

4 Lungenfunktionsmessung nach Aerosolapplikation oder intranasaler Instillation von PEI-pDNA Partikeln

4.1 Histologische Untersuchung des Lungengewebes der Mäuse nach Aerosolapplikation oder intranasaler Instillation von PEI-pDNA Komplexen

Mittels histologischer Untersuchungen wurde die Inflammation des Lungengewebes 24 h und 7 Tage nach der jeweiligen Behandlung untersucht (Abb. 13). Zum Vergleich wurden auch Schnitte von Lungen unbehandelter Kontrollmäuse angefertigt (in der Abb. nicht gezeigt).

Bei Tieren, die nur destilliertes Wasser inhalierten (Abb. 13 A), zeigten sich keine Veränderungen in der Lungenhistologie. Nach der PEI-pDNA Aerosolapplikation konnte eine leichte Entzündungsreaktion 24 h nach der Behandlung im Lungengewebe histologisch detektiert werden (Abb. 13 B). Die Lungen wiesen subpleurale fokale Blutungen mit Stauungen und kleine kapilläre und präkapilläre Fibrinthromben auf. Kleine subpleurale Blutungen und Stauungen konnten auch nach 7 Tagen noch beobachtet werden (Abb. 13 C).

Bei Mäusen, denen PEI-pDNA intranasal instilliert wurde, konnte ebenfalls eine leichte Entzündungsreaktion und geringe entzündliche Zellinfiltration detektiert werden. Das Gewebe zeigte nach 24 h relativ zentral kleine Parenchymherde mit ausgeprägten kapillären Thromben. Das Lungengewebe war hier diskret granulozytär infiltriert (Abb. 13 D). 7 Tage nach der Behandlung waren fokal frische Hämorrhagien mit kleinen Fibrinthromben zu beobachten (Abb. 13 E).

Außerdem wurden Lungen von Mäusen histologisch untersucht, die CpG-depletierte PEI-pDNA inhalierten (24 h und 7 Tage nach der Behandlung). Es zeigte sich keine Veränderung der Lungenhistologie bei diesen Tieren im Vergleich zu unbehandelten Kontrollmäusen (in der Abb.

nicht gezeigt). Die Thematik der CpG-Motive in bakteriellen Plasmiden zum Gentransfer wird in Kapitel 4.3 noch genauer besprochen.

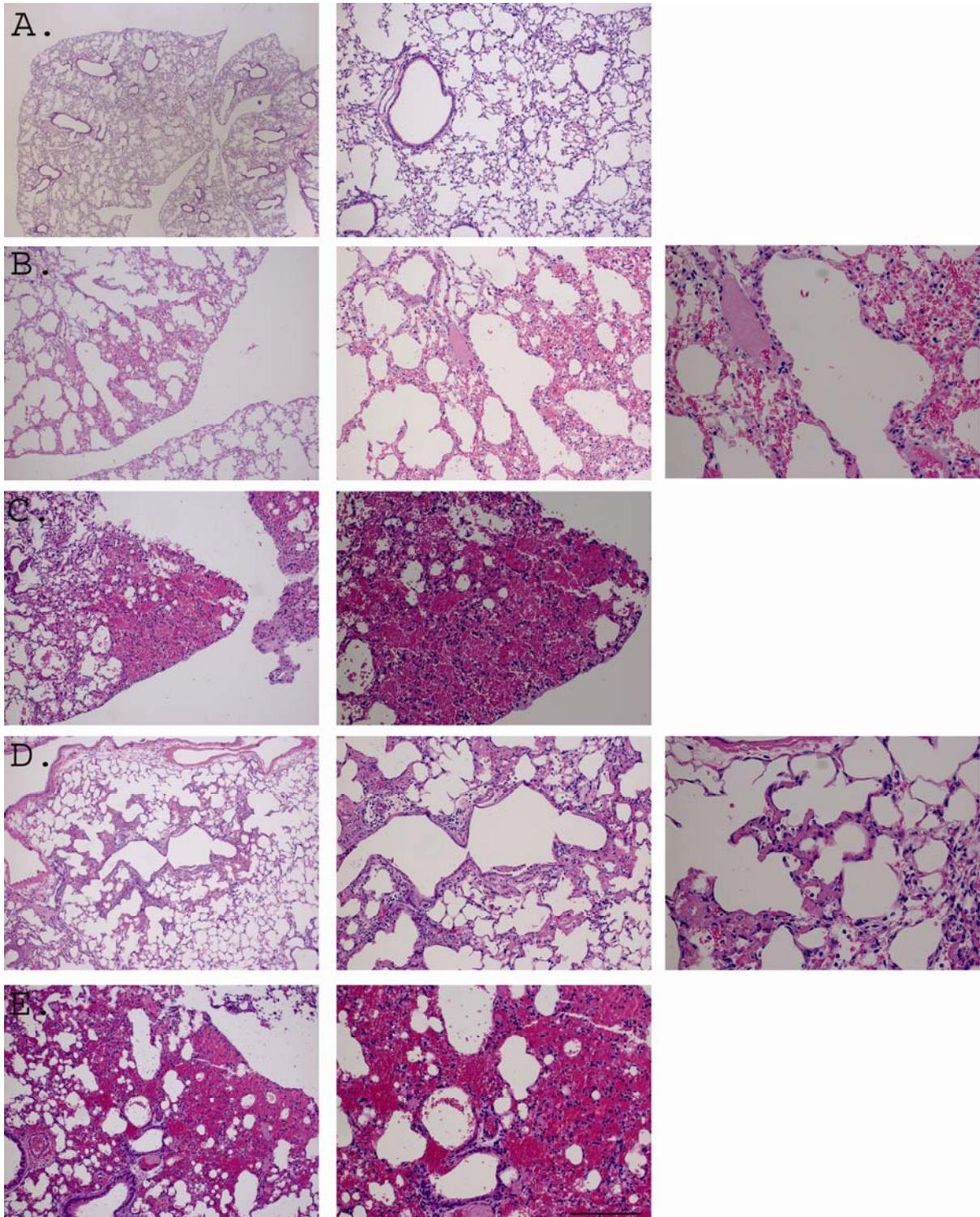


Abb. 13 Histologische Untersuchung des Lungengewebes zu bestimmten Zeitpunkten nach Aerosolapplikation bzw. intranasaler Instillation von PEI-pDNA oder destilliertem Wasser

Die histologischen Untersuchungen wurden nach Haematoxylin-Eosin Färbung durchgeführt. In Abb. A ist das Lungengewebe von einer Maus 24 h nach Aerosolapplikation von destilliertem Wasser gezeigt (10-fache und 20-fache Vergrößerung). Abb. B zeigt die Histologie der Mauslunge 24 h und C 7 Tage nach Aerosolapplikation von PEI-pDNA (10-fache, 20-fache und 40-fache (B) Vergrößerung). D und E zeigen die Histologie der Mauslungen nach intranasaler Instillation von PEI-pDNA (D 24 h, E 7 Tage nach der Behandlung). Die Länge des Maßstabs entspricht bei 10-facher Vergrößerung 400 μm , bei 20-facher 200 μm und bei 40-facher Vergrößerung 100 μm .

4.2 Lungenfunktionsmessungen nach Aerosolapplikation und intranasaler Instillation von PEI-pDNA Komplexen

Zur Beurteilung der potenziellen Nebenwirkungen von PEI-pDNA Komplexen auf die Lunge von Mäusen, denen die Partikel entweder als Aerosol oder intranasal verabreicht wurden, wurde die Lungenfunktion zu bestimmten Zeitpunkten nach der Behandlung mit einem Kolbenhubrespirator gemessen. Als Kontrolle wurde die Lungenfunktion unbehandelter Mäuse gemessen. Zusätzlich wurde die Lungenfunktion von Tieren, denen nur das Vehikel, d.h. destilliertes Wasser, als Aerosol oder intranasal verabreicht wurde, zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

Die lungenmechanischen Messgrößen sind in der Abb. 14 dargestellt. Die Lungenfunktion jeder Maus wurde dabei alle 3 min. für 20 min. gemessen. In den Graphen sind die Mittelwerte der Lungenfunktionswerte jeweils bei Minute 19 der Messung aufgetragen, weil erst nach mindestens 15 min. ein Steady-State der Lungenfunktionswerte erreicht war. Die TLC der Mäuse betrug im Mittel $48,0 \pm 4,7$ ml/kg. Es gab dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen.

4.2.1 Quasi-Statische Lungenmechanik

Die **Compliance** ist als Änderung des Volumens einer elastischen Struktur wie der Lunge mit verändertem Druck in dieser Struktur ($\Delta V/\Delta P$) definiert. In einem Druck/Volumen Diagramm

entspricht die Steigung der Compliance. 1 h nach der Aerosolapplikation von PEI-pDNA konnte eine Verminderung der Compliance um das 1,3-fache im Vergleich zu unbehandelten Kontrollmäusen detektiert werden (Abb. 14 A). Nach einer kurzzeitigen Verbesserung der Compliance innerhalb von 24 h sank die Compliance in den folgenden 6 Tagen. Am Tag 7 nach Aerosolapplikation waren die Werte der Compliance um das 1,8-fache gegenüber unbehandelten Mäusen reduziert.

Nach Aerosolapplikation von destilliertem Wasser war die Compliance der Lungen nur 1 h nach der Inhalation um das 1,5-fache verringert. Die Werte erreichten in den folgenden 24 h den Level der Kontrollmäuse. Die Werte blieben bis zum Ende der Messungen auf diesem Niveau. Nach intranasaler Instillation von 50 µl PEI-pDNA oder purem destilliertem Wasser war die Compliance zu allen Messzeitpunkten signifikant um das 1,8-fache reduziert (Abb. 14 A).

Die **Resistance** des respiratorischen Systems ist ein Maß für den Atemwegswiderstand und wird angegeben als Druckdifferenz pro Einheit der Stromstärke ($\Delta P/(\Delta V/s)$). Die Messwerte der Resistance der Atemwege waren nach Aerosolapplikation von PEI-pDNA Komplexen zu allen Zeitpunkten nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den Werten unbehandelter Kontrollmäuse (Abb. 14 B). Nach Aerosolapplikation von destilliertem Wasser war die Resistance ebenfalls nicht signifikant gegenüber Kontrollniveau verändert.

Die intranasale Instillation der PEI-pDNA Komplexe verursachte innerhalb der ersten 24 h einen signifikanten 1,6-fachen Anstieg des Widerstandes im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Werte sanken in den folgenden 6 Tagen, und waren am Tag 7 nach der Instillation nur noch um das 1,3-fache im Vergleich zum Kontrollniveau erhöht (nicht signifikant). Die Werte der Resistance nach Instillation von destilliertem Wasser waren zu keinem Messzeitpunkt signifikant unterschiedlich im Vergleich zu denen unbehandelter Kontrollmäuse.

4.2.2. Forcierte Oszillation

Nach Aerosolapplikation von PEI-pDNA waren die Werte der **Gewebedämpfung** (*Tissue damping*, **GTiss**) im Vergleich zur Kontrollgruppe zu keinem Messzeitpunkt signifikant erhöht (Abb. 14 C). Im Gegensatz dazu waren die Werte der Gewebedämpfung nach Aerosolapplikation von destilliertem Wasser in den ersten 24 h um das 1,8-fache im Vergleich zum Kontrollniveau erhöht. Nach 72 h waren die Werte noch signifikant um das 1,5-fache erhöht. Am Tag 7 wurde jedoch keine signifikant unterschiedliche Gewebedämpfung im Vergleich zur Kontrollgruppe mehr gemessen.

Auch nach intranasaler Instillation von PEI-pDNA und von destilliertem Wasser alleine waren die Werte der Gewebedämpfung in den ersten 24 h signifikant um das ~1,8-fache erhöht. Nach Instillation von PEI-pDNA blieben die Werte bis zum Tag 7 auf diesem Niveau. Die Werte der Gewebedämpfung nach Instillation von Wasser waren am Tag 7 noch signifikant um das 1,6-fache erhöht.

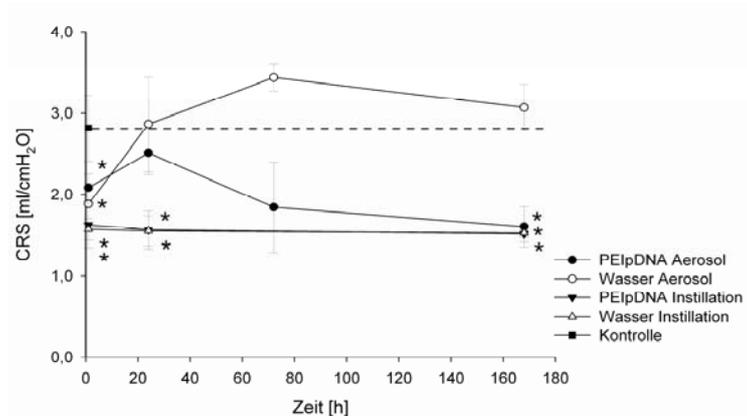
Die **Elastance** (**HTiss**, **Steifigkeit**) des Lungengewebes entspricht dem Kehrwert der Compliance und war nach Aerosolapplikation von PEI-pDNA schon nach 1 h signifikant um das 1,8-fache im Vergleich zum Kontrollniveau erhöht. Am Tag 7 der Messung waren die Werte auf das 2,4-fache über Kontrollniveau gestiegen (Abb. 14 D). Nach Aerosolapplikation von destilliertem Wasser zeigte sich ein ähnlicher Verlauf wie nach Aerosolapplikation von PEI-pDNA, außer einem Peak 24 h nach der Inhalation (3,5-fach höhere Werte im Vergleich zu Kontrollmäusen).

Nach Instillation von PEI-pDNA oder destilliertem Wasser waren die Werte der Elastance des Lungengewebes nach 1 h signifikant um das 2,5-fache erhöht. In den folgenden 7 Tagen stiegen die Werte weiter an und waren nach Instillation von PEI-pDNA am Tag 7 signifikant um das 3,4-fache gegenüber den Werten unbehandelter Kontrollmäuse erhöht, nach Instillation von Wasser um das 2,9-fache.

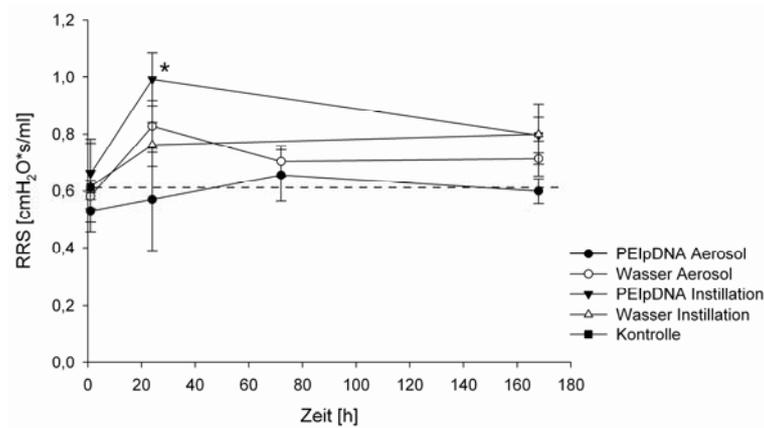
Die **Hysteresivität (Eta)**, die sich aus dem Quotienten Atemwegswiderstand/Elastance ergibt, war nach der Behandlung mit PEI-pDNA oder mit destilliertem Wasser zu jedem Messzeitpunkt um das ~1,7-fache reduziert (Abb. 14 E) gegenüber unbehandelten Mäusen (nicht signifikant). Es zeigten sich jeweils keine Unterschiede zwischen Aerosolapplikation und intranasaler Instillation.

Nach Aerosolapplikation bzw. intranasaler Instillation von PEI-pDNA oder destilliertem Wasser waren die **peripheren Atemwegswiderstände (Rn)** zu allen Messzeitpunkten gegenüber den Kontrollwerten erhöht (Abb. 14 F). Es zeigten sich jeweils keine signifikanten Unterschiede zwischen Aerosolapplikation und intranasaler Instillation. Auch nach 7 Tagen waren die Werte noch signifikant um das 1,2-fache (Aerosolapplikation von PEI-pDNA oder destilliertem Wasser) bzw. 1,4-fache (Instillation von PEI-pDNA oder destilliertem Wasser) gegenüber den Werten unbehandelter Kontrollmäuse erhöht.

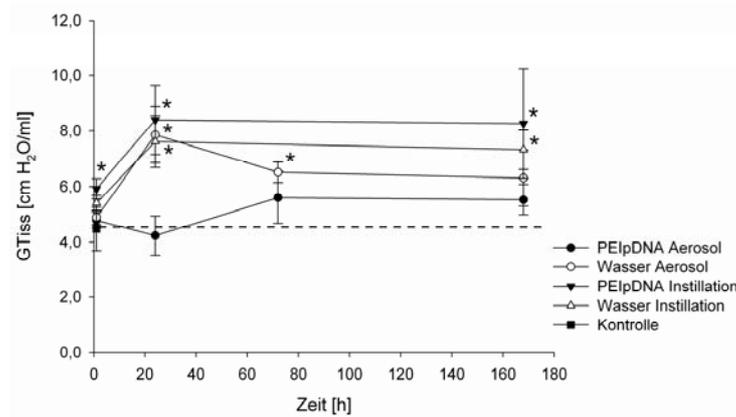
A.



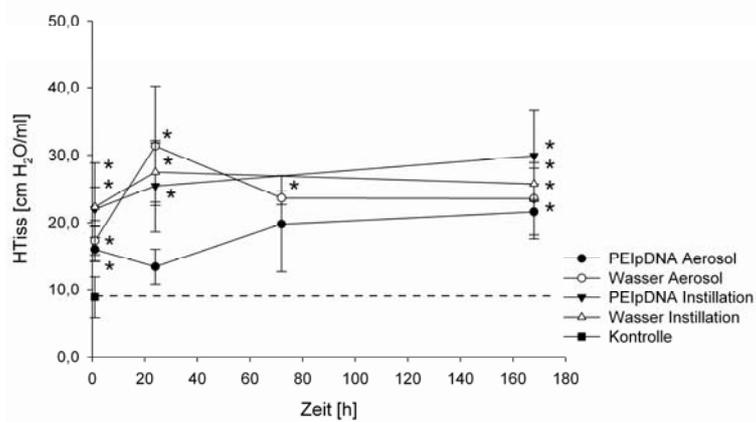
B.



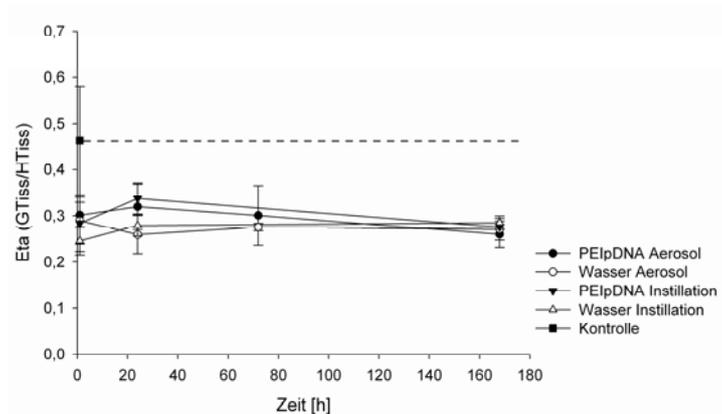
C.



D.



E.



F.

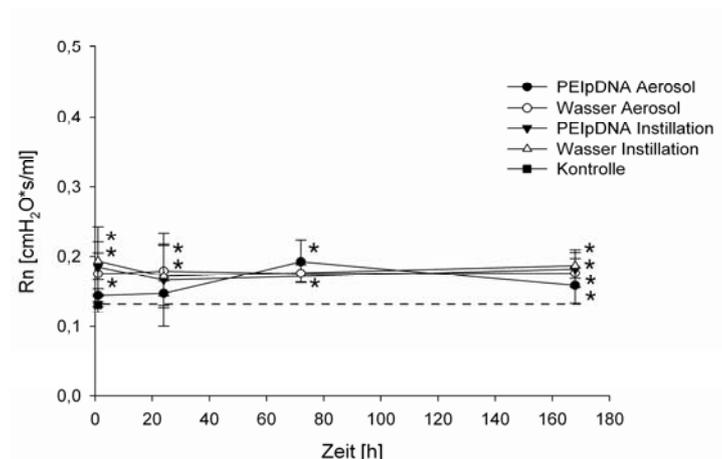


Abb. 14 Lungenfunktion der Mäuse gemessen zu bestimmten Zeitpunkten nach Aerosolapplikation bzw. intranasaler Instillation von PEI-pCMVLuc oder destilliertem Wasser

1 h, 24 h, 72 h und 7 d nach Aerosolapplikation bzw. intranasaler Instillation wurden die Mäuse mit Pentobarbital betäubt und an den Kolbenhubrespirator angeschlossen. Die Lungenfunktion jeder Maus wurde alle 3 min. für 20 min. gemessen. In den Graphen sind die Mittelwerte der Lungenfunktionswerte jeweils bei Minute 19 der Messung aufgetragen, weil erst nach mindestens 15 min. ein Steady-State der Lungenfunktionswerte erreicht ist. Die **Compliance** der Mauslunge ist als [ml/cm H₂O] angegeben (A.). Der Widerstand des respiratorischen Systems ist in Graph B. gezeigt [cm H₂O*s/ml]. Außerdem wurde das **Tissue damping** (GTiss, C.), die **Elastizität des Lungengewebes** (HTiss, D.), die **Hysteresivität** (Eta, E.) und **Rn** (F.) gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung der Mittelwerte angegeben (n=5). Statistisch signifikante Unterschiede der

Lungenfunktionparameter von unbehandelten Kontrollmäusen und behandelten Mäusen sind mit einem Sternchen markiert ($p \leq 0,01$).

4.3 Lungenfunktionsmessungen nach Aerosolapplikation von PEI-pCpG-Luc oder PEI-CpG-backbone

Pulmonale Gentherapie mit nichtviralen Genvektoren, die intravenös oder intranasal appliziert wurden, führten in früheren Studien typischerweise zu einer Induktion von Zytokinen, die den CpG Motiven bakterieller Plasmide zugeschrieben wurde [84].

Bei CpG-Motiven handelt es sich um Dinukleotide aus Cytidin und Guanosen, die durch eine Phosphatbrücke miteinander verbunden sind. DNA, die CpG-Motive enthält, kann verschiedene Zellen des Immunsystems, wie z.B. dendritische Zellen und B-Zellen, aktivieren. Neben dieser direkten Wirkung führen CpG-Motive über eine erhöhte Produktion von Zytokinen durch diese Zellen indirekt auch zur Aktivierung weiterer Zellen des Immunsystems, wie z.B. NK-Zellen oder Makrophagen.

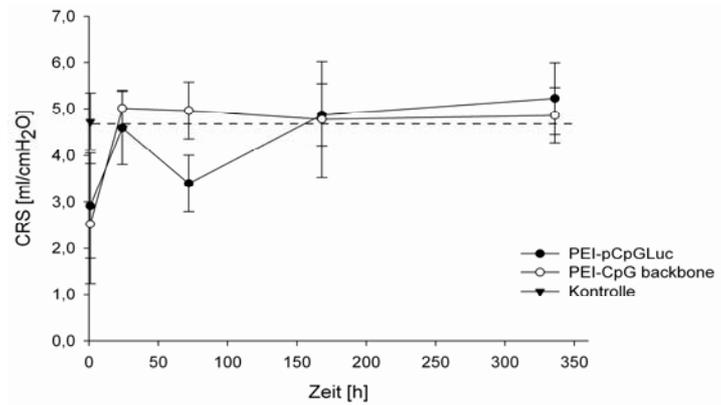
CpG-Dinukleotide kommen sowohl im menschlichen Genom, als auch im bakteriellen Genom vor. Allerdings reagiert das menschliche (und murine) Immunsystem auf bakterielle CpG-DNA mit einer Immunreaktion, während es durch eigene humane (murine) CpG-DNA nicht aktiviert wird. Bei humaner DNA ist ein Großteil der Cytidine in CpG-Motiven an ihrer 5. Position methyliert, während bei bakterieller DNA Methylierungen in CpG-Motiven nur selten vorkommen [134]. Außerdem treten CpG-Motive im bakteriellen Genom mit der Häufigkeit von 1:16 auf, im menschlichen Genom sind sie jedoch mit einer Frequenz von nur 1:64 stark unterrepräsentiert. Es konnte gezeigt werden, dass die zelluläre Antwort auf CpG-Motive durch das Transmembranprotein TLR9 (*Toll like receptor*) vermittelt wird, an den die CpG-Motive binden [135]. Die Familie der TLRs gehört zu den *pattern recognition receptors* (PRRs), welche eine essentielle Rolle bei der Erkennung von mikrobiellen Komponenten (*pathogen-associated molecular patterns*) spielen [136].

Möglicherweise trugen CpG-Motive in der PEI-pDNA zu den histologisch beobachteten Lungenveränderungen sowie zur beeinträchtigten Lungenfunktion bei (vgl. 4.1 und 4.2). Ursächlich hierfür könnte aber auch das Genexpressionsprodukt Luziferase sein, da nicht sicher geklärt ist, welche Auswirkungen Luziferase in den Zellen haben könnte.

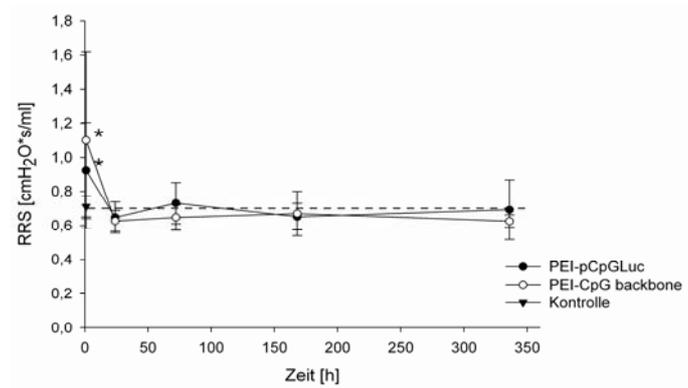
Deshalb wurden, in einem gleichen *Setting* wie unter 4.2 beschrieben, auch die Lungenfunktionsparameter von Mäusen bestimmt, die CpG-freie Plasmide, komplexiert mit PEI, inhalierten. Dabei wurden entweder CpG-freies pCpG-Luc, ein für Luziferase kodierendes Plasmid, oder pCpG-*backbone* (nur CpG-freier *backbone*, nicht für Luziferase kodierend) verwendet.

Nach der Aerosolapplikation von PEI-pCpG-Luc bzw. PEI-pCpG-*backbone* war die Compliance zu keinem Zeitpunkt gegenüber unbehandelten Kontrollmäusen verschlechtert (Abb. 15 A). Die Resistance war nur 1 h nach der Behandlung um das 1,3-fache (PEI-pCpG-Luc) bis 1,5-fache (PEI-CpG-*backbone*) gegenüber unbehandelten Mäusen erhöht und erreichte bereits nach 24 h wieder das Niveau der unbehandelten Kontrollmäuse (Abb. 15 B). Dieser kurzfristige Effekt der beiden CpG-depletierten Plasmide 1 h nach Aerosolapplikation konnte auch bei der Gewebedämpfung (PEI-pCpGLuc 1,9-fach; PEI-pCpG-*backbone* 2,5-fach) und der Elastance des Lungengewebes (PEI-pCpGLuc 2,5-fach; PEI-pCpG-*backbone* 2,8-fach) beobachtet werden (Abb. 15 C/D). Die Hysteresivität (Eta) war nach der Aerosolapplikation von CpG-depletierten Plasmiden zu jedem Messzeitpunkt unverändert im Vergleich zu Kontrollen (Abb. 15 E). Die peripheren Atemwegswiderstände waren im Fall der CpG-depletierten Plasmide nur 1 h nach Aerosolapplikation von PEI-pCpG-*backbone* um das 1,9-fache erhöht (im Vergleich zur Kontrolle), während sie bei PEI-pCpGLuc nicht erhöht waren (Abb. 15 F).

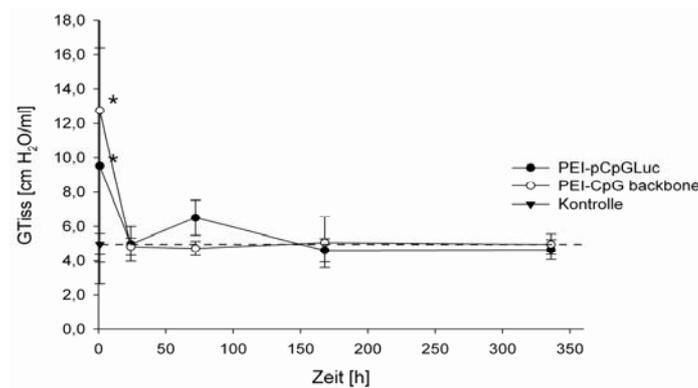
A.



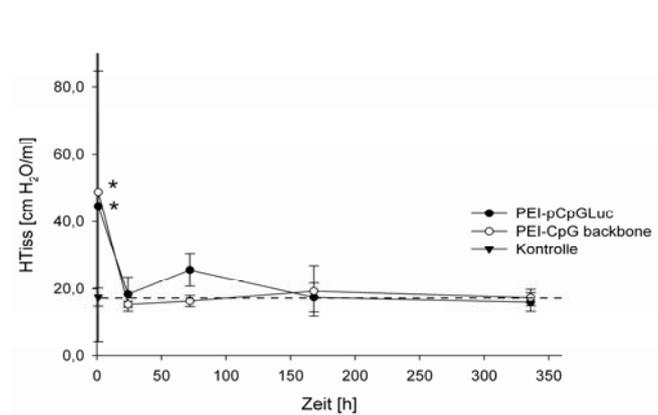
B.



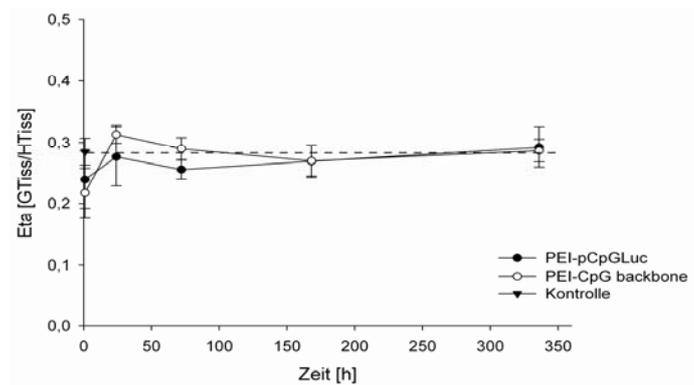
C.



D.



E.



F.

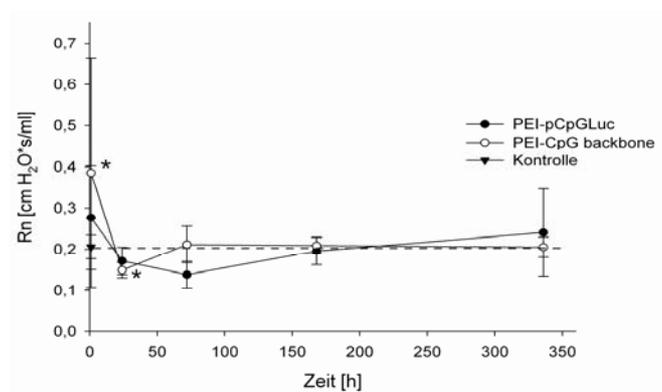


Abb. 15 Lungenfunktion der Mäuse gemessen zu bestimmten Zeitpunkten nach Aerosolapplikation von PEI-pCpG-Luc oder PEI-CpG-backbone

1 h, 24 h, 72 h, 7 d und 14 d nach Aerosolapplikation wurden die Mäuse mit Pentobarbital betäubt und an den Kolbenhubrespirator angeschlossen. Die Lungenfunktion jeder Maus wurde alle 3 min. für 20 min. gemessen. In den Graphen sind die Mittelwerte der Lungenfunktionswerte jeweils bei Minute 19 der Messung aufgetragen. Die Compliance der Mauslunge ist als [ml/cm H₂O] angegeben (A.). Der Widerstand des respiratorischen Systems ist in Graph B. gezeigt [cm H₂O*s/ml]. Außerdem wurde das Tissue damping (GTiss, C.), die Elastizität des Lungengewebes (HTiss, D.), die Hysteresivität (Eta, E.) und Rn (F.) gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung der Mittelwerte angegeben (n=5). Statistisch signifikante Unterschiede der Lungenfunktionparameter von unbehandelten Kontrollmäusen und behandelten Mäusen sind mit einem Sternchen markiert (p≤0,01).

4.4 Zusammenfassung des Einflusses der Aerosolapplikation oder intranasalen Instillation von PEI-pDNA auf die Lungenfunktion

Formulierungen zur Gentherapie, die auf PEI basieren, werden häufig im Mausmodell angewendet. Diese Arbeit untersucht erstmals detailliert die Lungenfunktion von Mäusen nach Applikation dieser Partikel.

Es konnte gezeigt werden, dass die Aerosolapplikation von CpG-haltigen PEI-pDNA Partikeln in wässriger Lösung die Lungenfunktion von Mäusen weniger beeinträchtigt als die intranasale Instillation von CpG-haltigen PEI-pDNA Partikeln. Die bessere Verträglichkeit spiegelte sich sowohl in histologisch erkennbaren geringeren Lungenveränderungen als auch in einer besseren Lungenfunktion nach Aerosolapplikation im Vergleich zur intranasalen Instillation wider. Möglicherweise ist die schlechtere Lungenfunktion nach nasaler Instillation auf eine Entzündungsreaktion im Lungengewebe zurückzuführen. Im Gegensatz dazu war der Einfluss von vernebelten CpG-depletierten Plasmiden (PEI-pCpG-Luc und PEI-pCpG-backbone) auf die Lungenfunktion der Mäuse gering und nur kurz nach Applikation zu beobachten. Als Kontrollexperiment wurden Lungen unbehandelter Mäuse untersucht.

Im Bezug auf die Plastizität der Lunge konnte nach Aerosolapplikation von destilliertem Wasser (Vehikel alleine) im Vergleich zu Kontrollen eine verringerte Compliance nur kurzfristig 1 h nach der Inhalation festgestellt werden. Die Compliance normalisierte sich innerhalb von 24 h. Zu allen späteren Messzeitpunkten zeigte die Behandlung der Mäuse mit destilliertem Wasser als Aerosol keine signifikante Änderung der Compliance im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die kurzfristige Verschlechterung der Compliance ist wahrscheinlich auf den hypo-osmotischen Effekt des destillierten Wassers im Lungengewebe zurückzuführen. Schon in früheren Studien wurden ein kurzfristiges Anschwellen des Lungengewebes und eine verringerte Compliance bei Meerschweinen beobachtet, die destilliertes Wasser inhalierten [124].

Auch nach Aerosolapplikation von CpG-haltigen PEI-pDNA Komplexen konnte man diesen frühen (1 h) Einfluss der hypotonen Lösung auf die Compliance des Lungengewebes detektieren. Wie nach der Aerosolapplikation von Vehikel alleine, normalisierte sich die Compliance in den ersten 24 h. Allerdings verschlechterte sich die Compliance dann in den folgenden 6 Tagen. Am Tag 7 war die Compliance um das 1,8-fache gegenüber den Kontrollwerten reduziert. Es lässt sich vermuten, dass die verringerte Plastizität der Lunge zu späteren Zeitpunkten (72 h und 7 Tage) nach der Aerosolapplikation von CpG-haltigen PEI-pDNA Komplexen direkt auf die Partikel selbst zurückzuführen ist, da dieser Effekt nach Aerosolapplikation von destilliertem Wasser (Vehikel alleine) nicht beobachtet werden konnte. Der Grund für die erneute Verringerung der Compliance in der PEI-pDNA Gruppe zum Zeitpunkt 72 h und 7 Tage könnte in einer Entzündungsreaktion im Gewebe verursacht durch die CpG-Motive liegen (s.u.).

Zu jedem Zeitpunkt nach intranasaler Instillation von CpG-haltigen PEI-pDNA Komplexen und destilliertem Wasser konnte eine signifikant reduzierte Compliance um das 1,8-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass dieser Effekt nach Instillation wahrscheinlich nicht nur durch die Partikel selbst verursacht wurde, denn sonst müsste ein Compliance-Unterschied zwischen der Instillation von PEI-pDNA Komplexen und der Instillation von destilliertem Wasser zu erkennen sein. Die Tatsache, dass der negative Effekt allerdings auch bei der nasalen Instillation von destilliertem Wasser längerfristig

anhält, spricht dafür, dass die nasale Instillation unabhängig von den Partikeln die Compliance beeinträchtigt.

Vielmehr wird die verminderte Compliance vermutlich u.a. auch von der großen Menge an hypo-osmotischer Flüssigkeit, die verabreicht wurde, verursacht. An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass die Menge an hypo-osmotischer Flüssigkeit, die bei der intranasalen Instillation in die Lunge gelangt, sehr viel größer ist, als nach Aerosolapplikation. Große Mengen hypo-osmotische Flüssigkeit lösen bekanntermaßen einen hypo-osmotischen Schock aus, der durch vorübergehendes Anschwellen und Permeabilisierung des Lungengewebes charakterisiert ist [77]. Das Lungengewebe wird steif, so dass ein höherer Druck notwendig ist, um das Lungenvolumen moderat zu erhöhen – die Compliance ist vermindert. Die Osmolarität der wässrigen PEI-pDNA Partikellösung, die für die intranasale Instillation verwendet wurde, lag mit 15 mOsm^{-1} weit unter der Osmolarität von zum Beispiel Plasma (300 mOsm^{-1}).

Genau wie die Compliance, die die Plastizität der gesamten Lunge charakterisiert, sind Gewebedämpfung, Elastance des Lungengewebes, Hysteresivität ($G_{\text{Tiss}}/H_{\text{Tiss}}$) und die peripheren Atemwegwiderstände Parameter, die das Lungengewebe selbst und nicht die Atemwege charakterisieren.

Nach allen Behandlungen mit CpG-haltiger PEI-pDNA oder destilliertem Wasser war die Steifigkeit des Lungengewebes (Elastance) am Tag sieben der Messungen um das 2-3-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (sowohl nach Aerosolapplikation als auch nach intranasaler Instillation). Die resistiven Kräfte des Lungenparenchyms (Gewebedämpfung) waren hauptsächlich nach intranasaler Instillation von Partikeln bzw. destilliertem Wasser erhöht (1,8-fach über Kontrollniveau), nicht jedoch nach Aerosolapplikation von CpG-haltigen PEI-pDNA Komplexen.

Die Hysteresivität als Quotient aus Gewebedämpfung und Elastizität des Gewebes ist dimensionslos. Sie zeigt die globalen Gewebeigenschaften (also die Materialkonstante der

Lunge) über den Verlauf der Zeit. In den hier beschriebenen Versuchen konnten keine signifikanten aber trotzdem recht deutlichen Veränderungen bezüglich der Hysteresivität im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen festgestellt werden.

Der Widerstand des respiratorischen Systems, der den Eingangswiderstand der zuleitenden Atemwege widerspiegelt, war zu keinem Zeitpunkt nach Aerosolapplikation oder intranasaler Instillation von CpG-haltiger PEI-DNA oder destilliertem Wasser signifikant verändert im Vergleich zu Kontrollen.

Im Gegensatz zum unveränderten Eingangswiderstand der zuleitenden Atemwege, waren die peripheren Atemwegswiderstände in allen Gruppen, d.h. bei Aerosolapplikation und bei intranasaler Instillation sowohl von destilliertem Wasser als auch von CpG-haltigen PEI-pDNA Komplexen, erhöht.

Insgesamt betreffen die Veränderungen der Lungenfunktion also hauptsächlich das Lungengewebe selbst - was sich in den Daten der Compliance, der Gewebedämpfung, der Steifigkeit des Lungengewebes und den peripheren Atemwegswiderständen widerspiegelt - und nicht die zuführenden Atemwege. Das deutet darauf hin, dass die verabreichten Nanopartikel das Lungengewebe erreichen, ohne die zuführenden Atemwege zu blockieren.

Um den Grund für die verringerten Plastizität der Lunge und die erhöhte Steifigkeit des Lungengewebes nach Aerosolapplikation und intranasaler Instillation von CpG-haltigen PEI-pDNA Partikeln und destilliertem Wasser genauer zu beurteilen, wurde das Lungengewebe auch histologisch untersucht.

Dabei konnten im Lungengewebe leichte Entzündungszeichen, wie zum Beispiel kapilläre Fibrinthromben 24 h und 7 Tage nach Instillation der PEI-pDNA Partikel und Infiltration von Granulozyten (nach 7 Tagen) beobachtet werden, was möglicherweise auch ein Grund für die

verringerte Plastizität der Lungen nach intranasaler Instillation von PEI-pDNA Komplexen sein könnte. 24 h nach Aerosolapplikation von PEI-pDNA Komplexen konnten nur geringe histologische Veränderungen und leichte Entzündungszeichen im Lungengewebe detektiert werden, im Gegensatz zu den Schnitten 24 h nach Instillation. Dieses Ergebnis passt zur relativ unveränderten Compliance 24 h nach Aerosolapplikation, während sie 24 h nach intranasaler Instillation deutlich verringert war.

Auch 7 Tage nach der PEI-pDNA Aerosolapplikation konnten Entzündungszeichen im Lungengewebe detektiert werden. Es wurde schon früher gezeigt, dass PEI-pDNA Partikel von Bronchialepithelzellen und Makrophagen aufgenommen werden [76]. Möglicherweise ist die Inflammation, die 7 Tage nach Instillation beobachtet werden konnte, auf den Verbleib der Partikel in den Makrophagen zurückzuführen. Dabei werden die Immunzellen aktiviert und die Zytokinproduktion angeregt. In den histologischen Lungenschnitten konnten die beteiligten Granulozyten (Neutrophile) detektiert werden. Auch die CpG-Motive könnten hierbei wieder eine Rolle spielen (s.u.).

In früheren Studien wurde ebenfalls beschrieben, dass eine Verabreichung von PEI-pDNA (intravenös, per Instillation oder als Aerosol) eine Zytokinproduktion hervorruft [137-140]. Man kann jedoch davon ausgehen, dass die Zytokinproduktion nur transient und mild ist und im Lungengewebe im Zeitraum zwischen 1 h und 24 h stattfindet [84]. Die korrespondierende Immunzellinfiltration kann jedoch auch länger andauern, wie es in den hier vorliegenden histologischen Untersuchungen nach Instillation der PEI-pDNA der Fall zu sein scheint.

Wie unter 3.3 beschrieben wurde die Anzahl der Zellen in der BALF nach den entsprechenden Zeitpunkten bestimmt. Während die intranasale Instillation zu einer signifikanten Erhöhung der Zellen führte, die hauptsächlich durch Makrophagen verursacht wurde, konnte dieser Effekt nach Aerosolapplikation von PEI-pDNA Partikeln nicht beobachtet werden. Da die Instillation von destilliertem Wasser zu einer ähnlichen Erhöhung der Makrophagen führte, kann man annehmen, dass dies eher auf die hohe Menge an Flüssigkeit zurückzuführen ist als auf die applizierten Partikel.

Auffällig war jedoch, dass nach 24 h die Anzahl der aktivierten Makrophagen in der BALF sowohl nach intranasaler Instillation als auch nach Aerosolapplikation von PEI-pDNA Komplexen erhöht war (15-fach nach Instillation und 6-fach nach Aerosolapplikation, siehe Abb. 11C), was ein Zeichen für bzw. die Folge von der oben postulierten Zytokinproduktion sein könnte.

Es konnte keine signifikanten Änderungen in der Zahl der Neutrophilen und Lymphozyten in der BALF nach Aerosolapplikation detektiert werden, hingegen schon zu manchen Zeitpunkten nach Instillation von destilliertem Wasser oder PEI-pDNA (siehe Abb. 11D/E). Die Infiltration von Immunzellen findet also eher im Lungengewebe statt, wie es auch in den histologischen Schnitten nach intranasaler Instillation von PEI-pDNA Komplexen zu sehen war, während die Atemwege weniger stark betroffen waren, weshalb auch der Widerstand des respiratorischen Systems unbeeinflusst blieb, die Plastizität jedoch eingeschränkt war.

Insgesamt weisen diese Ergebnisse zwar auf eine leicht bessere Verträglichkeit der Aerosolapplikation von CpG-haltiger PEI-pDNA im Vergleich zur intranasalen Instillation hin. Dies zeigte sich auch in der oben (Kapitel 3) beschriebenen Untersuchung zur Pharmakokinetik nach Aerosolapplikation bzw. intranasaler Instillation, wo höhere AUC Werte und eine langsamere Clearance nach Aerosolapplikation von PEI-pDNA im Vergleich zur intranasalen Instillation detektiert werden konnten. Jedoch ist insbesondere bei der Lungenfunktion zu erkennen, dass die Aerosolapplikation von PEI-pDNA Komplexen im Vergleich zu Kontrollen noch zu Einschränkungen führt. Möglicherweise werden also die positiven Eigenschaften der Aerosolapplikation durch negative Effekte, wie z.B. Entzündungsreaktion, überdeckt. Als Auslöser dieser Effekte kommen theoretisch das verzweigte PEI als Transfektionsreagenz, die Luziferase als Expressionsprodukt oder die CpG-Motive in der pDNA in Frage.

Wie oben bereits erwähnt haben Studien gezeigt, dass der pulmonale Gentransfer mit PEI-pDNA mit einer Zytokinresponse, die auf die CpG-Motive bakterieller pDNA zurückzuführen ist, einhergeht [139-142]. Nach Aerosolapplikation von PEI-pDNA wurden im Lungengewebe und in den Zellen der BALF hauptsächlich TNF- α und IL-1 β detektiert [84]. Durch die Bindung

der bakteriellen CpG-Motive an den TLR9 in dendritischen Zellen des Immunsystems werden nicht nur unspezifische Abwehrmechanismen, wie die Aktivierung von natürlichen Killerzellen und die Infiltration von Zytokinen stimuliert, sondern dendritische Zellen können auch B- und T-Lymphozyten aktivieren [139, 141-144]. Zur unspezifischen Immunantwort gehören auch Makrophagen und Granulozyten, die unter dem Einfluss verschiedener Zytokine die Blutbahn verlassen und ins Gewebe einwandern können. In den histologischen Untersuchungen nach Aerosolapplikation und intranasaler Instillation von CpG-haltigen PEI-pDNA Komplexen konnten wie oben beschrieben entzündliche Prozesse und nach Instillation auch eine diskrete Granulozytose beobachtet werden.

In der Literatur sind keine immunogenen bzw. inflammatorischen Effekte von Luziferase beschrieben. Dagegen ist PEI als zwar effizientes aber relativ toxisches Gentransferagens bekannt: PEI kann Membranen permeabilisieren [145]. Ferner wurde in Geweben eine *Upregulation* von Genen wie Cyclooxygenase 1 und 2 gefunden, die in inflammatorische Prozesse involviert sind, was auf einen nachteiligen Einfluss von PEI hindeutet [146, 147]. Zusätzlich wurde in früheren Studien mit Ratten, denen lineares PEI intranasal instilliert wurde, eine Verschlechterung der Lungenfunktion mit einem verringertem Sauerstoff-Partialdruck festgestellt. In diesen Untersuchungen wurde histologisch auch eine Entzündungsreaktion nach Gabe von linearem PEI alleine detektiert [148].

Um nun einen möglichen Einfluss von bakteriellen CpG-Motiven bzw. von PEI auf die Lungenfunktion der Mäuse auszuschließen bzw. nachzuweisen, wurde in weiteren Versuchen die Lungenfunktion nach Aerosolapplikation von PEI-pCpG-Luc untersucht, das keine bakteriellen CpG-Motive enthält. Weiter wurde als Kontrollexperiment PEI-pCpG-*backbone* von Mäusen inhaliert, um eine eventuelle immunogene Wirkung des Luziferaseexpressionsprodukts auszuschließen.

Tatsächlich zeigte sich, dass durch Aerosolapplikation CpG-depletierter PEI-pDNA Komplexe die Lungenfunktion im Vergleich zur Aerosolapplikation von CpG-haltigen PEI-pDNA Komplexen weniger beeinträchtigt wurde. Die Compliance der Lungen war unbeeinträchtigt.

Andere Gewebeparameter, wie Gewebedämpfung, Elastance, Hysteresivität und periphere Atemwegswiderstände, waren nur 1 h nach der Behandlung signifikant schlechter im Vergleich zu unbehandelten Kontrollmäusen. Dieser Effekt nach 1 h dürfte auf den hypo-osmotischen Effekt des destillierten Wassers als Solvenz zurückzuführen sein (s.o.). Die Lungenfunktion normalisierte sich innerhalb von 24 h, im Gegensatz zu den Lungenfunktionsparametern nach Aerosolapplikation von CpG-haltiger PEI-pDNA (s.o.). Der Widerstand des respiratorischen Systems war nach Aerosolapplikation von PEI-CpG-Luc bzw. PEI-CpG-*backbone* ebenfalls nur kurzfristig 1 h nach der Behandlung erhöht.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen hatte PEI also scheinbar nach Aerosolapplikation keinen Einfluss auf die Lungenfunktion von Mäusen, da bei CpG-freier PEI-pDNA kein Unterschied zu den Ergebnissen bei Kontrollmäusen zu erkennen war. Auch ein immunogener Effekt der Luziferase als Expressionsprodukt in den Mauslungen ist unwahrscheinlich, da in den Untersuchungen zur Lungenfunktion kein Unterschied zwischen den beiden Plasmiden pCpG-Luc und pCpG-*backbone* detektiert werden konnte.

Es ist daher anzunehmen, dass die verschlechterte Lungenfunktion und die Entzündungsreaktion, die nach Aerosolapplikation und Instillation von CpG-haltigen PEI-pDNA Partikeln beobachtet werden konnte, zum größten Teil durch die CpG-Motive bakterieller pDNA verursacht wurde.