

UNTERSUCHUNGEN ZUM NICHTVIRALEN
GENTRANSFER IN DIE LUNGE IM MAUSMODEL –
EINFLUSS DER APPLIKATIONSART,
MOLEKULARBIOLOGISCHER FAKTOREN UND
MAGNETISCHER DRUG
TARGETINGMECHANISMEN

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

PETRA DAMES
aus Heidenheim an der Brenz

Berlin im Dezember 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer H. Müller

2. Gutachter: Priv. Doz. Dr. Joseph Rosenecker

Disputation am 06.06.2008

Inhaltverzeichnis

Inhaltverzeichnis

1 Einleitung	8
1.1 Methoden für den Gentransfer	8
1.2 Aerosoltherapie	10
1.3 Gentransfer in die Lunge: Extra- und intrazelluläre Barrieren	13
1.4 Polyethylenimin (PEI) als Vektor für die Aerosoltherapie	15
1.5 Magnetfeldgesteuerte Aerosolapplikation	18
1.6 Steigerung der Gentransfereffizienz nichtviraler Genvektoren mit Hilfe von Transkriptionsfaktoren	20
1.7 Ziele der Arbeit	24
2 Methoden	27
2.1 Klonierung der Plasmid DNA	27
2.2 Zellkulturen	31
2.3 Detektion des CFP-GR Fusionsprotein mittels Epifluoreszenzmikroskopie	32
2.4 Western Blot Analyse verschiedener Zellysate	33
2.5 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	34
2.6 Herstellung von DOTAP-Dexamethason Liposomen	36
2.7 In vitro Transfektionen	37
2.8 In vivo Applikation von pEGFPLucGRE₀₋₂ Vektoren	39

2.9 Vernebelung und intranasale Instillation von PEI Genvektorkomplexen zur Untersuchung der Clearance bzw. der Lungenfunktion.....	42
2.10 Bestimmung der pDNA in Mauslungenkompartimenten mittels <i>Real Time</i> PCR.....	48
2.11 Luziferaseaktivitätsmessung im Lungengewebe mit dem Röhrenluminometer.....	50
2.12 Versuche mit superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln (SPION).....	51
2.13 Größenmessung mittels Photonenkorrelationsspektroskopie und Bestimmung des Zetapotentials.....	58
2.14 Statistische Auswertung.....	59
<i>3 pDNA-Clearance und Kinetik der Luziferaseexpression in der Mauselunge nach Aerosolapplikation oder intranasaler Instillation von PEI-pDNA Komplexen....</i>	60
3.1 Konzentrationsabhängige Stabilität von PEI-pDNA Komplexen.....	60
3.2 Pulmonale pDNA-Clearance nach Aerosolapplikation oder intranasaler Instillation von PEI-pDNA Komplexen.....	61
3.3 Untersuchung der Anzahl der BALF-Zellen und der aktivierten Makrophagen nach Aerosolapplikation oder nach intranasaler Instillation.....	64
3.4 Kinetik der Luziferaseexpression nach Vernebelung oder nach intranasaler Instillation der PEI-pDNA Komplexe.....	68
3.5 Zusammenfassende Betrachtung der Lungenclearance und der Kinetik der Luziferaseexpression.....	70
<i>4 Lungenfunktionsmessung nach Aerosolapplikation oder intranasaler Instillation von PEI-pDNA Partikeln.....</i>	75
4.1 Histologische Untersuchung des Lungengewebes der Mäuse nach Aerosolapplikation oder intranasaler Instillation von PEI-pDNA Komplexen.....	75

4.2 Lungenfunktionsmessung nach Aerosolapplikation bzw. intranasaler Instillation von PEI-pDNA Komplexen.....	77
4.3 Lungenfunktionsmessungen nach Aerosolapplikation von PEI-pCpG oder PEI-CpG-backbone.....	83
4.4 Zusammenfassung des Einflusses der Aerosolapplikation oder intranasalen Instillation auf die Lungenfunktion.....	87
<i>5 Untersuchung und Optimierung der magnetfeldgesteuerten Aerosolapplikation im Mausmodel.....</i>	95
5.1 SPION und pDNA Deposition in der Mauslunge nach Vernebelung via intratrachealer Intubation.....	95
5.2 Magnetfeldgesteuerte Aerosolgenapplikation in der Vernebelungskammer.....	106
5.3 Zusammenfassende Betrachtung der Genexpression und pDNA Deposition in Mauslungen nach magnetfeldgesteuerter Aerosolapplikation in der Vernebelungskammer.....	111
<i>6 Gentransfer mit Hilfe des Glucocorticoidrezeptors als Transkriptionsfaktor.....</i>	116
6.1 Nichtviraler Gentransfer mit Hilfe des Glucocorticoidrezeptors als Transkriptionsfaktor.....	116
6.2 Bindungsaffinität des Glucocorticoidrezeptors an <i>Hormone Responsive Elements</i> – Auswahl der zu klonierenden DNA Sequenz.....	117
6.3 Konstruktion des pEGFPLuc mit enthaltenen GRE-Multimeren.....	118
6.4 Der Glucocorticoidrezeptor als Transkriptionsfaktor im Zytoplasma.....	119
6.5 <i>Shuttling</i> des Transkriptionsfaktors vom Zytoplasma in den Zellkern.....	120
6.6 Bindung des Glucocorticoidrezeptors an die pDNA Sequenz.....	122

6.7 Transfektion von BEAS-2B Zellen mit pEGFP_{Luc}GRE₀₋₈.....	124
6.8 Intravenöse Applikation von pEGFP_{Luc}GRE₀₋₂ DOTAP-Dexamethason Liposomen.....	125
6.9 Aerosolapplikation von PEI- pEGFP_{Luc}GRE₀₋₂ in die Mauslunge.....	127
6.10 Zusammenfassende Betrachtung des Gentransfers mit Hilfe des Glucocorticoid- rezeptors als Transkriptionsfaktor.....	128
<i>7 Zusammenfassung.....</i>	<i>132</i>
<i>8 Abstract.....</i>	<i>138</i>
<i>9 Literaturverzeichnis.....</i>	<i>144</i>
<i>Danksagung.....</i>	<i>158</i>
<i>Publikationsliste.....</i>	<i>160</i>
<i>Lebenslauf.....</i>	<i>162</i>