). Der Zusatz dieser Hilfsstoffe ermöglicht es, die Partikelgröße in den Formulierungen konstant zu halten. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Beibehaltung der Partikelgröße eng mit der Transfektions-Effizienz nach der Lyophilisation korreliert ist (Allison and Anchordoquy, 2000; Cherng et al., 1997, 1999) und somit eine wichtige Rolle für die weitere Verwendung dieser Komplexe spielt.

Für die Verwendung als Pulveraerosol müssen die getrockneten Lyophilisate im Anschluss zerkleinert werden. Diese Methode wurde bisher kaum untersucht. In einer Veröffentlichung von Seville et al. wurden lyophilisierte DOTAP/Protaminsulfat/pDNA Komplexe mit Pistill und Mörser zu einem feinen Pulver zerkleinert. Daraus resultierte jedoch ein heterogenes Pulver mit einer mittleren Partikelgröße von mehr als 18 µm (Seville et al., 2002). Dieses Ergebnis zeigt, dass

eine weitere Entwicklung des Zerkleinerungsverfahrens nötig ist, um Pulveraerosole zu generieren, die eine lungengängige Partikelverteilung (1- $5 \mu m$ aerodynamischer Durchmesser) aufweisen.

Sprühtrocknung

Die Sprühtrocknung stellt eine weitere Methode zur Generierung trockener Pulverformulierungen dar. Bei dieser Methode wird die flüssige Formulierung im oberen Teil des Sprühturms vernebelt. Dabei strömt gleichzeitig heiße Trocknungsluft entweder von unten nach oben (Gegenstromverfahren) oder von oben nach unten (Gleichstromverfahren) durch den Turm und trocknet die feinen Tropfen durch ihre große Oberfläche fast augenblicklich. Als fertiges Produkt entsteht ein feines Pulver. Je nach Einstellung der Sprühdüse und des Luftstroms kann dabei die Partikelgröße der Pulverteilchen so eingestellt werden, dass eine lungengängige Verteilung entsteht. Dadurch kann auf einen weiteren Zerkleinerungsschritt, wie er bei der Lyophilisation nötig ist, verzichtet werden.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Sprühtrocknung ein geeignetes Verfahren zur Herstellung trockener Genvektor-Formulierungen darstellt (Seville et al., 2002; Li et al., 2003, 2005). Zur Stabilisierung der Komplexe wurde jeweils Lactose zugesetzt. Außerdem wurden verschiedene Aminosäuren auf ihre Fähigkeit, die Vernebelung der resultierenden Pulver zu verbessern, untersucht (Li et al., 2003, 2005).

Sprüh-Gefriertrocknung

Die Sprüh-Gefriertrocknung kombiniert die beiden oben beschriebenen Methoden. Eine wässrige Lösung wird mit einer Sprühdüse in kleine Tröpfchen zerteilt, die in flüssigen Stickstoff eingeleitet werden und damit sofort einfrieren. Im Folgenden wird das in den gefrorenen Tröpfchen enthaltene Wasser durch Lyophilisation entfernt. Es resultiert ein feines Pulver, welches aus sehr porösen kleinen Partikeln besteht.

Die Sprüh-Gefriertrocknung wurde bereits in verschiedenen Versuchen zur Herstellung von trockenen Genvektor-Formulierungen verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die pDNA durch Polymere wie Chitosan oder PEI geschützt sein muss, um nicht während des Prozessen zerstört zu werden (Kuo and Hwang, 2004; Mohri et al., 2010). Außerdem müssen, wie auch bei der Lyophilisation, Lyoprotektoren zugesetzt werden, um die Partikelgröße und damit die Transfektions-Effizienz beizubehalten. Dazu wurden die Disaccharide Saccharose und Trehalose sowie der Zuckeralkohol Mannitol eingesetzt (Kuo and Hwang, 2004).

1.4 Viraler Gentransfer

Virale Vektoren stellen die zweite große Gruppe der Gentherapeutika dar. Viren haben die Eigenschaft ihre Nukleinsäure in eine Wirtszelle einzubringen und eignen sich daher zum Einsatz in der Gentherapie. Bei den für den Gentransfer eingesetzten Vektoren werden die viralen Gene durch das gewünschte therapeutische Gen ersetzt. Aufgrund ihrer hohen Effektivität sind sie die am häufigsten eingesetzten Vektoren in klinischen Studien. Virale Vektoren für den Gentransfer sind in der Regel replikationsdefizient, das heißt sie können sich nach Transduktion einer Zelle nicht in dieser vermehren, was die Ausbreitung der viralen Vektoren nach *in vitro*- und *in vivo*-Applikation verhindert. Daher müssen zur Produktion der viralen Vektoren sogenannte Verpackungszelllinien und Helferkonstrukte eingesetzt werden (Thomas et al., 2003).

Trotz vielfältiger Entwicklungen beschränken sich die für den pulmonalen Gentransfer verwendeten Vektoren hauptsächlich auf Retro- bzw. Lentiviren, Adenoviren und Adeno-assoziierte Viren, die im Folgenden näher dargestellt werden.

1.4.1 Retro- und Lentiviren

Retro- und Lentiviren sind einzelsträngige RNA-Viren, die ihr RNA Genom durch reverse Transkription in DNA umschreiben und anschließend diese DNA in die chromosomale DNA des Wirts einbauen. Das Genom eines Retrovirus ist 7-12 kb groß und diploid angelegt, das heißt jedes Retrovirus hat zwei Kopien

seines Genoms. Es enthält retrovirale Gene, die von beiden Seiten von LTRs (*long terminal repeats*) flankiert sind. Die drei Gene *gag*, *pol* und *env* kodieren jeweils für Kernproteine, Reverse Transkriptase und Hüllproteine.

Die Verwendung von Retroviren bietet eine Reihe von Vorteilen (McTaggart and Al-Rubeai, 2002):

- stabile Integration des therapeutischen Gens in das Zielgenom und dadurch persistierende Genexpression
- hohe Transduktionseffizienz
- vielfältige Zielzellen können durch pseudotyping (das heißt durch den Einsatz verschiedener Virushüllen) transduziert werden
- geringe Immunogenität

Demgegenüber stehen verschiedene Nachteile. Mit Retroviren ist es z.B. nicht möglich, sich nicht-teilende Zellen zu tranduzieren (Engelhardt et al., 1992). Den größten Nachteil stellt aber die insertionelle Mutagenese dar, die bei der Verwendung von Retroviren in klinischen Studien beobachtet wurde (Hacein-Bey-Abina et al., 2003). Als insertionelle Mutagenese wird die Aktivierung eines Protoonkogens oder die Zerstörung eines Tumorsuppressorgens in der Zielzelle durch die genomische Integration der viralen DNA bezeichnet (Akagi et al., 2004). Diese Befunde schränken die klinische Anwendung von Retroviren stark ein. Mit der Entwicklung der Lentiviren konnte die Transduktion von sich nicht-teilenden Zellen erreicht werden. Außerdem konnte in Studien in CD34⁺ hämptopoetischen Zellen gezeigt werden, dass die Hauptintegrationsstellen der Lentiviren sich nicht in der Nähe von Protoonkogenen anreichern (Cattoglio et al., 2007), wodurch sich die Gefahr der insertionellen Mutagenese verringern soll. Ganz ausgeschlossen werden kann sie allerdings nicht, da die Integration von Zelltyp zu Zelltyp unterschiedlich verläuft.

1.4.2 Adenoviren

Adenoviren sind lineare, doppelsträngige, DNA-enthaltende, hüllenlose Viren. Das Genom von Adenoviren ist mit ca. 35 kb deutlich größer und komplexer als das der Retroviren (Smith, 1995). Sie haben einen Tropismus für die Luftwege und die Fähigkeit, eine breite Anzahl verschiedener Zellen zu transduzieren, da es eine Vielzahl verschiedener Serotypen gibt (Wu et al., 2002). Von Nachteil ist, dass der Coxsacki-Adenovirus-Rezeptor nur auf der basolateralen Seite der Epithelzellen in den unteren Luftwegen lokalisiert ist (Pickles et al., 2000). Dadurch ist der Gentransfer in vivo in die Lunge sehr ineffizient. Ein weiterer Nachteil ist die starke Immunantwort, die durch die Applikation von Adenoviren, insbesondere der ersten Generation, induziert wird. Neben der Bildung von neutralisierenden Antikörpern, die eine wiederholte Applikation ineffektiv macht, kommt es zu starken inflammatorischen Immunreaktionen und zu einer zytotoxischen T-Zell-Antwort (O'Neal et al., 1998; Yang et al., 1995). Die Entwicklung von helper dependant-Adenoviren hat einige Verbesserungen mit sich gebracht. Bei diesen Viren sind alle viralen Gene durch humane "Füll"-DNA ersetzt. Für sie konnte eine reduzierte Immunantwort kombiniert mit einer verbesserten Expression in vivo gezeigt werden (Toietta et al., 2003). Ob mit diesem Vektor allerdings eine wiederholte Applikation möglich ist, wurde noch nicht untersucht.

1.4.3 Adeno-assoziierte Viren

Adeno-assoziierte Viren (AAV) sind hüllenlos und tragen einzelsträngige DNA. Der Wildtyp-Virus ist beim Menschen nicht pathogen, integriert an einer definierten Stelle in Chromosom 19 und kann eine Vielzahl sich teilender und nicht teilender Zellen transduzieren (Samulski et al., 1991). Bei AAV handelt es sich um helferabhängige Viren, das heißt sie brauchen zur Proliferation einen Helfervirus, der sie mit Proliferationsgenen versorgt. Bei der Verwendung von AAV in der Gentherapie werden das *rep* Gen, das für die gezielte Integration in Chromosom 19 verantwortlich ist, und das *cap* Gen, das für das Capsid kodiert, durch das Transgen zusammen mit dessen Promotor ersetzt. Somit bleiben nur die beiden

inverted terminal repeats (ITRs) aus dem Wildtyp erhalten. Einen Nachteil stellt die mit 4,7 kb begrenzte Kapazität der AAV dar. Außerdem liegen die AAV nach Transduktion episomal vor und werden nicht ins Wirtsgenom integriert (McCarty et al., 2004). Da das Lungengewebe aber zum größten Teil aus differenzierten Zellen besteht, dürfte der Virus-Verlust durch subsequente Zellteilung *in vivo* zu vernachlässigen sein. Bei den AAV besteht die Möglichkeit durch Pseudotyping die Affinität zu bestimmten Zellen zu erhöhen, wobei das Capsid durch ein Capsid eines anderen Virus-Subtyps ersetzt wird (Burger et al., 2004). Im Gegensatz zu Adenoviren resultieren AAV in einer milden Immunantwort. Es kommt nach der Applikation zur Entwicklung von neutralisierenden Antikörpern (NAB), die aber durch transiente Immunsuppression während der ersten Applikation verhindert werden kann (Halbert et al., 1998). Untersuchungen bei gesunden Menschen haben gezeigt, dass etwa 70% durch Infektion mit dem Wildtyp-Virus bereits NABs gegen den Serotypen 2 gebildet haben. Für die Subtypen AAV5, -6, -8 und -9 wurden geringere Prävalenzen und geringere Titer gezeigt. Dies sind Anzeichen dafür, dass die Verwendung dieser Subtypen von Vorteil sein könnte (Boutin et al., 2010).

1.5 AAV2/9 für den viralen Gentransfer in die Lunge

Die meisten klinischen Studien wurden mit dem Serotypen 2 durchgeführt (Mueller and Flotte, 2008). Dabei führte vor allem der Mangel an Rezeptoren an der apikalen Seite der Luftwegs-Epithelzellen zu einer limitierten Effizienz (Virella-Lowell et al., 2005). Mit der Einführung des *Pseudotypings* ergab sich die Möglichkeit, die Limitationen durch fehlende Rezeptoren und hohe NAB Titer zu umgehen (Rabinowitz et al., 2002; Halbert et al., 2001, 2006). In vielen Studien mit verschiedenen Serotypen konnte die Langzeit-Expression nach pulmonaler Applikation eines Transgens gezeigt werden (Halbert et al., 2001, 2007; Sumner-Jones et al., 2006; Liqun Wang et al., 2009; Zabner et al., 2000; Limberis et al., 2009b). In einer weiteren Studie, in der verschiedene Serotypen *in vivo*, in murinen Lungen, und *in vitro*, in humanen Atemwegs-Epithelzellen, verglichen wur-

den, zeigte sich, dass AAV9 zusammen mit anderen Serotypen zu einer hoch effizienten Expression führt (Limberis et al., 2009b). Des Weiteren konnte nach intrapulmonaler Applikation die Transduktion von alveolaren Epithelzellen gezeigt werden (Limberis and Wilson, 2006; Limberis et al., 2009b), wodurch dieser Serotyp ein vielversprechender Kandidat für die Behandlung von Surfactant-Protein-Mangelkrankheiten ist, die primär die Alveolarzellen Typ II betreffen.

Die Studie von Limberis et al. war die Erste, die die erfolgreiche pulmonale Applikation von AAV2/9 demonstrieren konnte (Limberis and Wilson, 2006). In dieser Studie wurden humanes Alpha-1-Antitrypsin und nukleär lokalisierte Beta-Galactosidase als Reporter bei C57BL/6-Mäusen eingesetzt. Für diese Mäuse ist eine Immuntoleranz gegenüber humanem Alpha-1-Antitrypsin bekannt (Flotte and Laube, 2001) und auch die Verwendung von Beta-Galactosidase führt im Vergleich zu Balb/c-Mäusen zu einer reduzierten Immunantwort (Gavin et al., 1993). Tatsächlich konnte für die drei am häufigsten verwendeten Reportergene lacZ (Gavin et al., 1993), EGFP (Gambotto et al., 2000) und *firefly*-Luciferase (Limberis et al., 2009a) eine höhere Immunogenität in Balb/c-Mäusen im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen gezeigt werden.

Bei der Behandlung chronischer Krankheiten muss gewährleistet werden, dass das Transgen über den gesamten Lebenszeitraum eines Individuums exprimiert wird. Da die Lunge aber zum größten Teil aus terminal differenzierten Zellen besteht (Rawlins and Hogan, 2008) und diese sich nicht weiter erneuern, wird es wahrscheinlich mit jedem Vektor nötig sein, wiederholt zu behandeln, solange keine "Lungenstammzellen"transduziert werden. Bezüglich der Möglichkeit zur wiederholten Applikation von AAV gibt es widersprüchliche Veröffentlichungen. Die Entwicklung neutralisierender Antikörper vermindert die Effektivität bei wiederholter Behandlung mit demselben Serotypen (Sumner-Jones et al., 2007; Halbert et al., 2000). Verschiedene Studien haben die erfolgreiche, wiederholte Applikation von AAV gezeigt, wenn das Immunsystem während der ersten Applikation supprimiert wurde. Dazu wurden immunsupprimierende Antikörper wie anti-CD4 und/oder anti CD40L (Manning et al., 1998) oder generell immunsuppremierende Reagenzien wie Cyclophosphamid (Bouvet et al., 1998)

eingesetzt. Weiterhin konnte in zwei Studien die erfolgreiche Readministration gezeigt werden, wenn die Applikationen im Abstand von mindestens 28 Wochen stattfanden (Limberis and Wilson, 2006; Auricchio et al., 2002). Diese Ergebnisse sind allerdings widersprüchlich zu denen von Sumner-Jones et al., bei denen die Applikation von rAAV5 in einer anhaltenden Entwicklung von NABs gegen das Virus Capsid resultierte und den Gentransfer auch 36 Wochen nach der ersten Applikation noch stark einschränkte (Sumner-Jones et al., 2007). Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten auf die Verwendung verschiedener Mausstämme zurückzuführen sein. Während die immunsupprimierenden Versuche in C57BL/6-Mäusen durchgeführt wurden, fanden die Versuche von Sumner-Jones et al. in Balb/c-Mäusen statt. Diese Ergebnisse zeigen, dass vermutlich der verwendete Mausstamm einen Einfluss auf die Immunantwort, die ein AAV-Vektor induziert, haben kann.

Der verwendete Mausstamm kann nicht nur einen Einfluss auf die Immunantwort haben, sondern auch auf die Genexpression nach pulmonaler Applikation (Dames et al., 2007). Weiterhin hat das Geschlecht der Mäuse einen Einfluss auf Genexpression und Biodistribution (Davidoff et al., 2003; Paneda et al., 2009).

Neben geeigneten immunmodulatorischen Methoden müssen die Genvektoren in geeigneten Tiermodellen getestet werden. Nahezu alle Studien werden an gesunden Mäusen durchgeführt. Bei der Behandlung von Lungenkrankheiten wie der Zystischen Fibrose oder dem Surfactant-Protein-B (SPB)-Mangel ist die Lunge des Patienten aber mit einer starken Entzündung belastet. Untersuchungen mit einem AAV2-Vektor haben nach Inkubation mit der broncho-alveolaren Lavage von CF-Patienten eine komplette Inhibition der Genexpression gezeigt (Virella-Lowell et al., 2000). Aus diesem Grund sollte der AAV2/9-Vektor zuerst in einer entzündeten Lunge getestet werden, bevor die weitere Anwendung im therapeutischen Modell denkbar ist. Als Modell zur Untersuchung des Gentransfers in entzündeten Lungen bieten sich die konditionellen SPB-Knockout-Mäuse an. Diese Mäuse sind in der Literatur sehr gut beschrieben (Clark et al., 1995; Melton et al., 2003; Ikegami et al., 2005). Sie exprimieren das humane SPB unter der Kontrolle des CCSP Promotors. Dieser wird nur bei Anwesenheit von Doxycy-

clin abgelesen, welches den Tieren über das Trinkwasser zugeführt werden kann. Bei dem SPB handelt es sich um ein Surfactant Protein der Lunge, das für eine niedrige Oberflächenspannung im Alveolarbereich sorgt und so ein Kollabieren und Verkleben der Alveolen während der Ausatmung verhindert. Die Symptomatik des SPB-Mangels kann durch Absetzen des Doxycyclin-haltigen Wassers ausgelöst werden. Die Mäuse entwickeln innerhalb kürzester Zeit eine starke Entzündung in der Lunge, die mit erhöhten IL-6, IL-1ß und den Macrophagen-Entzündungsprotein-2 Werten einhergeht und innerhalb von vier bis fünf Tagen zum Tod durch Atemversagen führt (Ikegami et al., 2005). Die erneute Doxycyclingabe kann durch die wiederaufgenommene Expression von SPB die Entzündung hemmen.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die lokale Applikation nicht-viraler und viraler Genvektoren in die Lunge bietet vielversprechendes Potenzial bei der Behandlung pulmonaler Krankheiten. Bei den nicht-viralen Genvektoren stellt insbesondere die geringe Stabilität der Aerosol-Formulierungen eine Limitation in der Anwendung dar. Im ersten Teil dieser Arbeit soll daher ein Pulveraerosol für den nicht-viralen Gentransfer entwickelt werden. Pulveraerosole haben im Vergleich zu wässrigen Formulierungen eine Reihe von Vorteilen, insbesondere verfügen sie über eine bessere Stabilität und sind einfacher anzuwenden. Unter den nicht-viralen Gentransferreagenzien bietet Polyethylenimin als effektivstes kationisches Polymer das größte Potenzial und wurde aus diesem Grund für die folgenden Untersuchungen verwendet. Die Herstellung des Pulveraerosols erfolgte durch Lyophilisation und anschließende Zerkleinerung der Lyophilisate. Dazu wurden verschiedene Disaccharide als Stabilisatoren eingesetzt. Die biophysikalischen Eigenschaften (Partikelgröße, Zetapotenzial und Freisetzung der pDNA aus den Komplexen) der Genvektor-Komplexe wurden untersucht und die Pulver mit einem Andersen-Kaskaden-Impaktor charakterisiert. Anschließend wurden die verschiedenen Formulierungen zuerst in vitro und im Anschluss in vivo untersucht.

Die *in vivo* Versuche wurden zuerst mit einem Reporterplasmid durchgeführt. Im zweiten Versuch wurde mit einem für Erythropoetin kodierenden Plasmid untersucht, ob die Genexpression in einer physiologischen Antwort resultiert.

Da mit nicht-viralen Systemen nur eine transiente Genexpression erreicht werden kann, soll im zweiten Teil der Arbeit ein viraler Vektor für die pulmonale Gentherapie untersucht werden. Unter den viralen Vektoren stellen die AAV-Vektoren eine besonders aussichtsreiche Gruppe dar. Der Wildtyp Virus ist im Menschen nicht pathogen, die Immunantwort verläuft mild und es besteht auf Grund der episomalen Positionierung keine Gefahr der insertionellen Mutagenese. Die meisten Studien verwenden einen auf Serotyp 2 basierenden AAV-Vektor. In dieser Arbeit wurde ein mit dem Capsid des AAV9 ausgestatteter Vektor charakterisiert. Nach Optimierung des Vektors-Rückgrads wurde der produzierte AAV2/9-Vektor in verschiedenen in vivo Anwendungen untersucht. Zunächst wurde der Einfluss verschiedener Applikationswege auf die Genexpression, die Entwicklung neutralisierender Antikörper und die Biodistribution überprüft. Im Anschluss wurde der Einfluss der Vektor-Dosis pro Maus untersucht. Veröffentlichte Studien über den Einfluss des Mausstammes auf die Genexpression und die Immunantwort führten zu vergleichenden Untersuchungen in verschiedenen Mausstämmen. Außerdem fand der Stellenwert des Geschlechtes auf Genexpression und Immunantwort Berücksichtigung. Da die Entwicklung neutralisierender Antikörper bisher die größte Hürde für die wiederholte Applikation von AAV-Vektoren darstellt, wurde danach untersucht, ob es durch Immunsuppression mit Dexamethason möglich ist die Entstehung neutralisierender Antikörper zu inhibieren. Außerdem wurde die Genexpression nach Applikation der Vektoren in entzündete Lungen verfolgt und mit der von gesunden Mäusen verglichen.

2 Materialien

Im Folgenden sind sämtliche Reagenzien, Chemikalien, Enzyme, Kits, Medien und Medienzusätze sowie Geräte aufgelistet, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

2.1 Reagenzien und Chemikalien

In Tabelle 2.1 finden sich die Bezeichnungen der während dieser Arbeit verwendeten Reagenzien und Chemikalien mit Herstellerangaben.

Tabelle 2.1: Reagenzien und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Biozym Diagnostik GmbH, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Complete $^{\circledR}$ Protease Inhibitoren	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
D-Luciferin 99%	Synchem OHG, Deutschland
DPBS 1x	Invitrogen GmbH, Germany
DNA Ladder 100bp	PlasmidFactory GmbH & Co. KG, Deutsch-
	land
DNA Ladder 1kB	PlasmidFactory GmbH & Co. KG, Deutsch-
	land
DTT (Dithiothreitol)	Amersham Biosciences
Ethanol 96% p.a.	Merck KGaA, Deutschland

Tabelle 2.1: Reagenzien und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Fluorescein-NHS (5-(6-) Carboxyfluorescein-	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
succinimidylester)	
$GelRed^{TM}$	VWR International GmbH, Deutschland
Heparansulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Lactose monohydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Kanamycinsulfat	Invitrogen GmbH, Germany
$KAPA^{TM}$ SYBR FAST® BioRad iCycler TM	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Deutschland
Kupfersulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Lipofectamin 2000	Invitrogen GmbH, Germany
Mannitol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Natriumphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Natronlauge 1M	Merck KGaA, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Deutschland
Polyethylenimin, verzweigt 25kDa	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Rekombinante Luciferase	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA) Protein Standard	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Salzsäure 36%	Merck KGaA, Deutschland
Standard Protein Assay	BioRad Laboratories GmbH, Deutschland
Saccharose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
TAE 50x buffer	Invitrogen GmbH, Germany
Trehalose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Tris/HCL (pH7,5)	VWR International GmbH, Deutschland

Tabelle 2.1: Reagenzien und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Trypsin-EDTA	Invitrogen GmbH, Germany
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Wasser für Injektionszwecke	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Xylencyanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland

Die aufgelisteten Reagenzien und Chemikalien wurden ohne weitere Reinigungsschritte verwendet.

Verzweigtes Polyethylenimin wurde in destilliertem Wasser gelöst und mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

PEI-Fluorescein wird durch die Kopplung von Fluorescein-NHS an verzweigtes Polyethylenimin gewonnen. Dazu wurde Fluorescein-NHS in einem 10-molaren Überschuss mit PEI für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Kopplungsprodukt durch Größenausschluss-Chromatographie über eine PD-10 Desalting Column (GE Healthcare) gereinigt. Die Gehaltsbestimmung erfolgte über ein Kupfersulfat-Assay nach Ungaro et al., 2003).

2.2 Enzyme

Folgende Enzyme wurden in dieser Arbeit verwendet:

Tabelle 2.2: Restriktionsenzyme

Bezeichnung	Hersteller
EcoRI	Fermentas
MlnI	Fermentas
PmeI	New England Biolabs

2.3 Kits

Es wurden folgende Kits während dieser Arbeit verwendet:

Tabelle 2.3: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
BetaGal Reportergene Assay Kit	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
DNEasy® Blood & Tissue Kit	Quiagen AG, Deutschland
NucleoBond PC 2000 EF	MACHEREY-NAGEL GmbH, Deutschland
NucleoSpin extract II	MACHEREY-NAGEL GmbH, Deutschland
NucleoSpin plasmid	MACHEREY-NAGEL GmbH, Deutschland

2.4 Medien und Medienzusätze

Folgende Medien und Medienzusätze wurden während dieser Arbeit verwendet:

Tabelle 2.4: Medien und Medienzusätze

Bezeichnung	Hersteller
Fetal Bovine Serum (FBS)	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Minimum Essential Media mit Gluta \mathbf{MAX}^{TM}	Invitrogen GmbH, Germany
Penicillin/Streptomycin 100x	PAA Laboratories GmbH, Österreich
RPMI 1640 Medium mit Gluta MAX^{TM}	Invitrogen GmbH, Germany

2.5 Geräte und Chromatographiesäulen

Folgende Geräte und Chromatographiesäulen kamen in dieser Arbeit zum Einsatz:

Tabelle 2.5: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller	
Airpump, Model AP-1	Penn-Century, Inc	
Analysenwaage Electronic Balance ABJ 80-4M	Kern & Sohn GmbH, Deutschland	
Brookhaven 90 Plus Partikelgrößenmessgerät	BIC Brookhaven Inst. Corp., Österreich	
Bruker AV 250 MHz Spektrometer	Bruker BioSpin GmbH, Deutschland	
CapMix	3M ESPE	
Dry-Powder-Insufflator	Penn-Century, Inc	
Excella E24 Incubator shaker series	New Brunswick Scientific GmbH, Deutschland	
Geldokumentation, Camera system Diana II	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Deutschland	
Gelelektrophoresekammer Horizon® 11x14	GIBCO BRL, Deutschland	
Haematologie-System KX-21	Sysmex, Deutschland	
Heizblock Thermomixer compact	Eppendorf AG, Deutschland	
Heizplatte Tempcontrol-37	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Deutschland	
iCycler IQ Real Time PCR Detection System	BioRad Laboratories GmbH, Deutschland	
Inkubator CO ₂ -Series	Sheldon Mfg Inc., USA	
Inkubator-Shaker Excella E24	New Brunswick Scientific Inc., USA	
Inkubator 1000/Schüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	
IVIS 100 in vivo imaging System	Xenogen Inc., USA	
Kühlschrank FKS 1800	Liebherr GmbH, Deutschland	
Kühlschrank Liebherr Comfort	Eppendorf AG, Deutschland	
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Deutschland	
Luminometer Lumat LB9507	Berthold AG, Deutschland	
LyoVac GT2	LH Leybold, Deutschland	
Malvern Zetasizer Nano	Malvern Instruments, Deutschland	
Nanodrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	
Orthoscop Beta 200	Heine Optotechnik, Deutschland	

Tabelle 2.5: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller			
pH-Meter pH 330i	WTW, Deutschland			
Steilwerkbank Herasafe	Heraeus Holding GmbH, Deutschland			
Tiefkühler Liebherr Premium	Liebherr GmbH, Deutschland			
Tischwaage Navigator TM	Ohaus GmbH, Deutschland			
Tischzentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Deutschland			
Vortexer MS2 Minishaker	Ika GmbH & Co. KG, Deuschland			
Wallac Victor 2 / 1420 Multilabel Counter	PerkinElmer Inc., USA			
Wasserbad 1008	Gesellschaft für Labortechnik GmbH,			
	Deutschland			
Zentrifuge, J2-21 Centrifuge	Beckmann Coulter GmbH, Deutschland			
Zentrifuge, Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Deutschland			

2.6 Oligonukleotide

Die Synthese der in dieser Arbeit verwendeten, nachfolgend aufgelisteten Oligonukleotide wurde von der Firma Biomers GmbH, Deutschland durchgeführt.

Tabelle 2.6: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' nach 3')
FP Luciferase	tca aag agg cga act gtg tg
RP Luciferase	ggt gtt gga gca aga tgg at
FP Zeocin	gcc atg ttg acc agt gct gtc
RP Zeocin	cct cag tcc tgc tcc tct gcc

2.7 Arzneistoffe

Folgende Arzneistoffe wurden als Narkosemittel, Antidot und zur Immunsuppression bei den Tierversuchen eingesetzt:

Tabelle 2.7: Verwendete Arzneistoffe

Bezeichnung	Bezugsquelle	
Dexa-ratiopharm $^{\mathbb{R}}$ 4 mg Injektionslösung	Ratiopharm GmbH, Deutschland	
$\operatorname{Domitor}^{\circledR}$ ad us. vet., Injektionslösung (Me-	Pfizer AG, Deutschland	
detomidin 1 mg/ml)		
Fentany [®] -Janssen 0,1 mg Injektionslösung	Janssen-Cilag GmbH, Deutschland	
(Fentanyl 0,1 mg/ml)		
Flumazanil HEXAL ® 0,1 mg/ml Injektions-	Hexal AG, Deutschland	
lösung		
Forene [®]	Abbott GmbH & Co. KG, Deutschland	
Midazolam-ratiopharm $^{\circledR}$ 15 mg/3 ml Injekti-	Ratiopharm GmbH, Deutschland	
onslösung (Midazolam 5 mg/ml)		
Naloxon Inresa 0,4 mg Injektionslösung	Inresa Arzneimittel GmbH, Deutschland	
Revertor® 5 mg/ml	CP-Pharma GmbH, Deutschland	

2.8 Zusammensetzung von Puffern

Nachfolgend ist die Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Puffer beschrieben. Die Puffer wurden mit demineralisiertem, sterilem Wasser hergestellt.

10x Zelllysepuffer (Luziferase Assay)	
Tris/HCl pH 7.8	250 mM
Triton-X 100	0,1%
6x DNA-Ladepuffer (Agarosegele)	
Bromphenolblau	0,25%
Glycerol	30%
Xylencyanol FF	0,25%
Lysepuffer (Lungenhomogenisat)	
Tris/HCl pH 7.4	25 mM
Triton-X 100	0,1%
Protease Inh. Complete [®]	1x
Luciferin-Substrat	
D-Luciferin	$470\mu\mathrm{M}$
Coenzym A	$270\mu\mathrm{M}$
DTT	33,3 mM
ATP	$530\mu\mathrm{M}$
$(MgCO_3)_4Mg_2x5H_2O$	1,07 mM
$MgSO_4$	2,67 mM
EDTA	0,1 mM
Tricin	20 mM

3 Methoden

Im folgenden werden alle in dieser Arbeit angewandten Methoden beschrieben.

3.1 Zellkultur

Die *in vitro* Versuche wurden auf verschiedenen Zelllinien durchgeführt, die zusammen mit den Kultivierungsbedingungen im Folgenden beschrieben werden.

3.1.1 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden in dieser Arbeit verwendet:

Tabelle 3.1: Verwendete Zelltypen

Bezeichnung	Zelltyp	Bezugsquelle
A549	humane Alveolar Typ II Zelllinie	DSMZ, Deutschland
BEAS-2B	humane Bronchialepithel Zelllinie	ATCC, Deutschland
16HBE14o-	humane Bronchialepithel Zelllinie	Prof. D. C. Gruenert*
MLE12	murine Alveolar Typ II Zelllinie	ATCC, Deutschland
*Duck D. C. Consequent University of Version and Development LICA		

*Prof. D. C. Gruenert, University of Vermont, Burlington, USA

3.1.2 Kultivierungsbedingungen

Die humanen Alveolar- und Bronchialepithelzelllinien A549, BEAS-2B und 16HBE140- sowie die murine alveolar Typ II Zelllinie MLE12 wurden in Minimum Essential Medium (MEM) kultiviert. Bovines Serumalbumin (FBS) wurde MEM in einer Konzentration von 10% zugesetzt. Die adhärenten Zelllinien A549, BEAS-2B, 16HBE140- und MLE12 wurden alle 3-4 Tage passagiert. Dazu wurde

das Medium abgesaugt, die Zellen durch Waschen mit PBS von Calcium- und Magnesiumionen befreit und anschließend mit Trypsin-EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Ein Teil der gelösten Zellen wurde entnommen und frisches Medium zugefügt. Die Zellen wurden maximal bis Passage 20 verwendet, um die Transfizierbarkeit zu erhalten. Alle Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach Transfektion wurden die Zellen in Medium mit Antibiotika-Zusatz (Penicillin/ Streptomycin 10 U/ml) kultiviert.

3.2 Plasmid-DNA

Dieser Abschnitt beschreibt die in dieser Arbeit verwendeten Plasmid-DNA Konstrukte, deren Klonierung und Amplifizierung.

3.2.1 Verwendete Plasmid-DNA Konstrukte

Abbildung 3.1 zeigt schematisch die Expressionskassetten sowie wichtige spezifische Elemente der verwendeten Plasmid-DNA Konstrukte. Das jeweils zugehörige Plasmid-Rückgrad besteht aus dem bakteriellen Replikationsursprung und einem Selektionsmarker mit Promotor.

Die Plasmide pCLuc, pCpGLuc und pCpGLacZ wurden alle bei Plasmid Factory (PlasmidFactory GmbH, Deutschland) bestellt und sind nicht dargestellt.

3.2.2 Klonierung von pCB6-Luc und pCB7-Luc

Zur Klonierung der beiden Vektoren pCB6-Luc und pCB7-Luc standen die beiden Vektor-Backbones pCB6 und pCB7 zur Verfügung. Das Reportergen wurde aus pVAX1-Luc herausgeschnitten. Dieses Plasmid wurde bereits beschrieben (Aneja et al., 2009). Dazu wurde pVAX1-Luc mit PmeI nach Herstellerangaben verdaut. Das Luciferase-Insert wurde nach Auftrennung mittels Gelelektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten und mittels NucleoSpin extract II Kit isoliert. Die beiden Backbones wurden mit den Enzymen EcoRI und MluI nach Herstellerangaben verdaut und auf gleiche Weise isoliert. Im Anschluss wurden sowohl das

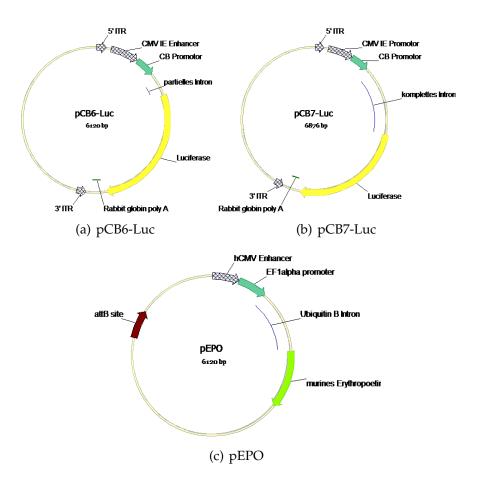


Abbildung 3.1: Plasmidmappen der selbst hergestellten Plasmide

Insert als auch die Backbones mittels T4-Polymerase zu Blunt Ends vervollständigt. Die Backbones wurden mit Phosphatase nach Herstellerangaben behandelt, wodurch die Phosphatgruppe entfernt wird und die Religation verhindert wird. Hierfür wurde die Shrimp Alkaline Phosphatase nach Protokoll des Herstellers verwendet. Anschließend wurden das Insert mit dem jeweiligen Rückgrat in einem molaren Verhältnis von 5:1 mittels T4-Ligase nach Protokoll des Herstellers miteinander ligiert. Aus diesem Reaktionsansatz wurde 1 µl zur Transformation in DH10B E. coli-Bakterien (Invitrogen GmbH, Deutschland) verwendet. Die transformierten Bakterien wurden bis zur Ausbildung der entsprechenden Antibiotika-Resistenz für eine Stunde in Antibiotika-freiem LB Medium bei 37°C inkubiert und anschließend auf Antibiotika-haltigen Agar-Platten ausgestrichen. Nach Inkubation der Platten für 16-18 Stunden bei 37°C wurden einzelne Klo-

ne wie in Abschnitt 3.2.3 amplifiziert. Zum Schluss wurde die richtige Orientierung des Inserts im Vektor-Backbone mittels Restriktionverdau und anschließender Gelelekrophorese kontrolliert.

3.2.3 Amplifizierung von Plasmid-DNA

Zur Amplifizierung von Plasmid-DNA wurden die jeweiligen Plasmid-DNA tragenden *E. coli*-Klone von Antibiotika-haltigen Agar-Platten gepickt und in 5 ml ("Mini-Präp") oder in 500 ml LB-Medium ("Mega-Präp") mit dem jeweiligen Antibiotikum bei 37°C über Nacht inkubiert. Aus den resultierenden *E. coli*-Kulturen wurde unter Verwendung der Kits NucleoSpin Plasmid oder NucleoBond PC 2000 EF die Plasmid-DNA isoliert. Anschließend wurde diese in 50 µl oder 500 µl Aqua ad inj. aufgenommen und die Konzentration und Reinheit mittels Nano-Drop 1000 bestimmt. Im Fall von pCLuc und pCpG-luc ccc wurde die in *E. coli* amplifizierte und aufgereinigte Plasmid-DNA von Plasmid Factory (PlasmidFactory GmbH, Deutschland) bezogen.

3.2.4 Produktion von AAV2/9

Die Herstellung von AAV2/9 erfolgte durch die Firma Penn Vector Core (Philadelphia). Dort wurde eine Trippel-Transfektion in 293 Zellen mit den folgenden Plasmiden durchgeführt:

- AAV-cis Plasmid (pCB7-Luc) (enthält das später im Virus enthaltene Transgen und die ITRs)
- AAV-trans Plasmid (enthält die beiden AAV Gene rep und cap)
- Adenovirus Helferplasmid (pD6F) (kodiert für die vom Adenovirus benötigten Proteine zur Produktion von AAV)

Nach drei Tagen wurden die Zellen geerntet und die viralen Vektoren durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren aus den Zellen befreit. Dem folgte die Reinigung der Vektoren durch zwei aufeinander folgende Cesiumchlorid-Gradienten.

Am Ende wurden die viralen Vektoren in PBS mit 35 mM Natriumchlorid und 5% Glycerol aufgenommen und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.3 Herstellung von Pulveraerosolen

Branched-PEI und Plasmid-DNA wurden zur Herstellung von Polyplexen in einem N/P Verhältnis von 10 gemischt. Dazu wurden PEI und pDNA jeweils im gleichen Volumen Aqua ad inj. verdünnt, so dass eine pDNA Konzentration von 0,1 mg/ml vorlag. Anschließend wurde die pDNA-Lösung zu der PEI Lösung gegeben, durch 8-maliges Auf- und Abpipettieren gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Vor der anschließenden Lyophilisation wurden die hergestellten Komplexe mit verschiedenen Zuckern versetzt, die während der Lyophilisation als Lyoprotektoren dienen sollen. Dazu wurden Lactose, Trehalose und Saccharose eingesetzt und in den Zucker/DNA Verhältnissen 1000/1, 500/1, 250/1, 100/1 und 50/1 zu den Komplexen als Feststoff zugemischt. Auf die Charakterisierung der Partikellösungen erfolgte ein 10-minütiges Einfrieren in flüssigem Stickstoff. In Studien konnte gezeigt werden, dass ein schnelles Einfrieren in flüssigem Stickstoff zu einer geringeren Partikelaggregation führt (Anchordoquy et al., 1998). Die gefrorenen, geöffneten Eppis wurden in die Lyophilisations-Apparatur gestellt und mit Parafilm abgedeckt, um ein Herausspringen des Lyophilisates zu verhindern. Zur Gewährleistung des Wasseraustritts wurde der Parafilm mit einer Nadel durchlöchert. Die Lyophilisation fand bei einem Druck von 0,1 bar über einen Zeitraum von 24 Stunden statt.

Die Zerkleinerung der erhaltenen Lyophilisate mit Silica-Beads erfolgte mit Hilfe des CapMix. Dazu wurden 3 Silica-Beads zu dem Lyophilisat im Eppi gegeben und für 5 Sekunden im CapMix behandelt.

3.4 Partikelcharakterisierung

In diesem Abschnitt werden die biophysikalischen Methoden zur Partikelcharakterisierung beschrieben.

3.4.1 Partikelgrößenmessung mittels Photonenkorrelationsspektroskopie

Die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers der Komplexe erfolgte in einem Brookhaven Instruments 90 Plus Partikelgrößenmessgerät. Hier wird das Verfahren der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) angewendet, wobei es sich um ein dynamisches Streulichtverfahren handelt, welches bereits ausführlich beschrieben worden ist (Müller and Schuhmann, 1996). Das Messprinzip basiert auf der Korrelation zwischen der Diffusionsgeschwindigkeit von Partikeln im Medium und ihrer Größe. Kleine Teilchen besitzen auf Grund der Brown´schen Molekularbewegung eine höhere Geschwindigkeit als große Partikel. Dies führt bei einem einfallenden Laserlicht zu einer stärkeren Intensitätsschwankung, welche mit Hilfe eines Detektors (meist im 90°-Winkel) gemessen werden kann. Es wurden jeweils 200 μl der hergestellten Polyplexe mit einer pDNA Konzentration von 0,02 mg/ml in eine Halbmikro-Küvette pipettiert und vermessen. Folgende Einstellungen wurden dabei verwendet: 5 Messungen pro Probe für eine Minute; Viskosität von Wasser 0,89 cP; Ref-Index 1,330, Dielektrizitätskonstante 78,54 F/m.

3.4.2 Zetapotenzialmessung

Das Zetapotenzial ist eine wichtige Kenngröße für die Stabilität einer Dispersion. Es gibt die Oberflächenladung der Partikel und somit die Möglichkeit der elektrostatischen Abstoßung zwischen den einzelnen Partikeln an. Die Bestimmung des Zetapotenzials erfolgt durch Anlegen eines elektrischen Feldes über der Formulierung. Partikel in einer Dispersion, die ein Zetapotenzial ungleich Null haben, wandern zur Elektrode der entgegengesetzten Polarisation. Die Wanderungsge-

schwindigkeit, die durch Laser Doppler Anemometrie gemessen werden kann, ist dabei proportional zum Zetapotenzial. Die Oberflächenladung wurde mit einem Malvern Zetasizer Nano bestimmt. Für die Messung wurden die Proben auf eine pDNA Konzentration von 0,02 mg/ml verdünnt und in die Messzelle gefüllt. Folgende Parameter wurden während der Messung verwendet: 3 Messungen pro Probe mit jeweils 10 bis 30 Subruns; Viskosität von Wasser 0,89 cP; Ref-Index 1,330, Dielektrizitätskonstante 78,54 F/m; Temperatur 25°C.

3.4.3 DNA-Freisetzungsassay

Die Komplexierung und Freisetzung der pDNA aus den Polyplexen wurde mittels DNA-Freisetzungsassay bestimmt. Polyplexe mit $100\,\mathrm{ng}$ Plasmid-DNA wurden in $10\,\mathrm{\mu l}$ Aqua ad inj. verdünnt. Jede Probe wurde doppelt hergestellt. Eines der Duplikate wurde mit $10\,\mathrm{\mu g}$ Heparansulfat versetzt, welches als stärkeres Anion die Plasmid-DNA kompetitiv aus den Polyplexen verdrängt. Die andere Probe blieb unbehandelt. Nach 45-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben mit $1,5\,\mathrm{\mu l}$ Ladepuffer versetzt und auf ein 0,8%-iges mit GelRed versetztes Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für eine Stunde bei $120\,\mathrm{V}$ in TAE-Puffer. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und mittels Gelkamera aufgenommen.

3.5 Pulvercharakterisierung mittels Andersen-Kaskaden-Impaktor

Zur Bestimmung des massenbezogenen medianen aerodynamischen Durchmessers (MMAD) wurden die Pulver vor der Lyophilisation mit Natriumfluorescein versetzt und mit Hilfe des Andersen-Kaskaden-Impaktors analysiert. Die Hälfte der Masse der Partikel hat einen kleineren Durchmesser als der MMAD, die andere Hälfte der Masse besteht aus Partikeln mit einem größeren Durchmesser. Die Messung erfolgte bei einem Luftstrom von 28,31/min. Jede Impaktionsplatte wurde mit einer Tween/Glycerol-Mischung eingerieben, um das Wiedereintreten

von bereits impaktierten Partikeln in den Luftstrom zu vermeiden. Vor dem Probeneinlass wurde ein ABLE-Spacer befestigt. Die Proben wurden mit Hilfe des Insufflators vernebelt, wobei bei jeder Applikation 2 mg Pulver in den Insufflator gefüllt und mit 2 mal 1 ml Luftvolumen vernebelt wurden. Diese Prozedur wurde jeweils 5 mal durchgeführt, um Pulverdepositionen im detektierbaren Bereich zu erhalten. Nach der Messung wurden jede einzelne Impaktionsplatte und der Probeneinlass mit 10 ml Aqua ad inj. gespült, um die Probe in Lösung zu bringen. Anschließend wurde die Fluorescein Emission an einem Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter gemessen, wobei jeweils 100 µl der Lösungen eingesetzt wurden. Zur Erstellung einer Standardkurve wurde die jeweilige Disaccharid-Fluorescein Lösung verdünnt und es wurden ebenfalls 100 µl der verschiedenen Verdünnungen in einem Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter vermessen.

3.6 Transfektion mittels kationischer Polymere und Lipide

Für die Transfektionsstudien wurden 24 Stunden vor Beginn des Experiments 100.000 Zellen pro Well in einer 24-Well-Platte ausgesät. Dies resultierte in einer Konfluenz von ca. 70-80%. Direkt vor der Transfektion wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 500 μ l PBS gewaschen und 450 μ l serumfreies Medium zugegeben.

Bei der Verwendung von kationischen Polymeren wurden die Polyplexlösungen, deren Herstellung in Abschnitte 3.3 beschrieben wurde, auf eine Konzentration von $0.02\,\text{mg/ml}$ verdünnt. Davon wurden jeweils $50\,\mu\text{l}$ (entsprechen $1\,\mu\text{g}$ pDNA) pro Well aufgetragen.

Für die Transfektion mit kationischen Lipiden wurde das kommerziell erhältliche Lipofectamin 2000 verwendet. Die Herstellung der Lipoplexe und Durchführung der Lipofektion erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Die DNA-Lipid Komplexe wurden in FBS-freiem Medium durch Inkubation für 20 min gebildet. Anschließend wurden die Komplexe mit 800 ng pDNA auf die Zellen in FBS-freiem Medium gegeben.

Nach 4-stündiger Inkubation im Brutschrank wurde das Medium wieder abgesaugt und durch serumhaltiges Medium mit Zusatz von Antibiotika ersetzt.

3.7 Messung der Luciferase- und

β-Galactosidase-Aktivität

Luciferase- und β -Galaktosidase-Expression wurden 24 Stunden nach der Transfektion gemessen. Im Falle des Neutralisierenden Antikörper-Assays wurde die Luciferase-Expression 72 Stunden nach Transduktion gemessen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, bevor jeweils 100 μ l Lysepuffer zugegeben und die Zellen für 10 Minuten bei Raumtemperatur lysiert wurden. Jeweils 50 μ l des Lysats wurden für die Luciferase- oder β -Galaktosidase-Expressionsbestimmung und 5 μ l für die Proteinbestimmung mittels BioRad Protein-Assay verwendet. Die Messungen wurden in einem Wallac Victor²/ 1420 Multilabel Counter durchgeführt. Im Falle der Luciferase-Bestimmung wurden pro Replikat automatisch 100 μ l Luciferase-Assay-Puffer (Surovoy et al., 1998) zugegeben und die daraus resultierende Lichtemission 5 Sekunden lang vermessen. Für die Bestimmung der β -Galaktosidase-Expression wurde das BetaGal Reportergene Assay Kit verwendet. Alle Messwerte wurden auf den Proteingehalt des Replikats normalisiert.

3.8 Tierversuche

Im Folgenden werden die in den Tierversuchen verwendeten Tiere und die dabei angewandten Methoden beschrieben. Außerdem werden die Methoden beschrieben, bei denen Organe oder Blut als Ausgangsprodukt dienten. Alle Tierversuche wurden von der Regierung Oberbayern genehmigt und kontrolliert. Die Durchführung erfolgte gemäß den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes.

3.8.1 Versuchstiere

Weibliche BALB/c Mäuse wurden im Alter von sechs bis acht Wochen von Charles River Laboratories (Deutschland) gekauft und unter speziellen pathogenfreien Bedingungen gehalten. Die Tiere wurden an die Umgebung der Tierversuchsanstalt über einen Zeitraum von mindestens sieben Tagen vor der Versuchsdurchführung akklimatisiert. Weibliche und männliche SPB -/- Mäuse wurden in der Tierversuchsanstalt der Klinik gezüchtet. Bei diesen Mäusen steht das Surfactant Protein B (SPB) Gen unter der Kontrolle eines Doxycyclin abhängigen Promotors. Die Mäuse wurden mit Doxycyclinwasser (200 mg Doxycyclin pro Liter) versorgt, um die Sympthomatik des SPB-Mangels zu verhindern.

3.8.2 Applikation von Pulveraerosolen

Die Produktion der Pulveraerosole erfolgte wie in Kapitel 3.3 beschrieben, allerdings wurden Fluorescein-gelabeltes PEI und pCpGLuc zur Herstellung der Komplexe und ein Zucker/DNA Verhältnis von 100/1 verwendet. Es wurden 12 bis 14 Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse mittels Injektionsnarkose (i.p.-Injektion von Medetomidin 0,5 mg/kg; Midazolam 5 mg/kg; Fentanyl 50 μg/kg) betäubt. Sie wurden mit den oberen Nagezähnen an einem Plattensystem (Hallowell EMC) im 45° Winkel aufgehängt. Ein modifiziertes Kaltlicht Otoscop Beta 200 (Heine Optotechnik) wurde verwendet, um einen optimalen Blick in die Trachea der Tiere zu ermöglichen. Es wurden ca. 2 mg Pulver in den Insufflator (Penn Century) geladen. Die Spitze des Insufflators wurde bis zur Bifurkation in die Trachea eingeführt, so dass ein tiefes Eindringen des Pulvers in die Lunge gewährleistet war. Bei jeder Behandlung wurden 2 Sprühstöße mit einem Luftvolumen von 1 ml abgegeben, wodurch ca. 1 mg Pulver appliziert wurde, was einer pDNA-Menge von ca. 10 µg entspricht. Nach der Behandlung wurden die Mäuse mittels Antidot (Atipamizol 50 μg/kg; Flumazanil 10 μg/kg; Naloxon 24 μg/kg) wieder aufgeweckt. Bei der Behandlung mit dem EPO Plasmid wurde nur noch das Lactose-Pulver verwendet. Außerdem wurde PEI anstatt von PEI-Fluorescein eingesetzt.

3.8.3 Applikation von AAV-Vektoren

Der virale Vektor wurde auf die gewünschte Konzentration eingestellt, bevor die Applikation bei den Mäusen erfolgte. Dazu wurden 109, 1010 und 1011 Vektoren auf ein Volumen von 100 µl mit PBS verdünnt. Die Applikation der Vektoren erfolgte im ersten Ansatz mit 10¹¹ Vektoren entweder intranasal (i.n.) oder intratracheal (i.t.). In allen weiteren Versuchen erfolgte eine i.t. Gabe der Vektoren. Die Mäuse wurden zuerst mittels Injektionsnarkose betäubt. Bei der i.n. Applikation wurden anschließend 100 µl Vektorlösung tropfenweise auf die Nase der Tiere pipettiert, welche durch die Atmung in die Lunge gelangt. Diese Technik wird als *sniffing* bezeichnet. Während der Applikation wurden die Mäuse in einer senkrechten Lage gehalten, um eine möglichst tiefe Penetration der Vektoren zu ermöglichen. Bei der i.t. Applikation wurden die Mäuse mit den oberen Nagezähnen an einem Plattensystem (Hallowell EMC) im 45° Winkel aufgehängt. Ein modifiziertes Kaltlicht Otoscop Beta 200 (Heine Optotechnik) wurde verwendet, um einen optimalen Blick in die Trachea der Tiere zu ermöglichen. Die Vektorlösung wurde in einer 1 ml Spritze aufgezogen. An der Spitze der Spritze wurde eine abgestumpfte Kanüle befestigt, welche in die Trachea eingeführt wurde, um den Vektor langsam in die Lunge zu geben. Die Mäuse wurden nach der Behandlung noch ca. 2 Minuten im 45° Winkel belassen, um eine tiefe Penetration der Vektoren in die Lunge zu gewährleisten. Anschließend wurden sie mittels Antidot wieder aufgeweckt. Die Versuche wurden zuerst an BALB/c und dann an SPB-/--Mäusen durchgeführt, da es zu Unterschieden in der Expression in Abhängigkeit des Mausstammes kommen kann. Die Versuche mit den SPB-/--Mäusen wurden sowohl an männlichen als auch an weiblichen Mäusen durchgeführt, um den Einfluss des Geschlechtes auf die Expression zu messen. Im folgenden Schritt wurde der Einfluss des Immunsystems untersucht. Dazu wurden sowohl weibliche als auch männliche Mäuse 3 Tage vor der Vektor-Applikation mit 10 mg/kgKG Dexamethason behandelt, welches intraperitoneal (i.p.) appliziert wurde. Die Behandlung mit Dexamethason erfolgte alle 3 Tage über einen Zeitraum von 30 Tagen und ist im Dosierungsschema in Abbildung 3.2 dargestellt.

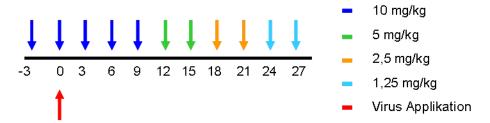


Abbildung 3.2: **Dexamethason Dosierungsschema.** Die Applikation des Dexamethasons erfolgte intraperitoneal. Die Behandlung begann 3 Tage vor der Vektor-Applikation und wurde dann über vier Wochen fortgeführt, wobei die Dosis am Ende ausgeschlichen wurde.

3.8.4 Messung der in vivo Luciferase-Aktivität

Die Messung der Luciferase-Aktivität *in vivo* erfolgte 24 h nach der Pulverapplikation. Den durch Injektionsnarkose betäubten Mäusen wurde pro Maus mittels *sniffing* 1,5 mg D-Luciferin in 50 µl PBS appliziert (Buckley et al., 2008). Während der 10-minütigen Inkubationszeit wurden die Mäuse auf einer Wärmeplatte bei 37°C gehalten. Anschließend wurde die Biolumineszenz mittels IVIS 100 Imaging System bestimmt. Dabei wurden folgende Kameraeinstellungen verwendet: Gesichtsfeld 10, High Resolution Binning und Belichtungszeit 10 Minuten. Nach der Messung wurden die Mäuse mittels Genickbruch getötet.

Die mit dem AAV-Luc Vektor behandelten Mäuse wurden zur Bestimmung der Langzeit-Expression in regelmäßigen Abständen nach der Vektor-Applikation im IVIS 100 Imaging System vermessen. Dazu wurden jeweils 3 mg D-Luciferin in 100 µl i.p. injiziert. Bei diesen Mäusen betrug die Belichtungszeit abhängig vom Zeitpunkt der Messung entweder 1 oder 2 Minuten. Die Mäuse wurden nach den Messungen mittels Antidot wieder aufgeweckt. Die Expression wurde bis zu 450 Tage verfolgt. Nach der letzten Messung wurden diese Mäuse ebenfalls durch Genickbruch getötet. Die Auswertung der *in vivo* Biolumineszenz erfolgte mit der Living Image 2.5 Software.

3.8.5 Blutentnahme und Serumgewinnung

Die Blutentnahme erfolgte in Narkose durch retroorbitale Punktion. Pro Maus wurden ca. $200\,\mu l$ Blut entnommen.

Für die Erythropoetin-Versuche wurde das mit EDTA versetzte Blut sofort in

einem Haematologie-System KX-21 vermessen, wobei der Hämatokritwert bestimmt wurde.

Bei den AAV-Versuchen wurde eine Probe ohne EDTA zur Gewinnung von Serum über Nacht bei 4°C inkubiert und am nächsten Tag bei 12.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand (Serum) wurde abgenommen und bei -80°C bis zur Durchführung des Assays auf neutralisierende Antikörper gelagert.

3.8.6 Assay auf neutralisierende Antikörper

Zur Bestimmung neutralisierender Antikörper aus Maus-Seren wurden 24 h vor Versuchsbeginn 70.000 MLE12 Zellen pro Well einer 24-Well-Platte ausgesät. Die Seren der einzelnen Gruppen wurden gepoolt, so dass ein Volumen von $10\,\mu l$ resultierte. Dies wurde bei den behandelten Gruppen in mehreren Verdünnungsschritten mit PBS auf die Konzentrationen 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} verdünnt. Die Seren von unbehandelten Kontroll-Mäusen wurden in der Konzentration von 10^{-1} eingesetzt. Jede dieser Verdünnungen wurde mit der volumengleichen Menge an AAV-Luc Vektor, welcher zuvor mit PBS auf die gewünschte Konzentration verdünnt wurde, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Als Positivkontrolle wurde der Vektor mit PBS inkubiert. Unmittelbar vor der Transduktion wurde das Medium über den Zellen abgesaugt und durch ein serum- und antibiotikahaltiges Medium ersetzt. Pro Well wurden $40\,\mu l$ appliziert, was einer Vektordosis von $2x10^9$ Partikeln entspricht. Die Luciferase-Aktivität wurde $72\,h$ nach Transduktion gemessen und auf das Gesamtprotein normalisiert.

3.8.7 Organentnahme und Aufbereitung

Nach der Tötung der Mäuse durch zervikale Dislokation wurde der Brustkorb chirurgisch geöffnet. Die Lunge wurde durch Injektion isotonischer Kochsalzlösung in den rechten Vorhof des Herzen perfundiert, um verbliebenes Blut zu entfernen.

Die Lungen der mit Pulveraerosol behandelten Mäuse wurden entnommen, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und in gefrorenem Zustand mittels Mörser und Pistill homogenisiert. Die Lungenhomogenisate wurden bis zur Lumineszenz-Messung und DNA-Isolierung bei -80°C gelagert.

Zur Bestimmung der Biodistribution der AAV-Vektoren in BALB/c Mäusen wurden alle Organe (Lunge, Herz, Leber, Milz, Niere, Gonaden, Gehirn) und Muskelgewebe aus dem Oberschenkel entnommen, ebenfalls im flüssigem Stickstoff gelagert, homogenisiert und bis zur DNA-Extraktion bei -80°C gelagert.

3.8.8 Histologische Lungenschnitte

Zur Erstellung von histologischen Schnitten wurden die Lungen nach Entnahme für 24h in 10% igem, phosphatgepuffertem Formalin eingelegt, bevor sie dann in 70% Ethanol eingelegt wurden. Im Anschluss wurden die Lungen in 1,5% igem Agar eingebettet. Nachdem der Agar ausgehärtet war wurde die Lunge in Scheiben geschnitten und in Casetten gelegt, welche erneut in 70% igem Ethanol gelagert wurden. Danach erfolgt die Einbettung in Paraffin, wovon dünne Schnittpräparate erstellt und anschließend mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt wurden. Diese Schnitte wurden dann unter dem Mikroskop untersucht.

3.8.9 Messung der Luciferase-Aktivität im Lungenhomogenisat

Für die Luciferase-Aktivitätsbestimmung wurden ca. 200 mg homogenisiertes Lungengewebe in $400\,\mu l$ Lysepuffer für $20\,m$ in auf Eis inkubiert. Anschließend wurde $10\,m$ in bei $14.000\,r$ pm zentrifugiert und $100\,\mu l$ des Überstandes wurden für die Luciferase-Bestimmung verwendet. Nach der Zugabe von $100\,\mu l$ Luciferase-Assay-Puffer wurde die Lumineszenz in einem Lumat LB9507 Röhrenluminometer bestimmt.

3.8.10 Isolierung von Fluorescein aus dem Lungenhomogenisat

Zur Bestimmung der tatsächlich applizierten Menge an PEI/pDNA-Komplexen bei den Pulveraerosolen wurden die Lungen mit dem Lysepuffer und der Proteinase K des DNeasy Blood and Tissue Kits über Nacht bei 56°C verdaut. Aus dem Überstand wurde das Fluorescein bestimmt, indem von jeweils 50 µl Überstand die Fluoreszenz in einer schwarzen 96-Well Platte in einem Wallac Victor² gemessen wurde.

3.8.11 Isolierung der Gesamt-DNA aus Geweben

Die Extraktion der Gesamt-DNA erfolgte mittels DNeasy Blood and Tissue Kit nach Anleitung des Herstellers. Die isolierte DNA wurde in 100 µl Elutionspuffer eluiert. Vor der quantitativen Bestimmung mittels Real-Time PCR wurde die DNA-Konzentration mittels NanaDrop 1000 bestimmt.

3.8.12 Quantifizierung mittels Real-Time PCR

Zur quantitativen Bestimmung von pCpGLuc und AAV-Luc wurde das iCycler IQ Real Time PCR Detection System benutzt. Dessen Prinzip beruht auf der Messung des DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I (2-2-[(3-Dimethylaminopropyl)- propylamino]-1-phenyl-1H-chinolin-4-ylidenmethyl-3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation) während der Amplifikation.

Protokoll für pCpGLuc

Zur Bestimmung von pCpGLuc wurden spezifische Primer für die Zeocinkodierende Sequenz eingesetzt. Die Primersequenzen für den *forward* (FP Zeocin) und den *reverse* (RP Zeocin) Primer sind in Tabelle 2.6 dargestellt.

Für die Quantifizierung mittels Real-Time PCR wurde eine Menge von 500 ng isolierter Gesamt-DNA eingesetzt, welche wie zuvor beschrieben aus den Lungen isoliert wurde. Die DNA-Menge wurde mit Aqua ad inj. auf 10 µl verdünnt.

In einer 96-Well PCR Platte wurden $10,4~\mu l$ KAPA SYBR Fast qPCR Master Mix 2x und je $0,2~\mu l$ von *forward* und *reverse* Primer ($100~\mu M$) vorgelegt. Dann wurden $10~\mu l$ DNA Lösung hinzugemischt. Für die Bestimmung wurde folgendes Real Time Protokoll verwendet: 95° C für 3~Minuten (Denaturierung der DNA), gefolgt von 40~Zyklen bei 97° C (Denaturierung), 67° C (Annealing) und 72° C (Elongation) für jeweils 20~Sekunden.

Die ermittelten c(t)-Werte wurden auf die Plasmid-Menge umgerechnet, indem eine Standardkurve mit reinem pCpGLuc-Plasmid erstellt wurde. Dazu wurden pCpGLuc-Mengen von 5 ng bis 5 fg mit dem gleichen PCR-Protokoll amplifiziert. Alle Daten wurden mit der iCycler IQ Software 3.1 ausgewertet.

Protokoll für AAV-Luc

Für die Quantifizierung der AAV-Luc DNA aus den verschiedenen Geweben wurden spezifische Primer für die Luciferase-kodierende Sequenz eingesetzt. Die Sequenzen des *forward* (FP Luciferase) und des *reverse* (RP Luciferase) Primers sind in Tabelle 2.6 dargestellt.

Für die Quantifizierung wurden bei diesen Proben insgesamt 100 ng Gesamt-DNA eingesetzt, welche in Aqua ad inj. auf ein Volumen von 10 μl eingestellt wurde. In den 96-Well PCR Platten wurden 11 μl KAPA SYBR Fast qPCR Master Mix 2x und je 0,5 μl von *forward* und *reverse* Primer (50 μM) vorgelegt. Nach Zugabe der DNA wurde das folgende PCR Programm durchgeführt: 95°C für 3 Minuten, gefolgt von 40 Zyklen bei 97°C, 60°C und 72°C für jeweils 20 Sekunden.

Zur Ermittlung der Standardkurve wurde pCB7-Luc in definierten Mengen von 5 ng bis 5 fg mit dem gleichen PCR-Protokoll amplifiziert.

4 Entwicklung eines Pulveraerosols für den nicht-viralen Gentransfer

Dieser Abschnitt der Arbeit beschäftigt sich mit der Herstellung eines Pulveraerosols für den nicht-viralen Gentransfer in die Lunge. Zur Herstellung der Pulveraerosole wurde die Technik der Lyophilisation verwendet. Zur Stabilisierung der Komplexe während diesem Vorgang, wurden verschiedene Disaccharide als Lyoprotektoren eingesetzt und verglichen. Außerdem wurden die Disaccharide in verschiedenen Zucker/DNA Verhältnissen gemischt, um den Einfluss der Disaccharidmenge auf die Partikeleigenschaften zu untersuchen. Im Folgenden werden zuerst die physikalischen Eigenschaften (Partikelgröße, Zetapotenzial und die Freisetzung der pDNA aus den Komplexen) beschrieben. Dann werden die Ergebnisse aus den *in vitro* Versuchen dargestellt. Zum Schluss folgt die *in vivo* Anwendung der hergestellten Formulierungen zuerst mit dem Reportergen Luciferase und letztendlich mit dem physiologischen Gen Erythropoetin.

4.1 Versuche zur Partikel-Charakterisierung

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Charakterisierungsversuche dargestellt. Dabei wurde die Partikelgröße, das Zetapotenzial und die Freisetzung der pDNA aus den Komplexen jeweils vor Lyophilisation, nach Lyophilisation und nach Pulverisierung bestimmt.

4.1.1 Partikelgrößenmessung

Die Partikelgröße der PEI/pDNA-Komplexe wurde bestimmt, um den Einfluss der verschiedenen Versuchsschritte auf diese zu untersuchen. Zuerst wurde durch Messung der Partikelgröße vor und nach Disaccharidzugabe, deren Einfluss betrachtet. Die beiden nächsten Bestimmungen erfolgten nach Gefriertrocknung bzw. nach Pulverisierung der Komplexe. Dazu wurden die Formulierungen in Aqua ad inj. aufgelöst und auf eine Konzentration von 0,02 mg/ml eingestellt. Bei den Messungen wurde neben der Partikelgröße auch die Polydispersität, also die Breite der Partikelgrößenverteilung, bestimmt.

Bei der Bestimmung der Partikelgröße ergab sich kein Unterschied zwischen den verschiedenen Disacchariden (Abbildung 4.1a, 4.1b, 4.1c). Der Zusatz der einzelnen Disaccharide in den verschiedenen Mengen hatte keinen Einfluss auf die Größe der PEI/pDNA-Komplexe. Nach der Lyophilisation war ein deutlicher Zusammenhang zwischen eingesetzter Disaccharidmenge und resultierender Partikelgröße feststellbar. Es zeigte sich bei allen drei Disacchariden, dass für die Erhaltung der Partikelgröße mindestens ein Zucker/DNA Massenverhältnis von 250/1 eingesetzt werden muss. War das Verhältnis geringer (Zucker/DNA von 100/1 und 50/1), so kam es zu einem deutlichen Anstieg der Partikelgröße. Dabei verdoppelte sich die Partikelgröße bei einem 100/1 Verhältnis und vervierfachte sich bei einem 50-fachen Überschuss. Die Lyophilisation von PEI/pDNA-Komplexen ohne Disaccharidzusatz führte zu einer Verzehnfachung der Ausgangsgröße.

Der Prozess der Pulverisierung führte bei allen Formulierungen zu einer Zunahme der Partikelgröße; einzig bei den Proben mit nur einem 50-fachen Überschuss von Saccharose und Lactose kam es zu einer leichten Abnahme der Partikelgröße.

Die Polydispersität wurde durch die Zugabe der Disaccharide nicht beeinflusst. Sie nahm nach der Lyophilisation und der Pulverisierung zu, blieb aber bei Zusatz von Lyoprotektoren unter 0,3. Ohne den Zusatz von Disacchariden stieg sie stärker an. Insgesamt war bei der Partikelgröße und der Polydispersität kein Unterschied zwischen den einzelnen Disacchariden zu erkennen.

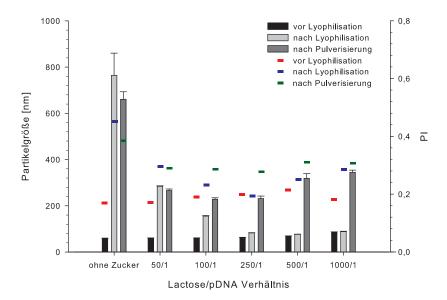


Abbildung 4.1a: Entwicklung von Partikelgröße und PI mit Lactose als Lyoprotektor. Wie in den folgenden Abbildungen 4.1b und 4.1c wurden PEI/pDNA-Komplexe mit einem N/P Verhältnis von 10 mit unterschiedlichen Mengen verschiedener Disaccharide versetzt. Die Formulierungen wurden lyophilisiert und im Anschluss pulverisiert. Die Partikelgröße wurde zu den Zeitpunkten vor Lyophilisation, nach Lyophilisation und nach Pulverisierung bestimmt. Die Disaccharide hatten keinen Einfluss auf die Partikelgröße. Nach der Lyophilisation kam es in allen Proben zu einem Anstieg der Partikelgröße abhängig von der zugesetzten Disaccharidmenge. Nach der Pulverisierung nahm die Partikelgröße in fast allen Proben noch weiter zu. Die Polydispersität (PI) wurde nicht von der Disaccharidzugabe beeinflusst. Sie nahm nach Lyophilisation und Pulverisierung zu. Die Partikelgröße ist in Form von Balken als Mittelwert \pm Standardabweichung, die PI als horizontale Markierung dargestellt.

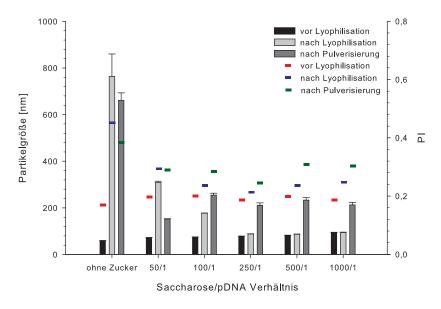


Abbildung 4.1b: Entwicklung von Partikelgröße und PI mit Saccharose als Lyoprotektor

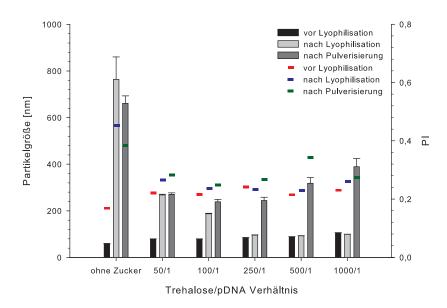


Abbildung 4.1c: Entwicklung von Partikelgröße und PI mit Trehalose als Lyoprotektor

4.1.2 Bestimmung des Zetapotenzials

Die Ergebnisse der Zetapotenzial-Messungen sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Vor der Bestimmung des Zetapotenzials wurden alle Proben mit Aqua ad inj. auf die gleiche DNA-Konzentration von 0,02 mg/ml eingestellt. Das Zetapotenzial veränderte sich nicht durch die Zugabe der verschiedenen Disaccharide. Nach der Lyophilisation kam es bei allen Proben zu einer Zunahme des Zetapotenzials. Diese Zunahme war unabhängig von den zugesetzten Disaccharidmengen. Nach der Pulverisierung kam es bei den meisten Proben zu einer Abnahme des Zetapotenzials. Bei diesen Messungen konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen den einzelnen Disacchariden beobachtet werden.

4.1.3 DNA-Freisetzungs-Assay

Mit dem Freisetzungs-Assay wurde untersucht, ob die pDNA nach den verschiedenen Behandlungsschritten weiterhin komplett durch das Polymer komplexiert ist und ob die komplexierte pDNA nach der Pulverherstellung weiterhin intakt ist.

Die Elektrophoresebilder der verschiedenen Zucker sind in den Abbildungen

Tabelle 4.1: Zetapotenzial von PEI/pDNA-Komplexen nach Zusatz verschiedener Lyoprotektoren. PEI/pDNA-Komplexe wurden bei einem N/P Verhältnis von 10 mit unterschiedlichen Mengen verschiedener Disaccharide versetzt (m(Zucker)/m(pDNA)). Die erhaltenen Formulierungen wurden lyophilisiert und im Anschluss pulverisiert. Das Zetapotenzial wurde zu den Zeitpunkten vor Lyophilisation, nach Lyophilisation und nach Pulverisierung bestimmt. Die Disaccharide hatten keinen Einfluss auf das Zetapotenzial. Nach der Lyophilisation kam es in allen Proben zu einem Anstieg des Zetapotenzials, welche unabhängig von der zugesetzten Zuckermenge war. Nach Pulverisierung nahm das Zetapotenzial leicht ab, blieb aber über den Werten vor der Lyophilisation. Es sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt (n=3).

Zucker/DNA Massenver- hältnis	Zucker	vor Lyophili- sation	nach Lyophi- lisation	nach Pulveri- sierung
0/1	ohne Zucker	45 ± 5 ,1	n.a.	59,4 ± 2,8
50/1	Lactose	49,1 ± 0,4	61 ± 0,6	48,2 ± 1,4
	Trehalose	$45,1\pm2,5$	$71,7\pm1,4$	$50,9 \pm 1,4$
	Saccharose	$44,6 \pm 2,4$	$66,7 \pm 0,5$	$62,7 \pm 0,9$
100/1	Lactose	$45,5 \pm 3,7$	55,6 ± 2,2	55,9 ± 2
	Trehalose	43,3 ± 1,5	74,4 ± 3,9	65,6 ± 2,2
	Saccharose	$45,3 \pm 0,8$	$63,6 \pm 1,3$	$59,7\pm2,7$
250/1	Lactose	$40,8\pm2,8$	51,7 ± 4,7	41,9 ± 1
	Trehalose	46 ± 1,1	55,4 ± 1,9	$65,4 \pm 3,4$
	Saccharose	$45,4 \pm 3,6$	$56,9 \pm 0,4$	$56,1 \pm 3,6$
500/1	Lactose	$44,5 \pm 3,4$	$61,4 \pm 0,9$	61,2 ± 4,5
	Trehalose	$45,5 \pm 3,4$	59,7 ± 1,8	$60,5 \pm 2,6$
	Saccharose	$43,5 \pm 0,6$	58 ± 1	52,6 ± 2,1
1000/1	Lactose	$41,1 \pm 5,1$	$55,4 \pm 2,2$	54.7 ± 0.9
	Trehalose	$44,5 \pm 3,2$	$58,2\pm0,8$	62,8 ± 1,2
	Saccharose	41,6 ± 1	58,8 ± 1,8	46,2 ± 1,4

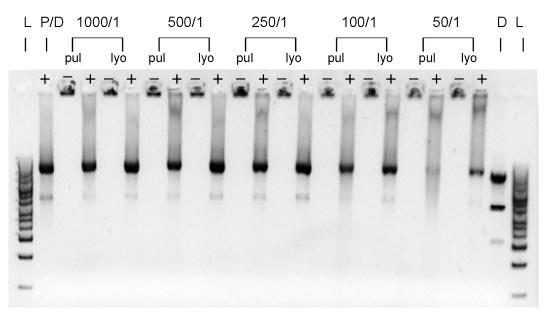


Abbildung 4.2a: DNA-Freisetzungs-Assay mit Lactose als Lyoprotektor. Wie in den folgenden Abbildungen 4.2b und 4.2c wurden PEI/pDNA-Komplexe mit einem N/P Verhältnis von 10 mit unterschiedlichen Mengen (1000/1 -50/1 Disaccharid/pDNA) verschiedener Disaccharide versetzt. Nach Lyophilisation (lyo) und Pulverisierung (pul) wurden die Komplexe ohne (-) und mit (+) Heparansulfat inkubiert, durch Gelelektrophorese auf einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt und mittels Zusatz von GelRed sichtbar gemacht. Unkomplexierte pCLuc Plasmid-DNA (D) und frisch hergestellte PEI/pDNA-Komplexe (P/D) dienten als Kontrolle, außerdem wurde ein 1kb Ladder (L) mit aufgetragen. Die DNA konnte bis auf die pulverisierten Proben mit einem 50-fachen Disaccharid Überschuss komplett freigesetzt werden.

4.2a, 4.2b und 4.2c dargestellt. Die pDNA blieb bei allen Proben ohne den Zusatz von Heparansulfat in der unteren Tasche. Dies ist ein Anzeichen für eine stabile Komplexierung der pDNA durch PEI. Weder die Lyophilisation noch die Pulverisierung mittels CapMix beschädigten die Komplexe. Der Zusatz von Heparansulfat führte bei nahezu allen Proben zur kompletten Freisetzung der pDNA aus den Komplexen; lediglich die Proben, bei denen ein 50-facher Disaccharidüberschuss eingesetzt wurde, zeigten eine schwächere Bande. Bei den pulverisierten Proben mit einem 50-fachen Disaccharidüberschuss kam es zu einer deutlich geringeren Freisetzung von pDNA. In den Gelen konnten lediglich Plasmid-spezifische Banden detektiert werden. Dies zeigt, dass die pDNA durch die Lyophilisation und anschließende Pulverisierung nicht zerstört wurde. Es zeigten sich dabei keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Disacchariden.

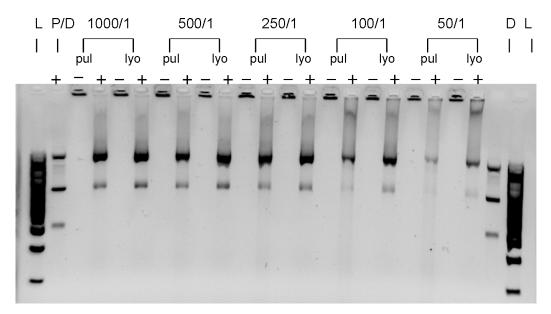


Abbildung 4.2b: DNA-Freisetzungs-Assay mit Saccharose als Lyoprotektor

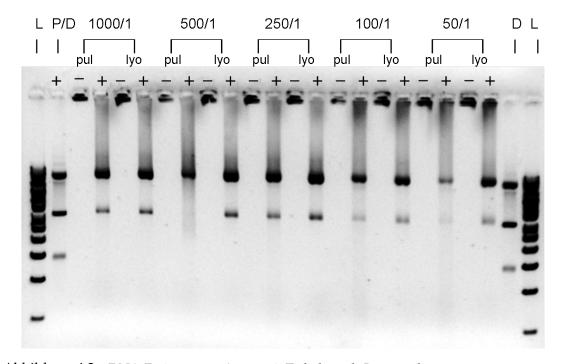


Abbildung 4.2c: DNA-Freisetzungs-Assay mit Trehalose als Lyoprotektor

4.2 Charakterisierung des Pulveraerosols

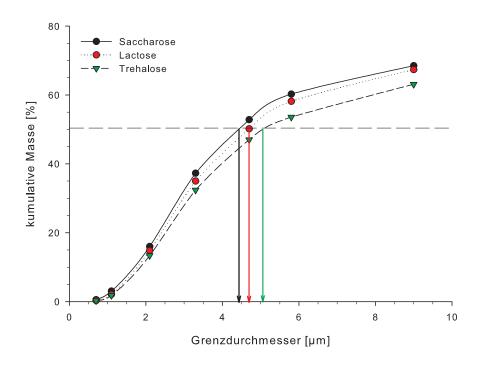


Abbildung 4.3: Bestimmung des MMAD. Die mit Natrium-Fluorescein versetzten Pulveraerosole werden mittels Insufflator in den Andersen Kaskaden-Impaktor gesprüht. Das impaktierte Pulver auf den einzelnen Prallplatten wurde mittels Fluoreszenzmessung quantifiziert. Die kumulative Masse wurde gegen den Grenzdurchmesser aufgetragen. Bei einer kumulativen Masse von 50% wurde das Lot gefällt und so der MMAD bestimmt.

Nach der Charakterisierung der einzelnen Komplexe wurde die Teilchenverteilung des Pulveraerosols bestimmt. Zur Bestimmung der Lungengängigkeit wurde das Pulver, das vor der Lyophilisation mit Natrium-Fluorescein versetzt wurde, in einem Andersen Kaskaden-Impaktor analysiert. Mit dieser Messung wurde der MMAD des Aerosols bestimmt. Bei der Messung wurde das Pulver mit Hilfe das Insufflators in einen ABLE Spacer gesprüht, der an der Öffnung des Kaskaden-Impaktors befestigt war. In Abbildung 4.3 sind die kumulativen Massen in Abhängigkeit des Grenzdurchmessers der einzelnen Impaktionsplatten dargestellt. Es zeigte sich bei allen Proben, dass etwa 30% der Masse schon auf der ersten Impaktionsplatte bzw. im Probeneinlass impaktieren. Die restlichen 70% des Pulvers impaktierten auf den folgenden Impaktionsplatten und lieferten

unterschiedliche MMADs für die verschiedenen Disaccharide. Der Einsatz von Saccharose lieferte das feinste Pulver mit einem MMAD von 4,3 μ m. Mit Lactose als Lyoprotektor entstand ein MMAD von 4,7 μ m und der Einsatz von Trehalose führte zum grobkörnigsten Pulver mit einem MMAD von 5 μ m.

4.3 In vitro Charakterisierung

Die Versuche zur *in vitro* Charakterisierung wurden auf den beiden Zelllinien BEAS-2B und 16HBE140- durchgeführt. Der Parameter, der bei allen Versuchen als Ergebnis gewertet wurde, war die Luciferase-Expression 24 Stunden nach der Transfektion. Im ersten Versuchsteil wurde der Einfluss der Disaccharide untersucht. Im zweiten und dritten Teil wurden die zuvor lyophilisierten bzw. pulverisierten Formulierungen zur Transfektion der verschiedenen Zelllinien eingesetzt.

4.3.1 Einfluss von Disacchariden auf die Transfektion

Zur Untersuchung des Einflusses der Disaccharide auf die Transfektionseffizienz der PEI/pDNA-Komplexe, wurden die beiden Bronchialepithel-Zelllinien BEAS-2B und 16HBE140- mit PEI/pDNA-Komplexen transfiziert, denen zuvor verschiedene Überschüsse an Disacchariden zugesetzt worden waren. Die eingesetzten Mengen entsprachen dabei denjenigen, die auch bei der Lyophilisation eingesetzt wurden. Es zeigte sich bei keinem getesteten Disaccharid ein Unterschied zwischen den Komplexen ohne Disaccharidzusatz und den Komplexen mit unterschiedlichen Mengen an Disaccharid. In Abbildung 4.4a und 4.4b ist beispielhaft das Ergebnis der Transfektion der beiden Zelllinien mit Überschüssen von Trehalose dargestellt.

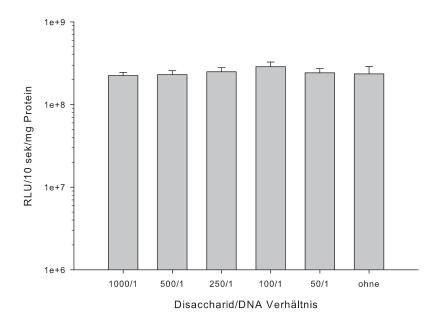


Abbildung 4.4a: Transfektion von BEAS-2B Zellen mit verschiedenen Zuckerüberschüssen. PEI/pCLuc Komplexe mit einem N/P Verhältnis von 10 wurden mit unterschiedlichen Mengen Trehalose versetzt und dienten zur Transfektion von BEAS-2B oder 16HBE14o- Zellen (siehe 4.4b) eingesetzt. 24 Stunden nach Transfektion wurde die Luciferase-Expression bestimmt. Die Trehalose hatte keinen Einfluss auf die Transfektion. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt (n=4).

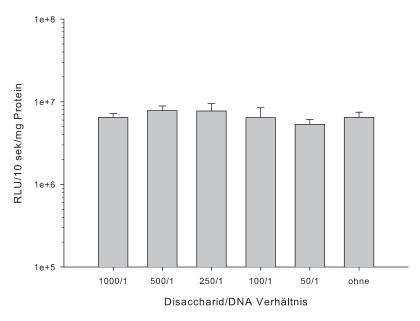


Abbildung 4.4b: Transfektion von 16HBE14o- Zellen mit verschiedenen Zuckerüberschüssen

4.3.2 Einfluss der Lyophilisation auf die Transfektion

Im zweiten Schritt wurde der Einfluss der Lyophilisation auf die Transfektionseffizienz der Komplexe untersucht. Nach der Lyophilisation wurden die erhaltenen Lyophilisate in Aqua ad inj. aufgelöst und auf eine Konzentration von $0.02\,\mathrm{mg/ml}$ eingestellt. Zur Kontrolle wurden frisch hergestellte PEI/pDNA-Komplexe ohne den Zusatz der entsprechenden Disaccharide eingesetzt. Es zeigte sich sowohl auf den BEAS-2B (Abbildung 4.5a, 4.5b und 4.5c) als auch auf den $16\mathrm{HBE}14o$ - Zellen (Abbildung 4.6a, 4.6b und 4.6c) kein Unterschied zwischen den lyophilisierten und den frisch hergestellten Komplexen. Es war keine Differenz zwischen den verschiedenen Disacchariden zu erkennen und auch die unterschiedlichen Disaccharidmengen hatten keinen Einfluss auf die Transfektionseffizienz. Wenn die Lyophilisation allerdings ohne den Zusatz eines Disaccharids durchgeführt wurde, kam es zu einer signifikant schlechteren Expression der Luciferase (p < 0.001).

4.3.3 Einfluss der Pulverisierung

Im abschließenden *in vitro* Versuch wurde der Einfluss der Pulverisierung auf die Transfektionseffizienz untersucht. Dazu wurden BEAS-2B und 16HBE14o-Zellen mit den pulverisierten Proben transfiziert. Diese wurden zuvor in Aqua ad inj. gelöst und auf eine Konzentration von $0.02\,\mathrm{mg/ml}$ eingestellt. Es konnte kein Unterschied zwischen den verschiedenen Disacchariden festgestellt werden. Bei allen Proben waren die RLU/mg Protein vergleichbar mit denen der Kontrolle, sofern während der Lyophilisation mindestens ein 100-facher Disaccharid-überschuss eingesetzt wurde. Die Proben mit einem 50-fachen Überschuss zeigten tendenziell eine niedrigere Expression, wobei die Unterschiede nicht signifikant waren. Allein bei der Probe, die ohne Disaccharid lyophilisiert und pulverisiert wurde, kam es zu einer signifikanten Abnahme der Luciferase-Expression (p<0.001).

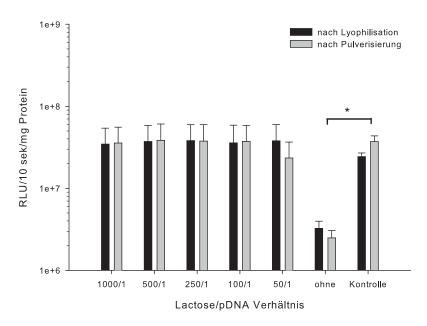


Abbildung 4.5a: Transfektion von BEAS-2B mit Lactose als Lyoprotektor. Wie in den folgenden Abbildungen 4.5b und 4.5c wurden PEI/pDNA-Komplexe mit einem N/P Verhältnis von 10 mit unterschiedlichen Mengen verschiedener Disaccharide versetzt. Die erhaltenen Lösungen wurden lyophilisiert und im Anschluss pulverisiert. Pro Well wurde 1 μ g pCLuc zur Transfektion von BEAS-2B Zellen verwendet. Als Kontrolle dienten frisch hergestellte PEI/pCLuc-Komplexe. Bei den Proben mit Lyoprotektor hatten Lyophilisation und Pulverisierung keinen Einfluss auf die Expression. Bei den Proben ohne Lyoprotektor kam es zu einer signifikanten Reduktion der Expression. Es sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt (n=4). Signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet (p<0,001).

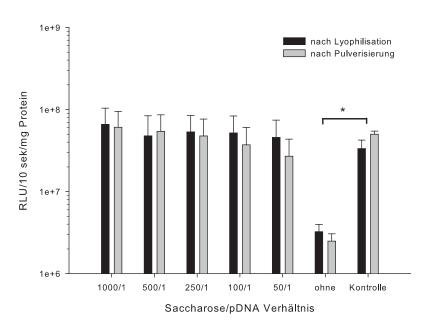


Abbildung 4.5b: Transfektion von BEAS-2B mit Saccharose als Lyoprotektor

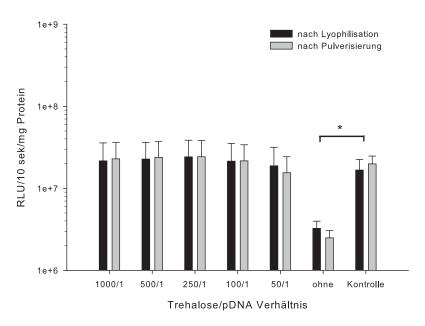


Abbildung 4.5c: Transfektion von BEAS-2B mit Trehalose als Lyoprotektor

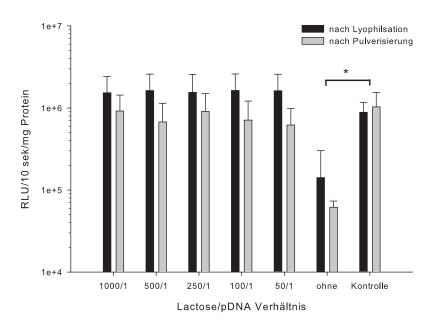


Abbildung 4.6a: Transfektion von 16HBE14o- mit Lactose als Lyoprotektor. Wie in den folgenden Abbildungen 4.6b und 4.6c wurden PEI/pDNA-Komplexe mit einem N/P Verhältnis von 10 mit unterschiedlichen Mengen verschiedener Disaccharide versetzt. Die erhaltenen Lösungen wurden lyophilisiert und im Anschluss pulverisiert. Pro Well wurde 1 µg pCLuc zur Transfektion von 14HBE-14o Zellen verwendet. Als Kontrolle dienten frisch hergestellte PEI/pCLuc-Komplexe. Bei den Proben mit Lyoprotektor hatten Lyophilisation und Pulverisierung keinen Einfluss auf die Expression. Bei den Proben ohne Lyoprotektor kam es zu einer signifikanten Reduktion der Expression. Es sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt (n=4). Signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet (p<0,001).

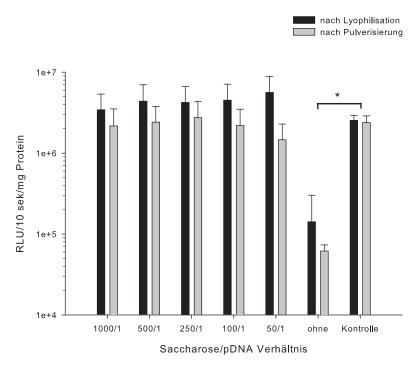


Abbildung 4.6b: Transfektion von 16HBE14o- mit Saccharose als Lyoprotektor

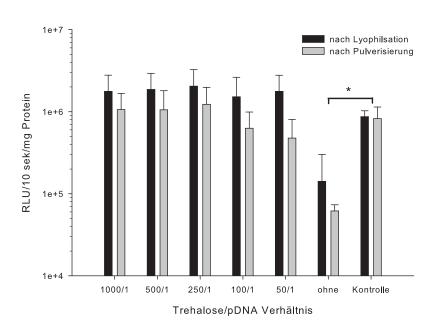


Abbildung 4.6c: Transfektion von 16HBE14o- mit Trehalose als Lyoprotektor

4.4 In vivo Charakterisierung

Dem erfolgreichen Test der Pulver *in vitro* folgte die Untersuchung im Tiermodell. Vorversuche hatten gezeigt, dass Mäuse als Versuchstiere maximal 2 Sprühstöße mit einem Luftvolumen von 1 ml tolerieren. Sprühversuche, in denen das Pulver mit dem Insufflator versprüht wurde, hatten zu dem Ergebnis geführt, dass es mit 2 Sprühstößen möglich ist eine Dosis von ca. 1 mg Pulver zu vernebeln. Es sollten 10 µg pDNA pro Tier appliziert werden, weshalb die Formulierungen mit einem 100-fachen Disaccharidüberschuss eingesetzt wurden. Im ersten *in vivo* Versuch wurde ein Reporterplasmid eingesetzt, welches für die *firefly*-Luciferase kodiert. Im darauf folgenden Versuch wurde ein für Erythropoetin kodierendes Plasmid eingesetzt, um zu testen, ob die Expression des Transgens zu einem potenziell therapeutischen Effekt führen kann.

4.4.1 Versuche mit Luciferase

In diesem Versuchsteil wurde das pCpGLuc Plasmid und Fluorescein-gelabeltes PEI eingesetzt. Die Komplexe wurden wie in Abschnitt 3.3 beschrieben hergestellt und mit einem 100-fachen Überschuss an Disaccharid versetzt, lyophilisiert und pulverisiert. Die Mäuse wurden narkotisiert und mit den Nagezähnen an einem Plattensystem aufgehängt. Der mit dem jeweiligen Pulver gefüllte Insufflator wurde in die Trachea bis zur Carnia (erste Bifurkation) der Tiere eingeführt und das Pulver durch 2 Sprühstöße appliziert. Danach wurde die Narkose antagonisiert. Am nächsten Tag wurden die Versuchstiere erneut narkotisiert und nach i.n. Applikation von 1,5 mg Luciferin im IVIS 100 Imaging System vermessen (Abbildung 4.7). Die Darstellung der Luciferase-Aktivität durch in vivo Biolumineszenz zeigte bei den behandelten Mäusen ein Lumineszenz-Signal in der Brustgegend. Bei den Aufnahmen fiel auf, dass das Signal meist auf die linke Seite der Lunge beschränkt war. Die Quantifizierung des Biolumineszenz-Signals zeigte einen leichten Trend dahingehend, dass Lactose zu der höchsten Expression des Reportergens führt, allerdings waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Disacchariden nicht signifikant (Abbildung 4.8). Nach der in vivo

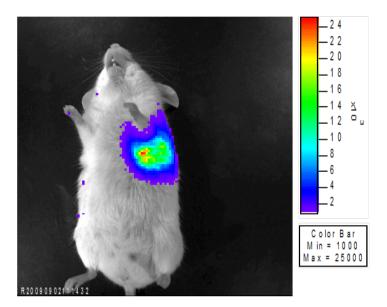


Abbildung 4.7: Biolumineszenz-Messung nach Pulveraerosol-Applikation. Die Maus wurde mit dem Lactose-Pulveraerosolen behandelt. 24 Stunden nach Applikation wurde nach intranasaler Applikation von Luciferin und einer 10-minütigen Inkubation die Biolumineszenz gemessen.

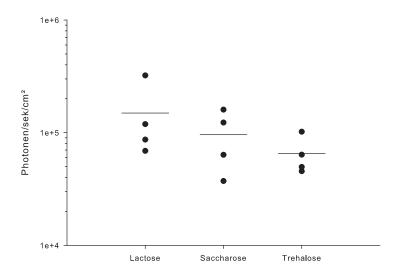


Abbildung 4.8: Quantifizierung der Biolumineszenz-Messung im IVIS 100 Imaging System. Die Mäuse wurden mit verschiedenen Pulveraerosolen behandelt. 24 Stunden nach Applikation wurde die Biolumineszenz gemessen. Die Biolumineszenz-Signale im Brustbereich wurden mit der Living Image Software quantifiziert und der Hintergrund subtrahiert. Lactose lieferte die höchste Luciferase-Expression, gefolgt von Saccharose und Trehalose. Die Unterschiede waren nicht signifikant. Es sind die Werte der Luciferase-Expression aller Mäuse, sowie der Mittelwert dargestellt (n=4).

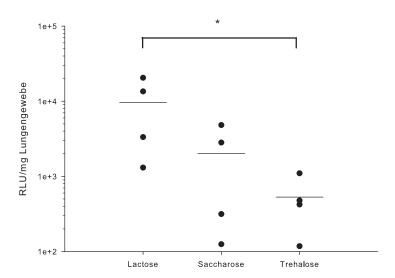


Abbildung 4.9: Lumineszenzmessung im Luminometer. Die Mäuse wurden mit verschiedenen Pulveraerosolen behandelt. 24 Stunden nach Applikation wurden die Mäuse getötet, die Lungen entnommen und homogenisiert. Anschließend wurde die Luciferase-Expression im Luminometer quantifiziert und auf das eingesetzte Lungengewebe bezogen. Es sind die Signale aller Mäuse, sowie der Mittelwert dargestellt (n=4). Signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet (p<0,05).

Biolumineszenz-Messung wurden die Mäuse getötet und die Lungen isoliert, um nach Homogenisation die Luciferase-Expression je mg Lungengewebe quantitativ zu bestimmen (Abbildung 4.9). Das Lactose-Pulver lieferte die höchste Luciferase-Expression pro mg Lungengewebe. Es führte zu einer signifikant höheren Expression im Vergleich zum Trehalose-Pulver (p<0,05), verglichen mit dem Saccharose-Pulver war der Unterschied allerdings nicht signifikant.

Die Bestimmung der tatsächlich in der Lunge deponierten Pulvermenge erfolgte durch Quantifizierung des zuvor an das PEI gekoppelte Fluorescein aus den Lungenhomogenisaten. Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen, der aber bedingt durch die breite Verteilung nicht signifikant war. Die größte Menge an Pulver und somit an pDNA wurde mit $9.3\pm4.8~\mu g$ pDNA pro Maus in der Saccharose-Gruppe in der Lunge deponiert, gefolgt von der Lactose-Gruppe ($6.8\pm1.6~\mu g$). Die geringste Menge wurde in der Trehalose-Gruppe in der Lunge deponiert ($3.9\pm1~\mu g$).

Nach Isolation der Gesamt-DNA aus den Lungenhomogenisaten, wurde eine

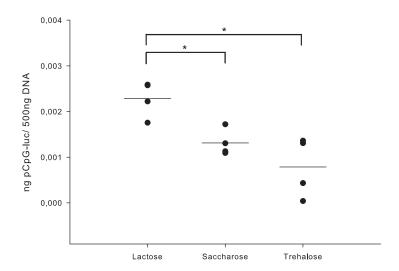


Abbildung 4.10: Quantifizierung von pCpG-luc im Lungenhomogenisat mittels Real Time PCR. pCpGluc wurde 24 h nach Applikation der Pulveraerosole aus der isolierten Gesamt-DNA der Lungenhomogenisate quantifiziert. Die Lactose-Gruppe führte zu signifikant höheren Plasmidmengen im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Es sind die Werte aller Mäuse, sowie der Mittelwert dargestellt (n=4). Signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet (p<0,05).

Real-Time PCR durchgeführt, die zur Bestimmung der tatsächlich in der Lunge deponierten pDNA-Menge diente (Abbildung 4.10). Die Quantifizierung zeigte signifikant höhere Konzentrationen an pDNA in den mit Lactose-Pulver behandelten Mäusen (p<0,05) im Vergleich zu den beiden anderen Behandlungsgruppen. Außerdem zeigte sich wie auch schon bei den Luciferase-Expressions-Messungen, dass das Saccharose-Pulver im Vergleich zum Trehalose-Pulver zu höherer pDNA Deposition führte, welche sich aber nicht signifikant unterschieden.

Neben der pDNA Deposition und der Gentransfereffizienz wurde auch die Histologie der Lunge nach erfolgter Pulverapplikation untersucht. Dazu wurden die Lungen einer mit PEI/pDNA-Lactosepulver und einer nur mit Lactosepulver behandelten Maus 24 Stunden nach Applikation entnommen und histologisch aufgearbeitet. In Abbildung 4.11 sind die histologischen Lungenschnitte abgebildet. Das PEI/pDNA Pulver führte zu kleinen Einblutungen und zur Einwanderung neutrophiler Granulozyten in den Alveolarbereich. Dies konnte auch nach Applikation von reinem Lactosepulver beobachtet werden.

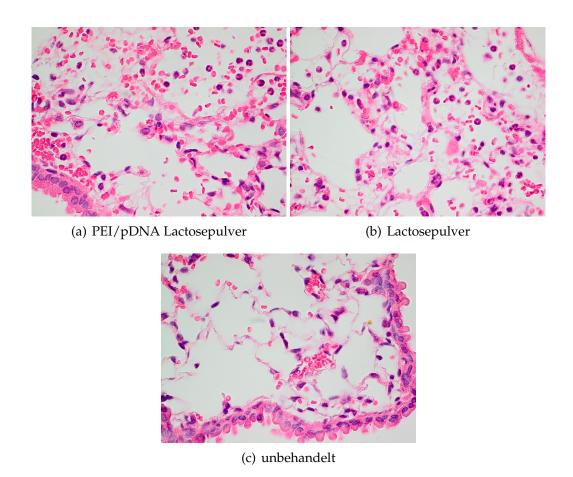


Abbildung 4.11: Histologische Lungenschnitte nach Pulverapplikation. 24 Stunden nach Applikation des PEI/pDNA Lactosepulvers (a) und des reinen Lactosepulvers (b) wurden die Lungen der Mäuse entnommen, in Formalin eingelegt, histologisch aufgearbeitet und mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung abgefärbt. Sowohl nach Applikation des PEI/pDNA-Pulvers als auch des reinen Pulvers kam es zu Einblutungen und zur Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in den Alveolarbereich, die bei der unbehandelten Kontrolllunge (c) nicht zu beobachten sind.

4.4.2 Versuche mit Erythropoetin

In einem weiterführenden Versuch sollte untersucht werden, ob die Expression des Transgens ausreicht, um in einem physiologischen Effekt zu resultieren. Dazu wurde ein Plasmid (pEPO) eingesetzt, welches für Erythropoetin kodiert. Das Pulveraerosol wurde mit Lactose als Lyoprotektor formuliert, da dieser Zucker in den *in vivo* Versuchen mit dem Luciferase-Plasmid die beste Gentransfereffizienz zeigte. Vor der ersten Behandlung wurde Blut von jeder Maus (n=8) abgenommen, um den Ausgangs-Hämatokritwert zu bestimmen. Im Anschluss wur-

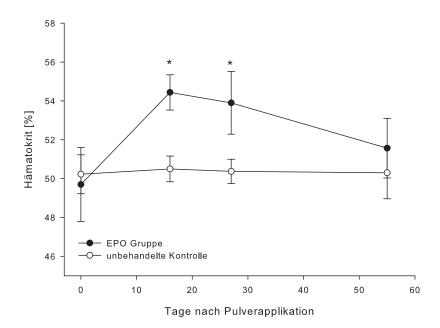


Abbildung 4.12: Entwicklung der Hämatokrits nach Pulverapplikation. Balb/c Mäuse (n=8) bekamen an Tag 0 und 8 ein Pulveraerosol, welches PEI/pEPO-Komplexe enthielt. Der Hämatokritwert wurde über mehrere Wochen verfolgt. An Tag 16 kam es zu einer signifikanten Erhöhung des Hämatokritwertes im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (p<0,001). Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet.

de das Pulveraerosol appliziert. Da es mit der Methode nur möglich war, etwa $7\,\mu g$ pDNA in die Lunge zu applizieren, wurden die Mäuse nach 8 Tagen ein zweites Mal behandelt. In zuvor durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Applikation von $20\,\mu g$ desselben Plasmids ausreicht, um den Hämatokritwert signifikant anzuheben (Aneja et al., 2009). Die Blutentnahme und die Bestimmung des Hämatokritwertes erfolgten an verschiedenen Zeitpunkten nach der Applikation (Abbildung 4.12). Es zeigte sich an Tag 16 ein höchst signifikanter Anstieg des Hämatokritwertes (p < 0.001). An Tag 27 nach der ersten Applikation war der Hämatokritwert noch immer signifikant erhöht, bevor er an Tag 55 wieder auf das Niveau der unbehandelten Mäuse zurückfiel. Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die Applikation von PEI/pDNA-Komplexen in Form eines Pulveraerosols nicht nur zur Expression des applizierten Gens führt, sondern auch in einem physiologischen Effekt resultiert.

4.5 Zusammenfassende Betrachtung und Diskussion der Ergebnisse

Dieser Teil der Arbeit untersuchte eine neue Applikationsmethode in Form eines Pulveraerosols, um nicht-virale Genvektoren in die Lunge zu applizieren. Komplexe, bestehend aus *branched* Polyethylenimin und pDNA, wurden zusammen mit verschiedenen Lyoprotektoren lyophilisiert und im Anschluss zu einem feinen Pulveraerosol zerkleinert. Zu diesem Zweck wurden die Lyophilisate mit Silica Beads in einem CapMix pulverisiert. Die Formulierungen wurden vor Lyophilisation, nach Lyophilisation und nach Pulverisierung *in vitro* auf Lungenzellen untersucht. Anschließend wurden die optimierten Formulierungen *in vivo* in Mäusen zuerst mit dem Reportergen *firefly*-Luciferase und dann mit dem physiologischen Gen Erythropoetin untersucht. Das Aerosol wurde dazu mit einem Insufflator in die Lungen der narkotisierten Mäuse appliziert. Es konnte gezeigt werden, dass es mit der Verwendung der Pulveraerosole möglich war, die Expression des applizierten Gens zu erreichen. Weiterhin resultierte die Expression bei Verwendung des Erythropoetin Plasmids in einem physiologischen Effekt.

Im ersten Teil wurden die biophysikalischen Eigenschaften der Genvektor-Komplexe in den verschiedenen Formulierungen untersucht. Die Untersuchung der Partikelgröße zeigte, dass die Zugabe der verschiedenen Disaccharide keinen Einfluss auf die Größe und Polydispersität der Komplexe hat. Die Lyophiliosation führte mit steigender Disaccharidmenge, unabhängig vom Disaccharid, nur zu einem geringen Anstieg oder sogar zur Beibehaltung der Partikelgröße. Dazu war mindestens ein 250-facher Disaccharidüberschuss nötig. Bei Verwendung eines nur 100- bzw. 50-fachen Überschusses kam es zur Verdopplung bzw. Vervierfachung der Ausgangsgröße. Die Lyophilisation der Komplexe komplett ohne Disaccharide resultierte in einer starken Aggregation der Komplexe und damit zu einer Verzehnfachung der Ausgangsgröße. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Disaccharidmenge eine kritische Rolle bei der Beibehaltung der Partikelgröße spielt. Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass Disaccharide durch Bildung einer glasartigen Matrix die Aggregation der Kom-

plexe während der Lyophilisation verhindern können (Crowe et al., 1994). Dabei dienen vor allem die polaren Gruppen der Disaccharide als Ersatz für die mit dem Wasser gebildeten Wasserstoffbrückenbindungen. Weiterhin wurde gezeigt, dass es durch den Zusatz von Disacchariden möglich ist, die Partikelgröße von liposomalen und PEI-Formulierungen während der Lyophilisation beizubehalten (Molina et al., 2001; Allison and Anchordoquy, 2000).

Nach der Pulverisierung kam es bei nahezu allen Formulierungen, unabhängig von der zugesetzten Disaccharidmenge, zu einer Zunahme der Partikelgröße. Die Zunahme der Partikelgröße könnte auf die Druckkräfte während des Pulverisierungsprozesses zurückgeführt werden, wodurch es zur Aggregation der Komplexe untereinander kommt. Lediglich bei den Formulierungen mit einem 50-fachen Überschuss an Saccharose und Lactose kam es zu einer leichten Abnahme der Partikelgröße. Die Abnahme der Partikelgröße lässt vermuten, dass die zugesetzte Disaccharidmenge nicht ausreicht, um die Partikel ausreichend vor den Scherkräften, die ebenfalls während der Pulverisierung auf die Komplexe wirken, zu schützen und es somit zur Zerkleinerung der Komplexe kommt.

Neben der Zunahme der Partikelgröße kam es zur Zunahme des Zetapotenzials, was auch schon von anderen gezeigt werden konnte (Brus et al., 2004; Anchordoquy et al., 1998; Molina et al., 2001). Es wurde vorgeschlagen, dass die Veränderung des Zetapotenzials auf die zusätzliche Inkorporation von freier pDNA oder freien PEI-Molekülen in die Komplexe zurückzuführen ist (Molina et al., 2001). Die zu beobachtende Zunahme des Zetapotenzials lässt vermuten, dass es zu einer zusätzlichen Aufnahme von freien PEI-Molekülen in die Komplexe kommt. Nach der Pulverisierung kam es wieder zu einer leichten Abnahme des Zetapotenzials. Dies reflektiert erneut den Einfluss der Pulverisierung, der sich auch schon in der Zunahme der Partikelgröße gezeigt hat. Im Gegensatz zur Partikelgröße hatte die Disaccharidmenge aber keinen Einfluss auf die Zunahme des Zetapotenzials.

Das im Anschluss durchgeführte DNA-Freisetzungs-Assay lieferte bei der Komplexierung der pDNA keinen Unterschied vor Lyophilisation, nach Lyophilisation und auch nach Pulverisierung. Die gesamte pDNA-Menge befand sich noch in der Tasche, in die sie geladen wurde. Dies lässt auf eine komplette Komplexierung der pDNA und damit auf die Unversehrtheit der Komplexe schließen. Der Zusatz von Heparansulfat resultierte bei nahezu allen Proben zur kompletten Freisetzung der pDNA; einzig bei den pulverisierten Proben mit einem 50-fachen Überschuss der verschiedenen Disaccharide kam es lediglich zur Freisetzung eines Teils der komplexierten pDNA. Dies lässt, zusammen mit der abnehmenden Partikelgröße nach Pulverisierung in diesen Proben, auf eine Beschädigung der Komplexe während der Pulverisierung schließen. Die Freisetzung der pDNA aus Komplexen spielt eine wichtige Rolle für den erfolgreichen Gentransfer und konnte schon in anderen Untersuchungen als kritischer Parameter identifiziert werden (Huth et al., 2006).

Nach den biophysikalischen Untersuchungen wurde die Transfektions-Effizienz der Formulierungen in vitro untersucht. Zu diesem Zweck wurden die lyophilisierten und pulverisierten Komplexe mit frisch hergestellten Komplexen auf den zwei verschiedenen Bronchialepithel-Zelllinien, 16HBE140- und BEAS-2B, verglichen. Bei diesen Versuchen konnten keine Unterschiede zwischen den eingesetzten Disacchariden festgestellt werden. Nach Lyophilisation und Pulverisierung war kein signifikanter Unterschied bei der Luciferase-Expression, bezogen auf die Positivkontrolle, auf den beiden Zelllinien zu detektieren. Durch Lyophilisation und Pulverisierung ohne den Zusatz eines Disaccharids kam es zu einer signifikant schlechteren Expression im Vergleich zur Positivkontrolle. Es konnten bei den Expressions-Daten allerdings zwei verschiedene Trends beobachtet werden. Die lyophilisierten Proben führten zu einer geringfügig höheren Expression im Vergleich zu den Kontroll-Komplexen. Da die Expression aber nicht durch den Disaccharidzusatz alleine positiv oder negativ beeinflusst wird und es auch keinen Zusammenhang zwischen der eingesetzten Disaccharidmenge und der Erhöhung der Expression gibt, kann die erhöhte Expression wahrscheinlich auf die Zunahme des Zetapotenzials zurückgeführt werden. Es konnte gezeigt werden, dass durch die stärkere positive Ladung von Genvektor-Komplexen die Affinität zur negativ geladenen Zellmembran erhöht wird (Brus et al., 2004), wodurch sich die höhere Expression in den lyophilisierten Proben erklären lassen könnte. Bei den pulverisierten Proben kam es dagegen mit sinkender Disaccharidmenge zu einer leichten Abnahme der Expression. Zusammen mit den physikalischen Daten, die bei den Proben mit einem 50-fachen Überschuss eine Abnahme der Partikelgröße und eine nicht mehr komplette Freisetzung gezeigt hatten, ist zu vermuten, dass die schlechtere Expression auf die mangelnde Freisetzung der pDNA aus den Komplexen zurückgeführt werden kann, da diese durch die Pulverisierung beschädigt werden.

Zur weiteren Validierung der in vitro Daten wurden die Proben in vivo im Mausmodell untersucht. Es wurden die Genexpression, die applizierte Pulvermenge und die effektiv aufgenommene Genvektor-Menge quantifiziert. Für diese Versuche wurden die Formulierungen mit einem 100-fachen Disaccharidüberschuss verwendet. Die zuvor durchgeführten Charakterisierungsversuche hatten gezeigt, dass diese Disaccharidüberschüsse ausreichen, um die biophysikalischen Eigenschaften sowie die in vitro Transfektions-Effizienz beizubehalten. Vorversuche hatten gezeigt, dass es mit 2 Sprühstößen mit einem jeweiligen Luftvolumen von 1 ml möglich ist, ca. 1 mg Pulver zu vernebeln. Durch den Einsatz der Proben mit einem 100-fachen Disaccharidüberschuss war es möglich, etwa 10 μg pDNA in die Lunge der Mäuse zu applizieren. Im ersten Versuchsteil, bei dem Luciferase als Reportergen eingesetzt wurde, konnte gezeigt werden, dass die Applikation der Pulveraerosole mit dem Insufflator zu einer messbaren Expression in den Lungen der Mäuse führt. Dabei wurde die Expression bei nahezu allen Tieren nur in der linken Lungenhälfte detektiert. Dies könnte mit der Anatomie der Mauslunge zusammenhängen. Die linke Lunge besteht nur aus einem Lappen, wohingegen die rechte Lunge aus vier Lappen besteht. Außerdem kann es bei der Applikation durch leichte Neigung des Insufflators auf die rechte Seite, wodurch sich die Spitze des Insufflators nach links ausrichtet, zur ausschließlichen Applikation des Pulvers in den linken Lungenflügel kommen.

Bei keiner physikalischen Untersuchung konnte ein Unterschied zwischen den verwendeten Disacchariden Lactose, Saccharose und Trehalose festgestellt werden. Dagegen lieferte die Charakterisierung der Pulverpartikel erste Unterschiede zwischen den einzelnen Disacchariden. Die untersuchten MMADs unterschiede

den sich bei den verschiedenen Disacchariden. Die Analyse der applizierten Pulvermenge in den Mäusen bestätigte diese Ergebnisse. Mit dem feinsten Pulver, das mit Saccharose als Lyoprotektor produziert wurde, war es möglich, die größte Menge an Pulver in die Lungen der Mäuse zu applizieren. Die etwas gröberen Pulver mit Lactose und Trehalose führten zu stetig geringeren applizierten Pulvermengen.

Nach Quantifizierung der Luciferase-Expression in den homogenisierten Lungen konnte eine signifikant höhere Expression in den mit Lactose-Pulver behandelten Tieren im Vergleich zu den mit Trehalose behandelten Tieren detektiert werden. Die Bestimmung der in die Lunge deponierten pDNA resultierte in signifikant höheren Mengen in der Lactose-Gruppe im Vergleich zu den beiden anderen Disaccharid-Gruppen. Im Gegensatz zu den in vitro Untersuchungen, bei denen keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Disacchariden festgestellt werden konnte, kam es bei den in vivo Versuchen zu deutlichen Unterschieden zwischen den einzelnen Disacchariden. Die Quantifizierung des Fluorescein-Signals hat gezeigt, dass mit dem Saccharose-Pulver die höchste Pulverdosis in der Lunge deponiert wurde. Es ist daher erstaunlich, dass die Applikation des Lactose-Pulvers im Vergleich zu dem Saccharose-Pulver zu einer höheren Expression und Aufnahme der pDNA führte. Es konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass die Konjugation von Lactose an Polymere wie PEI und Polylysin die zelluläre Aufnahme von Genvektor-Komplexen fördert (Bandyopadhyay et al., 1999; Kollen et al., 1999). In diesem Fall lag zwar keine kovalente Bindung zwischen der Lactose und den PEI Molekülen vor, trotzdem kann vermutet werden, dass die zelluläre Aufnahme durch Lactose in vivo verbessert wird, was die verbesserte Genexpression in dieser Gruppe erklären könnte.

Die histologische Untersuchung der Mauslunge zeigte nach Applikation von PEI/pDNA-Lactosepulver Einblutungen und die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in den Alveolarbereich. In einer Studie von Kleemann et al. konnte gezeigt werden, dass es nach intratrachealer Instillation von PEI/pDNA-Komplexen zu einer Infiltration von neutrophilen Granulozyten kommt (Kleemann et al., 2005). Bei Verwendung von reiner Lactose, die mit Hilfe des Insuf-

flators vernebelt wurde, kam es ebenfalls zu einer leichten Inflammation. Allerdings fiel die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten geringer aus. Daher kann vermutet werden, dass die histologischen Veränderungen nicht nur durch die PEI/pDNA-Komplexe, sondern auch durch die Applikationsmethode hervorgerufen werden. Die Luftwege der Maus sind sehr klein und es kann durch die Applikation von etwas größeren Pulverpartikeln zur Verlegung der Atemwege kommen (Yamashita and Tanaka, 1995). Dies führt zu einer Stauungsblutung, wodurch es zur Einwanderung von Erythrozyten und neutrophilen Granulozyten kommt.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Applikation der Pulveraerosole zur Expression des verwendeten Reportergens führt, sollte herausgefunden werden, ob die Expression ausreicht, um in einem physiologischen Effekt zu resultieren. Auricchio et al. konnten durch Verwendung eines rAAV Vektors und Erythropoetin als physiologischem Marker zeigen, dass es mit einem nicht invasiven Eingriff möglich ist, ein in die Blutbahn sekretiertes therapeutisches Gen in die Lunge zu applizieren (Auricchio et al., 2002). Zur Demonstration dieses Effekts mit dem Pulveraerosol wurde das pEPO Plasmid eingesetzt, welches ebenfalls für Erythropoetin kodiert. Das Plasmid steht unter der Kontrolle des EF1α Promotors, der für seine Langzeit-Expression in Lungenzellen bekannt ist (Gill et al., 2001). In einer Publikation, in der dasselbe Plasmid verwendet wurde, konnte gezeigt werden, dass die Applikation von 20 µg pEPO als i.v. Injektion in die Schwanzvene ausreicht, um den Hämatokrit anzuheben (Aneja et al., 2009). Die Verwendung des Pulveraerosols erlaubt nur die Applikation von ca. 7 µg pDNA bei einer Behandlung. Aus diesem Grund wurden die Mäuse zwei Mal mit dem Pulver behandelt, wobei die zweite Dosis acht Tag nach der Ersten verabreicht wurde. Durch Blutabnahme zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation wurde die Entwicklung des Hämatokritwerts in der behandelten Gruppe mit der von unbehandelten Mäusen verglichen. Es zeigte sich 16 Tage nach der ersten Behandlung eine signifikante Zunahme des Hämatokritwerts in der behandelten Gruppe. An Tag 27 war der Hämatokritwert noch immer signifikant erhöht, bevor er an Tag 55 wieder auf das Niveau der unbehandelten Mäuse zurückfiel. Der Verlauf des

Hämatokritanstiegs und -abfalls auf das Niveau der unbehandelten Mäuse entsprach dabei dem Verlauf, der auch in einer zuvor durchgeführten Studie zu beobachten war (Aneja et al., 2009). Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des Pulveraerosols zur einer gewünschten physiologischen Reaktion in der Maus führt. Es könnte also eine effektive Behandlungsalternative zu den bisher eingesetzten Aerosolen darstellen.

5 Untersuchungen von AAV2/9 für den Gentransfer in die Lunge

In diesem Teil der Arbeit wurde ein AAV2/9-Vektor für den viralen Gentransfer in die Lunge untersucht. Bevor der virale Vektor produziert und bei verschiedenen Mausstämmen appliziert wurde, erfolgte die Optimierung des Vektors, indem der Einfluss des Introns auf die Expression untersucht wurde. Nach intranasaler (i.n.) oder intratrachealer (i.t.) Applikation des Vektors wurde in Balb/c-Mäusen die Transgen-Expression über die Zeit, die Biodistribution und die Immunogenität des Vektors untersucht und verglichen. Im zweiten Versuchsteil wurde der Vektor an SPB-/--Mäusen untersucht, wobei der Effekt des Geschlechtes auf die Transgen-Expression und auf die Entwicklung neutralisierender Antikörper untersucht wurde. Weiterhin wurde je eine Gruppe von männlichen und weiblichen Mäusen über einen bestimmten Zeitraum mit Dexamethason behandelt, um das Immunsystem zu inhibieren. Auch bei diesen Tieren wurde die Transgen-Expression und die Entwicklung von neutralisierenden Antikörpern analysiert.

5.1 Einfluss des Introns auf die Expression

Der erste Schritt bei der Entwicklung des AAV2/9-Vektors war die Optimierung des Vektor-Rückgrads. Hierzu wurden zwei Vektoren untersucht, die sich lediglich darin unterschieden, dass ein Vektor das komplette *Chicken Beta-Aktin* Intron und der andere nur einen Teil dieses Introns enthält. In beide Vektoren wurde Luciferase als Reportergen einkloniert, um zu vergleichen, ob das gan-

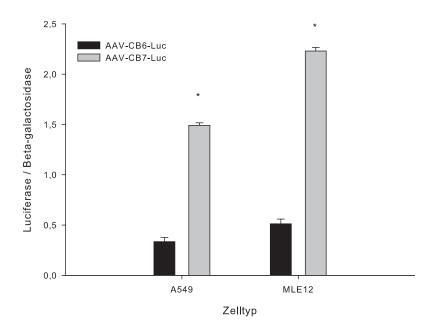


Abbildung 5.1: Effekt des Introns auf die Expression. Die beiden Plasmide pCB6- und pCB7-Luc wurden zusammen mit einem für Beta-Galactosidase kodierenden Plasmid auf zwei Zelllinien (A549 und MLE12) kotransfiziert. Nach 24h Stunden wurde die Luciferase- und die Beta-Galactosidase-Expression gemessen, wobei die Luciferase-Expression relativ zur Beta-Galactosidase dargestellt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass es bei der Verwendung von pCB7-Luc zu einer signifikant höheren Luciferase-Expression kommt (p<0,05). Signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet. Es sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt.

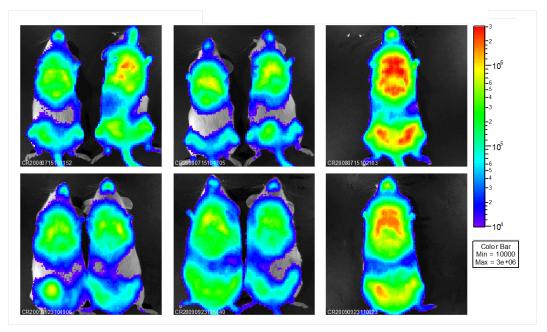
ze oder nur ein Teil des Introns nötig ist, um eine effektive Genexpression zu erhalten. Beide Vektoren wurden anschließend in der Zellkultur auf zwei verschiedenen Zelllinien getestet. Als Transfektions-Kontrolle wurde ein für Beta-Galactosidase kodierendes Plasmid eingesetzt. Die alveolaren Zelllinien, A549 und MLE12, wurden mit den beiden Plasmiden kotransfiziert, wobei Lipofectamine 2000 als Transfektions-Reagenz eingesetzt wurde. Nach 24 Stunden wurde sowohl die Beta-Galactosidase- als auch die Luciferase-Aktivität bestimmt. Die Luciferase-Signale wurden relativ auf die Beta-Galactosidase-Signale bezogen (Abbildung 5.1). Es zeigte sich auf beiden Zelllinien, dass der Vektor mit dem kompletten Intron zu einer signifikant höheren Expression führte (p<0,05). Aus diesem Grund wurde der Vektor mit dem ganzen Intron verwendet, um den AAV-Luc Vektor herzustellen.

5.2 Einfluss der Applikationsroute

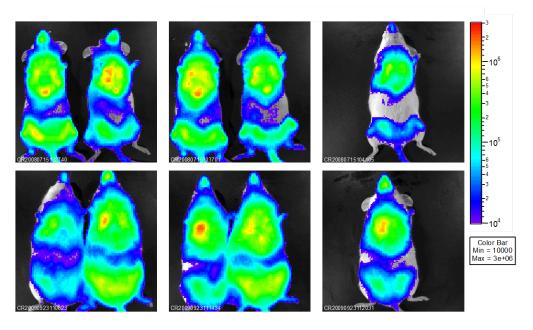
Im ersten *in vivo* Versuch wurde der Einfluss von zwei unterschiedlichen Applikationsrouten auf die Langzeit-Expression, die Biodistribution und die Entwicklung neutralisierender Antikörper untersucht. Weibliche Balb/c-Mäuse wurden jeweils mit 10¹¹ GC (Gen Kopien)/Maus behandelt, die in der einen Gruppe intranasal und in der zweiten Gruppe intratracheal verabreicht wurden. Die Transgen-Expression wurde über ein Jahr lang verfolgt, bevor die Mäuse euthanasiert und ihre inneren Organe zur Bestimmung der Biodistribution entnommen wurden. Außerdem wurde vor der Euthanasie Blut abgenommen, aus dem das Serum gewonnen wurde. Dies diente zur Bestimmung neutralisierender Antikörper (NAB) gegen den applizierten Vektor.

5.2.1 Langzeit-Expression

Zur Bestimmung der Langzeit-Expression wurden die Mäuse an verschiedenen Zeitpunkten nach Vektor-Applikation in Narkose gelegt und nach intraperitonealer Applikation von Luciferin die *in vivo* Luciferase-Expression im IVIS 100 Imaging System gemessen (Abbildung 5.2). Bei beiden Applikationsrouten konnte bereits am siebten Tag nach Vektor-Applikation ein Luciferase-Signal detektiert werden. Die Expression blieb bis zum Ende der Studie nach 450 Tagen konstant. Die Quantifizierung des Luciferase-Signals im Bereich der Brust zeigte im gesamten Messzeitraum keine Unterschiede zwischen den beiden Applikationsrouten (Abbildung 5.3).



(a) intratracheale Applikation



(b) intranasale Applikation

Abbildung 5.2: Biolumineszenz-Messung Balb/c-Mäuse mit 10^{11} AAV-Luc Vektoren an verschiedenen Zeitpunkten. Weibliche BALB/c-Mäuse wurden jeweils mit 10^{11} AAV-Luc Vektoren behandelt. Dafür wurden die viralen Vektoren auf ein Volumen von $100\,\mu$ l verdünnt und entweder i.t. (n=5)(a) oder i.n. (n=5) (b) appliziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation wurde das Substrat Luciferin i.p. injiziert und die Biolumineszenz mittels IVIS 100 Imaging System bestimmt. Die obere Reihe stellt jeweils die Messung von Tag 7, die untere Reihe von Tag 442 dar. In beiden Gruppen bleibt die Expression über den gesamten Messzeitraum von 450 Tagen konstant und es können keine Unterschiede zwischen den beiden Applikationsrouten detektiert werden.

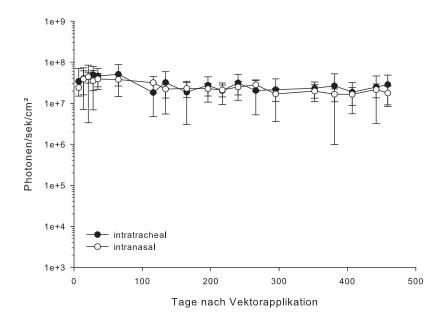


Abbildung 5.3: Langzeit-Expression in Balb/c-Mäusen mit 10¹¹ GC/Maus. Zwei Gruppen von Balb/c-Mäusen (n=5) wurden mit jeweils 10¹¹ AAV-Luc Vektoren behandelt, wobei die Applikation in einer Gruppen i.n. und in der anderen Gruppe i.t. erfolgte. Durch Biolumineszenz-Messungen an unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Applikation wurde die Luciferase-Expression im IVIS 100 Imaging System gemessen und das Signal über der Brustgegend quantifiziert. Es kam zu keinem Zeitpunkt zu einem signifikanten Unterschied zwischen den beiden Applikationsrouten. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt.

5.2.2 Entwicklung neutralisierender Antikörper

Zur Detektion von NABs gegen den applizierten Vektor wurde den Mäusen Blut zur Serumgewinnung abgenommen. Zur Kontrolle wurde Serum von unbehandelten Balb/c-Mäusen verwendet. Die gepoolten, seriell verdünnten Seren der behandelten Mäuse wurden mit jeweils derselben Vektor-Menge für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie auf MLE12 Zellen gegeben und nach 72 h die Luciferase-Aktivität bestimmt wurde (Abbildung 5.4). Die 10-fache Verdünnung des Serums führte in beiden Applikationsgruppen zu einer kompletten Neutralisierung der Vektoren. Die 100-fache Verdünnung resultierte in einer Reduktion der Luciferase-Aktivität auf 2% der unbehandelten Kontrolle. Bei der 1000-fachen Verdünnung der Seren konnte keine Reduktion der Luciferase-Aktivität festgestellt werden. Ähnlich der Langzeit-Expression lässt sich kein Unterschied zwischen den beiden Applikationsrouten detektieren.

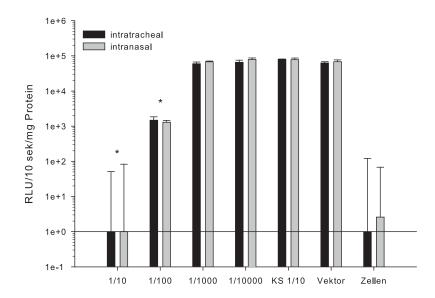
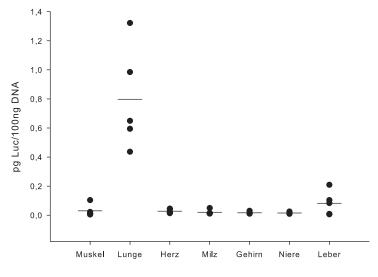


Abbildung 5.4: Entwicklung von NAB bei Mäusen mit 10^{11} GC/Maus. Zwei Gruppen von Balb/c-Mäusen (n=5) wurden mit jeweils 10^{11} AAV-Luc Vektoren behandelt, wobei die Applikation in einer Gruppe i.n. und in der anderen Gruppe i.t. erfolgte. Am Ende des Versuchs wurde von beiden Gruppen Serum gewonnen. Aus den gepoolten Serumproben wurde die Entwicklung von NABs verglichen. Dazu wurden die Proben in mehreren Schritten 10-fach verdünnt und mit dem AAV-Luc Vektor inkubiert. Als Kontrollen wurde Kontrollserum (KS) von unbehandelten Mäusen, der Vektor alleine und Zellen alleine verwendet. Die Luciferase-Messung erfolgte 72 h nach der Transduktion. Bei der 10-fachen Verdünnung kam es zu einer kompletten Neutralisierung der Vektoren, bei der 100-fachen Verdünnung sank die Expression auf 2% der unbehandelten Serumkontrolle. Es war kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu detektieren. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Signifikante Unterschiede zum KS sind mit einem * gekennzeichnet.

5.2.3 Biodistribution

An Tag 450 nach Vektorapplikation wurden die Mäuse euthanasiert und die Organe (Lunge, Herz, Leber, Milz, Nieren, Gehirn, Gonaden) sowie Muskelgewebe zur Bestimmung der Biodistribution isoliert. Nach Homogenisierung und DNA-Isolation wurde mit der gewonnenen Gesamt-DNA eine Real-Time PCR durchgeführt, um die Menge an AAV-Luc Vektor in jedem Organ/Gewebe zu bestimmen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.5 dargestellt. Die absolute Quantifizierung zeigte die höchste Konzentration an Vektor-DNA in beiden Gruppen in der Lunge. Die Gonaden waren in beiden Applikationsgruppen bei allen Mäusen negativ und sind in der Abbildung nicht dargestellt. Der Vergleich zwischen den beiden Applikationsrouten zeigte, dass die intratracheale Applikation zu höhe-



(a) intratracheale Applikation

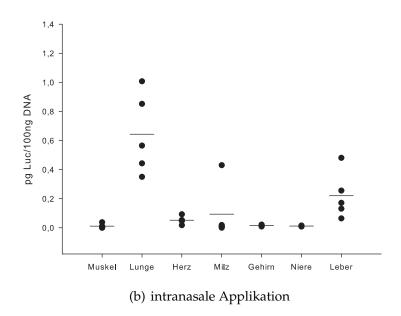


Abbildung 5.5: Biodistribution bei Mäusen mit 10¹¹ GC/Maus. Nach Isolierung der Gesamt-DNA aus jedem Organ wurde die Vektor-DNA bezogen auf die Gesamt-DNA mittels Real-Time PCR bestimmt. Bei allen Tieren lag die höchste Vektor-DNA Menge in der Lunge vor. In der i.n. Gruppe kam es im Vergleich zur i.t. Gruppe zu einer höheren Vektor-DNA Konzentration in Leber und Milz. Die Unterschiede zwischen den Applikationsrouten waren aber nicht signifikant. Es sind sowohl die einzelnen Tiere, als auch der Mittelwert dargestellt.

ren Vektor-DNA Mengen in der Lunge, kombiniert mit geringeren Mengen in Leber und Milz führt. Die folgenden Versuche wurden trotz nicht signifikanter Unterschiede mit der intratrachealen Applikation durchgeführt.

5.3 Einfluss der Dosisreduktion

Die *in vivo* Biolumineszenz-Aufnahmen und Biodistributionsstudien haben gezeigt, dass es bei der Applikation von 10¹¹ Vektoren zu einer Verteilung der Vektoren im gesamten Körper der Maus kommt. Aus diesem Grund wurde versucht, durch Reduktion der applizierten Dosis die Verteilung des Vektors auf die Lunge einzuschränken. Es wurden zwei weitere Versuchsgruppen gebildet, wobei eine Gruppe 10¹⁰ und die andere Gruppe 10⁹ AAV-Luc Vektoren intratracheal instilliert bekam. Analog zur ersten Versuchsgruppe wurde die Luciferase-Aktivität über die Zeit verfolgt. Am Versuchsende wurden Organe und Blut entnommen, um die Biodistribution und die Entwicklung neutralisierender Antikörper zu untersuchen.

5.3.1 Langzeit-Expression

Die Langzeit-Expression der Luciferase wurde durch *in vivo* Biolumineszenz-Messungen verfolgt. Die Luciferase-Aktivität konnte bereits nach sieben Tagen detektiert werden. In Abbildung 5.6 sind die Biolumineszenz-Aufnahmen der verschiedenen Dosierungsgruppen an Tag 28 dargestellt. Die Dosisreduktion führte zu einer geringeren Verteilung des Genexpression im Körper der Mäuse. In der 10¹¹ Gruppe war die Biolumineszenz in der ganzen Maus detektierbar, wohingegen sie in der 10¹⁰ Gruppe hauptsächlich auf Brust- und Lebergegend beschränkt und in der 10⁹ Gruppe nur noch schwach in einem Lungenflügel ermittelbar war. Die Quantifizierung der Luciferase-Expression im Brustbereich zeigte, dass eine 10-fache Dosisreduktion zu einer 50-fach schlechteren Transgen-Expression führte (Abbildung 5.7). Eine weitere 10-fache Reduzierung resultierte in Luciferase-Signalen, die knapp über dem Hintergrund lagen.

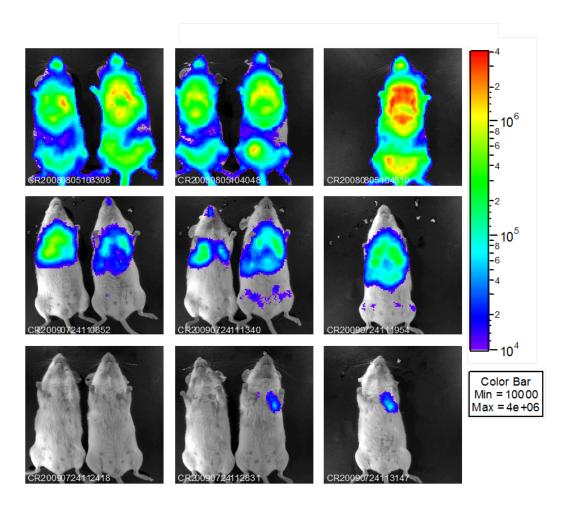


Abbildung 5.6: Biolumineszenz-Aufnahme von Balb/c-Mäusen verschiedener AAV-Luc Dosisgruppen. Weibliche BALB/c-Mäuse wurden mit drei verschiedenen Dosen von AAV-Luc behandelt: Obere Reihe: 10^{11} GC/Maus; Mittlere Reihe: 10^{10} GC/Maus; Untere Reihe: 10^{9} GC/Maus. Dafür wurden die Vektoren auf ein Volumen von $100\,\mu$ l verdünnt und i.t. appliziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation wurde das Substrat Luciferin i.p. injiziert und die Biolumineszenz mittels IVIS 100 Imaging System bestimmt. Hier sind die Messungen von Tag 28 nach Vektor-Applikation dargestellt. Durch Reduzierung der Dosis kam es zu einer deutlichen Reduzierung des Luciferase-Signals in der Brustgegend, kombiniert mit einer Abnahme der Verteilung des Luciferase-Signals. Bei der Gruppe die 10^{9} AAV-Luc Vektoren instilliert bekam, war die Luciferase-Expression kaum noch messbar.

5.3.2 Entwicklung neutralisierender Antikörper

Im nächsten Schritt wurden die NABs bei den Versuchsgruppen mit 10¹⁰ und 10⁹ Vektoren pro Tier bestimmt, um zu sehen ob die Dosisreduktion auch einen Einfluss auf die Immunreaktion hat. Analog zu den zuvor durchgeführten Experimenten wurden die gepoolten Seren in verschiedenen Verdünnungen mit derselben Vektor-Dosis für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, bevor

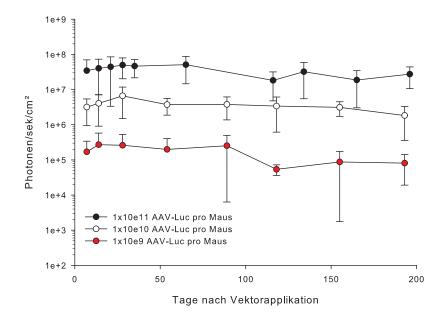


Abbildung 5.7: Langzeitexpression der verschiedenen AAV-Luc Dosierungen. Drei Gruppen von Mäusen (n=5) wurden mit drei verschiedenen Dosen von AAV-Luc behandelt: 10^{11} , 10^{10} und 10^{9} . Durch Biolumineszenz-Messungen an unterschiedlichen Zeitpunkten wurde die Luciferase-Expression im IVIS 100 Imaging System gemessen und das Signal über der Brustgegend quantifiziert. Durch die 10-fache Reduzierung der Dosis kam es zu einer mehr als 10-fachen Reduktion des Luciferase-Signals. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

sie auf MLE12 Zellen gegeben und nach 72 h die Luciferase-Aktivität bestimmt wurde. Beide Gruppen führten bei der 10-fachen Verdünnung des Serums zu einer kompletten Neutralisierung der Vektoren (Abbildung 5.8). Unterschiede zwischen ihnen konnten bei der 100-fachen Verdünnung detektiert werden. Die 100-fache Verdünnung der 10⁹ Gruppe resultierte in keiner signifikanten Reduktion der Luciferase-Expression, wohingegen es bei derselben Verdünnung in der 10¹⁰ Gruppe zu einer Reduktion der Expression auf 65% der unbehandelten Kontrolle kam. Verglichen mit der 10¹¹ Gruppe, bei der es zu einer Absenkung der Luciferase-Expression auf 2% der Negativkontolle kam, konnte die Bildung der NABs durch Dosisreduktion vermindert werden.

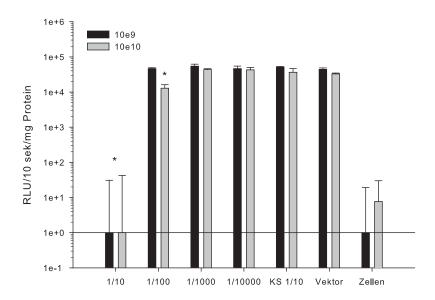


Abbildung 5.8: Entwicklung von NAB bei reduzierter Dosis. Zwei Gruppen von Balb/c-Mäusen (n=5) wurden mit 10^{10} oder 10^9 AAV-Luc Vektoren behandelt. Bei beiden Gruppen wurde am Ende des Versuchs Serum gewonnen. Aus den gepoolten Serumproben wurde die Entwicklung von NABs verglichen, indem die Proben seriell 10-fach verdünnt und mit dem AAV-Luc Vektor inkubiert wurden. Als Kontrollen wurden Kontrollseren (KS) unbehandelter Mäuse, der Vektor alleine und Zellen alleine verwendet. Die Luciferase-Messung erfolgte 72 h nach Transduktion. Bei der 10-fachen Verdünnung kam es in beiden Gruppen zu einer kompletten Neutralisierung der Vektoren, bei der 100-fachen Verdünnung sank die Expression in der 10^{10} Gruppe auf 65% der unbehandelten Serumkontrolle. In der 10^9 Gruppe kam es dagagen zu keiner Reduktion bei dieser Verdünnung. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Signifikante Unterschiede zum KS sind mit einem * gekennzeichnet.

5.3.3 Biodistribution

Die Biodistribution wurde aufgrund der kaum detektierbaren Luciferase-Expression und der geringen NAB-Titer in der 10⁹-Gruppe ausschließlich in der 10¹⁰-Gruppe durchgeführt. Die Mäuse wurden 230 Tage nach der Vektor-Applikation euthanasiert, die inneren Organe wurden entnommen und zur DNA-Isolierung verwendet. Die Vektor-DNA wurde mittels Real-Time PCR aus der isolierten Gesamt-DNA quantifiziert (Abbildung 5.9). Die höchsten Vektor-DNA Mengen konnten wie in der 10¹¹-Gruppe in der Lunge detektiert werden. In den Gonaden konnte wie auch bei der 10¹¹-Gruppe keine Vektor-DNA nachgewiesen werden, allerdings war der Vektor in allen anderen getesteten Organen nachzuweisen.

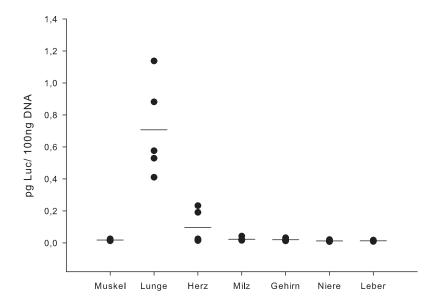


Abbildung 5.9: Biodistribution bei Mäusen mit 10¹⁰ GC/Maus. Nach Isolierung der Gesamt-DNA aus jedem Organ wurde die Vektor-DNA bezogen auf die Gesamt-DNA mittels Real-Time PCR bestimmt. Bei allen Tieren lag die höchste Vektor-DNA Menge in der Lunge vor. Es sind sowohl die einzelnen Tiere, als auch der Mittelwert dargestellt.

Der direkte Vergleich zwischen der 10¹¹- und der 10¹⁰-Gruppe ist nicht möglich, da die Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Applikation getötet wurden.

5.4 Einfluss des Mausstammes auf die Expression

Die Ergebnisse aus den Dosisstudien haben gezeigt, dass es mittels Dosisreduktion möglich ist, die Entwicklung von NAB zu reduzieren. Gleichzeitig war es aber nicht möglich die Biodistribution positiv zu beeinflussen und die Expression nahm um ein Vielfaches ab. Die folgenden Versuche wurden mit einer Dosis von 10¹¹ Vektoren pro Tier durchgeführt, da eine hohe Expression des Transgens wichtig ist.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass der Gentransfer in die Lunge und somit auch die Genexpression vom verwendeten Mausstamm abhängt (Dames et al., 2007; Liu et al., 2002). Deshalb wurden zum Vergleich SPB^{-/-}-

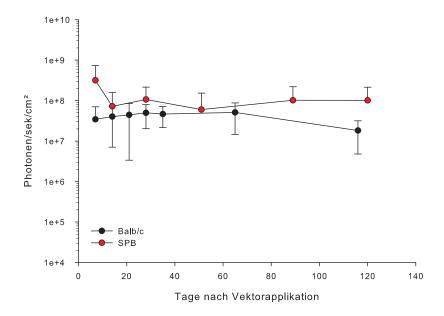


Abbildung 5.10: Langzeit-Expression in Balb/c- und SPB-/--Mäusen. Zwei Gruppen von Mäusen (n=5) wurden jeweils mit 10^{11} AAV-Luc Vektoren behandelt. Eine Gruppe bestand aus weiblichen Balb/c-Mäusen, die andere setzte sich aus weiblichen SPB-/--Mäusen zusammen. Durch Biolumineszenz-Messungen an unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Applikation wurde die Luciferase-Expression im IVIS 100 Imaging System gemessen und das Signal über der Brustgegend quantifiziert. Es waren keine Unterschiede in der Expression zwischen den beiden Mausstämmen zu detektieren. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

Mäuse verwendet, die in der Literatur gut beschrieben sind und die einen FVB/n-Hintergrund haben, ein Mausstamm, der meist bei Transgenen Tieren verwendet wird (Clark et al., 1995; Melton et al., 2003; Ikegami et al., 2005).

In den folgenden Versuchen, wurden weibliche SPB-/--Mäuse i.t. mit 10¹¹ AAV-Luc Vektoren behandelt. Zum Vergleich der Expression wurden sie an unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Vektor-Applikation im IVIS 100 Imaging System vermessen. Die quantifizierten Luciferase-Signale über dem Brustbereich wurden mit denen der Balb/c-Mäuse verglichen (Abbildung 5.10). Die Biolumineszenz-Aufnahmen der SPB-/--Mäuse zeigten nach einer Woche die Expression des Transgens. Die Expression blieb über den gesamten Messzeitraum konstant. Im Vergleich zu den Balb/c-Mäusen war die Expression in den SPB-/--Mäusen zwar tendenziell etwas höher, insgesamt aber waren die Unterschiede nicht signifikant.

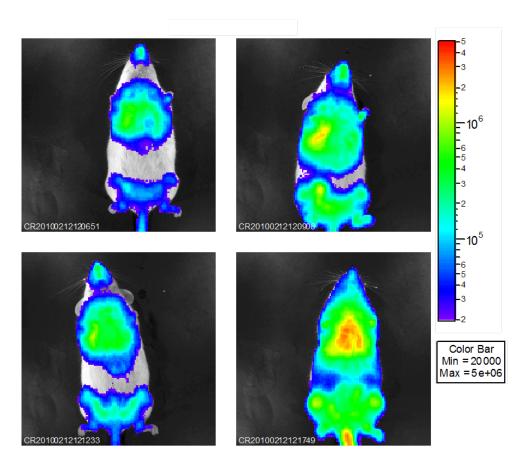
5.5 Einfluss von Geschlecht und Immunsuppression

Nachdem der Einfluss des Mausstammes zu keinen Unterschieden in der Genexpression geführt hatte, wurden nun zwei weitere Einflussfaktoren untersucht. Zum einen wurde der Einfluss des Geschlechts untersucht. Zum anderen sollte herausgefunden werden, ob eine Immunsuppression mit Dexamethason einen Effekt auf die Genexpression und auf die Entwicklung neutralisierender Antikörper hat. Zu diesem Zweck wurden 4 Gruppen (n=5) von SPB^{-/-}-Mäusen gebildet, die jeweils mit 10¹¹ AAV-Luc Vektoren behandelt wurden. Dabei bestanden 2 Gruppen aus männlichen und 2 Gruppen aus weiblichen Mäusen, wovon jeweils eine Gruppe mit Dexamethason behandelt wurde. Bei diesen Gruppen wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten sowohl die Luciferase-Expression im IVIS 100 Imaging System bestimmt als auch Blut zur Serumgewinnung abgenommen.

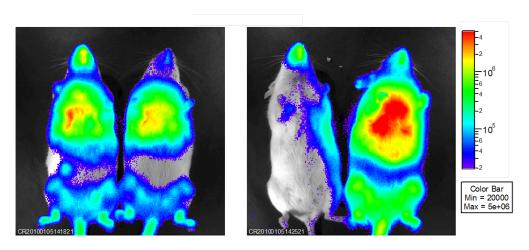
5.5.1 Langzeit-Expression

Die Biolumineszenz-Messungen führten bei allen untersuchten Gruppen bereits 7 Tage nach Vektor-Applikation zu einem messbaren Luciferase-Signal, das über den gesamten Messzeitraum konstant blieb. In den Abbildungen 5.11 und 5.12 sind die Biolumineszenzaufnahmen von Tag 14 nach der Vektor-Applikation dargestellt. Das Luciferase-Signal ist, ähnlich wie bei den Balb/c-Mäusen, in beiden Geschlechtern bei mehreren Mäusen im gesamten Körper detektierbar. Die höchste Intensität kann aber bei allen Tieren in der Brustgegend gemessen werden. Es fällt auf, dass bei je einer weiblichen und einer männlichen Maus das Signal nur sehr schwach ist im Vergleich zu den anderen Mäusen derselben Versuchsgruppe.

Der optische Vergleich der Signalstärke in der Brustgegend gibt den Eindruck einer höheren Expression bei den weiblichen Mäusen. Die rote Farbe bei diesen Mäusen zeigt einen hohe Signalintensität in diesem Bereich, welche auf eine hohe lokale Expression der Luciferase schließen lässt. Dagegen ist die Brustgegend

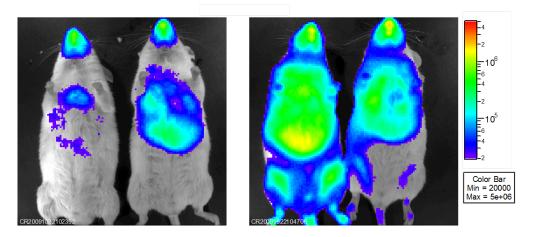


(a) ohne Dexamethason

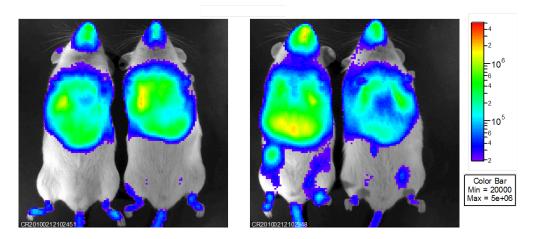


(b) mit Dexamethason

Abbildung 5.11: Biolumineszenz-Messung bei weiblichen SPB-/--Mäusen. Weibliche SPB-/--Mäuse wurden jeweils mit 10^{11} AAV-Luc Vektoren behandelt. Dafür wurden die Vektoren auf ein Volumen von $100\,\mu l$ verdünnt. Das Immunsystem wurde zuvor entweder nicht supprimiert (a) oder es wurde mittels Dexamethason supprimiert (b). Es lies sich kein Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen erkennen.



(a) männliche Mäuse ohne Dexamethason

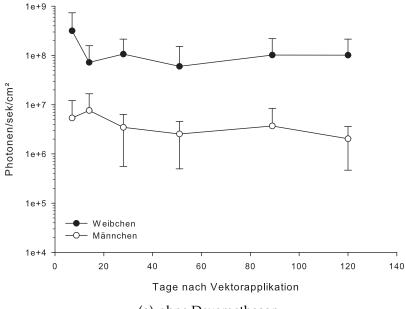


(b) männliche Mäuse mit Dexamethason

Abbildung 5.12: Biolumineszenz-Messung bei männlichen SPB-/--Mäusen. Männliche SPB-/--Mäuse wurden jeweils mit 10^{11} AAV-Luc Vektoren behandelt. Dafür wurden die Vektoren auf ein Volumen von $100\,\mu$ l verdünnt. Das Immunsystem wurde zuvor entweder nicht supprimiert (a) oder es wurde mittels Dexamethason supprimiert (b). Es lies sich kein Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen erkennen.

bei den männlichen Mäusen nur grün eingefärbt und zeigt damit eine geringere Signalstärke. Dies spricht für eine geringere lokale Expression.

Die Signale im Brustbereich wurden quantifiziert, um die Expression in den verschiedenen Gruppen besser vergleichen zu können. In Abbildung 5.13 ist der Einfluss des Geschlechtes auf die Langzeit-Expression dargestellt. Es zeigte sich in den beiden Behandlungsgruppen ohne Dexamathason (5.13(a)) eine um den Faktor 10 höhere Expression bei den weiblichen Mäusen im Vergleich zu den





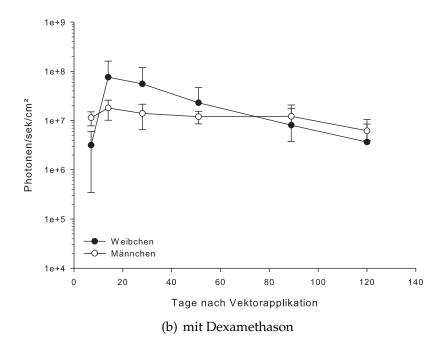
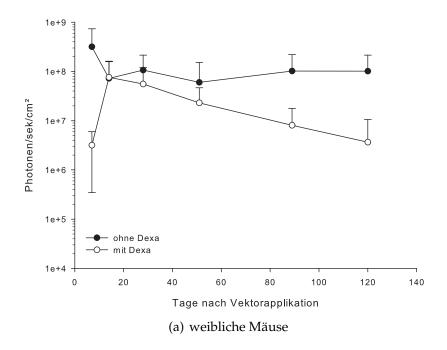


Abbildung 5.13: Einfluss des Geschlechts auf Langzeit-Expression in SPB^{-/-}-Mäusen mit 10^{11} GC/Maus. Vier Gruppen von SPB^{-/-}-Mäusen (n=5) wurden i.t. mit jeweils 10^{11} AAV-Luc Vektoren behandelt. Dabei bestanden 2 Gruppen aus männlichen und 2 Gruppen aus weiblichen Mäusen, wovon jeweils eine Gruppe mit Dexamethason behandelt wurde. Durch Biolumineszenz-Messungen an unterschiedlichen Zeitpunkten nach Applikation wurde die Expression im IVIS 100 Imaging System gemessen und das Signal über der Brustgegend quantifiziert. Die Expression bei den weiblichen Mäusen in (a) ist tendenziell höher als bei den männlichen Mäusen, die Unterschiede sind aber zu keinem Zeitpunkt signifikant. In (b) unterscheiden sich die quantifizierten Luciferase-Signale kaum zwischen den beiden Geschlechtern. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.



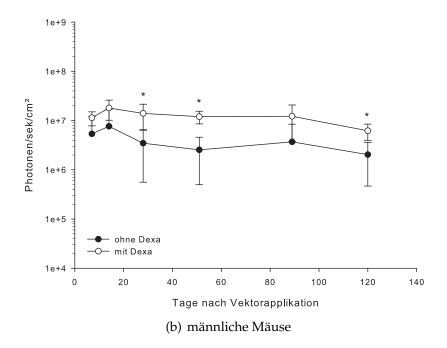


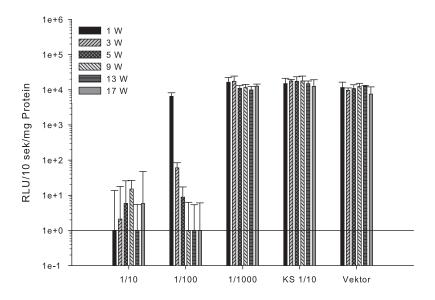
Abbildung 5.14: Einfluss von Immunsuppression auf Langzeit-Expression in SPB^{-/-}-Mäusen mit 10^{11} GC/Maus. Vier Gruppen von SPB^{-/-}-Mäusen (n=5) wurden i.t. mit jeweils 10^{11} AAV-Luc Vektoren behandelt. Dabei bestanden 2 Gruppen aus männlichen und 2 Gruppen aus weiblichen Mäusen, wovon jeweils eine Gruppe mit Dexamethason behandelt wurde. Durch Biolumineszenz-Messungen an unterschiedlichen Zeitpunkten nach Applikation wurde die Expression im IVIS 100 Imaging System gemessen und das Signal über der Brustgegend quantifiziert. Bei den weiblichen Mäusen (a) kam es durch die Dexamethasongabe tendenziell zu einer Verschlechterung der Expression. Bei den männlichen Mäusen (b) kam es dagegen zu einer Erhöhung der Expression, die zu den Zeitpunkten (Tag 28, 51 und 120) signifikant war (p<0,05). Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet.

männlichen Mäusen. Dies bestätigt den optischen Eindruck. Die Unterschiede waren aber aufgrund der breiten Streuung zu keinem Zeitpunkt signifikant. In Abbildung 5.13(b) wurde die Expression zwischen den beiden mit Dexamethason behandelten Gruppen verglichen. In diesen Gruppen war kein Unterschied zwischen den männlichen und den weiblichen Mäusen erkennbar. Die Expression blieb in beiden Gruppen über den gesamten Messzeitraum vergleichbar.

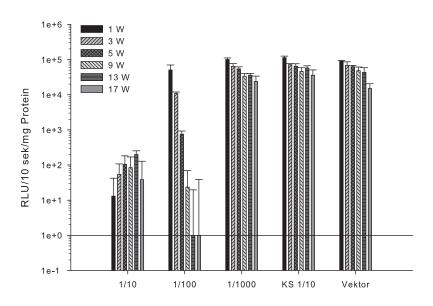
Zur Bestimmung des Effekts der Immunsuppression auf die Transgen-Expression sind in Abbildung 5.14 die quantifizierten Luciferase-Signale innerhalb des gleichen Geschlechts mit und ohne Dexamethasonbehandlung dargestellt. Bei den männlichen Mäusen (Abbildung 5.14 (b)) hatte die Dexamethasonbehandlung einen positiven Effekt auf die Genexpression, da die Genexpression in den mit Dexamethason behandelten Tieren tendenziell höher war im Vergleich zur unbehandelten Gruppe, wobei die Unterschiede zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 28, 51 und 120) signifikant waren (p<0,05). Im Gegensatz dazu kam es bei den weiblichen Mäusen (Abbildung 5.14 (a)) zu einer tendenziell schlechteren Transgenexpression, wenn sie mit Dexamethason behandelt wurden. Die Darstellung der beiden Expressionskurven lässt eindeutig den Trend erkennen, dass die Expression in der mit Dexamethason behandelten Gruppe kontinuierlich abnimmt, auch wenn dieser Trend nicht signifikant ist. Die weiblichen Mäuse, die dagegen nicht mit Dexamethason behandelt wurden, wiesen eine konstante und stabile Genexpression auf.

5.5.2 Entwicklung neutralisierender Antikörper

Die Entwicklung von NAB konnte durch Serumgewinnung zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation genau verfolgt werden. Die Serumproben der einzelnen Gruppen und Messzeitpunkte wurden gepoolt. Die Durchführung der Versuche verlief analog zu den zuvor durchgeführten Assays auf neutralisierende Antikörper. In den Abbildungen 5.15 und 5.16 sind alle Ergebnisse der einzelnen Gruppen dargestellt. Die 10-fache Verdünnung aller Proben führte zu jedem Zeitpunkt zu einer kompletten Inhibierung der Luciferase-Expression. Unterschiede zwischen den verschiedenen Messzeitpunkten ergaben sich ledig-

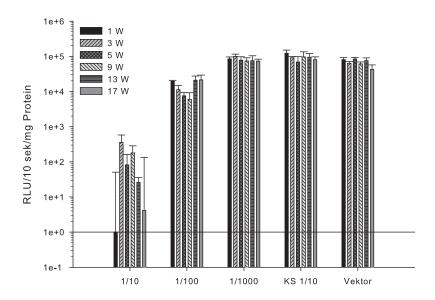


(a) weibliche Mäuse ohne Dexamethason

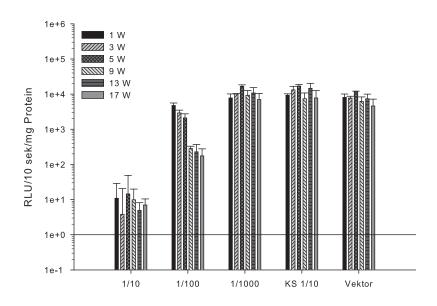


(b) männliche Mäuse ohne Dexamethason

Abbildung 5.15: Entwicklung von NAB bei verschiedenen Geschlechtern ohne Immunsuppression. Zwei Gruppen von SPB $^{-/-}$ -Mäusen (n=5) wurden jeweils mit 10^{11} AAV-Luc Vektoren behandelt. An verschiedenen Zeitpunkten nach der Applikation wurde Serum gewonnen. Zum Vergleich der NAB-Entwicklung wurden die gepoolten Proben in mehreren Schritten 10-fach verdünnt und mit dem AAV-Luc Vektor inkubiert. Als Kontrollen wurden Kontrollserum (KS) von unbehandelten Mäusen und der Vektor alleine verwendet. Die Luciferase-Messung erfolgte 72 h nach Transduktion. Bei der 10-fachen Verdünnung kam es schon nach einer Woche (W) in beiden Gruppen zu einer kompletten Neutralisierung der Vektoren, bei der 100-fachen Verdünnung sank die Expression mit der Zeit. Nach 9 bzw. 13 Wochen wurden die Vektoren auch von den 100-fach verdünnten Seren komplett neutralisiert. Es war kein Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Mäusen zu messen. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

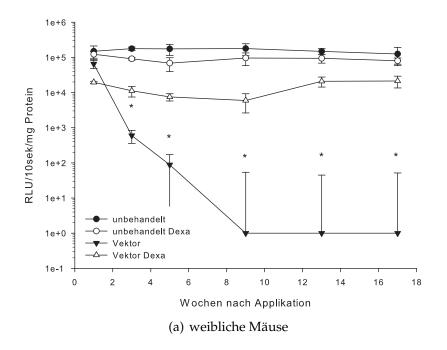


(a) weibliche Mäuse mit Dexamethason



(b) männliche Mäuse mit Dexamethason

Abbildung 5.16: Entwicklung von NAB bei verschiedenen Geschlechtern mit Immunsuppression. Zwei Gruppen von SPB^{-/-}-Mäusen (n=5) wurden jeweils mit 10^{11} AAV-Luc Vektoren behandelt, wobei das Immunsystem mittels Dexamethason supprimiert wurde. An verschiedenen Zeitpunkten nach der Applikation wurde Serum gewonnen. Zum Vergleich der NAB-Entwicklung wurden die gepoolten Proben in mehreren Schritten 10-fach verdünnt und mit dem AAV-Luc Vektor inkubiert. Als Kontrollen wurden Kontrollserum (KS) von unbehandelten Mäusen und der Vektor alleine verwendet. Die Luciferase-Messung erfolgte 72 h nach Transduktion. Bei der 10-fachen Verdünnung kam es schon nach einer Woche (W) in beiden Gruppen zu einer kompletten Neutralisierung der Vektoren, bei der 100-fachen Verdünnung sank die Expression mit der Zeit. Es war kein Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Mäusen zu messen. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.



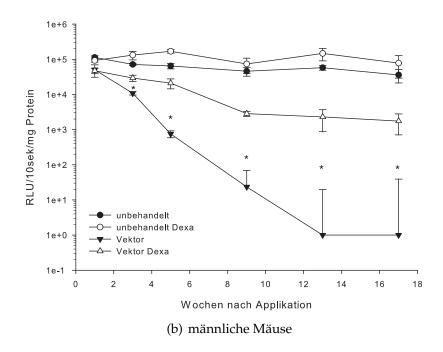


Abbildung 5.17: Abhängigkeit der NAB Entwicklung von Immunsuppression mit Dexamethason. Die Luciferase-Signale der 100-fach verdünnten Seren und der dazugehörigen 10-fach verdünnten Seren der unbehandelten Kontrollgruppen mit und ohne Immunsuppression mit Dexamethason sind in Abhängigkeit zur Zeit dargestellt. Sowohl bei den weiblichen (a) als auch bei den männlichen (b) Mäusen kam es durch die Immunsuppression mit Dexamethason zu einer signifikant reduzierten Bildung von NAB (p<0,05). Signifikante Unterschiede zwischen der Expression mit und ohne Dexamethasonbehandlung sind mit einem * gekennzeichnet. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

lich bei der 100-fachen Verdünnung der Proben, da bei den 1000-fach verdünnten Proben kein Unterschied zur unbehandelten Serumkontrolle festgestellt werden konnte. Die Entwicklung neutralisierender Antikörper verlief bei männlichen und weiblichen Tieren analog. Es kam in beiden Gruppen bis zu 9 bzw. 13 Wochen nach Vektor-Applikation zu einer weiteren Zunahme der neutralisierenden Antikörper. Danach nahm der Titer nicht mehr weiter zu. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Luciferase-Expression in der 100-fachen Verdünnung der Seren komplett inhibiert.

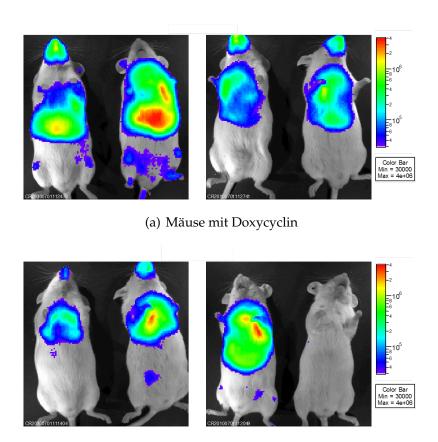
Zur Darstellung des Effekts, den Dexamethason auf die Entwicklung neutralisierender Antikörper hat, wurden die Luciferase-Signale der 100-fachen Verdünnung und der unbehandelten Kontrolle gegen die Zeit aufgetragen. Als Kontrollgruppe für die Mäuse die nur mit dem Vektor behandelt wurden, dienten unbehandelte Mäuse. Eine weitere Kontrollgruppe stellten unbehandelte, aber mit Dexamethason immunsupprimierte Mäuse dar. In der Abbildung 5.17 wurden die Luciferase-Signale auf ein Niveau angepasst, da es bei den unterschiedlichen Gruppen zu Variationen in der Intensität der unbehandelten Kontrolle kam. In Abbildung 5.17 (a) wird die Entwicklung der NAB bei den weiblichen Mäusen mit und ohne Dexamethasonbehandlung dargestellt. Bei den mit Dexamethason behandelten Tieren kam es zu einer deutlich verringerten Bildung von NAB, auch wenn die komplette Inhibierung der NAB-Produktion nicht möglich war. Ein ähnliches Bild ergab sich bei den männlichen Versuchstieren (Abbildung 5.17(b)). Die Bildung von NAB konnte bis zu einem bestimmten Level verhindert, wenn auch nicht komplett blockiert werden. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die Immunsuppression einen positiven Effekt auf die Entwicklung der NAB hat, was bei einer wiederholten Applikation des Vektors von Vorteil ist.

5.6 Applikation der AAV-Luc Vektoren in entzündeten Lungen von konditionellen SPB-Knockout-Mäusen

In diesem Abschnitt sollte analysiert werden, ob der Entzündungsstatus der Lunge einen Einfluss auf Gentransfer und -expression der Tiere hat. Dazu wurden SPB^{-/-}-Mäuse verwendet, da bei diesen Mäusen sehr einfach eine physiologische Entzündung in der Lunge hervorgerufen werden kann, indem man ihnen kein mit Doxycyclin versetztes Wasser, sondern normales Wasser gibt. Diese Mäuse sind in der Literatur beschrieben (Clark et al., 1995; Melton et al., 2003; Ikegami et al., 2005). Sie exprimieren das humane SPB unter der Kontrolle des CCSP Promotors. Dieser wird nur bei Anwesenheit von Doxycyclin abgelesen, welches den Tieren über das Trinkwasser zugeführt werden kann. Durch Absetzen des Doxycyclinwassers entwickeln die Mäuse innerhalb kürzester Zeit eine starke Entzündung in der Lunge, die mit erhöhten IL-6, IL-1β und den Macrophagen-Entzündungsprotein-2 Werten einhergeht und innerhalb von vier bis fünf Tagen zum Tod durch Atemversagen führt (Ikegami et al., 2005). Die erneute Doxycyclingabe kann durch die wiederaufgenommene Expression von SPB die Entzündung hemmen.

Zur Untersuchung wurden daher drei verschiedene Gruppen (n=4) gebildet. Bei der ersten Gruppe wurde das Doxycyclin für zwei Tage und bei der zweiten für einen Tag abgesetzt. Als Kontrolle wurde am Versuchstag eine weitere Gruppe, bei der das Doxycyclin zu keinem Zeitpunkt abgesetzt wurde, ebenfalls i.t. mit 10¹¹ AAV-Luc Vektoren behandelt. In der Gruppe, die zwei Tag ohne Doxycyclin war, überlebte keine Maus die Applikation der Vektoren. Alle Tier starben entweder schon in der Narkose oder in den folgenden 24 Stunden nach Applikation. Von dieser Gruppe konnte die Expression somit nicht bestimmt werden.

Die Expression in den anderen beiden Gruppen wurde über vier Wochen verfolgt, da schon in den vorherigen Versuchen gezeigt werden konnte, dass die Ex-



(b) Mäuse 1 Tag ohne Doxycyclin

Abbildung 5.18: Abhängigkeit der Genexpression vom Entzündungsstatus der Mauslunge. Zwei Gruppen von SPB-/--Mäusen (n=4) wurden i.t. mit jeweils 10¹¹ AAV-Luc Vektoren behandelt. Eine Gruppe war einen Tag ohne Doxycyclin, die andere Gruppe bekam immer Doxycyclin. An verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation wurde das Substrat Luciferin i.p. injiziert und die Biolumineszenz mittels IVIS 100 Imaging System bestimmt. Außer bei einer Maus konnte in beiden Gruppen das Luciferase-Signal im Brustbereich der Mäuse detektiert werden.

zu den zuvor durchgeführten Versuchen wurde einmal pro Woche die Luciferase-Aktivität mittels Biolumineszenz-Messungen bestimmt und das erhaltene Signal im Brustbereich quantifiziert. In Abbildung 5.18 sind die Biolumineszenz-Aufnahmen von Tag 14 dargestellt. Das Luciferase-Signal ist bei nahezu allen Mäusen im Brust- und Leberbereich deutlich zu erkennen. In der Gruppe, die einen Tag ohne Doxycyclin war, kam es bei einer Maus zu keinem Zeitpunkt zu einer messbaren Luciferase-Expression. In Abbildung 5.19 kann das quantifizierte Signal zu den verschiedenen Messzeitpunkten verfolgt werden, wobei das quantifizierte Signal der Maus die keine Expression zeigt nicht berücksichtigt ist.

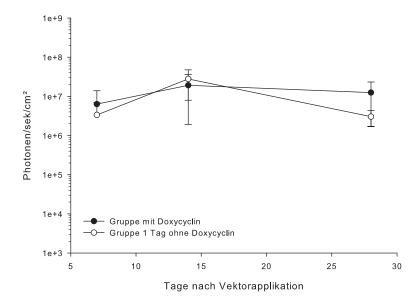


Abbildung 5.19: Langzeit-Expression in SPB-/--Mäusen mit und ohne Doxycyclin. Zwei Gruppen von SPB-/--Mäusen (n=4) wurden i.t. mit jeweils 10^{11} AAV-Luc Vektoren behandelt. Eine Gruppe war einen Tag ohne Doxycyclin, die andere Gruppe bekam immer Doxycyclin. An verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation wurde die Biolumineszenz mittels IVIS 100 Imaging System bestimmt und das Signal im Brustbereich quantifiziert. Es kam zu keinem Zeitpunkt zu einem signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

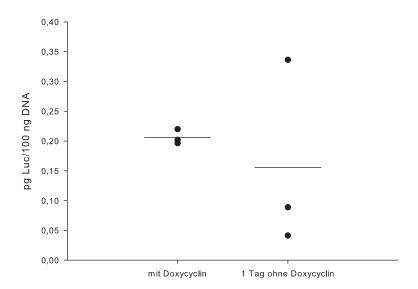


Abbildung 5.20: Quantifizierung der AAV-Luc DNA in Mauslungen. Zwei Gruppen von SPB-/-Mäusen (n=4) wurden i.t. mit jeweils 10¹¹ AAV-Luc Vektoren behandelt. Eine Gruppe war einen Tag ohne Doxycyclin, die andere Gruppe bekam immer Doxycyclin. An Tag 28 wurden die Lungen der Mäuse entnommen und nach DNA-Isolation mittels Real-Time PCR die in der Lunge applizierte Menge AAV-Luc bestimmt. Es kam zu keinem signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Es sind jeweils die einzelnen Mäuse, sowie der Mittelwert dargestellt.

Es konnte zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Das Entzündungsgeschehen in der Lunge hatte somit keinen Einfluss auf die resultierende Luciferase-Expression.

Nach 28 Tagen wurden die narkotisierten Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Lungen entnommen. Nach Isolation der Gesamt-DNA aus jeder Lunge wurde mittels Real-Time PCR die in der Lunge applizierte AAV-Luc DNA bestimmt (Abbildung 5.20). Es konnte in beiden Gruppen die gleiche DNA-Menge in den Lungen detektiert werden. Bei der Maus, die zu keinem Zeitpunkt ein Signal im IVIS 100 Imaging System gezeigt hatte, konnte auch keine AAV-Luc DNA nachgewiesen werden (nicht mit in der Abbildung dargestellt). Die Entzündung der Lunge hatte damit keinen Einfluss auf den Gentransfer.

5.7 Zusammenfassende Betrachtung und Diskussion der Ergebnisse

In dieser Studie wurde ein AAV2/9-Vektor für den pulmonalen Gentransfer untersucht. Nach Optimierung des AAV-Vektors wurde zuerst der Einfluss der Applikationsroute auf die Expression, die Entwicklung neutralisierender Antikörper und die Biodistribution untersucht. Dem schloss sich eine Untersuchung der Dosisreduktion an. Weitere Faktoren, die die oben genannten Parameter beeinflussen können, sind der Mausstamm, das Geschlecht der Versuchstiere und das Vorliegen einer Entzündung in der Lunge, weshalb diese Einflussfaktoren analysiert wurden. Zuletzt wurde der Einfluss der Immunsuppression mit Dexamethason auf Genexpression und Entwicklung neutralisierender Antikörper gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass die Applikationsroute keinen Einfluss auf die Expression, die Entwicklung von NAB und die Biodistribution hat. Durch Dosisreduktion kam es zu keiner Einschränkung der Biodistribution, wohingegen die Entwicklung von NAB und die Expression abnahmen. In weiteren Versuchen wurde der Einfluss des Mausstammes und einer vorherrschenden Entzündung in der Lunge auf die Expression untersucht, wobei keine signifikanten Unterschiede gemessen werden konnten. Durch Immunsuppression mit Dexamethason war es möglich die Entwicklung von NAB zu senken, eine komplette Blockade war aber nicht möglich.

Bevor der AAV-Vektor produziert wurde, wurde das Vektor-Rückgrad optimiert. Zu diesem Zweck wurden zwei Vektoren untersucht, die sich lediglich darin unterschieden, dass ein Vektor das komplette *Chicken Beta-Aktin-Intron* und der andere nur einen Teil dieses Introns enthält. In beiden Vektoren wurde Luciferase als Reportergen einkloniert, um zu vergleichen, ob das ganze oder nur ein Teil des Introns notwendig ist, um eine effektive Genexpression zu erhalten. Es konnte in der *in vitro* Untersuchung gezeigt werden, dass es bei Verwendung des kompletten Introns zu einer signifikant besseren Genexpression kommt. Dieses Ergebnis bestätigt eine Studie in der gezeigt werden konnte, dass Introns einen positiven Einfluss auf die Genexpression haben (Huang and Gorman, 1990). Au-

ßerdem konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass die hier verwendete Expressionskassette aus CMV Enhancer, *Chicken Beta-Actin-Promotor* und *Chicken Beta-Actin-Intron* zu einer sehr effizienten Genexpression im Vergleich zu anderen Promotoren führt (Xu et al., 2001).

Die in vivo-Studien mit dem optimierten AAV2/9-Vektor zeigten in zwei verschiedenen Mausstämmen die stabile Expression des Transgens über den gesamten Versuchszeitraum (450 bzw. 120 Tage nach Applikation), die nicht durch die Applikationsroute beeinflusst wurde. Als erster Mausstamm wurden Balb/c-Mäuse untersucht. Für diese Mäuse konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass unterschiedliche Transgene eine höhere Immunogenität in diesem Mausstamm besitzen (Gavin et al., 1993; Gambotto et al., 2000; Limberis et al., 2009a). In der ersten Studie von Limberis et al (Limberis and Wilson, 2006), die den erfolgreichen Einsatz von AAV2/9-Vektoren für den pulmonalen Gentransfer demonstrieren konnte, wurden C57BL/6-Mäuse eingesetzt. Diese wurden mit AAV Vektoren behandelt, die für die Transgene Alpha-1-Antitrypsin oder Beta-Galactosidase kodierten, wobei für beide Transgene eine Immuntoleranz (Flotte and Laube, 2001), beziehungsweise eine verminderte Immunreaktion (Gavin et al., 1993) in dem verwendeten Mausstamm besteht. Als zweiter Mausstamm wurden konditionelle SPB-/--Mäuse mit dem Vektor behandelt. Dieses Mausmodell hat einen FVB/n-Hintergrund, welcher häufig zur Generierung von transgenen Mäusen eingesetzt wird. Somit können die hier gewonnenen Ergebnisse gut auf andere transgene Mäuse übertragen werden. In einer von Dames et al. durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass der pulmonale Gentransfer vom Mausstamm abhängt, wenn nicht-virale PEI/pDNA-Partikel vernebelt wurden (Dames et al., 2007). Die Verwendung von AAV2/9-Vektoren resultierte dagegen nicht in einem signifikanten Unterschied zwischen den beiden Mausstämmen. Tendenziell kam es aber in den SPB^{-/-}-Mäusen zu eine etwas höheren Luciferase-Expression. Diese Untersuchung belegt, dass AAV2/9-Vektoren zur Langzeit-Expression eines Transgens in verschiedenen Mausstämmen führen, welche keinerlei Immuntoleranz gegenüber dem verwendeten Transgen aufweisen.

Es gibt verschiedene Untersuchungen, die einen Einfluss des Geschlechts auf die Transgenexpression zeigen (Davidoff et al., 2003; Paneda et al., 2009). Deshalb wurde eine Vergleichsstudie mit männlichen und weiblichen SPB-/--Mäusen durchgeführt, die zeigen sollte, ob es bei diesem Vektor zu geschlechtsspezifischen Unterschieden kommt. Die Mäuse beider Geschlechter wurden mit jeweils 10¹¹ GC/Maus behandelt und die Luciferase-Expression über die Zeit verfolgt. Bei den weiblichen Mäusen kam es tendenziell zu einer höheren Transgen-Expression. Die Unterschiede waren aber nicht signifikant. Nach Quantifizierung der Vektor-DNA in den Lungen der Mäuse konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern festgestellt werden. Es kann somit vermutet werden, dass die erhöhte Genexpression auf die erhöhte Expression des Transgens bei den weiblichen Mäusen zurückzuführen ist.

Die klinische Anwendung eines Vektors setzt die Wirksamkeit des Vektors in der bereits erkrankten Lunge voraus. In einer Studie von Virella-Lowell et al. konnte für einen AAV2-Vektor gezeigt werden, dass es nach Inkubation mit der Broncho-Alveolaren-Lavage von CF-Patienten zu einer kompletten Inhibierung der Genexpression kommt (Virella-Lowell et al., 2000). Daher wurde der AAV2/9-Vektor in einem passenden Tier-Modell untersucht. Bei den konditionellen SPB^{-/-}-Knockout-Mäusen ist es durch den Entzug von Doxycyclin aus dem Trinkwasser möglich, innerhalb von kürzester Zeit eine Entzündung in der Lunge hervorzurufen, die innerhalb von vier bis fünf Tagen zum Tod führt (Clark et al., 1995). Daher bietet sich dieser Mausstamm an, um den Effekt einer pulmonalen Entzündung auf die Transgen-Expression zu untersuchen. In einem Versuch wurde zwei Gruppen von Mäusen über verschiedene Zeitspannen das Doxycyclin entzogen, bevor sie mit dem AAV2/9-Vektor behandelt wurden. Die Mäuse, die zwei Tage ohne Doxycyclin waren, überlebten die Behandlung mit den Vektoren nicht. Bei ihnen war die Entzündung wahrscheinlich schon so weit fortgeschritten, dass es zusammen mit der Flüssigkeit, die bei der Vektor-Applikation in die Lunge gelangte, zum Atemversagen kam. Die Mäuse, die nur einen Tag ohne Doxycyclin waren, haben die Behandlung gut überstanden. Im Vergleich zu den Mäusen, die die ganze Zeit Doxycyclin bekommen haben, waren keine Unterschiede in der Genexpression zu sehen. Im Gegensatz zu dem von Variella-Lowell et al. verwendeten AAV2-Vektor scheint sich der AAV2/9-Vektor auch zum Gentransfer in die entzündete Lunge zu eignen.

Es ist bekannt, dass die Immunogenität eines Transgen-Produktes durch Faktoren wie den genetischen Hintergrund des Versuchstieres oder die verwendete Vektormenge beeinflusst werden kann. Dabei sind vor allem vektor- bzw. transgenspezifische T-Zellen an der Inaktivierung eines Transgens beteiligt (Thomas et al., 2003). Die stabile Expression über einen Zeitraum von mehr als einem Jahr in beiden Mausstämmen lässt auf eine nicht vorhandene oder nur sehr geringe T-Zell Antwort schließen, die durch die Applikation von AAV2/9-Vektoren in die Lunge ausgelöst wird.

Neben der T-Zell-vermittelten Immunantwort spielt aber auch die von den B-Zellen vermittelte Entwicklung von NAB eine wichtige Rolle, vor allem im Bezug auf die wiederholte Applikation von AAV (Flotte et al., 2007; Daya and Berns, 2008). Die Anwesenheit von NAB bei einer zweiten Applikation verringert die Effizienz um ein Vielfaches, da die NAB den applizierten Vektor noch vor Transduktion der Zielzellen neutralisieren und damit inaktivieren. Bei einer dritten Applikation kommt es zu nahezu keiner weiteren Transduktion, da alle Vektoren zuvor neutralisiert worden sind (Sumner-Jones et al., 2007). Die Verwendung von AAV2/9 resultierte in beiden Mausstämmen in der Entwicklung von NAB. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Titer im Verlauf der Zeit weiter zunehmen, bis sie nach ca. 13 Wochen ihren Höchststand erreicht haben. Bei der NAB-Entwicklung konnte kein Unterschied zwischen den beiden Geschlechtern festgestellt werden. Die Dosisreduktion um das 10- bzw. 100-fache führte zu einer Senkung der NAB-Titer. Allerdings war die mit der reduzierten Dosis korrelierende Reduktion der Genexpression nicht tolerabel. Die Entwicklung der NAB sollte daher von Beginn an blockiert werden. In Versuchen bei denen das Immunsystem der Versuchstiere vor der Behandlung supprimiert wurde, konnte die Entwicklung neutralisierender Antikörper inhibiert werden (Manning et al., 1998; Halbert et al., 1998). Die dabei eingesetzten Immunsuppresiva sind allerdings mit schweren Nebenwirkungen verbunden. In anderen Studien wurde postuliert, dass es zu einer erfolgreichen zweiten Applikation kommen kann, wenn die beiden Applikationen mindestens 28 Wochen auseinander liegen (Auricchio et al., 2002; Limberis and Wilson, 2006). Für den hier untersuchten Vektor erscheint dies nicht sehr wahrscheinlich, da die NAB auch nach über einem Jahr noch in sehr hoher Konzentration vorhanden sind. Diese Vermutung wird auch durch Daten einer anderen Studie belegt, bei der es 36 Wochen nach der ersten Applikation noch immer zu einer verminderten Transduktion durch die Anwesenheit von NAB kam (Sumner-Jones et al., 2007).

Die wiederholte Applikation des AAV2/9-Vektors setzt die Inhibierung der NAB-Entwicklung voraus. Dazu sollte eine auch in der Klinik anwendbare Methode verwendet werden. Dexamethason ist ein in der Klinik weit verbreitetes Cortison-Derivat, das bereits zur Immunsuppression eingesetzt wird. Es wurde schon erfolgreich zur Immunsuppression bei Mäusen eingesetzt, die mit adenoviralen Vektoren behandelt wurden. Es führte in diesem Versuch zu einer Hemmung der Immunantwort und verlängerte damit die Expression des applizierten Transgens (Kumahara et al., 2005). In dem hier durchgeführten Versuch wurden männliche und weiblichen Mäuse über vier Wochen mit Dexamethason behandelt, wobei die Behandlung drei Tage vor der Vektor-Applikation begann. Im Anschluss wurde die Entwicklung der NAB-Titer mit den Titern von nicht immunsupprimierten Mäusen verglichen. In der Dexamethason-Gruppe kam es zwar noch immer zur Bildung von NAB, allerdings waren die Titer wesentlich geringer und stabilisierten sich schon zu einem früheren Zeitpunkt. Damit eignet sich Dexamethason zur Reduzierung der NAB-Titer. Es war aber nicht möglich die Bildung komplett zu blockieren. Bezogen auf die wiederholte Applikation lässt sich so vermuten, dass es bei der Verwendung von Dexamethason zu einer höheren Transduktionsrate bei der zweiten Applikation des Vektors kommt, da weniger Vektoren durch die vorhandenen NAB neutralisiert werden. Prinzipiell würde aber wahrscheinlich die Effizienz im Verlauf der folgenden Transduktionen abnehmen, da sich immer mehr NAB bilden würden. Neben der vermindeten Bildung von NAB wurde die Expression durch die Dexamethsonbehandlung leicht beeinflusst. Es kam zu unterschiedlichen Reaktionen bei den Geschlechtern. Bei den männlichen Mäusen hatte die Behandlung einen positiven Einfluss auf die Expression, wohingegen es bei den weiblichen zu einer leichten Abnahme kam. Die Unterschiede innerhalb der weiblichen Mäuse waren nicht signifikant. Dagegen waren sie bei den männlichen Mäusen ab Tag 28 signifikant.

Im Gegensatz zur Expression und zur Entwicklung von NAB, die nicht durch den Applikationsweg beeinflusst wurden, konnten bei den Biodistributions-Untersuchungen Unterschiede zwischen der intratrachealen und der intranasalen Applikation festgestellt werden. In der intratrachealen Gruppe konnte im Vergleich zur intranasalen Gruppe eine höhere Vektor-DNA-Menge in der Lunge kombiniert mit geringeren Mengen in Leber und Milz detektiert werden. Biodistributions-Untersuchungen in anderen Studien konnten zeigen, dass es nach intratrachealer Applikation zu einer mehr als 1000-fach höheren Vektor-DNA-Konzentration in der Lunge im Vergleich zu anderen Organen kommt (Limberis and Wilson, 2006; Liqun Wang et al., 2009). Hier liegen die Unterschiede in einem Bereich zwischen einer 3- und 60-fach höheren Konzentration. Besonders nach intranasaler Applikation war die Konzentration in der Lunge nur 3-fach höher im Vergleich zu der in der Leber detektierten Vektor-DNA-Konzentration, wohingegen es nach intratrachealer Applikation zu einem 10fachen Unterschied kam. Die Biodistributions-Untersuchungen zeigten die Distribution der Vektor-DNA im ganzen Körper der Tiere. Zusätzlich belegen die in vivo Biolumineszenz-Aufnahmen die Expression in diesen "Off-Target"Organen. Die Expression eines therapeutischen Transgens in diesen Organen könnte zu unerwünschten Nebenwirkungen führen. Wenn Strategien gefunden werden, die die Biodistribution des Vektors nach der lokalen Applikation verhindern, ist AAV2/9 ein aussichtsreicher Kandidat zur Behandlung verschiedener respiratorischer Erkrankungen.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden zwei Themengebiete des pulmonalen Gentransfers behandelt. Im ersten Teil wurde ein Pulveraerosol für den nicht-viralen Gentransfer mit PEI/pDNA-Komplexen entwickelt. Im zweiten Teil wurde ein AAV2/9-Vektor zum lokalen viralen Gentransfer in die Lunge untersucht.

Die Entwicklung des Pulveraerosols hat den Hintergrund, dass die Applikation nicht-viraler Genvektoren in Form von wässrigen Aerosol-Formulierungen große Stabilitätsprobleme mit sich bringt, die mit der Entwicklung eines Pulveraerosols behoben werden können. Dies ist von besonderer Bedeutung bei der Verwendung von Aerosol-Formulierung in klinischen Studien, da diese zum aktuellen Zeitpunkt stets unmittelbar vor der Anwendung hergestellt werden müssen. Dies ist angesichts der gewünschten GMP-Bedingungen problematisch.

Die Herstellung der Pulveraerosole erfolgte durch Lyophilisation von PEI/pDNA-Komplexen zusammen mit Disacchariden (Lactose, Trehalose und Saccharose) und anschließende Zerkleinerung im CapMix. Die Untersuchung verschiedener Disaccharide als Lyoprotektoren ergab keine Unterschiede bezüglich der biophysikalischen Eigenschaften der resultierenden Formulierungen. Die Partikelgröße nahm zu, sobald die Lyophilisation nicht mit mindestens 250-fachem Disaccharidüberschuss durchgeführt wurde. Im Weiteren kam es nach Pulverisierung zu einer Partikelgrößenzunahme unabhängig von der zugesetzten Disaccharidmenge; einzig Formulierungen mit einem 50-fachen Disaccharidüberschuss resultierten in kleineren Komplexen. Nach der Lyophilisation kam es unabhängig von der zugesetzten Disaccharidmenge zu einem Anstieg des Zetapotenzials, das auch nach Pulverisierung noch erhöht war. Die Freisetzung der pDNA aus den lyophilisierten Komplexen mittels Inkubation mit Heparan-

sulfat und anschießender Gelelektrophorese erfolgte komplett. Nach der Pulverisierung wurde die pDNA ebenfalls aus den Komplexen freigesetzt, allerdings konnte bei den Proben mit einem 50-fachen Disaccharidüberschuss nur ein Teil der pDNA freigesetzt werden.

Die Charakterisierung der Pulveraerosole am Andersen Kaskadenimpaktor zeigte erste Unterschiede zwischen den eingesetzten Disacchariden. Der ermittelte MMAD war für Saccharose mit $4,3~\mu m$ am kleinsten, womit Saccharose das feinste Pulveraerosol lieferte. Mit Lactose resultierte eine MMAD von $4,7~\mu m$ und mit Trehalose einer von $5~\mu m$.

Die *in vitro* Untersuchungen wurden auf zwei verschiedenen Bronchialepithel-Zelllinien durchgeführt. Es konnte wie auch bei den biophysikalischen Untersuchungen kein Unterschied zwischen den Disacchariden festgestellt werden. Tendenziell kam es nach Lyophilisation zu einer leicht verbesserten Genexpression bei allen eingesetzten Disaccharidüberschüssen im Vergleich zur Kontrolle. Nach der Pulverisierung war die Genexpression vergleichbar mit derjenigen der Kontrollkomplexe, wenn mindestens ein 100-facher Disaccharidüberschuss eingesetzt wurde. Formulierungen mit einem 50-fachen Überschuss resultierten nach Pulverisierung in einer tendenziell schlechteren Expression.

Die *in vivo* Versuche mit Luciferase zeigten die Genexpression in den Lungen der Mäuse. Nach Quantifizierung der Luciferase-Expression bezogen auf das Lungengewebe konnte für Lactose als Lyoprotektor die höchste Genexpression gezeigt werden. Die Bestimmung der in der Lunge aufgenommenen pDNA mittels Real-Time PCR resultierte in signifikant höheren Werten in der Lactose-Gruppe im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Die Verwendung eines für Erythropoetin kodierenden Plasmids in Form des Lactose-Pulvers resultierte in einer signifikanten Erhöhung des Hämatokritwertes. Histologische Untersuchungen der Lungen zeigten eine geringgradige Entzündung, die mit der Einwanderung von Erythrozyten und neutrophilen Granulozyten einherging. Dies konnte sowohl nach Applikation der PEI/pDNA-Pulveraerosols aus auch nach der Verneblung von reinem Lactosepulver beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch Verwendung geeig-

neter Lyoprotektoren die Formulierung von Pulveraerosolen mit PEI/pDNA-Komplexen möglich ist und die *in vivo* Applikation zu einem physiologischen Effekt führt. Damit stellt diese Applikationsform eine vielversprechende Option für den pulmonalen Gentransfer dar.

Die Verwendung nicht-viraler Vektoren führt nur zu einer transienten Expression des Transgens, weshalb im zweiten Abschnitt dieser Arbeit ein viraler AAV2/9-Vektor für den pulmonalen Gentransfer untersucht wurde. Unter den viralen Vektoren bieten AAV-Vektoren verschiedene Vorteile. Der Wildtypvirus ist beim Menschen nicht pathogen, es besteht keine Gefahr der insertionellen Mutagenese und die Immunantwort nach Applikation verläuft sehr mild. Im Vergleich zu dem bisher am häufigsten verwendeten AAV2-Vektoren sind sowohl die Prävalenz neutralisierender Antikörper als auch deren Titer für AAV2/9-Vektoren deutlich niedriger, weshalb diese eine attraktive Alternative darstellen.

Nach Optimierung des Vektor Backbones, konnte in Balb/c-Mäusen gezeigt werden, dass die Applikationsroute keinen Einfluss auf die Transgenexpression hat. Sowohl nach intranasaler als auch nach intratrachealer Applikation blieb die Genexpression über 450 Tage konstant. Weiterhin hatte der Mausstamm keinen Einfluss auf die Genexpression. Dies konnte durch Versuche in konditionellen SPB-/--Mäusen gezeigt werden. Des Weiteren war die Genexpression unabhängig vom Geschlecht der Mäuse. Zwar war die Expression bei den weiblichen SPB-/--Mäusen zwischen 10- und 50-fach höher im Vergleich zu den männlichen Mäusen, die Unterschiede waren aber nicht signifikant. Die Applikation des AAV2/9-Vektors in die entzündete Lunge von SPB-/--Mäusen hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Expression.

Die Entwicklung neutralisierender Antikörper gegen den Vektor stellt die größte Hürde bei der wiederholten Applikation von AAV-Vektoren dar. Die Applikationsroute hatte keinen Einfluss auf diese Entwicklung. In beiden Gruppen waren 450 Tage nach Vektor-Applikation NAB nachzuweisen. Durch Dosisreduktion konnten zwar die NAB-Titer verringert werden, allerdings ging damit auch eine starke Verminderung der Transgenexpression einher. Weiterhin wurde die Entwicklung von NAB nicht durch das Geschlecht beeinflusst. Durch Immun-

suppression mit Dexamethason konnten außerdem die Titer der NAB reduziert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass es nach lokaler Applikation des AAV2/9-Vektors zur Transgenexpression in der gesamten Maus kommt. Die Verteilung des Vektors konnte durch Biodistributionsstudien belegt werden. Es zeigte sich die höchste Vektor-DNA Deposition in der Lunge. Die intratracheale Applikation lieferte eine höhere Vektor-DNA Konzentration in der Lunge kombiniert mit niedrigeren Mengen in Leber und Milz im Vergleich zur intranasalen Gruppe, allerdings waren die Unterschiede nicht signifikant.

Diese Ergebnisse zeigen, dass AAV2/9-Vektoren geeignet sind, um die Langzeit-Expression eines Transgens zu erreichen. Die Effizienz dieses Vektors in entzündeten Lungen lässt auf gute Ergebnisse in einem therapeutischen Modell hoffen. Bevor dieser Vektor allerdings klinisch eingesetzt werden kann, muss nach Methoden gesucht werden, die die Biodistribution nach lokaler Applikation verhindern und die Immunogenität reduzieren.

7 Summary

This work is divided into two parts, both addressing pulmonary gene delivery. The overall goal of the first part of the thesis was the development of a powder aerosol for the delivery of PEI/pDNA complexes to the lung. The second part investigated the effect of gene expression, biodistribution and immune response after pulmonary application of an AAV2/9 vector.

The rationale underlying the development of dry powder aerosol(s) for pulmonary gene delivery is the well documented physical instability of aqueous suspensions of non-viral vector complexes over time. These instabilities include aggregation tendencies and loss of transfection efficiency, thus requiring fresh preparation each time directly prior to injection for maximal effect. Besides increased stability, dry powder systems confer additional advantages including reduced drug loss during administration and improved portability.

The technique of lyophilization was used to produce dry powder cakes followed by powderization with zirconia beads using a CapMix. Different sugars, namely lactose, sucrose and trehalose, were used as lyoprotectants. Biophysical characterization of complexes before and after lyophilization and after powderization was performed. Particle size measurements of gene vector complexes showed that augmenting the amount of sugar, independent of the sugar type, used during lyophilization led to lower increase or maintenance of the particle size. Complexes lyophilized without sugar showed an enormous increase in particle size. After powderization, the particle size increased in nearly all samples. Only samples with a 50-fold excess of sucrose resulted in smaller particles in comparison to the size after lyophilization. In contrast to particle size, the increase of zeta potential is not influenced by the amount of sugar. DNA retardation assay revea-

led no major differences between freshly prepared, lyophilized and powderized complexes with exception of the powderized sample with an excess of 50/1 of sugar, which did not completely release pDNA.

After characterizing the nanoparticles, the resulting powders were analyzed by Andersen Cascade Impactor. Sucrose led to the finest powder with a MMAD of $4.3\,\mu\text{m}$, followed by Lactose ($4.7\,\mu\text{m}$). The trehalose sample had a MMAD of $5\,\mu\text{m}$, thus producing the most coarse powder of all samples. These results show that although the sugars have no influence on the particle size of gene vector complexes, they do influence the MMAD of the powder aerosol.

After biophysical characterization, complexes were used in transfection studies to explore their gene delivery potential *in vitro*. Lyophilized and powderized complexes were compared to freshly prepared complexes on BEAS-2B and 16HBE14o- cells. Lyophilization with different sugars did not lead to any difference in gene expression in both cell lines. Values measured with lyophilized samples were slightly higher than those of freshly prepared positive controls. Addition of free sugars, did not influence the transfection efficiency. After powderization process, gene delivery was retained in comparison to freshly prepared complexes. Only samples containing a 50-fold excess of sugar showed slightly decreased expression values.

In vivo administration of powder aerosols with a sugar/pDNA ratio of 100/1 resulted in gene expression in lungs of treated mice. Quantification of pDNA in lung tissue by real-time PCR resulted in significantly, up to 3-fold higher values with lactose as lyoprotector during lyophilization compared to the other two lyoprotectants. By using a plasmid coding for murine erythropoietin formulated with lactose, a significant increase of the hematocrit value could be achieved, demonstrating a physiological response after powder aerosol treatment. Histological analysis of lungs treated with either PEI/pDNA lactose powder or lactose powder without gene vector complexes, showed a mild inflammation with increased numbers of erythrocytes and neutrophil granulocytes in the alveolar region.

In summary, the first part of the work convincingly shows the applicability of dry powder aerosols for pulmonary gene delivery and expression of the desired transgene at physiological levels, making this technique a promising option for pulmonary gene delivery.

Despite numerous advancements in the field of non-viral vectors, clinical trials of gene therapy are currently dominated by viral vectors. Dominance of viral vectors in numerous gene therapy clinical trials can be attributed to their high efficiency of gene transfer. Desirable attributes like lack of pathogenicity, ability to transduce non-dividing cells, prolonged transgene expression and low immunogenicity present AAVs as potential vectors for clinical applications.

The second part of this work successfully demonstrates stable long term expression using AAV2/9 based vector in two different mouse strains (BALB/c-mice and SPB-/--mice). After optimization of the vector backbone, no effect of either mouse genotype or pulmonary route of delivery on transgene expression could be observed. Gene expression was constant over 450 days both after intranasal and intratracheal application of the vector. Besides mouse strain, animal gender has also been shown to influence AAV mediated gene delivery. This study demonstrates no gender specific differences in transgene expression post AAV2/9 mediated gene delivery. A 10-50 fold higher expression was observed in female mice compared to their male counterparts, but all results were insignificant. Further, no significant difference in expression was observed when AAV2/9 was delivered to inflamed lungs of SPB-/--mice. These results point to the resistance of AAV2/9 to pulmonary inflammation.

NAB development is a major limitation of viral vectors and inhibits vector readministration. Pulmonary route of administration had no influence on NAB development, as demonstrated in BALB/c-mice. By using 10- and 100-fold lower doses, significantly reduced NAB titers were achieved but lower doses also resulted in drastically reduced transgene expression. In SPB-/--mice, by using transient immunosuppression with dexamthasone, the development of NABs was significantly inhibited in both gender types thereby overcoming a major hurdle in the way of using AAV based vectors for gene therapy.

In contrast to transgene expression and NAB development which were unaffected by the pulmonary route of application, biodistribution studies showed a

trend for higher delivery to the lungs combined with lower deposition in spleen and liver when using the intratracheal route. Using real time PCR mediated vector quantification and *in vivo* bioluminescence imaging, systemically distribution post pulmonary gene delivery and persistent gene expression in various organs of the vector was observed. These findings bode well for the application of AAV2/9 based vectors, where long-term transgene expression is desired. The performance of AAV2/9 in the presence of lung inflammation gives hope for use in a therapeutic setting. However, prior to clinical application, strategies need to be developed that limit viral biodistribution and immunogenicity.

Abkürzungsverzeichnis

μl Mikroliter

μM Mikromolar

AAV Adeno-assoziierter Virus

ADA Adenosindeaminase-Defizienz

ATP Adenosintriphosphat

bp Basenpaare

brPEI branched Polyethylenimin

BSA Bovines Serum-Albumin

ccc covalently closed circular

CCSP Clara Cell Secretopy Protein

CFTR Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

cP cPoise

CpG Cytosin-phosphatidyl-Guanin

DNA Desoxyribonukleinsäure

DOTAP 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan

DPBS Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

DTT Dithiothreitol

EDTA Ethylendiamintetraacetat

EPO Erythropoetin

F Farad

FBS Bovines Serumalbumin, fetal bovine serum

GC Gen Kopien, gene copies

h Stunde

i.n. intranasal

i.p. intraperitoneal

i.t. intratracheal

IL Interleukin

inj. injectabilia

ITR Inverted Terminal Repeat

kB Kilobasen

kDA Kilodalton

KG Körpergewicht

kg Kilogramm

l Liter

LTR long terminal repeats

M molar

MEM Minimum Essential Medium

mg Milligramm

min Minute

Abkürzungsverzeichnis

ml Milliliter

mM Millimolar

MMAD massenbezogener medianer aerodynamischer Durchmesser

mRNA messenger RNA

NAB neutralizing antibody, neutralisierende Antikörper

ng Nanogramm

PCR Polymerase Chain Reaction

pDNA Plasmid DNA

PEI Polyethylenimin

pH potentia Hydrogenii

PI Polydispersität

rAAV rekombinanter AAV

RISC RNA-induced silencing complex

RLU relative light unit

RNA Ribonukleinsäure

RNAi RNA-Interferenz

rpm revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute

SCID Severe Combined Immundeficiency

siRNA small interfering RNA

SPB Surfactant protein B

TAE Tris-Acetat-EDTA

TNF Tumornekrosefaktor

U Unit

UV Ultraviolett

V Volt

Abbildungsverzeichnis

1.1	Strukturformel PEI	9
3.1	Plasmidmappen der selbst hergestellten Plasmide	35
3.2	Dexamethason Dosierungsschema	44
4.1a	Entwicklung von Partikelgröße und PI mit Lactose als Lyoprotektor	51
4.1b	Entwicklung von Partikelgröße und PI mit Saccharose als Lyopro-	
	tektor	51
4.1c	Entwicklung von Partikelgröße und PI mit Trehalose als Lyopro-	
	tektor	52
4.2a	DNA-Freisetzungs-Assay mit Lactose als Lyoprotektor	54
4.2b	DNA-Freisetzungs-Assay mit Saccharose als Lyoprotektor	55
4.2c	DNA-Freisetzungs-Assay mit Trehalose als Lyoprotektor	55
4.3	Bestimmung des MMAD	56
4.4a	Transfektion von BEAS-2B Zellen mit verschiedenen Zuckerüber-	
	schüssen	58
4.4b	Transfektion von 16HBE140- Zellen mit verschiedenen Zucker-	
	überschüssen	58
4.5a	Transfektion von BEAS-2B mit Lactose als Lyoprotektor	60
4.5b	Transfektion von BEAS-2B mit Saccharose als Lyoprotektor	60
4.5c	Transfektion von BEAS-2B mit Trehalose als Lyoprotektor	61
4.6a	Transfektion von 16HBE140- mit Lactose als Lyoprotektor	61
4.6b	Transfektion von 16HBE140- mit Saccharose als Lyoprotektor	62
4.6c	Transfektion von 16HBE140- mit Trehalose als Lyoprotektor	62
4.7	Biolumineszenz-Messung nach Pulveraerosol-Applikation	64

4.8	Quantifizierung der Biolumineszenz-Messung im IVIS 100 Ima-	
	ging System	64
4.9	Lumineszenzmessung im Luminometer	65
4.10	Quantifizierung von pCpG-luc im Lungenhomogenisat mittels Re-	
	al Time PCR	66
4.11	Histologische Lungenschnitte nach Pulverapplikation	67
4.12	Entwicklung der Hämatokrits nach Pulverapplikation	68
5.1	Effekt des Introns auf die Expression	77
5.2	Biolumineszenz-Messung Balb/c-Mäuse mit 10 ¹¹ AAV-Luc Vekto-	
	ren an verschiedenen Zeitpunkten	79
5.3	Langzeit-Expression in Balb/c-Mäusen mit $10^{11}\mathrm{GC/Maus}\dots$	80
5.4	Entwicklung von NAB bei Mäusen mit $10^{11}\mathrm{GC/Maus}$	81
5.5	Biodistribution bei Mäusen mit $10^{11}\mathrm{GC/Maus}\dots\dots\dots$	82
5.6	Biolumineszenz-Aufnahme von Balb/c-Mäusen verschiedener	
	AAV-Luc Dosisgruppen	84
5.7	Langzeitexpression der verschiedenen AAV-Luc Dosierungen	85
5.8	Entwicklung von NAB bei reduzierter Dosis	86
5.9	Biodistribution bei Mäusen mit $10^{10}\mathrm{GC/Maus}\dots\dots\dots$	87
5.10	Langzeit-Expression in Balb/c- und SPB ^{-/-} -Mäusen	88
5.11	Biolumineszenz-Messung bei weiblichen SPB-/Mäusen \dots	90
5.12	Biolumineszenz-Messung bei männlichen SPB-/Mäusen	91
5.13	Einfluss des Geschlechts auf Langzeit-Expression in SPB ^{-/-} -Mäusen	
	mit 10^{11} GC/Maus	92
5.14	Einfluss von Immunsuppression auf Langzeit-Expression in SPB ^{-/-} -	
	Mäusen mit 10^{11} GC/Maus	93
5.15	Entwicklung von NAB bei verschiedenen Geschlechtern ohne Im-	
	munsuppression	95
5.16	Entwicklung von NAB bei verschiedenen Geschlechtern mit Im-	
	munsuppression	96
5.17	Abhängigkeit der NAB Entwicklung von Immunsuppression mit	
	Dexamethason	97

Abbildungsverzeichnis

5.18	Abhängigkeit der Genexpression vom Entzündungsstatus der	
	Mauslunge	100
5.19	$Langzeit\text{-}Expression in SPB^{\text{-}/\text{-}}\text{-}M\"{a}usen \ mit \ und \ ohne \ Doxycyclin .$	101
5.20	Quantifizierung der AAV-Luc DNA in Mauslungen	101

Tabellenverzeichnis

1.1	Physikalische Methoden für den Gentransfer	3
2.1	Reagenzien und Chemikalien	25
2.1	Reagenzien und Chemikalien	26
2.1	Reagenzien und Chemikalien	27
2.2	Restriktionsenzyme	27
2.3	Verwendete Kits	28
2.4	Medien und Medienzusätze	28
2.5	Verwendete Geräte	29
2.5	Verwendete Geräte	30
2.6	Verwendete Oligonukleotide	30
2.7	Verwendete Arzneistoffe	31
3.1	Verwendete Zelltypen	33
4.1	Zetapotenzial von PEI/pDNA-Komplexen nach Zusatz verschie-	
	dener Lyoprotektoren	53

Literaturverzeichnis

- Akagi, K., Suzuki, T., Stephens, R. M., Jenkins, N. A., and Copeland, N. G. (2004). Rtcgd: retroviral tagged cancer gene database. *Nucleic Acids Res*, 32(Database issue):D523–7.
- Allison, S. D. and Anchordoquy, T. J. (2000). Mechanisms of protection of cationic lipid-dna complexes during lyophilization. *J Pharm Sci*, 89(5):682–91.
- Allison, S. D., Molina, M. C., and Anchordoquy, T. J. (2000). Stabilization of lipid/dna complexes during the freezing step of the lyophilization process: the particle isolation hypothesis. *Biochim Biophys Acta*, 1468(1-2):127–38.
- Anchordoquy, T. J., Armstrong, T. K., and Molina, M. C. (2005). Low molecular weight dextrans stabilize nonviral vectors during lyophilization at low osmolalities: concentrating suspensions by rehydration to reduced volumes. *J Pharm Sci*, 94(6):1226–36.
- Anchordoquy, T. J., Girouard, L. G., Carpenter, J. F., and Kroll, D. J. (1998). Stability of lipid/dna complexes during agitation and freeze-thawing. *J Pharm Sci*, 87(9):1046–51.
- Anchordoquy, T. J. and Koe, G. S. (2000). Physical stability of nonviral plasmid-based therapeutics. *J Pharm Sci*, 89(3):289–96.
- Aneja, M. K., Geiger, J., Imker, R., Uzgun, S., Kormann, M., Hasenpusch, G., Maucksch, C., and Rudolph, C. (2009). Optimization of streptomyces bacteriophage phi c31 integrase system to prevent post integrative gene silencing in pulmonary type ii cells. *Exp Mol Med*, 41(12):919–34.

- Armstrong, T. K., Girouard, L. G., and Anchordoquy, T. J. (2002). Effects of pegylation on the preservation of cationic lipid/dna complexes during freeze-thawing and lyophilization. *J Pharm Sci*, 91(12):2549–58.
- Auricchio, A., O'Connor, E., Weiner, D., Gao, G. P., Hildinger, M., Wang, L., Calcedo, R., and Wilson, J. M. (2002). Noninvasive gene transfer to the lung for systemic delivery of therapeutic proteins. *J Clin Invest*, 110(4):499–504.
- Bandyopadhyay, P., Ma, X., Linehan-Stieers, C., Kren, B. T., and Steer, C. J. (1999). Nucleotide exchange in genomic dna of rat hepatocytes using rna/dna oligonucleotides. targeted delivery of liposomes and polyethyleneimine to the asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem*, 274(15):10163–72.
- Barron, L. G., Gagne, L., and Szoka, F. C., J. (1999). Lipoplex-mediated gene delivery to the lung occurs within 60 minutes of intravenous administration. *Hum Gene Ther*, 10(10):1683–94.
- Bivas-Benita, M., Zwier, R., Junginger, H. E., and Borchard, G. (2005). Non-invasive pulmonary aerosol delivery in mice by the endotracheal route. *Eur J Pharm Biopharm*, 61(3):214–8.
- Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., Greenblatt, J. J., Rosenberg, S. A., Klein, H., Berger, M., Mullen, C. A., Ramsey, W. J., Muul, L., Morgan, R. A., and Anderson, W. F. (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ada-scid: initial trial results after 4 years. *Science*, 270(5235):475–80.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(16):7297–301.
- Boussif, O., Zanta, M. A., and Behr, J. P. (1996). Optimized galenics improve in vitro gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold. *Gene Ther*, 3(12):1074–80.

- Boutin, S., Monteilhet, V., Veron, P., Leborgne, C., Benveniste, O., Montus, M. F., and Masurier, C. (2010). Prevalence of serum igg and neutralizing factors against adeno-associated virus types 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using aav vectors. *Hum Gene Ther*, ahead of print.
- Bouvet, M., Fang, B., Ekmekcioglu, S., Ji, L., Bucana, C. D., Hamada, K., Grimm, E. A., and Roth, J. A. (1998). Suppression of the immune response to an adenovirus vector and enhancement of intratumoral transgene expression by low-dose etoposide. *Gene Ther*, 5(2):189–95.
- Brus, C., Kleemann, E., Aigner, A., Czubayko, F., and Kissel, T. (2004). Stabilization of oligonucleotide-polyethylenimine complexes by freeze-drying: physicochemical and biological characterization. *J Control Release*, 95(1):119–31.
- Buckley, S. M., Howe, S. J., Rahim, A. A., Buning, H., McIntosh, J., Wong, S. P., Baker, A. H., Nathwani, A., Thrasher, A. J., Coutelle, C., McKay, T. R., and Waddington, S. N. (2008). Luciferin detection after intranasal vector delivery is improved by intranasal rather than intraperitoneal luciferin administration. *Hum Gene Ther*, 19(10):1050–6.
- Burger, C., Gorbatyuk, O. S., Velardo, M. J., Peden, C. S., Williams, P., Zolotukhin, S., Reier, P. J., Mandel, R. J., and Muzyczka, N. (2004). Recombinant aav viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol Ther*, 10(2):302–17.
- Capecchi, M. R. (1980). High efficiency transformation by direct microinjection of dna into cultured mammalian cells. *Cell*, 22(2 Pt 2):479–88.
- Caplen, N. J., Alton, E. W., Middleton, P. G., Dorin, J. R., Stevenson, B. J., Gao, X., Durham, S. R., Jeffery, P. K., Hodson, M. E., Coutelle, C., and et al. (1995). Liposome-mediated cftr gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nat Med*, 1(1):39–46.

- Carpenter, J. F. and Crowe, J. H. (1988). The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology*, 25(3):244–55.
- Carpenter, J. F. and Crowe, J. H. (1989). An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry*, 28(9):3916–22.
- Carpenter, J. F., Prestrelski, S. J., and Arakawa, T. (1993). Separation of freezing-and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization. i. enzyme activity and calorimetric studies. *Arch Biochem Biophys*, 303(2):456–64.
- Cattoglio, C., Facchini, G., Sartori, D., Antonelli, A., Miccio, A., Cassani, B., Schmidt, M., von Kalle, C., Howe, S., Thrasher, A. J., Aiuti, A., Ferrari, G., Recchia, A., and Mavilio, F. (2007). Hot spots of retroviral integration in human cd34+ hematopoietic cells. *Blood*, 110(6):1770–8.
- Cherng, J. Y., van de Wetering, P., Talsma, H., Crommelin, D. J., and Hennink, W. E. (1997). Freeze-drying of poly((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-based gene delivery systems. *Pharm Res*, 14(12):1838–41.
- Cherng, J. Y., vd Wetering, P., Talsma, H., Crommelin, D. J., and Hennink, W. E. (1999). Stabilization of polymer-based gene delivery systems. *Int J Pharm*, 183(1):25–8.
- Chollet, P., Favrot, M. C., Hurbin, A., and Coll, J. L. (2002). Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-dna complexes. *J Gene Med*, 4(1):84–91.
- Clark, J. C., Wert, S. E., Bachurski, C. J., Stahlman, M. T., Stripp, B. R., Weaver, T. E., and Whitsett, J. A. (1995). Targeted disruption of the surfactant protein b gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(17):7794–8.
- Crowe, J. H., Leslie, S. B., and Crowe, L. M. (1994). Is vitrification sufficient to preserve liposomes during freeze-drying? *Cryobiology*, 31(4):355–66.

- Dames, P., Ortiz, A., Schillinger, U., Lesina, E., Plank, C., Rosenecker, J., and Rudolph, C. (2007). Aerosol gene delivery to the murine lung is mouse strain dependent. *J Mol Med*, 85(4):371–8.
- Davidoff, A. M., Ng, C. Y., Zhou, J., Spence, Y., and Nathwani, A. C. (2003). Sex significantly influences transduction of murine liver by recombinant adenoassociated viral vectors through an androgen-dependent pathway. *Blood*, 102(2):480–8.
- Daya, S. and Berns, K. I. (2008). Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev*, 21(4):583–93.
- De Smedt, S. C., Demeester, J., and Hennink, W. E. (2000). Cationic polymer based gene delivery systems. *Pharm Res*, 17(2):113–26.
- del Pozo-Rodriguez, A., Solinis, M. A., Gascon, A. R., and Pedraz, J. L. (2009). Short- and long-term stability study of lyophilized solid lipid nanoparticles for gene therapy. *Eur J Pharm Biopharm*, 71(2):181–9.
- Elfinger, M., Geiger, J., Hasenpusch, G., Uzgun, S., Sieverling, N., Aneja, M. K., Maucksch, C., and Rudolph, C. (2009). Targeting of the beta(2)-adrenoceptor increases nonviral gene delivery to pulmonary epithelial cells in vitro and lungs in vivo. *J Control Release*, 135(3):234–41.
- Engelhardt, J. F., Yankaskas, J. R., and Wilson, J. M. (1992). In vivo retroviral gene transfer into human bronchial epithelia of xenografts. *J Clin Invest*, 90(6):2598–607.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., and Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated dna-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(21):7413–7.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded rna in caenorhabditis elegans. *Nature*, 391(6669):806–11.

- Flotte, T. R. and Laube, B. L. (2001). Gene therapy in cystic fibrosis. *Chest*, 120(3 Suppl):124S–131S.
- Flotte, T. R., Ng, P., Dylla, D. E., McCray, P. B., J., Wang, G., Kolls, J. K., and Hu, J. (2007). Viral vector-mediated and cell-based therapies for treatment of cystic fibrosis. *Mol Ther*, 15(2):229–41.
- Fortunati, E., Bout, A., Zanta, M. A., Valerio, D., and Scarpa, M. (1996). In vitro and in vivo gene transfer to pulmonary cells mediated by cationic liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 1306(1):55–62.
- Gambotto, A., Dworacki, G., Cicinnati, V., Kenniston, T., Steitz, J., Tuting, T., Robbins, P. D., and DeLeo, A. B. (2000). Immunogenicity of enhanced green fluorescent protein (egfp) in balb/c mice: identification of an h2-kd-restricted ctl epitope. *Gene Ther*, 7(23):2036–40.
- Gautam, A., Densmore, C. L., Xu, B., and Waldrep, J. C. (2000). Enhanced gene expression in mouse lung after pei-dna aerosol delivery. *Mol Ther*, 2(1):63–70.
- Gavin, M. A., Gilbert, M. J., Riddell, S. R., Greenberg, P. D., and Bevan, M. J. (1993). Alkali hydrolysis of recombinant proteins allows for the rapid identification of class i mhc-restricted ctl epitopes. *J Immunol*, 151(8):3971–80.
- Geiger, J., Aneja, M. K., Hasenpusch, G., Yueksekdag, G., Kummerlowe, G., Luy, B., Romer, T., Rothbauer, U., and Rudolph, C. (2009). Targeting of the prostacyclin specific ip(1) receptor in lungs with molecular conjugates comprising prostaglandin i(2) analogues. *Biomaterials*.
- Gill, D. R., Smyth, S. E., Goddard, C. A., Pringle, I. A., Higgins, C. F., Colledge, W. H., and Hyde, S. C. (2001). Increased persistence of lung gene expression using plasmids containing the ubiquitin c or elongation factor 1alpha promoter. *Gene Ther*, 8(20):1539–46.
- Goula, D., Benoist, C., Mantero, S., Merlo, G., Levi, G., and Demeneix, B. A. (1998). Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung. *Gene Ther*, 5(9):1291–5.

- Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J. L., Fraser, C. C., Cavazzana-Calvo, M., and Fischer, A. (2003). A serious adverse event after successful gene therapy for x-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*, 348(3):255–6.
- Halbert, C. L., Allen, J. M., and Miller, A. D. (2001). Adeno-associated virus type 6 (aav6) vectors mediate efficient transduction of airway epithelial cells in mouse lungs compared to that of aav2 vectors. *J Virol*, 75(14):6615–24.
- Halbert, C. L., Lam, S. L., and Miller, A. D. (2007). High-efficiency promoter-dependent transduction by adeno-associated virus type 6 vectors in mouse lung. *Hum Gene Ther*, 18(4):344–54.
- Halbert, C. L., Miller, A. D., McNamara, S., Emerson, J., Gibson, R. L., Ramsey, B., and Aitken, M. L. (2006). Prevalence of neutralizing antibodies against adenoassociated virus (aav) types 2, 5, and 6 in cystic fibrosis and normal populations: Implications for gene therapy using aav vectors. *Hum Gene Ther*, 17(4):440–7.
- Halbert, C. L., Rutledge, E. A., Allen, J. M., Russell, D. W., and Miller, A. D. (2000). Repeat transduction in the mouse lung by using adeno-associated virus vectors with different serotypes. *J Virol*, 74(3):1524–32.
- Halbert, C. L., Standaert, T. A., Wilson, C. B., and Miller, A. D. (1998). Successful readministration of adeno-associated virus vectors to the mouse lung requires transient immunosuppression during the initial exposure. *J Virol*, 72(12):9795–805.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. (2000). A toll-like receptor recognizes bacterial dna. *Nature*, 408(6813):740–5.
- Huang, M. T. and Gorman, C. M. (1990). Intervening sequences increase efficiency of rna 3' processing and accumulation of cytoplasmic rna. *Nucleic Acids Res*, 18(4):937–47.

- Huth, S., Hoffmann, F., von Gersdorff, K., Laner, A., Reinhardt, D., Rosenecker, J., and Rudolph, C. (2006). Interaction of polyamine gene vectors with rna leads to the dissociation of plasmid dna-carrier complexes. *J Gene Med*, 8(12):1416–24.
- Ikegami, M., Whitsett, J. A., Martis, P. C., and Weaver, T. E. (2005). Reversibility of lung inflammation caused by sp-b deficiency. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 289(6):L962–70.
- Ito, T., Yoshihara, C., Hamada, K., and Koyama, Y. (2010). Dna/polyethyleneimine/hyaluronic acid small complex particles and tumor suppression in mice. *Biomaterials*, 31(10):2912–8.
- Kleemann, E., Neu, M., Jekel, N., Fink, L., Schmehl, T., Gessler, T., Seeger, W., and Kissel, T. (2005). Nano-carriers for dna delivery to the lung based upon a tat-derived peptide covalently coupled to peg-pei. *J Control Release*, 109(1-3):299–316.
- Kollen, W. J., Schembri, F. M., Gerwig, G. J., Vliegenthart, J. F., Glick, M. C., and Scanlin, T. F. (1999). Enhanced efficiency of lactosylated poly-l-lysine-mediated gene transfer into cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 20(5):1081–6.
- Koping-Hoggard, M., Tubulekas, I., Guan, H., Edwards, K., Nilsson, M., Varum, K. M., and Artursson, P. (2001). Chitosan as a nonviral gene delivery system. structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo. *Gene Ther*, 8(14):1108–21.
- Kumahara, K., Nagata, H., Watanabe, K., Shimizu, N., Arimoto, Y., Isoyama, K., Okamoto, Y., and Shirasawa, H. (2005). Suppression of inflammation by dexamethasone prolongs adenoviral vector-mediated transgene expression in murine nasal mucosa. *Acta Otolaryngol*, 125(12):1301–6.
- Kuo, J. H. and Hwang, R. (2004). Preparation of dna dry powder for non-viral gene delivery by spray-freeze drying: effect of protective agents (polyethyleneimine and sugars) on the stability of dna. *J Pharm Pharmacol*, 56(1):27–33.

- Kuruba, R., Wilson, A., Gao, X., and Li, S. (2009). Targeted delivery of nucleicacid-based therapeutics to the pulmonary circulation. *AAPS J*, 11(1):23–30.
- Leventis, R. and Silvius, J. R. (1990). Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. *Biochim Biophys Acta*, 1023(1):124–32.
- Li, H. Y., Neill, H., Innocent, R., Seville, P., Williamson, I., and Birchall, J. C. (2003). Enhanced dispersibility and deposition of spray-dried powders for pulmonary gene therapy. *J Drug Target*, 11(7):425–32.
- Li, H. Y., Seville, P. C., Williamson, I. J., and Birchall, J. C. (2005). The use of amino acids to enhance the aerosolisation of spray-dried powders for pulmonary gene therapy. *J Gene Med*, 7(3):343–53.
- Li, S. and Huang, L. (1997). In vivo gene transfer via intravenous administration of cationic lipid-protamine-dna (lpd) complexes. *Gene Ther*, 4(9):891–900.
- Limberis, M. P., Bell, C. L., and Wilson, J. M. (2009a). Identification of the murine firefly luciferase-specific cd8 t-cell epitopes. *Gene Ther*, 16(3):441–7.
- Limberis, M. P., Vandenberghe, L. H., Zhang, L., Pickles, R. J., and Wilson, J. M. (2009b). Transduction efficiencies of novel aav vectors in mouse airway epithelium in vivo and human ciliated airway epithelium in vitro. *Mol Ther*, 17(2):294–301.
- Limberis, M. P. and Wilson, J. M. (2006). Adeno-associated virus serotype 9 vectors transduce murine alveolar and nasal epithelia and can be readministered. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(35):12993–8.
- Liqun Wang, R., McLaughlin, T., Cossette, T., Tang, Q., Foust, K., Campbell-Thompson, M., Martino, A., Cruz, P., Loiler, S., Mueller, C., and Flotte, T. R. (2009). Recombinant aav serotype and capsid mutant comparison for pulmonary gene transfer of alpha-1-antitrypsin using invasive and noninvasive delivery. *Mol Ther*, 17(1):81–7.

- Liu, Y., Liggitt, H. D., Dow, S., Handumrongkul, C., Heath, T. D., and Debs, R. J. (2002). Strain-based genetic differences regulate the efficiency of systemic gene delivery as well as expression. *J Biol Chem*, 277(7):4966–72.
- Lombry, C., Edwards, D. A., Preat, V., and Vanbever, R. (2004). Alveolar macrophages are a primary barrier to pulmonary absorption of macromolecules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 286(5):L1002–8.
- MacLaughlin, F. C., Mumper, R. J., Wang, J., Tagliaferri, J. M., Gill, I., Hinchcliffe, M., and Rolland, A. P. (1998). Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *J Control Release*, 56(1-3):259–72.
- Mahato, R. I., Rolland, A., and Tomlinson, E. (1997). Cationic lipid-based gene delivery systems: pharmaceutical perspectives. *Pharm Res*, 14(7):853–9.
- Maitani, Y., Aso, Y., Yamada, A., and Yoshioka, S. (2008). Effect of sugars on storage stability of lyophilized liposome/dna complexes with high transfection efficiency. *Int J Pharm*, 356(1-2):69–75.
- Manning, W. C., Zhou, S., Bland, M. P., Escobedo, J. A., and Dwarki, V. (1998). Transient immunosuppression allows transgene expression following readministration of adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther*, 9(4):477–85.
- Marshall, J., Nietupski, J. B., Lee, E. R., Siegel, C. S., Rafter, P. W., Rudginsky, S. A., Chang, C. D., Eastman, S. J., Harris, D. J., Scheule, R. K., and Cheng, S. H. (2000). Cationic lipid structure and formulation considerations for optimal gene transfection of the lung. *J Drug Target*, 7(6):453–69.
- McCarty, D. M., Young, S. M., J., and Samulski, R. J. (2004). Integration of adenoassociated virus (aav) and recombinant aav vectors. *Annu Rev Genet*, 38:819–45.
- McTaggart, S. and Al-Rubeai, M. (2002). Retroviral vectors for human gene delivery. *Biotechnol Adv*, 20(1):1–31.

- Melton, K. R., Nesslein, L. L., Ikegami, M., Tichelaar, J. W., Clark, J. C., Whitsett, J. A., and Weaver, T. E. (2003). Sp-b deficiency causes respiratory failure in adult mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 285(3):L543–9.
- Merdan, T., Kunath, K., Fischer, D., Kopecek, J., and Kissel, T. (2002). Intracellular processing of poly(ethylene imine)/ribozyme complexes can be observed in living cells by using confocal laser scanning microscopy and inhibitor experiments. *Pharm Res*, 19(2):140–6.
- Müller, R. and Schuhmann, R. (1996). *Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Mohri, K., Okuda, T., Mori, A., Danjo, K., and Okamoto, H. (2010). Optimized pulmonary gene transfection in mice by spray-freeze dried powder inhalation. *J Control Release*, 144(2):221–6.
- Molina, M. C., Allison, S. D., and Anchordoquy, T. J. (2001). Maintenance of non-viral vector particle size during the freezing step of the lyophilization process is insufficient for preservation of activity: insight from other structural indicators. *J Pharm Sci*, 90(10):1445–55.
- Molina, M. C., Armstrong, T. K., Zhang, Y., Patel, M. M., Lentz, Y. K., and Anchordoquy, T. J. (2004). The stability of lyophilized lipid/dna complexes during prolonged storage. *J Pharm Sci*, 93(9):2259–73.
- Mueller, C. and Flotte, T. R. (2008). Clinical gene therapy using recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther*, 15(11):858–63.
- Noone, P. G., Hohneker, K. W., Zhou, Z., Johnson, L. G., Foy, C., Gipson, C., Jones, K., Noah, T. L., Leigh, M. W., Schwartzbach, C., Efthimiou, J., Pearlman, R., Boucher, R. C., and Knowles, M. R. (2000). Safety and biological efficacy of a lipid-cftr complex for gene transfer in the nasal epithelium of adult patients with cystic fibrosis. *Mol Ther*, 1(1):105–14.
- O'Neal, W., Zhou, H., Morral, N., Aguilar-Cordova, E., Pestaner, J., Langston, C., Mull, B., Wang, Y., Beaudet, A., and Lee, B. (1998). Toxicological compari-

- son of e2a-deleted and first-generation adenoviral vectors expressing alpha1-antitrypsin after systemic delivery. *Human Gene Therapy*, 20(9):1587–98.
- Packhaeuser, C. B., Lahnstein, K., Sitterberg, J., Schmehl, T., Gessler, T., Bakowsky, U., Seeger, W., and Kissel, T. (2009). Stabilization of aerosolizable nano-carriers by freeze-drying. *Pharm Res*, 26(1):129–38.
- Paneda, A., Vanrell, L., Mauleon, I., Crettaz, J. S., Berraondo, P., Timmermans, E. J., Beattie, S. G., Twisk, J., van Deventer, S., Prieto, J., Fontanellas, A., Rodriguez-Pena, M. S., and Gonzalez-Aseguinolaza, G. (2009). Effect of adenoassociated virus serotype and genomic structure on liver transduction and biodistribution in mice of both genders. *Hum Gene Ther*, 20(8):908–17.
- Pickles, R. J., Fahrner, J. A., Petrella, J. M., Boucher, R. C., and Bergelson, J. M. (2000). Retargeting the coxsackievirus and adenovirus receptor to the apical surface of polarized epithelial cells reveals the glycocalyx as a barrier to adenovirus-mediated gene transfer. *Journal of Virology*, 74(13):6050–6057.
- Pouton, C. W., Lucas, P., Thomas, B. J., Uduehi, A. N., Milroy, D. A., and Moss, S. H. (1998). Polycation-dna complexes for gene delivery: a comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids. *J Control Release*, 53(1-3):289–99.
- Rabinowitz, J. E., Rolling, F., Li, C., Conrath, H., Xiao, W., Xiao, X., and Samulski, R. J. (2002). Cross-packaging of a single adeno-associated virus (aav) type 2 vector genome into multiple aav serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol*, 76(2):791–801.
- Rawlins, E. L. and Hogan, B. L. (2008). Ciliated epithelial cell lifespan in the mouse trachea and lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 295(1):L231–4.
- Reinisalo, M., Urtti, A., and Honkakoski, P. (2006). Freeze-drying of cationic polymer dna complexes enables their long-term storage and reverse transfection of post-mitotic cells. *J Control Release*, 110(2):437–43.

- Rudolph, C., Ortiz, A., Schillinger, U., Jauernig, J., Plank, C., and Rosenecker, J. (2005). Methodological optimization of polyethylenimine (pei)-based gene delivery to the lungs of mice via aerosol application. *J Gene Med*, 7(1):59–66.
- Samulski, R. J., Zhu, X., Xiao, X., Brook, J. D., Housman, D. E., Epstein, N., and Hunter, L. A. (1991). Targeted integration of adeno-associated virus (aav) into human chromosome 19. *EMBO Journal*, 10(12):3941–3950.
- Seville, P. C., Kellaway, I. W., and Birchall, J. C. (2002). Preparation of dry powder dispersions for non-viral gene delivery by freeze-drying and spray-drying. *J Gene Med*, 4(4):428–37.
- Shin, J. Y., Suh, D., Kim, J. M., Choi, H. G., Kim, J. A., Ko, J. J., Lee, Y. B., Kim, J. S., and Oh, Y. K. (2005). Low molecular weight polyethylenimine for efficient transfection of human hematopoietic and umbilical cord blood-derived cd34+ cells. *Biochim Biophys Acta*, 1725(3):377–84.
- Smith, A. E. (1995). Viral vectors in gene therapy. Annu Rev Microbiol, 49:807–38.
- Sumner-Jones, S. G., Davies, L. A., Varathalingam, A., Gill, D. R., and Hyde, S. C. (2006). Long-term persistence of gene expression from adeno-associated virus serotype 5 in the mouse airways. *Gene Ther*, 13(24):1703–13.
- Sumner-Jones, S. G., Gill, D. R., and Hyde, S. C. (2007). Lack of repeat transduction by recombinant adeno-associated virus type 5/5 vectors in the mouse airway. *J Virol*, 81(22):12360–7.
- Surovoy, A., Flechsler, I., Gaunitz, F., Papke, M., and Jung, G. (1998). Simple and fast microscale procedure for transfection and quantification of reporter gene expression in eukaryotic cells. *Adv Exp Med Biol*, 451:457–60.
- Talsma, H., Cherng, J., Lehrmann, H., Kursa, M., Ogris, M., Hennink, W. E., Cotten, M., and Wagner, E. (1997). Stabilization of gene delivery systems by freezedrying. *Int J Pharm*, 157(2):233–238.
- Thomas, C. E., Ehrhardt, A., and Kay, M. A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*, 4(5):346–58.

- Thomas, M., Ge, Q., Lu, J. J., Chen, J., and Klibanov, A. M. (2005). Cross-linked small polyethylenimines: while still nontoxic, deliver dna efficiently to mammalian cells in vitro and in vivo. *Pharm Res*, 22(3):373–80.
- Toietta, G., Koehler, D. R., Finegold, M. J., Lee, B., Hu, J., and Beaudet, A. L. (2003). Reduced inflammation and improved airway expression using helper-dependent adenoviral vectors with a k18 promoter. *Molecular Therapy*, 7(5):649–658.
- Ungaro, F., De Rosa, G., Miro, A., and Quaglia, F. (2003). Spectrophotometric determination of polyethylenimine in the presence of an oligonucleotide for the characterization of controlled release formulations. *J Pharm Biomed Anal*, 31(1):143–9.
- Urtti, A., Polansky, J., Lui, G. M., and Szoka, F. C. (2000). Gene delivery and expression in human retinal pigment epithelial cells: effects of synthetic carriers, serum, extracellular matrix and viral promoters. *J Drug Target*, 7(6):413–21.
- Virella-Lowell, I., Poirier, A., Chesnut, K. A., Brantly, M., and Flotte, T. R. (2000). Inhibition of recombinant adeno-associated virus (raav) transduction by bronchial secretions from cystic fibrosis patients. *Gene Ther*, 7(20):1783–9.
- Virella-Lowell, I., Zusman, B., Foust, K., Loiler, S., Conlon, T., Song, S., Chesnut, K. A., Ferkol, T., and Flotte, T. R. (2005). Enhancing raav vector expression in the lung. *J Gene Med*, 7(7):842–50.
- Wu, H., Dmitriev, I., Kashentseva, E., Seki, T., Wang, M., and Curiel, D. T. (2002). Construction and characterization of adenovirus serotype 5 packaged by serotype 3 hexon. *J Virol*, 76(24):12775–82.
- Xu, Z. L., Mizuguchi, H., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Mayumi, T., and Hayakawa, T. (2001). Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors. *Gene*, 272(1-2):149–56.
- Yamamoto, A., Kormann, M., Rosenecker, J., and Rudolph, C. (2009). Current prospects for mrna gene delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 71(3):484–9.

- Yamashita, M. and Tanaka, J. (1995). Pulmonary collapse and pneumonia due to inhalation of a waterproofing aerosol in female cd-1 mice. *J Toxicol Clin Toxicol*, 33(6):631–7.
- Yang, Y., Li, Q., Ertl, H. C., and Wilson, J. M. (1995). Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *J Virol*, 69(4):2004–15.
- Zabner, J., Seiler, M., Walters, R., Kotin, R. M., Fulgeras, W., Davidson, B. L., and Chiorini, J. A. (2000). Adeno-associated virus type 5 (aav5) but not aav2 binds to the apical surfaces of airway epithelia and facilitates gene transfer. *J Virol*, 74(8):3852–8.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Carsten Rudolph, der mir die Möglichkeit gegeben hat diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe am Forschungszentrum des Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität München durchzuführen. Ich danke ihm für seinen ungebrochenen Optimismus, die Auswahl des kreativen Themas, die wissenschaftliche Anleitung, anregende Diskussionen und konstruktive Kritik. Das mir entgegen gebrachte Vertrauen und die Freiheit zum selbstständigen Forschen waren sehr motivierend für mich und haben mich darin bestärkt auch weiterhin in dem spannenden Forschungsgebiet der Gentherapie zu arbeiten.

Gleichermaßen möchte ich mich bei meinem Zweitgutachter Herrn Prof. Dr. Rainer Müller, für die hervorragende Zusammenarbeit bedanken. Die gemeinsamen Treffen an der Universität in Berlin waren für mich stets eine Bereicherung.

Den Kollegen in der Arbeitsgruppe Rudolph/Rosenecker danke ich für die zahlreichen fachlichen Diskussionen und die Unterstützung meiner Arbeit. Besonderen Dank gilt Dr. Manish Kumar Aneja für die fachliche Betreuung in der Arbeitsgruppe, Dr. Johannes Geiger, Dr. Senta Üzgün und Anne Himmel für die gute Einarbeitung in viele neue Methoden zu Beginn meiner Doktorandenzeit, sowie Marta Illenyi und Rabea Imker für ihre Unterstützung in der Laborarbeit. Dr. Günther Hasenpusch danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den Tierversuchen. Zudem möchte ich mich bei allen meinen Kollegen im Kubus für die entspannten Mittagspausen und die schöne Zeit auch außerhalb des Labors bedanken.

Weiterhin danke ich meiner Schwester Verena, Sebastian Streibel und Angela Schoch für die schnelle und gewissenhafte Durchsicht der Arbeit und Dr. Manish Kumar Aneja und Sonja Schriever für die Durchsicht der englischsprachigen Manuskripte.

An dieser Stelle möchte ich von ganzem Herzen meinen Eltern für ihre immerwährende uneingeschränkte Unterstützung danken, ohne die mein Studium und meine Doktorarbeit niemals möglich gewesen wäre.

Nicht zuletzt danke ich Julian für seine fortwährende Geduld und Unterstützung, insbesondere in den letzten Monaten dieser Arbeit.

Publikationen

Zeitschriftenartikel

Self-assembly of ternary insulin-polyethylenimine (PEI)-DNA nanoparticles for enhanced gene delivery and expression in alveolar epithelial cells.

Elfinger M, **Pfeifer C**, Uezguen S, Golas MM, Sander B, Maucksch C, Stark H, Aneja MK, Rudolph C.

Biomacromolecules. 2009 Oct 12;10(10):2912-20.

Efficient, specific and targeted delivery of genes to the lung

Corinna Pfeifer, Anne Himmel, Johannes-Peter Geiger, Manish K Aneja, Carsten Rudolph

Therapeutic Delivery, Jul 2010, Vol. 1, No. 1, Pages 133-148.

Adeno-associated virus serotype 9 mediated pulmonary transgene expression - effect of mouse strain, animal gender and lung inflammation

Corinna Pfeifer, Manish K. Aneja, Guenther Hasenpusch1and Carsten Rudolph *submitted* to Gene Therapy

Dry powder aerosols as novel delivery method for pulmonary gene therapy.

Corinna Pfeifer, Guenther Hasenpusch, Senta Uezguen, Manish Kumar Aneja, Dietrich Reinhardt, Julian Kirch, Marc Schneider, Sarah Claus, Wolfgang Frieß and Carsten Rudolph

submitted to Biomaterials

Uezguen S, Nica G, **Pfeifer C**, Akdemir Ö, Boscino M, Lutz J-F, Schneider M, Rosenecker J, Rudolph C

PEGylation of poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate) (P(DMAEMA)) improves nanoparticle formation and transfection efficiency of messenger RNA. *In Vorbereitung*

Kongressbeiträge

Ternary PEI/pDNA/insulin complexes increase nonviral gene delivery to pulmonary epithelial cells

Corinna Pfeifer, Markus Elfinger, Senta Uezguen, Manish K. Aneja and Carsten Rudolph

European Society of Gene and Cell Therapy, Hannover, Germany Nov 21-25, 2009

Aerosol delivery of polyethylenimine (PEI)-BC-819 plasmid DNA inhibits growth of lung tumors in mice

G. Hasenpusch, C. Pfeifer, R. Imker, K. Wagner, P. Ohana, A.Hochberg and C. Rudolph

European Society of Gene and Cell Therapy, Hannover, Germany Nov 21-25, 2009

Buchkapitel

Inhalatives Insulin

Geiger J, **Pfeifer C**, Rudolph C

Moderne Pharmazeutische Technologie 2009; Herausgeber: Keck CM, Müller RH, akzeptiert