
Lokaler Gentransfer durch ultraschall-induzierte Freisetzung von Plasmid-DNA aus Albumin-Trägermikrosphären

Claudius Teupe

1 Problemstellung

Die Gentherapie eröffnet neue, vielversprechende Möglichkeiten für die Behandlung zahlreicher Krankheiten. Die klinische Anwendung ist bisher allerdings wegen des Fehlens eines sicheren und effektiven Systems zur lokalen Genapplikation nur eingeschränkt möglich. Zwei unterschiedliche Wege („Vektoren“) stehen derzeit für die Transfektion zur Verfügung. Die nicht-virale Applikation kann durch die direkte Injektion der DNA oder durch Mischung mit Agentien, mit deren Hilfe die Passage durch die Zellmembran erleichtert wird, erfolgen. Ein Nachteil dieser Technik ist die geringe Transfektionseffizienz und die transiente Expression des Genproduktes (FELGNER 1997). Daher werden gegenwärtig virale Vektoren in gentherapeutischen Anwendungen bevorzugt. Durch Viren kann die Transfektionsrate signifikant gesteigert werden, da Viren im Laufe der Evolution spezielle Techniken entwickelt haben, um fremde DNA in Säugetierzellen einzuschleusen. Allerdings stehen einer breiten und uneingeschränkten Anwendung viraler Vektoren immunologische Risiken infolge von Abwehrreaktionen des Empfängerorganismus insbesondere bei wiederholter Anwendung entgegen (VERMA/SOMIA 1997). Zudem führte die adenovirale Transfektion des Endothels zu einer erheblichen entzündlichen Aktivierung, die mit hoher Wahrscheinlichkeit die günstigen Effekte der Gentransfektion beeinträchtigt (NEWMAN et al. 1995).

Die Ultraschall-induzierte Zerstörung von Mikrosphären, die als Trägermedium dienen, ist eine neue Technik für die lokale Einbringung von Medikamenten und Genen in spezifische Zielgewebe (SKYBA/PRICE/LINKA 1998; WIE/SKYBA/FIRSCHKE 1997; MUKHERJEE et al. 2000; PRICE et al. 1998). Bei diesem Verfahren nutzt man die Cavitation, einen speziellen Bioeffekt von Ultraschall. Hierunter versteht man die akustische Aktivierung von gasgefüllten Kavitäten. Die Formation von gasgefüllten Mikrobläschen erfolgt dabei *in vivo* aus in lebendem Gewebe vorhandenen (gelösten) Gasen und kann durch die externe Zufuhr von Mikrobläschen verstärkt werden. Die Cavitationseffekte führen zu einer transienten, nicht letalen Perforation der Kapillar- und Zellmembran und verbessern so die Transfektion. Zusätzlich steigert Ultraschall die Aktivität verschiedener Zellreparaturgene und steigert auf diese Weise die Transfektionsrate.

Die meisten der ultraschallunterstützten Transfektionstechniken verwendeten Albumin-Bläschen als Transportverkapselung, mit der die Expressionsvektoren den Transfektionsort erreichen. Anschließend wird mit Hilfe des Ultraschalls das Bläschen zur Oszillation an-

geregt und so letztendlich zerstört. Auf diese Weise wird das transportierte Material am gewünschten Ort freigesetzt. In früheren Studien ist es mit Hilfe dieses Vorgehens gelungen, kolloidale Partikel durch Ruptur von Kapillargefäßen zu applizieren (PRICE et al. 1998). Die ultraschallvermittelte Zerstörung von Mikrobäschen, die von Albumin ummantelt waren, und die ein adenovirales Transgen enthielten, führte zu einer signifikanten Zunahme der myokardialen Genexpression bei Ratten (SHOHET et al. 2000). In ähnlicher Weise konnte der kationische, lipidmedierte Gentransfer in primäre Tumorzellen gesteigert werden (ANWER et al. 2000).

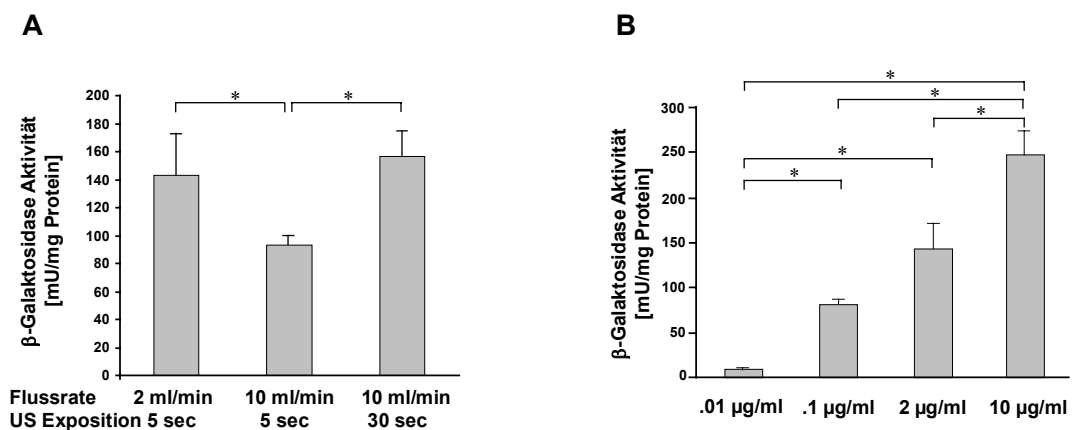
Bisher war allerdings unklar, ob auch mit einer reinen Plasmid-DNA eine Ultraschall-unterstützte Transfektion möglich ist und ob bei kardiovaskulärer Anwendung eine funktionelle Schädigung der endothelialen Zellschicht auftritt, wie sie in initialen Untersuchungen beschrieben wurde (PRICE et al. 1998). Eine normale Endothelfunktion spielt aber in der Prävention atherosklerotischer Läsionen und einer Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur eine wesentliche Rolle (SCHACHINGER/BRITTEN/ZEIHER 2000).

Wir untersuchten daher, ob die ultraschallinduzierte Plasmidfreisetzung aus Albumin-Mikrosphären zu einem effizienten Gentransfer in die Gefäßwand von Koronararterien führt, ohne die funktionelle Aktivität des Endothels zu beeinträchtigen (TEUPE et al. 2002). Da Stickstoffmonoxid (NO) einen wesentlichen Mediator der atheroprotektiven Wirkung des funktionell intakten Endothels darstellt, verwendeten wir ein Konstrukt, die phosphomimetische, endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthetase (eNOS). Dieses Konstrukt simuliert die Aktivierung von eNOS durch die Phosphorylierung der Aminosäure Ser1177 (DIMMELER et al. 1999; FULTON et al. 1999). Die Nachahmung der Phosphorylierung von eNOS erfolgt über den Austausch von Ser1177 durch Aspartat, wodurch die basale Aktivität des Enzyms ohne einen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration gesteigert wird (DIMMELER et al. 1999).

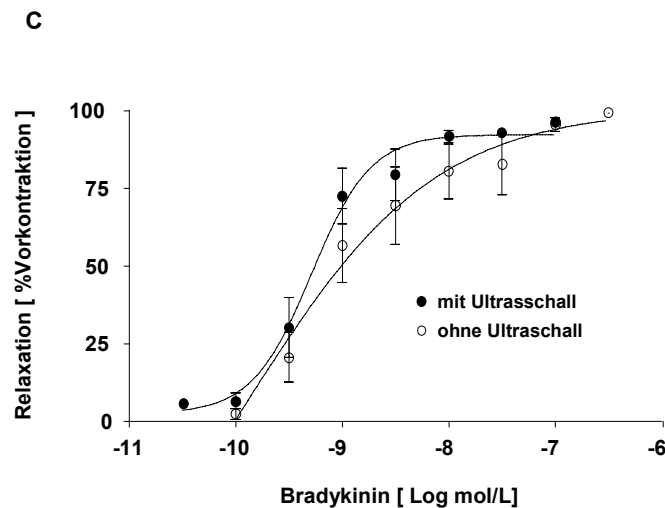
2 Methoden und Ergebnisse

Gasgefüllte Mikrobäschen (Durchmesser $3.0 \pm 1.2 \mu\text{m}$) wurden durch die Sonifikation von 2 mL einer 5%igen humanen Albuminlösung in Gegenwart von 20 μg Plasmid-DNA hergestellt, die entweder LacZ, eNOS S1177D oder einen Leervektor kodiert. Koronararterien von Schweinen wurden mit DNA beladenen Mikrobäschen perfundiert und anschließend diagnostischem Ultraschall (System V, GE Vingmed, 2,2 MHz, MI 1.2, 172.9 Bilder/s, Expositionsdauer 5 s) ausgesetzt. Nach einer Inkubationsperiode von 18 bis 20 Stunden konnte eine intensive blaue Färbung, die die Expression von LacZ-Protein repräsentierte, in dem ultraschall-exponierten Gefäßabschnitt nachgewiesen werden. Segmente, die mit Leervektor beladenen Mikrobäschen perfundiert, aber ansonsten in gleicher Weise behandelt wurden, zeigten keine blaue Anfärbung. Die histochemische Analyse ergab, dass β -Galaktosidase von mehr als 90% der Endothelzellen exprimiert wurde, während die subintimalen glatten Gefäßmuskulzellen nur sporadisch angefärbt waren. Die Funktion der

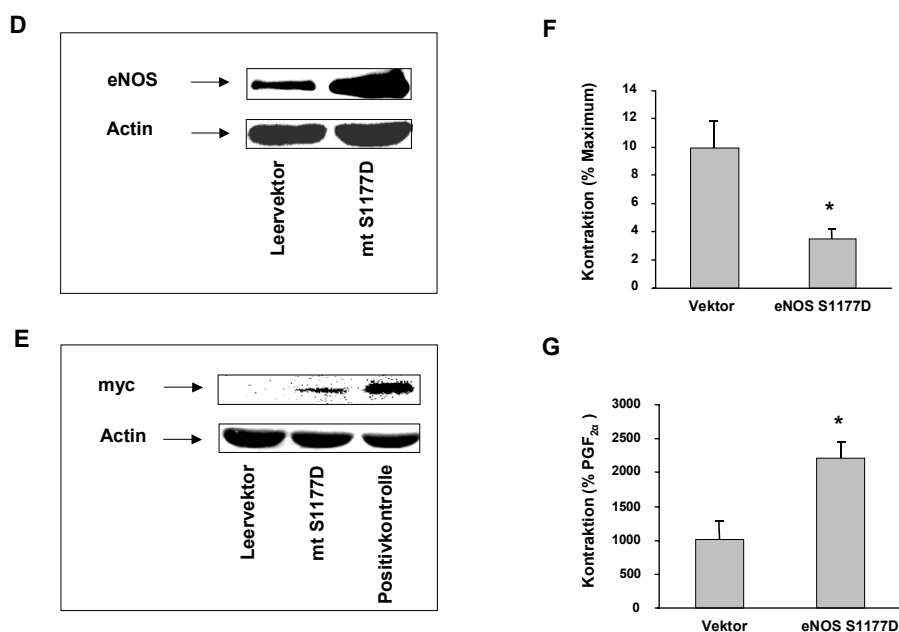
in die Arterienwand eingeschleusten β -Galaktosidase wurde durch Messung der Enzymaktivität in Koronararterienhomogenaten quantifiziert. Die Kombination von LacZ beladenen Mikrosphären und Ultraschallbehandlung führte zu einer deutlichen Steigerung der β -Galaktosidase-Aktivität verglichen mit Arterien, die mit dem reinen LacZ-Plasmid (ohne Mikrosphären) perfundiert bzw. die mit LacZ beladenen Mikrosphären perfundiert aber nicht ultraschall exponiert wurden. Die Expression von β -Galaktosidase war fluss- und konzentrationsabhängig und am größten bei der höchsten untersuchten Dosierung (Abbildung A und B).



Wir untersuchten den Effekt einer LacZ-Transfektion auf die bradykinininduzierte, endothelabhängige Relaxation von Gefäßringen aus transfizierten Arterien. Die bradykinininduzierte Relaxation von mit Prostaglandin (U46619) vorkontrahierten Gefäßringen war gleich in unbehandelten Kontrollgefäßen und Gefäßen, die Ultraschall und Mikrosphären ausgesetzt wurden (Abbildung C). Die Ultraschall-Exposition führte zu keinerlei histologisch erkennbaren Veränderungen der Gefäßwand. Weiterhin zeigte sich in der Trypanblau-Färbung des Endothels und bei der Bestimmung der Laktatdehydrogenase-Aktivität im Perfusat kein Hinweis auf einen zytotoxischen Effekt der Behandlung.



Zur Bestimmung einer möglichen Beeinflussung der Koronararterienfunktion durch ultraschallunterstützten Gentransfer wurden Koronararterien mit dem eNOS S1177D-Genkonstrukt transfiziert. Die quantitative Western-Blot-Analyse ergab eine deutliche Zunahme der eNOS-Proteinexpression im Vergleich mit leervektortransfizierten Segmenten (Abbildung D). Die qualitative Unterscheidung erfolgte durch eine myc-Markierung des eNOS S1177-Konstruktes (Abbildung E). Ob die Einbringung von S1177D in die endothelialen Zellen mit einer Zunahme der NO-Produktion einhergeht, wurde durch Messung der kontraktilen Antwort auf die Zugabe des spezifischen NOS-Inhibitors L-NA zu Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$)-vorkontrahierten Gefäßen bestimmt. Verglichen mit der Kontrollgruppe, war die $PGF_{2\alpha}$ -induzierte Kontraktion in Koronararterienringen aus eNOS S1177D-transfizierten Gefäßen signifikant vermindert (Abbildung F). Weiterhin zeigten die eNOS S1177D-transfizierten Gefäßsegmente eine ungefähr zweifach erhöhte L-NA-induzierte Kontraktion im Vergleich zu vektortransfizierten Gefäßen (Abbildung G). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die ultraschallunterstützte Einbringung des eNOS S1177D-Konstruktes in die Endothelzellen von Koronararterien zu einer signifikanten Steigerung der vaskulären NO-Produktion führt.



3 Diskussion

In dieser Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass die ultraschallvermittelte Zerstörung von DNA-beladenen Albumin-Mikrosphären eine wirksame und effiziente Methode für den vaskulären Gentransfer darstellt. In den beschallten Gefäßsegmenten, die mit Plasmid-DNA- (β -Galaktosidase oder eNOS S1177D) beladenen Albumin-Mikrosphären perfundiert wurden, kam es zu einer signifikanten Steigerung der endothelialen Transfektion verglichen mit Gefäßen, die mit DNA-beladenen Mikrobläschen durchströmt, aber nicht beschallt wurden. Weiterhin zeigten Endothelzellen, die mit dem eNOS S1177D-Konstrukt transfiziert wurden, gesteigerte NO-vermittelte Reaktionen als Hinweis auf eine erhöhte NO-Synthese.

Fortschritte in der lokalen kardiovaskulären Genterapie sind durch Probleme mit der Sicherheit und Praktikabilität der verwendeten viralen Vektoren sowie die geringe Effektivität nicht-viraler Transfektionstechniken erschwert. Diese Studie zeigt, dass reine, in 5%iger Humanalbuminlösung verdünnte Plasmid-DNA durch Sonikation in Gegenwart von Luft oder Perfluorocarbongas in Mikrosphären eingeschlossen werden kann. Die Beschallung führte weder im Herstellungsprozess noch bei der Freisetzung zu einem Aktivitätsverlust der inkorporierten DNA. Trotz Beschallung und wirksamen Gentransfers bzw. -expression war die funktionelle Integrität der transfizierten Endothelzellschicht erhalten. Daher erscheint die ultraschallunterstützte Freisetzung von Plasmid-DNA aus Albumin-Mikrobläschen ideal für die Transfektion von Endothelzellen epikardialer Gefäße

geeignet, die arteriosklerotischen Veränderungen in besonderem Maße ausgesetzt sind. In Übereinstimmung zum Fehlen funktioneller Schädigungen ließen sich histologisch keine strukturellen Veränderungen der endothelialen Zellschicht durch die Ultraschallexposition nachweisen. Ebenso ergab die Untersuchung der endothelialen Vitalität mittels Trypanblau-Färbung und die LDH-Messung im Gefäßperfusat keinerlei Hinweis auf einen zytotoxischen Effekt der Ultraschall-vermittelten Zerstörung der DNA beladenen Albumin-Mikrosphären.

Im Endothel gebildetes NO besitzt wesentliche anti-arteriosklerotische Eigenschaften (ZEIHER 1996). Auch der gut untersuchte vaskuloprotektive Effekt von regelmäßigem körperlichen Training wird auf die durch Scherkräfte stimulierte Freisetzung von NO zurückgeführt (GIELEN/SCHULER/HAMBRECHT 2001; KINGWELL 2000; NIEBAUER/COOKE 1996). Scherkräfte aktivieren die Proteinkinase B (Akt), die ihrerseits eNOS an Ser1177 phosphoryliert und auf diese Weise ohne einen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration die Enzymaktivität um das zwei- bis dreifache der Basalproduktion steigert (DIMMELER et al. 1999). Wir verwendeten daher für unsere Transfektionsuntersuchungen ein eNOS-Konstrukt, in dem Ser1177 durch Alanin ersetzt ist, um die physiologische Aktivierung von eNOS nachzuahmen. Hierdurch kam es nach Transfektion zu einer Abschwächung der PGF_{2α}-vermittelten Vorkontraktion um ca. 60% und zu einer Steigerung der Kontraktion nach Zugabe von L-NA, was die Inhibierung der NO-Produktion durch eNOS als Folge der isometrischen Kontraktion widerspiegelt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die ultraschallvermittelte Freisetzung von Plasmid-DNA aus Albumin-Trägermikrosphären eine wirksame Technik zur lokalen Gentransfektion der Gefäßwand darstellt, ohne die funktionelle oder strukturelle Integrität des Endothels zu beeinträchtigen.

4 Literatur

- ANWER, K.; KAO, G.; PROCTOR, B. et al.: Ultrasound enhancement of cationic lipid-mediated gene transfer to primary tumors following systemic administration. *Gene Ther.* 21 (2000) 7, 1833-1839
- DIMMELER, S.; FLEMING, I.; FISSALTHALER, B. et al.: Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* (1999) 399 (6736), 601-605
- FELGNER, P.L.: Nonviral strategies for gene therapy. *Sci. Am.* 1997; 276 (1997) 6, 102-106
- FULTON, D.; GRATTON, J.P.; McCABE, T.J. et al.: Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* (1999) 399(6736), 597-601
- GIELEN, S.; SCHULER, G.; HAMBRECHT, R.: Exercise training in coronary artery disease and coronary vasomotion. *Circulation* 103 (2001) 1, E1-E6
- KINGWELL, B.A.: Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. *FASEB J.* 14 (2000) 12, 1685-1696

- MUKHERJEE, D.; WONG, J.; GRIFFIN, B. et al.: Ten-fold augmentation of endothelial uptake of vascular endothelial growth factor with ultrasound after systemic administration. *J. Am. Coll. Cardiol.* 35 (2000) 6, 1678-1686
- NEWMAN, K.D.; DUNN, P.F.; OWENS, J.W. et al.: Adenovirus-mediated gene transfer into normal rabbit arteries results in prolonged vascular cell activation, inflammation, and neointimal hyperplasia. *J. Clin. Invest.* 96 (1995) 6, 2955-2965
- NIEBAUER, J.; COOKE, J.P.: Cardiovascular effects of exercise: role of endothelial shear stress. *J. Am. Coll. Cardiol.* 28 (1996) 7, 1652-1660
- PRICE, R.J.; SKYBA, D.M.; KAUL, S. et al.: Delivery of colloidal particles and red blood cells to tissue through microvessel ruptures created by targeted microbubble destruction with ultrasound. *Circulation* 98 (1998) 13, 1264-1267
- SCHACHINGER, V.; BRITTEN, M.B.; ZEIHNER, A.M.: Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long- term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 101 (2000) 16, 1899-1906
- SHOHET, R.V.; CHEN, S.; ZHOU, Y.T. et al.: Echocardiographic destruction of albumin microbubbles directs gene delivery to the myocardium. *Circulation* 101 (2000) 22, 2554-2556
- SKYBA, D.M.; PRICE, R.J.; LINKA, A.Z. et al.: Direct in vivo visualization of intravascular destruction of microbubbles by ultrasound and its local effects on tissue. *Circulation* 98 (1998) 4, 290-293
- TEUPE, C.; RICHTER, S.; FISSALTHALER, B. et al.: Vascular gene transfer of phosphomimetic endothelial nitric oxide synthase (S1177D) using ultrasound-enhanced destruction of plasmid- loaded microbubbles improves vasoreactivity. *Circulation* 105 (2002) 9, 1104-1109
- VERMA, I.M.; SOMIA, N.: Gene therapy - promises, problems and prospects. *Nature* (1997) 389 (6648), 239-242
- WIE, K.; SKYBA, D.M.; FIRSCHKE, C. et al.: Interactions between microbubbles and ultrasound: in vitro and in vivo observations. *J. Am. Coll. Cardiol.* 29 (1997) 5, 1081-1088
- ZEIHER, A.M.: Endothelial vasodilator dysfunction: pathogenetic link to myocardial ischaemia or epiphenomenon? *Lancet* (1996) 348 (Suppl. 1), 10-12

