

6 Gentransfer mit Hilfe des Glucocorticoidrezeptors als Transkriptionsfaktor

6.1 Nichtviraler Gentransfer mit Hilfe des Glucocorticoidrezeptors als Transkriptionsfaktor

Der Gentransfer mit nichtviralen Genvektoren stellt eine viel versprechende Methode des Gentransfers dar, aber bisher war die klinische Anwendung durch die geringe Gentransfereffizienz dieser Genvektoren begrenzt. Die geringe Transfereffizienz kommt durch die geringe Aufnahme der nichtviralen Genvektoren in die Zellen, durch die verminderte Freisetzung der Genvektor-pDNA Komplexe aus Endosomen und durch den ineffektiven Transport in den Zellkern zustande [157]. Deshalb wurden zahlreiche Anstrengungen unternommen, diese Hürden zu überwinden und die Effizienz des nichtviralen Gentransfers zu steigern, zum Beispiel mit Hilfe von zellmembranbindenden Liganden, zellmembrandurchbrechenden Peptiden oder Kernlokalisierungssequenzen.

Der Ansatz zur Verbesserung des Gentransfers nichtviraler Genvektoren, der in dieser Arbeit verfolgt wurde, beruht auf der Bindung des endogenen Glucocorticoidrezeptor (GR) Protein an spezielle DNA-Sequenzen im Plasmid. Die Wahl des GR als Transkriptionsfaktor beruht auf folgenden Gründen: Der GR wird ubiquitär in verschiedenen Gewebe- und Zelltypen exprimiert [158]. Der Transport des GR in den Zellkern ist ein induzierbarer Prozess. In Abwesenheit eines Stimulus befindet sich der Rezeptor in inaktivierter Form hauptsächlich im Zytoplasma von Zellen. Applikation eines Liganden, wie zum Beispiel Dexamethason, führt zur Aktivierung des Rezeptors und zur Aufnahme in den Zellkern [113, 159-161]. Die Bindungsaffinität des GR zu seinen responsiven Elementen (GRE) ist hoch ($K_D \sim 0,1-1000\text{nM}$, siehe Tabelle 8) und die Translokation in den Zellkern nach der Aktivierung erfolgt rasch [112, 113, 161]. Durch Protein-Protein Interaktionen des aktivierten GR mit weiteren Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B und Aktivator Protein-1, führt die Dexamethasongabe auch zu immunsuppressiven und anti-entzündlichen Reaktionen.

6.2 Bindungsaffinität des Glucocorticoidrezeptors (GR) an *Hormone Responsive Elements* – Auswahl der zu klonierenden DNA Sequenz

Der GR gehört zu einer Familie von nukleären Hormonrezeptoren, die als liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren wirken und mit ihrer zentralen DNA-Bindungsdomäne an kurze DNA Sequenzen, die sog. *Hormone Responsive Elements* (HRE), bestimmter Gene binden und ihre Transkription regulieren [162].

Steroidhormon-Rezeptoren, z.B. Glucocorticoid-, Progesteron-, Androgen-, und Mineralocorticoid-Rezeptoren gehören zum Typ I dieser nukleären Rezeptoren und können als Homodimere an ein allgemeines *Steroid Responsive Element* (SRE) binden. Dieses SRE wurde ursprünglich in einem Promotor des MMTV (*mouse mammary tumour virus*) identifiziert [112]. Eine genauere Analyse dieses viralen Promotors führte zur Identifizierung der Sequenz des SRE, GGTCAnnnTGTTCT, die eine hohe Bindungsaffinität für alle Steroidhormon-Rezeptoren hat [112, 163]. In weiteren Untersuchungen fanden sich SREs mit einer selektiven Bindungsaktivität für einzelne Steroidhormon-Rezeptoren [164, 165]. Im Gegensatz zum Glucocorticoid-, Progesteron-, Androgen-, und Mineralocorticoid-Rezeptor binden Estrogen-Rezeptoren an das *Estrogen Responsive Element* (ERE), das sich in der Sequenz von anderen SREs unterscheidet: GGTCAnnnTGACC [166]. Die DNA-Sequenzen und Bindungsaffinitäten der nukleären Hormonrezeptoren an ihre HRE sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Aus Tabelle 8 ist ersichtlich, dass der GR mit der höchsten Affinität in picomolaren Konzentrationen ($K_D=100\text{pM}$) an sein entsprechendes HRE bindet.

Damit der GR an das entsprechende HRE binden kann, muss er im Zytoplasma in einer aktiven Form vorliegen. In Abwesenheit von Liganden ist GR im Zytoplasma an sog. *Heat Shock* Proteine (HSP) gebunden [167-171]. Die Affinität des GR zu seinem entsprechenden HRE ist sehr viel geringer, solange GR an HSP gebunden vorliegt [172-174]. Die Anwesenheit eines passenden Liganden, wie Dexamethason, führt zur Abspaltung der HSPs vom GR Komplex [169, 172, 175] und erlaubt dann dessen Bindung an entsprechende HREs [173, 174]. Da durch die Aktivierung die Kernlokalisierungssequenz (NLS) des GRs freigelegt wird, kann der GR-Plasmid

Komplex mit Hilfe des nukleären Transportproteins Importin durch die Kernporen (NPC) in den Kern transportiert werden (siehe auch Kapitel 1.6).

Durch Befunde aus der Literatur lässt sich belegen, dass der GR eine hohe Bindungsaffinität zur entsprechenden DNA-Sequenz im Zytoplasma aufweist.

<i>Hormone Responsive Element (HRE)</i>	Rezeptor-Bindungskonstanten (K_D)				
	GR	PR	AR	MR	ER
ACGGGT GGTACA GAA TGTTCT TTTGGC [112]	0.1 nM	3.5 nM	2.1 nM	nicht bestimmt	bindet nicht
ACGGGT GGAACG CGG TGTTCT TTTGGC [112]	5.14 nM	25.2 nM	12.6 nM	nicht bestimmt	bindet nicht
GGGCCG AGGACG AGT TGTTCT TGGTGC [112]	15.4 nM	13.8 nm	>50 nM	nicht bestimmt	bindet nicht
GGTTCT TGG AGTACT [164, 165] TGTTCT TGA TGTTCT [164]	165 nM <1000 nM	nicht bestimmt	23 nM 70 nM	nicht bestimmt	nicht bestimmt
GTCAGGTCACAGTGACCTGATCAAAGTTAA TGTAACCTCA [166]	bindet nicht	bindet nicht	bindet nicht	bindet nicht	0.2-2 nM

Tabelle 8 Rezeptor-Bindungskonstanten einzelner Hormon Response Elements (HRE)

Zusammengefasste DNA Sequenzen und ihre Bindungskonstanten zu bestimmten Hormonrezeptoren; Glucocorticoid (GR)-, Progesteron (PR)-, Androgen (AR)-, Mineralocorticoid (MR)-, und Estrogen (ER)-Rezeptor.

6.3 Konstruktion des pEGFP_{Luc} mit enthaltenen GRE-Multimeren

Das für diese Studie verwendete Plasmid pEGFP_{Luc} ist in Abb. 4 gezeigt. Die GRE Sequenz wurde als Dimer, Tetramer und Oktamer *downstream* der SV40 Poly A Seite in das Plasmid

pEGFP_{Luc} kloniert. Die verwendete Sequenz 5'-ACGGGT GGTACA GAA TGTTCT TTTGGC-3' bindet mit picomolarer Affinität an den Rezeptor ($K_D \sim 0,1$ nM). Eine PCR der verschiedenen Klone ergab folgende Amplifikate, die mittels Agarosegelelektrophorese detektiert wurden (Abb. 24): 225 bp (pEGFP_{Luc}), 291 bp (pEGFP_{Luc}GRE₂), 357 bp (pEGFP_{Luc}GRE₄) und 489 bp (pEGFP_{Luc}GRE₈).

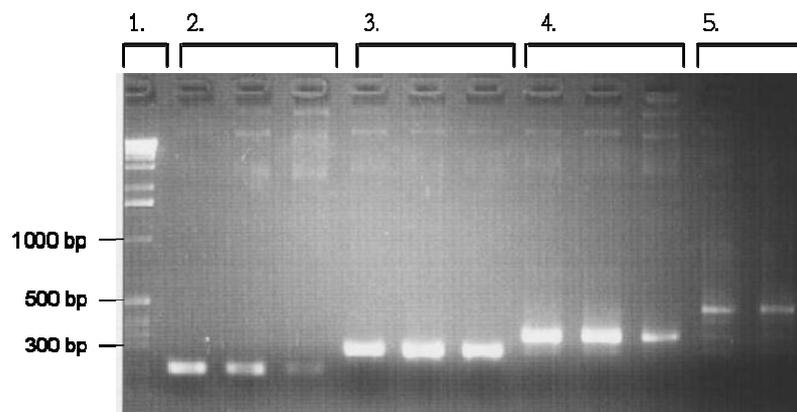


Abb. 24 Konstruktion der Plasmide

Die unterschiedlichen Plasmide, die durch die Klonierung erhalten wurden, wurden mittels PCR untersucht. Die Amplifikate wurden auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen und in TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. 0,5 μ g 1 kb DNA-Ladder wurden als Standard verwendet (Bande 1). pEGFP_{Luc} wurde bei 225bp (Bande 2), pEGFP_{Luc}GRE₂ bei 291 bp (Bande 3), pEGFP_{Luc}GRE₄ bei 357 bp (Bande 4) und pEGFP_{Luc}GRE₈ bei 489 bp (Bande 5) detektiert.

6.4 Der Glucocorticoidrezeptor als Transkriptionsfaktor im Zytoplasma

Der GR konnte in Zelllinien, die für *in vitro* Transfektionsstudien verwendet wurden, mittels Western Blot Analyse detektiert werden. Dabei wurde ein polyklonaler Antikörper verwendet [176]. Proteine aus Zelllysaten von A549-, BEAS-2B- und COS-7-Zellen wurden elektrophoretisch getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Nach Inkubation der Membran mit dem ersten Antikörper und indirekter Immunoperoxidasereaktion konnte das Signal der GR-Antikörperkomplexe bei 94 kDa in A549 und BEAS-2B Zelllysaten (Abb. 25; Spur 1/2) detektiert werden. COS-7 Zellen wurden 48h vor Herstellung des Zellextraktes mit

CFP-GR transfiziert. Die Bande des Antikörper-Fusionsprotein-Komplexes wurde bei 108 kDa detektiert (Abb. 25; Spur 3), wie bei Nishi et al. [113] beschrieben.

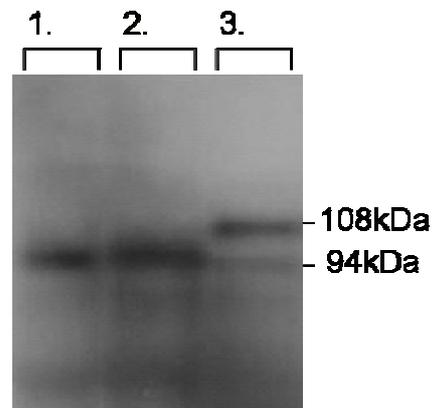


Abb. 25 Nachweis des Glucocorticoidrezeptors in verschiedenen Zelllinien bzw. des CFP-GR Fusionsproteins in transfizierten COS-7 Zellen mittels Western Blot Analyse

Die Proteine aus GR-haltigen Zelllysaten wurden nach elektrophoretischer Trennung mittels Elektroblothing auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit polyklonalem GR Antikörper inkubiert. Nach indirekter Immunperoxidase-Reaktion waren auf dem Röntgenfilm die Banden des GR-Antikörper-Komplexes bei 94 kDa (1. / 2.) bzw. die des CFP-GR-Antikörper-Komplexes in den transfizierten COS-7 Zellen bei 108 kDa (3.) zu erkennen.

6.5 *Shuttling* des Transkriptionsfaktors vom Zytoplasma in den Zellkern

Der GR wird in verschiedenen Gewebe- und Zelltypen exprimiert [158]. In Abwesenheit von entsprechenden Hormonen ist der GR hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert, was sowohl für unveränderten GR (untersucht mit Immuno-Zytochemie) als auch für GR, der mit CFP (*cyan fluorescent protein*) fusioniert wurde (GR-CFP), zutrifft [113, 159-161]. In Anwesenheit von passenden Liganden, wie zum Beispiel Dexamethason, wurde in früheren Untersuchungen die zeit- und dosis-abhängige Aufnahme des Rezeptors in den Zellkern gemessen. Bei einer Konzentration des Dexamethasons von 10 nM wurde der Rezeptor innerhalb von 10 min. in den Zellkern aufgenommen (halb-maximale nukleäre Akkumulation ~5 min.). Bei einer Konzentration von 1 nM dauerte die Aufnahme 30 min. (halb-maximale nukleäre Akkumulation ~10 min.) [113, 161]. Darüber hinaus ist die Aufnahme des GR in den Zellkern liganden-

spezifisch. Der Glucocorticoidrezeptor Antagonist RU486 verursacht ebenfalls eine Aufnahme in den Zellkern; bei Liganden mit niedriger Affinität zum GR, wie Progesteron, oder nicht bindenden Liganden, wie 17 β -Estradiol, wurde keine Translokalisierung beobachtet [161]. Zusätzlich zu der liganden-aktivierten Aufnahme in den Zellkern wird der GR in geringem Ausmaß kontinuierlich zwischen dem Zytoplasma und dem Kern hin und her transportiert [177, 178]. Dies zeigt, dass der GR in hohen Konzentrationen im Zytoplasma vorliegt und dass pDNA in ausreichender Menge gebunden werden kann. Die (liganden-abhängige) Aufnahme des Rezeptors vom Zytoplasma in den Zellkern ist ebenfalls gewährleistet.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aufnahme des GR in den Zellkern ein rezeptor-spezifisch induzierbarer Prozess ist und der GR für die Entwicklung eines transkriptionsfaktor-basierten Gentransfers geeignet ist.

COS-7 Zellen wurden mit dem Plasmid pECFP-GR transfiziert, um das *Shuttling* des CFP-GR Rezeptors nach Dexamethasongabe fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen für 15 h in 10 ml serumfreiem D-MEM inkubiert (GR im Zytoplasma) und das *Shuttling* des blauen Glucocorticoidrezeptors vom Zytoplasma in den Zellkern nach Dexamethasongabe wurde fluoreszenzmikroskopisch beobachtet. Für die Untersuchungen wurde eine hohe Konzentration von 10 μ M Dexamethason verwendet. Wie erwartet, konnte das CFP-GR Fusionsprotein 1 h nach Dexamethason-Applikation im Zellkern von transfizierten COS-7 Zellen detektiert werden (Abb. 26 D-F). Ohne Dexamethason (serumfreies D-MEM) befand sich der CFP-GR größtenteils im Zytoplasma der Zellen (Abb. 26 A-C).

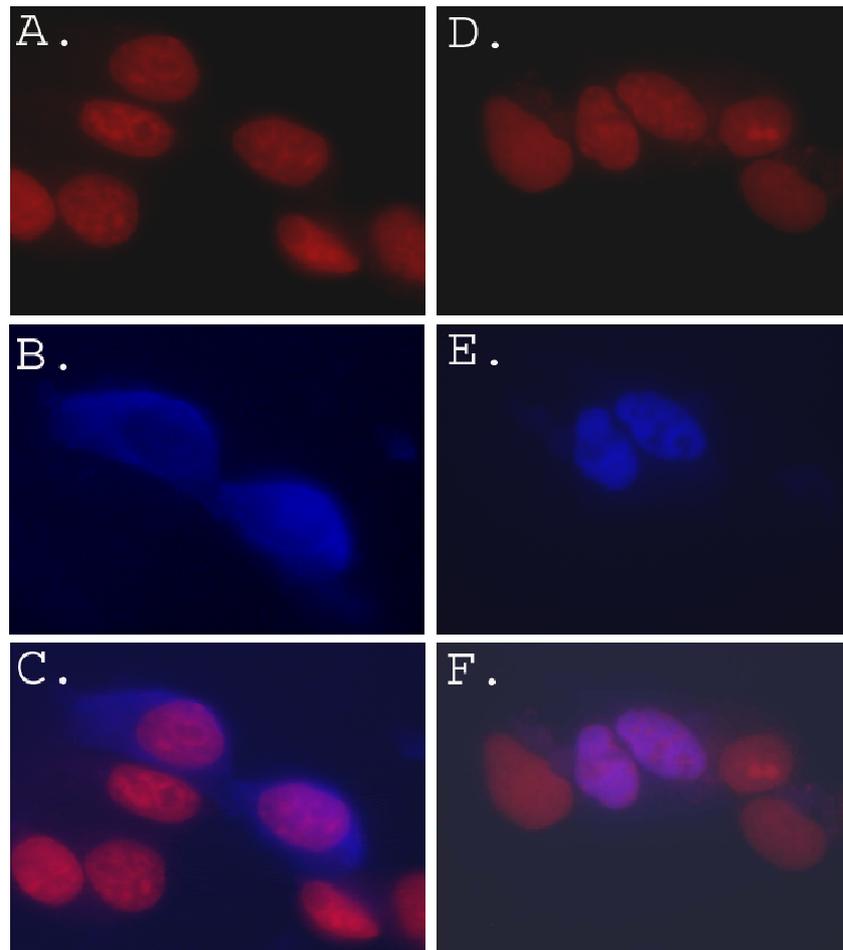


Abb. 26 Nachweis des *Shuttlings* des CFP-Glucocorticoidrezeptor Fusionsproteins in der Zelle nach Dexamethasonapplikation mittels Fluoreszenzmikroskopie

Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde blauer CFP-GR im Zytoplasma von transfizierten COS-7 Zellen detektiert, wenn die Zellen für mindestens 2 h in serumfreiem Medium kultiviert wurden (linke Spalte; A. Propidiumiodid gelabelte Zellkerne (rot), B. blauer CFP-GR, C. übereinander gelegte Bilder A. und B.). 1 h nach der Zugabe von Dexamethasone 10 μ M konnte man das CFP-GR Fusionsprotein im Zellkern der COS-7 Zellen detektieren (rechte Spalte; D. Propidiumiodid gelabelte Zellkerne (rot), E. CFP-GR (blau), F. übereinander gelegte Bilder D. und E.).

6.6 Bindung des Glucocorticoidrezeptors an die pDNA Sequenz

Die Bindung des Glucocorticoidrezeptor-Proteins an die in der Untersuchung verwendete GRE-Sequenz wurde mittels *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) bestimmt. Dabei wurde radioaktiv gelabeltes GRE₂-Oligonukleotid verwendet. Zelllysate von BEAS-2B Zellen, die den

GR exprimieren, wurden mit γ - ^{32}P gelabeltem GRE_2 inkubiert. Daraufhin konnte im Polyacrylamid-Gel eine Retardierung des gelabelten Oligonukleotids durch die Bindung an das GR Protein beobachtet werden (*Shift*; Abb. 27; Bande 2). Der Zusatz eines 100-fachen Überschusses an pEGFP LucGRE_2 zum Reaktionsansatz verminderte den *Shift* (Abb. 27; Bande 3). Nach Zusatz von pEGFP Luc zum Reaktionsansatz konnte keine kompetitive Verdrängung der GR- GRE_2 Bindung durch das zugesetzte Plasmid beobachtet werden (Abb. 27; Bande 4). Aus diesen Ergebnissen lässt sich eine spezifische Bindung von GR an die GRE-Sequenz im Plasmid ableiten.

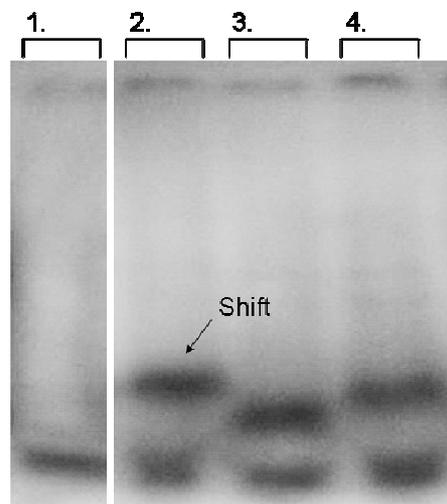


Abb. 27 Untersuchung der Bindung des GRE_2 Oligonukleotids an Glucocorticoidrezeptoren im Zelllysate durch *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA)

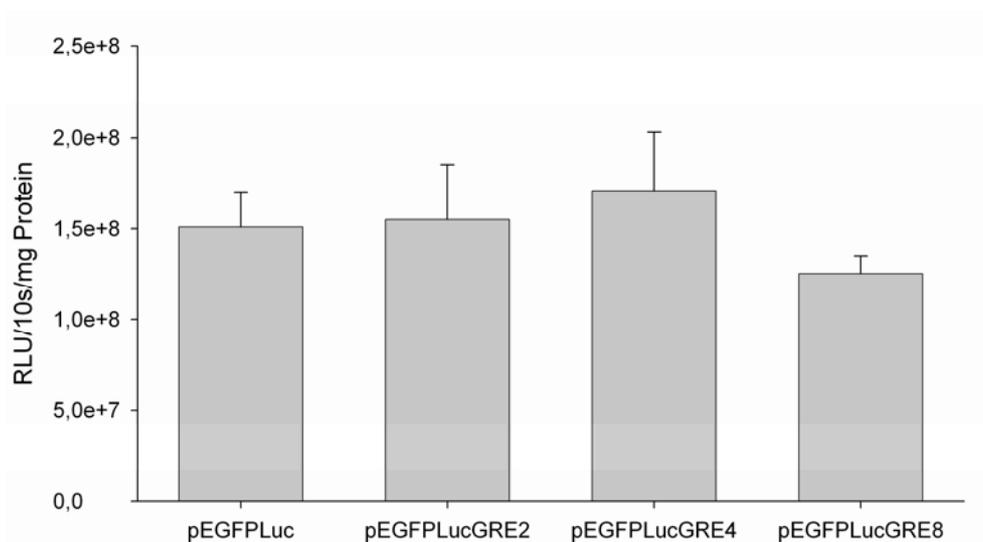
Nach Inkubation von aus BEAS-2B Zellen gewonnem GR-haltigem Zelllysate mit $[\gamma$ - $^{32}\text{P}]$ -gelabeltem GRE_2 Oligonukleotid (radioaktive Sonde, im Gel Bande 1) zeigte sich im Polyacrylamidgel eine Retention der Protein-DNA-Komplexe (2, *Shift*). Durch Zugabe von pEGFP LucGRE_2 in 100-fachem Überschuss zu der Reaktionslösung ließ sich die Retention durch kompetitive Verdrängung der radioaktiven Sonde teilweise aufheben (3), nicht jedoch durch Zugabe von pEGFP Luc im Überschuss (4).

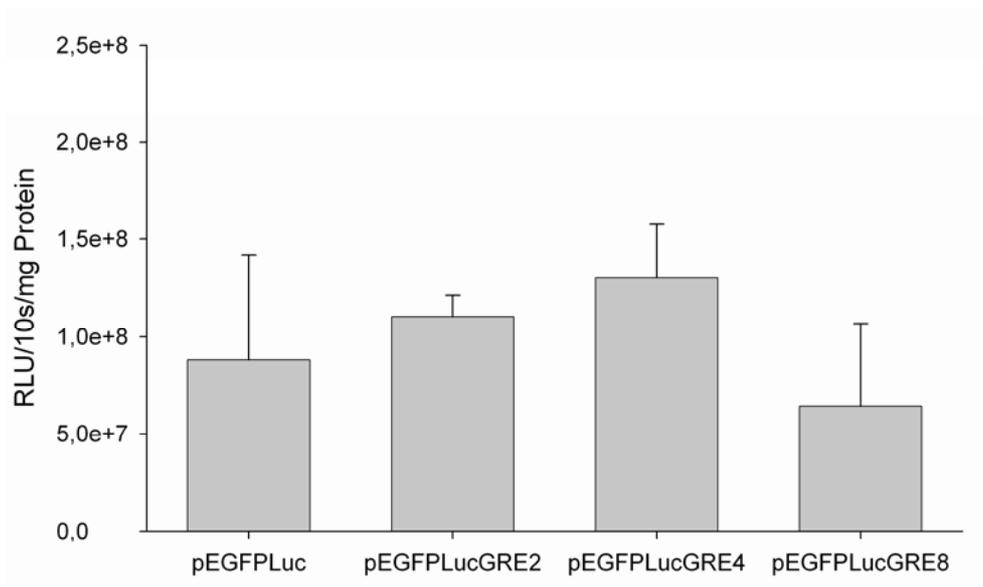
6.7 Transfektion von BEAS-2B Zellen mit pEGFP_{Luc}-GRE₀₋₈

Die Elektroporation von BEAS-2B Zellen und die nachfolgende Kultivierung der Zellen in Medium ohne Glucocorticoide führte wie erwartet zu keiner gesteigerten Luziferaseexpression von pEGFP_{Luc}GRE₂₋₈ im Vergleich zu pEGFP_{Luc} (Abb. 28 B). In Abwesenheit von Glucocorticoidhormonen liegt der GR in seiner inaktiven Form im Zytoplasma vor und kann somit nicht zum verbesserten Transport der pDNA in den Zellkern beitragen. Allerdings konnte auch in Experimenten, in denen nach der Elektroporation Dexamethason zu den Zellen gegeben wurde, keine verbesserte Genexpression gemessen werden (Abb. 28 A). Als Grund dafür könnte man die hohe Mitoserate subkonfluenten Zellkulturen erwägen. Dabei wird die Aufnahme der pDNA in den Zellkern ermöglicht, wenn während der Mitose die Kernmembran zerstört ist [179]. Möglicherweise wird dadurch der Effekt des nukleären Transports durch den GR überdeckt.

In weiteren Versuchen wurde daher die Zahl der Zellen bestimmt, die nach der Transfektion von **konfluenten** BEAS-2B Zellen mit *Metafectene* EGFP exprimierten. Dabei konnte nach der Transfektion mit pEGFP_{Luc}GRE₂ ein Anstieg der EGFP exprimierenden Zellen um das 2,9-fache detektiert werden (0.36 ± 0.29 pEGFP_{Luc}; 1.06 ± 0.41 pEGFP_{Luc}GRE₂).

A.



B.**Abb. 28** Luziferaseexpression 24 h nach Elektroporation von BEAS-2B Zellen

Zellsuspensionen, die 300.000 Zellen in 400 μ l MEM Medium und 10 μ g pEGFPucGRE₀₋₈ enthielten, wurden in 1 mm Küvetten mit 200 V und 1600 μ F im BioRad Genpulsar II elektroporiert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseexpression mit einem Bioluminometer Wallac Viktor² bestimmt. In Abb. A wurden die Zellen nach der Elektroporation für 5 h in Airway Epithelial Growth Medium mit Wachstumsfaktoren und Dexamethason kultiviert und dann für weitere 19 h ohne Dexamethason. In Abb. B wurden die Zellen nach der Elektroporation 24 h in Airway Epithelial Growth Medium mit Wachstumsfaktoren aber ohne Hydrocortison/Dexamethason kultiviert.

6.8 Intravenöse Applikation von pEGFPucGRE₀₋₂ DOTAP-Dexamethason Liposomen

Die beiden Plasmide pEGFPucGRE₂ und pEGFPuc wurden mit DOTAP-Dexamethason-Liposomen komplexiert und in die Schwanzvene von BALB/c Mäusen injiziert, um den Transkriptionsfaktor-vermittelten Gentransfer mit Hilfe des GR *in vivo* zu untersuchen.

Die Luziferaseexpression wurde in der Mauslunge durch *in vivo* Biolumineszenz-Messung 24 h nach der Injektion bestimmt (Abb. 29 A/B). Verglichen mit pEGFPuc war die Luziferaseexpression nach Injektion von pEGFPucGRE₂ 2,5-fach erhöht (n=3) (Abb. 29 C). Die

Behandlung der Mäuse mit pEGFP_{Luc}GRE₄ verbesserte die Luziferaseexpression nicht weiter (Daten nicht gezeigt).

Das Ergebnis zeigt, dass Dexamethason, das in das Transferagens inkorporiert ist, die Transgenexpression eines GRE-enthaltenden Plasmids in der Lunge *in vivo* verbessern kann.

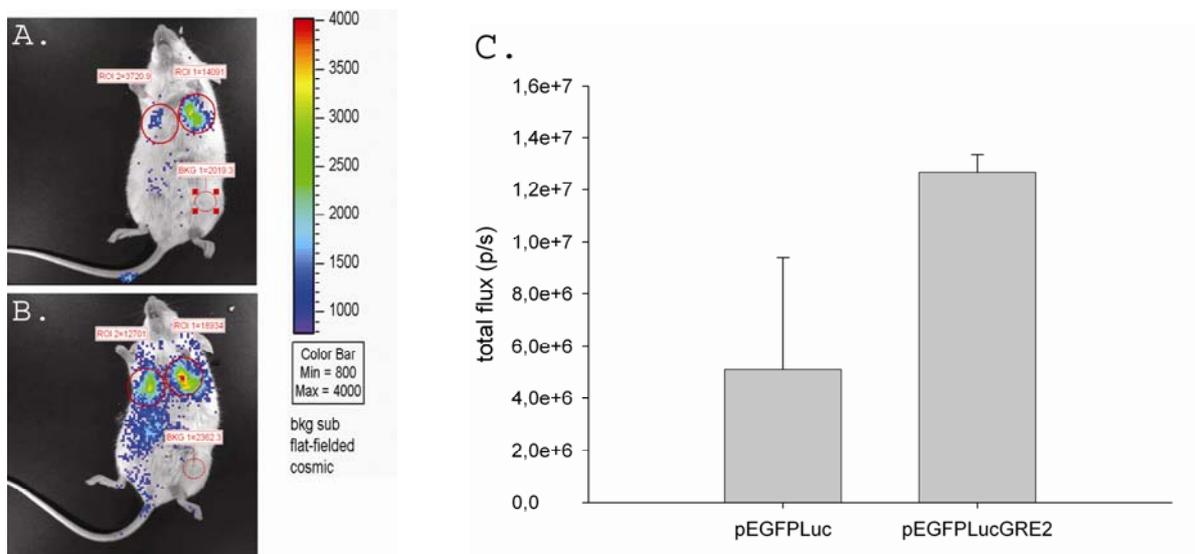


Abb. 29 Luziferaseexpression 24 h nach der Injektion von 40 µg pEGFP_{Luc}GRE_{0,2} komplexiert mit DOTAP-Dexamethason in die Schwanzvene von Mäusen

250 µl pEGFP_{Luc}GRE_{0,2}-DOTAP-Dexamethason in wässriger Lösung wurden in die Schwanzvene von weiblichen BALB/c Mäusen injiziert. 24 h nach der Behandlung wurden die Mäuse anaesthetisiert und jeder Maus wurden 3 mg Luziferin in 100 µl wässriger Lösung intraperitoneal verabreicht. 10 min. nach der Injektion wurde die Luziferaseexpression mit dem IVIS-100 Imaging System (Xenogen) gemessen. In Abb. A ist die Luziferaseexpression in der Mauslunge 24 h nach Behandlung mit pEGFP_{Luc}-Safeplexen gezeigt. In Abb. B wurde die Maus mit pEGFP_{Luc}GRE₂-Safeplexen behandelt. In Abb. C sind die gemessenen Photonen pro Sekunde (*total flux*, p/s) für die beiden Plasmide aufgetragen und als Mittelwert ± Standardabweichung der Mittelwerte angegeben (n=3).

6.9 Aerosolapplikation von PEI-pEGFPLucGRE_{0,2} in die Mauslunge

Zur weiteren Untersuchung des Gentransfers mit Hilfe des GR als Transkriptionsfaktor wurden PEI-pEGFPLuc oder PEI-pEGFPLucGRE₂ von Mäusen in der Vernebelungskammer inhaliert. 2 h nach der Aerosolapplikation erhielt ein Teil der Mäuse 1 mg Dexamethason intraperitoneal. In den Mäuselungen ohne Dexamethasonbehandlung war die Luziferaseexpression der Plasmide pEGFPLuc und pEGFPLucGRE₂ statistisch nicht unterschiedlich (Abb. 30). Dagegen war die Genexpression durch pEGFPLucGRE₂ 4,7-fach höher als durch pEGFPLuc, wenn 2h nach der Aerosolapplikation Dexamethason gegeben wurde (n=5; p≤0,05).

Das zeigt, dass Dexamethason, das nach der Aerosolapplikation verabreicht wird, die Genexpression von Plasmiden, die GRE-Sequenzen enthalten, in der Lunge verbessern kann.

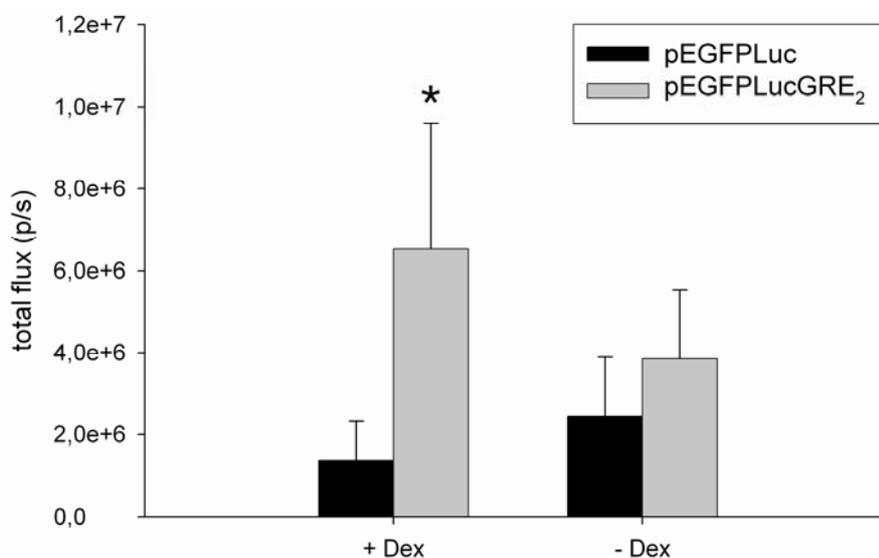


Abb. 30 Aerosolapplikation von PEI-pEGFPLuc und PEI-pEGFPLucGRE₂ Partikeln mit oder ohne Dexamethasongabe 2h nach der Inhalation

10 weibliche BALB/c Mäuse inhalierten 8 ml wässrige PEI-pEGFPLuc oder PEI-pEGFPLucGRE₂ Lösung in einer Ganzkörpervernebelungskammer (1mg pEGFPLucGRE₂ oder pEGFPLuc, N/P=10). 5 Mäuse jeder Gruppe erhielten 2 h nach der Aerosolapplikation 1 mg Dexamethason intraperitoneal. 24 h nach der Behandlung wurden die Mäuse

anaesthetisiert und jeder Maus wurden 3 mg Luziferin in 100 μ l wässriger Lösung intraperitoneal (pH=7,4) appliziert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes angegeben (n=5). Mäuse, die pEGFP_{Luc}GRE2 und Dexamethason erhielten, zeigten eine 4,7-mal höhere Genexpression im Vergleich zu Mäusen, die pEGFP_{Luc} und Dexamethason erhielten ($p \leq 0.05$).

6.10 Zusammenfassende Betrachtung des Gentransfers mit Hilfe des Glucocorticoidrezeptors als Transkriptionsfaktor

Wie bereits im Kapitel 6.1 beschrieben, stellt die Verwendung von GR als Transkriptionsfaktor eine gute Strategie zur Verbesserung der Gentransfereffizienz nichtviraler Genvektoren dar. Dabei wird der Gentransfer verbessert, indem vermutlich die Aufnahme der Gentransferkomplexe in den Zellkern durch die Kernporen (NPC) vermittelt wird.

Das Glucocorticoidrezeptor-System wurde schon früher untersucht, zum Beispiel von Choi et al. [180], der Poly(amidoamin)dendrimere, die mit Dexamethason konjugiert waren, verwendet hat. Choi et al. beobachteten eine geringere Toxizität und eine höhere Gentransfereffizienz der Dexamethason-Dendrimere in Zellkulturexperimenten im Vergleich zu PEI und Polyamidoamin (PAMAM)-Dendrimeren. Auch eine direkte Konjugation des Dexamethasons an die pDNA über eine *Peptide Nucleic Acid (PNA)-Clamp* führte zu einer Akkumulation der konjugierten pDNA im Zellkern [181]. Allerdings limitiert eine komplexe und kostenintensive chemische Kopplung einen weitverbreiteten Gebrauch der beschriebenen (Gen)Vektoren. Die Insertion der GRE-Sequenz in Plasmide stellt hingegen eine einfache Methode zur Erhöhung der Transfereffizienz durch erhöhte Aufnahme in den Zellkern dar. In kompetitiven EMSA Experimenten konnte die Bindung von pDNA, die eine dimere GRE-Sequenz enthielt, an GR beobachtet werden. Außerdem wurde der dexamethasonabhängige Transport des GR in den Zellkern gezeigt, indem ein fluoreszierendes Fusionsprotein des GR verwendet wurde (vgl. Kapitel 6.5).

Nachdem die Bindung des GR an pDNA, die GRE-Sequenzen enthielt, untersucht wurde, wurden *in vitro* Transfektionsexperimente mit BEAS-2B Zellen, die von humanen Bronchialepithelzellen gewonnen wurden, und mit A549 Lungenkarzinomzellen durchgeführt. Diese Zellen exprimieren den GR endogen sehr stark, was durch Westernblot-Analyse bestätigt werden konnte (vgl 6.4).

Die Zelllinien wurden für die Testung des GR-basierten Gentransfersystems als ein Model für die Gentherapie von erworbenen oder vererbten monogenetischen Lungenkrankheiten, wie z.B. der zystischen Fibrose, verwendet. In einer ersten Reihe von Experimenten wurden die Zellen mittels Elektroporation transfiziert, da dabei nackte pDNA direkt ins Zytoplasma gelangt und diese so an den GR binden kann, ohne vorher von weiteren Transfektionsreagenzien dekomplexiert werden zu müssen. Trotzdem konnte keine erhöhte Gentransfereffizienz durch Plasmide mit GRE-Multimeren beobachtet werden (siehe Abb. 28). Als Grund dafür könnte man die hohe Mitoserate subkonfluenten Zellkulturen erwägen. In früheren Studien wurde schon gezeigt, dass in Zellkultur pDNA in den Kern aufgenommen werden konnte, nachdem während der Mitose die Kernmembran zerstört war [27, 179]. Dieser Effekt könnte den Effekt des nukleären Transports durch den GR überdecken. Bei der Methode der Elektroporation ist die Verwendung von konfluenten Zellen nicht möglich, da die Zellen für die Elektroporation aus der Zellkulturflasche gelöst werden und als Suspension in Küvetten behandelt werden, wobei die Kontaktinhibierung des Wachstums sofort unterbrochen wird. Allerdings konnte in FACS Untersuchungen eine Erhöhung der EGFP exprimierenden Zellen nach Transfektion mit pEGFPLucGRE₂ im Vergleich zu pEGFPLuc detektiert werden. Dies zeigt, dass durch das GRE-Segment die Zahl der Zellen, die das Plasmid exprimieren, steigt. Im Zelllysat (Luziferase-Messung) wurde allerdings kein Effekt detektiert.

Deshalb wurde im nächsten Schritt die Effizienz von GR-basierten Gentransfersystemen *in vivo* direkt am Lungengewebe von Mäusen untersucht. Dort ist *in vivo* eine sehr geringe Mitoserate zu erwarten. Dabei wurden pEGFPLuc und pEGFPLucGRE₂ jeweils mit Safeplexen komplexiert. Safeplexe wurden schon früher in Mausstudien untersucht, wobei eine effiziente Transfektion des Lungengewebes nach intravenöser Gabe festgestellt wurde [17]. Für die Untersuchungen war so der „Induktor“ schon im Gentransferkomplex enthalten. 24 h nach intravenöser Gabe konnte im Vergleich zu pEGFPLuc eine 2,5-fach höhere Luziferasegenexpression in Mäusen gemessen werden, die pEGFPLucGRE₂ erhielten.

Dieses Ergebnis zeigt, dass *in vivo* die Erhöhung der Genexpression durch den GR möglich ist. Das Ergebnis bestätigt auch das einer anderen Studie, in der NFκB als Transkriptionsfaktor zur

Erhöhung des Transfers in den Zellkern verwendet wurde, wobei NFκB durch TNF-α aktiviert wurde. In dieser Studie wurden fünf Wiederholungen des 11 bp I κ B Motives, das mit picomolarer Affinität an NFκB bindet, in ein Plasmid kloniert, das für Luziferase kodiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die TNF-α induzierte Aufnahme in den Zellkern von Plasmiden, die I κ B Motive enthielten, in einer NFκB-abhängigen Erhöhung der Genexpression resultierte [103]. *In vivo* führt die intravenöse Injektion von Formulierungen, die auf kationischen Lipiden basieren, zu einer kurzzeitigen Inflammation in den Mauslungen, was wiederum zu einer Aktivierung von NFκB führt. Die Gabe einer kationischen Lipidformulierung, die Plasmide mit I κ B Motiven enthält, induzierte eine 4,7-fache Genexpression in den Lungen im Vergleich zum Kontrollplasmid ohne I κ B Motiv [104].

Um zu sehen, ob die *in vivo* Ergebnisse auch nach Aerosolapplikation zu erzielen sind, wurden weitere Experimente durchgeführt. In diesem Fall wurden die Plasmide pEGFP κ B und pEGFP κ B_{GRE₂} jeweils mit dem kationischen verzweigten Polymer PEI 25 kDa komplexiert und mit der Ganzkörper-Vernebelungskammer in die Mauslungen vernebelt. Einem Teil der Tiere wurde 2h nach der Aerosolapplikation Dexamethason intraperitoneal verabreicht, um den GR in den Lungen zu aktivieren. Während die Luziferaseexpression nach Dexamethasongabe durch pEGFP κ B_{GRE₂} 4,7-mal höher war als durch pEGFP κ B, wurden ohne Dexamethasonbehandlung keine unterschiedlichen Expressionen gefunden. Diese Ergebnisse bestätigen also die nach intravenöser Gabe von Safeplexen beobachtete Erhöhung der Luziferaseexpression durch pEGFP κ B_{GRE₂}.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass *in vivo* die Genexpression durch glucocorticoidrezeptor-vermittelten Transport in den Zellkern mit Plasmiden, die GRE-Multimere enthalten, gesteigert werden kann. In zukünftigen Studien muss dieses System verbessert werden, zum Beispiel durch I) die Optimierung des Intervalls zwischen Gentransferkomplexgabe und Dexamethasongabe sowie durch II) eine genauere Analyse der Kinetik der Dekomplexierung der pDNA Komplexe im Zytoplasma, was der erste Schritt ist, bevor die pDNA an den Transkriptionsfaktor binden und so in den Zellkern transportiert werden kann. III) Es muss ein möglicher anti-inflammatorischer Effekt des Dexamethasons untersucht

werden, der synergistisch die Transfereffizienz erhöhen könnte, dadurch dass die Entzündungsreaktion (und die damit verbundene erniedrigte Genexpression), die durch CpG Motive in pDNA ausgelöst wird, abgeschwächt werden könnte.