

7 Zusammenfassung

Zurzeit existieren zwei wichtige Verfahren des Gentransfers: viraler und nichtviraler Gentransfer. Beim viralen Gentransfer gibt es dabei die Problematik gravierender unerwünschter Nebenwirkungen aufgrund von Immunogenität und einer möglichen Mutagenese durch unkontrollierten Einbau der Gene in das Genom. Ein grundlegendes Problem beim nichtviralen Gentransfer ist die niedrige Genexpression *in vivo*. Diese Schwierigkeit besteht auch beim Gentransfer in die Lunge. In dieser Arbeit wurden mehrere Ansätze verfolgt, um den nichtviralen Gentransfer in Lungengewebe zu verbessern und die Kinetik der Genexpression sowie die Auswirkung auf die Lungenfunktion zu bestimmen.

Eine mögliche Strategie des Gentransfers in die Lunge ist die Verwendung von PEI-pDNA Komplexen, die als Aerosol oder via intranasaler Instillation appliziert werden können. Es stellte sich heraus, dass PEI-pDNA Komplexe abhängig vom pH-Wert bis zu einer Konzentration von 1 mg/ml stabil sind. Nach intranasaler Instillation von PEI-pDNA Komplexen in Mäuse war die pDNA-Clearance aus dem Lungengewebe um das 3,5-fache höher als nach Aerosolapplikation. Die Clearance ist also abhängig von der Applikationsart.

So zeigte sich nach intranasaler Instillation auch ein schneller Anstieg der Zellzahl in der BALF. Bei über 90% dieser Zellen handelte es sich dabei um alveoläre Makrophagen. Während nach Aerosolapplikation lediglich nach 24 h eine leicht erhöhte Anzahl aktivierter Makrophagen nachweisbar war, fanden sich nach intranasaler Instillation eine stärkere und länger anhaltende Aktivierung von Makrophagen, die vermutlich durch Phagozytose teilweise für die erhöhte pDNA-Clearance sorgen.

Eine Luziferaseexpression als Zeichen eines erfolgreichen Gentransfers konnte nach intranasaler Instillation nur kurzfristig 24 h nach der Behandlung detektiert werden. Nach Aerosolapplikation hingegen war die Luziferaseexpression nach 72 h am höchsten und blieb bis zum letzten

gemessenen Zeitpunkt (7 Tage) konstant. Dieses Ergebnis steht somit im Einklang mit der geringeren *Clearance* nach Aerosolapplikation. Interessanter Weise konnte die Luziferaseexpression in weiteren Experimenten nach Aerosolapplikation von CpG-depletierter pDNA noch weiter gesteigert werden. Nach 1 h und 24 h waren die Werte 10-fach höher als bei CpG-haltiger pDNA, nach 72 h noch 3-fach höher, danach fielen die Werte auf das gleiche Niveau.

Aus diesen Versuchen ergeben sich folgende Vorteile einer Aerosolapplikation von PEI-pDNA Partikeln auch im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung: i) Eine langsamere *Clearance* und damit verbundene längere Genexpression verringert die nötige Therapiefrequenz, wodurch möglicherweise die Compliance gesteigert wird. ii) Eine niedrigere Dosis ist möglich, was mit einer verringerten Zellinfiltration und Aktivierung von Makrophagen in der Lunge einhergehen könnte (weniger Nebenwirkungen). iii) Bei der Aerosolapplikation handelt es sich um die einfachere Applikationsart, bei der invasive Techniken vermieden werden.

Diese Arbeit untersuchte erstmals die Lungenfunktion von Mäusen nach Behandlung mit PEI-pDNA. In histologischen Präparaten der Mäuselungen konnte sowohl 24 h nach Aerosolapplikation als auch 24 h nach intranasaler Instillation von PEI-pDNA Entzündungszeichen beobachtet werden, die allerdings nach intranasaler Instillation stärker ausfielen. In Kontrollversuchen, in denen den Mäusen lediglich Wasser bzw. CpG-freie pDNA als Aerosol verabreicht wurde, fanden sich keine histologischen Entzündungszeichen.

Bei den Lungenfunktionsparametern fand sich sowohl 1 h nach Aerosolapplikation als auch 1 h nach intranasaler Instillation von PEI-pDNA oder Wasser eine erniedrigte Compliance der Lunge, was auf einen hypoosmotischen Effekt der in destilliertem Wasser formulierten Komplexe zurückgeführt werden kann. Die Werte verbesserten sich 24 h nach Aerosolapplikation von PEI-pDNA und erreichten wieder fast das Niveau von Kontrollmäusen.

Zu späteren Messzeitpunkten verschlechterte sich die Compliance nach Aerosolapplikation von PEI-pDNA erneut, was möglicherweise auf eine durch die Behandlung ausgelöste Entzündungsreaktion zurückzuführen ist. Diese zeigte sich wie oben beschrieben auch in der histologischen Untersuchung und wird am wahrscheinlichsten durch CpG-Motive in der pDNA ausgelöst. Wurde nämlich statt der CpG-haltigen pDNA CpG-depletierete pDNA verabreicht, war die Lungenfunktion weniger eingeschränkt. Neben einer verbesserten Genexpression resultiert die Verwendung von CpG-depletierter pDNA also auch in einer besseren Lungenfunktion.

Gleiches gilt für die Aerosolapplikation im Vergleich zur intranasalen Instillation. Bei letzterer zeigte sich nämlich zu jedem Messzeitpunkt eine eingeschränkte Compliance der Lunge, unabhängig davon ob PEI-pDNA oder Wasser instilliert wurde. Die eingeschränkte Lungenfunktion ist hier vermutlich durch die hohe Flüssigkeitsmenge verursacht, die das Lungengewebe schädigt, wie auch in der histologischen Untersuchung zu sehen war.

Eine eingeschränkte Compliance der Lunge spiegelte sich bei den entsprechenden Experimenten auch in verschlechterten Werten der Lungenfunktionsparameter Elastance, Gewebedämpfung und peripherer Atemwegswiderstand wider. Der Eingangswiderstand der Atemwege, die Resistance, war hingegen zu keinem Zeitpunkt nach Aerosolapplikation oder intranasaler Instillation von pDNA oder Wasser signifikant verändert im Vergleich zu Kontrollen. Insgesamt betreffen die Veränderungen der Lungenfunktion also hauptsächlich das Lungengewebe selbst und nicht die zuführenden Atemwege.

Die Aerosoltherapie mit PEI-pDNA ist also bezüglich *Clearance*, Kinetik, Lungenfunktion, Nebenwirkungen und Genexpression günstiger als die intranasale Instillation. Durch Verwendung von CpG-depletierter pDNA können die Ergebnisse dabei noch weiter verbessert werden. Außerdem zeigte sich keine Veränderung der Lungenhistologie bei Tieren die CpG-freie PEI-pDNA inhalierten.

Um die Gentherapie weiter zu optimieren, wurde in dieser Arbeit als nächstes untersucht, ob die pDNA mittels magnetischer Ablenkung gezielt an den Ort einer möglichen Erkrankung in der Lunge gelenkt werden kann. Dadurch könnte die Dosis und damit die Genexpression am Krankheitsort erhöht und potentielle Nebenwirkungen im übrigen Lungengewebe vermindert werden. Dazu wurden PEI-pDNA Komplexe zusammen mit SPION formuliert, wobei keine Bindungen zwischen PEI-pDNA Komplexen und SPION detektiert werden konnten. Es konnte gezeigt werden, dass die magnetische Ablenkung von SPION in der Mauslunge funktioniert und zu einer gezielten, erhöhten Deposition von pDNA führt. Die Lungenfunktion wird durch die Verwendung von SPION dabei nicht zusätzlich eingeschränkt.

Bei in der Vernebelungskammer freibeweglichen Mäusen, denen über der Lunge ein Permanentmagnet befestigt wurde, konnte nach Vernebelung von SPION zusammen mit PEI-pDNA (im Verhältnis 125:1) eine 4-fach gesteigerte Expression im Vergleich zu Mäusen ohne Magnet nachgewiesen werden. Allerdings war die Expression noch um das 7,5 fache höher, wenn die PEI-pDNA ohne SPION und ohne Magnet vernebelt wurde. *In vitro* wurde in einer Lungenzelllinie festgestellt, dass eine optimale Expression bei einem SPION/pDNA-Verhältnis von 15:1 erreicht werden kann, während sie sowohl bei höheren als auch bei niedrigeren Verhältnissen vermindert ist.

In weiteren *in vivo* Versuchen mit dem SPION/pDNA-Verhältnis 15:1 konnte dann tatsächlich eine 1,5-fache Deposition von pDNA bei vorhandenem Magneten detektiert werden (im Vergleich zu Mäusen ohne Magnet). Allerdings war auch hier die Deposition nochmal um das 5-fache erhöht, wenn weder SPION noch ein Magnet verwendet wurde. In diesen Versuchen war nach 24 h keine Genexpression detektierbar, wenn SPION zusammen mit PEI-pDNA verwendet wurde. Möglicherweise sind die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen auch nicht auf die Situation *in vivo* übertragbar, so dass hier ein anderes SPION/p-DNA-Verhältnis zu besseren Ergebnissen führen könnte.

Zukünftige Studien, wie sie inzwischen auch im Schweinemodell durchgeführt werden, müssten die SPION optimieren und ihren Einfluss auf die *Clearance* der pDNA durch alveoläre

Makrophagen, wie sie hier ebenfalls verstärkt beobachtet wurde, näher untersuchen. Eine Beseitigung der hier beobachteten nachteiligen Effekte durch die Kombination von SPION und PEI-pDNA Partikeln könnte dann zu höherer und gezielter Deposition durch Applikation eines externen Magnetfeldes während der Aerosolapplikation führen, was eine große Verbesserung gegenüber bestehenden Methoden bedeuten würde.

In dieser Arbeit wurde des Weiteren eine neue Methode zur Steigerung der Gentransfereffizienz etabliert, die auf der Verwendung des Glucocorticoidrezeptors (GR) als Transkriptionsfaktor beruht. Wird GR durch Dexamethason (oder vergleichbare Liganden) aktiviert, führt dies zu einem Transport des GR aus dem Zytoplasma in den Zellkern einer Zelle. Wird vorher pDNA, die Glucocorticoidrezeptor-responsive Elemente enthält (GRE), an GR gebunden, kann durch diese Methode der Transfer von pDNA aus dem Zytoplasma in den Zellkern verbessert werden.

Tatsächlich zeigte sich zunächst in *in vitro* Versuchen eine erhöhte Anzahl von EGFP-exprimierenden Zellen nach Applikation von pEGFP_{Luc}GRE₂ und Dexamethason im Vergleich zu pEGFP_{Luc} und Dexamethason. In *in vivo* Versuchen an Mäusen, denen intravenös pEGFP_{Luc}GRE₂ komplexiert mit Liposomen, die Dexamethason enthielten, verabreicht wurde, wurde eine erhöhte Expression von Luziferase (2,5-fach) detektiert im Vergleich zu Mäusen, denen pEGFP_{Luc}-Liposomen mit Dexamethason intravenös verabreicht wurde. In folgenden Versuchen, in denen PEI-pDNA mittels Aerosol im Mausmodell appliziert wurde, konnte ebenfalls eine verbesserte Genexpression (4,7-fach) nach Gabe von pEGFP_{Luc}GRE₂ im Vergleich zu pEGFP_{Luc} nachgewiesen werden, wenn 2 h nach der Aerosolapplikation Dexamethason intraperitoneal appliziert wurde.

Durch Glucocorticoidrezeptor-vermittelten Transport von Plasmiden, die GRE enthalten, in den Zellkern lässt sich also *in vivo* die Genexpression steigern. In zukünftigen Studien kann dieses Verfahren verbessert werden, indem das Intervall zwischen Dexamethason- und Gentransferkomplexgabe optimiert und die Kinetik der Dekomplexierung der pDNA Komplexe im Zytoplasma genauer analysiert werden. Ferner sollte ein möglicher anti-inflammatorischer

Effekt des Dexamethasons untersucht werden, der synergistisch die Transfereffizienz in der Lunge erhöhen könnte.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass mit Hilfe von (magnetfeldgesteuerter) Aerosolapplikation und/oder Verwendung des Glucocorticoidrezeptors als Transkriptionsfaktor die nichtvirale Gentransfereffizienz auf verträgliche Art und Weise in der Lunge von Mäusen verbessert werden kann. Eine Herausforderung in der Zukunft wird sein, die Methode der Aerosolapplikation von Gentransferkomplexen, sei es mit oder ohne Magnetfeld oder Verwendung von GR als Transkriptionsfaktor, auf ein Großtiermodell und letztendlich auf Patienten zu übertragen und zu optimieren. Insbesondere sollte dabei CpG-freie DNA verwendet werden, da sich dadurch die Verträglichkeit und auch die Gentransfereffizienz nochmals verbessern lassen.