

1 Einleitung

1.1 Methoden für den Gentransfer

Ziel einer somatischen Gentherapie ist es, angeborene und erworbene Krankheiten kausal zu therapieren, indem Gene in Körperzellen eines Patienten eingebracht, verändert oder ersetzt werden. Dabei muss durch das Einschleusen der Gene in den Zellkern eine Korrektur der fehlerhaften Bildung des Proteins erreicht werden, welches durch den Gendefekt betroffen ist.

Es stehen drei methodisch unterschiedliche Ansätze zur Verfügung, um Gene in Zellen einzubringen: das Einschleusen von nackter Plasmid-DNA (pDNA), der Gentransfer mit viralen Gentransfercarriern, auch virale Genvektoren genannt, und der Gentransfer mit nichtviralen Gentransfercarriern bzw. nichtviralen Genvektoren. Erstmals gelang es 1979, ein Gen in Zellen von Mäusen einzuschleusen – das Thymidin Kinase Gen wurde in murine Knochenmarkszellen transferiert [1, 2].

Die Applikation nackter pDNA kann auf intravenösem, intratrachealem oder intramuskulärem Weg erfolgen [3, 4]. Durch Elektroporation (Anlegen eines elektrischen Feldes) kann der Eintritt der pDNA in die Zelle erleichtert werden [5-7].

Beim viralen Gentransfer benutzt man die evolutionär erworbene Fähigkeit von Viren, Erbinformation in Zellen einzubringen. Anfang der 1980er Jahre wurden erstmals virale Genvektoren entwickelt, denen die Fähigkeit zur Replikation fehlte [8, 9]. Von Fischer und Kollegen wurde die erste erfolgreiche Gentherapie einer Erbkrankheit überhaupt durchgeführt. Sie korrigierten mit Hilfe retroviraler Genvektoren, über eine *ex vivo* Transfektion den Gendefekt, der eine Variante des schweren kombinierten Immundefizienzsyndroms (X-SCID) zugrunde liegt [10, 11]. Allerdings führen virale Genvektoren häufig zu immunologischen Reaktionen [12, 13], weshalb nach einer wiederholten Anwendung der Gentherapie eine erhebliche Abnahme der Genexpression beobachtet wurde [14, 15]. Der eigentliche Vorteil des

viralen Gentransfers, dass mit Hilfe bestimmter Viren die Erbinformation in das menschliche Genom stabil eingebaut werden kann, erwies sich hinsichtlich einer möglichen Mutagenese durch unkontrollierten Einbau als Risiko [16].

Die Gentherapie basierend auf nichtviralen synthetischen Genvektoren hat in den vergangenen Jahren große Fortschritte gemacht und ist in klinischen Studien erprobt worden. Dabei werden die positiven Eigenschaften des viralen Gentransfers imitiert während gleichzeitig die Nachteile vermieden werden sollen. Ideale Gentransfersysteme sollten biologisch abbaubar und nicht toxisch sein, keine Immunantwort hervorrufen und in der Lage sein, in die Zielzelle zu gelangen und dort eine effiziente Genexpression erzielen. Kationische Liposomen und kationische Polymere sind bislang die erfolgreichsten nichtviralen Gentransfersysteme bzw. synthetische Gentransfercarrier. Diese Genvektoren weisen unter physiologischen Bedingungen eine positive Ladung auf und können so über elektrostatische Anziehungskräfte die negativ geladene pDNA binden.

Der Gentransfer mit Hilfe von synthetischen Gentransfercarriern bietet einige Vorteile gegenüber dem Gentransfer mit Hilfe von rekombinanten Viren. Beispielsweise kommt es bei synthetischen Gentransfercarriern zu keiner Immunreaktion, die bei replikations-defizienten Viren hauptsächlich durch virale Proteine hervorgerufen wird [17, 18]. 1999 starb ein Patient, der an einer Ornithin-Cytosin-Transferase-Defizienz erkrankt war, auf Grund einer unerwarteten schweren Immunreaktion, die durch die Gabe veränderter adenoviraler Vektoren zur Gentherapie hervorgerufen wurde [19, 20]. Außerdem führte die Behandlung von Kindern, die an einer schweren Immunschwäche (*X-SCID*, *Severe Combined Immunodeficiency Disorder*) erkrankt waren, mit einem rekombinanten Retrovirus in vier von vierzehn Fällen zur Entwicklung einer Blutkrankheit ähnlich der Leukämie. Diese schwere Nebenwirkung trat auf, weil das Genom des rekombinanten Retrovirus in das LMO-2-Gen integriert und das Gen dabei aktiviert wurde. LMO-2 ist für die frühe Entwicklung von Blutzellen mitverantwortlich [21, 22].

Da solche Nebenwirkungen bislang für synthetische Gentransfercarrier nicht bekannt geworden sind, geht man davon aus, dass sie im Vergleich zu rekombinanten Viren eine deutlich höhere

Sicherheit besitzen. Zusätzlich sind nichtvirale Genvektoren nicht-pathogen und weniger immunogen. Außerdem besitzen rekombinante Viren eine eingeschränkte DNA-Transportkapazität von ungefähr 40 kB. Bei synthetischen Gentransfercarriern dagegen besteht keine Einschränkung der Transportkapazität [23]. Ein Nachteil der synthetischen Gentransfercarrier ist die im Vergleich zu rekombinanten Viren geringe Effektivität des Gentransfers [24]. Die geringe endosomale Freisetzung unmodifizierter synthetischer Gentransfercarrier [25] und der eingeschränkte Transport der DNA in den Zellkern postmitotischer Zellen sind als Gründe dafür zu nennen [26-30].

Neben der Weiterentwicklung und Erforschung der synthetischen Genvektoren ist das eigentliche therapeutische Agens – die DNA – in den vergangenen Jahren Gegenstand intensiver Entwicklung gewesen. Dabei stand die Optimierung des Genexpressionssystems im Vordergrund. Durch die Verwendung starker Promotoren viralen Ursprungs, wie die des Cytomegalievirus oder des Simian Virus [31] wurde eine Steigerung der Transgenexpression erreicht. Aber auch der Einfluss der 5' URT Stelle auf die Translationseffizienz der mRNA wurde untersucht [32-34]. Eine wichtige Rolle spielte die Inkorporation mindestens eines Introns in die cDNA (100-fache Steigerung) [35], sowie der Einbau eines geeigneten Poly(A)-Signals [36].

1.2 Aerosoltherapie

Die Lunge ist, aufgrund ihrer großen Oberfläche und der guten Zugänglichkeit über das Bronchialsystem, ein exzellentes Ziel für die lokale und nicht-invasive Applikation von Gentransferkomplexen. Die pulmonale Gabe ist entweder über Aerosol- oder intratracheale Applikation möglich. Vor allem die Aerosolapplikation ist eine effiziente Methode des Gentransfers in die Lunge. Dabei werden die Gentransferkomplexe, die in einem entsprechenden Lösungsmittel suspendiert/gelöst sind, mittels Druckluft oder Ultraschall zu kleinen Aerosoltröpfchen (ca. 0,5-5 µm) vernebelt und inhaliert.

Atemwege und Alveolar-Epithelium können von Auswirkungen genetischer Erkrankungen wie zystische Fibrose und vererbter Surfactant Protein B Defizienz betroffen sein. Eine Reihe von

weiteren Erkrankungen der Lunge eignen sich für eine Gentherapie, wie z.B. der alpha-1-Antitrypsin Defekt, Lungenkrebs, Asthma, pulmonale Alveolitis und Fibrose. Außerdem könnte die genetische Immunisierung über Aerosolapplikation, bei der eine virale Infektion simuliert wird, zukünftig eine Rolle spielen und bei neu auftretenden pandemischen Influenzainfektionen zum Einsatz kommen, da herkömmliche Impfstoffe – vor allem in hohen Mengen - problematisch in der Herstellung sind [37].

Für eine effektive Gentherapie der Lunge *in vivo* ist das gezielte *Targeting* eine der wichtigsten Anforderungen. Bei systemischer (intravenöser) Anwendung der Gentherapie bietet die Lunge ein gutes Ziel, da die applizierten Genvektoren im Kapillarnetz der Lungenstrombahn herausgefiltert werden [38]. Eine topische Applikation hat den Vorteil, dass das therapeutische Agens direkt an der Lunge appliziert wird und so einige biologische und physiologische Barrieren umgangen werden [39]. Die Partikel gelangen direkt auf die große Oberfläche des Alveolar- und Atemwegsepithels. Probleme, die mit der intravenösen Gabe der Genvektoren verbunden sind, können umgangen werden, wie zum Beispiel die Bindung der Komplexe an Plasmaproteine.

Obwohl die nichtinvasive Aerosoltherapie der Lunge eine Reihe von Vorteilen und Möglichkeiten bietet, wurde der Entwicklung dieser Technologie in der Gentherapie lange keine große Aufmerksamkeit geschenkt. Zum größten Problem bei der Verabreichung von pDNA mittels Aerosol gehört der Verlust der Transfektionskapazität der pDNA durch die Scherkräfte, die während der Vernebelung auftreten und zu deren Zerstörung führt. Die Verabreichung von „nackter“ pDNA auf diesem Wege ist daher nicht möglich. Durch die Komplexierung der pDNA mit kationischen Lipiden konnte die pDNA erheblich stabilisiert werden und die Transfektionseffizienz konnte gesteigert werden. Desweiteren vermindern Lungen-spezifische Eigenschaften, wie die Anwesenheit der Surfactant-Schicht der luminalen Seite des Lungenepithels, alveolare Makrophagen und mucoziliare Clearance-Mechanismen, die Gentransfereffizienz der Aerosole (siehe „Gentransfer in die Lunge: Extra- und intrazelluläre Barrieren“).

1992 wurden von Striblin et al. [40] zum erstenmal liposomale (DOTMA-DOPE) Genkomplexe vernebelt, wobei die Transgenexpression, beschränkt auf das Lungengewebe, gezeigt werden konnte. Allerdings waren die pDNA Mengen, die für das Verneblerreservoir zur Vernebelung benötigt wurden mit 12 mg sehr hoch, und die pDNA Menge, die in den Mäuselungen gefunden wurde, betrug nur 10 µg. Außerdem wurde eine Aerosol-Expositionszeit von 4-5 Stunden benötigt.

Um eine Sedimentation der pDNA Partikel in den distalen und terminalen Atemwegen zu erreichen, muss die Partikelgröße zwischen 1-2 µm liegen. Kleinere Aerosolpartikel tragen nicht zum therapeutischen Effekt des Aerosols bei, da ein großer Teil dieser kleinen Partikel wieder exhalieret wird, bevor es zur Deposition kommen kann. Partikel, die größer als 3 µm sind, tendieren zur Impaktion (Trägheitsaufprall) in der Luftröhre und in den oberen Atemwegen. Deshalb ist die richtige Größe der Aerosoltröpfchen sehr wichtig [41]. Wie oben erwähnt, verlangt das Generieren der richtigen Aerosol-Tröpfchengröße hohe Energie (Scherkräfte), so dass nackte pDNA dabei zerstört wird. Mit verschiedenen Formulierungen kationischer Lipide, die in ersten Versuchen verwendet wurden, lässt sich die pDNA teilweise gegen die Zerstörung schützen.

Nachdem die Klonierung des CFTR-Genes (*cystic fibrosis transductance regulator gene*) gelungen und ein erster großer Erfolg im Bereich der Aerosolapplikation von Gentransfersystemen von Stribling et al. erzielt worden war, wurde diese Methode als ideale nicht-invasive Therapieoption der pulmonalen Manifestation der zystischen Fibrose angesehen. Das CFTR Gen, komplexiert mit DC-Chol-carbamoyl]-cholesterol), wurde von Alton et al. 1993 in die Lungen einer "CFTR-Maus" (Edinburgh CF transgene Maus (cf/cf), durch Insertion einer Mutation generiert) vernebelt [42]. Es gelang, mittels RNA-Polymerase-Chain-Reaction (PCR) CFTR Expression nachzuweisen. Außerdem gelang es den CF (*cystic fibrosis*)-Defekt der Mäuse um 50% Richtung Normalwert zu verschieben, wie am cAMP (cyclisches Adenosin-Mono-Phosphat) gebundenen Chlorid-Response gezeigt werden konnte. Nekrosen des Lungenepithels oder histologische Schäden durch die Applikation des Aerosols konnten nicht festgestellt werden.

Die systematische Weiterentwicklung der kationischen Lipide [43, 44] führte zu verbesserten Eigenschaften und gesteigerter Effizienz mit dem Beginn klinischer Studien z.B. bei Patienten mit zystischer Fibrose (Cystic Fibrosis, CF) [45-47]. In einer plazebokontrollierten Doppelblindstudie konnte unter Einsatz eines kationischen Lipids (GL 67) bei CF-Patienten transient der Chlorid-Defekt um 25% in Richtung Normalwert korrigiert werden [46] und zeigt damit den Fortschritt des Gentransfers mit kationischen Lipiden. Aus diesem Grund wurde vom „UK Cystic Fibrosis Therapy Consortium“ eine neue klinische Studie zur Behandlung der zystischen Fibrose mit GL67 Liposomen als nichtvirale Vektoren, die inhaliert werden, initiiert [48]. Die neue doppelblinde und plazebokontrollierte Studie mit 100 CF-Patienten soll Anfang 2008 starten.

1.3 Gentransfer in die Lunge: Extra- und intrazelluläre Barrieren

Für einen effizienten Gentransfer in die Lunge über die Atemwege müssen verschiedene Hürden überwunden werden. Nach Aerosolapplikation bzw. Instillation von Genvektorkomplexen müssen diese extrazelluläre Barrieren durchdringen, die eine physiologische Schutzfunktion für die Atemwegsepithelien haben. Das Atemwegsepithel besteht im Wesentlichen aus Bronchialepithelzellen, Alveolarzellen, Clarazellen, Becherzellen und zilienträgenden Zellen. Die Zellmembran ist mit einer Glykokalyx besetzt, deren inhibitorischer Effekt auf z.B. adenovirale Genvektoren nachgewiesen ist [49]. Die Zilien, die engstehend auf den Zellen angeordnet sind, stellen bereits eine physikalische Barriere dar. Weiter besteht die extrazelluläre Barriere der Atemwegsepithelien aus einer Solschicht, die Komponenten des Blutserums, wie Albumin, Komplementfaktoren und Immunglobuline, enthält [50]. Dann folgt eine Gelschicht bestehend aus ungeladenen Lipiden, die mit Proteinen, negativ geladenen Mucinen und Glycoproteinen durchsetzt ist. Auf der Gelschicht befindet sich ein dünner stark oberflächenaktiver Phospholipid-Film (Surfactant). Mit diesem Film treten Genvektorkomplexe nach topischer Applikation zunächst in Kontakt. Der Flüssigkeitsfilm auf den Atemwegsepithelien wird mit gerichtetem Zilienschlag Richtung Pharynx transportiert (mucoziliäre Clearance). Die Spitze der Zilien des Flimmerepithels ragen in die Gelschicht hinein und transportieren diese auf der Solschicht schwimmende Lage durch den Zilienschlag [51].

Aus den bronchoalveolären Verästelungen der Lunge können freie Zellen durch eine Lavage herausgespült werden (bronchoalveoläre Lavage, BAL). Man erhält nach der Lavage hauptsächlich alveoläre Makrophagen, die für die Phagozytose inhalierter Partikel und Mikroorganismen zuständig sind. Die restlichen Zellen in der BALF (*broncho-alveolar lavage fluid*) sind Lymphozyten und wenige Neutrophile und Leukozyten [51]. Die nicht-zellulären Bestandteile der BALF sind hauptsächlich Phospholipide, Proteine und Glycoproteine aus dem Flüssigkeitsfilm über den Atemwegsepithelien. In *in vitro* Versuchen konnte festgestellt werden, dass die BALF Poly- und Lipoplex-vermittelten Gentransfer vermindert. Dies wurde auf die Interaktion der Gentransferkomplexe mit negativ geladenen Bestandteilen des Flüssigkeitsfilms der Alveolarepithelien zurückgeführt, wobei die Größe der Gentransferkomplexe ansteigt und die positive Oberflächenladung abnimmt [52].

Die erste Barriere, die nach der Passage der extrazellulären Barriere für die Aufnahme der DNA in die Zelle überwunden werden muss, ist die Zytoplasmamembran. Durch die elektrostatische Interaktion mit kationischen Lipiden oder kationischen Polymeren wird die DNA zu kleinen Komplexen (Lipoplexe bzw. Polyplexe) kondensiert. Bisher wurde angenommen, dass diese nach Interaktion mit Proteoglykan-Heparansulfat-Rezeptoren auf der Zelloberfläche über Endosomen internalisiert werden [53, 54]. Eine neuere Studie hat gezeigt, dass die Aufnahme der Lipoplexe in die Zelle hauptsächlich von $\beta 1$ -Integrin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche vermittelt wird, mit nachfolgender Clathrin-vermittelter Endozytose [55].

Für den durch kationische Lipide vermittelten Gentransfer stellt die erste Barriere, d.h. die Aufnahme der Lipoplexe in die Zelle, das geringste Hindernis dar. Mit Gold- und fluoreszenzmarkierter DNA, die mit Liposomen komplexiert wurde, konnte *in vitro* elektronen- und fluoreszenzmikroskopisch oder mittels FACS die Aufnahme in die Zellen gezeigt werden [56-58]. Polyplexe, die durch Kondensation der DNA mit z.B. PEI (Polyethylenimin) erhalten werden, verhalten sich bezüglich der rezeptorvermittelten-endozytischen Aufnahme in die Zelle ähnlich wie kationische Lipide [53, 59]. Eine hohe Expressionsrate des Transgens in der Lunge bei systemischer Applikation der kationischen Genvektoren wurde dem Vorhandensein von anionischen Heparansulfat-Proteoglykan-Rezeptoren zugeschrieben [54].

Im nächsten Schritt erfolgt die endosomale Freisetzung der Komplexe in perinuklearen Regionen des Zytoplasmas. Der intrazelluläre endosomale Transport der Gentransferkomplexe in Richtung perinuklearer Regionen erfolgt mit Hilfe von mikrotubulären Motorproteinen [60]. Die Freisetzung der Polyplexe bzw. Lipoplexe aus den Endosomen stellt die zweite Barriere für den Transport der DNA in den Zellkern dar und ist stark vom verwendeten kationischen Polymer abhängig. Im Fall der Lipoplexe konnte die Endosomenmembran durch endosomenzerstörende Substanzen wie Chloroquin, DOPE (L-alpha-Dioleoyl-Phosphatidylethanolamin, neutrales „Helfer“-Lipid) oder endosomolytische Peptide überwunden werden [25]. Poly-L-Lysin/DNA Komplexe gelangen ebenfalls nur nach Zusatz von endosomenzerstörenden Substanzen ins Zytoplasma [61]. PEI bewirkt aufgrund der hohen Pufferkapazität („Protonenschwamm“) und des resultierenden Anstiegs des osmotischen Drucks in den Endosomen deren Platzen und so die endosomale Freisetzung der Polyplexe in das Zytoplasma [62].

Die dritte Barriere für den Transport der DNA in den Zellkern ist die Kernmembran. Mechanistische Studien haben gezeigt, dass eine im Vergleich zu viralen Vektoren geringe Gentransfereffizienz sowohl von Lipoplexen als auch von kationischen Polymeren, hauptsächlich durch eine geringe Aufnahme der pDNA aus dem Zytoplasma in den Zellkern verursacht wird [27, 28, 57]. Deshalb sollte noch an einer effizienten Vermittlung des Transportes der verwendeten DNA in den Zellkern gearbeitet werden.

1.4 Polyethylenimin (PEI) als Vektor für die Aerosoltherapie

Außer den kationischen Liposomen wurden kationische Polymere als eine wichtige Klasse synthetischer Genvektoren in den vergangenen Jahren intensiv untersucht. Kationische Polymere kondensieren pDNA effizient, indem sie aufgrund entgegengesetzter Ladungen spontan mit pDNA assoziieren und kleine Partikel formen. Neben polymerisierten bzw. oligomerisierten Aminosäuren wie Lysin oder Arginin und dessen verzweigten Oligomeren [63, 64] ist Polymethylenimin (PEI), das 1995 von Boussif [65] erstmals für den Gentransfer *in vitro* und *in vivo* eingesetzt wurde, derzeit der vielversprechendste Vertreter unter den kationischen Polymeren.

PEI kann einfach chemisch modifiziert werden, ohne seine spezifischen Eigenschaften zu verändern, und es ist in verschiedenen Formen erhältlich.

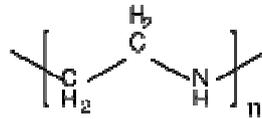


Abb. 1 Strukturformel des Polyethylenimins

PEI-pDNA Komplexe zeigten eine hohe Spezifität für die Transfektion der Lunge. PEI wurde mit verschiedenen Molekulargewichten in verzweigter [66, 67] oder linearer Form [68, 69] in zahlreichen Tiermodellen *in vivo* eingesetzt. Dabei zeigte sich eine gute Gentransfereffizienz der PEI-pDNA Komplexe nach i.v. Injektion [66, 68, 69], nach intratrachealer Applikation oder nach Aerosolapplikation [70-72]. *In vivo*-jetPEITM DNA-Komplexe wurden im Rahmen einer klinischen Studie über einen Katheter erfolgreich bei Patienten mit refraktärem oberflächlichem Harnblasenkarzinom eingesetzt [73].

PEI hat eine große Pufferkapazität, da jedes dritte Atom ein protonierbares Stickstoffatom darstellt. pDNA, die an dieses kationische Polymer gebunden ist, wird somit effektiv gegen den niedrigen pH-Wert geschützt, der in Lysosomen herrscht. Außerdem führt PEI aufgrund seiner hohen Pufferkapazität zum Platzen der Endosomen und bewirkt so die endosomale Freisetzung der PEI-pDNA Komplexe in das Zytoplasma (siehe Kapitel 1.3). In mechanistischen Studien konnte ferner gezeigt werden, dass PEI-Genvektoren in Anwesenheit von RNA im Zytoplasma dissoziieren. Dies deutet darauf hin, dass pDNA von zytoplasmatischer RNA durch kompetitive Verdrängung aus den PEI-pDNA Komplexen freigesetzt werden und in freier Form in den Zellkern gelangen kann [74].

Man verwendete PEI-pDNA Formulierungen für die Entwicklung von Partikeln zur Aerosolapplikation, die eine gute pulmonale Transfektionseffizienz nach Injektion zeigten. Nach Aerosolapplikation von Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT)-Plasmid Formulierungen,

resultierten PEI-Gentransfersysteme in höheren Transfektionsraten als einige Lipidformulierungen, obwohl diese bereits optimiert waren und in klinischen Studien verwendet wurden. Nach Vernebelung von PEI-Formulierungen zeigten die Lungen eine 20-fach höhere Transfektionsrate im Vergleich zur nasalen Transfektion von PEI-Formulierungen. Durch die Vernebelung von PEI-pDNA Partikeln in Anwesenheit von 5% CO₂ in der Atemluft von Mäusen und durch die Optimierung des Verhältnisses von PEI zu pDNA (N/P Verhältnis, Stoffmengenverhältnis des Stickstoffs in PEI zu Phosphat in der DNA) konnte die Transfektionseffizienz noch weiter verbessert werden [75].

Zur Aerosolapplikation oder nasalen Instillation werden PEI-pDNA Komplexe in wässrigen Lösungen verwendet. Die Genexpression in der Mauslunge stieg um das 100-fache, wenn kleine pDNA-Komplexe verwendet wurden, die in destilliertem Wasser hergestellt wurden, im Vergleich zu Transferkomplexen, die in isotoner Glucose oder Kochsalzlösung formuliert wurden [76]. Dies deutet auf einen hypoosmotischen Schock hin, wobei die apikale Membran des Atemwegsepitheliums anschwillt und die Permeabilität der Membran für Makromoleküle und Proteine erhöht wird [77]. Im Hinblick auf die zukünftige Anwendung muss noch erwähnt werden, dass inhaliertes vernebeltes destilliertes Wasser bisher keinen negativen Einfluss auf die Lungenfunktion von gesunden nichtasthmatischen Patienten gezeigt hat und auch nicht auf die Lungenfunktion von Patienten, die an verschiedenen Lungenerkrankungen leiden, wie zum Beispiel zystische Fibrose [78].

Nach intravenöser Gabe relativ hoher Konzentrationen zeigten Formulierungen, die auf PEI basierten, allerdings eine hohe akute Toxizität. In präklinischen Studien mit PEI als Transfektionsreagenz wurden allgemein Polyplexe mit einer positiven Oberflächenladung eingesetzt, da so stabile Komplexe und hohe Transfektionseffizienzen erreicht werden konnten [79]. Allerdings bedingt die positive Oberflächenladung der Polyplexe auch teilweise deren Toxizität durch die Interaktion mit Blutbestandteilen. In Studien konnte eine verminderte Gentransfereffizienz durch die Wechselwirkung der positiv geladenen Komplexe mit z.B. Erythrozyten, Plasmaproteinen [38, 67] und Mucusbestandteilen, wie Proteoglycanen, Glucosaminglycanen [80] und Phospholipiden der Surfactantschicht [81] gezeigt werden.

Wechselwirkungen mit diesen Komponenten führen zu opsonierten Polyplexen mit veränderten physiko-chemischen Eigenschaften und zur Aggregation der Polyplexe mit verringerter Transfektionseffizienz und erhöhter Toxizität, woraus Mikroembolien der Lunge und die Aktivierung des Komplementsystems resultieren. Das Adsorptionsverhalten zahlreicher Arzneistoffträger, wie zum Beispiel Liposomen, an Plasmaproteine beeinflusst die Phagozytose der Partikel durch Macrophagen und die Verteilung der Partikel im Körper [82, 83].

Um die toxische Wirkung zu verringern, wurde versucht, die Polyplexe mit schützenden Copolymeren, wie z.B. Polyethylenglycol (PEG), zu maskieren. Dabei werden die PEI-pDNA Komplexe sterisch in ihrer kleinsten Größe stabilisiert und vor salz- und seruminduzierter Aggregation bewahrt. Allerdings resultierte daraus auch eine verringerte Gentransfereffizienz [79], da PEI-PEG-pDNA-Partikel mit einer neutralen Oberflächenladung entstehen. Die positive Ladung der Polyplexe ist aber für die Interaktion mit der Zelloberfläche über Heparansulfat-Proteoglycan-Rezeptoren (HSPG) und die Endozytose notwendig [53, 54].

Interessanterweise konnte man aber auch nach wiederholter Aerosolapplikation nur eine geringe Toxizität feststellen. Die Spiegel an TNF- α (Tumornekrose-Faktor-alpha) und Interleukin 1-beta, die in bronchoalveolärer Lavage Flüssigkeit [46], im Serum und im Lungengewebe gemessen wurden, waren geringer als nach Injektion oder als nach Verbnebelung von kationischen Lipidformulierungen [84].

1.5 Magnetfeldgesteuerte Aerosolapplikation

Die effiziente Transfektion von Atemwegsepithelien im Tiermodell ist die Voraussetzung für den Erfolg künftiger klinischer Studien zur Gentherapie der zystischen Fibrose und anderer Atemwegserkrankungen. Auf der einen Seite ist die Lunge für eine lokale Applikation von Genvektoren z.B. via Aerosol aufgrund ihrer anatomischen Eigenschaften besonders geeignet. Auf der anderen Seite ist der Kontakt der Genvektorkomplexe mit den Zellen der Atemwegsepithelien durch extrazelluläre Barrieren, wie das Vorhandensein eines Lungenflüssigkeitsfilms oder der mukoziliären Clearance, erschwert (siehe Kapitel 1.3). Dies

fürte z.B. zu sehr geringen Transfektionsraten in *in vitro* Versuchen mit intakten Atemwegsepithelien [85]. Eine Anreicherung der applizierten Genvektorkomplexe und eine Verlängerung der Kontaktzeit an den Zielzellen sollte eine verstärkte Aufnahme in die Zelle und eine erhöhte Transfektionseffizienz zur Folge haben [86].

Aerosole als Arzneistoffträger werden für die Behandlung einer Reihe von Lungenkrankheiten, wie Asthma, chronisch obstruktive Lungenkrankheit (COPD) [87], zystische Fibrose [88], Atemwegsentzündungen [89] und seit kurzem bei Lungenkrebs [90], eingesetzt. Obwohl die gezielte Anreicherung von Arzneistoffen mit Hilfe von superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln und Magnetfeldern gezeigt wurde, wurde dieses Prinzip bisher noch nicht für die Lunge angewendet.

Mit Hilfe der *Magnetofektion*, die ursprünglich zur Anreicherung von Arzneistoffen im Tumorgewebe entwickelt worden war, konnte *in vitro* und *in vivo* die Akkumulation der Genvektorkomplexe im Einflussbereich des Magnetfelds mit nachfolgender hoher Transfektionseffizienz in Zellkulturexperimenten und *in vivo* an Blutgefäßen nachgewiesen werden [91-93].

In der vorliegenden Arbeit soll die Anwendbarkeit der magnetfeldgesteuerten Aerosolapplikation *in vivo* im Mausmodell untersucht werden. Der therapeutische Effekt von Aerosolen könnte verbessert werden, wenn verabreichte Arzneistoffe gezielt in erkrankte Regionen der Lunge geleitet werden könnten. Außerdem könnten unerwünschte Nebenwirkungen verringert werden und die Dosis könnte, bei gleich bleibender Konzentration im betroffenen Lungenbereich, reduziert werden. Trotz enormer Fortschritte, was die Partikelgröße des Aerosols, die Atemtechnik und die Bolus-Inhalation [94, 95] angeht, konnten Aerosole bisher nicht in gezielte Lungenregionen gelenkt werden. Außerdem wird die Deposition der Aerosolpartikel bei der Anwendung herkömmlicher Vernebler durch die Exhalation eines großen Teiles der inhalierten Partikel negativ beeinflusst.

Inhalierte Partikel gelangen mit dem tidalen Luftstrom durch das respiratorische System und deponieren in der Lunge, wenn ihre Flugbahn durch physikalische Kräfte von dem eingeatmeten Luftstrom abgelenkt wird. Zu diesen Kräften gehören die Schwerkraft und Impulstransfer durch die Kollision mit Gasmolekülen oder Trägheit. Auf Grund dieser Kräfte geraten die Partikel aus der Strömungslinie und werden durch Impaktion, Sedimentation oder Diffusion zu der Oberfläche des Atemwegstraktes gebracht [96]. Theoretisch ließe sich das Aerosol bzw. die Partikeldeposition eines Aerosols durch die Anwendung eines externen inhomogenen Magnetfeldes ausreichender Stärke während der Inhalation beeinflussen bzw. abgelenken.

1.6 Steigerung der Gentransfereffizienz nichtviraler Genvektoren mit Hilfe von Transkriptionsfaktoren

Gentransfer mit Hilfe von Transkriptionsfaktoren

Wie in Kapitel 1.3 bereits beschrieben, müssen für einen effizienten Gentransfer verschiedene intrazelluläre Barrieren überwunden werden. Nach der Aufnahme der Gentransferkomplexe über die Zytoplasmamembran muss die Freisetzung aus den Endosomen ins Zytoplasma erfolgen und die pDNA muss die Kernmembran passieren, um in den Zellkern zu gelangen.

Mit dem Ziel, den Transport der DNA in den Zellkern zu verbessern, wurden in verschiedensten Ansätzen Versuche mit sogenannten Kernlokalisierungssequenzen (*nuclear localisation sequences*, NLS) durchgeführt. Diese Aminosäure-Sequenzen sind Bestandteil der endogenen Transportmaschinerie durch die Kernmembran. Die Aminosäure-Sequenz einer NLS wurde entweder direkt an die DNA gebunden oder kationische NLS wurden selbst als Gentransfercarrier verwendet [97, 98]. Auf diese Art konnte die Genexpression verbessert werden. Diese Strategien verlangen jedoch komplexe und kostenintensive chemische Synthesen, welche eine weit verbreitete Anwendung limitieren.

Normalerweise verbleibt pDNA (>1kb) im Zytoplasma und gelangt nach der zytoplasmatischen Applikation nicht in den Kern [26, 57]. Im Gegensatz dazu hat Dean et al. darüber berichtet, dass

pDNA in den Kern gelangt, wenn das Plasmid ein 72 bp großes Fragment aus dem *Enhancer* Element des Simian Virus 40 (SV40) beinhaltet [99-101]. Auf dem SV 40 *Enhancer* Element befinden sich zahlreiche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Auf Grund dieser Beobachtung postulieren die Autoren einen Mechanismus, der darauf basiert, dass Plasmid DNA mit Hilfe dieser Transkriptionfaktoren durch die Kernporen (*nuclear pore complex*, NPC) transportiert wird [102]. Wie in Abb. 2 dargestellt, führt die Anwesenheit des SV 40 *Enhancer* Elements zu einer Bindung der pDNA an neu synthetisierte Transkriptionsfaktoren im Zytoplasma. Diese DNA-bindenden Proteine, wie z.B. AP2 und AP3, sind normalerweise im Zellkern lokalisiert und enthalten entsprechende NLS, die einen Transport durch die Kernporen vermitteln. Der DNA-Transkriptionsfaktor-Komplex wird über die NLS erkannt und an ein Shuttle Protein gebunden, das für den Transport durch die Kernporen verantwortlich ist. Dieser Mechanismus wurde als „Huckepack“ Transport bezeichnet.

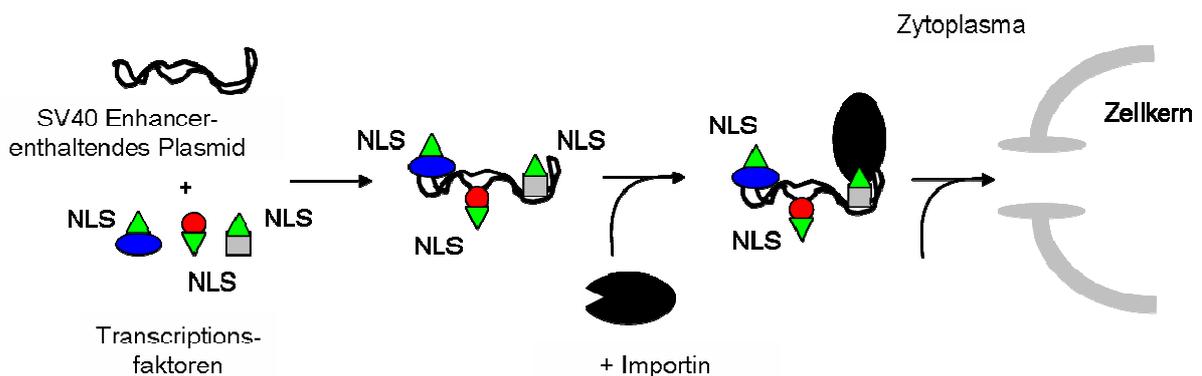


Abb. 2 Mechanismus des Gentransfers mit Hilfe des SV 40 Enhancer Elements

Plasmid DNA, die das SV40 *Enhancer* Element enthält, bindet an verschiedene Transkriptionsfaktoren (AP2, AP3 etc.), die eine NLS enthalten, und führt dadurch zur Interaktion mit einem Protein aus der Familie der Importine. Dadurch wird das Plasmid durch den *nuclear pore complex* in den Zellkern transportiert [100].

In einer anderen Studie wurde der Transkriptionsfaktor NF κ B verwendet, der z. B. von TNF- α aktiviert wird, um das Konzept des Gentransfers mit Hilfe von Transkriptionsfaktoren zu verfolgen. In dieser Studie wurden fünf direkte Wiederholungen des 11 bp großen Ig κ κ B Motivs, das mit picomolarer Affinität an Transkriptionsfaktoren der NF κ B/Rel Familie bindet, in ein

Plasmid, das für ein bestimmtes Gen kodierte („Transgen“), eingefügt. Das Ergebnis dieser Studie zeigte einen TNF- α induzierbaren Transport des I κ B κ B motiv-enthaltenden Plasmids in den Zellkern, was auf einen NF κ B-abhängigen Transport zurückzuführen ist. Im Vergleich zu Plasmiden, die kein I κ B κ B Motiv enthielten, war die Expression des Transgens 35-mal höher [103]. Die Effektivität dieses Gentransfersystems wurde auch *in vivo* getestet. Die intravenöse Gabe von Gentransferkomplexen auf Basis von kationischen Lipiden (DOTMA/Cholesterol) führt zu einer Entzündung in der Lunge von Mäusen, die eine Aktivierung von NF κ B verursacht. Die Gabe von Formulierungen auf der Basis von kationischen Lipiden, die Plasmide mit I κ B κ B Motiv enthielten, verursachte eine signifikant höhere Genexpression in der Lunge verglichen mit einem Kontrollplasmid ohne das I κ B κ B Motiv [104, 105].

Wie aus den dargestellten Ergebnissen hervorgeht, hat sich die Methode des Gentransfers mit Hilfe von Transkriptionsfaktoren als eine erfolgreiche Strategie erwiesen, um die Effektivität des Gentransfers mit synthetischen Gentransfercarriern zu steigern. Die Insertion von transkriptionsfaktor-bindenden Motiven ist eine einfach durchzuführende Möglichkeit, die Aufnahme von Plasmid DNA in den Zellkern zu verbessern.

Gentransfer mit Hilfe des Glucocorticoidrezeptors als Transkriptionsfaktor

In Abb. 3 ist der Mechanismus des Gentransfers mit Hilfe des Glucocorticoidrezeptors schematisch dargestellt. Zellen, die Glucocorticoidrezeptoren (GR) exprimieren, werden mit Plasmid DNA, die repetitive glucocorticoid-responsive Elemente (GRE) enthält, transfiziert. Dabei werden die üblichen Methoden zur Transfektion mit kationischen Lipiden oder Polymeren angewendet.

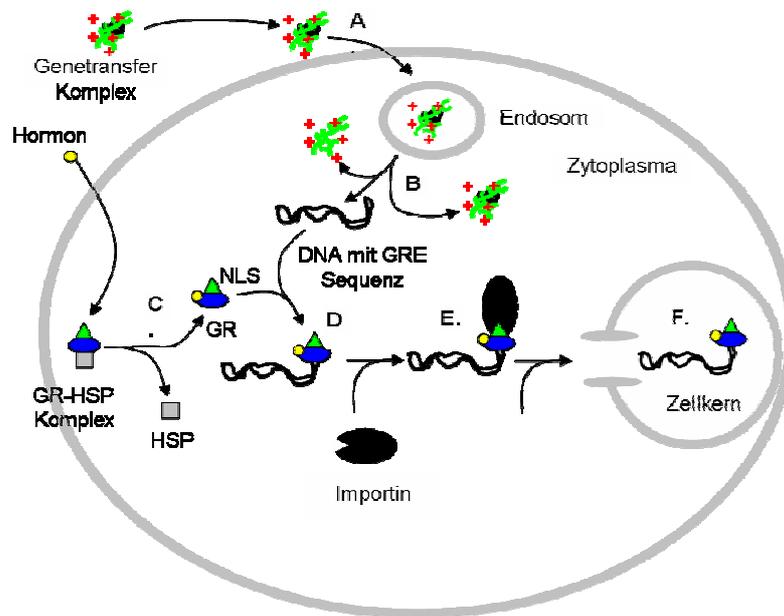


Abb. 3 Schematische Darstellung des Gentransfers mit Hilfe von Glucocorticoid Rezeptoren

Der Glucocorticoidrezeptor (GR) liegt im Zytoplasma in seiner inaktivierten Form gebunden an *Heat-Shock*-Proteine (HSP) vor. Nach der Aktivierung des GR (Abspaltung der HSP) durch einen Liganden (Hormon) bindet die Plasmid DNA im Zytoplasma mit dem repetitiven GRE an den liganden-aktivierten GR. Der DNA-GR Komplex interagiert mit dem endogenen nukleären Transportsystem und wird so in den Kern transportiert.

Die Gentransferkomplexe werden durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zellen aufgenommen, wobei die positiv geladenen Komplexe an die Heparansulfat-Proteoglycan Rezeptoren an der Zelloberfläche binden (Abb. 3, A) [53, 54]. Anschließend werden die Komplexe durch verschiedene Mechanismen aus den Endosomen ins Zytoplasma freigesetzt. Komplexe mit kationischen Polymeren, wie PEI, verursachen einen Anstieg des intravesikulären osmotischen Druckes. Dabei platzen die Endosomen auf und setzen die Komplexe frei [65, 106]. Wird die DNA mit kationischen Lipiden komplexiert, verschmelzen diese mit der endosomalen Membran [107] und setzen sowohl komplexierte als auch freie Plasmid DNA frei (Abb. 3, B). Die Freisetzung freier Plasmid DNA aus den Endosomen ist sehr wichtig für den Gentransfer über den GR, da die GRE Sequenzen im Plasmid so vorliegen müssen, dass sie vom GR erkannt und gebunden werden können. Dies ist bei komplexierter pDNA nicht der Fall. Beispielsweise resultierten Transkriptionsexperimente in zellfreien Systemen mit komplexierter Plasmid DNA in

stark verminderten Transkriptionsraten [108, 109]. Das deutet darauf hin, dass die RNA Polymerase, die in diesen Experimenten verwendet wurde, die Promotor Region der komplexierten Plasmid DNA nicht erkennen konnte, da diese weiterhin mit dem Gentransferagens komplexiert vorlag. Um deshalb eventuelle Freisetzungsprobleme der pDNA aus den Komplexen zu vermeiden, kann auch „nackte“ pDNA mittels Elektroporation direkt ins Zytoplasma gebracht werden.

Im nächsten Schritt verursacht die Hormonexposition eine Aktivierung des GR durch Abspaltung der *Heat Shock* Proteine (HSPs) und ermöglicht so eine Bindung des GR an das GRE des Plasmids (Abb. 3, C + D). Da durch die Aktivierung die NLS des GRs freigelegt wird, kann der GR-Plasmid Komplex mit Hilfe des nukleären Transportproteins Importin durch den NPC in den Kern transportiert werden (Abb. 3, E + F).

1.7 Ziele der Arbeit

PEI ist ein weit verbreitetes kationisches Polymer, das für den nicht viralen Gentransfer *in vivo* und *in vitro* verwendet wird. In verschiedenen Tumormodellen der Mauslunge wurden therapeutische Effekte mit PEI-pDNA-Aerosolen erzielt [110, 111]. Aber auch intratracheale Bolusgabe hat sich als Methode für vor allem hohe Mengen an Plasmid-DNA direkt in die Lunge erwiesen.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Clearance von PEI-pDNA Partikeln aus der Lunge von Mäusen und die Kinetik der Genexpression nach intranasaler Instillation oder Aerosolapplikation in verschiedenen Lungenkompartimenten verglichen werden. Um die Clearance Mechanismen nach Aerosolgabe und Instillation besser zu verstehen, sollte außerdem die Zellanzahl in der BALF und der aktivierten alveolaren Makrophagen (AMs) im Vergleich zur Zellanzahl unbehandelter Kontrollmäuse bestimmt werden. Es sollten auch die Menge an pDNA, die von den Makrophagen aufgenommen wurde und die Menge freier pDNA im Überstand der BALF detektiert werden.

Pulmonale Gentherapie mit nichtviralen Genvektoren, die intravenös oder intranasal appliziert wurden, führten typischerweise zu einer Induktion von Zytokinen, die den CpG Motiven bakterieller Plasmide zugeschrieben wurde [84]. Aus früheren Studien ist bekannt, dass auch Aerosolapplikation der PEI-pDNA Partikel zum Beispiel zur Induktion von TNF- α und IL-1 β im Lungengewebe und in der BALF führte, dies aber in geringerem Ausmaß als nach intravenöser Injektion der Komplexe [84]. Obwohl also leichte Entzündungsreaktionen nach Aerosolapplikation von PEI-pDNA Partikeln bekannt sind, wurde bisher noch nie die Lungenfunktion der behandelten Mäuse bestimmt. Daten über die Lungenfunktion könnten wichtig sein im Bezug auf weitere präklinische Studien an Mäusen sowie einer möglichen Anwendung von PEI-pDNA in klinischen Studien, vor allem bei zystischer Fibrose, wo die Lungenfunktion ohnehin durch chronische Infektionen verschlechtert ist.

Deshalb sollte die Lungenfunktion von Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aerosolapplikation oder intranasaler Instillation von PEI-pDNA untersucht werden. Zusätzlich sollten die Lungen histologisch untersucht werden. Als Kontrollexperiment sollten CpG-depletierte Plasmide ebenfalls mit PEI komplexiert, Mäusen als Aerosol appliziert und die Lungenfunktion der Tiere zu bestimmten Zeitpunkten nach der Applikation gemessen werden.

Eine weitere Fragestellung der Arbeit war die Optimierung der Gentransfereffizienz durch magnetfeldgesteuerte Aerosolapplikation *in vivo* im Mausmodell. Es sollte untersucht werden, ob durch die Applikation eines externen Magnetfelds während der Vernebelung superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel (SPION) im Mausmodell in definierten Regionen der Lunge angereichert werden können. Die lokale Deposition sollte histologisch und mittels Magnetrelaxometrie detektiert werden. Außerdem sollte mittels Real Time PCR die Menge des deponierten Wirkstoffs (pDNA) in der Mauslunge bestimmt werden. In weiteren Versuchen sollte die therapeutische Wirksamkeit – also die Genexpression – nach magnetfeldgesteuerter Aerosolapplikation im Mausmodell überprüft werden.

Zuletzt sollte eine neue Methode des transkriptionsfaktor-vermittelten Gentransfers mit Hilfe des Glucocorticoidrezeptors untersucht werden, mit dem Ziel, effizienter als bisher den Gentransfer

mit nichtviralen Genvektoren zu vermitteln. Dabei sollte mit Hilfe von repetitiven GRE-Sequenzen, die in die verwendeten Plasmide kloniert wurden, die Zellkernmembran als limitierende Barriere des nichtviralen Gentransfers gezielt überwunden werden. Ein solches System hätte den Vorteil, dass die Aufnahme der therapeutischen DNA in den Zellkern durch die Gabe von Glucocorticoiden stimuliert werden könnte, die als zugelassene Arzneistoffe verfügbar sind. Zusätzlich könnte die immun-modulierende Wirkung der Glucocorticoide den Gentransfer verbessern, da entzündliche Reaktionen vermindert würden. Das System wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im Mausmodell untersucht.