

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im
Dr.von Haunerschen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. D. Reinhard

Präklinische Optimierung des nicht-viralen Gentransfers in die
Lunge mittels Aerosolapplikation

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von

Aurora Ortiz Arandes

Puerto Rico

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Joseph Rosenecker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Rudolf M. Huber

Prof. Dr. Ines Golly

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2009

A mis padres

1	Einleitung.....	5
1.1	Grundlagen des nicht viralen Gentransfers.....	5
1.1.1	Somatische Genterapie.....	5
1.1.2	Viraler und nicht-viraler Gentransfer.....	6
1.1.3	Kationische Polymere.....	7
1.2	Vernebelung als Applikationsweg für Gentransfer.....	8
1.3	Ziele dieser Dissertation.....	9
2	Methoden und Materialien.....	11
2.1	Vernebelung der Gen-Vektor-Komplexe und Untersuchung der Stabilität und Transfektionseigenschaften.....	11
2.1.1	Herstellung der Gen-Vektor-Komplexe.....	11
2.1.2	Verneblertypen.....	15
2.1.3	Vernebelung der Gen-Vektor-Komplexe.....	15
2.1.4	<i>In vitro</i> -Transfektionen und Luziferasemessung.....	17
2.1.5	Gelelektrophorese.....	18
2.2	Vernebelung von pDNA-Vektor-Komplexen an Mäuse.....	19
2.2.1	Versuchstiere.....	19
2.2.2	Vernebelungsapparaturen.....	19
2.2.3	Herstellung der Gen-Vektor-Komplexe.....	25
2.2.4	Organentnahme und Nachweis der Luziferaseaktivität.....	26
2.2.5	Größenmessung der Gen-Vektor-Komplexe im Zetasizer.....	27
2.2.6	Charakterisierung der Aerosoltröpfchengrößen und Ermittlung der Aerosoldeposition in der Vernebelungsapparatur.....	27
2.2.7	Messung der pDNA-Verteilung mittels Radioaktiv markierter pDNA.....	29
2.2.8	Histologie.....	29
2.2.9	Negativfärbung von PEI und PEI-pDNA-Komplexen.....	30
2.2.10	Native Kryoschnitte der Probe.....	31
2.2.11	Fluoreszenz Quenching Assay.....	32
2.3	Statistische Auswertung.....	32

3	Untersuchung der Einflussfaktoren für einen Effektiven Gentransfer in Mäuselungen bei der Vernebelung nicht viraler Genvektorkomplexe.....	33
3.1	Optimierung der Vernebelungsapparatur.....	33
3.1.1	Ganzkörperkäfig und Reihenvernebelung.....	33
3.1.2	Verneblertyp.....	40
3.2	Einflussfaktoren auf die Vernebelung.....	45
3.2.1	Solvens.....	45
3.2.2	Einfluss des Polymerstruktur von PEI auf die Gentransfereffizienz.....	54
3.2.3	Kinetik der Genexpression.....	56
3.2.4	Dosis-Wirkungsbeziehung.....	61
3.2.5	Zink.....	63
3.2.6	Einfluss des Mausstammes.....	64
3.3	Biodistribution vernebelter PEI/pDNA-Komplexe.....	66
3.3.1	Verteilung der pDNA im Körper der Versuchstiere.....	66
3.3.2	Histologie.....	69
3.4	Vergleich der Transfektionseffizienz zwischen Aerosolapplikation und intratrachealer Instillation.....	73
4	Anwendung der Aerosolapplikation auf verschiedene Gentransferträgersysteme.....	74
4.1	TAT-vermittelte Aerosolgentransfer.....	74
4.1.1	Einfluss des Solvens auf die Transfektionseffizienz.....	75
4.1.2	Vernebelung von TAT-pDNA-PEI-Komplexen <i>in vivo</i>	78
4.2	Verwendung von Solid Lipid Nanoparticles als Genvektor.....	79
4.2.1	Vernebelung der SLN-Komplexe <i>in vivo</i>	79
4.2.2	Untersuchung der Stabilität der SLN-Komplexe.....	81
4.3	P6YE5C-Hüllpolymer.....	85

5	Diskussion.....	87
5.1	Methodologische Optimierung des PEI-basierten Gentransfers via Aerosol.....	87
5.2	Einfluss der Vektor-Komplexlösung.....	89
5.3	Kinetik der Genexpression.....	91
5.4	Verteilung der pDNA in den Lungen der Mäuse.....	92
5.5	Abhängigkeit der Gentransfereffizienz vom Mausstamm.....	93
5.6	Verwendung weiterer nicht-viraler Genvektoren für die Vernebelung.....	94
5.7	Zusammenfassende Betrachtung.....	95
6	Literaturverzeichnis.....	97
7	Abkürzungen.....	104
8	Publikationen	105
9	Danksagung.....	105
10	Lebenslauf.....	107

1 Einleitung

1.1 Grundlagen des nicht viralen Gentransfers

1.1.1 Somatische Gentherapie

Unter somatischer Gentherapie versteht man im Allgemeinen die Einschleusung genetischen Materials in die Körperzellen eines Individuums mit dem Ziel einen therapeutischen Nutzen für das Individuum zu erzeugen. Somatische Zellen sind alle Körperzellen, die nicht an der Fortpflanzung beteiligt sind. Deshalb beschränkt sich eine somatische Gentherapie nur auf den behandelten Patienten und nicht seine Nachkommen. Die Anwendungsmöglichkeiten der somatischen Gentherapie liegen vor allem auf zwei Gebieten: (i) Erbkrankheiten mit einem monogenen Einzelgendefekten (z.B. Zystische Fibrose, Muskeldystrophie Duchenne), und (ii) multifaktorielle genetische Erkrankungen (z.B. maligne Tumoren und Herz-Kreislaufkrankungen). Ziel der Gentherapie ist es beispielsweise bei den monogenen Erbkrankheiten, das defekte Gen zu ersetzen, beziehungsweise der Zelle die korrekte genetische Information zuzuführen („Genaddition“). Die Gentherapie kann grundsätzlich außerhalb und innerhalb des Organismus erfolgen. Bei der *ex vivo* Gentherapie werden dem Patienten Gewebszellen entnommen in welche das gewünschte Gen außerhalb des Körpers in der Zellkultur (*in vitro*) eingeschleust („transfiziert“) wird. Die genetisch veränderten Zellen werden anschließend wieder reimplantiert. Die *ex vivo* Gentherapie beschränkt sich auf Zellen, die leicht isolierbar und *in vitro* kultivierbar sind, wie Lymphozyten und hämatopoetische Stammzellen.

Bei der *in vivo* Behandlung versucht man, das genetische Material direkt in die Zielzellen im Körper des Patienten einzuschleusen. Die einfachste Methode ist hierbei die direkte Injektion nackter Plasmid-DNA in das Gewebe, zum Beispiel in Skelettmuskel, Haut oder Herzmuskel (Wolff *et al.*, 1990, Hengge *et al.*, 1996, Li *et al.*, 1997). Zwar konnte man nach der direkten Injektion der Plasmid-DNA einen Gentransfer beobachten, dieser war jedoch gering. Das Verfahren ist zudem kostenintensiv, weil der größte Anteil der Plasmid-DNA von pDNA-Nukleasen abgebaut wird, bevor die pDNA in die Zellen gelangen kann. DNA-Nukleasen sind Enzyme, die die Desoxyribonukleinsäure-Molekülketten (DNA) in kürzere Molekülketten oder Einzelbausteine abbauen. Aus diesem Grund erfordert es Methoden, die diesen Abbauvorgang verhindern. Ein viel beschriebener Weg hierfür ist es, die pDNA mit Vektoren zu verpacken.

1.1.2 Viraler und nicht-viraler Gentransfer

Um die Transfereffizienz zu steigern, ist es sinnvoll die pDNA an ein Transportvehikel („Vektor“) zu koppeln, welches es ihr vereinfacht, die Zellmembran zu überwinden und in die Zelle zu gelangen. Man unterscheidet zwischen *viralen* und *nicht-viralen* Vektoren. Man verwendet bei den viralen Vektoren genetisch modifizierte Viren, meist replikationsdefiziente Retro- oder Adenoviren, die das gewünschte genetische Material in die Zielzelle einbringen. Nicht-virale Vektoren versuchen auf unterschiedlichste Art und Weise, die pDNA in die Zelle einzuschleusen. Die pDNA kann beispielsweise an zellspezifische Substanzen gekoppelt werden, die von den Zielzellen über rezeptor-vermittelten Transport aufgenommen werden (Kim *et al.*, 2005). Weitere häufig verwendete nicht-virale Vektoren sind *Lipide* mit kationisch geladenen Kopfgruppen. Die negativ geladene nackte Plasmid-DNA wird hierbei über elektrostatische Bindung an die positiv geladenen Vektoren gekoppelt. Dadurch wird zum einen die pDNA im Körper vor DNase Abbau geschützt. Zum anderen ermöglicht eine nicht näher bekannte Interaktion der membranständigen endosomalen Lipide mit den Lipid-DNA-Komplexen die Freisetzung der pDNA in das Zytoplasma der Zelle (Felgner *et al.*, 1987).

Der Vergleich der Transfereffizienz von viralen und nicht-viralen Vektoren miteinander zeigt, dass virale Vektoren wesentlich effektiver sind. Adenoviren beispielsweise wären bei intravenöser Applikation hervorragend geeignet für eine Genterapie von Lebererkrankungen, da sie Leberzellen sehr effizient infizieren. Allerdings bauen Adenoviren im Gegensatz zu Retroviren, ihre pDNA jedoch nicht in das Genom ein. Damit ist die Genexpression lediglich vorübergehend und erfordert eine Wiederholung der Applikation. Zudem reagiert der Empfängerorganismus mit einer Immunantwort auf die vorausgegangene Virusapplikation, die zu einer entzündlichen Reaktion führt und den Gentransfer erschwert (Rosenecker *et al.*, 1996). Nicht-virale Vektoren wie Lipide zeigen keine solche Antigenizität und besitzen zudem eine geringe Toxizität. Hierin besteht ihr großer Vorteil gegenüber den viralen Vektoren, insbesondere bei wiederholter Applikation. Zudem besteht keine Gefahr, dass es bei einer zeitgleichen Infektion mit dem Wildtyp des Virus, zu einer Rekombination genetischen Materials kommt

1.1.3 Kationische Polymere

Neben den Lipiden, stellen die *kationischen Polymere* eine weitere Gruppe synthetischer nicht-viraler Vektoren dar. Dazu gehören zum Beispiel die *Dendrimere* (Haensler *et al.*, 1993), das *poly-L-Lysin* (Zauner *et al.*, 1999) und das *Polyethylenimin* (Boussif *et al.*, 1995). Gleich den kationischen Polymeren sind die kationischen Lipide positiv geladen und komplexieren die negativ geladene Plasmid-DNA über elektrostatische Kräfte. Die daraus entstehenden Komplexe sind mono- oder polydispers und zeigen ähnlich gute Transfektionseigenschaften wie Lipide, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Boussif *et al.*, 1995). Beim nicht viralen Gentransfer muss die Plasmid-DNA drei große Barrieren überwinden: Die Zellmembran, die Endosomenmembran und die Kernmembran. Man nimmt an, dass die insgesamt positiv geladenen pDNA-Vektor Komplexe mit negativ geladenen Proteoglycanen der Zellmembran reagieren und rezeptor-vermittelt endosomal aufgenommen werden. Die positiven Ladungen und die Pufferkapazität des kationischen Polymers führen im Endosom vermutlich zu einem osmotischen Anschwellen und anschließend zur Zerstörung des Endosoms, wodurch die Plasmid-DNA in das Zytoplasma der Zelle gelangen (Behr, 1997). In dieser Arbeit wurde vornehmlich das kationische Polymer Polyethylenimin (PEI) zur Komplexierung der pDNA verwendet. Es hatte sich gezeigt, dass kationische Polymere wie Polyethylenimin im Unterschied zu kationischen Lipiden, die Translokation der pDNA in den Zellkern fördern (Pollard *et al.*, 1998). Trotzdem ist der Transport von Plasmid-DNA in den Zellkern noch sehr ineffizient. Pollard *et al.* injizierten nackte Plasmid-DNA und PEI-gebundene Plasmid-DNA in das Zytoplasma. Sie beobachteten, dass 10-fach mehr pDNA-Kopien den Zellkern erreichten, wenn die pDNA an PEI gebunden war. Verglich man dies jedoch mit einer Injektion von pDNA in den Zellkern, so konnte man beobachten, dass insgesamt lediglich 1% der pDNA-Kopien aus dem Zytoplasma in den Zellkern gelangt war. Kationische Polymere scheinen also zwar erfolgreich die Zellmembran und die endosomale Membran zu überwinden, aber der Transport in den Zellkern scheint noch immer der größte limitierende Faktor beim nicht viralen Gentransfer zu sein.

1.2. Vernebelung als Applikationsweg für Gentransfer

Im *in vivo* Versuch ist der Applikationsweg der Genvektorkomplexe von großer Bedeutung, da die Plasmid-DNA zielgerichtet in ein bestimmtes Organ und eine bestimmte Zellart eingeschleust werden soll. In dieser Arbeit war das Augenmerk auf die möglichen Anwendungen in der Lunge gerichtet, in der sich sowohl angeborene Erbkrankheiten wie die zystische Fibrose oder der α 1-Antitrypsin-Mangel, als auch erworbene Erkrankungen wie Karzinome und Metastasen manifestieren. Es hatte sich interessanterweise gezeigt, dass nach intravenöser Gabe von PEI-pDNA-Komplexen, ein effizienter Gentransfer in der Lunge gefunden werden kann (Goula *et al.*, 1998, Zou *et al.*, 2000, Coll *et al.*, 1999). Die systemische Gabe der Genvektorkomplexe (z.B. durch Injektion in die Schwanzvene von Mäusen) zeigte in der Lunge die höchste Transfereffizienz im Vergleich zu anderen Organen (Herz, Leber Lunge, Niere). Die Transfektionseffizienz war abhängig von Zeit und Dosis. Die Gabe von höheren Dosen der Genvektorkomplexe war jedoch gleichzeitig mit der Entstehung von Lebernekrosen und dem Tod der Versuchstiere verbunden (Chollet *et al.*, 2002).

Bei der Lunge bietet sich neben der systemischen Applikation auch die Möglichkeit einer topischen Applikation an. Grundsätzlich sind für die intrapulmonale Applikation (i) die Inhalation eines Aerosols und (ii) die Instillation durch einen intratracheal liegenden Tubus denkbar. Ein Vergleich dieser Methoden zeigte, dass sich die verabreichten Substanzen bei der Instillation eher in den distalen Abschnitten der Lunge fanden, und bei der Inhalation eher in den proximalen Anteilen. Intratracheal instillierte Flüssigkeiten verteilen sich allerdings nicht so homogen wie inhalierte (Brain *et al.*, 1974). Ein Vorteil der direkten intratrachealen Instillation, besteht darin, dass die gesamte Dosis der Genvektorkomplexe in die Lunge eingebracht werden kann. Im Gegensatz dazu kommt es bei der inhalativen Darreichungsform zu großen Verlusten der verabreichten Substanz. Die Partikelgröße des Aerosols ist hier von entscheidender Bedeutung. Im Mausmodell werden bis zu 47% der Partikel eines Durchmessers kleiner als $0,27\mu\text{m}$ in der Alveolarregion abgesetzt. Bei einem Durchmesser von $3,45\mu\text{m}$ sind es nur noch 0,9%. Teilchen dieser Größe werden bei Mäusen, welche obligatorische Nasenatmer bereits im Nasopharynxbereich abgefangen (Raabe *et al.*, 1988). Trotzdem erscheint die inhalative Applikation als eine schonende und weniger invasive Methode, vor allem im Hinblick auf eine Anwendung beim Menschen.

In verschiedenen Studien ist die Transfereffizienz von *vernebelten* PEI-pDNA-Komplexen untersucht worden. Dabei wurden Mäuse in ihrem Käfig, einem vernebelten PEI-pDNA-Komplexen ausgesetzt. Mit dieser Methode konnte in einem B16-F10 Mausmelanommodell

das Wachstum von Lungenmetastasen stark vermindert und die Überlebenszeit der Mäuse um 50% gesteigert werden. Die verabreichte pDNA kodierte in diesem Versuch das Apoptose induzierende Gen p53 (Gautam *et al.*, 2000). Mit der gleichen Methode konnten ebenso die Lungenmetastasen des Osteosarkoms im Mausmodell inhibiert werden (Densmore *et al.*, 2001). Gleichzeitig konnten keine Anzeichen von Toxizität oder einer Entzündung in den Lungen der Tiere gefunden werden. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das Vernebeln von Genvektorkomplexen eine viel versprechende Darreichungsform für den nicht viralen Gentransfer in der Lunge darstellt.

1.3 Ziele dieser Dissertation

Der erste Teil der Arbeit hatte das Ziel, einen Versuchsaufbau zu konzipieren, der einen reproduzierbaren und effektiven nicht-viralen Gentransfer in den Lungen von Mäusen bei Vernebelung der Genvektorkomplexe erreicht. Dafür sollten die verschiedenen Faktoren, die den Gentransfer bei Vernebelung beeinflussen können untersucht werden. Es wurden als erstes unterschiedliche Vernebelungskäfige konstruiert und erprobt. Die erfolgreiche Behandlung der Mäuse erforderte es, aufgrund der anatomischen und physiologischen Vorbedingungen, ein Aerosol zu produzieren dessen Durchmesser klein genug war, um die Lungen der Tiere durch Inhalation zu erreichen. Dies konnte sowohl durch die Modifikation des Versuchsaufbaus erreicht werden, als auch durch die Verwendung unterschiedlicher Verneblertypen. Als Standardvernebler wurde hier, entsprechend der Vorarbeiten von Densmore *et al.*, ein weit verbreiteter Düsenvernebler verwendet.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Optimierung des Gentransfers via Aerosol war der Einfluss des Solvens auf die Eigenschaften der PEI-pDNA-Komplexe. Densmore *et al.* hatten beispielsweise bei der Vernebelung ihrer PEI-pDNA-Komplexe erfolgreich PBS (Phosphate buffered Saline) als Solvens verwendet (Densmore *et al.*, 2001). Voruntersuchungen hatten aber gezeigt, dass die Verwendung von Solventien geringer Ionenstärke wie destilliertem Wasser und 5%-iger Glukose zur Entstehung kleiner Partikel von 50-60nm Größe führt (Finsinger *et al.*, 2000, Goula *et al.*, 1998, Ogris *et al.*, 1998, Rudolph *et al.* 2002), während die Verwendung ionischer Solventien, wie isotonischer Kochsalzlösung zur Entstehung größerer Partikel führt, welche aggregieren (Finsinger *et al.*, 2000, Goula *et al.*, 1998, Ogris *et al.*, 1998). Zudem hatte das Solvens einen Einfluss auf die Oberflächenladung der Komplexe gezeigt (Zou *et al.*, 2000). In dieser Arbeit sollte der Einfluss des Solvens sowohl auf die vernebelten Komplexe selbst, als auch auf die Transfereffizienz nach Vernebelung untersucht

werden. Dies gründete auf der Annahme, dass das Solvens selbst auch einen physiologischen Effekt auf die Epithelzellen haben kann (Mochizuki *et al.*, 1999).

Nach der Etablierung eines geeigneten Versuchssettings sollte die Kinetik der Genexpression untersucht werden, um festzustellen, ob sich ein Gentransfer über längere Zeit hinweg aufrechterhalten lässt. Angesichts der Tatsache, dass das Verabreichen von Genvektoren nur einen transienten Gentransfer bewirkt und eventuell wiederholt werden muss, war es von Interesse festzustellen, ob auch geringere pDNA-Dosen einen zufrieden stellenden Effekt erzielen. Schließlich sollte der Verbleib der vernebelten Genvektorkomplexe im Körper der Mäuse mittels Radioaktiv markierter pDNA untersucht werden. Da Mäuse große stammspezifische Unterschiede in der Lungenanatomie und Atemphysiologie zeigen (Raabe *et al.*, 1988), sollten drei Maustämme im Hinblick auf Transfereffizienz und Körper-DNA-Verteilung untersucht werden. Die spezifische Verteilung in den Lungen der Tiere sollte mit Hilfe histologischer Schnitte dargestellt werden.

Im letzten Teil der Arbeit sollten andere Genvektorträgersysteme, die sich beispielsweise *in vitro* als wirksam gezeigt hatten, auf das nun standardisierte Versuchssetting am Mäusemodell übertragen werden und mit den etablierten PEI-pDNA-Komplexen verglichen werden.

2 Methoden und Materialien

2.1. Vernebelung der Gen-Vektor-Komplexe und Untersuchung der Stabilität und Transfektions-eigenschaften

2.1.1 Herstellung der Gen-Vektor-Komplexe

Verwendete Solventien

Die Stabilität und Transfektionseffizienz der Polyplexe bei Vernebelung wurde für folgende Lösungen untersucht: zweifach destilliertes pyrogenfreies Wasser (Delta Pharma, Boehringer Ingelheim, Deutschland), 5%-iger Glukose-Lösung (Delta Pharma, Boehringer Ingelheim, Deutschland), 10mM HEPES-Puffer, pH=7,4 und HBS (HEPES buffered saline; 150mM NaCl, 10mM HEPES, pH=7,4).

Plasmide und kationische Polymere

Als Reporter gen für die Transfektionseffizienz wurden bei allen *in vitro* und *in vivo* Versuchen, mit Ausnahme der Mehrfachvernebelung, das Plasmid pCMVLuc verwendet, das für das Luziferase-Protein des Glühwürmchens *Photinus pyralis* kodiert und über einen CMV Promoter reguliert wird. Bei den Mehrfachvernebelungen wurde das Plasmid pBLuc verwendet. Beide Plasmide wurden uns von Herrn Dr. E.Wagner (Boehringer Ingelheim, Wien) zur Verfügung gestellt. Die Plasmid-DNA wurde in *Escherichia coli* amplifiziert und von PlasmidFactory (Bielefeld, Deutschland) gereinigt. Die Reinheit der Plasmide beträgt $\leq 0,1$ E.U./ μg pDNA, die Menge an supercoiled pDNA war größer als 90% ccc.

Polyethylenimin wurde als Vektor sowohl in der verzweigt-kettigen Form (branched PEI, b-PEI, mittleres Molekulargewicht 25kDa; Aldrich, Deisenhofen) als auch in der linearen Form (linear PEI, l-PEI, mittleres Molekulargewicht 25kDa; Polysciences, Warrington, USA und l-PEI 22kDa von M. Ogris) verwendet. L-PEI wurde bei pH=7 in Wasser dialysiert.

Berechnung des N/P-Verhältnises

Das Stoffmengenverhältnis von protoniertem Stickstoff zu Phosphat bei der Herstellung von PEI/pDNA-Komplexen wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\frac{N}{P} = \frac{m(PEI)}{43,069 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}} \cdot \frac{330 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}}{m(DNA)}$$

$$\Rightarrow \frac{N}{P} = \frac{m(PEI)}{m(DNA)} \cdot 7,662$$

Das Ladungsverhältnis +/- des TAT-Oligomers zur pDNA wird wie folgt berechnet:

$$\frac{+}{-} = \frac{m(TAT_{2-4})}{MG(TAT_{2-4}) \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}} \cdot \frac{z \cdot 330 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}}{m(DNA)}$$

z = Anzahl positiv geladener Aminosäuren

$$MG(TAT_2) = 3444,1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}, z = 16$$

$$MG(TAT_3) = 5059,0 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}, z = 24$$

$$MG(TAT_4) = 6673,9 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}, z = 32$$

Zubereitung der pDNA-Vektor-Komplexe

Für die Vernebelungsexperimente *in vitro* wurden 3 ml pDNA-Vektor-Lösung zur Vernebelung zubereitet. Bei der Herstellung binärer Komplexe wurden 30µg Plasmid-DNA in 1500µl des jeweiligen Solvens gelöst. Entsprechend wurde bei einem N/P = 10 der kationische Vektor ebenfalls in 1500µl Vernebelungslösung verdünnt. Dies entspricht 39,2µg PEI. Dienten SLN als kationischer Vektor, wurden die SLN in einem w/w-Verhältnis von 2,5 (entsprechend 7,5µg SLN) in 1500µl Vernebelungslösung gelöst. Anschließend wurde die pDNA-Lösung schnell zur Vektorlösung pipettiert, durch mehrmaliges rasches Auf- und Absaugen vermischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die Herstellung Ternärer Komplexe, wurden die entsprechenden Mengen der Plasmid-DNA, des kationischen Polypeptids und des TAT-Oligomers (bei einem N/P=1,

m(TAT₂)=19,569µg) jeweils in 1000µl verdünnt. Anschließend wurde die pDNA-Lösung zur TAT-Lösung pipettiert und durch mehrmaliges rasches Auf- und Absaugen vermischt. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur, wurde die pDNA-TAT-Lösung zur PEI-Lösung zugegeben und wiederum für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

SLN- Herstellung

Als weiterer kationischer Vektor wurden Solid Lipid Nanoparticles (SLN) verwendet, die uns freundlicherweise von Prof. R.H. Müller, Berlin, zur Verfügung gestellt wurden. SLN-Partikel wurden durch das Verfahren der heißen Hochdruckhomogenisierung hergestellt (Müller *et al.* 2000). Die festen Lipide wurden kurz auf 10°C über ihr Schmelzpunkt erhitzt. Die geschmolzenen Lipide (4% [w/w] bezogen auf das Endprodukt) und die heiße wässrige Lösung, bestehend aus Surfactant und kationischen Lipiden (2% [w/w] Tween 80 und Span 85 in einem 7:3 Verhältnis und 1% [w/w] kationische Lipide) bildeten nach einer Minute Durchmischung eine Voremulsion. 3,5g -Ladungen der SLN, die das kationische Lipid DOTAP (SLN_DOTAP) enthielten, wurden durch einen erhitzbaren EmulsiFlex[®]-B3 (Avestin Inc., Ottawa, Kanada) homogenisiert, welcher diskontinuierlich arbeitete. Für die Herstellung der Voremulsion wurde ein Hochgeschwindigkeitsrührer (Ultra Turrax T25, Jahnke & Kunkel, Deutschland) verwendet. Die Voremulsion wurde auf 85°C erhitzt und bei einem Druck von 480 bar in vier Zyklen homogenisiert.

TAT- Peptid

Zusätzlich zu den kationischen Polymeren wurden Oligopeptide an die Genvektorkomplexe gekoppelt, die das argininreiche Motiv des HIV-1 TAT Proteins enthielten. Die Peptide wurden nach einem standardisierten Protokoll mittels Fmoc-Chemie über Festphasenpeptidsynthese in einem automatischen Applied Biosystems 431 A Peptidsynthesizer hergestellt, gereinigt und durch Massenspektroskopie analysiert. Folgende Peptide wurden synthetisiert und verwendet: C(YGRKKRRQRRRG)₂ (TAT₂), C(YGRKKRRQRRRG)₃ (TAT₃), C(YGRKKRRQRRRG)₄ (TAT₄) und C(YGRKERRQERRG)₂ (TAT₂-M1). Die Peptide wurden im Biochemieinstitut der medizinischen Fakultät der Humboldt Universität, Berlin synthetisiert.

P6YE5C-Hüllpolymer

Das P6YE5C Hüllpolymer gehört zu einer neuen Klasse protektiver Co-Polymere (= PROCOP) die auf Polyethylenglycol basieren und die Funktion haben elektrostatisch an die präformierten Vektor-pDNA-Komplexe zu binden, diese zu umhüllen und damit vor Interaktionen mit Blutbestandteilen wie Serumproteinen zu schützen (Finsinger *et al.*, 2000). Für die Herstellung der PROCOP wurden Co-Polymere bestehend aus 3-(2'-Thiopyridyl)-Mercaptopropionyl-Glutamat und Diamino-Polyethylenglycol-6000 synthetisiert, und anschließend an das Peptid YE5C gekoppelt (Sequenz (Ac-YE₅)₂-K-ahx-C; ahx = 6-Aminohexansäure). Hier wurden für die Vernebelung PEI/pDNA-Komplexe in einem N/P von 8 zubereitet (pDNA-Gesamtmenge = 1mg, in 8 ml destilliertem Wasser) und anschließend mit 309,2µl des P6YE5C vermischt. Die Hüllpolymere wurden von Dr. C. Plank im Institut für experimentelle Onkologie der TU-München synthetisiert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Verneblertypen

Es werden in der klinischen Anwendung verschiedene Apparaturen zu Vernebelung von Flüssigkeiten verwendet. In dieser Arbeit wurden drei verschiedenartige Verneblertypen daraufhin untersucht, inwiefern der Verneblungsprozess die pDNA degradiert: Der Düsenvernebler PARI BOY® LC plus (PARI GmbH, Starnberg, Deutschland) und die Ultraschallvernebler e-Flow® (PARI GmbH, Starnberg, Deutschland) und der multisonic®LS 290 (Schill GmbH & Co. KG Medizintechnik, Probstzella, Deutschland)

2.1.3 Vernebelung der Gen-Vektor-Komplexe

Es wurden verschiedene Vorrichtungen konstruiert um die pDNA/Vektor-Lösungen zu vernebeln und den Nebel aufzufangen. Bei dem PARI BOY® LC plus wurde eine 10 ml Spritze an den Düsenausgang befestigt und die Spritzenspitze durch ein kleines Gummischläuchlein mit einem Eppendorfcup verbunden, in dem der Nebel aufgefangen wurde (*Abb. 1*). Der PARI e-Flow® wurde durch einen Elastomer-Adapter von Intersurgical (22mmID/22mm Lippe; Intersurgical, St. Augustin, Deutschland) und Parafilm mit einem 50 ml Tube verbunden (*Abb. 2*). Dabei war es wichtig, in den verbindenden Parafilm eine kleine Öffnung zu stechen, um einen Druckausgleich zu ermöglichen. Bei dem Schill Ultraschallvernebler stellte sich das Kondensieren und Auffangen des Nebels als technisch unmöglich heraus, weshalb keine Gelelektrophorese mit den vernebelten Komplexen durchgeführt werden konnte.

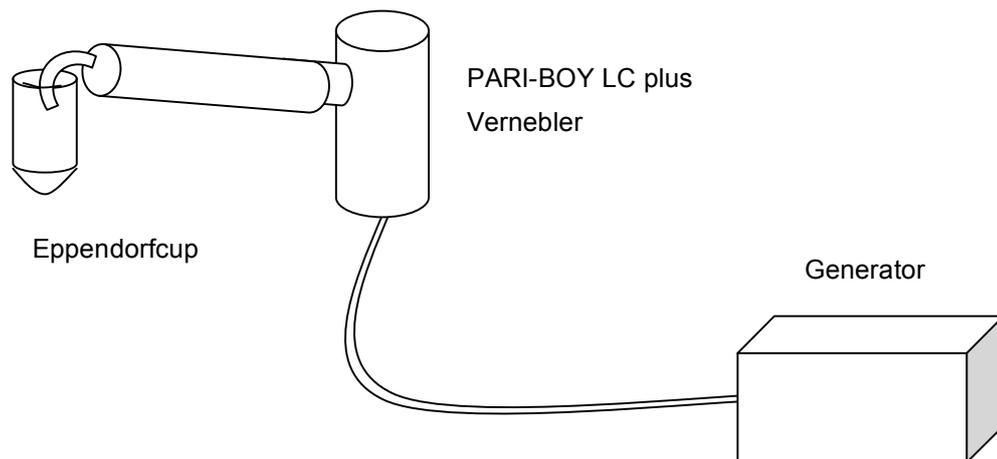


Abb. 1: Schematischer Aufbau des PARI-BOY LC plus Verneblers zum Auffangen des Aerosols.

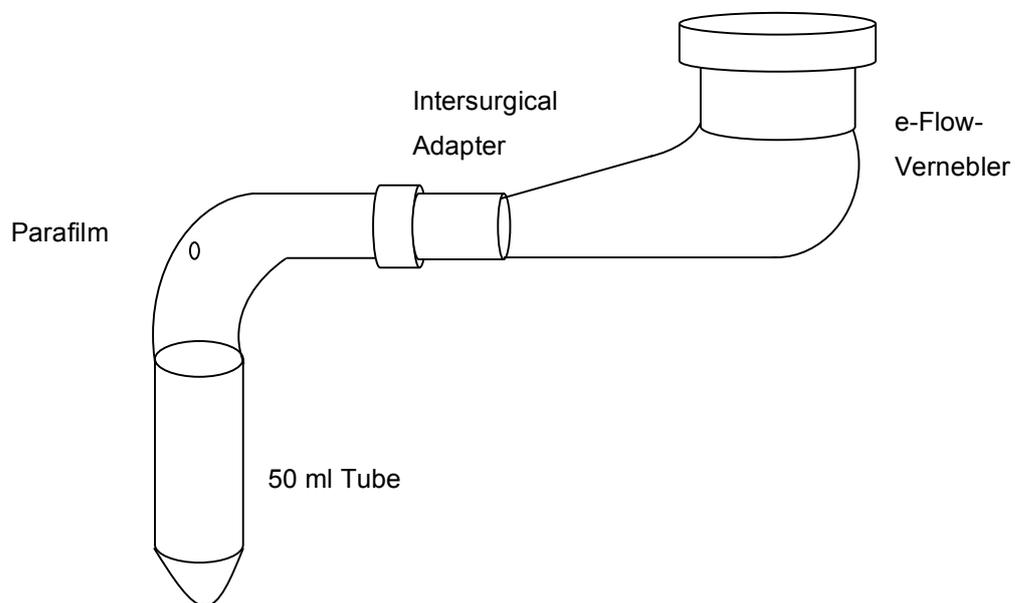


Abb. 2: Schematischer Aufbau der Vernebelungsapparatur mit PARI e-Flow®. Erläuterungen im Text.

2.1.4 *In Vitro*-Transfektionen und Luziferasemessung

16HBE14o-Zellen wurden in Minimal Essential Medium nach Eagle (MEM, supplementiert mit 10% Fötalem Kälber Serum (FCS)) bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-4 Tage mit Trypsin EDTA trypsinisiert und passagiert. Zellen aus den Passagen 3-25 wurden für die Transfektionen benutzt. Die Transfektionen wurden in 24-Well Platten (TPP, Peske) durchgeführt. Einen Tag vor der Transfektion wurden 150.000 16HBE14o - Zellen pro Well ausgesät. Dieses resultierte in ca. 60-70% Konfluenz für die Transfektion. Am Tag der Transfektion wurden die Zellen mit 1 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) gewaschen und anschließend 900µl FCS freies Medium in jedes Well pipettiert. Dann wurden 100µl der durch Vernebelung gewonnenen pDNA/Vektor-Lösung (nicht vernebelt, vernebelt, Reservoir) zu den vorgelegten 900µl Medium pipettiert, die Platten leicht geschwenkt und 4h bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchte inkubiert. Die Transfektionen wurden als Vierfach-Bestimmung durchgeführt. Nach 4h wurden bei den 24-well Platten die Komplexe abgesaugt und durch FCS-haltiges und Antibiotika-haltiges (Penicillin/Streptomycin 0,1% (V/V); Gentamycin 0,5% (V/V)) Medium ersetzt und die Zellen für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Es wurden 100µl Lysepuffer (250mM Tris, 0,1% Triton, pH=7,8) in jedes Well pipettiert, die Platten mit Folie verklebt und bei -80°C eingefroren bis zur Messung der Luziferaseaktivität.

Nach Injektion von 100µl Luziferin-Substrat-Puffer (Promega) zu 10µl des Zellüberstandes, wurden die über 10 s emittierten Photonen in einem Lumat LB9507 (Berthold, Bad Wildbach, Deutschland) vermessen und jeweils der zuvor gemessene Hintergrund des Messröhrchens abgezogen. 1×10^6 RLU/10s entsprechen 1,25ng Luziferase. Die Luziferaseaktivität wurde auf das Gesamtprotein der Zellmasse bezogen. Das Gesamtprotein wurde mittels eines BioRad Protein Assays (Bradford) bestimmt. Alle Transfektionen wurden mindestens zweimal durchgeführt, und ein repräsentatives Experiment ist gezeigt.

2.1.5 Gelelektrophorese

Die Stabilität der pDNA-Vektor-Komplexe wurde durch Gelelektrophorese untersucht. Dazu wurde ein 1%iges RNA-freies Agarosegel hergestellt. 1g Agarose wurde in eine Glasflasche eingewogen und mit 100 ml TAE-Puffer aufgefüllt, 3 Minuten in der Mikrowelle (Micro 750W, Whirpool) aufgeköcht, unter Röhren etwa 15 Minuten abgeköhlt und 10 μ l Ethidiumbromid-Lösung (c=10mg/ml) hinzu pipettiert. Die Elektrophoresekammer wurde gefüllt, die Kämme für die Taschen eingesetzt, und das Gel erstarren gelassen. Die Komplexe wurden wie unter 2.1.1 beschrieben generiert, anschließend wurden die Komplexe vernebelt. Es wurden folgenden Proben untersucht: Eine vor der Vernebelung entnommene Fraktion (nv = nicht vernebelt), die nach der Vernebelung aufgefangene Fraktion (v = vernebelt) und die im Vernebler verbliebene Fraktion (r = Reservoir). 20 μ l der so gewonnenen Samples (0,2 μ g pDNA) wurden mit 5 μ l Orange G und 5 μ l Heparansulfat (c = 5 μ g/ μ l) vorsichtig vermischt und 28 μ l dieser Lösungen in die Taschen pipettiert. Vergleichend wurden 20 μ l eines Markers (1kDa; 15 μ l Marker + 5 μ l Orange G), und jeweils 30 μ l einer mit, bzw. ohne Heparansulfat versetzten pDNA-Lösung (0,2 μ g pDNA in Wasser) auf das Gel aufgetragen, und das Gel für 1,5h bei 70V laufen gelassen.

2.2 Vernebelung von pDNA-Vektor-Komplexen an Mäuse

2.2.1 Versuchstiere

Sechs bis acht Wochen alte Mäuse der Stämme BALB/c (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland), NMRI (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) und heterozygote C57bl/6 (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) wurden bei *ad libitum* Fütterung unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen gehalten, bei $24\pm 1^\circ\text{C}$, $55\pm 10\%$ Luftfeuchtigkeit und einem 12h:12h Licht-Dunkelheit Zyklus. Alle Tierversuche wurden von der Ethikkommission zugelassen und kontrolliert und entsprachen den Richtlinien des Deutschen Gesetzes zum Schutz der Tiere.

2.2.2 Vernebelungsapparaturen

Es wurden grundsätzlich zwei Arten von Vernebelungskammern untersucht, zum einen eine Reihenvernebelung bei der sich die Versuchstiere außerhalb der Vernebelungsvorrichtung befanden, zum anderen die Ganzkörperkammer, bei der sich die Tiere in einem Käfig frei bewegen konnten, in den das Aerosol direkt eingeleitet wurde.

Reihenvernebelung

Der Reihenvernebler bestand aus einem 45 cm hohen Plexiglaszylinder mit einem Durchmesser von 7,7 cm, der in aufrechter Position befestigt wurde. Die obere und untere Öffnung wurden mit einem konischen Aufsatz verschlossen, die jeweils einen etwa 2 cm große kreisrunde Eingang an der Spitze hatten, an die man oben den Vernebler anschließen konnte, und die am unteren Ende den Aerosolabfluss ermöglichte. Zwischen dem oberen Kegel und dem Zylinder war eine perforierte Platte angebracht um einen gleichförmigen Fluss des Aerosols zu erleichtern. Entlang des Zylinders wurden in senkrechter Position auf verschiedenen Höhen 50 ml Tubes angebracht (30 x 115 mm, Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz), deren Spitze abgeschnitten war (*Abb. 3*). Die Versuchstiere wurden zum Teil anästhesiert (Ketamin 100mg, -Xylazin 4mg/kg Körpergewicht) und anschließend entweder mit einem 22-gauge Venenverweilkatheter intubiert (25mm, 0,9 mm OD, 0,6 mm ID; Baxter, Deutschland) oder ohne Intubation belassen, und mit der Schnauze in Richtung der Vernebelungsapparatur in die Tubes gelegt. Nicht anästhesierte Mäuse wurden in

spezielle Tubes platziert, an deren vorderer Öffnung ein Metallgitter angebracht war, sodass das Aerosol zwar eingeatmet werden konnte, die Maus jedoch nicht in den Verneblungszyylinder entweichen konnte. Nun wurde der Düsenvernebler (PARI BOY® LC plus, PARI GmbH, Starnberg, Deutschland) am oberen Ende durch einen kurzen Gummischlauch mit dem Kunststoffzylinder verbunden und die Vernebelung gestartet.

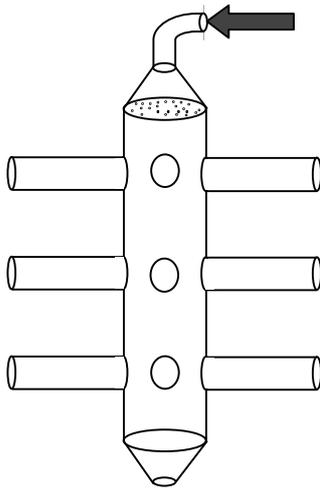


Abb. 3: Schematischer Aufbau des Reihenverneblers. Das Aerosol wird oben eingeleitet (Pfeil) und fließt im Rohr nach unten. Die Mäuse befinden sich in der wagrecht liegenden Röhren.

Ganzkörperkammer

Die Ganzkörperkammer bestand grundsätzlich aus einer Plexiglasbox von 9,8 x 13,2 x 21,5 cm Größe, in der sich die Mäuse frei bewegen konnten und an deren einer Seite der Vernebler direkt angeschlossen werden konnte. Auf der anderen Seite befanden sich vier kleine Löcher, die den Druckausgleich und damit auch den Aerosolfluss ermöglichten (Abb. 4). Eine Variation der Ganzkörperkammer bestand in einem vorgeschalteten 45 cm langen horizontal gelegten Plexiglaszylinder („Spacer“) mit einem 7,7 cm Durchmesser, der an einem Ende durch ein kleines Plastikrohr (\varnothing 2,1cm) an den Käfig verbunden war. Am anderen Ende wurde der Düsenvernebler angebracht (Abb. 5). Bei manchen Versuchen wurde der Boden des Spacers gleichmäßig mit 150g Silikagel (\varnothing 1-3mm, #85330, Fluka, Schweiz) bestreut (Abb. 6). Des Weiteren wurde ein Plexiglaszylinder (\varnothing 15,4 cm, Höhe 41,5cm) senkrecht auf die Ganzkörperkammer aufgebracht. Auf der Innenseite war 0,25 cm von der Lumenwand entfernt ein feinmaschiges Eisengitter angebracht. Der Zwischenraum wurde mit Silikagelkörnchen gefüllt. Am oberen Ende befand sich eine Abdeckung, die eine kleine Öffnung für den Vernebler enthielt (Abb. 7).

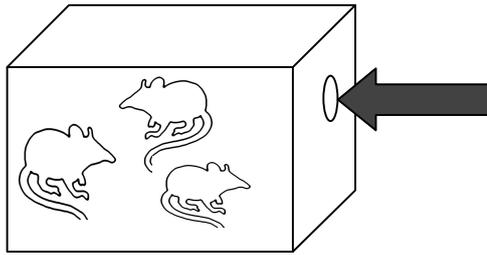


Abb. 4: Schema der Ganzkörperkammer. Der Nebel wird direkt in die rechteckige Plastikbox eingeleitet, in der sich die Mäuse frei bewegen können.

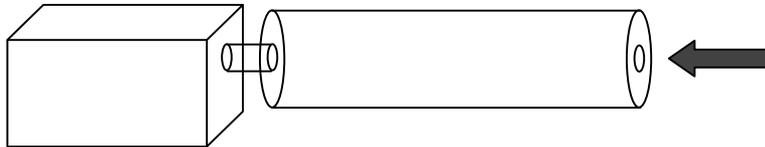


Abb. 5: Schema der Ganzkörperkammer mit Spacer. Die größeren Aerosoltröpfchen setzen sich am Anfang des Spacers ab, nur die kleineren gelangen bis zur Ganzkörperkammer.

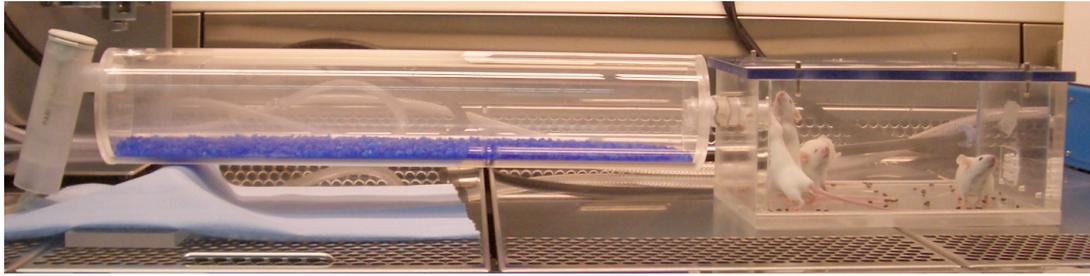


Abb. 6: Vernebelung in der Ganzkörperkammer mit Spacer und Silicagel.

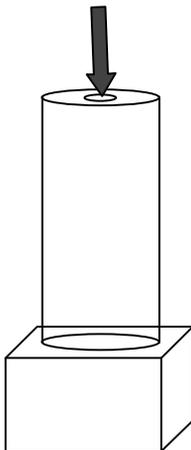


Abb. 7: Schematische Darstellung der Top-Down-Vernebelung. Das Aerosol wird oben eingeleitet (Pfeil), die Innenwand des Rohres ist mit Silicagel bedeckt. Die Mäuse befinden sich in der rechteckigen Box.

Einleitung von CO₂-haltiger Luft

Die Atemfrequenz und –tiefe verändert sich bei einer Erhöhung der CO₂ Konzentration in der Atemluft. Um diese zu steigern, verwendeten wir bei einigen Experimenten ein synthetisches Luftgemisch, das zu 5% CO₂ beinhaltet (Westfalen AG, Münster, Deutschland). Dazu wurde die Gasflasche über einen Gummischlauch mit einem Flowmeter verbunden, welches ermöglichte, die Flussgeschwindigkeit zu regulieren. Das Beatmungsgerät wurde mit dem Kompressor des Verneblers verbunden. Es wurde eine Flussgeschwindigkeit von 6 l/min bei einem Druck von 1 bar eingestellt. Dies entsprach der Flussgeschwindigkeit des Kompressors (Abb. 8).



Abb. 8: Einleitung des CO₂. Das Gasgemisch aus synthetischer Luft und 5 % CO₂ wird an einen Flowmeter angeschlossen und direkt an den Kompressor des Verneblers angeschlossen.

2.2.3 Herstellung der Gen-Vektor-Komplexe

Insgesamt wurde ein Gesamtvolumen von 8 ml vernebelt. Da der Vernebler (PARI- BOY, LC plus) maximal 4 ml fasst, wurden die Komplexe in zwei Portionen von 4 ml hintereinander vernebelt. Für die *in vivo* Experimente wurden die Genvektorkomplexe auf die gleiche Weise zubereitet wie unter 2.1.1 (siehe S.11) beschrieben. Als Plasmid wurde, wie in den *in vitro* Experimenten, das Luziferase-Gen kodierende pCMV-Luc-Plasmid verwendet. Als kationische Vektoren dienten Polyethylenimin (PEI), Solid Lipid Nanoparticles (SLN), Oligomere des HIV-1 TAT-Peptids, oder das P6YE5C Hüllpolymer (Finsinger *et al*, München). Als Gesamtdosis sollte standardmäßig im *in vivo* Versuch eine pDNA-Menge von 1 mg pro Experiment vernebelt werden, um einen ausreichend hohe pDNA-Dosis an die Mäuse zu erreichen. Dazu wurden die Konzentrationen der Lösungen angepasst.

Binäre Komplexe

Für die Herstellung binärer Komplexe wurden gleichvolumige Lösungen von 4 ml für die Plasmid-DNA und den Vektor erstellt. Das waren entsprechend für PEI 1,3 mg bei einem N/P=10, für die SLN 2,5 mg bei einem w/w-Verhältnis von 2,5.

Es wurden dieselben Solventien wie in den *in vitro* Versuchen verwendet, also zweifach destilliertes Wasser, 5%-iger Glukoselösung, HEPES Puffer, HBS und PBS (siehe 2.1.1). In einer Versuchsreihe wurde die Abhängigkeit zwischen der pDNA-Konzentration und -Dosis der Vernebelungsflüssigkeit und der Transfektionseffizienz untersucht. Die Standarddosis war 1 mg pDNA in 8 ml Solvens, also eine Konzentration von $c = 0,125 \text{ mg/ml}$. Es wurde erstens die halbe pDNA-Dosis bei gleicher Konzentration vernebelt (0,5 mg pDNA in 4 ml Wasser, $c = 0,125 \text{ mg/ml}$) und zweitens die halbe pDNA-Dosis bei geringerer Konzentration (0,5 mg pDNA in 8 ml Wasser, $c = 0.0625 \text{ mg/ml}$).

Ternäre Komplexe

Bei den ternären Komplexen wurden entsprechend drei gleichvolumige Lösungen hergestellt von jeweils 2,667 ml. Es wurden die gleichen Mengen Plasmid-DNA und PEI, bzw. SLN verwendet wie bei den binären Vektoren, und zusätzlich in der dritten Fraktion 0,652 mg TAT₂ (N/P=1) und 1,237 mg TAT₂-M₁ (N/P=1) und 309,2µl des Hüllpolymers P6 (DNA/PEI bei N/P = 8).

Vorvernebelungen

Bei einigen Versuchen wurde untersucht, ob die Vorvernebelung bestimmter Substanzen die Transfektionseffizienz steigern können. Zu diesem Zweck wurden 4 ml zweifach destilliertes Wasser (Delta Pharma, Boehringer Ingelheim, Deutschland), 3 ml Indomethazin (c=5mg/ml), 3 ml 400mM EGTA, und 3 ml 1% Polydokanol vor der eigentlichen Genvektorvernebelung eine halbe Stunde lang an die Versuchstiere vernebelt.

2.2.4 Organentnahme und Nachweis der Luziferaseaktivität

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Genvektorapplikation, üblicherweise jedoch nach 24 h, wurden die Mäuse mit 200µl einer Pentobarbital-Lösung (Narcoren[®]) entsprechend 120 mg Pentobarbital pro Kilogramm Körpergewicht intraperitoneal narkotisiert. Nach einem medianen Hautschnitt am Bauch wurde die Haut stumpf vom Bauchmuskel abpräpariert. Anschließend wurde der Bauchmuskel median durchtrennt, und damit das Peritoneum eröffnet. Im Anschluss wurde die Vena cava inferior punktiert etwa 0,1 ml venöses Blut entnommen und anschließend durch einen Schnitt komplett durchtrennt. 1 ml einer heparinhaltigen isotonischen Kochsalzlösung (25000 I.E. Heparin/1000ml) wurde direkt in den rechten Ventrikel injiziert, um die Lungen von Blut zu reinigen. Dieses war wichtig, da die Luziferaseaktivität durch Blutbestandteile, vor allem Hämoglobin (Colin *et al.*, 2000), beeinflusst wird und folglich die Ergebnisse verändert. Herz, Leber, Lunge, Trachea und Ösophagus wurden entnommen, in PBS gewaschen und in vorbereitete, mit 750µl Lysepuffer (Reporter Gene Assay Lysis Buffer und eine Proteininhibitortablette von Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) gefüllte und gekühlte Behälter gelegt (im Falle von Trachea und Ösophagus 250µl). Die Organe wurden anschließend gewogen, zweimal 20s lang auf höchster Stufe in einem in einem Mini-bead Beater (Biospect Products, Bartlesville, USA) homogenisiert und mit 10000g bei 4°C für 10 min. zentrifugiert. Nach Injektion von 100µl Luziferin-Substrat-Puffer (Promega) (10s Verzögerungszeit) zu 50µl des Überstandes wurden die über 10 s emittierten Photonen in einem Topcount Microplate Scintillation and Luminescence Counter (Canberra-Packard, Dreieich, Deutschland) vermessen und jeweils der Hintergrund abgezogen. Es war zu beachten, dass die Proben während der Aufbereitung kühl zu halten waren, und dass zügig gearbeitet wurde. Als Standard für die Berechnung der Menge exprimierter Luziferase im Lungengewebe, wurde rekombinante Luziferase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Höhe der Genexpression ist immer in pg Luziferase pro Gramm Lungengewebe angegeben.

2.2.5 Größenmessung der Komplexe im Zetaziser

Je nach Ionenstärke der Solventien, und nach Vektorzusammensetzung, änderten sich die Größen und Größenverteilung der einzelnen Partikel. Die Partikelgröße wurde durch dynamische Lichtstreuung in einem Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, Herrenberg, Deutschland) ermittelt. Folgende Einstellungen wurden verwendet: zehn Messungen pro Probe, Viskosität für Wasser, 0,89cP bei einer Temperatur von 25°C. Die Proben wurden nach der Herstellung der Komplexe kurz vor der Vernebelung entnommen (100µl) und nach der Vermessung wieder zur Vernebelung bereitgestellt.

2.2.6 Charakterisierung der Aerosoltröpfchengrößen und Ermittlung der Aerosoldeposition in der Vernebelungsapparatur

Die Größe der Aerosoltröpfchen hat einen maßgeblichen Einfluss auf den Ort der Deposition der vernebelten Substanz. Zur Charakterisierung der Größenverteilung der Tröpfchen wurde die Vernebelungsapparatur, bestehend aus Luftkompressor (PARI BOY® N), Vernebler (PARI LC plus®) und Spacer (horizontal positionierter Plexiglaszylinder) über ein T-Verbindungsteil mit einem NGI-Kaskadenimpaktor (Next Generation Pharmaceutical Impactor #072, MSP-Corporation, Minneapolis, USA) verbunden. Der Spacer war entweder leer oder am Boden gleichmäßig mit 150g Silikagel belegt. Da der Impaktor für eine genaue Messung eine Flussrate von 30 l/min benötigt, wurde hinter den NGI-Kaskadenimpaktor eine Absaugvorrichtung geschaltet (Digitaler Mass-Flow-Controller, (Bronkhorst High-Tech B.V., Ruurlo, Niederlande) und ein konstanter Fluss durch ein Flussmessgerät kontrolliert (Gilibrator 2, Gilian, Sensidyne, Inc., Clearwater, USA) (*Abb. 9*). Der Kompressor drückte das Aerosol mit einer Flussgeschwindigkeit von 5,5 l/min durch den Spacer. Die zusätzlich benötigte Luft (Raumluft $50 \pm 3\%$ r.h., $23 \pm 1^\circ\text{C}$) wurde über das offene T-Stück angesaugt. Es wurden 8 ml PEI/pDNA-Komplexe wie unter 2.2.3. beschrieben hergestellt und das gesamte Volumen auf einmal vernebelt, damit das Experiment nicht unterbrochen werden musste. Es wurde so lange vernebelt bis kein Aerosol mehr produziert wurde. Die Quantifizierung der Menge an Komplexen, die sich in den jeweiligen Stages des Kaskadenimpaktors befanden, wurde aufgrund der PEI Menge berechnet. Das PEI wurde nach der Methode von Ungaro *et al.* (Ungaro *et al.*, 2003) durch ein photometrisches Kupferassay quantifiziert.

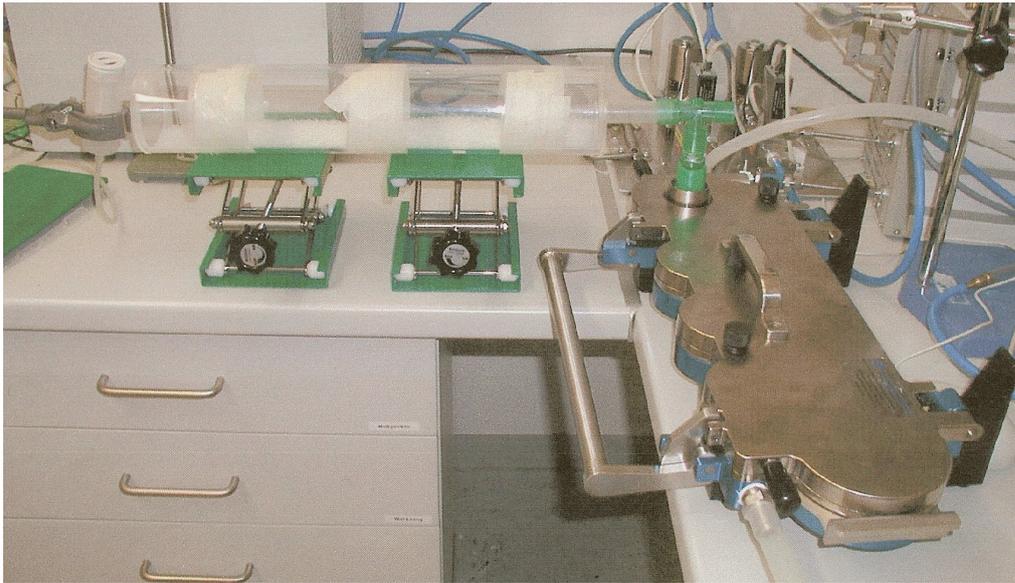


Abb. 9: Aerosolgrößenbestimmung im Kaskadenimpaktor. Das Aerosol wird in den Spacer geleitet, am anderen Ende wird es über ein T-Stück in den Kaskadenimpaktor gesaugt.

Die Aerosolcharakterisierung für den PARI e-Flow wurde mit einem Mastersizer X Ver. 2.15 (Malvern Instruments GmbH, Herrenberg, Deutschland) durch Laserbeugung bestimmt. Drei Minuten lang wurden 3 ml frisch zubereitete PEI-pDNA-Komplexe vernebelt und vermessen (Einstellungen: 20 l/m inspiratory flow, 50% r.h., 23°C). Die Komplexe wurden in zweifach destilliertem Wasser, 0,9% Kochsalzlösung, HBS, und 5%-ige Glukoselösung bei einem N/P von 10 (20µg pDNA) generiert, inkubiert und vernebelt.

2.2.7 Messung der pDNA-Verteilung mittels radioaktiv markierter pDNA

Zur genauen Ermittlung der pDNA-Menge, die jedes Einzelne Versuchstier durch die Vernebelung davonträgt, und der Verteilung der pDNA im Körper der Maus, wurden Genvektorkomplexe, dessen pDNA mit Jod¹²³ radioaktiv markiert war an die drei verschiedenen Mausstämmen vernebelt. Die Plasmid-DNA (pCMVLuc, 150µg) wurde nach der Commerford Methode radioaktiv markiert, wie von Terebesi *et al.* (Terebesi *et al.*, 1998) genauer beschrieben wurde. Die markierende Lösung wurde mittels einer PD-10 Gelfiltrationssäule (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) mit Wasser als Solvens getrennt. Die radioaktiv markierte pDNA wurde mit unmarkierter pDNA vermischt, zu einer Gesamtmenge von 1 mg pDNA mit PEI vermischt und vernebelt, wie unter 2.2.3 beschrieben. Unmittelbar nach der Vernebelung wurden die Mäuse eingeschläfert, die Organe entnommen, und die Radioaktivität mit einem Gammazähler (Wallac 1480 Wizard 3'', PerkinElmer Wallac, Freiburg, Germany) gemessen.

2.2.8 Histologie

Herstellung von FITC-markiertem PEI

PEI (15mg, mit destilliertem Wasser dialysiert) wurde mit Na₂CO₃ (pH=9) auf 300µl gelöst und reagierte für 1,5 h mit 5(6)-Carboxyfluoreszein (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in 10-fach molarem Überschuss. Anschließend wurde das PEI über PD-10 Sephadex G-25 Säulen (Amersham Biosciences Europe GmbH, D-79111 Freiburg) gereinigt. Anhand photometrischer Messungen von FITC und Quantifizierung von PEI durch Kupferassay, konnten ein Grad der Modifizierung von etwa 3 festgestellt werden (Ungaro et al. 2003).

Histologische Untersuchung der FITC-markierten Zellen

Das FITC-markierte PEI wurde wie in 2.2.3 beschrieben in einem N/P von 10 mit der pDNA komplexiert und an die Mäuse vernebelt. Eine Stunde nach der Vernebelung wurden die Mäuse mit Pentobarbital durch intraperitoneale Injektion anästhesiert und das Peritoneum und der Thorax durch einen Längsschnitt eröffnet. 10 bis 15 ml heparinisierte isotonische NaCl-Lösung (25000 I.E. Heparin/1000ml) wurden in der rechten Herzventrikel vorsichtig injiziert um die Lunge von Blut zu säubern. Anschließend wurde über eine intratracheal gelegte Kanüle 4% Paraformaldehyd in PBS in die Lungen gespritzt. Ein dünner Baumwollfaden, der um die Trachea gebunden wurde, verhinderte das Auslaufen des Paraformaldehyds. So

konnten die Lungen in einem ausgefalteten Zustand eine Stunde lang bei Raumtemperatur fixiert werden. Die Lungen wurden nun *en bloc* aus dem Thorax genommen und nochmals fünf Stunden bei 4°C in der Fixationslösung inkubiert. Dann wurden die Lungen mit PBS gewaschen und in einer 30%-igen Sucroselösung in PBS bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Lungen in O.C.T. Compound (Tissue Tek, Sakura Finetek Europa) gelegt und bei -80°C gelagert. Mit einem Kryoschneider wurden 6µm dicke Gewebsschnitte geschnitten, kurz mit Alexa 468-phallotoxin (1:200 in PBS mit 1% BSA, 20 Minuten bei Raumtemperatur) gefärbt und auf Objektträgern gelegt (Vectashield, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Ein Epifluorescence Axiovert 135 Microscop (Zeiss, Jena, Deutschland) mit einem 63x oder 100×/1.30 Öl-Plan-Neofluor Objektiv (Zeiss) wurde für die Mikroskopie verwendet.

Histochemische Untersuchungen mit β -Galactosidase

Für die histochemischen Untersuchungen wurde als Rezeptorgen das Plasmid verwendet welches für die β -Galactosidase kodiert. β -Galactosidase ist ein Kernlokalisierungsfusionsprotein. Die Lungen wurden wie oben beschrieben präpariert. Die Kryoschnitte bei 37°C über Nacht in einer X-Gal färbenden Lösung inkubiert (1mg/ml X-gal, 2 mM MgCl₂, 5 mM K-Ferricyanid, 5 mM K-Ferrocyanid in PBS, pH=7.4).

2.2.9 Negativfärbung von PEI und PEI-pDNA-Komplexen

Für die Untersuchung mit dem Elektronenmikroskop wurden die PEI-pDNA Komplexe durch rasches Vermischen gleicher Volumina (20µl) von PEI (130µg/ml) und pDNA (100µl/ml) jeweils gelöst in Wasser, HBS und 5%-iger Glukoselösung frisch hergestellt. Als Kontrolle wurde Polyethylenimin verwendet (gelöst in Wasser, HBS und 5%-iger Glukoselösung). Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proben in einen Behälter eines Tefloncontainers gefüllt. Die Partikel wurden 90 Sekunden lang auf ein Stück Kohlefilm adsorbiert und für 20 Minuten in einen zweiten Well übertragen, der mit 2% Uranylformat (in Wasser) gefüllt war (Valentine *et al.*, 1968) Der Kohlefilm mit den adsorbierten Partikeln wurde von der Färbelösung aufgehoben, indem man ein Elektronenmikroskopgitter, das von einem perforierten Kohlefilm bedeckt war, auf den schwimmenden Kohlefilm legte. Ein zweites Stück Kohlefilm wurde in einen weiteren Behälter gelegt, der mit 2% Uranylformat gefüllt war, und anschließend auf die Partikel auf dem EM-Gitter gelegt, sodass nun die Partikel in einem Farbpuffer zwischen zwei

Kohlefilmen eingebettet waren (Tischendorf *et al.*, 1974). Nach dem Blotting wurde das Gitter bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Bilddarstellung wurde ein Philips CM200 FEG Elektronenmikroskop das bei 200 kV betrieben wurde, verwendet, bei einer Vergrößerung von 38,000 \times und einem Defocus von etwa 2 – 3 μ m. Die Bilder wurden bei Raumtemperatur auf einer 1k \times 1k CCD-Kamera (charge coupled device) oder einer 4k \times 4k CCD-Kamera (TVIPS, Gauting, Germany) mit vierfachem Binning gemacht. Die Partikelgröße wurde anhand der Imagesoftware des TVIPS bestimmt. Die Versuche wurden freundlicherweise von Holger Stark *et al.* (Ludwig-Maximilians Universität, München) durchgeführt.

2.2.10 Native Kryoschnitte der Proben

Die PEI/pDNA Komplexe wurden wie oben beschrieben in Wasser oder HBS gelöst. 5 μ l der Lösungen wurden auf ein Elektronenmikroskopgitter pipettiert, das mit einem perforierten Kohlefilm bedeckt war. Der Kohlefilm wurde vor dem Gebrauch entladen. Nachdem die überschüssige Lösung abgesaugt worden war, wurde das EM-Gitter in flüssiges Ethan getaucht und bis zur Elektronenmikroskopanalyse in flüssigem Stickstoff gelagert (Adrian *et al.*, 1984). Die Proben wurden unter den Bedingungen von flüssigem Stickstoff analysiert, da die PEI/pDNA-Komplexe in amorphem Eis eingebettet waren. Die Komplexe wurden mit einem Philips CM200 FEG Elektronenmikroskop untersucht, die Bilder wurden sowohl mit einer 1k \times 1k CCD Kamera als auch auf Kodak SO 163 Film aufgenommen. Die Negative wurden mit einem Scanner (Tango, Heidelberger Druckmaschinen, Germany) mit rotierender Trommel bei 1200 dpi eingescannt.

2.2.11 Fluoreszenz Quenching Assay

Die Plasmid-DNA (pCMVLuc) wurde mit bisinterkalierender TOTO-1 Färbung markiert bei einem Verhältnis des Basenpaares zur Färbung von 20:1. Die Versuche wurden in 96-Well platten durchgeführt. Gleiche Volumina von TOTO-1 markierter pDNA (0.25µg in 50µl Solvens pro Well) und PEI (0.33µg in 50µl Solvens pro Well) wurden in den verschiedenen Solventien gelöst und vermischt, indem die markierte pDNA zum PEI hinzupipettiert wurde (N/P=10). Die Komplexe wurden 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die in einer Reihenverdünnung verdünnte poly-L-Glutaminsäure (25µg-0.1µg in 50µl Solvens pro Well) zu den Komplexen pipettiert und die Fluoreszenzintensität mit einem Wallac Victor²/1420 Multilabel Zähler (PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland) gemessen.

2.3 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben. Die statistische Analyse zwischen wurde mit einem nicht-gepaarten t-Test für kleine Stichproben durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als signifikant unterschiedlich betrachtet, wenn $p < 0,05$ war (falls nicht anders im Text beschrieben). Die statistischen Auswertungen der *in vivo* Experimente wurden mit Programm StatView 5.0. (SAS Institute Inc., Cary, NC) ausgeführt. Für die *in vitro* Experimente wurde das Programm Microsoft Exel verwendet.

3 Untersuchung der Einflussfaktoren für einen effektiven Gentransfer in die Mauslunge bei der Vernebelung nicht-viraler Genvektorkomplexe

3.1 Optimierung der Vernebelungsapparatur

3.1.1 Ganzkörperkäfig und Reihenvernebelung

Ganzkörperkäfig

Densmore *et al.* hatten nach Vernebelung von Genvektorkomplexen an Mäusen eine Genexpression in den Lungen der Tiere feststellen können. Die von ihnen verwendete Vernebelungsapparatur bestand aus einer rechteckigen Box in der sich die Mäuse frei bewegen konnten. In diesen Käfig wurde das Aerosol direkt aus dem Vernebler eingeleitet und die Versuchstiere konnten so die Genvektorkomplexe einatmen.

Das Ziel war es nun einen Versuchsaufbau zu etablieren, der einen ebenso erfolgreichen und reproduzierbaren Gentransfer in den Lungen unseren Versuchstiere erreicht. Deshalb wurde nach diesen Vorgaben eine maßgerechte Plexiglasbox nachgebaut, in der sich vier Mäuse (C57bl/6) befanden. Es wurde eine Genvektorkomplexlösung in destilliertem Wasser generiert, bestehend aus der Plasmid-DNA (pCMVLuc) und Polyethylenimin (br-PEI, 25kDA). Die Komplexlösung wurde in den Düsenvernebler (PARI BOY® LC plus) eingefüllt und der Nebel direkt in den Käfig eingeleitet (siehe *Abb. 4*). Die Tiere wurden 24 Stunden nach der Vernebelung eingeschläfert und ihre Organe (Blut oder Serum, Herz, Lunge, Trachea, Leber, Milz, Nieren, Magen-Darm-Trakt, Augen und Nase) auf eine Luziferaseexpression untersucht.

Hierbei konnte ausschließlich im Lungengewebe der Mäuse eine Genexpression festgestellt werden. Die Genexpression betrug im Mittel $6,74 \pm 7,6$ pg Luziferase pro Gramm Lungengewebe (*Abb. 10*). Es fand sich keine Luziferaseaktivität in Leber, Milz, Nieren, Magen-Darm-Trakt, Herz, Blut oder Serum, Trachea, Augen und Nase.

Wirkung von CO₂

Die Menge an Genvektorkomplexen, welche die Lungen erreichen, kann erhöht werden indem man versucht, die Atemfrequenz und –tiefe der Tiere zu erhöhen. Eine relativ einfache und schonende Methode dafür, ist es, den Anteil an Kohlendioxid in der Atemluft zu steigern. Das CO₂ steigert über zentrale Mechanismen den Atemantrieb. Um diesen Effekt auszunutzen, leiteten wir während der Vernebelung der Genvektorkomplexe ein Luftgemisch in den Käfig (bestehend aus synthetischer Luft und 5%-iges CO₂). Bei Anwesenheit von CO₂ begannen die Mäuse sichtbar schneller und vor allem tiefer zu atmen. Durch die zusätzliche Einleitung eines 5%-iges CO₂ Luftgemisches konnte die Gentransfereffizienz nochmals um das 1,6-fache auf $11,21 \pm 14,17$ pg gesteigert werden (Abb. 10).

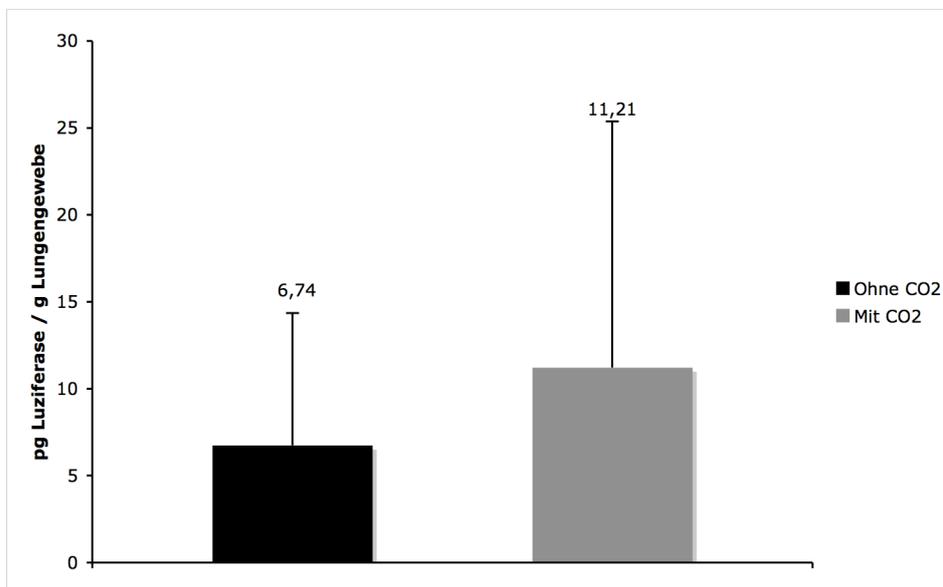


Abb. 10: Wirkung von CO₂. Die Zuführung von 5% CO₂ in die Atemluft hat eine Steigerung der Transfereffizienz um das 1,6-fache.

Reihenvernebelung

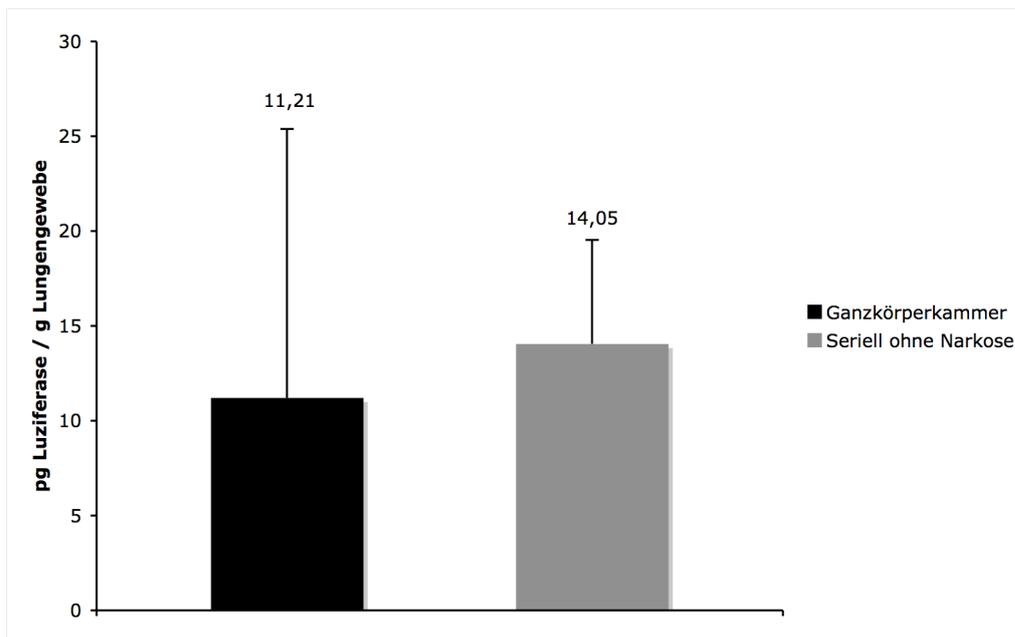
Die Atemwegsanatomie stellt besondere Anforderungen an die Tröpfchengröße des Aerosols. Die handelsüblichen Vernebelungsapparate sind so konstruiert, dass sie Tröpfchen generieren, die möglichst effizient die unteren Atemwege, und hier vor allem die Bronchien des Menschen erreichen.

Für die Anwendung von Aerosolen im Tierexperiment finden wir das besondere Hindernis, dass (i) die Atemwege von Mäusen wesentlich kleiner sind und (ii) es sich bei Mäusen um obligatorische Nasenatmer handelt. Deshalb hat die Größe der Aerosolpartikel einen besonders großen Einfluss auf die Menge an Genvektorkomplexen, die in der Lunge deponiert werden. Es erreichen lediglich Partikel mit einem Durchmesser $< 1\mu\text{m}$ die Lunge und verbleiben dort. Die Teilchen, die größer als $3\mu\text{m}$ sind, gelangen nur noch zu 1% in die Lunge. Die pulmonale Deposition ist bei Teilchen $> 5\mu\text{m}$ fast null (Raabe *et al.*, 1988). Der mittlere Aerosoldurchmesser (MMAD = Median Mass Aerosol Diameter) betrug bei dem Düsenvernebler PARI BOY LC plus $3,4\mu\text{m}$. Das bedeutet, dass wahrscheinlich der Hauptteil der Aerosolteilchen die Lunge nicht erreicht, sondern bereits vorher extrapulmonal, beispielsweise in Nase und Pharynx, deponieren. Es wurde deshalb eine Vernebelungsapparatur konstruiert, die es ermöglichte anästhesierte und intubierte Tiere einem regelmäßigen Aerosolfluss auszusetzen, und durch die Intubation die Nasenpassage zu umgehen. Diese Apparatur bestand aus einem senkrecht stehenden Zylinder, in den das Aerosol am oberen Ende eingeleitet wurde. Entlang der Wand des Rohres waren Röhrrchen in horizontaler Position angebracht in denen sich jeweils eine Maus befand (siehe S.19, *Abb. 3*). Es wurden drei Gruppen gebildet, ((i) wache, (ii) anästhesierte und (iii) anästhesierte und intubierte Mäuse) und der Vernebelung von PEI-pDNA-Komplexen in Wasser gleichzeitig ausgesetzt. Eine Luziferaseexpression in der Lunge von durchschnittlich $14,05 \pm 5,48\text{pg}$ konnte nur bei den wachen Mäusen festgestellt werden (*Abb. 11*). Bei keinem der anästhesierten Mäuse, weder den nicht intubierten noch den intubierten, war Luziferaseexpression detektierbar. Während des Experiments konnte beobachtet werden, dass die anästhesierten Tiere wesentlich langsamer und flacher atmeten, als die wachen Tiere, da die verwendeten Medikamente atemdepressiv wirken (Meditomidin, Midazolam, Fentanyl). Es ist wahrscheinlich, dass die verminderte Ventilation der Lunge zu einer zu geringen Deposition von Aerosol in der Lunge geführt hat. Es war daher keine Verbesserung durch die Umgehung der Nasenpassage zu sehen. Im Vergleich der beiden Vernebelungsapparaturen, Ganzkörperkammer und Reihenvernebelung, sieht man eine leicht erhöhte Transfereffizienz auf Seiten der Reihenvernebelung, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte (*Abb. 11*). Angesichts des komplizierteren Versuchsaufbaus und des hohen Stressfaktors für die

Versuchstiere bei der Reihenverneblung, war es vorteilhafter, an einer Optimierung der Ganzkörperkammer zu arbeiten.

Abb. 11: Vergleich Reihenvernebelung und Ganzkörperkammer.

Lediglich die nicht narkotisierten Mäuse zeigten eine Genexpression, die sich jedoch nicht signifikant von der Genexpression in der Ganzkörperkammer unterschied.



Einsatz eines Spacers

Der Versuch größere Aerosolpartikel durch Umgehung der Nasenpassage in die Lunge zu transportieren hatte sich als schwierig erwiesen. Eine weitere Möglichkeit, um die Menge an Aerosolpartikeln in der Lunge zu erhöhen, war es den Aerosoldurchmesser zu senken, bestenfalls auf Partikelgrößen unter $1\mu\text{m}$. Zu diesem Zweck wurde eine Vernebelungsapparatur konstruiert, bei der ein 45cm langes Plexiglasrohr („Spacer“) zwischen dem Käfig und dem Vernebler zwischengeschaltet wurde (siehe S.20, *Abb. 5*). Der Theorie nach sollten in diesem Rohr die größten Aerosolpartikel aufgrund der Schwerkraft unmittelbar hinter dem Vernebler sedimentieren. Das andere Ende des Zwischenstücks erreichten nun hauptsächlich Aerosolpartikel, die kleiner und leichter waren. In diesem Zusammenhang wurde die genauere Größenzusammensetzung des Aerosols mit einem Kaskadenimpaktor untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass der MMAD des Aerosols, das hinter dem Spacer im Käfig ankam, $0,27\mu\text{m}$ betrug, also im Mittel 10-fach kleiner war als ohne vorgeschalteten Spacer ($3,4\mu\text{m}$). Nach der Vernebelung konnten interessanterweise nur 10,4% der gesamten vernebelten pDNA ($104\mu\text{g}$) im Kaskadenimpaktor wieder gefunden werden. Entsprechend kommen beim Einsatz eines Spacers nur 10,4% der vernebelten pDNA in der Vernebelungskammer an, in der sich die Versuchstiere befinden. Die restliche pDNA geht bei der Vernebelung im Spacer verloren, ein Teil davon verbleibt als Rest im Reservoir des Düsenverneblers.

Im Tierexperiment konnte durch das Zwischenschalten des Spacers, die Transfereffizienz signifikant ($p < 0,05$) um das 3,1-fache von $11,21 \pm 14,17\text{pg}$ auf $34,65 \pm 13,3\text{pg}$ Luziferase gesteigert werden (Abb. 12).

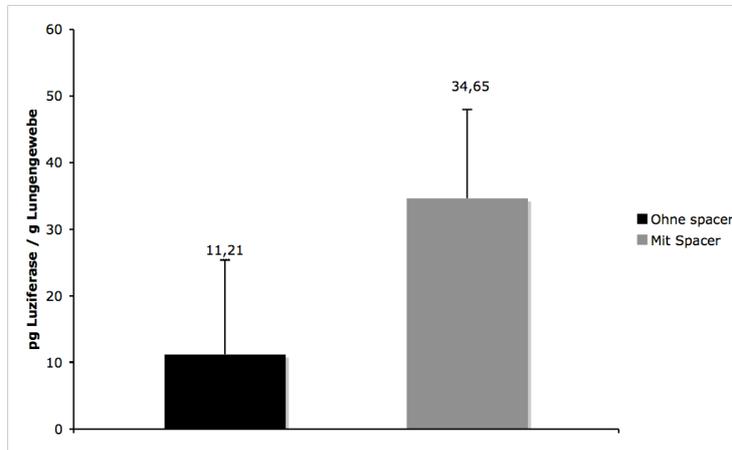


Abb. 12: Wirkung des Spacers. Die größeren Aerosoltröpfchen setzen sich im Spacer ab. Die Verringerung des Aerosoldurchmessers bringt eine Steigerung des Gentransfers um das 3-fache.

Abtrocknen des Aerosols mit Kieselgel

Um die Tröpfchengröße noch weiter zu reduzieren, wurde der Boden des zwischengeschalteten Spacers gleichmäßig mit Silicagel bedeckt. Silicagel ist stark hydrophil. Durch die Passage des Aerosols durch das silicagelgefüllte Rohr, sollte das Aerosol „abgetrocknet“ und dadurch die Tröpfchengröße verringert werden. Das Silicagel war mit einem blauen Indikatorfarbstoff versetzt, der durch Farbveränderung die Trocknungsfähigkeit des Silicagels anzeigte (siehe S.21, Abb. 6). Es zeigte sich, dass der MMAD der Aerosolpartikel in Anwesenheit des Silicagels $0,47\mu\text{m}$ betrug. Gleichzeitig erhöhte sich der Anteil an pDNA, der in der Vernebelungskammer detektiert werden konnte, auf 15,6% ($156\mu\text{g}$) der Gesamtdosis vernebelter pDNA. Es ist zu beachten, dass diese Größenordnungen die untere Begrenzung der Messfähigkeit des Kaskadenimpaktors darstellen. Daher kann eine Aussage über einen Unterschied in den MMADs zwischen der Verwendung eines Spacers mit und ohne Silicagel nicht mit ausreichender Genauigkeit getroffen werden.

Die Gentransfereffizienz konnte durch die Verwendung von Silicagel von $34,11 \pm 23,66\text{pg}$ um das 3,1fache auf $107,63 \pm 49,29\text{pg}$ Luziferase gesteigert werden (Abb. 13).

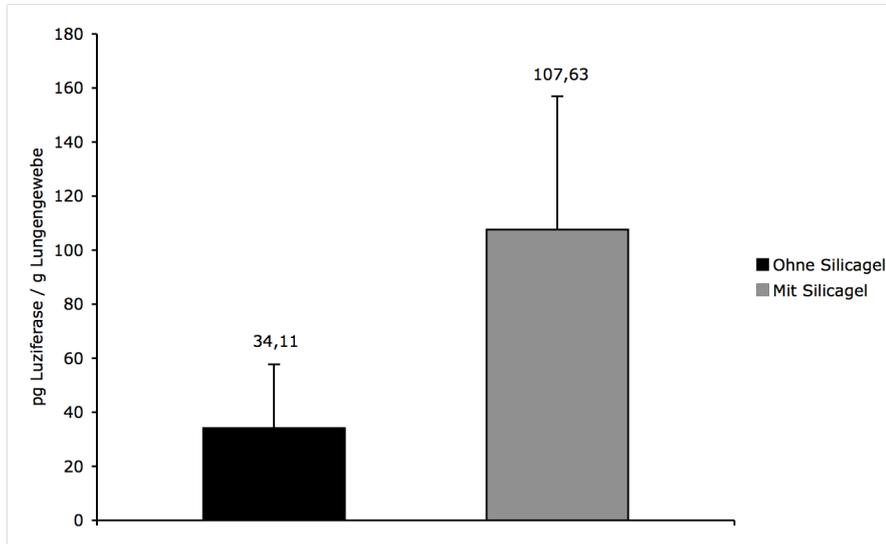


Abb. 13: Wirkung des Silicagels. Das Silicagel hat einen trocknenden Einfluss auf Aerosol. Die Verkleinerung der Tröpfchengröße wirkt sich in einer 3-fachen Steigerung der Genexpression aus.

Top-Down-Vernebelung

Wir hatten festgestellt, dass durch die Verwendung eines Spacers die Gentransfereffizienz zwar insgesamt um das 10-fache gesteigert werden kann, die Menge an vernebelter pDNA, die die Vernebelungskammer erreicht jedoch nur 15% beträgt. Deshalb modifizierten wir den Versuchsaufbau dahingehend, den Spacer mit Silicagel in vertikaler Position auf den Käfig zu stellen („Top-Down-Spacer“). Hierbei wurde ein Spacer größeren Durchmessers verwendet. Das Silicagel war entlang des gesamten Spacers an der Innenseite angebracht und durch ein feinmaschiges Metallgitter vom Lumen des Rohres getrennt (siehe S.20, Abb. 7). Dieser Versuchsaufbau sollte es ermöglichen, die aerosoltrocknende Wirkung des Silicagels zu nutzen und gleichzeitig die Menge an pDNA, die in den Käfig gelangt, zu erhöhen. Während der Vernebelung konnte beobachtet werden, dass im Käfig kein Aerosol sichtbar war. Im Gegensatz dazu war bei dem vertikal angebrachten Spacer immer ein sehr feiner Nebel im Käfig sichtbar gewesen. Es zeigte sich, dass die Genexpression bei dem Top-Down-Spacer $49,51 \pm 20,79\text{pg}$ Luziferase/g Lungengewebe betrug und damit gegenüber dem horizontal angebrachten Spacer signifikant um das 2,1-fache geringer war (Abb. 14). Dies könnte darauf

zurückzuführen sein, dass sich das Aerosol beim Herabfallen an den Seitenwänden des Spacers ablagert und zusätzlich durch das Silicagel so stark abgetrocknet wird, dass kaum Aerosol überhaupt die Kammer erreicht, bzw. nur als Trockenaerosol in die Kammer gelangt. Das würde auch von der Beobachtung bestätigt werden, dass kaum Nebel im Käfig sichtbar war.

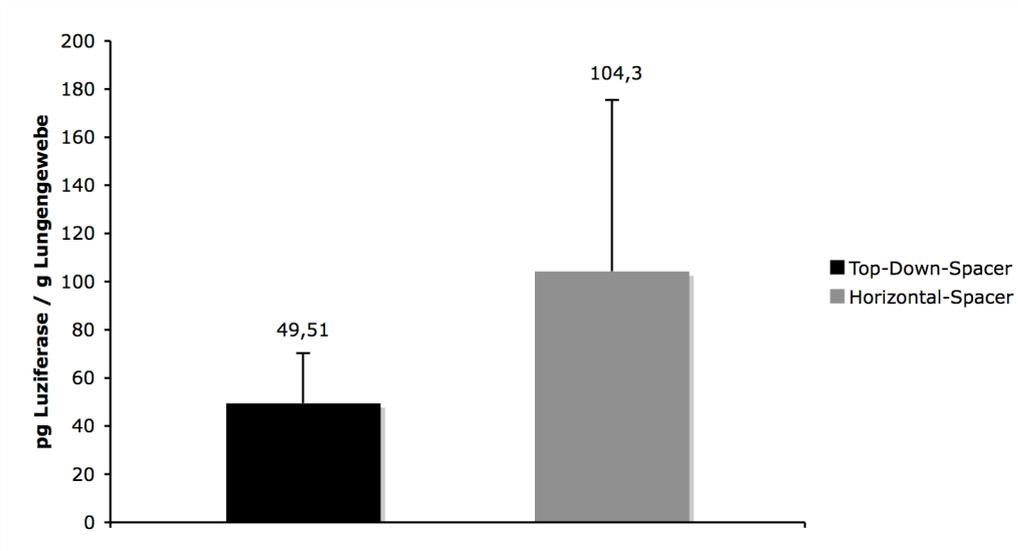


Abb. 14: Top-Down-Spacer versus Horizontal-Spacer. Beim Top-Down-Spacer werden die Aerosoltropfen an das Silicagel adsorbiert. Dies hat eine Verminderung der Genexpression um das 2-fache zur Folge.

3.1.2 Verneblertypen

Für die topische Verabreichung von Medikamenten in die Lunge finden sich unterschiedliche Verneblertypen auf dem Markt, die sich in der Handhabung und in der Art und Weise der Aerosolgenerierung wesentlich unterscheiden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Aerosolgeräte untersucht, ein Düsenvernebler und zwei unterschiedliche Ultraschallvernebler.

Funktionsweise der Verneblertypen

Für den Hauptteil der Experimente wurde der Düsenvernebler PARI BOY® LC plus verwendet. Bei diesem Vernebler wird das Aerosol dadurch erzeugt, dass eine Flüssigkeit entlang einer Kapillare angesaugt wird und durch einen konstanten Luftstrom mit großer Geschwindigkeit gegen eine Prallplatte geschossen wird. Durch den Aufprall entstehen kleine Nebeltröpfchen. Dieses Aerosol hat zwei Eigenschaften die sich negativ auf die Transfereffizienz auswirken können. Zum einen, sind sie Partikel relativ groß (MMAD = 3,4µm). Zum anderen treten bei der Generierung des Nebels Scherkräfte auf (durch das Aufprallen der Flüssigkeit an die Prallplatte), die die Genvektorkomplexe beschädigen können. Die Verringerung der Partikelgröße wurde durch das Zwischenschalten eines silikagelgefüllten Rohres erreicht. Um die Beschädigung der Genvektorkomplexe zu vermeiden wurden Vernebler gesucht, bei denen die Aerosolgenerierung schonender ist, und untersucht, ob diese eine höhere Transfereffizienz zeigten.

Als Ultraschallvernebler wurden der PARI® e-Flow und der multisonic® LS 290 der Firma Shill® untersucht. Grundprinzip beider Vernebler ist ein Piezokristall, der elektrisch gesteuert wird und in Ultraschallfrequenz schwingt. Beim e-flow bringt dieser Piezokristall eine Metallmembran zum schwingen, die mit Poren einer definierten Größe perforiert ist. Die Flüssigkeit wird durch die schwingende Membran über die Poren hindurchgedrückt, und so das Aerosol produziert. Die Porengröße gibt den MMAD des Aerosols vor. Beim multisonic® LS 290 liegt die zu vernebelnde Flüssigkeit in einem Wasserbad. Das Wasser wird von dem Piezokristall in Schwingungen versetzt und führt so zur Ablösung kleinster Aerosoltröpfchen aus der Oberfläche der Inhalationslösung. Der MMAD des Aerosols beider Geräte liegt nach Angaben der Hersteller zwischen 3,5µm und 4,1µm bei beiden Geräten, abhängig von der Vernebelten Substanz. In diesem Abschnitt wurde mittels des e-Flows die Vernebelungsfähigkeit der Genvektorkomplexe in verschiedenen Solventien untersucht.

Untersuchung der Vernebelungsfähigkeit von Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen mittels des PARI® e-Flows

Aus vorhergehenden Vernebelungsversuchen hatten wir festgestellt, dass man mit dem Düsenvernebler PARI BOY® LC plus problemlos Lösungen unterschiedlicher Ionenstärke (Wasser, Hepes, HBS) vernebeln kann. Bei allen Experimenten war ein gleichförmiger Output des Düsenverneblers zu beobachten. In diesem Abschnitt wurde die Vernebelungsfähigkeit des PARI® e-flows untersucht.

Dazu wurden PEI-PDNA-Komplexe in destilliertem Wasser, HBS und 5%-iger Glukoselösung zubereitet und das Aerosol mittels Laserlichtstreuung charakterisiert. Es wurde beobachtet, dass es bei der Vernebelung der in destilliertem Wasser gelösten Komplexe, zu einem anfänglich hohen Output von Aerosol kommt (total output rate TOR = $2,4\text{g}\cdot 10^{-1}/\text{min}$), dieser aber nach sehr kurzer Zeit sistiert. Im Reservoir des e-flows befand sich eine große Restmenge an Flüssigkeit, obwohl kein Aerosol mehr produziert wurde. Der e-flow wurde daraufhin erneut verschlossen und vernebelt. Die Outputrate war geringer (unterhalb des Messbereichs) und sistierte erneut nach kurzer Zeit. Die Restflüssigkeit wurde abgesaugt, der Vernebler kurz unter gereinigtem Leitungswasser gesäubert, getrocknet und die Komplexlösung erneut vernebelt. Dies führte zu keiner Erhöhung des Outputs (TOR = $0,8\text{g}\cdot 10^{-1}/\text{min}$). Der MMAD des Aerosols erhöhte sich im Verlauf der Vernebelung von $3,61\mu\text{m}$ auf $4,76\mu\text{m}$ (Abb. 15). Anfänglich waren 73% des Aerosolpartikel $< 5\mu\text{m}$. Im Verlauf der Vernebelung nahm der Anteil der Partikel $< 5\mu\text{m}$ auf 55% ab.

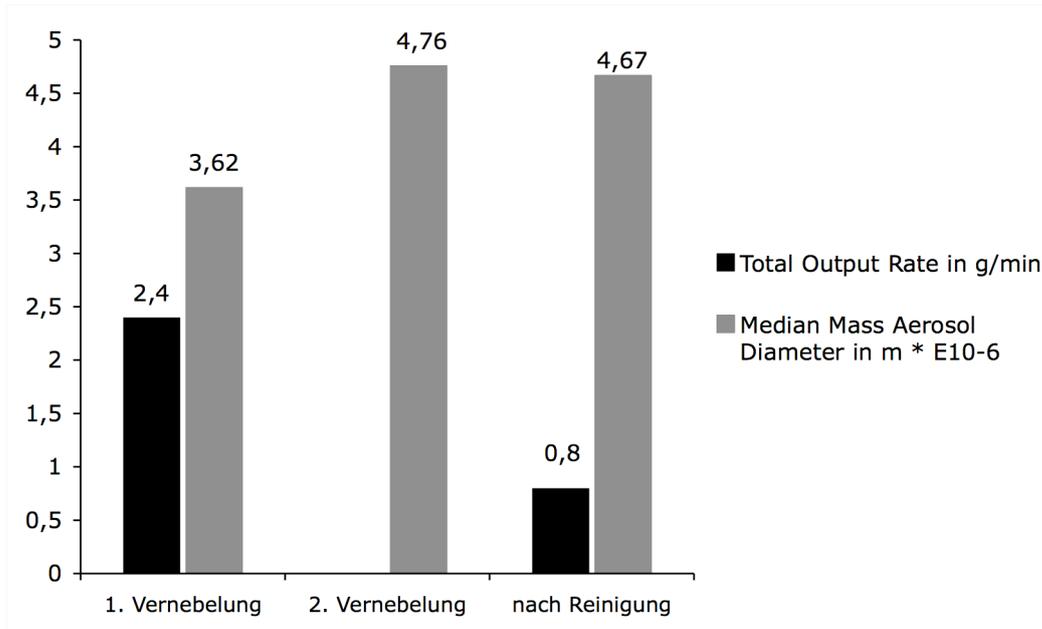


Abb 15: Total Output Rate und MMAD des Aerosols des e-flows für Komplexe in destilliertem Wasser. Nur am Anfang der Vernebelung war ein guter Output zu sehen, der schnell sistierte. Auch nach der Reinigung der Membran konnte nicht der ursprüngliche Output erreicht werden.

Die Vernebelung der Komplexe in Glukose hatte insgesamt einen etwas besseren und regelmäßigeren Output von $1,1\text{g} \cdot 10^{-1}/\text{min}$ und $1,2\text{g} \cdot 10^{-1}/\text{min}$. Die MMAD betragen $4,93\mu\text{m}$ und $4,12\mu\text{m}$, wobei 51%, bzw. 63% der Teilchen $<5\mu\text{m}$ waren.

Bei der Vernebelung der Komplexe in HBS gab es keine Schwierigkeiten mit dem Output des Gerätes. Bei einer regelmäßigen TOR von $2,5\text{g} \cdot 10^{-1}/\text{min}$ betrug der MMAD $3,49\mu\text{m}$. 78% der Partikel waren $<5\mu\text{m}$ (Abb. 16).

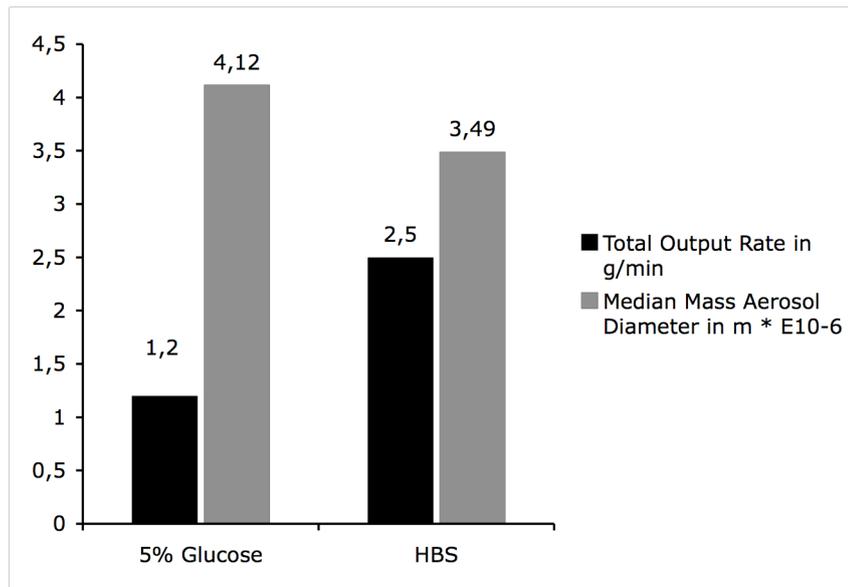


Abb 16: Total Output Rate des e-flows bei Komplexen in 5%-iger Glukose und HBS. Das ionenhaltige HBS hatte der regelmäßigsten Output und eignete sich am besten für eine Vernebelung mit dem e-flow.

Um einen ausreichenden Output des Verneblers zu erreichen, musste folglich ein Solvens verwendet werden, das eine gewisse Ionenstärke aufzeigt. Aus diesem Grund wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, in welcher Kochsalzlösungen verschiedener Konzentrationen (5mM , 10mM, 20mM, 30mM, 75mM, 150mM) im PARI® e-Flow vernebelt wurden, und dabei beobachtet ob die Ionenstärke einen Einfluss auf den Aerosoloutput hat. Dies konnte nicht festgestellt werden, da alle Lösungen einen gleichförmigen und regelmäßigen Output zeigten bei dem nach 10 min fast das Gesamtvolumen von 3 ml vernebelt worden war.

3.2 Einflussfaktoren auf die Vernebelung

Nachdem die Vernebelungsapparatur optimiert wurde, sollte nun untersucht werden, welche weiteren Faktoren die Transfektionseffizienz beeinflussen können.

3.2.1 Solvens

Es hatte sich bereits bei der Transfektion von nicht-viralen Genvektorkomplexen auf Zellen in der Zellkultur gezeigt (Rudolph *et al.*, 2002), dass das Solvens, in dem sich die Komplexe gelöst sind, einen großen Einfluss auf die Transfereffizienz haben kann. Rudolph *et al.* untersuchten PEI/pDNA-Komplexe, die in 5%-iger Glukoselösung, HBS und destilliertem Wasser generiert und anschließend vernebelt wurden, auf physikalische Stabilität und Größe der Komplexe, pDNA-Konzentration in der Lösung, ζ -Potential (also die Ladung des Komplexes nach außen) und Transfereffizienz in der Zellkultur. Sie stellten fest, dass der Vernebelungsprozess sich zwar kaum auf die Stabilität der Komplexe oder die pDNA-Integrität auswirkte, jedoch Komplexgröße, ζ -potential und pDNA-Konzentration in Abhängigkeit des Solvens unterschiedlich stark beeinflusst wurden. Darüber hinaus kann auch das Solvens selbst einen physiologischen Einfluss auf die Bronchialepithelzellen haben und somit den Gentransfer beeinflussen. So ist beispielsweise von Mochizuki *et al.* gezeigt worden, dass vernebeltes destilliertes Wasser, die Bronchialepithelzellen, wahrscheinlich aufgrund des osmotischen Gefälles, stark anschwellen lässt (Mochizuki *et al.*, 1999.). Es sollte also zunächst untersucht werden, bei welchem Solvens die höchste Transfereffizienz zu beobachten ist, und inwiefern biophysikalische oder physiologische Parameter den Gentransfer bedingen können.

Gentransfereffizienz der PEI/pDNA-Komplexen in unterschiedlichen Solventien

Alle Experimente zur Bestimmung der Transfereffizienz verschiedener Solventien wurden in der standardisierten Ganzkörperkammer mit einem vorgeschalteten silicagelgefüllten Spacer durchgeführt (Düsenvernebler PARI BOY LC plus, 5%-iges CO₂-Luftgemisch). Es wurden PEI-pDNA-Komplexe in destilliertem Wasser, isotonischer 5%-ige Glukoselösung und isotonischem HBS und PBS generiert und vernebelt. Während die Glukose- und Wasserlösungen klar blieben, zeigte die HBS-Lösung eine leichte und die PBS-Lösung eine stärkere Trübung. Der Vernebelungsprozess verlief bei allen Solventien gleich. Auch im Verhalten der Tiere konnte während der Vernebelung kein Unterschied festgestellt werden. Bezüglich der Transfektionseffizienz konnte folgendes festgestellt werden: Während die Komplexe in destilliertem Wasser eine gleichbleibend hohe Transfektionsrate von $107,6 \pm 49,3$ pg Luziferase/g Lungengewebe zeigten, betrug die Transfektionsraten für PEI/pDNA-Partikel in Glukose und HBS $1,88 \pm 1,41$ pg und $0,58 \pm 1,1$ pg (Abb. 17). Bei PBS konnte keine Luziferaseexpression beobachtet werden. Damit zeigte destilliertes Wasser eine um den Faktor 57 signifikant ($p < 0,01$) höhere Effizienz als die 5%-ige Glukoselösung und eine signifikante 185-fache Erhöhung gegenüber HBS.

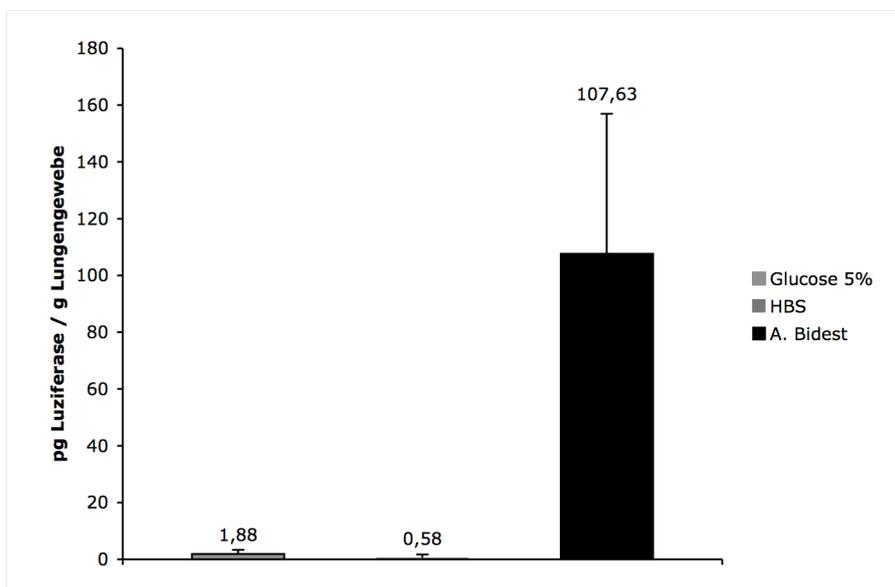


Abb. 17: Lösungsmittelvergleich. Die Komplexe in Glukose und HBS zeigten eine 57-fach und 185-fach schlechtere Transfereffizienz als destilliertes Wasser.

Diese Daten korrelierten insofern mit den Ergebnissen, die in der Zellkultur erhoben worden waren, als dass sich auch hier destilliertes Wasser als bestes Solvens herausgestellt hatte. In der Zellkultur hatte HBS eine höhere Transfereffizienz gezeigt als 5%-ige Glukose. Im Tierversuch konnte Glukose eine signifikant 3,2-fache Erhöhung der Transfektion gegenüber HBS erreichen.

Solvensabhängige Unterschiede der biophysikalischen Parameter

Komplexgröße

Ein Vergleich der Komplexgrößen zeigte große Unterschiede bei verschiedenen Solventien (*Abb. 18*). In Glukose bildeten sich die kleinsten Komplexe mit einem Durchmesser von 89 ± 10 nm im Durchmesser. Bei destilliertem Wasser, HBS und PBS betragen die Komplexgrößen 98 ± 2 nm, 153 ± 10 nm und 848 ± 142 nm. Es konnte jedoch keine direkte Korrelation zwischen Komplexgröße und Transfereffizienz gefunden werden. Die hohe Transfereffizienz der Genvektorkomplexe in destilliertem Wasser im Vergleich zu anderen Solventien lässt sich also nicht ausschließlich durch die relativ kleine Komplexgröße erklären, da beispielsweise 5%-ige Glukose beinahe ebenso kleine Komplexe bildet.

Oberflächenladung (ζ -Potential)

Es wurde bereits gezeigt, dass die Transfereffizienz von Genvektoren bis zu einem gewissen Maß mit der Oberflächenladung korreliert (Erbacher *et al.*, 1999), also die Transfereffizienz beeinflusst. Die Oberflächenladungen der Genvektoren in Wasser, 5%-iger Glukose und HBS betragen 56 ± 1 , 45 ± 1 und 12 ± 2 mV.

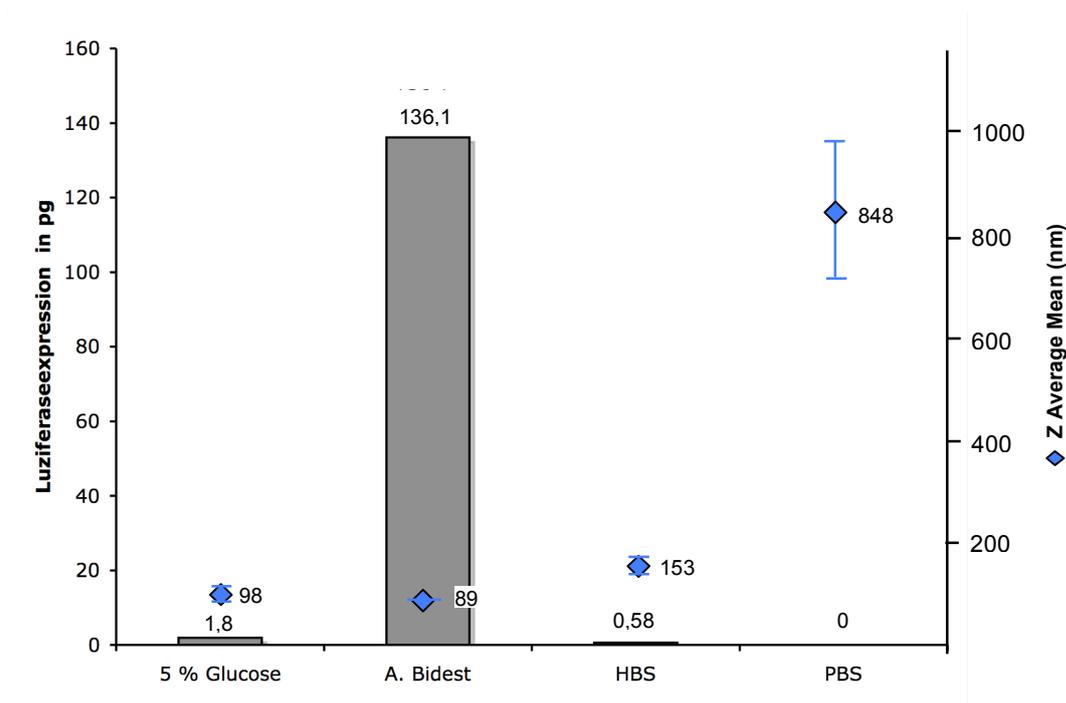


Abb. 18: Luziferaseexpression in Abhängigkeit der Komplexgröße. Die Komplexgrößen in 5% Glukose, A. bidest und HBS sind ähnlich. Nur in PBS bilden sich große Komplexe. Erst bei sehr großen Teilchen scheint ein Zusammenhang zwischen Luziferaseexpression und Komplexgröße zu bestehen.

Morphologie der Genvektorkomplexe

Zur Identifizierung der Komplexmorphologien wurden weiterhin die PEI-pDNA Komplexe elektronenmikroskopisch mit Hilfe einer doppelten Kohlennegativfärbung untersucht. Hierbei konnte beobachtet werden, dass nicht komplexiertes PEI hauptsächlich aus kleinem amorphem Material besteht, und zwar unabhängig vom Solvens. Nach der Inkubation des PEI mit der pDNA formten sich homogene Populationen von Partikeln definierter Größen mit beinahe kugelförmiger Gestalt. Die Teilchengröße variierte in Abhängigkeit des Solvens. Es zeigten sich Durchmesser von $50 \pm 8\text{nm}$ für die in destilliertem Wasser gelösten Komplexe, $54 \pm 4\text{nm}$ für die Komplexe in 5%-iger Glukose und $111 \pm 18\text{nm}$ für die Komplexe in HBS (Abb. 19). Um einen möglichen Effekt der doppelten Kohlennegativfärbung auf die Partikelmorphologie auszuschließen, wurden dieselben Komplexe durch native Kryomikroskopie analysiert. In den nativen Kryopräparate zeigten sich ebenso Partikel von beinahe kugelförmiger Gestalt und ähnlicher Größen (Abb. 20). Der Bildkontrast der Kryopräparate war jedoch geringer als bei den Kohlennegativfärbungen. Die Komplexgrößen betragen in Wasser und HBS $57 \pm 6\text{nm}$ und $139 \pm 28\text{nm}$, und waren somit vergleichbar mit den negativgefärbten Partikeln (Abb. 21). Ein Vergleich der Partikel war bei 5%-iger

Glukoselösung nicht möglich, da die Anwesenheit von Glukose den Bildkontrast der nativen Kryopräparate stark reduzierte. Der Unterschied der gemessenen Partikelgrößen zwischen dem Verfahren mit dynamischer Lichtstreuung und Elektronenmikroskopie ist möglicherweise auf die nicht streng Kugelförmige Gestalt der Komplexe zurückzuführen, da nichtkugelförmige Teilchen aufgrund der Lichtstreuung einen scheinbar größeren Durchmesser zeigen als kugelförmige Teilchen gleichen Volumens.

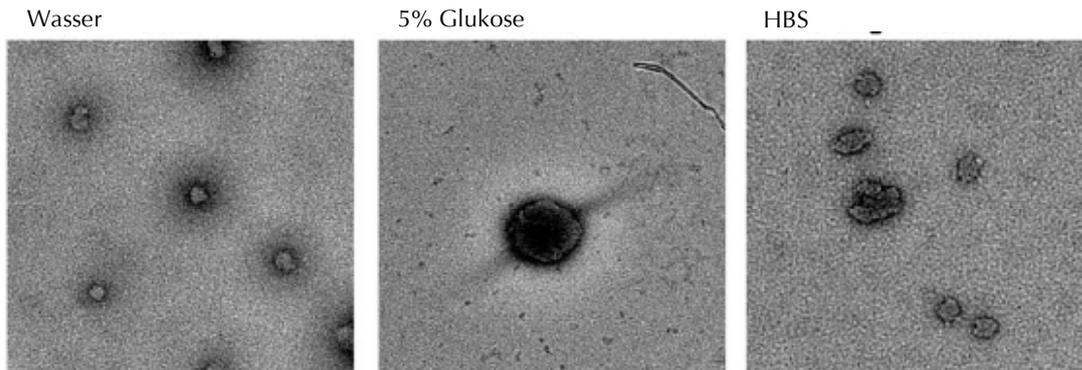


Abb. 19: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Komplexe in den verschiedenen Lösungsmitteln. Die Komplexgröße variiert mit dem Solvens. Die Komplexe in Wasser und Glukose waren am kleinsten ($50\pm 8\text{nm}$ und $54\pm 4\text{nm}$) und in HBS am größten ($111\pm 18\text{nm}$).

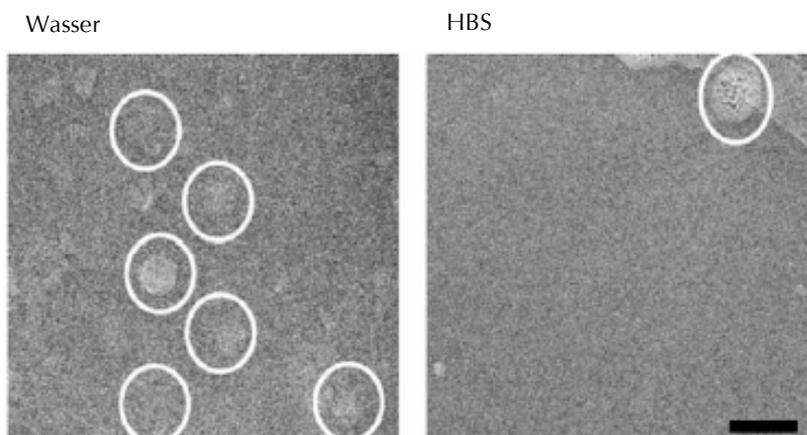


Abb. 20: Kryomikroskopische Untersuchung der Komplexe. Die Komplexgrößen sind vergleichbar mit den Kohlenegativfärbungen und betragen hier $57\pm 6\text{nm}$ für Wasser und $139\pm 28\text{nm}$ für HBS. Aufgrund des niedrigen Bildkontrastes konnten die Komplexe in Glukose nicht vermessen werden.

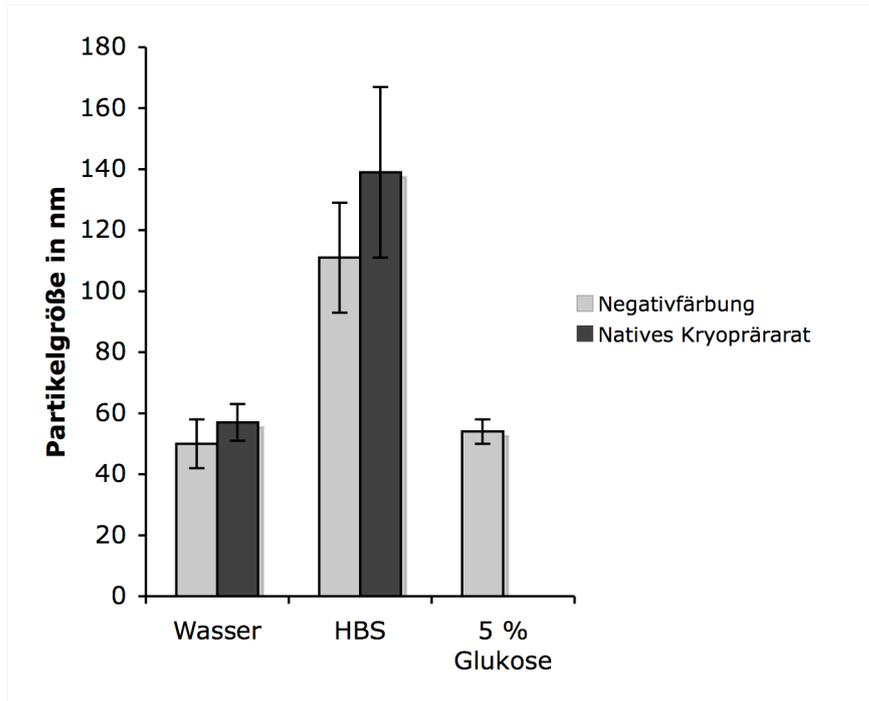


Abb. 21: Vergleich der Partikelgrößen zwischen Negativfärbung und nativem Kryopräparat.

Bindungsverhalten zwischen PEI und pDNA

Die Bindung zwischen PEI und Plasmid-DNA in den jeweiligen Solventien wurde mit Poly-L-Glutaminsäure (pLG) in einem Kompetitions-Assay untersucht. Die Fluoreszenzsignalintensität von TOTO-1 welches zweifach in die pDNA interkaliert wird durch die Kondensierung der pDNA mit dem kationischen Vektor gelöscht (=quenching). Steigende Konzentrationen eines polyanionischen Polymers wie pLG in der Lösung, führen zu einer Lösung der Bindungskraft von PEI an die pDNA, wodurch es zur Wiederherstellung der Fluoreszenzsignalintensität der kondensierten pDNA kommt. (Ernst *et al.*, 1999). Es zeigte sich, dass bei Erhöhung der pLG Konzentrationen, die PEI-pDNA Komplexe in Wasser, 5%-iger Glukose und HBS gleichsam dissoziiert wurden (Abb. 22). Dieser Effekt war jedoch bei höherem Ionengehalt, also bei HBS, stärker ausgeprägt. Es konnte kein Unterschied im Bindungsverhalten zwischen den in Wasser und den in 5%-iger Glukose gelösten Komplexen festgestellt werden.

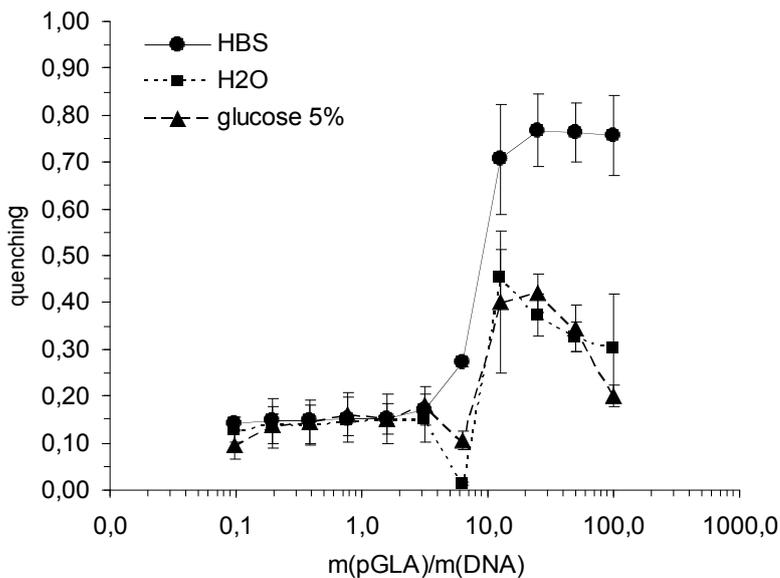


Abb 22: Bindungsintensität (Quenching) des PEI an die pDNA in verschiedenen Lösungsmitteln. Bei höheren pGLA-Konzentrationen werden die Komplexe zerlegt. Dieser Prozess ist bei HBS am stärksten ausgeprägt.

Untersuchung der physiologischen Wirkung von destilliertem Wasser

Die Untersuchung der biophysikalischen Parameter hatte ergeben, dass sich die in Wasser gelösten Teilchen weder in ihrer Form noch in ihrer Oberflächenladung oder ihrer Größe stark von in Glukoselösung gelösten Teilchen unterscheiden. Trotzdem war eine 57-fach höhere Transfektionsrate bei Wasser zu finden. Das destillierte Wasser schien also selbst eine physiologische Wirkung auf die Bronchialepithelzellen der Mäuse zu haben, die sich steigernd auf den Gentransfer auswirkte. Es war gezeigt worden, dass die Vernebelung von destilliertem Wasser zu einer Schwellung der Bronchialepithelzellen von Meerschweinchen führen kann (Mochizuki *et al.*, 1999), wodurch es zu einer Lockerung der interzellulären Räume kommt. Gleichzeitig macht Wasser die apikale Membran aufgrund eines hypoosmotischen Schocks kurzzeitig durchlässig für Proteine und anderen Makromolekülen (Widdicombe *et al.*, 1996). Diese osmotisch bedingte Schwellung des Bronchialepithels kann durch Indomethazin inhibiert werden (Mochizuki *et al.*, 2002). Indomethazin verhindert, genauso wie Furosemid, den schnellen Ionentransport an der Epithelzellmembran, der bei Erniedrigung des osmotischen Drucks zu einer Schwellung der Zellen führt (Butt *et al.*, 1990.). Wenn die Erhöhung des Gentransfers auf die oben beschriebenen physiologischen

Effekte von Wasser zurückzuführen wären, müsste sich bei einer Vorbehandlung der Mäuse mit Indomethazin ein verminderter Gentransfer zeigen. Wir vernebelten also 3,0 ml einer Indomethazidlösung (5mg/ml) als Vorbehandlung an die Versuchstiere. Gleich im Anschluss wurden die in destilliertem Wasser gelösten PEI/pDNA Komplexe vernebelt und die Luziferaseexpression nach 24 Stunden gemessen. Die mit Indomethazin vorbehandelten Mäuse zeigten mit $46,2 \pm 15,4$ pg Luziferase eine signifikant 2,9-fach niedrigere Genexpression ($p < 0,01$) verglichen mit den nicht vorbehandelten Mäusen ($136,1 \pm 21,9$ pg; siehe *Abb. 23*).

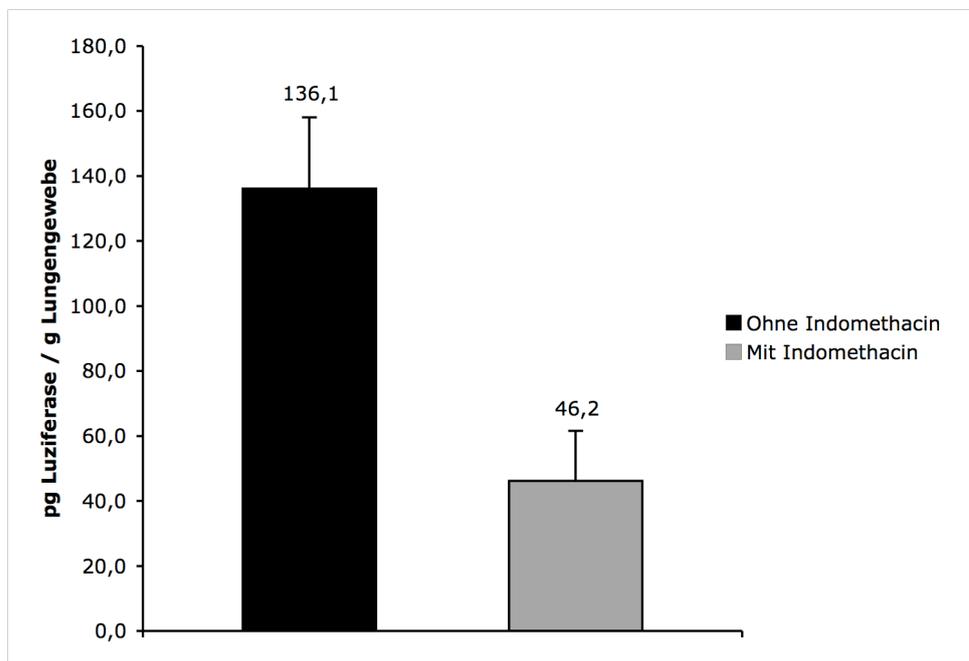


Abb. 23: Indomethazineffekt. Indomethazin inhibiert das hypoosmotische Anschwellen der Bronchialepithelzellen nach Wasservernebelung. Das Vorvernebeln von Indomethazin hat eine Reduktion des Gentransfers um das 3-fache zur Folge.

Einfluss der Modulation der Tight Junctions auf den Gentransfer

Die durch destilliertes Wasser verursachte Epithelzellschwellung kann prinzipiell auch zu einer Lockerung der Interzellulären Bindungen führen. Dadurch könnten Genvektoren die basolaterale Membran erreichen und dort aufgenommen werden. Eine ähnliche Herangehensweise ist bereits bei viralen Genvektoren erfolgreich verwendet worden. Um die basolaterale Membran zu erreichen, wurden Mäuse mit Substanzen wie EGTA und Polidokanol vorbehandelt, welche die Permeabilität der Tight Junctions der Epithelzellen der Luftwege erhöhen (Wang, *et al.*, 2000, Chu *et al.*, 2001, Parsons *et al.*, 1998). In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob die transfersteigernde Wirkung destillierten Wassers auch durch das Ermöglichen eines basolateralen Transports begründet ist, und ob der basolaterale Transport auch bei nicht-viralen PEI-pDNA Genvektoren von Bedeutung ist. Es wurden also die Versuchstiere jeweils 30 Minuten lang einer Vorbehandlung mit vernebeltem destilliertem Wasser, EGTA (400mM) oder 0,1% Polidokanol unterzogen. Anschließend wurden die PEI-pDNA Komplexe, die entweder in destilliertem Wasser oder 5%-iger Glukoselösung zubereitet worden waren, an die Mäuse vernebelt (*Abb.* 24). Die Vorbehandlung der Tiere mit destilliertem Wasser ($8,2 \pm 1,2\text{pg}$), EGTA ($2,4 \pm 2,2\text{pg}$) und Polydokanol ($3,7 \pm 4,4\text{pg}$), hatte aber keinen signifikanten ($p > 0,01$) Einfluss auf die Transfereffizienz bei den in 5%-iger Glukose formulierten Komplexen ($9,1 \pm 5,1\text{pg}$ ohne Vorvernebelung). Die Transfektionseffizienz war bei den in Wasser gelösten Komplexen insgesamt höher (Wasser $157,2 \pm 17,8\text{pg}$, EGTA $29,0 \pm 17,1\text{pg}$, Polydokanol $92,7 \pm 77,8\text{pg}$, ohne Vorvernebelung $196,6 \pm 77,8\text{pg}$). Bei den in Wasser gelösten Komplexen konnte lediglich bei der Vorbehandlung mit EGTA ein signifikanter Unterschied (Erniedrigung um das 7-fache, $p < 0,01$) gefunden werden. Es konnte jedoch weder für Genvektorkomplexe in 5%-iger Glukose, noch in destilliertem Wasser eine signifikante Steigerung der Transfektionsrate gefunden werden. Dies weist darauf hin, dass der Modulation der Tight Junction und somit der basolaterale Transport, nur zum Teil für die hohe Transfektionseffizienz verantwortlich sein kann.

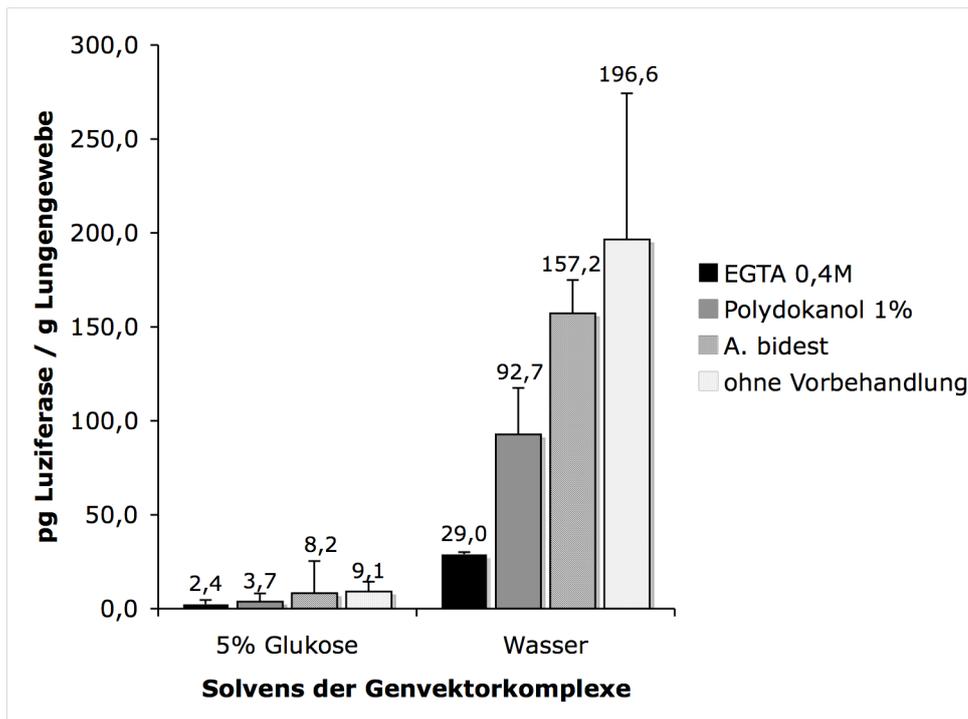


Abb. 24: Modulation der Tight Junctions durch EGTA und Polydokanol. Die Vorbehandlung der Mäuse mit Tight Junctions lösenden Medikamenten hatte keinen steigenden Effekt auf die Transfereffizienz. Damit scheint der basolaterale Genvektortransport keine entscheidende Rolle zu spielen.

3.2.2 Einfluss der Polymerstruktur von PEI auf die Gentransfereffizienz

Der *in vivo* Gentransfer wird bei der intratrachealen Instillation von Genvektoren maßgeblich durch die molekulare Struktur des Polyethylenimins mit beeinflusst. Hierzu zählen Molekulargewicht und Verzweigungsgrad des PEI (Bragonzi *et al.*, 2000, Stammberger *et al.*, 2002). Lineares PEI (lin-PEI) mit einem Molekulargewicht von 22kDa zeigte einen höheren Gentransfer als verzweigt-kettiges PEI (branched PEI, br-PEI) des Molekulargewichts 25 kDa.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die verschiedenen PEI-Typen bei der Vernebelung von Genvektoren Unterschiede in der Transfereffizienz zeigen. Es wurde die Luziferaseexpression in den Lungen von BALB/C Mäusen nach der Vernebelung von PEI/pDNA Vektoren in destilliertem Wasser für lin-PEI 22 kDa, lin-PEI 25kDa und br-PEI 25kDa untersucht (Abb. 25). Es zeigte sich hierbei ein signifikant 9-fach und 15-fach höherer Gentransfer für br-PEI ($104,3 \pm 71,3\text{pg}$) gegenüber lin-PEI 22kDa ($11,6 \pm 10,1\text{pg}$) und lin-PEI 25kDa ($7,0 \pm 7,8\text{pg}$). Zudem bildeten sich bei der Herstellung der Komplexe bei linearen PEI 25kDa sichtbare Trübungen der Komplexlösung, was auf die Bildung sehr großer Partikel

hinweist. Dies war weder bei br-PEI 25kDa noch bei lin-PEI 22kDa der Fall. Hier betragen die Komplexgrößen ~100nm (Tabelle 1).

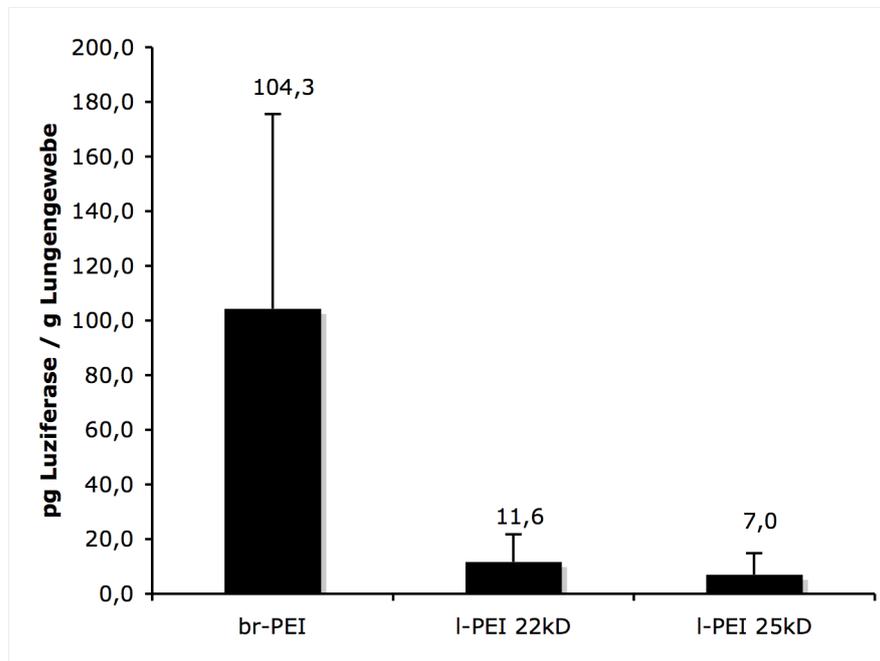


Abb. 25: Vergleich von verzweigt-kettigem PEI (br-PEI) und linearem PEI (lin-PEI). Br-PEI ist bis zu 15mal effektiver als die linearen Formen.

Tabelle 1: Partikelgröße (nm) und Polydispersität von linearem und verzweigtem PEI

Polymer	Partikelgröße	PI
br-PEI 25 kDa	98 ± 2	0.519 ± 0.023
lin-PEI 22 kDa	108 ± 2	0.765 ± 0.018
lin-PEI 25 kDa	Präzipitation	n.d.

Die 9-fache Steigerung der Transfereffizienz von br-PEI gegenüber lin-PEI 22kDa lässt sich also nicht durch einen Unterschied der Komplexgrößen erklären. Allerdings könnte die großen Komplexdurchmesser des lin-PEI 25kDa, die sich durch das Präzipitat zeigt, für den 15-fach niedrigeren Gentransfer verantwortlich sein. Insgesamt zeigte sich, dass sich im Gegensatz zur intratrachealen Instillation von PEI/pDNA-Genvektoren, br-PEI für die Aerosolanwendung besser eignet als die lineare Formen.

3.2.3 Kinetik der Genexpression

Rudolph *et al* hatten nach intratrachealer Instillation einen Gentransfer in der Lunge nachgewiesen. In diesen Experimenten war 24 h nach der Applikation die maximale Luziferaseexpression zu finden gewesen (Rudolph *et al.*, 2000). Es stellte sich die Frage, ob die Genexpression bei der Vernebelung der Genvektorkomplexe, ebenfalls nach 24 h ihr Maximum erreicht hat, und wie schnell die Genexpression danach abfällt. Wir untersuchten zuerst die Kinetik der Genexpression innerhalb von 48 Stunden (nach 6, 10, 24 und 48h), unter der Annahme, dass sich auch bei der Vernebelung von Genvektorkomplexen, ein Maximum um die 24 h finden würde. Es konnte bereits nach 6 h eine Genexpression detektiert werden, die überraschenderweise über die 24 h hinaus weiter zunahm (*Abb. 26*). In einer weiteren Versuchsreihe wurde deshalb die Kinetik der Genexpression zwischen 48 h und 2 Wochen untersucht (48 h, 72 h, 96 h, 7 d, 14 d). Hierbei konnte beobachtet werden, dass das Maximum der Genexpression bei 72 h lag und danach abfiel. Allerdings war auch nach zwei Wochen noch ein Genexpression detektierbar (*Abb. 27*). Es sollte erwähnt werden, dass der Verlauf der Genexpression bei Vernebelung nach Erreichen des Maximums, dem Verlauf bei intratrachealer Instillation ähnelt (Rudolph *et al.*, 2000).

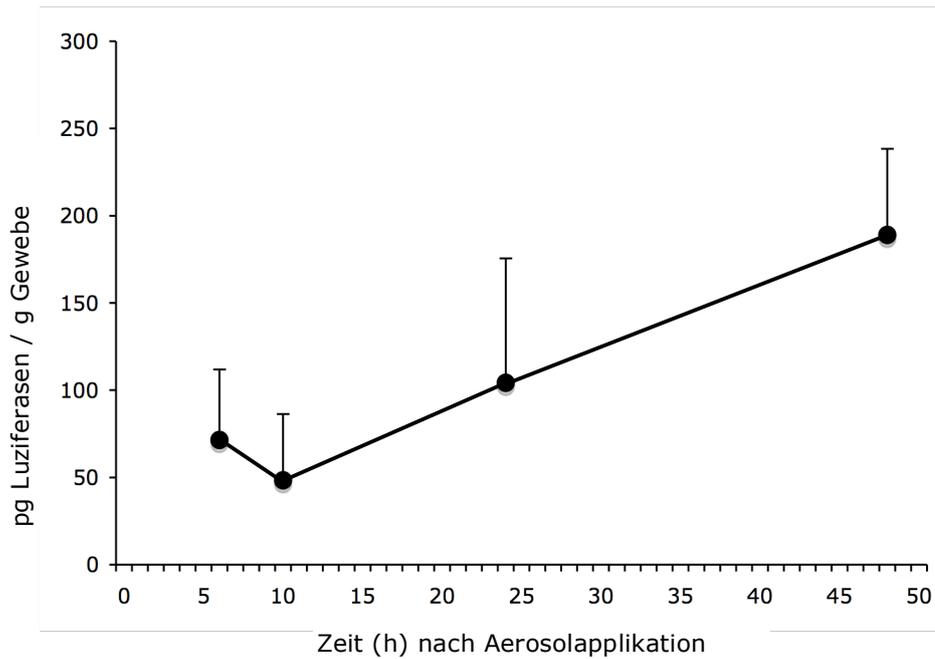


Abb. 26: Zeitverlauf der Genexpression innerhalb von 48 h. Die Genexpression nahm kontinuierlich nach 24 h weiter zu und erreichte ihr Maximum nach 48 h.

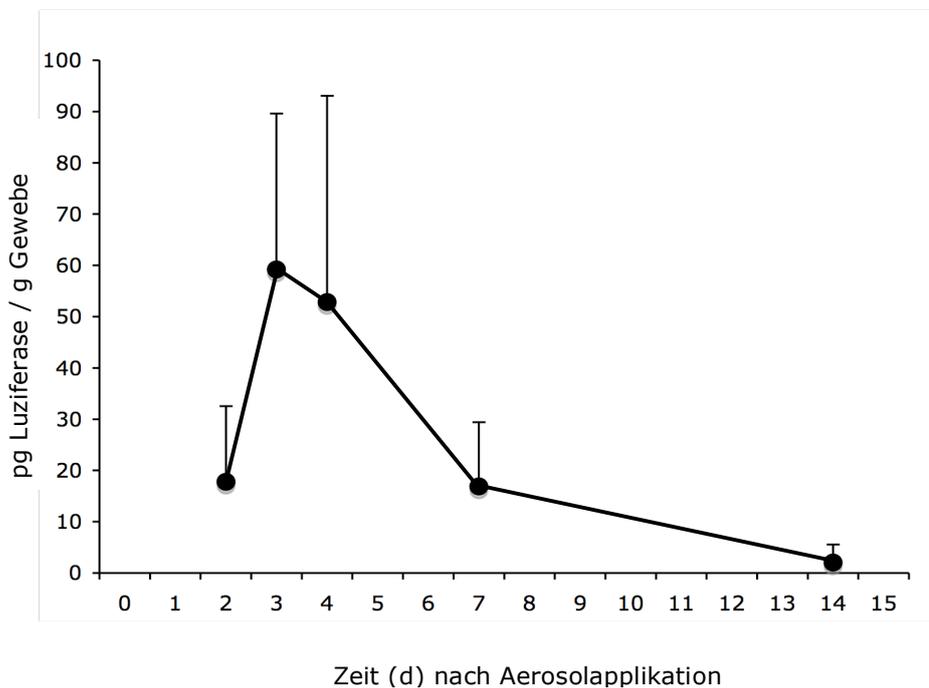


Abb. 27: Zeitverlauf der Genexpression in einem Beobachtungszeitraum von 14 Tagen. Das Maximum der Genexpression lag bei 72 h. Danach nahm sie kontinuierlich ab. Auch nach zwei Wochen war eine Genexpression nachweisbar.

DNA-Clearance aus den Lungen nach PEI-pDNA-Applikation via Aerosol

Es wurden PEI-pDNA Komplexe in destilliertem Wasser generiert und an BALB/C Mäuse vernebelt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden sowohl die pDNA als auch die Luziferaseexpression analysiert. Die Plasmid-DNA wurde innerhalb der ersten vier Tage rasch aus der Lunge entfernt, was zu einer 16-fachen Verringerung der Luziferaseexpression gegenüber 24h nach der Vernebelung führte. Bis zum Tag 7 war keine weitere Abnahme der Plasmid-DNA in den Lungen zu beobachten. Die Luziferaseexpression nahm von Tag 1 bis Tag 3 um das 2,7-fache zu und nahm dann bis zu Tag 7 nach der Vernebelung ab. Die Luziferaseexpression korrelierte nicht mit den Plasmid-DNA Mengen in der Lunge (*Abb. 28*).

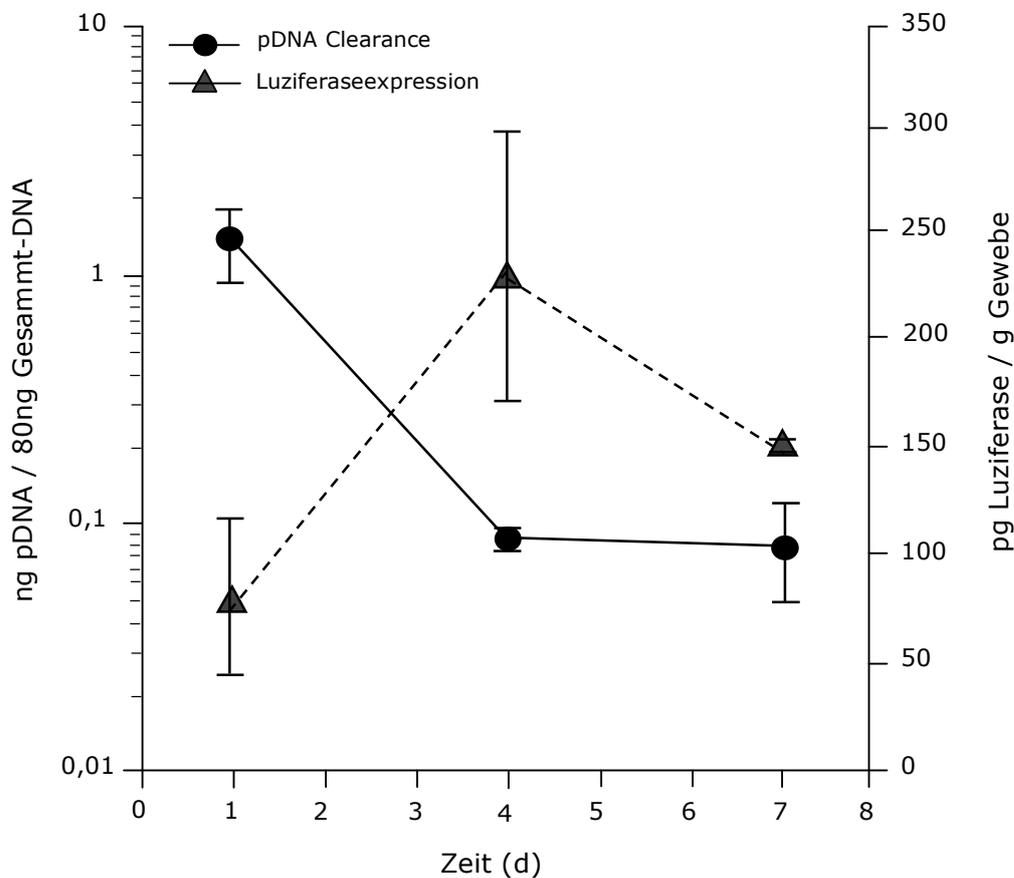


Abb. 28: pDNA-Clearance aus der Lunge. Innerhalb der ersten vier Tage nahm die pDNA-Menge in der Lunge um das 16-fache ab. Die Luziferaseexpression stieg in dieser Zeit im Gegensatz dazu an.

Mehrfachvernebelungen

Wir hatten festgestellt, dass das Expressionsmaximum nach drei Tagen erreicht wurde und danach abfiel. Nun stellte sich die Frage, inwiefern das Maximum durch eine erneute Applikation mit Genvektoren aufrechterhalten werden könnte. Es wurden sechs Versuchsgruppen gebildet (siehe Tabelle 2). Drei Gruppen davon (Gruppe A1, A2, A3) wurden am ersten Tag (Tag 1) der Vernebelung mit PEI/pDNA Komplexen ausgesetzt und die Luziferaseexpression nach 3, 6 und 9 Tagen untersucht. Zwei weitere Gruppen (B1, B2) wurden zweimal der Vernebelung ausgesetzt und die Luziferaseexpression nach 6 und 9 Tagen untersucht. Die letzte Gruppe (C) wurde einer 3 maligen Vernebelung unterzogen und drei Tage nach der letzten Vernebelung untersucht (Tag 9).

Tabelle 2: Ablauf der Mehrfachvernebelung

	Tag 1	Tag 3	Tag 6	Tag 9
Vernebelung mit PEI /pDNA-Komplexen	A1, A2, A3, B1, B2, C	B1, B2, C	C	
Messung der Luziferaseexpression		A1	A2, B1	A3, B2, C

Folgendes konnte festgestellt werden (*Abb. 29*): (i) Eine einmalige Vernebelung von PEI/pDNA Komplexen zeigt nach drei Tagen ein Maximum ($210,5 \pm 47,1\text{pg}$) und nimmt nach weiten drei ($57,9 \pm 9,2\text{pg}$) und sechs Tagen ($35,1 \pm 30,7\text{pg}$) um das 3,7-, bzw. 6-fache ab. (ii) Eine zweite Behandlung der Tiere am Tag des Expressionsmaximums (Tag 3) kann die Luziferaseexpression zunächst auf ihrem Maximum ($227,4 \pm 25,3\text{pg}$) halten. Trotzdem nimmt auch hier die Genexpression sechs Tage nach der letzten Vernebelung um das 3-fache ab ($74,3 \pm 20,7\text{pg}$). (iii) Eine dritte Behandlung der Mäuse konnte das Maximum an Genexpression nicht aufrechterhalten ($127,5 \pm 19,7\text{pg}$). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine einmalige Wiederholung der Behandlung die hohe Luziferaseexpression nur über kurze Zeit erhalten kann. Nach einer dritten Vernebelung beobachtet man bereits

sinkende Expressionsraten. Betrachtet man die Luziferaseraten neun Tage nach der ersten Vernebelung, so kann man sehen, dass die dreimalige Behandlung insgesamt 3,6-fach höher ist als die einmalige Behandlung und 1,7-fach höher als die zweimalige Behandlung. Das heißt, die Luziferaseexpression nimmt kontinuierlich ab, kann jedoch über einen gewissen Zeitraum durch die wiederholte Applikation von Genvektorkomplexen in gewissem Maße aufrechterhalten werden

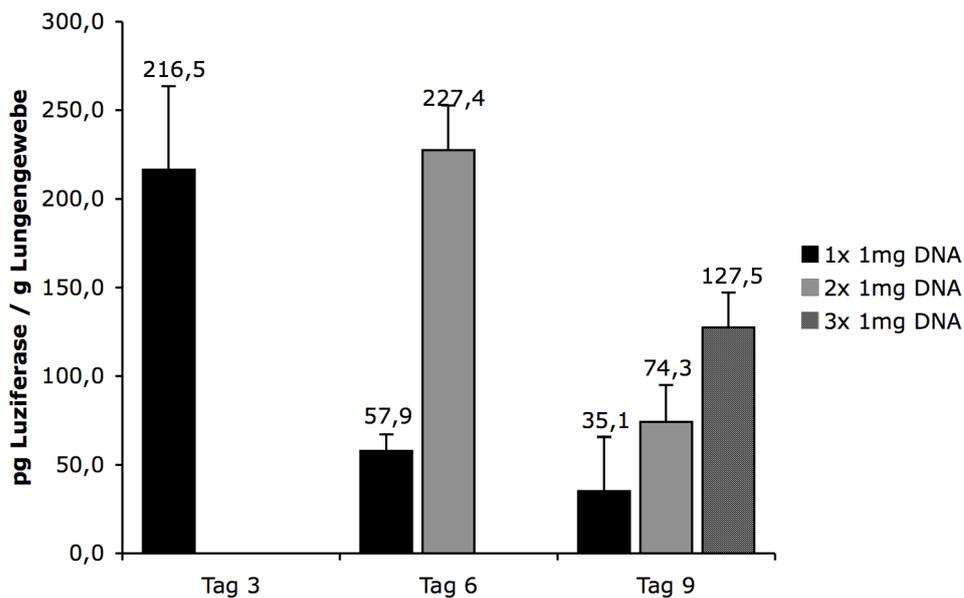


Abb. 29: Luziferaseexpression nach Mehrfachvernebelung. Eine wiederholte Vernebelung von Genvektorkomplexen kann die Luziferaseexpression bis zu 6 Tagen aufrechterhalten.

3.2.4 Dosis-Wirkungsbeziehung

Bei der Messung der Partikelgrößen wurde beobachtet, dass die pDNA- Konzentration der Genvektorlösung einen Einfluss auf die Partikelgröße hat (Tabelle 3). Die Teilchengröße bei der niedrigeren Konzentration (62,5µg/ml) betrug nur 65 ± 1 nm. Eine Erhöhung der Konzentration (125µg/ml) ging mit einer Vergrößerung der Partikel einher (98 ± 2 nm). Daher war es von Interesse, zu erfahren, ob die auch pDNA-Konzentration einen Einfluss auf die Transfereffizienz hat.

Tabelle 3: Abhängigkeit der Partikelgröße von der pDNA-Konzentration bei br-PEI 25 kDa

Polymer	[DNA] in µg/ml	Partikelgröße (nm)	PI
br-PEI 25 kDa	125,0	98 ± 2	0.519 ± 0.023
	62,5	65 ± 1	0.519 ± 0.023

Für dieses Experiment wurde die Hälfte der üblichen pDNA-Menge, also 0,5mg, verabreicht. Dabei wurde entweder die ursprünglichen Konzentration (125µg/ml) beibehalten und die Gesamtmenge der Lösung halbiert (4,0ml), oder aber die pDNA-Konzentration der Lösung erniedrigt (62,5µg/ml) und die Gesamtmenge der Lösung (8,0ml) beibehalten. Vergleichend wurde eine Versuchsgruppe mit der üblichen pDNA-Dosis (1mg) bei einer Konzentration von 125µg/ml behandelt. Abbildung 30 zeigt, dass die Luziferaseexpression signifikant um das 5,6-fache erniedrigt wurde (von $107,63 \pm 49,3$ pg auf $19,06 \pm 2,76$ pg), wenn die Hälfte der pDNA-Dosis in der ursprünglichen Konzentration (125µg/ml) verabreicht wurde (*Abb. 30*). Im Gegensatz dazu zeigte sich lediglich eine 3,4-fache Erniedrigung der Genexpression auf $31,3 \pm 9,64$ pg, wenn die Hälfte der Dosis in der geringeren Konzentration, dafür aber im größeren Gesamtvolumen (8,0ml) verabreicht wurde.

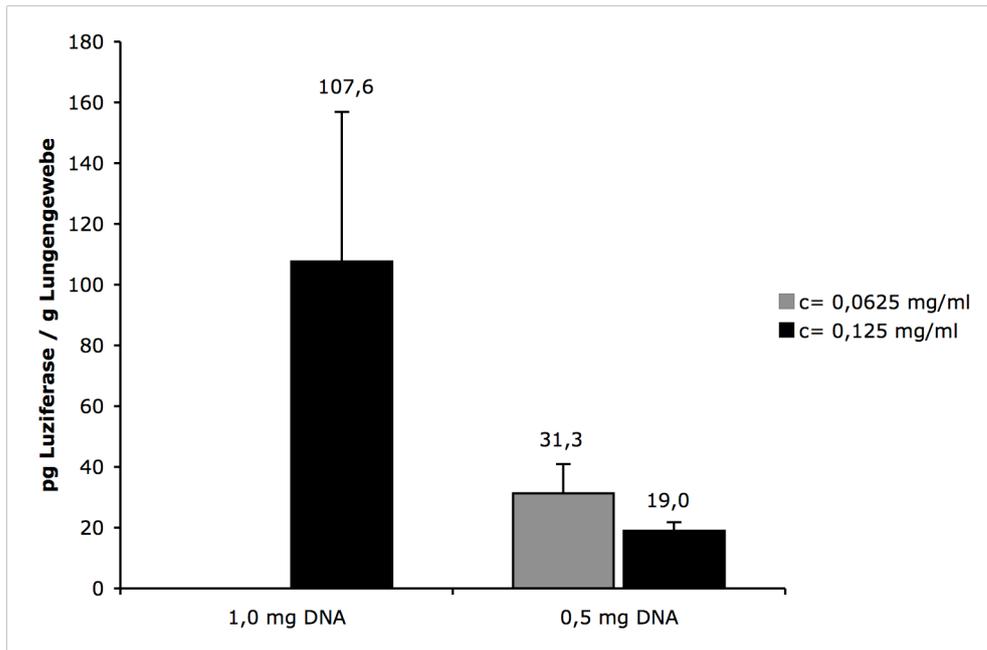


Abb. 30: Luciferaseexpression bei verschiedenen pDNA-Konzentrationen. Eine Verminderung der pDNA-Konzentration zeigt eine Steigerung gegenüber der Vernebelung der gleichen Menge pDNA bei höherer Konzentration.

Zwei Faktoren könnten die erhöhte Gentransferrate bei der Lösung niedrigerer Konzentration beeinflussen. Zum einen war die Partikelgröße in der niedriger konzentrierten Lösung geringer. Zum anderen resultierte durch die geringere Konzentration eine verlängerte Vernebelungsdauer und damit eine längere Inhalationszeit für die Mäuse, die sich ebenfalls positiv auf die Transfektionsrate auswirken könnte.

3.2.5 Zink

Pichon *et al.* hatten im Zellkulturversuch gezeigt, dass beim PEI basierte Gentransfer eine 8 bis 12-fach größere Anzahl an transfizierten HepG2 Zellen erreicht werden kann, wenn der Genvektorlösung vor der Transfektion 250 μM Zn^{2+} zugesetzt wurde (Pichon *et al.*, 2002). Dieser Ansatz sollte hier im *in vivo* Versuch untersucht werden. In diesem Experiment wurde ZnSO_4 bei einer Endkonzentration der Lösung von 250 μM den präformierten Genvektorkomplexen zugesetzt. In Abbildung 31 sieht man jedoch, dass die Luziferaseexpression der Komplexe mit ZnSO_4 ($196,6 \pm 77,8\text{pg}$) keinen signifikanten Unterschied zu der üblichen Vernebelung ohne ZnSO_4 ($220,3 \pm 131,7\text{pg}$) zeigen. Die Untersuchung der Komplexgrößen ergab, dass diese ebenso wenig vom ZnSO_4 beeinflusst wurden wie die Luziferaseexpression (siehe Tabelle 4). Allerdings besteht die Möglichkeit, dass die Wirkung von Zn^{2+} -Ionen zellartabhängig ist, und daher kein Effekt bei den Atemwegsepithelzellen zu sehen war.

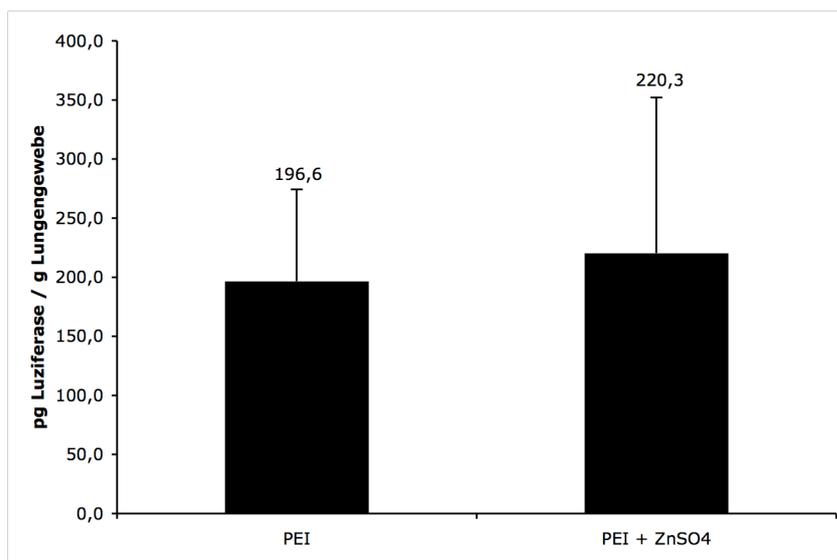


Abb. 31: Einfluss von Zinksulfat. Die Zugabe von Zinksulfat zu den PEI-pDNA-Vektoren hat keine signifikante Steigerung der Genexpression zur Folge.

Tabelle 4: Abhängigkeit der Partikelgröße von der pDNA-Konzentration bei br-PEI 25kDa unter Zugabe von Zinksulfat

Polymer	[DNA] in $\mu\text{g/ml}$	Partikelgröße (nm)	PI
br-PEI 25 kDa	125,0 + ZnSO_4	110 ± 1	0.284 ± 0.018

3.2.6 Einfluss des Mausstammes

Der Gentransfer mittels PEI durch Vernebelung ist bereits vielfach erfolgreich an verschiedenen Tierversuchsmodellen mit Mäusen durchgeführt worden. Dabei wurden unterschiedliche Mausstämme untersucht, beispielsweise das Murine B16F10 Melanommodell (Gautam *et al.*, 2000b, Gautam *et al.*, 2002), oder das Osteosarkom Lungenmetastasenmodell an Nacktmäusen (Densmore *et al.* 2001, Jia *et al.*, 2002), und das K-ras Null Lungenkrebs Mäusemodell (129/Sv Mäuse) (Kim *et al.*, 2004). Allerdings waren bisher, verschiedene Mausstämme noch nicht direkt miteinander verglichen worden. Angesichts der Tatsache, dass Mäuse in vorklinischen Experimenten sehr häufig in Tierversuchsmodellen untersucht werden, ist es von Interesse zu erfahren, ob sich die verschiedenen Mausstämme in der Genexpression unterscheiden, und zu untersuchen, worin diese Unterschiede liegen könnten. In diesem Abschnitt wurde der Mausstammabhängige Gentransfer durch den direkten Vergleich dreier Mäusestämme, bezüglich der Luziferaseexpression in den Lungen nach Vernebelung mit PEI/pDNA-Komplexen untersucht. Im nächsten Kapitel (siehe 3.3. Biodistribution) wird genauer auf die Verteilung der pDNA in den verschiedenen Organen der Versuchstiere eingegangen. Es wurden Mäuse der Stämme C57bl/6, BALB/c und NMRI untersucht. PEI/pDNA-Komplexe wurden jeweils gleichzeitig an BALB/c- und C57bl/6 Mäuse, oder BALB/c- und NMRI-Mäusen vernebelt. Die Tiere befanden sich in der standardisierten Ganzkörperkammer, die Komplexe wurden in destilliertem Wasser generiert. 24 Stunden nach der Vernebelung betrug die Luziferaseexpression der Lungen bei den BALB/c-Mäusen im Mittel $86,3 \pm 16,7$ pg und war damit signifikant 3,8-fach höher als die der C57bl/6 Mäuse mit $22,8 \pm 7,3$ pg (Abb. 32). Im zweiten Vergleich (Abb. 33) zeigten BALB/c-Mäusen mit $136,1 \pm 21,9$ pg einen signifikant 3,2-mal höheren Gentransfer ($p < 0,05$) als die NMRI-Mäusen ($42,01 \pm 51,2$ pg). Es konnte keine Genexpression in Herz, Leber, Nieren, Magen, Dünn- und Dickdarm, oder Blut festgestellt werden. Um festzustellen woher diese Unterschiede kommen könnten wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, die im folgenden Kapitel abgehandelt werden.

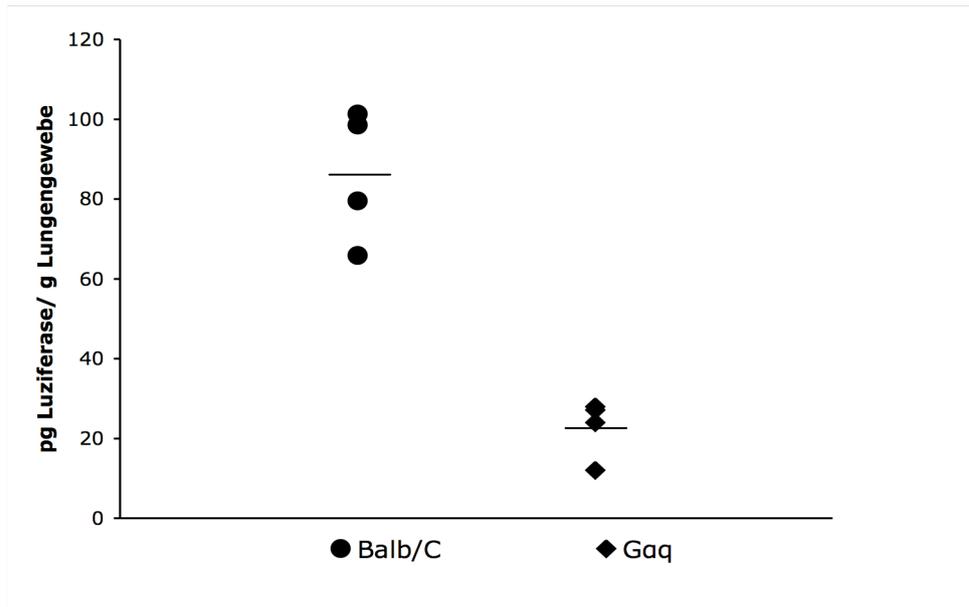


Abb. 32: Vergleich der Mausstämmе BALB/C und C57bl/6. Die BALB/C-Mäuse zeigten im Mittel eine 3,8-fach höhere Luziferaseexpression als die C57bl/6 -Mäuse.

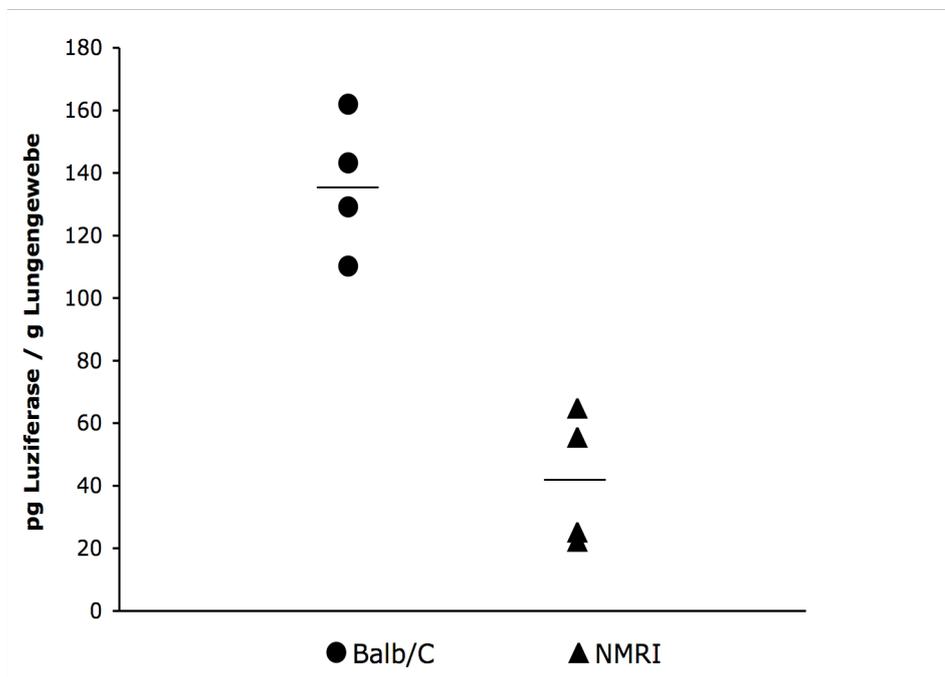


Abb. 33: Vergleich der Mausstämmе BALB/C und NMRI. Die BALB/C-Mäuse zeigten im Mittel eine 3,1-fach höhere Luziferaseexpression als die NMRI-Mäuse.

3.3 Biodistribution vernebelter PEI/pDNA-Komplexe

In dieser Arbeit, bei der die Genexpression von Luziferase in den Lungen von Mäusen untersucht wurde, waren vor allem die stammspezifischen Unterschiede der Atemwege der verschiedenen Mausstämmen zu beachten. Es war berichtet worden, dass es zwischen den Mausstämmen signifikante Unterschiede bezüglich einiger Lungenfunktionsparameter, wie Lungengröße, Compliance und Diffusionskapazität bestehen (Schulz H *et al.*, 2002, Reinhard *et al.*, 2002.). Zudem wurden zwischen den Mausstämmen signifikante Unterschiede der Morphologie des Tracheobronchialbaums der ersten bis sechsten Generation gezeigt. Dies betraf die Länge, Durchmesser und Abzweigungswinkel (Oldham *et al.*, 2002). Diese anatomischen und physiologischen Parameter könnten die Depositionsraten bei der Aerosolapplikation verändern und somit den Unterschied der Gentransferraten zwischen den Mausstämmen erklären (siehe 3.2.).

3.3.1 Verteilung der pDNA im Körper der Versuchstiere

Es sollte untersucht werden, ob die Deposition der Vernebelten pDNA sich bei verschiedenen Mausstämmen unterscheidet. Dazu wurden jeweils Mäusen der Stämme BALB/c, C57bl/6 und NMRI gleichzeitig PEI/pDNA-Komplexen in destilliertem Wasser und in 5%-iger Glukoselösung appliziert. Die pDNA war vor der Vernebelung mit dem Isotop Iod¹²³ radioaktiv markiert worden, sodass nach der Vernebelung die pDNA mittels Gammazähler in den Organen detektiert werden konnte. Unmittelbar nach der Vernebelung wurden die Mäuse eingeschläfert, die Organe rasch entnommen und die Radioaktivität in dem jeweiligen Organ vermessen. Die gemessene Radioaktivität korrelierte mit der pDNA-Dosis, die sich in diesem Organ befand und konnte in Relation gesetzt werden, zur pDNA-Menge pro Gramm Gewebe des jeweiligen Organs.

Die höchste pDNA Deposition (54-60% der Gesamtdeposition) bei den Komplexen in destilliertem Wasser, fand sich bei allen Tieren am Fell (C₁-C₃, 2,8-2,9µg pDNA) und im Gastrointestinaltrakt (31-36%, 1,5-1,9µg pDNA), unabhängig vom Mausstamm (*Abb.* 34). Am dritthöchsten war die Deposition in der Lunge (NMRI 0.483 ± 0.015µg; BALB/C 0.323 ± 0.096µg; C57bl/6 0.328 ± 0.080µg). In den inneren Organen wie Herz, Leber, Nieren, Milz und im Blut konnten nur sehr geringe Mengen an radioaktiver pDNA detektiert werden (insgesamt 50-80ng pDNA). In keinem der Organsysteme war der Unterschied zwischen den drei Mausstämmen signifikant (p>0,01).

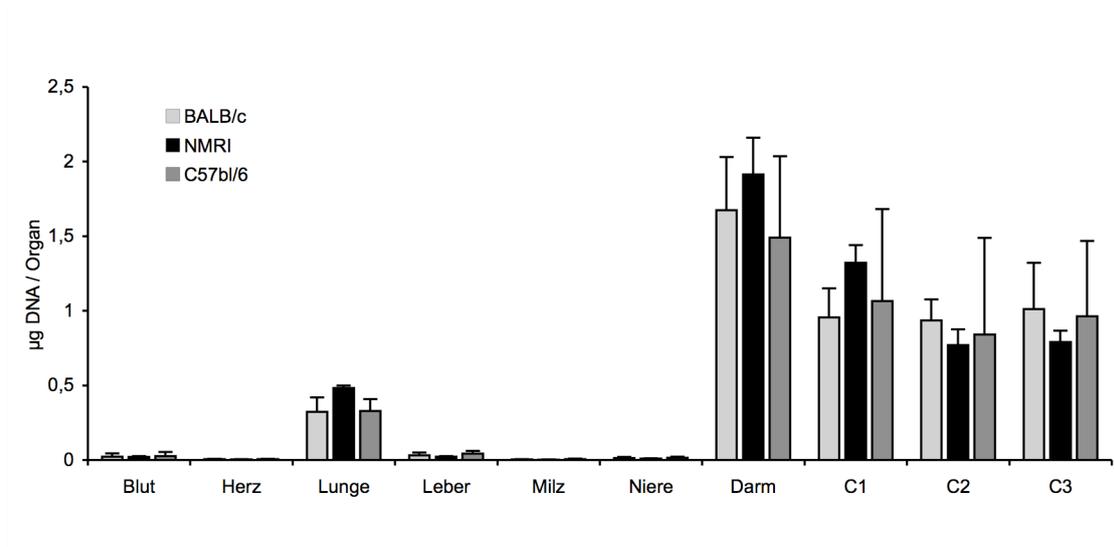


Abb. 34: Absolute pDNA-Distribution pro Organ. In Wasser generierte Komplexe. Die meiste pDNA-Menge findet sich auf dem Fell und im Magen-Darm-Trakt.

Wurden die Depositionsmengen mit den Organgewichten in Relation gesetzt (Abb. 35), so zeigte sich, dass die Deposition bei Vernebelung der Komplexe bevorzugt in der Lunge stattfand, und die Deposition in der Lunge 2-3fach höher war als im Darm. Jedoch konnte auch hier in keinem der Organe ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Mausstämmen gefunden werden ($p > 0,01$).

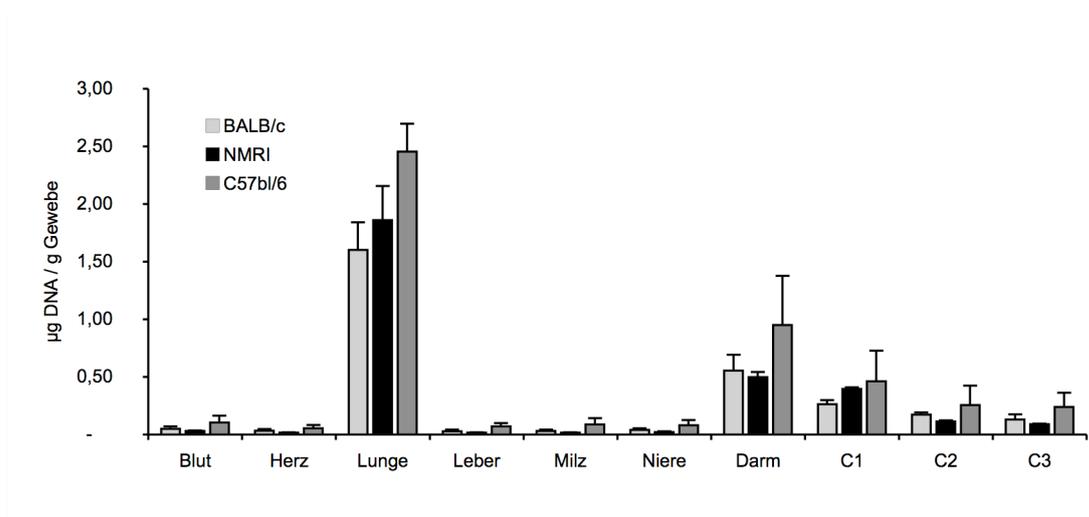


Abb. 35: Relative pDNA-Verteilung pro g Gewebe. In Wasser generierte Komplexe. In der Lunge findet sich die höchste Menge an pDNA relativ zum Organgewicht.

Die Komplexe, die in 5%-iger Glukose generiert wurden, zeigten ein sehr ähnliches Verteilungsmuster, wobei die Felldeposition leicht höher war (Abb. 36). Die pDNA-Menge, die sich in der Lunge befand war jedoch nicht signifikant höher als bei destilliertem Wasser (NMRI $0.295 \pm 0.094\mu\text{g}$; BALB/c $0.319 \pm 0.035\mu\text{g}$; C57bl/6 $0.272 \pm 0.029\mu\text{g}$; $p < 0.01$). Ebenso konnte bei den Komplexen in 5%-iger Glukose zwischen den Mausstämmen kein Unterschied gefunden werden, weder in der gesamt pDNA-Deposition pro Organ, noch in der organspezifischen Deposition (Abb. 37).

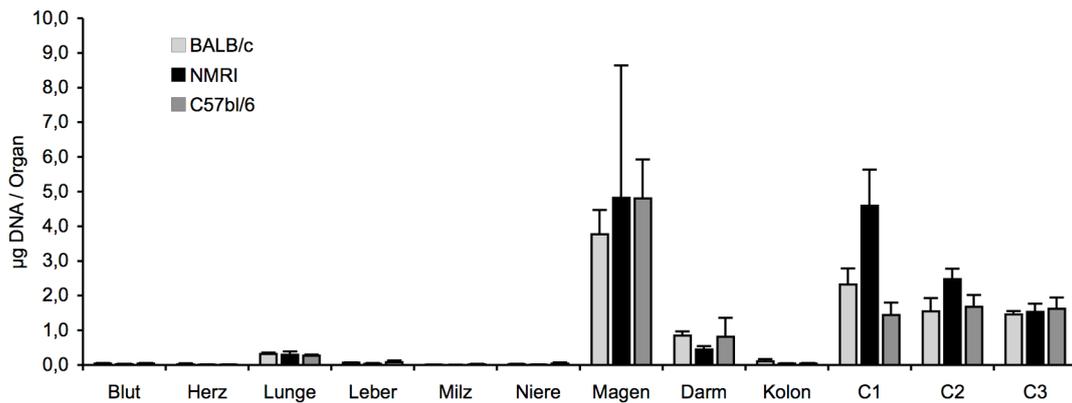


Abb. 36: Absolute pDNA-Verteilung pro Organ. Komplexe in 5%-iger Glukose gelöst. Auch hier findet sich die meiste pDNA auf dem Fell und im Gastrointestinaltrakt, da vor allem in Magen.

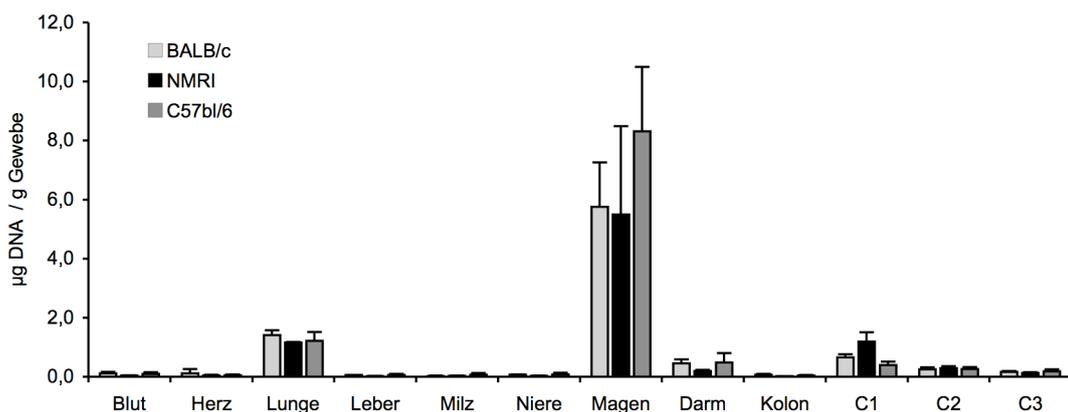


Abb. 37: Relative pDNA-Verteilung pro g Gewebe. Für die Komplexe in 5%-iger Glukose zeigt sich vor allem eine Ansammlung im Magen.

Es wurde zwar Radioaktivität in allen Organsystemen der Tiere gefunden, aber eine Genexpression wurde lediglich in den Lungen detektiert. Beim Vergleich der Mausstämmen zeigte sich deutlich, dass die deponierte pDNA-Menge und das Verteilungsmuster weder vom Mausstamm abhängig waren, noch von dem Solvens in denen sich die Komplexe befanden. Da sich trotzdem große Unterschiede in der Luziferaseexpression zwischen den Mausstämmen zeigen (siehe S.63, 3.2.6), ist anzunehmen, dass diese Ungleichheiten eher auf genetische Differenzen beruht, denn auf einen physiologisch-morphologischen Unterschied.

3.3.2 Histologie

Mit Hilfe von Histologischen Untersuchungen, sollte die genauere regionale Lokalisation des Aerosols in der Lunge untersucht werden. Dazu wurden PEI/pDNA-Komplexe in destilliertem Wasser generiert, wobei das verwendete PEI zuvor mit FITC fluoreszenzmarkiert worden war. Die Komplexe wurden an BALB/c Mäuse vernebelt und eine Stunde nach Vernebelung mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht (*Abb. 38*). Bei geringer Vergrößerung sah man fluoreszierende PEI/pDNA-Komplexe, die im Alveolarepithel homogen verteilt waren (A). Im Bronchialepithel konnten keine Komplexe detektiert werden (B). Erst bei der höheren Vergrößerung konnten sowohl im Alveolarepithel (C) als auch im Bronchialepithel (D) PEI/pDNA-Komplexe gefunden werden. Einige der Komplexe schienen durch Endozytose in die Bronchialepithelzellen aufgenommen worden zu sein (D). Ein großer Anteil der Komplexe, die in der Alveolarregion deponierten, wurden von Alveolarmakrophagen phagozytiert (A, E; Pfeilspitzen).

Um diejenigen Zellen zu detektieren, die tatsächlich das applizierte Gen exprimieren, wurden PEI/pDNA-Komplexe generiert, die als Reporter gen ein Plasmid trugen, welches für ein β -Galaktosidase-NLS-Fusionsprotein kodierte (NLS = Nuklear Localisation Sequence; Kernlokalisierungssequenz). Kernlokalisierungssequenzen sind meist aus wenigen Aminosäuren bestehende Peptidsequenzen, welche es größeren Proteinen (>40kDA) ermöglichen durch aktiven Transport über so genannte Importine in den Zellkern überführt zu werden. Die Fusion der NLS mit dem β -Galaktosidase Reporter gen führte zu einer Blaufärbung der Zellkerne transfizierter Zellen, da das Enzym β -Galaktosidase das artifizielle, chromogene Substrat X-Gal zu Galactose und einem wasserunlöslichen blauen Indigo-Farbstoff hydrolisiert.

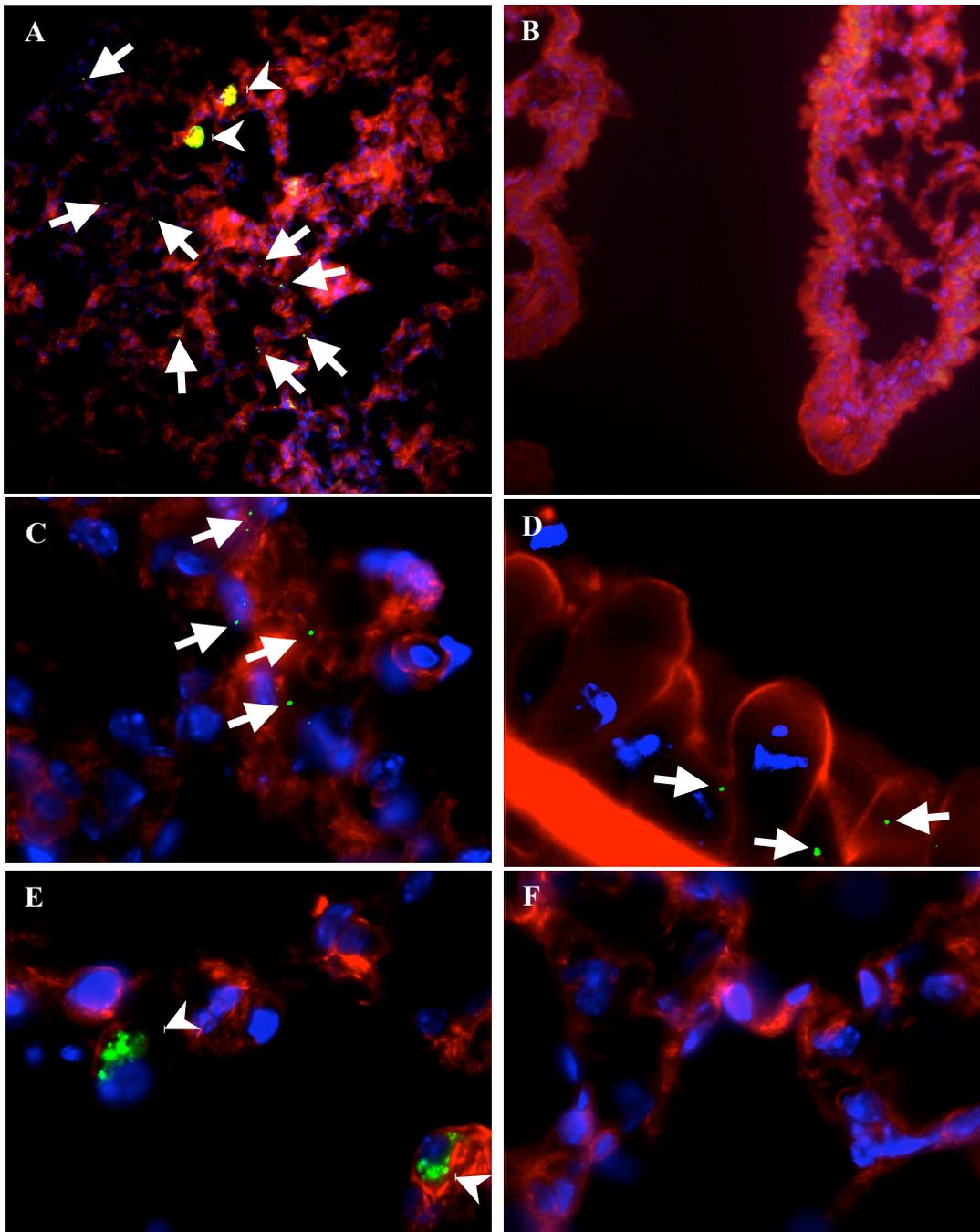


Abb. 38: Fluoreszenzmikroskopie der FITC-markierten Komplexe nach Vernebelung (Pfeile). Bei geringer Vergrößerung (A; B) sieht man die Komplexe nur in den Alveolen. Bei höherer Vergrößerung (C; D) erkennt man auch Komplexe in den Bronchialepithelzellen. Ein großer Anteil der Komplexe wird von den Alveolarmakrophagen phagozytiert (Pfeilspitzen A, E). Die Komplexe in den Bronchialepithelzellen werden scheinbar durch Endozytose aufgenommen (D).

Diese Genvektoren wurden in destilliertem Wasser generiert und an BALB/c Mäuse vernebelt. Es wurde hauptsächlich eine positive Genexpression für β -Galaktosidase in den zilientragenden Zellen des Bronchialepithels der größeren Bronchien gefunden (Abb. 39; A, B). Es konnten auch einige wenige transfizierte Makrophagen gefunden werden (C). Bei den unbehandelten Kontrolltieren konnte keine β -Galaktosidase-Expression in den Lungen gefunden werden. Die beobachtete Genexpression korreliert wahrscheinlich mit dem Verteilungsmuster der Komplexe. Möglicherweise werden die Genvektorkomplexe zunächst homogen in der Lunge verteilt. Anschließend wird ein Großteil der Komplexe in den Alveolen jedoch von Alveolarmakrophagen phagozytiert, wodurch eine effektive Transfektion der Alveolarzellen selbst verhindert wird. Im Bronchialepithel finden sich weniger Alveolarmakrophagen. Dadurch ist die Clearance der Genvektorkomplexe geringer und die Transfektionsrate höher.

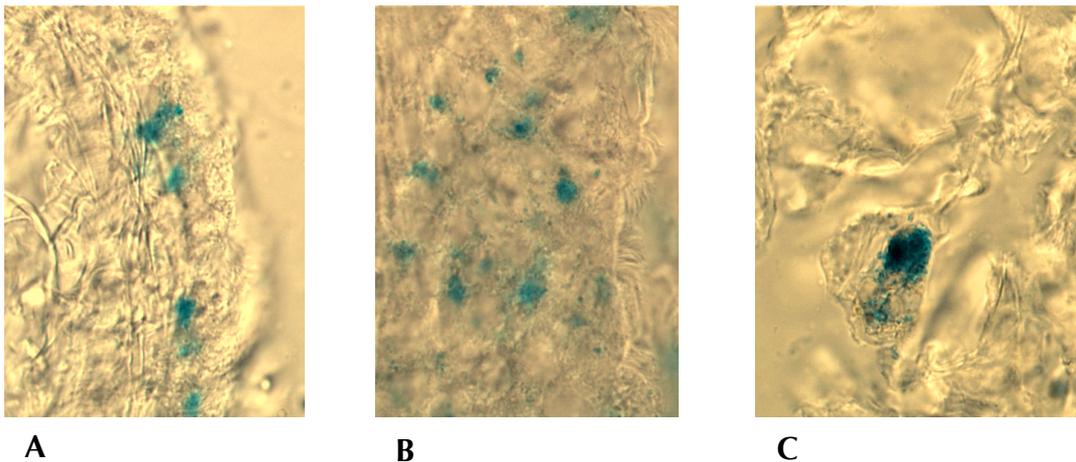


Abb. 39: β -Galaktosidaseexpression in der Lunge nach Vernebelung von PEI/pDNA-Komplexen in destilliertem Wasser. Es färbten sich hauptsächlich die zilientragenden Zellen des Bronchialepithels blau an (A; B). Auch einige wenige Alveolarzellen färbten sich an (C).

3.4 Vergleich der Transfektionseffizienz zwischen Aerosolapplikation und intratrachealer Instillation

Bei der Untersuchung der Biodistribution von Genvektorkomplexen war festgestellt worden, dass von der insgesamt vernebelten pDNA-Menge von 1 mg nur 0,35µg pDNA in die Lungen der Mäuse gelangen (siehe 3.3.1). Eine weitere Möglichkeit Gentransfer in den Lungen von Mäusen zu erwirken, ist die intratracheale Instillation. Um einen direkten Vergleich zwischen den beiden Applikationsmethoden zu erstellen, wurden PEI/pDNA-Vektoren ($m_{\text{pDNA}} = 0,35\mu\text{g}$; N/P = 10) in destilliertem Wasser, 5%-iger Glukose und HBS generiert, und nach vorsichtiger Intubation per intratrachealer Instillation an kurzzeitig narkotisierte Mäuse verabreicht. Nach 24 Stunden wurde die Luziferaseexpression in den Lungen der Mäuse gemessen. Bei dieser niedrigen pDNA-Dosis war bei keinem der Solventien ein Gentransfer festzustellen. Die pDNA-Dosis wurde nun auf 50µg pro Maus erhöht. Diese Menge an pDNA war von Rudolph *et al* (Rudolph *et al.* 2000) erfolgreich via intratrachealer Instillation von PEI/pDNA Komplexen an Mäuse verabreicht worden. Die Komplexe wurden in destilliertem Wasser generiert und wiederum direkt in die Lungen der Mäuse instilliert. Nun zeigte sich ein Gentransfer, der jedoch, bezogen auf die applizierte pDNA-Dosis, signifikant um das 2280-fache geringer war als bei der Vernebelung ($p < 0,01$), bei der lediglich 0,35µg pDNA in die Lungen gelangen.

4. Anwendung der Aerosolapplikation auf verschiedene Gentransferträgersysteme

Der nicht-virale Vektor Polyethylenimin 22kDa hatte sich für den Zweck des Gentransfers in der Lunge via Aerosolapplikation als geeignet und effektiv gezeigt. In diesem Kapitel sollen nun die Ergebnisse der Untersuchung zwei weiterer Gentransferträgersysteme vorgestellt werden.

4.1 TAT-vermittelte Aerosolgentransfer

Ein entscheidender Schritt im Prozess der Expression eines zugeführten Gens ist der Transfer der Plasmid-DNA aus dem Zytoplasma in den Zellkern der Zelle. Es wurde gezeigt, dass durch die Kopplung von Kernlokalisierungssequenzen (NLS = Nuclear localisation sequence) an den Vektor-DNA-Komplex eine Steigerung der Gentransfereffizienz bewirkt werden kann (Branden *et al.*, 1999, Subramanian *et al.*, 1999). Kernlokalisierungssequenzen sind kurze Peptidsequenzen, die sowohl endogenen als auch exogenen Proteinen ermöglichen, in den Zellkern transportiert zu werden, was ihnen aufgrund ihrer Größe sonst nicht möglich wäre. Das aus 11 Aminosäuren bestehende arginin-reiche Motiv des HIV-1 TAT-Protein (essentiell Transkriptions-aktivierendes Protein des HIV-1) zeigt sowohl Eigenschaften einer Kernlokalisierungssequenz als auch einer Proteintransduktionsdomäne (Frankel *et al.* 1988). Rudolph *et al.* konnten zeigen, dass die elektrostatische Kopplung eines Oligomers des arginin-reichen Motivs des HIV-1 TAT-Proteins („TAT₂-Peptid“) an PEI-pDNA-Komplexe, die Transfektionsraten in der Zellkultur um das 100-800fache steigern konnte im Vergleich zu den PEI-pDNA-Komplexen ohne angekoppelter NLS (Rudolph *et al.*, 2003). Des Weiteren untersuchte Rudolph *et al.* die ternären und quartären Oligomere des TAT-Peptids auf ihre biophysikalischen Parameter und ihre Transfereffizienz hin. Hierbei erwies sich die dimere Form insgesamt als die für den Gentransfer günstigste. In dieser Arbeit wurde untersucht, in wie weit sich die unterschiedlichen TAT-Oligomere in Komplex mit PEI und pDNA für den Gentransfer via Vernebelung eignen. Die Transfektionseffizienz der verschiedenen Gentransferträgersysteme PEI/pDNA, TAT₂/PEI/pDNA, TAT₃/PEI/pDNA und TAT₄/PEI/pDNA wurden außerdem in verschiedenen Solventien (Aqua bidest., 10mM HEPES, HBS) untersucht, da in Kapitel 3.2.1 bereits erläutert wurde, dass das Solvens, in welchem die Genvektorkomplexe generiert werden, sowohl biophysikalische Parameter wie ζ -Potential

und Partikelgröße, als auch zellphysiologische Vorgänge beeinflussen kann. Die Transfektionsfähigkeit wurde im Zellkulturversuch an humanen Bronchialepithelzellen untersucht. Als Letztes sollte untersucht werden, ob sich diese Gentransferträgersysteme insgesamt im *in vivo* Versuch bei Mäusen als effektiver erweisen, als die bisher verwendeten PEI/pDNA Komplexe.

4.1.1 Einfluss des Solvens auf die Transfektionseffizienz

Für die Untersuchung der Gentransfereffizienz von TAT₂₋₄/pDNA/PEI-Komplexen wurde zuerst aus der hergestellten Komplexlösung eine Fraktion entnommen (nicht vernebelte Fraktion = nv) und anschließend die restliche Lösung im PARI BOY LC plus zehn Minuten lang vernebelt und das Aerosol in einem Eppendorfcup aufgefangen (vernebelte Fraktion = v). Die im Vernebler verbliebene Lösung wurde ebenso untersucht (Reservoirefraktion = r). Die Komplexe wurden in HBS, 10mM Hepes, und zweifach destilliertem Wasser generiert. Die Transfektionseffizienz ist in pg Luziferase /g Protein ± Standardabweichung angegeben.

Die Komplexe zeigten je nach Solvens ein sehr unterschiedliches Verhalten. Die Transfereffizienz für alle TAT₂₋₄/PEI/pDNA Komplexe war in HBS als Solvens (*Abb. 40*) insgesamt am höchsten verglichen mit 10mM Hepes und destilliertem Wasser. In allen Fraktionen zeigte sich ein höherer Gentransfer als bei den binären PEI/pDNA-Komplexen. Die nicht vernebelten Fraktionen zeigten für TAT₂ eine 12-fache, für TAT₃ eine 17-fache und für TAT₄ einen 22-fachen Steigerung der Luziferaseexpression gegenüber den PEI/pDNA-Komplexen. Desgleichen sah man in der vernebelten Fraktion, bei denen sich entsprechend Steigerungen um das 90-, 832- und 1415-fache fanden. In der Reservoirefraktion betrugen die Unterschiede das 528-, 2101- und 4817-fache. Alle Differenzen waren signifikant ($p < 0,05$). Hierbei ist jedoch gleichzeitig zu beachten, dass die PEI/pDNA-Komplexe in HBS stark durch den Vernebelungsprozess beeinflusst wurden und die Transfereffizienz der Komplexe nach der Vernebelung 75 -fach und im Reservoire sogar 321 -fach niedriger war als unvernebelt. Insgesamt lässt sich sagen, dass mit steigendem Oligomerisierungsgrad die Transfereffizienz in HBS für alle Fraktionen zunahm.

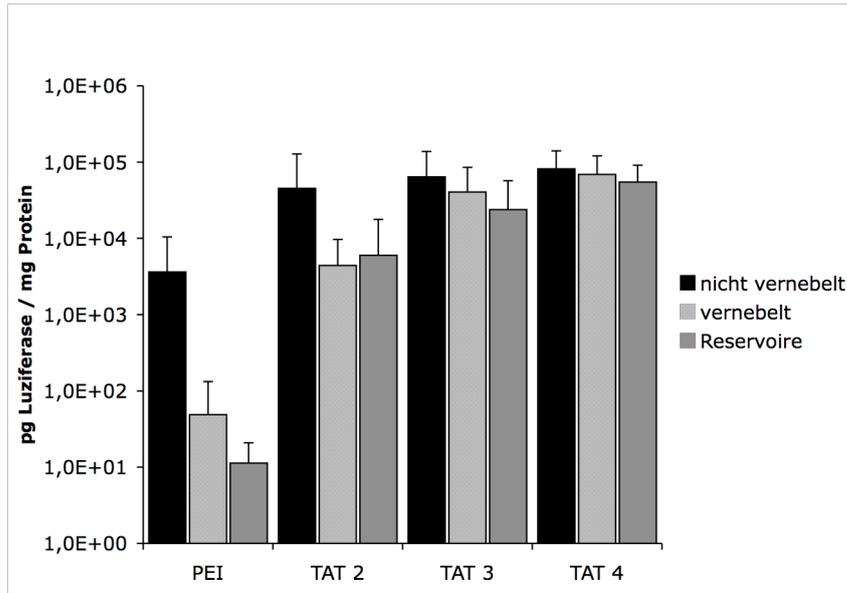


Abb. 40: Transfereffizienz von binären Komplexen (PEI/pDNA) und ternären Komplexen (TAT₂₋₄/PEI/pDNA) in HBS. Binäre Komplexe werden durch die Vernebelung stärker angegriffen. Alle ternären Komplexe sind effizienter als die binären Komplexe.

In 10mM HEPES zeigt sich ein sehr unregelmäßiges Bild (Abb. 41). In der nicht vernebelten Fraktion fanden sich signifikante Erhöhungen von TAT₂ um das 72-fache und von TAT₃ um das 1,7-fache gegenüber PEI/pDNA. TAT₄ jedoch zeigte eine Erniedrigung um das 14-fache. Auch in der vernebelten Fraktion waren TAT₂ und TAT₃ signifikant ($p < 0,05$) um das 6,5- und 5,9-fache effektiver als PEI alleine, und auch hier war wieder TAT₄ signifikant 8,4-fach niedriger als PEI. Bei der Reservoirfraktion fand sich lediglich für TAT₃ ein signifikanter Unterschied zu PEI mit einer 4-fachen.

In Wasser schienen die PEI/pDNA-Komplexe den Vernebelungsprozess am besten zu überstehen (Abb. 42). Es zeigten sich hier auch die geringsten Unterschiede zwischen den Binären PEI/pDNA-Komplexen und den ternären TAT/pDNA/PEI-Komplexen. In der nicht vernebelten Fraktion konnte man zwar im Mittel mit zunehmendem Oligomerisierungsgrad eine Abnahme des Gentransfers beobachten (TAT₄ insgesamt 162mal niedriger als PEI). Die Unterschiede waren aber nicht signifikant. Dasselbe Bild konnte man auch für die Reservoirfraktion beobachten. TAT₂ war im Mittel 2mal besser, TAT₃ war 215mal schlechter und TAT₄ sogar 408mal schlechter. Die Standardabweichungen waren aber besonders für TAT₃ und TAT₄ extrem hoch und die Ergebnisse nicht signifikant. Lediglich in der Vernebelten Fraktion konnte man für TAT₃ und TAT₄ eine signifikante 52-fache und 126-fache Verringerung des Gentransfers feststellen.

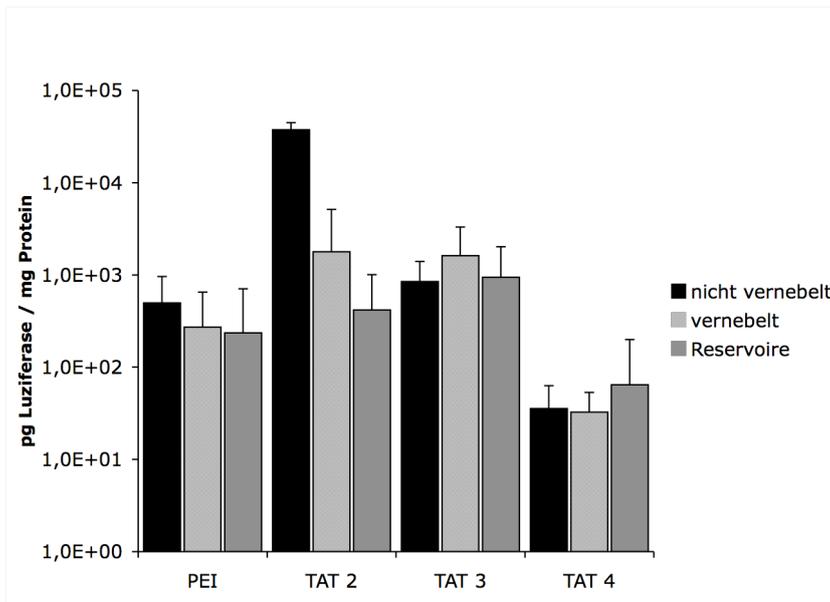


Abb. 41: Transfereffizienz von binären Komplexen (PEI/pDNA) und ternären Komplexen (TAT₂₋₄/PEI/pDNA) in 10 mM Hepes. Für die ternären Komplexe waren signifikante Erhöhungen der vernebelten Fraktion nur für TAT₂ und TAT₃ gegenüber den binären Komplexen.

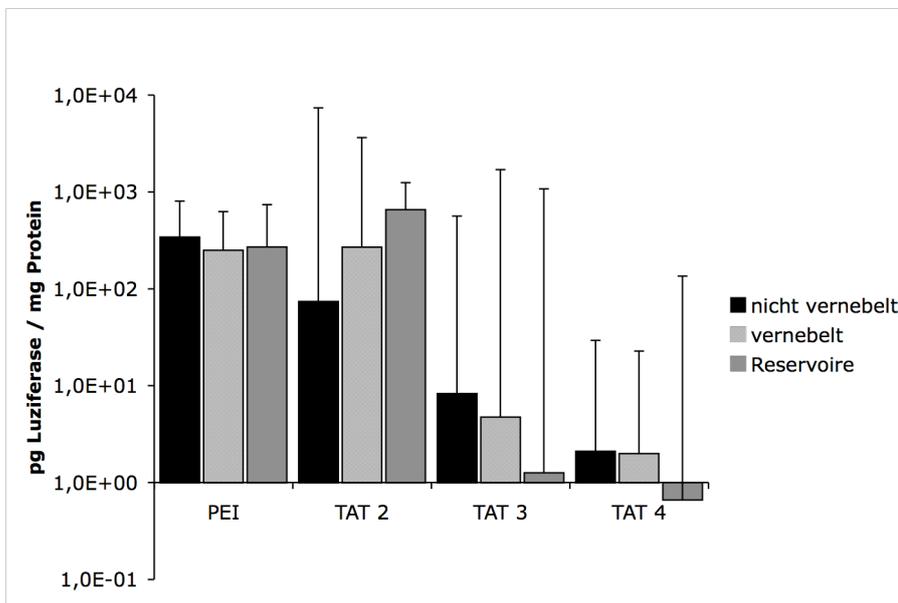


Abb. 42: Transfereffizienz von binären Komplexen (PEI/pDNA) und ternären Komplexen (TAT₂₋₄/PEI/pDNA) in destilliertem Wasser. Die binären Komplexe waren am stabilsten in Wasser. In der vernebelten Fraktion waren lediglich die TAT₃ und TAT₄ Komplexe signifikant niedriger als die binären Komplexe (sehr hohe Standardabweichung, siehe Text).

4.1.2 Vernebelung von TAT-pDNA-PEI-Komplexen *in vivo*

Nachdem die TAT-Oligomere in der Zellkultur eine Steigerung des Gentransfers gezeigt hatten, sollte das Vernebelungsexperiment auch im Tierexperiment untersucht werden. Dazu wurden die Komplexe in 10mM HEPES generiert. 1 mg Plasmid-DNA wurde in einem N/P von 1 mit dem TAT-Dimer (TAT₂) vermischt und 10 Minuten lang inkubiert. Anschließend sollte die Lösung in einem N/P- Verhältnis von 10 zu PEI gegeben werden. Das Gesamtvolumen betrug 8ml, und die pDNA-Konzentration somit $c = 0,125\text{mg/ml}$. Bei der Zumischung von TAT fand jedoch unerwarteterweise unmittelbar eine Ausfällung der Komplexe statt, die eine Vernebelung sinnlos machte. In einer Verdünnungsreihe konnte festgestellt werden, dass eine Ausfällung der Komplexe bis zu einer pDNA-Konzentration von $c = 0,0375\text{mg/ml}$ stattfindet. Deshalb wurden nun erneut eine TAT₂-pDNA-Lösung generiert mit 1/5 der ursprünglichen Konzentration generiert ($c = 0,025\text{mg/ml}$). Um trotzdem die Gesamtdosis der pDNA von 1 mg zu vernebeln, wurde der Vernebelungsvorgang mehrmals hintereinander durchgeführt. Bei keinem der Tiere konnte jedoch ein Gentransfer beobachtet werden.

4.2 Verwendung von Solid Lipid Nanoparticles als Genvektor

Solid Lipid Nanoparticles (SLN) sind positiv geladene Lipidpartikel, die die Fähigkeit gezeigt hatten pDNA zu Partikeln kondensieren zu können und Säugetierzellen zu transfizieren (Olbrich *et al.*, 2001, Tabatt *et al.*, 2004). Die SLN bieten gegenüber den anderen nicht-viralen Standardvektoren wie kationischen Lipiden oder kationischen Polymeren, technische Vorteile, wie die relativ einfache Herstellung ohne organische Solventien (Mehnert *et al.*, 2001), die Möglichkeit sie in großem Maßstäben herstellen zu können (Müller *et al.*, 2000, Dingler *et al.*, 2002), gute Lagerungseigenschaften (Freitas *et al.* 1999) und die Möglichkeit der Dampfsterilisation und der Gefriertrocknung (Schwarz *et al.*, 1994, 1997). Aufgrund der Verwendung von Substanzen, die allgemein als sicher gelten (GRAS = generally accepted as safe) haben SLN zudem ein gutes Toxizitätsprofil (Müller *et al.*, 2000), verglichen mit Polyethylenimin. PEI kann bei intravenöser Applikation zu Lebernekrosen führen (Chollet *et al.*, 2002) und nach intratrachealer Instillation zu einer reduzierten Lungenfunktion führen (Uduehi *et al.*, 2001). Trotzdem bleibt die Gentransfereffizienz von SLN niedriger als die vom PEI 25kDA, wenn man keine endosomolytischen Substanzen wie Chloroquin verwendet (Olbrich *et al.*, 2001, Tabatt *et al.*, 2004).

Rudolph *et al.* hatten durch Vorkomplexierung der pDNA mit einem Oligomer des HIV-1 TAT Peptids die Transfereffizienz von PEI wesentlich steigern können (Rudolph *et al.*, 2003), wobei sich das TAT-Dimer (TAT₂) als das Effektivste gezeigt hatten. In weiteren Studien dieser Arbeitsgruppe wurde die Funktion des TAT-Peptids als Proteintransduktionsdomäne und Kernlokalisierungssequenz zur eine Steigerung der Gentransfereffizienz der SLN/pDNA Komplexe in der Zellkultur genutzt (Rudolph *et al.*, 2004). Dabei war beobachtet worden, dass *in vitro* die ternären SLN/TAT₂/pDNA-Komplexe den Gentransfer um das über 100-fache steigern konnten gegenüber den binären SLN/pDNA-Komplexen

4.2.1 Vernebelung der SLN-Komplexe *in vivo*

Auf der Grundlage der Vorarbeiten von Rudolph *et al.* wurden in dieser Arbeit binäre Komplexe (SLN/pDNA und PEI/pDNA) und ternäre Komplexe (TAT₂/pDNA/SLN) in einem Gesamtvolumen von 8 ml destilliertem Wasser generiert und mittels Düsenvernebler an Mäuse in einer Ganzkörperkammer vernebelt. Vergleichend wurde eine TAT₂ Mutante (TAT₂-M1) verwendet, die für den Kerntransport defizient ist (Truant *et al.*, 1999). Die Größenmessung der Komplexe zeigte stabile aber polydisperse Partikel (Tabelle 5).

Tabelle 5: Partikelgrößen (nm) und Polydispersität der SLN-Komplexe

Genvektor	Größe in nm	PDI
SLN	400 ± 15	0,835 ± 0,096
SLN-TAT ₂	204 ± 4	0,351 ± 0,020
SLN-TAT ₂ -M1	198 ± 3	0,336 ± 0,014
PEI	91 ± 2	0,500 ± 0,031

Die ternären SLN/TAT₂/pDNA Komplexe vermittelten mit $1,8 \pm 1,1$ pg einen 1,6fach höheren Gentransfer gegenüber den binären SLN/pDNA-Komplexen ($1,1 \pm 0,3$ pg). Auch die SLN/TAT₂-M1-Komplexe hatten einen 1,2-mal höheren Gentransfer ($1,4 \pm 0,6$ pg). Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Verglichen mit PEI ($136,1 \pm 21,9$ pg) war die Transfektionseffizienz um das 80- bis 100-fache niedriger (*Abb. 44*).

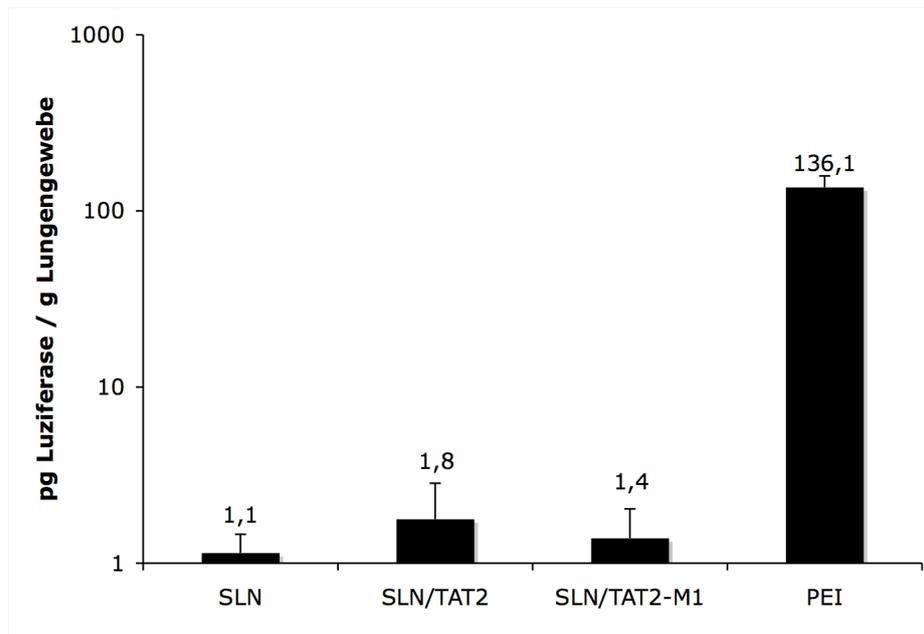


Abb. 44: Vergleich der Luciferaseexpression der SLN-basierten Genvektorkomplexe mit PEI-pDNA. Die SLN-basierten Komplexe zeigen untereinander keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression. Verglichen mit PEI/pDNA war SLN/pDNA um das 100-fache niedriger.

4.2.2 Untersuchung der Stabilität der SLN-Komplexe

Rudolph *et al.* hatten im *in vitro* Versuch durch die zusätzliche Kopplung des TAT₂-Peptids an die SLN/pDNA-Komplexe eine signifikante Steigerung des Gentransfers gefunden (Rudolph *et al.*, 2004). Diese ließ sich bei der topischen Applikation via Vernebelung mit einem Düsenvernebler im *in vivo* Experiment nicht bestätigen. Eine mögliche Erklärung für die schlechte Transfereffizienz, könnte die Beschädigung der Komplexe durch den Vernebelungsvorgang darstellen. Im folgenden Abschnitt wurde deshalb der Einfluss des Vernebelungsvorganges auf die pDNA-Vektor-Komplexe untersucht.

Aerosolgenerierung im PARI-BOY LC plus® Düsenvernebler

Die Stabilität der Komplexe und die Intaktheit der pDNA wurden mittels Agarosegelelektrophorese untersucht. Dazu wurden neben nackter pDNA, binäre und ternäre Genvektorkomplexe generiert und vernebelt. Wenn durch den Vernebelungsprozess die pDNA zerstört wurde, so war auf dem Agarosegel ein Schmier zu sehen. Dieser Schmier wird durch das Vorhandensein kleiner pDNA-Fragmente erklärt, die aufgrund ihrer geringeren

Größe im elektrischen Feld schneller wandern. *Abb. 45* zeigt den Effekt der Vernebelung auf nackte und an SLN komplexierte pDNA beim Düsenvernebler. Die nicht vernebelte pDNA ist intakt, während die vernebelte nackte pDNA einen starken Schmier zeigt, was darauf hindeutet, dass ein großer Teil der pDNA durch den Vernebelungsprozess degradiert wird. Auch die komplexierte pDNA zeigt einen Schmier. Dieser ist aber deutlich geringer ausgeprägt, als bei der nackten pDNA. Der Vektor scheint also einen gewissen schützenden Effekt auf die pDNA zu haben.

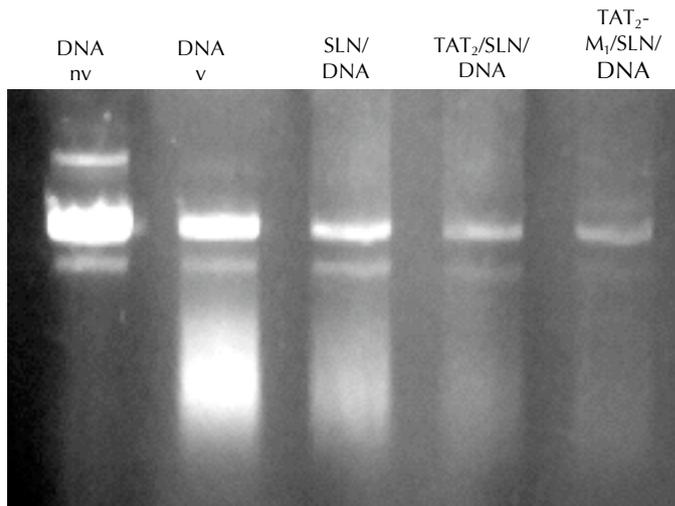


Abb 45: Vernebelung von nackter pDNA und verschiedenen pDNA/SLN-Komplexen im PARI BOY LC plus. Nackte pDNA wird stark de-gradiert. Auch bei den SLN-Komplexen sieht man einen leichten Schmier. Die Komplexierung scheint einen schützenden Effekt auf die pDNA zu haben.

Aerosolgenerierung mittels Ultraschallvernebler

Beim Vernebelungsprozess in einem Düsenvernebler wirken starke Scherkräfte auf die Genvektorkomplexe. Die Komplexierung mit PEI schützt hier die pDNA vor Degradation (Rudolph *et al.*, 2002). Wie oben erläutert sind jedoch die SLN-Partikel unerwarteterweise nicht im gleichen Maße dazu in der Lage. Wir untersuchten daher den Effekt eines schonenderen Vernebelungsverfahrens, nämlich eines Ultraschallverneblers auf die SLN/pDNA-Komplexe (PARI® e-flow). Die Untersuchung des Einflusses eines weiteren Ultraschallverneblers, dem Schill multisonic® LS 290, war nicht möglich, da sich das Auffangen des Aerosols als schwierig erwies.

Die in destilliertem Wasser generierten binären und ternären SLN/pDNA-Komplexe wurden für zehn Minuten mit dem e-flow vernebelt und die pDNA mittels Agarosegelelektrophorese auf ihre Integrität hin untersucht. Hierbei zeigte sich, dass sich die Aerosolgenerierung durch den e-flow wesentlich weniger auf die Intaktheit der pDNA auswirkte als die Aerosolgenerierung mit dem Düsenvernebler. Auf dem Agarosegel (*Abb. 46*) war zwar sowohl bei der Bande der mit dem e-flow vernebelten nackten pDNA ein Schmier zu erkennen, als auch bei den vernebelten pDNA/SLN-Komplexen. Diese waren aber wesentlich

zarter als bei der Vernebelung mit dem Düsenvernebler (*Abb. 45*). Man konnte hier ebenso einen gewissen Schutzeffekt des komplexierenden Vektors gegenüber den nackten Plasmid-DNA erkennen. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Methode der Aerosolgenerierung des Ultraschallverneblers schonender ist als die des Düsenverneblers, und die Komplexierung der pDNA an einen nicht viralen Vektor zusätzlich schützend auf die pDNA wirkt.

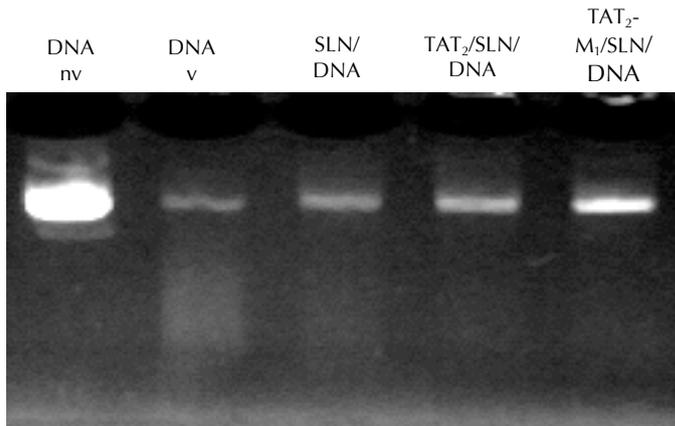


Abb 46: Vernebelung von nackter pDNA und pDNA/SLN-Komplexen mit dem e-flow. Die Vernebelungsmethode ist wesentlich schonender. Selbst nackte pDNA wird kaum im Vernebelungsprozess degradiert.

Untersuchung der Transfektionseffizienz verschiedener Verneblertypen.

Bei der Untersuchung der Gentransfereffizienz verschiedener Verneblertypen hatten wir uns für destilliertes Wasser als Solvens entschieden, weil die Verwendung von Wasser bei unserem Standarddüsenvernebler PARI BOY LC plus reproduzierbare Ergebnisse und eine hohe Transfereffizienz gezeigt hatte (siehe S, 43, 3.2.1.). Es sollte nun im *in vivo* Versuch erforscht werden, ob die verminderte Degradierung der pDNA im e-flow, eine Verbesserung des Gentransfers mit sich bringt.

Es wurden SLN/pDNA-Komplexe generiert und im PARI BOY® LC plus, sowie in den Ultraschallverneblern PARI® e-flow und Schill multisonic® LS 290 vernebelt. Die Mäuse befanden sich in der Ganzkörperkammer. Bei keinem der Ultraschallverneblern konnte eine Genexpression in den Lungen gefunden werden. Lediglich beim Düsenvernebler zeigten die Lungen der Mäuse eine Genexpression von $1,1 \pm 0,3$ pg Luziferase pro g Lungengewebe.

Verschiedene Faktoren können die mangelnde Gentransfereffizienz begründen. Zum einen ist destilliertes Wasser kein optimales Solvens zu Vernebelung im e-flow, da es wohl Aufgrund der erhöhten Oberflächenspannung zu einer Verstopfung der Membranporen kommt, und damit einerseits zu einer Erhöhung der Tropfchengröße und andererseits zu einer ineffektiven Vernebelung. Wir konnten beobachten, dass der Aerosolfluss anfangs sehr kräftig war und dann relativ rasch stagnierte. Damit waren die Mäuse nur über sehr kurze Zeit einem konstanten Aerosolfluss ausgesetzt. Auch der multisonic LS 290 vernebelte die Komplexflüssigkeit extrem zügig. Während der Düsenvernebler über eine halbe Stunde lang konstant vernebelte, brauchte der multisonic LS 290 kaum zehn Minuten um das gleich Volumen zu vernebeln. Die kurze Dauer und der inkonstante Aerosolfluss könnten also die Ursache für die schlechte Gentransfereffizienz der Ultraschallvernebler darstellen.

4.3 P6YE5C- Hüllpolymer

Das P6YE5C-Hüllpolymer hat die Eigenschaft, vorkomplexierte nicht-virale Genvektorkomplexe über elektrostatische Kräfte zu binden und zu umhüllen. Diese Umhüllung soll die Genvektorkomplexe im Körper vor Interaktionen z.B mit Serumproteinen oder dem Komplementsystem im Blut schützen. Finsinger *et al.* hatten gezeigt, dass die Komplexierung von PEI-pDNA-Vektoren (bei N/P = 8) mit dem P6YE5C-Hüllpolymer in der Zellkultur zu einer Steigerung der Transfereffizienz um das zweifache führt (Finsinger *et al.*, 2000). Vor diesem Hintergrund wurde hier untersucht, ob sich die Verwendung des Hüllpolymers ebenso für die Vernebelung an Mäuse eignet. Wir stellten ternäre Komplexe in destilliertem Wasser her, bestehend aus Plasmid-DNA, PEI und P6YE5C und vernebelten sie an die Versuchstiere. Vergleichend wurden binäre PEI-pDNA-Komplexe vernebelt. Abbildung 47 zeigt, dass die ternären Komplexe eine signifikante 2,6-fach niedrigere Genexpression vermittelten als die binären Komplexe (P6YE5C/PEI/pDNA = $41,2 \pm 15,37\text{pg}$; PEI/pDNA = $107,6 \pm 49,29\text{pg}$). Die Komplexe zeigten im Mittel eine Größe von 127,2nm und unterschieden sich somit nicht so stark von den binären Komplexen. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass in der Zellkultur die ternären Komplexe ihre eigentliche effizienzsteigernde Wirkung gezeigt hatten (10-fache Steigerung gegenüber PEI/pDNA), wenn sie in HBS formuliert waren (Finsinger *et al.*, 2000).

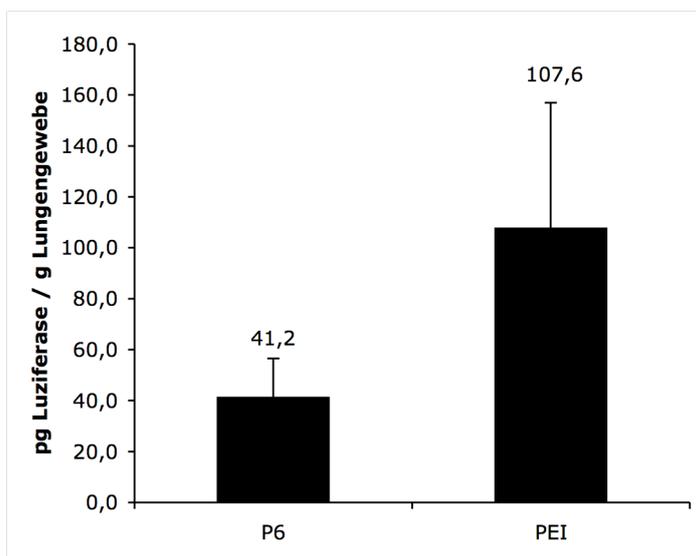


Abb. 47: Luziferaseexpression bei der Verwendung des P6YE5C-Hüllpolymers. Das Hüllpolymer vermittelt eine 2,6-fach niedrigere Genexpression als PEI-pDNA.

5 Diskussion

5.1 Methodologische Optimierung des PEI-basierten Gentransfers via Aerosol

Der erste Teil der Arbeit bestand in der methodologischen Optimierung eines Versuchsaufbaus, der erfolgreich in Mäuselungen einen Gentransfer über die Vernebelung von nicht-viralen Vektor-pDNA-Komplexen erreichte. In einer ersten Versuchsreihe wurde eine Vernebelungsapparatur verwendet, wie sie von Densmore *et al.*, (Densmore *et al.*, 2000) beschrieben wurde. Diese bestand aus einer einfachen Plexiglaskäfig, in dem sich die Mäuse befanden, und das gleichzeitig als Vernebelungskammer fungierte. Die Experimente bestätigten, dass dieser unkomplizierte Versuchsaufbau erfolgreich Gentransfer in die Lungen von Mäusen ermöglicht. Des Weiteren konnten die positive Auswirkung von CO₂ in der Atemluft auf die Gentransfereffizienz bestätigt werden, über die Gautam *et al.*, berichtet hatten (Gautam *et al.*, 2000).

Mäuse sind im Unterschied zu Menschen obligatorische Nasenatmer. Aufgrund der physiologischen Funktion der Nase als Partikelfilter für die Atemluft, ist bei Mäusen die Zuführung des Aerosols in die tieferen Abschnitte der Lunge deutlich erschwert. Um die Aerosoldeposition zu steigern, wurde versucht die Nasenpassage zu umgehen, indem die Mäuse vor der Inhalation anästhesiert und intubiert, und anschließend einem regelmäßigem Aerosolstrom im Reihenvernebler ausgesetzt wurden. Unerwarteterweise konnte bei den intubierten Tieren keine Genexpression gefunden werden. Die nicht intubierten Tiere zeigten hingegen eine Genexpression, die vergleichbar war mit der Ganzkörperkammermethode.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte der Einfluss der anästhesiologischen Medikamente auf wichtige Lungenfunktionsparameter, wie Atemfrequenz und Atemzugvolumen sein (Erhardt *et al.*, 1984, Vinegar *et al.*, 1979). Die Veränderung dieser Parameter während der Anästhesie führen zu einer Verminderung der Aerosoldeposition in den Lungen (Sweeney *et al.*, 1983). Aus dieser Versuchsreihe ging hervor, dass (i) die Intubation der Mäuse zur Umgehung der Nasenpassage keine geeignete Methode zur Verbesserung der Genexpression darstellte und (ii) die Reihenvernebelungsapparatur keine Verbesserung der Gentransfereffizienz bei wachen Mäusen erreichte. Da bei der Reihenvernebelung die Mäuse einem wesentlich höheren Stressfaktor ausgeliefert sind, wurde diese Konstruktion verworfen.

Das Augenmerk wurde deshalb auf eine andere Strategie gerichtet, um die Lungendeposition zu steigern. Diese Strategie berücksichtigte, dass die Depositionsraten in der Lunge stark von den Aerosolpartikeldurchmessern abhängen. Für Mäuse gilt, dass Partikel mit einem MMAD (Median Mass Aerosol Diameter) von $0,27\mu\text{m}$ zu 45% in den Alveolen deponiert werden, während größere Partikel mit einem MMAD von $3,45\mu\text{m}$ lediglich zu 0,9% in den Alveolen deponiert werden da sie schon im Nasopharynx abgefangen und verschluckt werden (Raabe *et al.*, 1988). Da der MMAD des hier verwendeten Aerosols $3,4\mu\text{m}$ betrug, war nur eine geringfügige Aerosoldeposition in den Lungen zu erwarten. Daher wurde nach einer Möglichkeit gesucht, die Partikelgröße der Aerosols zu verringern. Zu diesem Zweck wurde die Vernebelungsapparatur mit einem Verbindungsrohr zwischen Vernebler und Käfig bestückt („Spacer“), das ein größenabhängiges Fraktionieren des Aerosols erlaubt. Durch das Zwischenschalten des Spacers wurde die Partikelgröße des Aerosols im Vernebelungskäfig um das ~ 10 -fache auf $0,27\mu\text{m}$ MMAD reduziert und erreichte eine 3-fache Erhöhung der Genexpression. Die Genexpression konnte wiederum um das 3-fache gesteigert werden, wenn der Boden des Spacers mit Silikagelkörnchen bedeckt war, welches eine aerosolabtrocknende Wirkung hatte. Diese Ergebnisse machen den entscheidenden Einfluss der Aerosolpartikelgröße auf die Aerosoldeposition deutlich.

Etwa 70% der Gesamt-pDNA gehen bei Vernebelungsprozess in dem horizontal liegenden Spacer verloren. Um diesen Verlust zu minimieren, wurde ein Spacer senkrecht auf die Vernebelungskammer positioniert, dessen Innenwand vollständig mit Silicagel bedeckt war. Überraschenderweise war der Gentransfer bei dieser Vernebelungsmethode um das 1,7-fache geringer. Eine mögliche Erklärung hierfür ist dass ein großer Teil des Aerosols von dem Silicagel an der Wand adsorbiert wurde, und gar nicht den Käfig erreichte, bzw. nur als Trockenaerosol in die Vernebelungskammer gelangte. Diese Vermutung wird von der Beobachtung bestätigt, dass in der Vernebelungskammer kaum Aerosol zu beobachten war. Im Vergleich dazu, war beim horizontal liegenden Spacer immer ein sehr feiner Nebel in der Vernebelungskammer beobachtet worden.

Widdicombe *et al.* (Widdicombe *et al.* 1996) hatten beschrieben, dass destilliertes Wasser einen positiven Einfluss auf die Gentransfereffizienz hat, indem es die apikale Membran der Bronchialepithelzellen vorübergehend durchlässig macht. Sollte das Aerosol durch das Silicagel tatsächlich vollständig abgetrocknet sein worden, könnte die fehlende positive

Wirkung des destillierten Wassers, welches hier als Solvens fungierte, eine weitere Erklärung für die niedrige Transfereffizienz darstellen.

Da es sich als technisch unmöglich erwies den Nebel aus dem vertikal stehenden Spacer zu sammeln, war eine genauere Analyse des Aerosols nicht möglich.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich die Ganzkörperkammer mit einem vorgeschalteten, silicagelgefüllten Spacer als effektivste Vernebelungsapparatur gezeigt hatte.

5.2 Einfluss der Vektor-Komplexlösung

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit dem möglichen Einfluss der Genvektorkomplexlösung selbst auf den Gentransfer. Es konnte gezeigt werden, dass die in destilliertem Wasser gelösten PEI-pDNA-Komplexe bei Vernebelung einen bis zu zwei Größenordnungen höheren Gentransfer zeigten als in 5%-iger Glukoselösung oder in HBS gelöste Komplexe. Obwohl das Solvens (vor allem die Ionenstärke des Solvens), wichtige biophysikalische Parameter des Komplexes beeinflusst, scheinen diese Wirkungen nicht von entscheidender Bedeutung zu sein, da sich beispielsweise in Wasser und in 5%-iger Glukoselösung gelöste Komplexe weder in ihrer Größe und ihrer Form, noch ihrer Oberflächenladung unterscheiden. Der solvensabhängige Einfluss scheint eher durch einen physiologischen Effekt auf das Atemwegsepithel der Mäuse zu beruhen.

Es war berichtet worden, dass vernebeltes destilliertes Wasser zu einem hypoosmotischen Schock der Atemwegsepithelzellen führen kann, wodurch die apikale Zellmembran vorübergehend für Makromoleküle und Proteine durchlässig wird (Widdicombe *et al.*, 1996). Dieser Effekt kann durch eine Vorbehandlung mit Indomethazin verhindert werden (Mochizuki *et al.*, 1999). Tatsächlich zeigten hier die mit Indomethazin vorbehandelten Mäuse eine signifikante Verringerung der Gentransfereffizienz. Eine Vorbehandlung mit Indomethazin hat keinen Einfluss auf die phagozytäre Aktivität der Alveolarmakrophagen (Canning *et al.*, 1991). Daher ist eine Verminderung der Genexpression durch eine erhöhte Clearance der Genvektorkomplexe durch Makrophagen unwahrscheinlich.

Neben der oben genannten Permeabilisierung der apikalen Membran, war bei der Vernebelung von destilliertem Wasser ein Anschwellen der Atemwegsepithelzellen beobachtet worden (Mochizuki *et al.*, 2002), der prinzipiell einen parazellulären Transport der Genvektoren an die basolaterale Membran und eine dortige Transfektion ermöglicht. Eine Vorbehandlung der Epithelzellen mit Substanzen, die die Tight Junctions permeabel machen

(EGTA oder Polidokanol) war bereits erfolgreich bei viralen Vektoren angewendet worden (Parson *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 2000, Chu *et al.*, 2001). Für die hier verwendeten nicht-viralen PEI-pDNA-Komplexe brachte die Vorbehandlung mit EGTA und Polydokanol weder für in 5%-ige Glukoselösung noch in Wasser gelöste Komplexe eine Steigerung der Genexpression. Dies war ein Hinweis, dass der basolaterale Transport nicht den Haupttransportweg in die Zelle darstellt. In Hinblick auf künftige Anwendungen am Menschen sollte erwähnt werden, dass die Inhalation von destilliertem Wasser nicht die Lungenfunktionsparameter von gesunden, nicht-asthmatischen Patienten oder Patienten mit verschiedenen Erkrankungen wie Zystischer Fibrose beeinflusst (Castello *et al.*, 1980), und sich deshalb für die Therapie am Menschen eignen sollte.

Der *in vivo* Gentransfer in die Lungen, der von PEI durch intratracheale Instillation vermittelt wird, ist stark vom Molekulargewicht und –struktur wie dem Verzweigungsgrad des PEI abhängig (Koshkina *et al.*, 2003, Rudolph *et al.*, 2005). Lineares PEI 22kDa (lin-PEI) war bei der Instillation effektiver als verzweigtes PEI 25kDa (br-PEI). Der Gegensatz war der Fall, wenn die PEI-pDNA-Komplexe vernebelt wurden. Überraschenderweise war hier das br-PEI 25kDa um ein 9-faches besser als lin-PEI 22 kDa, wobei ein Größenunterschied der Komplexe nicht den Unterschied in der Transfereffizienz erklären kann, da beide PEI-pDNA-Komplexe gleichwertige Komplexgrößen zeigten. Im Gegensatz dazu bildeten sich bei dem größeren Vertreter des linearen PEI (lin-PEI 25 kDa), während der Komplexierung mit der Plasmid-DNA, sichtbar aggregierende Komplexe, die niedrigen Gentransfer erklären könnten. Zusammenfassend kann man sagen, dass br-PEI 25kDa für die Aerosolapplikation der effektivste Vertreter unter den PEI-Vektoren zu sein scheint.

Die Genvektorkonzentration zeigte ebenso einen deutlichen Effekt auf die Gentransfereffizienz. Während die Verringerung der pDNA-Konzentration auf die Hälfte ihrer Ursprungskonzentration zu einer 3,6-fachen Verschlechterung des Gentransfers führte, hatte die Halbierung des vernebelten Volumens bei ursprünglicher Konzentration eine 5,6-fache Verschlechterung zu verzeichnen. Dies könnte zum einen durch die Verringerung der Komplexgröße erklärt werden, denn eine Verringerung der Konzentration war mit einer Abnahme der Komplexgröße verbunden. Zum anderen brachte die Halbierung der pDNA-Menge bei ursprünglicher Konzentration gleichzeitig eine Verminderung der Vernebelungsdauer und damit der Inhalationszeit mit sich. Es empfiehlt sich also bei der

Vernebelung eher niedrige Genvektorkonzentrationen bei verlängerter Vernebelungsdauer einzusetzen als hohe Genvektorkonzentrationen bei kurzer Vernebelungsdauer.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde versucht, sich den positiven Effekt von Zn^{2+} -ionen auf PEI-vermittelten Gentransfer zunutze zu machen, welcher von Pichon *et al.*, in der Zellkultur bei Hep G2 beschrieben worden war (Pichon *et al.*, 2002). In der *in vivo* Applikation konnte im Lungengewebe der Mäuse, jedoch keine Steigerung der Genexpression festgestellt werden. Dies könnte auf eine zellspezifische Wirkung der Zn^{2+} -ionen zurück zu führen sein, die sich nicht auf den Gentransfer im Atemwegsepithel der Mäuse auswirkt.

5.3 Kinetik der Genexpression

Das Maximum der Genexpression konnte 72 Stunden nach der Vernebelung detektiert werden. Interessanterweise konnte man bei der Untersuchung der Clearance der Plasmid-DNA aus den Lungen gleichzeitig beobachten, dass zwischen dem ersten und dem vierten Tag nach der Vernebelung die pDNA-Menge um das 16-fache abgenommen hatte. Die Luziferaseexpression hatte sich in dieser Zeit um das 2,7-fache gesteigert. Dies war auf dem ersten Blick eine widersprüchliche Beobachtung, da sie nicht die Abhängigkeit der Transfereffizienz von der Genvektordosis bestätigen. Möglicherweise ist diese Beobachtung aber ein Indiz für intrazellulär ablaufende Vorgänge, bei der Verarbeitung der PEI-pDNA-Komplexe. Sehr wahrscheinlich wird der Großteil der Vernebelten Komplexe innerhalb der ersten Stunden nach der Vernebelung von Makrophagen und durch mukoziliäre Transportmechanismen aus der Lunge entfernt. So kann nur der Anteil an Genvektorkomplexen der primär aufgenommen wird, der mukoziliären Clearance entgehen und die Zellen transfizieren. Der folgende graduelle Anstieg der Genexpression, könnte kontinuierliche intrazelluläre Vorgänge widerspiegeln.

Im Unterschied dazu war bei der intratrachealen Instillation von PEI-pDNA Komplexen das Maximum nach 24 Stunden festgestellt worden (Rudolph *et al.*, 2000). Dies könnte das Resultat der Abtrocknung des Aerosols durch das Silicagel sein. Der MMAD der getrockneten Aerosolpartikel betrug etwa 0,3-0,5 μ m, während der Durchmesser der PEI-pDNA-Komplexe im durchschnitt 0,1 μ m betrug, und damit nur etwa 3-5mal kleiner war als die Aerosoltropfen. Das heißt, dass Größe der Aerosolpartikel sich der Größe der Genvektorkomplexe nähert. Möglicherweise müssen solche quasi feste Partikel, im Gegensatz

zu gelösten PEI-pDNA-Komplexen, als erstes Lösungsvorgängen ausgesetzt werden, bevor sie die Zellen erfolgreich transfizieren können. Das spätere Erreichen eines Maximums könnte eine Auswirkung dieses Lösungsvorgangs darstellen. Eine Wiederholung der PEI-pDNA Applikation konnte, trotz der raschen Lungen Clearance, die Genexpression über neun Tage aufrechterhalten, wobei die dritte Applikation nicht mehr den hohen Wert der ersten beiden Applikationen erreichen konnte. Dies widersprach den Beobachtungen von Davies *et al.*, (Davies *et al.*, 2005), der berichtete, dass die Applikation von PEI-pDNA-Komplexen oder von PEI ausschließlich, in der Lunge zu einer für den Gentransfer refraktären Phase führt.

Diese Differenzen könnten möglicherweise durch Unterschiede in der Verneblungsapparatur, z.B. dem Einsatz von Silicagel, oder durch das Dialysieren des PEI vor seiner Verwendung begründet sein. Weitere Untersuchungen werden jedoch nötig sein, um diese Differenzen genauer aufzuklären.

5.4 Verteilung der pDNA in den Lungen der Mäuse

In dieser Arbeit konnte durch die Vernebelung radioaktiv markierter pDNA gezeigt werden, dass bereits geringste Mengen vernebelter PEI-pDNA-Komplexe (350ng), einen Gentransfer vermitteln, der eine Größenordnung höher liegt, als die intratracheal verabreichten Komplexe in einer 140-fach höheren Menge (50µg). Damit erwies sich die Vernebelungsmethode im Hinblick auf die Dosis-Wirkungsbeziehung drei Größenordnungen effizienter als die Instillationsmethode. Diese Genexpression wurde innerhalb der Lungen hauptsächlich im Bronchialepithel der großen Luftwege und in einigen Alveolarmakrophagen. Man kann annehmen an, dass durch die Vernebelung zuerst eine gleichmäßige Verteilung der Genvektorkomplexe in Bronchien und Alveolen vorherrscht. Die Alveolamakrophagen beseitigen jedoch rasch die Mehrzahl der Genvektorkomplexe in den Alveolen, wodurch dort ein Gentransfer verhindert wird. Da sich in den Bronchien zahlenmäßig weniger Makrophagen befinden, könnte die verminderte phagozytäre Clearance die hier vorkommende höhere Transfektionsrate erklären.

Die Vernebelung radioaktiv markierter pDNA zeigte weiterhin, dass die Lunge die höchste Depositionsrates im Verhältnis zum Organgewicht hatte. Des Weiteren fanden sich große pDNA-Mengen vor allem auf dem Fell und im Magen-Darm-Trakt der Tiere, aber auch in Blut, Herz, Leber, Milz und Niere. Das völlige Fehlen von Luziferaseexpression außerhalb

der Lunge, kann dadurch erklärt werden, dass die aggressive Magensäure die verschluckten Genvektorkomplexe zerstört, sodass zwar radioaktiv markierte pDNA-Metabolite in den Kreislauf und die Organe gelangen, dort aber zu keinem Gentransfer mehr führen. Diese Vermutung wird von den Untersuchungen von Koshkina *et al.*, unterstützt, der nach einer Vernebelungsbehandlung mit PEI-pDNA-Komplexen mittels TaqMan-PCR keine intakte Plasmid-DNA in Herz Blut, Leber, Milz und Niere detektieren konnte (Koshkina *et al.*, 2003).

5.5 Abhängigkeit der Gentransfereffizienz vom Mausstamm

Liu *et al.*, verabreichten intravenös Lipid-pDNA-Komplexe an Mäuse mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund. Dabei fanden sie dosisunabhängige Unterschiede der Genexpression in den Lungen der Mäuse (Liu *et al.*, 2002). In dieser Arbeit konnten ebenso dosisunabhängige aber mausstammabhängige Unterschiede der Genexpression gefunden werden, wenn die Genvektorkomplexe via Aerosol appliziert wurden. Die Abweichungen der Transgenexpression zwischen den Mausstämmen scheinen also unabhängig vom Applikationsweg der nicht-viralen Genvektoren zu sein. Es ist eher wahrscheinlich, dass mausstammsspezifische Immunreaktionen auf die PEI-pDNA-Komplexe zu diesen Differenzen der Genexpression führen, da Unterschiede im genetischen Hintergrund der Mäuse zu Abweichungen der Entzündungsreaktionen und der Alveolarmakrophagen-dysfunktion führen kann (Ohjtsuka *et al.*, 2000, Takeda *et al.*, 2001, Whitehead *et al.*, 2003). Ein weiterer genetischer Unterschied muss jedoch bestehen, da unsere Ergebnisse zeigten, dass BALB/C Mäuse, welche zu den sensitivsten Maustämmen gehören, den höchsten dosisunabhängigen Gentransfer zeigten. Dies könnten zusätzliche genetische Variationen sein, die die zahlreichen Schritte bis zu einem erfolgreichen Gentransfer beeinflussen könnten. Dazu gehören die Aufnahme der Genvektoren, der intrazelluläre Transport, die endosomale Freisetzung, die Translokation der pDNA in den Zellkern und schließlich die Transkription und Translation der Plasmid-DNA. Um diese Frage genauer zu beantworten, sind allerdings weitere Studien erforderlich. Hinsichtlich der potentiellen Anwendung beim Menschen könnten diese Beobachtungen allerdings zu der Vermutung führen, dass interindividuelle genetische Polymorphismen zu unterschiedlich erfolgreichen Transgenexpressionen führen könnten.

5.6 Verwendung weiterer nicht-viraler Genvektoren für die Vernebelung

Im letzten Teil der Arbeit wurden verschiedene andere nicht-virale Genvektoren in dem nun etablierten Versuchssetting untersucht. Dazu gehörten die Solid Lipid Nanoparticles, die TAT-Oligomere, und das P6YE5C-Hüllpolymer. Keines dieser Vektoren konnte unter den für PEI/pDNA optimierten Versuchsbedingungen ein ähnlich hohes Gentransferniveau erreichen. Eine mögliche Erklärung könnte die Verwendung von destilliertem Wasser als Standardsolvens in unseren Experimenten sein. Die Verwendung von destilliertem Wasser hatte sich wegen seiner wahrscheinlich physiologischen Wirkung auf das Bronchialepithel etabliert. Im Gegensatz dazu hatten sich Genexpressionssteigerungen in der Zellkultur sowohl für die TAT-Oligomere (siehe 4.1.1) und das P6YE5C-Hüllpolymer (Finsinger *et al.*, 2000) als auch für die SLN-Vektoren (Rudolph *et al.*, 2004) eher in den ionischen Solventien gefunden (HBS und 10 mM HEPES). Für die Vernebelung der SLN-Partikel könnte des Weiteren die Zerstörung der Komplexe durch den Vernebelungsvorgang beim Düsenvernebler ein Grund für die verminderte Genexpression sein. Die SLN-Partikel, welche die pDNA eher an ihre Oberfläche adsorbieren, scheinen also die pDNA nicht so gut vor Degradation zu schützen wie PEI, welches die pDNA fest kondensiert. Durch die Verwendung milderer Vernebelungsmethoden, wie dem Ultraschallvernebler PARI e-Flow, konnte man den Degradationsprozess vermindern. Allerdings konnte eine suffiziente Aerosolgenerierung in destilliertem Wasser nur bei pDNA-Konzentrationen erreicht werden, die für eine erfolgreiche Transfektion zu gering waren. Drittens hat PEI zudem den Vorteil, im Endosom als „Protonenschwamm“ zu fungieren, wodurch die Endosomen, durch osmotischen Anschwellen und platzen, die aufgenommenen Genvektorkomplexe in das Zytoplasma entlassen können. SLN-Partikel, die ebenso endosomal aufgenommen werden (Rudolph *et al.*, 2004), können sich nicht diesen Mechanismus zu nutze machen.

Das TAT₂-Oligomer, das in der Zellkultur in Wasser ebenso hohe Genexpression nach Vernebelung erreichen konnte wie PEI, konnte in der *in vivo* benötigten Konzentration nicht verwendet werden, da die Komplexe sofort aggregierten. Auch die mehrmalige Vernebelung bei fünffacher Verdünnung, bei der die Komplexe nicht mehr aggregierten, zeigte keinen Gentransfer. Dies könnte durch die zügige Clearance der Alveolarmakrophagen im Zuge der langen Vernebelungsdauer zurückzuführen sein.

Die erniedrigte Gentransfereffizienz von P6YE5C im *in vivo* Experiment im Vergleich zur *in vitro* Applikation, könnte durch zellspezifische Mechanismen begründet sein, da die

Steigerung in vitro bei menschlichen Lymphoblasten beobachtet (K-562 Zellen) worden war, nicht jedoch an Bronchialepithelzellen.

5.7 Zusammenfassende Betrachtung

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der genauen Untersuchung von Faktoren, die den Transfer von nicht-viralen Genvektoren via Aerosol in die Lungen von Mäusen beeinflussen können. Zusammenfassend kann Folgendes festgestellt werden: (i) Die Osmolarität des Solvens und die Stabilität der Genvektorkomplexe haben den größten Einfluss auf die Gentransfereffizienz. Der Einsatz von niedrig osmolaren Solventien hatte möglicherweise einen physiologischen Effekt auf die Atemwegszellen, der zu einem starken Anstieg der Genvektoraufnahme in die Zellen führte. (ii) Die Degradation der pDNA durch den Vernebelungsprozess führte ebenso zu einem starken Abfall der Genexpression, da nur intakte Plasmid-DNA zu einem erfolgreichen Gentransfer führen kann. (iii) die biophysikalischen Parameter der Komplexe, wie Größe und Oberflächenladung, ebenso wie die Struktur des Genträgers (lineares versus verzweigtes PEI) und die Aerosoltröpfchengröße nehmen einen weniger starken Einfluss. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass unter optimierten Bedingungen die Aerosolapplikation von PEI-basierten Genvektoren weiterhin eine viel versprechende Möglichkeit für die Behandlung genetisch bedingter Lungenerkrankungen darstellen könnte.

6. Literaturverzeichnis

1. **Adrian M, Dubochet J, Lepault J and McDowell AW.** Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature* 308: 32-3622, 1984.
2. **Behr J.** The proton sponge: A trick to enter cells the viruses did not exploit. *Chimia* **51**, 34-36, 1997.
3. **Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP.** A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:7297-301, 1995.
4. **Bragonzi, A., Dina, G., Villa, A., Calori, G., Biffi, A., Bordignon, C., Assael, B. M., and Conese, M.** Biodistribution and transgene expression with nonviral cationic vector/DNA complexes in the lungs. *Gene Ther.* 7:1753-1760, 2000.
5. **Brain JD, Knudson DE, Sorokin SP, Davis MA.** Pulmonary distribution of particles given by intratracheal instillation or by aerosol inhalation. *Environ Res.* 11:13-33, 1976.
6. **Branden, L.J., Mohamed, A.J. & Smith, C.I.** A peptide nucleic acid-nuclear localization signal fusion that mediates nuclear transport of DNA. *Nat Biotechnol*, **17**, 784-7, 1999.
7. **Butt AG, Clapp WL, and Frizzell RA.** Potassium conductances in tracheal epithelium activated by secretion and cell swelling. *Am J Physiol Cell Physiol* 258: C630–C638, 1990.
8. **Canning BJ, Hmieleski RR, Spannhake EW, Jakab GJ.** Ozone reduces murine alveolar and peritoneal macrophage phagocytosis: the role of prostanoids. *Am J Physiol.* 261:L277-82, 1991.
9. **Castello D, De Candussio G, Bertocchi F. and Sacchetti L.** A specifically induced bronchoconstriction by distilled water in children and adults. *Bronchopneumologie* 30: 424-431, 1980.
10. **Chu, Q., et al.** EGTA enhancement of adenovirus-mediated gene transfer to mouse tracheal epithelium in vivo. *Hum. Gene Ther.* 12: 455 – 467, 2001.
11. **Colin M, Moritz S, Schneider H, Capeau J, Coutelle C, Brahimi-Horn MC.** Haemoglobin interferes with the ex vivo luciferase luminescence assay: consequence for detection of luciferase reporter gene expression in vivo. *Gene Ther.* 7:1333-6, 2000.
12. **Coll JL, Chollet P, Brambilla E, Desplanques D, Behr JP, Favrot M.** In vivo delivery to tumors of DNA complexed with linear polyethylenimine. *Hum Gene Ther.* 10:1659-66, 1999.

13. **Davies LA, Hyde SC and Gill DR.** Repeat Administration of Polyethylenimine (PEI) Aerosols of Plasmid-DNA to the Murine Lung is Associated with Loss of Gene Transfer Efficiency. *Mol Ther* 11: 137, 2005.
14. **Densmore CL, Kleinerman ES, Gautam A, Jia SF, Xu B, Worth LL, Waldrep JC, Fung YK, T'Ang A and Knight V.** Growth suppression of established human osteosarcoma lung metastases in mice by aerosol gene therapy with PEI-p53 complexes. *Cancer Gene Ther* 8: 619-627, 2001
15. **Dingler A and S. Gohla.** Production of solid lipid nanoparticles (SLN): scaling up feasibilities. *J Microencapsul* 19: 11-6. (2002).
Erbacher, P., et al. Transfection and physical properties of various saccharide, poly(ethylene glycol), and antibody-derivatized polyethylenimines (PEI). *J. Gene Med.* 1: 210 – 222, 1999.
16. **Erhardt, W., Hebestedt, A., Aschenbrenner, G., Pichotka, B., and Blumel, G.** A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone, ketamine-xylazine, carfentanyl-etomidate). *Res Exp Med (Berl)* 184:159-169, 1984.
17. **Ernst, N., et al.** Interaction of liposomal and polycationic transfection complexes with pulmonary surfactant. *J Gene Med* 1: 331-340, 1999.
18. **Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M.** Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:7413-7, 1987.
19. **Finsinger D, Remy JS, Erbacher P, Koch C, Plank C.** Protective copolymers for nonviral gene vectors: synthesis, vector characterization and application in gene delivery. *Gene Ther.* 7:1183-92, 2000.
20. **Frankel, A.D. & Pabo, C.O.** Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 55, 1189-93, 1988.
21. **Freitas and Müller RH.** Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase. *Eur J Pharm Biopharm* 47: 125-32. (1999).
22. **Gautam A, Densmore CL and Waldrep JC.** Inhibition of experimental lung metastasis by aerosol delivery of PEI-p53 complexes. *Mol Ther* 2: 318-323, 2000b.
23. **Gautam A, Densmore CL, Melton S, Golunski E and Waldrep JC.** Aerosol delivery of PEI-p53 complexes inhibits B16-F10 lung metastases through regulation of angiogenesis. *Cancer Gene Ther* 9: 28-36, 2002.

24. **Goula D, Benoist C, Mantero S, Merlo G, Levi G, Demeneix BA.** Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung. *Gene Ther.* 5:1291-5, 1998.
25. **Goula, D., Remy, J.S., Erbacher, P., Wasowicz, M., Levi, G., Abdallah, B. & Demeneix, B.A.** Size, diffusibility and transfection performance of linear PEI/DNA complexes in the mouse central nervous system. *Gene Ther.* 5: 712-7, 1998b.
26. **Hengge UR, Walker PS, Vogel JC.** Expression of naked DNA in human, pig, and mouse skin. *J Clin Invest.* 97:2911-6, 1996.
27. **Haensler J, Szoka FC Jr.** Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconj Chem.* 4:372-9, 1993.
28. **Jia SF, Worth LL, Densmore CL, Xu B, Zhou Z and Kleinerman ES.** Eradication of osteosarcoma lung metastases following intranasal interleukin-12 gene therapy using a nonviral polyethylenimine vector. *Cancer Gene Ther* 9: 260-266, 2002.
29. **Jiao S, Williams P, Berg RK, Hodgeman BA, Liu L, Repetto G, Wolff JA.** Direct gene transfer into nonhuman primate myofibers in vivo. *Hum Gene Ther.* 3:21-33, 1992.
30. **Kim HW, Park IK, Cho CS, Lee KH, Beck GR, Jr., Colburn NH and Cho MH.** Aerosol delivery of glucosylated polyethylenimine/phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 complex suppresses Akt downstream pathways in the lung of K-ras null mice. *Cancer Res* 64: 7971-7976, 2004.
31. **Kim EM, Jeong HJ, Park IK, Cho CS, Moon HB, Yu DY, Bom HS, Sohn MH, Oh IJ.** Asialoglycoprotein receptor targeted gene delivery using galactosylated polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol): in vitro and in vivo studies. *J Control Release.* 108:557-67. Epub 2005.
32. **Koshkina, N. V., Agoulnik, I. Y., Melton, S. L., Densmore, C. L. and Knight, V.** Biodistribution and pharmacokinetics of aerosol and intravenously administered DNA-polyethyleneimine complexes: optimization of pulmonary delivery and retention. *Mol Ther* 8: 249-254, 2003.
33. **Li K, Welikson RE, Vikstrom KL, Leinwand LA.** Direct gene transfer into the mouse heart. *J Mol Cell Cardiol.* 29:1499-.
34. **Mehnert W and Mader K.** Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev* 47: 165-96. (2001).
35. **Mochizuki, H., Ohki, Y., Arakawa, H., Tokuyama, K., and Morikawa, A.** Effect of ultrasonically nebulized distilled water on airway epithelial cell swelling in guinea pigs. *J. Appl. Physiol.* 86: 1505 – 1512, 1999

36. **Mochizuki, H., et al.** (2002). Effect of inhaled indomethacin on distilled water-induced airway epithelial cell swelling. *J Appl Physiol* 92: 155-161, 2002.
37. **Müller RH, Dingler A, Schneppe T and Gohla S.** Large scale production of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanodispersions (DissoCubes). In D. Wise (ed), *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology* (D. Wise, ed), Marcel Dekker Inc, New York, 2000.
38. **Müller RH, Mader K and Gohla S.** Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm* 50: 161-77, 2000.
39. **Ogris M, Steinlein P, Kursa M, Mechtler K, Kircheis R, Wagner E.** The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther.* 5:1425-33, 1998.
40. **Ohtsuka Y, Clarke RW, Mitzner W, Brunson K, Jakab GJ and Kleeberger SR.** Interstrain variation in murine susceptibility to inhaled acid-coated particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L469-476., 2000.
41. **Olbrich C, Bakowsky U, Lehr CM, Müller RH and Kneuer C.** Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect Plasmid-DNA. *J Control Release* 77: 345-55. (2001).
42. **Oldham MJ and Phalen RF.** Dosimetry implications of upper tracheobronchial airway anatomy in two mouse varieties. *Anat Rec* 268: 59-65, 2002.
43. **Oupicky D, Ogris M, Howard KA, Dash PR, Ulbrich K, Seymour LW.** Importance of lateral and steric stabilization of polyelectrolyte gene delivery vectors for extended systemic circulation. *Mol Ther.* 5:463-72, 2002.
44. **Parsons, D. W., Grubb, B. R., Johnson, L. G., and Boucher, R. C.** Enhanced in vivo airway gene transfer via transient modification of host barrier properties with a surface-active agent. *Hum. Gene Ther.* 9: 2661 – 2672, 1998.
45. **Pichon, C., Guerin, B., Refregiers, M., Goncalves, C., Vigny, P., and Midoux, P.** Zinc improves gene transfer mediated by DNA/cationic polymer complexes. *J Gene Med* 4:548-559, 2002.
46. **Pollard, H., Remy, J.S., Loussouarn, G., Demolombe, S., Behr, J.P. & Escande, D.** Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J Biol Chem* 273, 7507-11, 1998.
47. **Raabe, O. G., Al-Bayati, M. A., Teague, S. V., and Rasolt, A.** Regional deposition of inhaled monodisperse coarse and fine aerosol particles in small laboratory animals. *Ann. occup. Hyg.* 32:53-63, 1988

48. **Reinhard C, Eder G, Fuchs H, Ziesenis A, Heyder J and Schulz H.** Inbred strain variation in lung function. *Mamm Genome* 13: 429-437, 2002.
49. **Rosenecker J, Harms KH, Bertele RM, Pohl-Koppe A, v Mutius E, Adam D, Nicolai T.** Adenovirus infection in cystic fibrosis patients: implications for the use of adenoviral vectors for gene transfer. *Infection.* 24:5-8, 1996.
50. **Rudolph C, Lausier J, Naundorf S, Muller RH and Rosenecker J.** In vivo gene delivery to the lung using polyethylenimine and fractured polyamidoamine dendrimers. *J Gene Med* 2: 269-78, 2000.
51. **Rudolph C, Muller RH, Rosenecker J.** Jet nebulization of PEI/DNA polyplexes: physical stability and in vitro gene delivery efficiency. *J Gene Med.* 2002 Jan-Feb;4(1):66-74, 2002
52. **Rudolph C., Plank C., Schillinger U., Müller R.H., Rosenecker J.** Oligomers of the arginine-rich motif of the HIV-1 TAT protein are capable of transferring Plasmid-DNA into cells. *J Biol Chem* 8: 8, 2003.
53. **Rudolph C, Schillinger U, Ortiz A, Tabatt K, Plank C, Muller RH, Rosenecker J.** Application of novel solid lipid nanoparticle (SLN)-gene vector formulations based on a dimeric HIV-1 TAT-peptide in vitro and in vivo. *Pharm Res.* 21:1662-9, 2004
54. **Sawa T, Miyazaki H, Pittet JF, Widdicombe JH, Gropper MA, Hashimoto S, Conrad DJ, Folkesson HG, Debs R, Forsayeth JR, Fox B, Wiener-Kronish JP.** Intraluminal water increases expression of Plasmid-DNA in rat lung. *Hum Gene Ther.* 7:933-41, 1996.
55. **Schulz H, Johner C, Eder G, Ziesenis A, Reitmeier P, Heyder J and Balling R.** Respiratory mechanics in mice: strain and sex specific differences. *Acta Physiol Scand* 174: 367-375, 2002.
56. **Schwarz W, Mehnert J, Lucks S and Müller RH.** Solid Lipid Nanoparticles (Sln) For Controlled Drug Delivery .1. Production, Characterization and Sterilization. *Journal of Controlled Release* 30: 83-96 (1994).
57. **Schwarz W and Mehnert J.** Freeze-Drying of Drug-Free and Drug-Loaded Solid Lipid Nanoparticles (Sln). *International Journal of Pharmaceutics* 157: 171-179 (1997).
58. **Stammberger,U., Uduehi, A. N., Kubisa, B., Roth, T., and Schmid, R. A.** Non-viral gene delivery to atelectatic and ventilated lungs. *Annals of Thoracic Surgery* 73:432-43, 2002.

59. **Subramanian, A., Ranganathan, P. & Diamond, S.L.** Nuclear targeting peptide scaffolds for lipofection of nondividing mammalian cells. *Nat Biotechnol*, **17**, 873-7, 1999., *Journal of Biological Chemistry* 278 (13), 11411-11418, 2003.
60. **Sweeney, T. D., Brain, J. D., and LeMott, S.** Anesthesia alters the pattern of aerosol retention in hamsters. *J Appl Physiol* 54:37-44, 1983
61. **Tabatt K, Sameti M, Olbrich C, Müller RH and Lehr CM.** Effect of cationic lipid and matrix lipid composition on solid lipid nanoparticle-mediated gene transfer. *Eur J Pharm Biopharm* **57**: 155-62 (2004).
62. **Takeda K, Haczku A, Lee JJ, Irvin CG and Gelfand EW.** Strain dependence of airway hyperresponsiveness reflects differences in eosinophil localization in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L394-402, 2001.
63. **Terebesi J, Kwok KY, Rice KG.** Iodinated Plasmid-DNA as a tool for studying gene delivery. *Anal Biochem.* 263:120-3, 1998.
64. **Tischendorf, G. W., Zeichhardt, H. and Stöffler, G.** Determination of the location of proteins L14, L17, L18, L19, L22, L23 on the surface of the 50S ribosomal subunit of *Escherichia coli* by immune electron microscopy. *Mol Gen Genet* 134: 187-208, 1974.
65. **Truant R, and Cullen BR.** The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Mol Cell Biol* **19**: 1210-7, 1999.
66. **Uduehi AN, Stammler U, Kubisa B, Gugger M, Buehler TA, and Schmid RA.** Effects of linear polyethylenimine and polyethylenimine /pDNA on lung function after airway instillation to rat lungs. *Mol Ther* **4**: 52-7, 2001.
67. **Ungaro F, De Rosa G, Miro A, Quaglia F.** Spectrophotometric determination of polyethylenimine in the presence of an oligonucleotide for the characterization of controlled release formulations. *J Pharm Biomed Anal.* 31:143-9, 2003
68. **Valentine, R. C., Shapiro, B. M. and Stadtman, E. R.** Regulation of glutamine synthetase. XII. Electron microscopy of the enzyme from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **7**: 2143-2152, 1968.
69. **Vinegar, A., Sinnott, E. E., and Leith, D. E.** Dynamic mechanisms determine functional residual capacity in mice, *Mus musculus*. *J Appl Physiol* 46:867-871, 1979.
70. **Wang, G., et al.** Increasing epithelial junction permeability enhances gene transfer to airway epithelia in vivo. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **22**: 129 – 138, 2000.
71. **Weiss DJ.** Delivery of gene transfer vectors to lung: obstacles and the role of adjunct techniques for airway administration. *Mol Ther.* **6**:148-52, 2002.

72. **Whitehead GS, Walker JK, Berman KG, Foster WM and Schwartz DA.** Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: L32-42, 2003.
73. **Widdicombe, J. H., Azizi, F., Kang, T. and Pittet, J. F.** Transient permeabilization of airway epithelium by mucosal water. *J Appl Physiol* 81: 491-499, 1996.
74. **Wightman L, Kircheis R, Rossler V, Carotta S, Ruzicka R, Kursa M, Wagner E.** Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med.* 3:362-72, 2001.
75. **Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL.** Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science.* 247:1465-8, 1990.
76. **Zauner W, Brunner S, Buschle M, Ogris M, Wagner E.** Differential behaviour of lipid based and polycation based gene transfer systems in transfecting primary human fibroblasts: a potential role of polylysine in nuclear transport *Biochim Biophys Acta.* 1428:57-67, 1999.
77. **Zou SM, Erbacher P, Remy JS, Behr JP.** Systemic linear polyethylenimine (L-PEI)-mediated gene delivery in the mouse. *J Gene Med.* 2:128-34, 2000.

7. Abkürzungen

Abb.	= Abbildung
br-PEI	= Verzweigtes PEI
d	= Tag
FITC-PEI	= Fluoreszenzmarkiertes PEI
g	= Gramm
h	= Stunde
HBS	= Hepesgepufferte Kochsalzlösung
kDa	= Kilo Dalton
l	= Liter
lin-PEI	= Lineares PEI
M	= Molar
m	= Milli (10^{-3})
MMAD	= Durchschnittlicher Aerosoldurchmesser
μ	= Micro (10^{-6})
n	= Nano (10^{-9})
p	= Pico (10^{-12})
pDNA	= Plasmid-Desoxiribonukleinsäure
PEI	= Polyethylenimin
RLU	= Relative Lichteinheiten
SLN	= Solid Lipid Nanoparticles
w/w	= Gewicht/Gewicht

8. Publikationen

Dames P, Ortiz A, Schillinger U, Lesina E, Plank C, Rosenecker J, Rudolph C. **Aerosol gene delivery to the murine lung is mouse strain dependent.**

J Mol Med. 2007 Apr;85(4):371-8. Epub 2006 Dec 8.

Rudolph C, Schillinger U, Ortiz A, Plank C, Golas MM, Sander B, Stark H, Rosenecker J. **Aerosolized nanogram quantities of plasmid DNA mediate highly efficient gene delivery to mouse airway epithelium.**

Mol Ther. 2005 Sep;12(3):493-501.

Rudolph C, Ortiz A, Schillinger U, Jauernig J, Plank C, Rosenecker J. **Methodological optimization of polyethylenimine (PEI)-based gene delivery to the lungs of mice via aerosol application.**

J Gene Med. 2005 Jan;7(1):59-66.

9. Danksagung

Für ihre tatkräftige und engagierte Unterstützung möchte ich mich bei meinen Kollegen PD Dr. Joseph Rosenecker, Dr. Ulrike Schillinger und Dr. Christian Plank und vor allem bei meinem Betreuer Dr. Carsten Rudolph herzlich bedanken.

10. Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN:

Name: Aurora Ortiz Arandes
Geburtsdatum: 27. Juli 1979
Geburtsort: Rio Piedras, Puerto Rico
Staatsangehörigkeit: Amerikanisch

SCHULAUFBILDUNG:

1985 – 1988 Internationale Grundschule,
Mönchengladbach
1989 Simmern-Grundschule, München
1989 – 1997 Willi-Graf-Gymnasium, München
1997 Abitur

HOCHSCHULAUFBILDUNG:

1998 – 2005 Medizinstudiums an der Ludwig-
Maximilian-Universität München
08/2000 Physikum, Beginn des klinischen Studiums
03/2002 1. Staatsexamen
03/2004 2. Staatsexamen
11/2005 3. Staatsexamen

PRAKTIKA:

05/1998	Krankenpflegepraktikum auf der internistischen Station des Krankenhaus für Naturheilweisen, München
07/1998	Krankenpflegepraktikum auf der neurologischen Station des Neurologischen Krankenhaus Tristanstrasse, München
03/2000	Famulatur auf der kardiologischen Station des Stiftsklinik am Augustinum, München
09/2001	Famulatur in der Praxis für Allgemeinmedizin, Dr. A. Sotomayor, San Juan, Puerto Rico
03/2003	Famulatur in der ophthalmologischen Abteilung des Allgemeinen Krankenhauses, Wien
08/2003	Famulatur in der chirurgischen Abteilung der Parkklinik Weißensee, Berlin
10/2004 - 01/2005	Chirurgisches Tertial des Praktischen Jahres am Hospital Alemán (Deutsches Krankenhaus), Buenos Aires, Argentina
02/2005 - 05/2005	Wahlfachtertial an der Augenklinik der Universität München, Mathildenstraße, München
06/2005 - 09/2005	Tertial der Inneren Medizin am städt. Krankenhaus Schwabing, München

ARBEITSVERHÄLTNISSE:

06/2006-04/2007	Iatrosklinik, München
Seit 04/2007	Ophthalmologische Praxis, Dr.Höfling, Ottobrunn