

Aus der Universitätsklinik für Thorax-, Herz- und
Gefäßchirurgie

**Entwicklung einer neuartigen messengerRNA (mRNA)-
basierten Therapiestrategie
zur Optimierung der Wundheilung**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Thoma, Robert Konstantin

2019

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. H. P. Wendel

2. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. M. Held

Tag der Disputation: 04.06.2019

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Aufbau menschlicher Haut	1
1.1.1 Hautanhangsgebilde	4
1.2 Funktion menschlicher Haut.....	4
1.3 Wundarten	5
1.4 Wundheilung	6
1.4.1 Phasen der Wundheilung	6
1.4.2 Wirkungen von Wachstumsfaktoren auf die Wundheilung	7
1.4.3 Störfaktoren	10
1.5 Lokale Wundbehandlung	11
1.6 mRNA-basierte Therapie	12
1.6.1 Herstellung der mRNA	13
1.6.2 mRNA-basierter Gentransfer.....	13
1.6.3 Transfektionsarten.....	15
1.6.4 Nebenwirkungen der mRNA-Therapie	19
1.7 In-vitro Wundheilungsmodelle	20
1.8 Wundheilungstherapie mit Hilfe von Wachstumsfaktoren	21
1.9 Ziel der vorliegenden Arbeit	24
2. Material und Methoden	25
2.1 Material	25
2.1.1 Reagenzien & Chemikalien	25
2.1.2 Geräte.....	27
2.1.4 Medium und Lösungen.....	29
2.1.5 Zelllinien/primäre Zellen	30
2.1.6 Plasmide.....	30
2.1.7 Kits.....	33
2.1.8 Software	33
2.2 Methoden	35
2.2.1 Zellkultur	35
2.2.2 Herstellung der mRNA	36
2.2.3 Herstellung von DC-Chol/DOPE-Liposomen	39
2.2.4 Transfektion von Zellen	40
2.2.5 Transfektion von Haut und Hautmodellen	42
2.2.6 Untersuchung am Konfokalmikroskop/Fluoreszenzmikroskop	48
2.2.7 Zellviabilitätsbestimmung (CASY- Cellcounter)	48

2.2.8 Konzentrationsmessung des KGF-Gehalts mittels ELISA	49
2.2.9 MTT-Assay	49
2.2.10 Durchflusszytometrie	50
2.2.11 Statistik	50
3. Ergebnisse	52
3.1 Erfolgreiche Herstellung der synthetischen mRNA	52
3.2 Herstellung und Validierung der kationischen Liposomen.....	54
3.3 Transfektion von HaCat-Zellen mit KGF und eGFP mRNA.....	58
3.4 Transfektion von primären Keratinozyten mit KGF und eGFP mRNA.....	64
3.5 Herstellung eines einfachen 3D-Hautmodells	70
3.6 Transfektion von Hautmodellen (Phenion)	72
3.7 Transfektion humaner Haut.....	74
3.8 Transfektion humaner Haut (nach Modell Phenion)	77
4. Diskussion	80
4.1 Etablierung der synthetischen mRNA als therapeutisches Mittel zur Induktion der KGF-Expression	81
4.2 Etablierung von Transfektionsmodellen zur Optimierung der Wundheilung	88
4.3 Ausblick.....	93
5. Zusammenfassung	95
6. Literaturverzeichnis	98
7. Erklärung zum Eigenanteil.....	104
8. Danksagung.....	106

Abkürzungsverzeichnis:

ARCA	Anti reverse cap analogon
DC-Chol	3 β -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)- carbamoyl]cholesterol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid (Desoxyribonukleinsäure)
DOPE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3- phosphoethanolamine
EGF	Epidermal growth factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetal calf serum (Fetales Kälberserum)
FGF	Fibroblast growth factor (Fibroblasten Wachstumsfaktor)
GFP	Green-fluorescent-protein
HaCat	Human adult low calcium high temperature (keratinocytes)
hEGF	human epithelial growth factor
Hek	human embryonic kidney
IL	Interleukin
IVT	In-vitro Transkription
KGF	Keratinocyte growth factor (Keratinocytenwachstumsfaktor)
Lipofectamin	Lipofectamine 2000
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
mRNA	messenger RNA
MTT	Thiazolyl-blau-tetrazolium-bromid
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PDGF	Platelet-derived growth factor
pDNA	Plasmid-DNA
TGF	Transforming-growth-factor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor necrosis factor (Tumornekrosefaktor) UTRs
UTR	Untranslated region
vEGF	vascular endothelial growth factor

1. Einleitung

Aktuelle Studien zeigen, dass in Deutschland 2,7 Millionen Menschen an Wunden leiden, von denen ca. 890.000 chronisch sind [1]. Neben den erheblich hohen Behandlungskosten wird in den nächsten Jahrzehnten die Zahl der an Wunden leidenden Personen aufgrund des demographischen Wandels weiter steigen. Damit diese Kosten in Zukunft nicht weiter ansteigen, ist es von großer Bedeutung, neue Konzepte und Therapiestrategien der Wundheilung zu entwickeln und voranzutreiben. So sollen moderne Behandlungsmethoden helfen, den Betroffenen schnell Linderung zu verschaffen. Oft ist deren Lebensqualität stark eingeschränkt, nicht zuletzt, weil sich die Behandlung auf Monate oder Jahre hinauszieht.

Die Haut, als Flächenorgan bezeichnet, ist das größte Organ des menschlichen Körpers [2]. Sie ist hauptsächlich für dessen Schutz verantwortlich, trägt jedoch zahlreiche andere Aufgaben. Somit ist sie essentiell für den menschlichen Körper und genau deshalb ist sie Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten im Bereich neuartiger Wundheilungskonzepte. In dieser Arbeit soll nun die Wundheilung an in-vitro- und in-vivo-Modellen mit Hilfe von KGF als Wachstumsfaktor untersucht werden, welcher die Reepithelisation von Wunden entscheidend verbessern soll.

1.1 Aufbau menschlicher Haut

Die menschliche Haut ist aus mehreren Schichten aufgebaut. Apikal besteht sie aus einer epithelialen Schicht (Epidermis), die basal in eine bindegewebige Schicht, die Dermis (Corium) übergeht. Die Dermis grenzt wiederum an die darunterliegende Subcutis [3].

Die Epidermis stellt im histologischen Sinne ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel dar. Sie kann, je nach Körperregion, dicker (Leistenhaut) oder dünner (Felderhaut) ausgeprägt sein. Sie setzt sich vor allem aus Keratinozyten, Melanozyten, sowie Langerhans- und Merkel-Zellen zusammen. Keratinozyten durchlaufen nach ihrer Bildung aus den Zellen des Stratum basale verschiedene Differenzierungsschritte, wobei diese nach ungefähr vier Wochen abgeschlossen sind und die Zellen abgeschilfert werden. Sie werden von Zytokinfilamenten (Tonofilamenten) durchzogen. Diese bilden ein Netzwerk, welches die Epidermis durchsetzt und mit den Kollagenfasern der Dermis verbunden ist [4]. Dieser Prozess wird durch viele Faktoren beeinflusst. Von großer Bedeutung sind vor allem Wachstumsfaktoren der Familie der Fibroblasten Wachstumsfaktoren (fibroblast growth factor, FGF) oder auch epidermaler Wachstumsfaktoren (epidermal growth factor, EGF) [5]. Die Epidermis teilt sich von apikal nach basal in fünf Schichten auf, wie in **Abbildung 1** dargestellt.

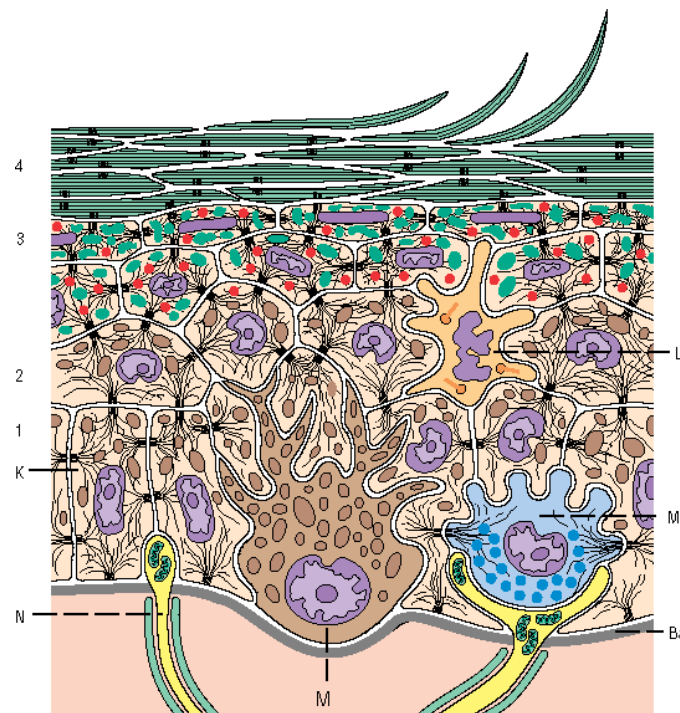


Abbildung 1: Zelltypen der Epidermis [6]: 1. Stratum basale, 2. Stratum spinosum, 3. Stratum granulosum, 4. Stratum corneum, Me = Merkelzellen, L = Langerhans-Zelle, Ba = Basallamina, N = freie Nervenendigungen, M = Melanozyten, K = Keratinozyten

Das **Stratum corneum** besteht aus toten, flachen Zellen, welche an der Oberfläche durch mechanische Einwirkung abgeschilfert werden. Die Zellen sind kern- und organellenlos und enthalten vorwiegend Keratin. Je nach Körperstelle kann diese Schicht unterschiedlich stark ausgeprägt sein. So ist sie besonders an den Hand- und Fußsohlen besonders stark ausgebildet. Das **Stratum lucidum** ist nur in der Leistenhaut zu finden, welche sich an Palmar- und Plantarflächen der Hand und der Füße befindet. Sie ist dünn, erscheint homogen und eosinophil. Die Zellen enthalten keine Organellen mehr. Das **Stratum granulosum** besteht aus ungefähr 1-3 Schichten abgeflachter Zellen, die apikal durch sog. Zonulae occludentes verbunden sind. Dies verhindert die Austrocknung des Gewebes. Basal an das Stratum granulosum grenzt das **Stratum spinosum**, welches 2-5 Schichten aufweist. Die Zellen des Stratum basale bilden Fortsätze aus, welche über Desmosomen zu Fortsätzen anderer Zellen verbunden sind. Die Zellen des **Stratum basale** sitzen auf der Basalmembran und sind teilungsfähig. Sie sind über Hemidesmosomen mit der Basalmembran verbunden [3, 7, 8]. Auf die Epidermis folgt basal die Dermis (Corium, Lederhaut). Diese kann weiter in ein Stratum papillare und Stratum reticulare unterteilt werden. Das **Stratum papillare** (Lat.: Papilla, Warze) bildet Bindegewebspapillen aus, welche sich fingerförmig in die Epidermis ausdehnen. In dieser Schicht befinden sich vor allem Kollagen- und elastische Fasern. Außerdem sind Abwehrzellen (Makrophagen, Mastzellen und Lymphozyten) vorhanden. Das Stratum reticulare, welches basal des Stratum papillare liegt, enthält weniger Zellen, dafür mehr Kollagen- und elastische Fasern. Es dient unter anderem der Reiß- und Dehnbarkeit der Haut. Basal dieser Schicht, an der Grenze zur Subcutis, befinden sich Gefäße, welche sich nach apikal aufzweigen und für die Versorgung der Haut mit Sauerstoff und Nährstoffen zuständig sind [3]. Zwischen den Kollagenfasern der Dermis befinden sich zudem viele Immunzellen, wie dendritische-, T- und B-Zellen, natürliche Killerzellen, Mastzellen und Makrophagen [9].

Die Subcutis besteht aus Fett- und Bindegewebe. Sie verbindet die Haut mit dem darunterliegenden Muskel oder Knochen. Sie dient vor allem der Wärmeisolation aber auch als Energiespeicher [3, 6].

1.1.1 Hautanhangsgebilde

Alle Hautanhangsgebilde werden von der Epidermis gebildet, wobei die Dermis die Bildung steuert. Epithelzapfen wachsen in die Tiefe und differenzieren sich anschließend [4]. Sowohl Haare, als auch Nägel wachsen aus diesen Epidermiseinstülpungen hervor, welche sogenannte Matrixzellen beinhalten. Diese sind mitotisch sehr aktiv, vergleichbar der Keratinozyten des Stratum basale. Haare und Nägel stellen Verhornungsprodukte der Haut dar. D.h., dass sich die Matrixzellen zu Hornzellen differenzieren können, welche anschließend Haarschaft und Nagelplatte bilden.

Die Haut beinhaltet des Weiteren auch Drüsengewebe (Talg-, Schweißdrüsen). Talgdrüsen sind oft mit einem Haarfollikel verbunden, wobei ihr Ausführungsgang in den Haartrichter mündet [4]. Schweißdrüsen entleeren ihren Inhalt dagegen direkt auf die Epidermis nach außen.

1.2 Funktion menschlicher Haut

Die Haut, ein Organ des menschlichen Körpers, erfüllt mehrere Funktionen. Sie bietet Schutz vor äußerlichen Einflüssen. Hierzu gehören vor allem der Schutz vor UV-Strahlung, der durch die Melaninproduktion der Melanozyten gewährleistet wird. Außerdem bietet sie mechanischen Schutz und auch den Schutz vor Krankheitserregern. Des Weiteren verhindert sie die Austrocknung des Organismus, in dem sie den Wasserhaushalt durch Verdunstung an ihrer Oberfläche regelt [10].

Sie ist verantwortlich für die Sinneswahrnehmung von mechanischen und thermischen Reizen [3]. Diese werden durch in der Haut liegende Gebilde (Meissner-Tastkörperchen, Vater-Pacini-Körperchen, Ruffini-Körperchen) wahrgenommen.

Außerdem ist sie für den Wärmehaushalt des Organismus verantwortlich. Sie isoliert und reguliert die Abgabe von Wärme durch Veränderung der Durchblutung [11] und ist zudem maßgeblich an der Produktion von Vitamin D beteiligt [12].

1.3 Wundarten

Die Haut kann durch verschiedene Einflüsse geschädigt werden. Hierbei werden Wunden in drei Kategorien eingeteilt [13]:

1. Traumatische Wunden
2. Iatrogene Wunden
3. Chronische Wunden

Traumatische Wunden stellen den größten Teil aller Verletzungen dar. Sie entstehen meist durch äußere Gewalteinwirkung und werden in mechanische, thermische, chemische und strahlenbedingte Wundklassen unterteilt.

Mechanische Wunden können durch Abschürfungen, Schnittverletzungen, Riss- und Quetschverletzungen, Schusswunden oder auch Ablederungen (sog. Décollement) entstehen. Thermisch bedingte Wunden entstehen durch Verbrennungen oder Erfrierungen. Chemische Wunden werden durch Verätzungen, bedingt durch Säuren und Laugen hervorgerufen.

Iatrogene Wunden werden durch Operationen und durch diagnostische bzw. therapeutische Verfahren hervorgerufen. Dies können beispielsweise Punktionen, Amputationen oder auch Laserbehandlungen sein.

Wunden, welche nach vier Wochen noch immer nicht abgeheilt sind, werden als chronische Wunden bezeichnet. Ihnen liegen meist Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus, eine venöse Insuffizienz oder eine chronische arterielle Verschlusskrankheit zugrunde. Allen Krankheiten gemeinsam ist die verschlechterte Mikro- und Makrozirkulation, welche als Ursache für chronische Wunden herangezogen wird. Diese werden zu den primären Störfaktoren gezählt. Sekundäre Störfaktoren entwickeln sich erst im Laufe der Chronifizierung einer Wunde. Dazu gehören unter anderem die Unterversorgung des Gewebes mit Sauerstoff (Hypoxie), aber auch die fehlende Migration von Epithelzellen [13].

1.4 Wundheilung

Als Wunde wird die Trennung von Geweben bezeichnet. Diese kann entweder durch Regeneration oder Reparation heilen. Regeneration beschreibt die Heilung durch Bildung des vorliegenden spezifischen Gewebes, Reparation die Heilung durch unspezifisches Gewebe, auch Narbe genannt [13].

Sind die Wundränder gut adaptiert und die Wunde nicht infiziert, so wird die Heilung als **primäre Wundheilung** (per primam intentionem) bezeichnet. Die Heilung sollte nach wenigen Tagen abgeschlossen sein. Ist die Wundheilung jedoch durch systemische oder lokale Gegebenheiten, wie Diabetes mellitus oder schlechte Durchblutung gestört, spricht man von **sekundärer Wundheilung** (per secundam intentionem). Die Wunde wird durch Granulationsgewebe gefüllt, da die Wundränder nicht adaptiert sind. Die Heilung kann so erst nach Wochen abgeschlossen sein, wobei eine Narbe bleibt [13, 14].

1.4.1 Phasen der Wundheilung

Die Wundheilung lässt sich grob in vier Phasen einteilen. Ist eine Wunde entstanden, setzt sofort die Koagulation und Hämostase ein [15]. Daraufhin setzt die primäre Blutstillung ein, welche durch eine Vasokonstriktion gekennzeichnet ist [14]. Dabei bleiben die im Blut vorkommenden Leukozyten am Endothel der Gefäßinnenwand haften und bilden dort eine geschlossene Schicht aus. Nach einiger Zeit heften sich sowohl Erythrozyten, als auch Thrombozyten an den Leukozyten an und verschließen das verletzte Gefäß vollständig [13]. Zudem geben Thrombozyten eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren ab, welche für die weitere Abheilung der Wunde von Bedeutung sind. Am gesamten Ablauf dieser ersten **exsudativen Phase** der Wundheilung spielt vor allem die Blutgerinnung (Hämostase) eine entscheidende Rolle. Die nachfolgende **resorptive Phase** ist vor allem wegen der Einwanderung der neutrophilen Granulozyten von Bedeutung. Deren Aufgabe

besteht darin, abgestorbene Zellen, Zellreste und Bakterien zu phagozytieren. Außerdem gelangen Makrophagen und Lymphozyten zum Wundgebiet. Diese lösen unter anderem durch Enzyme das abgestorbene Gewebe auf und sind für die Abwehr von Infekten wichtig.

Danach einwandernde Fibroblasten kennzeichnen die nächste Phase (**proliferierende Phase**). Diese sind sowohl für die Epithelialisierung der Wunde, als auch für die Einsprossung von Kapillaren in das Wundgebiet verantwortlich [14, 16]. Zytologisch sind nun mehr die proliferierenden Zellen, wie Keratinozyten, Fibroblasten und Angiozyten feststellbar und weniger die Entzündungszellen. In der letzten Phase (**reparative Phase**) findet der Aufbau des Bindegewebes, mit den darin enthaltenen Kollagenfasern, statt. Außerdem sollte in dieser Phase die oberflächliche Epithelialisierung abgeschlossen sein. Die Wunde wird nun sowohl durch den Verlust von Wasser, als auch durch das Vorliegen von Myofibroblasten immer kleiner [13, 17].

1.4.2 Wirkungen von Wachstumsfaktoren auf die Wundheilung

An der Heilung einer Wunde sind eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen beteiligt. Nach einer Verletzung kommt es zu Entzündungsprozessen, Gewebeneubildungen und Gewebeumbau. Dieser Vorgang wird vor allem durch das Vorkommen von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen gesteuert, die über das Serum verletzter Blutgefäße am Ort der Verletzung freigesetzt werden. Sie beeinflussen dort vor allem Keratinozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen und Thrombozyten [18].

Bislang konnte eine Reihe an Wachstumsfaktoren gefunden werden, welche am Heilungsprozess einer Wunde beteiligt sind. In **Tabelle 1** sind die wichtigsten beteiligten Wachstumsfaktoren und Zytokine, sowie deren Funktion gelistet.

Tab. 1: Wachstumsfaktoren/Zytokine mit Einfluss auf die Wundheilung; [15, 18-21]

Wachstumsfaktor/Zytokin	Zellen	Funktion
EGF (epidermal growth factor)	Thrombozyten, Makrophagen, Fibroblasten	Reepithelisation
FGF (fibroblast growth factor)	Keratinozyten, Fibroblasten, Mastzellen, Endothelzellen, Chondrozyten, glatte Muskelzellen	Reepithelisation, Geweberemodelling und Gewebeneubildung
TGF- β (Transforming growth factors β -family)	Thrombozyten, Makrophagen, Keratinozyten, Lymphozyten, Fibroblasten	Reepithelisation, Inflammation, Bildung von Granulationsgewebe, Bildung einer Matrix
PDGF (platelet derived growth factor)	Thrombozyten, Makrophagen, Keratinozyten, Endothelzellen, Fibroblasten	Reepithelisation, Inflammation, Bildung von Granulationsgewebe, Bildung einer Matrix
VEGF (vascular endothelial growth factor)	Thrombozyten, Neutrophile, Makrophagen, Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten	Bildung von Granulationsgewebe, Angiogenese
IL-1 (Interleukin 1)	Neutrophile, Makrophagen, Monozyten, Keratinozyten	Inflammation und Reepithelisation, Angiogenese

IL-6 (Interleukin 6)	Neutrophile, Makrophagen	Inflammation und Reepithelisation, Angiogenese
TNF- α (tumor necrosis factor)	Neutrophile, Makrophagen	Inflammation und Reepithelisation

KGF (keratinocyte growth factor) gehört zur Familie der FGF (fibroblast growth factors), wobei FGF-7 auch als Synonym für KGF verwendet wird. Die Gruppe der FGF besteht aus 23 Wachstumsfaktoren. Vor allem drei dieser Faktoren, FGF-2, FGF-7 und FGF-10, sind an der Wundheilung der Haut von größerer Bedeutung [18]. KGF ist ein einzelsträngiges Polypeptid mit einer molekularen Masse von 28 kDa [22]. Es wird von Fibroblasten produziert, anschließend parakrin von ihnen sekretiert, und wirkt vor allem mitotisch auf epitheliale Zellen, welche Rezeptoren für KGF auf deren Oberfläche tragen [23, 24]. Kommt es zu einer Wunde, wird KGF am Wundrand bis zu hundertfach stärker produziert, was eine mögliche Antwort der Ausschüttung von Zytokinen ist [25]. Vor allem in den ersten sieben Tagen nach einer Verletzung verbleibt die KGF-Expression hoch [26].

Wird KGF über einen exogenen Weg zu einer Wunde gegeben, hat das Protein mitogenetischen Einfluss auf die heilende Epidermis, da es die Expression von Plasminogenaktivator und MMP-10 in der Keratinozyten erhöht, was wiederum zur schnelleren Heilung der Wunde beiträgt [27].

Des Weiteren führt KGF zu einer Verdickung der Epidermis, einer stärkeren Verzahnung der Basalzellen, zu einer Verstärkung der Tonofilamente und Hemidesmosomen und zu einer Erhöhung der Bildung von Kollagen im Stratum papillare der Dermis [26].

1.4.3 Störfaktoren

Die Heilung einer Wunde ist vor allem durch deren Zustand und deren Art abhängig. Wichtige Faktoren, welche die Wundheilung bestimmen, sind in Tabelle 2 zusammengefasst [28-30].

Tab. 2: Faktoren, welche die Wundheilung beeinflussen

Wundzustand	Größe und Art der Wunde, Ort, Grad der Verschmutzung, Durchblutung
Patientenalter	Verringerung der Wundkontraktion, verminderte Zellproliferation, Kapillarproliferation und Epithelisation, Verringerte immunologische Reaktion, geringere Kollagensynthese, evtl. Arteriosklerotische Veränderungen und Stoffwechselerkrankungen
Ernährungszustand	Schlecht heilende Wunden aufgrund ungenügender Versorgung essenzieller Nahrungsbestandteile (Vitamine, Mineralstoffe, Spurenelemente)
Begleitende Erkrankungen	Diabetes mellitus, chronisch venöse Veneninsuffizienz, Arteriosklerose, Bindegewebserkrankungen, Anämie
Medikamente	Kortikoide, Immunsuppressiva, Zytostatika, Antikoaganzien, Psychopharmaka
Gestörtes Immunsystem, Infektionskrankheiten	Syphilis/Tuberkulose, HIV-Infektion
Wundinfektionen	Bakterien, Viren und Pilze

Ist der klassische normalerweise ablaufende Wundheilungsprozess nicht gegeben, da er durch lokale oder allgemeine Störfaktoren behindert wird, kann

es zu Wundheilungskomplikationen wie zu Seromen, Hämatomen, Nekrosen und Infektionen kommen [31, 32].

1.5 Lokale Wundbehandlung

Die primäre Absicht der Behandlung einer Wunde liegt darin, eine Infektion zu vermeiden und möglichst eine primäre Wundheilung anzustreben. Die Funktion des verletzten Gewebes sollte erhalten bleiben und auch das ästhetische Ergebnis, besonders aus Sicht des Patienten, spielt eine nicht unwichtige Rolle.

Alle Verletzungen sollten möglichst unter sterilen Umständen versorgt werden. Im Allgemeinen richtet sich die Therapie nach Ausdehnung und Art des Defektes. Um den Defekt zu schließen, stehen verschiedene Materialien und Methoden zur Verfügung. Wichtig ist jedoch, dass die Wundränder, ohne unter Spannung zu geraten, adaptiert werden.

Der Wundverschluss erfolgt anschließend über eine Naht, Klammern oder auch Klebstoffe [33]. Bei den Fäden stehen resorbierbare und nicht-resorbierbare mit unterschiedlichen Fadenstärken- oder Aufbauten zur Verfügung. Ebenso stehen bei den zu verwendenden Nadeln zahlreiche Möglichkeiten zur Auswahl [34].

Um das Wundgebiet zu schützen, und um Infektionen zu vermeiden, werden Wundverbände angelegt. Im Falle einer primär heilenden Wunde wird diese mit sterilen Kompressen oder Pflastern bedeckt. Durch regelmäßige Wundkontrollen und die Auswechslung des Verbandes, können Komplikationen vermieden werden.

Sekundär heilende Wunden heilen durch Granulierung des freiliegenden Gewebes. Besonders hier ist es sehr wichtig, die Wunde gut vor Infektionen zu schützen. Möglich ist ein Débridement, welches chirurgisch durchgeführt wird [35]. Auch das Ausspülen, und somit die Reinigung der Wunde, ist möglich. Voraussetzung ist also, dass die Wunde sauber ist, um heilen zu können [36].

Weiter kann zwischen trockener und feuchter Wundbehandlung unterschieden werden. So werden primäre Wunden, Wunden die einfach abheilen, aber auch trockene Nekrosen mit einer Minderdurchblutung, durch eine trockene Wundbehandlung therapiert. Sekundär heilende und chronische Wunden hingegen sind in feuchtem Milieu besser therapierbar.

Als Wundauflagen stehen diverse Materialien zur Verfügung. Im Allgemeinen wird zwischen inaktiven (passiven), aktiven und interaktiven Wundauflagen unterschieden [13].

Inaktive Wundauflagen sind in der Lage, das Wundsekret aufzunehmen. Sie bieten allerdings kein Milieu, welches sich fördernd auf die Wundheilung auswirkt. Dazu gehören unter anderem Auflagen wie Gaze, Vliese oder auch Mullkompressen. Interaktive (hydroaktive) Wundauflagen sorgen dahingegen aktiv für ein besseres Wundmilieu, welches zu einer schnelleren Heilung führt. Der physiologische Heilungsprozess wird gewissermaßen durch die Wundauflage nachgeahmt. Hierzu gehören Auflagen wie Hydrokolloide, Hydrofasern, Hydrogele und auch Alginat.

Aktive Wundauflagen sollen die Heilung durch zugesetzte wundheilungsfördernde Wirkstoffe beschleunigen. Dies gelingt durch Substanzen wie Hyaluronsäure, Wachstumsfaktoren und auch Kollagene [37].

1.6 mRNA-basierte Therapie

Seit langem forscht man in der Wissenschaft daran, über die Einschleusung von DNA und RNA in die Körperzellen, Prozesse in der Zelle steuern zu können. Dadurch sollen Krankheiten therapiert werden, die auf einen Mangel oder das Fehlen eines bestimmten Proteins zurückzuführen sind [38]. Für die Entwicklung von Impfstoffen, zur Therapie von Allergien, in der Krebsimmuntherapie und viele weiteren Bereichen kann die mRNA Therapie in Zukunft potentiell angewendet werden [39]. Ebenso wird versucht über eingeschleuste Gene die Heilung von Wunden zu fördern, indem die für die DNA/RNA-kodierenden gewünschten

Proteine in der Zelle hergestellt werden. Problematisch ist hierbei sowohl die gezielte Applikation in die Zelle, als auch die Reaktion des Körpers auf die Fremdeinwirkung.

1.6.1 Herstellung der mRNA

Die in-vitro Synthese der gewünschten mRNA wird im Wesentlichen über drei Schritte erreicht. Im ersten Schritt wird die gewünschte DNA-Sequenz mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR=polymerase-chain-reaction) vervielfältigt. Über einen eingesetzten Rückwärtsprimer erhält die DNA-Sequenz einen Poly-A-Schwanz. Nach Aufreinigung der DNA kann die Konzentration am Spektrometer gemessen werden, wobei diese ungefähr 300 µg/ml liegen sollte. In der anschließend durchgeführten in-vitro Transkription wird die DNA in RNA umgeschrieben. Hierfür werden modifizierte und nicht-modifizierte Nukleotide eingesetzt. Nach 3 h Inkubation kann durch die Zugabe einer DNase die noch vorhandene DNA enzymatisch abgebaut werden, so, dass nur noch mRNA vorliegt. Nach einer zweiten Aufreinigung wird die mRNA schließlich mit antarktischer Phosphatase behandelt. Diese bewirkt, dass 5'Triphosphate entfernt werden, welche ansonsten durch RIG-I-Rezeptoren der Zelle erkannt und zu Immunantworten führen würden. Am Anschluss kann die Qualität der synthetisierten mRNA mittels Gelelektrophorese kontrolliert werden [40].

1.6.2 mRNA-basierter Gentransfer

Die Möglichkeit der mRNA Transfektion bietet im Gegensatz zur DNA Transfektion einige Vorteile. Sie muss im Gegensatz zu DNA nicht die Zellkernmembran überwinden, da die Translation direkt im Zytosol der Zelle stattfindet [41]. So entfällt der Schritt der Transkription. Außerdem besteht das Risiko einer Insertionsmutagenese nicht [42], bei dem ein DNA-Fragment in das Genom eingebaut wird, wobei die Funktion des geschädigten Gens im Genom

ausfällt. Ebenso entfällt der Einsatz eines ansonsten benötigten Promotors. Weitere Vorteile sind, dass die Anwendung wiederholt werden und exogen aufgenommene mRNA auch bei sich nicht teilenden Zellen eingesetzt werden kann [43]. Für die Transfektion von mRNA stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung, wobei es bei einigen schwierig sein wird, die Therapie am Tiermodell oder auch später am Menschen durchführen zu können. Erst seit den letzten zwei Jahrzehnten wird der Vorgang der mRNA-Freisetzung in Zellen untersucht [44]. **Abbildung 2** zeigt hierbei anschaulich, dass die Zahl der Publikationen, die sich mit dem Thema der nicht viralen mRNA-Freisetzung beschäftigt haben, stark angestiegen ist.

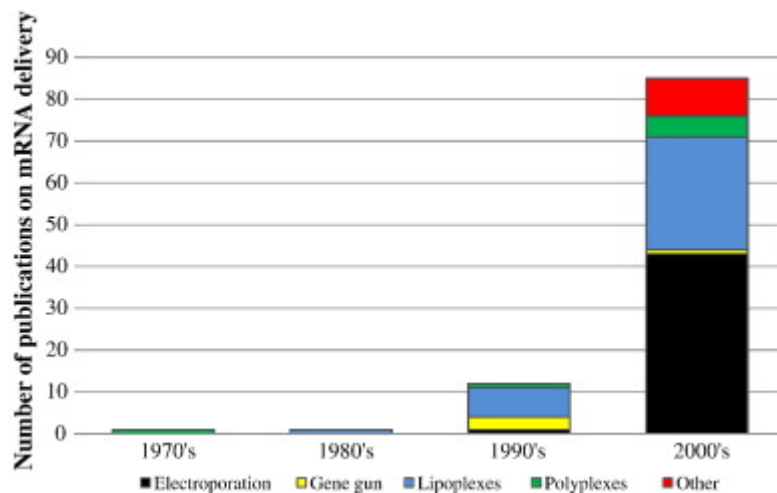


Abbildung 2: Zahl der Publikationen von nicht-viraler mRNA-Freisetzung [44]. Ab dem Jahr 2000 wird besonders die Technik der Elektroporation und die Freisetzung der mRNA über Lipoplexe verfolgt.

Im Gegensatz zur DNA gibt es jedoch auch Nachteile in der Verwendung von mRNA. mRNA stellt ein instabiles Molekül dar, welches im Zytoplasma der transfizierten Zelle schnell von Enzymen abgebaut werden kann. So hält die Produktion der mRNA-kodierenden Proteine maximal über ein paar Tage an [45, 46]. Der Grund für die Instabilität ist die Hydroxylgruppe des zweiten Kohlenstoffatoms am Zuckerrest des Moleküls [44]. Um die mRNA erfolgreich vor Nukleasen im Cytoplasma zu schützen, kann exogen hergestellte und zugeführte mRNA genau wie mRNA, die im Zellkern hergestellt wird, durch eine CAP-Struktur stabilisiert werden. Hierfür wird ARCA (anti-reverse-cap-analogue), eine

modifizierte CAP-Struktur verwendet, welche es möglich macht, dass bis zu 100% der mRNA translatiert werden [47]. Ebenso kann über eine Poly-A-Sequenz, welche mindestens 20 Adenosinmoleküle enthält, eine erhöhte Halbwertszeit der mRNA erzielt werden [48-50]. So korreliert die Länge des Poly-A-Schwanzes mit der mRNA Expression [51, 52]. Die meisten eukaryontischen mRNA-Moleküle enthalten sogenannte 3' untranslatierte Bereiche (3'UTRs). Dazu gehören beispielsweise die Adenylat-Uridylat-reichen Elemente (ARE), welche für die Instabilität der mRNA verantwortlich gemacht werden [53]. Sie sind wesentlich an der Destabilisierung der mRNA beteiligt oder verstehen sich als regulatorische Elemente [54].

1.6.3 Transfektionsarten

Da die spontane Aufnahme freier mRNA in Zellen sehr gering ausfällt, muss die mRNA-Aufnahme durch Vektoren erhöht werden. Hier stehen virale und nicht-virale Vektoren zur Verfügung. Derzeit werden virale Vektoren jedoch meist nur für pDNA verwendet. Die Genexpression nach viraler Transfektion ist schwer kontrollierbar, ebenso kann der Virus sein Genom in das der Wirtszelle einbauen [44]. Einen Überblick des nicht-viralen Gentransfers veranschaulicht die **Abbildung 3**.

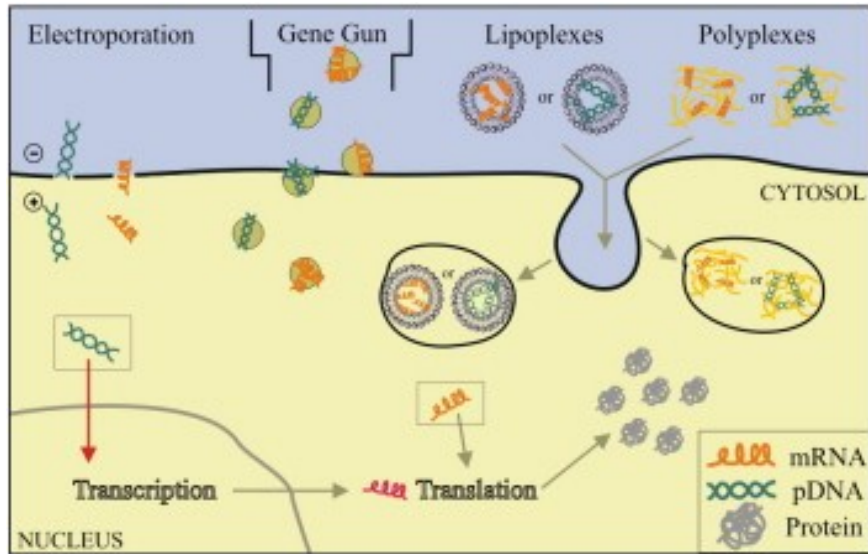


Abbildung 3: Nicht-virale Freisetzungsmöglichkeiten von mRNA in die Wirtszelle [44]. Elektroporation, Genkanonen oder Lipo- und Polyplexe als Methode, Genmaterial in eine Zelle einzuschleusen. Die pDNA wird zuerst im Zellkern transkribiert, bevor die mRNA im Zytosol translatiert werden kann.

Für die Freisetzung von mRNA kommen verschiedene Möglichkeiten zum Einsatz:

1. viraler Gentransport: Für den Gentransport werden rekombinante Viren verwendet. Dafür werden einige oder auch alle virale Gene durch die therapeutisch zu nutzenden Gene ersetzt. Die meisten Viren enthalten DNA oder RNA, welche in die Zielzelle eingeschleust werden. Vorteilhaft an RNA-Viren ist, dass die RNA nicht die Zellkernmembran überwinden muss. Sie wird direkt im Zytoplasma an den Ribosomen translatiert und hat somit einen entscheidenden Vorteil im Vergleich zur DNA. Für den Gentransport über RNA-Viren werden vor allem Alphaviren, wie Sindbis und Semliki-Forest-Virus, aber auch Picornaviren und Flaviviren verwendet [43]. Allerdings ist die Genexpression nach erfolgter Transfektion schwer kontrollierbar. Transfizierte DNA kann dauerhaft in das Genom des Wirts eingebaut werden und die Herstellung der Viren zur Nutzung für Transfektionszwecke ist kostenintensiv und sehr zeitaufwendig [44].

2. Elektroporation: Bei der Methode der Elektroporation, welche eigentlich nur für den Einsatz in In-vitro Studien entwickelt wurde, wird die Zellmembran über eine angelegte Spannung permeabel. Das heißt, dass die mRNA, die sich in einer Lösung befindet, welche die Zellen umgibt, durch die Zellmembran in die Zelle aufgenommen wird. Die angelegte Spannung birgt jedoch auch die Gefahr, dass die Zellen geschädigt werden, oder sogar sterben können [55]. Auch hier ist die Toxizität bei der mRNA-Freisetzung deutlich geringer als die bei der pDNA-Freisetzung, da eine höhere Spannung angelegt werden muss, um auch die Membran des Zellkerns für die pDNA permeabel zu machen [56].

3. Gene Gun (Genkanone): Eine weitere Möglichkeit, mRNA oder DNA in die Zelle zu schleusen, kann über den Mechanismus der Genkanone gelingen. Hierbei werden Metallteilchen (meist Gold) mit mRNA beschichtet und mit hoher Geschwindigkeit auf die Zellen geschossen. Erreicht das beschichtete Teilchen das Zytoplasma der Zelle, wird die mRNA freigesetzt [44, 57]. Die Technik wurde bereits erfolgreich in in-vitro und in-vivo Studien eingesetzt. Sohn et al. nutzten diese Möglichkeit, um hEGF- (human epithelial growth factor) mRNA zu Wundheilung an Ratten zu testen. Ebenso ist es Ihnen gelungen, GFP (green fluorescent Protein) mRNA mittels einer Genkanone erfolgreich in Zellen zu transfizieren [58].

4. Lipo- und Polyplexe: Die negativ geladenen Nukleinsäuren bilden mit positiv geladenen Lipiden Lipo- oder Polyplexe. Dieser Komplex kann mit der negativ geladenen Zellmembran fusionieren, wobei so die mRNA/pDNA über Endozytose in die Zelle aufgenommen werden kann [59, 60]. Sie sind technisch einfach herstellbar, zeigen eine hohe Reproduzierbarkeit und sind relativ gering toxisch [61]. Allerdings können diese positiv geladenen Komplexe in-vivo Reaktionen mit negativ geladenen Serumproteinen im Blut eingehen, weswegen ihre Verweildauer begrenzt bleibt [62]. Um dieses Problem zu lösen, werden die kationisch geladenen Lipide mit Polyethylenglykol (PEG) verknüpft, welches sie vor einer raschen Elimination im Blut schützt [63]. Ebenso werden Polyplexe mit Polyethylenglykol verknüpft, um sie vor Aggregation zu schützen. Zudem wird deren Toxizität verringert, die Zirkulationszeit kann erhöht und der zielgerichtete Gentransfer gesteigert werden [64, 65].

Um die Effizienz der Lipoplexe zu steigern, wird Cholesterol zur Bildung von Lipoplexen verwendet, welche eine Verbesserung der Transfektionseffizienz für in-vitro und in-vivo Experimente zeigt [66, 67]. Ebenso reduziert Cholesterol die Bindung von Serumproteinen an die Lipoplexe [68].

Des Weiteren wurden die Cholesterolmoleküle durch Derivate ersetzt, was wiederum zu einer deutlichen Steigerung der Effizienz geführt hat. Eines der bekanntesten Cholesterolderivate ist DC-Chol (3β -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]-cholesterol) [69], welches kombiniert mit anderen Lipiden DNA auf effiziente Weise in die meisten Zelllinien freigesetzt werden kann. Neben DC-Chol wurden auch viele weitere Cholesterolderivate synthetisiert und auch erfolgreich in Transfektionen getestet. Eine der meist genutzten Substanzen für die Herstellung von Lipoplexen stellen heute DC-Chol und DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamine) dar [70].

Viele Transfektionsreagenzien haben unterschiedlichste Effizienzen im Verhältnis zu deren Toxizitäten. **Abbildung 4** zeigt dieses Verhältnis anschaulich. Demnach haben chemische und elektrische Transfektionsmethoden eine relative Bandbreite was deren Effektivität angeht, sind aber auch sehr toxisch im Vergleich zu nackter DNA, den Polymeren oder zur Mikroinjektion. Die Methode der Mikroinjektion vereint dem Schaubild nach, eine hohe Effektivität mit einer relativ niedrigen Toxizität.

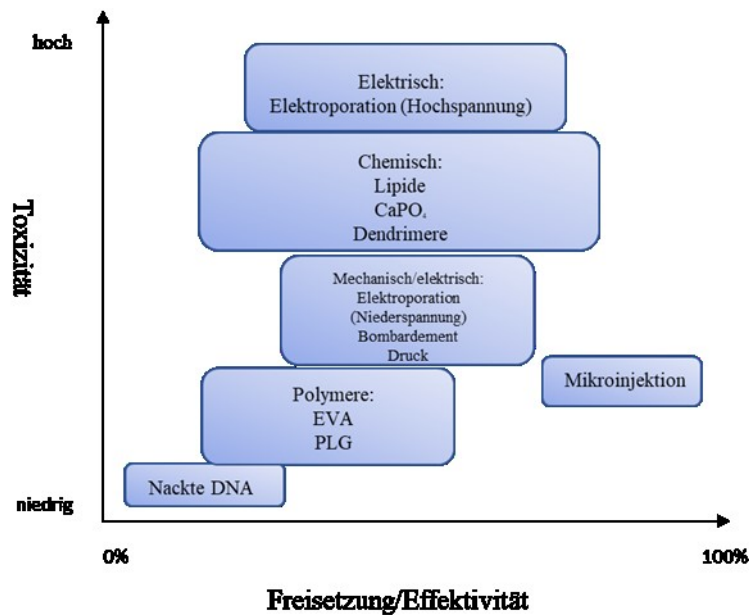


Abbildung 4: Toxizität und Effektivität verschiedener Transfektionsmethoden modifiziert nach Luo, D. and W.M. Saltzman [71].

1.6.4 Nebenwirkungen der mRNA-Therapie

Ein weiteres Problem, welches bei der Transfektion auftritt ist, dass durch freies Genmaterial oder Genmaterial in Kombination mit einem Transfektionsreagenz eine immunologische Reaktion des zu transfizierenden Gewebes hervorgerufen wird. Es kommt zur Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (TLR) und somit zur Ausschüttung von Zytokinen. So wurden sowohl beim Menschen, als auch bei der Maus zusammen 13 TLR entdeckt. Insbesondere TLR3, TLR7 und TLR8 sind für die Erkennung fremder mRNA verantwortlich [72]. Sogar die verschiedenen Nukleoside der mRNA aktivieren TLR unterschiedlich stark. Uridin-reiche einzelsträngige mRNA aktivieren TLR7 [73], wohingegen doppelsträngige mRNA TLR3 aktiviert [74]. mRNA kann verschiedene Sekundärstrukturen annehmen, sogenannte Haarnadeln bilden oder auch doppelsträngig sein. In vorklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die mRNA Freisetzung die Produktion des Interferon- α , des IL-6, des Tumornekrosefaktor- α und des Interferon- γ -induzierte Protein 10 ansteigen lässt [39]. Ebenso muss das Organ, sei es die Leber, Niere oder Lunge in präklinischen Studien auf deren Wechselwirkung mit der mRNA-

Freisetzung untersucht werden, bevor mRNA-Therapeutika in-vivo eingesetzt werden können. Zudem muss gewährleistet sein, dass die mRNA nur in die gewünschten Zellen eines Gewebes freigesetzt wird [39].

Um zumindest die in-vitro ausgelöste Immunreaktion zu vermeiden, werden modifizierte Nucleoside eingesetzt. So wurde gezeigt, dass 2'-O-Methylnucleoside, 5-Methylcytidin, N⁶-methyladenosin, 5-Methyluridin, Pseudouridin und 2-Thiouridin die Aktivierung der TLR 3,7 und 8 verringert [75]. Dadurch kann deren Einsatz aber auch zur Steigerung der Translation oder auch zur besseren Stabilität der mRNA beitragen. Obwohl durch diese Methode die Immunreaktion von Zellen in-vitro abgeschwächt werden kann, gibt es für den Einsatz der mRNA als Therapeutika für den klinischen Einsatz dennoch zahlreiche ungelöste Probleme, welche mit der deutlich komplexeren Struktur des menschlichen Körpers zusammenhängen. Viele Mechanismen und die Reaktion des Körpers auf die Freisetzung der mRNA sind teilweise noch wenig erforscht [39].

1.7 In-vitro Wundheilungsmodelle

Um im Labor möglichst unter Gegebenheiten arbeiten zu können, welche menschlicher Haut nahe kommen, wird derzeit stark an der Herstellung dreidimensionaler Hautmodelle gearbeitet. Diese haben den Vorteil, dass keine humane Haut zu Versuchszwecken benötigt wird. Sie können so in Zukunft in zahlreichen Forschungsgebieten als Ersatz für menschliche Haut dienen, beispielsweise in der Entwicklung neuer Wundheilungskonzepte, in der Untersuchung von Kosmetika und transdermalen Medikamenten aber auch für dermatologische Zwecke.

Es wird zwischen Gerüst-freien (Scaffold-free) und Gerüst-basierenden (Scaffold-based) Technologien unterschieden. Am einfachsten und kostengünstigsten sind Zellsphäroide, die über die sogenannte Hanging-drop-Methode hergestellt werden. Sie besitzen kein Gerüst, in welches die Zellen

eingebettet sind, sondern bilden mit Hilfe der Schwerkraft, kugelförmige Sphäroide aus. Die Zellen sind so in direktem Kontakt zueinander und bilden auch Komponenten der extrazellulären Matrix aus [76].

Im Gegensatz dazu gibt es Technologien, ein 3D-Hautmodell herzustellen, die auf einem Gerüst basieren. Reijnders et al. beschreiben in ihrer Publikation die Herstellung eines dreidimensionalen Hautmodells mit Hilfe von MatriDerm (Med Skin Solutions Dr. Suwelack AG), welches aus den Kollagenen I, III, V und Elastin besteht. In diesem Gerüst werden anschließend erst Fibroblasten kultiviert, später, in einer zweiten Schicht, Keratinozyten [77]. Eleanor Knight und Stefan Przyborski beschreiben die Herstellung Gerüst-basierender Hautmodelle mit Hilfe von Hydrogelen, aber auch die Herstellung fibröser Gerüste über Elektrosponning und die Herstellung poröser Gerüste [78]. Als Materialien dienen außerdem viele weitere Substanzen, wie Keramiken und bioaktive Gläser, Metalle und biologisch-synthetische Hybride [79].

Viele Vorteile und Eigenschaften, die zweidimensionale Modelle nicht bieten können, machen die 3D- Zellkultur in Zukunft sehr interessant. Sie haben sich als realistische Methode zu in-vivo Versuchen etabliert und machen es möglich, unter natürlichen Bedingungen zu arbeiten.

1.8 Wundheilungstherapie mit Hilfe von Wachstumsfaktoren

Damit Hautwunden möglichst schnell heilen, ist es wichtig, dass die Reepithelisation ausgehend von den Wundrändern zügig voranschreitet. Vor allem Keratinozyten sind an diesem entscheidenden Schritt beteiligt, welche durch Wachstumsfaktoren und Zytokine gesteuert werden. Diese werden von in die Wunden eingewanderte Zelle ausgeschüttet und sind somit an der Wundheilung maßgeblich beteiligt.

Grundsätzlich sind Wachstumsfaktoren in allen Stadien der Wundheilung beteiligt. Beginnend mit der Inflammation sind sie an der Bildung von Granulationsgewebe, der Reepithelisation, der Neubildung der extrazellulären

Matrix durch Anregung der Bildung von Kollagen und Fibronectin und am Remodelling beteiligt [80, 81]. Sie induzieren außerdem die Proliferation und Migration von Zellen im Wundbereich. Des Weiteren tragen sie zur Angiogenese bei.

Aufgrund dieser positiven Eigenschaften der Wachstumsfaktoren versucht man seit Jahrzehnten die Wundheilung durch Zugabe exogener Wachstumsfaktoren zu steuern und zu beschleunigen. So sollen sie zukünftig begleitend zur herkömmlichen Therapie verwendet werden. Viele in-vitro Versuche belegten so deren Funktion, zeigten jedoch auch, dass bestimmte Kombinationen an Wachstumsfaktoren eine bessere Wirkung erzielten, als nur einer alleine [82]. Die Migration von Keratinozyten konnte in sogenannten scratch wound assays bewiesen werden, wobei ein gleichmäßig durch eine Pipettenspitze hervorgerufener Kratzer einem Zell-Monolayer zugefügt wird.

Da die Wachstumsfaktoren in chronischen Wunden jedoch schnell von vorliegenden Enzymen abgebaut werden, stellt dies ein weiteres Problem in der Applikation und Sicherstellung des Erhalts und der Funktion der Wachstumsfaktoren in der Wunde dar. Daher wird an zahlreichen neuen Freisetzungsverfahren geforscht, wie an der Freisetzung über Polymere aber auch über Adenoviren [18], um dieses Problem zu lösen. Neue Konzepte sollen eine kontrollierte Freisetzung der Wachstumsfaktoren am gewünschten Ort möglich machen. Dies soll über polymerbasierte Mikro- und Nanobestandteile, lipidbasierte Nanopartikel oder faserartige Strukturen, aber auch durch sogenannte „Scaffolds“ und Hydrogele möglich gemacht werden [81].

Das erste Medikament, welches auf der Wirksamkeit des Wachstumsfaktors rhPDGF-BB (recombinant human platelet-derived growth factor BB) basiert, kam mit dem Namen Regranex® auf den Markt. In Gelform angewendet, soll in einer Dosis von 100µg/g pro Tag die komplette Heilung einer Wunde erhöhen [83]. Dafür wurden 1992 von Robson et al. eine Studie mit 45 Patienten durchgeführt, welche an Druckulzera litten [84]. Sie wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an rhPDGF oder einem Placebo behandelt. Dabei zeigte sich

eine Reduktion der Wundgröße der mit rhPDGF behandelten Patienten verglichen zu den mit Placebos behandelten Patienten.

Ebenso wurde unter dem Namen Regen-D™ der rekombinante humane epidermale Wachstumsfaktor rhEGF in klinischen Studien bis zur Marktreife in Indien untersucht. Dieses Medikament soll die Dauer der Abheilung chronisch ulzerierender diabetisch bedingter Wunden senken [85].

1.9 Ziel der vorliegenden Arbeit

In dieser Arbeit sollte in verschiedenen Versuchen der positive Effekt des Wachstumsfaktors KGF auf die Wundheilung sichergestellt werden.

Die mRNA, welche Wachstumsfaktoren kodiert, soll künftig in der Behandlung von Wunden eingesetzt werden. Über die Transfektion eukaryontischer Zellen mittels mRNA, welche den entsprechenden Wachstumsfaktoren kodiert, wird das gewünschte Protein in der Zelle hergestellt und soll dort die für die Wundheilung gewünschte Wirkung positiv beeinflussen. Da die mRNA-Therapie jedoch auch Nachteile birgt, wie immunologische Auswirkungen des betroffenen Organismus oder die kontrollierte temporäre Produktion der Wachstumsfaktoren in der Zelle, muss zukünftig an der Optimierung dieser Behandlungsstrategie gearbeitet werden, um sie als mögliche Alternative oder in Kombination zu herkömmlichen Therapien nutzen zu können.

Zunächst sollte in einfachen in-vitro Versuchen die Transfektion von KGF mRNA in verschiedene immortalisierte Zellarten untersucht werden. Des Weiteren sollte die Transfektion optimiert werden, indem verschiedene Transfektionsreagenzien und mRNA-Konzentrationen eingesetzt werden, wobei die Transfektionseffizienz hoch und die Viabilität der Zellen erhalten werden soll.

Im Anschluss sollten die gewonnenen Erkenntnisse der zuvor durchgeführten Versuche auf die Transfektion primärer humaner Keratinozyten angewandt werden. Ebenso sollte ein einfaches 3D-Hautmodell, in Form von Sphäroiden, die im Hanging drop Verfahren kultiviert werden, hergestellt und transfiziert werden. In weiteren Versuchen sollte zudem humane Haut transfiziert und die Wirkung von KGF auf die Reepithelisation der Wundheilung an den ex-vivo Modellen untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Im folgenden Kapitel sind die für die Versuche verwendeten Materialien aufgelistet.

2.1.1 Reagenzien & Chemikalien

Tab. 3: Verwendete Reagenzien, bzw. Chemikalien.

Agarose	Lonza AG, Basel, (CH)
Ampuwa Spüllösung 1000 ml Plastipur	Fresenius Kabi France, Sèvres (F)
Antarctic Phosphatase Kit	New England Biolabs, Ipswich (USA)
ARCA, 3'-0-Mem7G(5')ppp(5')G RNA Cap Structure Analog (10 mM)	New England BioLabs, Ipswich (USA)
CASY-Ton	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, (D)
Cell-Fix	BD Biosciences, Heidelberg, (D)
DC-Cholesterol HCl, 3 β -[N-(N',N'- Dimethylaminoethane)- carbamoyl]cholesterol hydrochloride	AVANTI POLAR LIPIDS, INC, (USA)
Dispase II, Protease	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, (D)
DMSO, Dimethylsulfoxide	Merck Millipore, Darmstadt (D)
DNA Marker, peqGOLD Range Mix DNA Ladder (100-10000 bp)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, (D)
DOPE, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3- phosphoethanolamine	AVANTI POLAR LIPIDS, INC, (USA)
FACS Clean Solution	Becton, Dickinson and Company - BD Biosciences (USA)
FACS Flow Solution	Becton, Dickinson and Company - BD Biosciences (USA)

FACS Rinse Solution	Becton, Dickinson and Company - BD Biosciences (USA)
FACSscan	Becton Dickinson Immunocytometry Systems, 2350 Qume Drive, San Jose, California 95131-1807, (USA)
FCS (Fetales Kälberserum)	Gibco® Life Technologies™ GmbH, Darmstadt, (D)
Formamid	Merck KGaA, Darmstadt, (D)
GelRed, GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain	Biotium Inc., Hayward (USA)
Lipofectamin 2000 (Lipofectamine)	Invitrogen™ Life Technologies® GmbH, Darmstadt (D)
Methycytidin, 5-Methylcytidine-5'Triphosphate (10 µmol)	TriLink BioTechnologies, San Diego (USA)
MTT Thiazolyl-blautetrazolium-bromid	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
Nuclease- free water	Qiagen, Hilden, (D)
Penicillin/Streptomycin (100x), 10000 U Penicillin/ 10000 µg Streptomycin/ml	Gibco® Life Technologies™ GmbH, Darmstadt, (D)
Pseudouridin, Pseudouridine-5'Triphosphate (10 µmol)	TriLink BioTechnologies, San Diego (USA)
RNAse Inhibitor, RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Scientific, Karlsruhe (D)
RPMI 1640 Medium, no glutamine, no phenol red, 500 ml	Gibco® Life Technologies™ GmbH, Darmstadt (D)
Trypsin, 0.05% Trypsin-EDTA (1X)	Gibco® Life Technologies™ GmbH, Darmstadt (D)
0,5 – 10 kb RNA Marker	Invitrogen™ Life Technologies® GmbH, Darmstadt, (D)
6x Ladepuffer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, (D)

2.1.2 Geräte

Tab. 4: Verwendete Geräte.

Axiovert 135-Mikroskop	Zeiss (D)
CASY® Cell Counter+Analyzer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, (D)
Durchflusszytometrie	Becton Dickinson Immunocytometry Systems, 2350 Qume Drive, San Jose, California 95131-1807, (USA)
Dynatech MR7000 Reader	Dynatech, (USA)
Inkubator, Incubator TI-O	Incutec GmbH, Mössingen (D)
Konfokalmikroskop	Zeiss, (D)
Konfokalmikroskop	Zeiss, (D)
Mikroskop, Axiovert 40CFL	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena (D)
Mini Extruder Set: Mini Extruder Heating Block 2 O-Rings 2 Gas Tight syringes 100 Polycarbonate Membranes 100 Filter supports	AVANTI POLAR LIPIDS, INC, (USA)
Mithras LB 940 Mikroplattenleser	Bertold Technologies GmbH & Co. KG, (D)
Photometer	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Schüttler SHAKER DRS-12	neoLab®, Leonberg (D)
Sterilwerkbank, Herasafe Heraeus	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl Genkingen, (D)
Thermocycler	Eppendorf AG, Hamburg, (D)
UV-Transilluminator	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, (D)

Vortex	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen (D)
Waage	Mettler-Toledo GmbH, Gießen (D)
Wasserbad, GFL 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel (D)
Zentrifuge, Varifuge 3.2RS	Heraeus Sepatech (D)

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tab. 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

BD Microlance 3; 27 G $\frac{3}{4}$ 0,4 x 19mm -	Becton, Dickinson and Company Limited, (IRL)
CASY Cup	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, (D)
Cell-Strainer (Porengröße 70 µm)	Corning, (USA)
DNA/Protein LoBind Tube	Eppendorf AG, Hamburg, (D)
Falcon, 50 ml	Greiner Bio.One GmbH Frickenhausen, (D)
Falcons, 15 ml, 50 ml	Greiner Bio.One GmbH Frickenhausen, (D)
Filter supports, 100/Pack	AVANTI POLAR LIPIDS, INC, (USA)
Küvetten für Photometer, UVette® 220-1600nm	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Nunc Maxisorb 96 well plate	Nunc, (DNK)
Pasteur capillary pipettes	WU MAINZ, (D)
Petrischalen, 94/16 MM, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (D)
Pipettenspitzen mit Filter, TipOne® 10 µl, 100 µl, 1000 µl	STARLAB GmbH, Hamburg, (D)
serologische Pipetten	Corning, (USA)

Spritzen; Omnifix-H, Heparin 10.000 I.U., 1ml	B. Braun Melsungen AG, 34209 Melsungen, (D)
Track-Etch Membrane 100 nm/ 200 nm	Whatman®, (USA)
Zellkulturflaschen T75	Corning, (USA)
Zellkulturflaschen, T25, T75, T125	Corning, (USA)
1,5ml DNA LoBind Tube	Eppendorf AG, Hamburg (D)
12-well-Platte, cell culture plate	Corning Inc. Life Sciences, Kentucky (USA)

2.1.4 Medium und Lösungen

Tab. 6: Verwendete Medien, bzw. Lösungen.

DMEM (1X) +4,5 g/L DGlucose + L-Glutamine, Penicillin/Streptomycin (100x), FCS (Fetales Kälberserum)	Gibco® Life Technologies™ GmbH, Darmstadt (D)
DMEM, DMEM (1X) + 4,5 g/L DGlucose + L-Glutamine	Glucose + L-Glutamine Gibco® Life Technologies™ GmbH, Darmstadt, (D)
Formaldehyd-Lösung min. 20 %, stabilisiert mit 10 % Methanol	Merck KGaA, Minneapolis (USA)
KGM2 Medium (Keratinocyte Growth Medium 2) + Supplement Pack: <ul style="list-style-type: none"> - Rinderhypophysenextrakt - Epidermaler Wachstumsfaktor (rekombinant human) - Insulin (rekombinant human) - Hydrokortison - Epinephrin - Transferrin, holo (human) - CaCl₂ 	PromoCell GmbH, Heidelberg, (D)

Opti-MEM®	Gibco® Life Technologies™ GmbH, Darmstadt (D)
PBS, Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Gibco® Life Technologies™ GmbH, Darmstadt (D)
TBE Puffer (TRIS-Borat EDTA-Puffer) Herstellung von 1l, 10fach konzentriert, 0,8 g (89 mM) TRIS Base, 5,5 g (89 mM) Borsäure und 0,7 g (2 mM) EDTA-Na ₂ , pH = 8	
10x MEN (MOPS-EDTA Natriumacetat)-Puffer; 46,2 g (200 mM) MOPS, 4,1 (50 mM) Natriumacetat, 2,92 g (10 mM) EDTA	

2.1.5 Zelllinien/primären Zellen

Tab. 7: Verwendete Zellen.

HaCat Zellen (Human adult low Calcium high Temperature keratinocytes)	THG- Labor Tübingen
HEK 293 Zellen	THG-Labor Tübingen
Primäre Keratinozyten	Selbstständig im THG-Labor Tübingen isoliert

2.1.6 Plasmide

Tab. 8: verwendete Plasmide.

eGFP Plasmid	Eurofins Genomics, Ebersberg (D), eGFP-Basensequenz:
--------------	---

	<p>CCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGC TGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACC GATCCAGCCTCCGGACTCTAGAGGATCGAAC CCTTTTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACGA CTCACTATAGGGAAATAAGAGAGAAAAGAAG AGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGTG AGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTG GTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGAC GTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCG AGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGC TGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAA GCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGAC CACCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGC CGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACT TCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGT CCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGAC GGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGT TCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGA GCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGG CAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAAC TACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGA CAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTC AAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCG TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACAC CCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCC CGACAACCACTACCTGAGCACC</p>
KGF Plasmid	<p>Eurofins Genomics, Ebersberg (D), KGF-Basensequenz: TTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACGACTCA CTATAGGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTA AGAAG AAATATAAGAGCCACC ATG CAC AAG TGG ATC CTG ACC TGG ATA CTG CCC ACT</p>

CTT CTG TAT CGC AGC TGT TTT CAC ATT ATC
TGC CTT GTG GGA ACC ATT AGC TTG GCC
TGT AAC GAC ATG ACT CCG GAG CAG ATG
GCC ACC AAT GTG AAT TGT TCC TCA CCA
GAA CGC CAT ACA CGG AGT TAT GAC TAC
ATG GAA GGA GGG GAT ATT AGG GTG AGG
AGA CTC TTC TGC AGA ACA CAG TGG TAT
CTC CGG ATC GAC AAA CGT GGG AAA GTC
AAG GGC ACC CAA GAG ATG AAG AAC AAC
TAC AAC ATC ATG GAG ATT CGA ACG GTC
GCA GTT GGC ATA GTG GCC ATC AAA GGA
GTA GAG TCC GAG TTC TAT CTG GCG ATG
AAT AAG GAG GGG AAA CTG TAC GCT AAG
AAA GAA TGC AAT GAA GAT TGC AAC TTC
AAA GAA CTC ATC TTG GAG AAT CAC TAC
AAC ACT TAC GCT TCT GCT AAG TGG ACG
CAT AAT GGT GGT GAG ATG TTT GTG GCA
CTG AAC CAG AAG GGC ATC CCT GTT AGA
GGC AAG AAA ACC AAG AAG GAA CAG AAA
ACA GCC CAT TTT CTG CCC ATG GCA ATT
ACA
TAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGG
CCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTGTAC
CTCTTGGTCTAATTTGAATAAAGCCTGAGTAG
GAAGTGAGGGTCTAGAACTAGTGTCGACGC

2.1.7 Kits

Tab. 9: verwendete Kits.

HotStar HiFidelity Polymerase Kit	Qiagen GmbH, Hilden, (D)
Human FGF-7 ELISA Kit	Sigmaaldrich, St. Louis, (USA)
MEGAscript® T7 Transcription Kit	Ambion® Life Technologies® (USA)
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, (D)
Phenion Ft skin model kit Set: 6 Hautmodelle 6 sterile Abstandhalter 6 kleine sterile Petrischale (35/10 mm) 2 große sterile Petrischalen (100/20 mm) 6 sterile Filterpaiere (approx. 20 x 20 mm) 1 steriles Filterpapier (approx. 55 x 65 mm) 250 ml ALL- (Air-liquid-interface) Medium, ready-to-use	Phenion, Henkel AG, Düsseldorf, (D)
RNeasy MinElute Cleanup Kit	Qiagen GmbH, Hilden (D)
Transit mRNA Transfection Kit	Mirus Bio LLC 545 Science Drive Madison, WI 53711 (USA)

2.1.8 Software

Tab. 10: verwendete Software.

GraphPad Prism, Version 6	GraphPad Software, La Jolla (USA)
Software	BD CellQuest Pro™, von BD Biosciences, Heidelberg, (D)

OriginPro 8.5.0 SR1	OriginLab Corporation, One Roundhouse Plaza, Northhampton, MA 01060 (USA)
AxioVision Rel. 4.8	Mikroskop-Software - Zeiss

2.2 Methoden

Im nachfolgenden Kapitel werden die durchgeführten Methoden beschrieben.

2.2.1 Zellkultur

Verwendete Zellen

Für die Transfektionsversuche wurden u.a. immortalisierte Zelllinien verwendet, welche die normale Begrenzung der Teilungsfähigkeit verloren haben.

Eingesetzt wurden HEK 293 Zellen (human embryonic kidney), bei denen es sich um menschliche embryonale Nierenzellen handelt und die HaCat-Keratinocyten-Zelllinie (human adult low calcium high temperature). Außerdem wurden primäre Keratinocyten aus humaner Haut isoliert und kultiviert.

Auftauen von Zellen

Für das Auftauen von Zellen wurden 10 ml warmes Zellmedium in einem 15 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Anschließend wurden die Zellen, welche in einem Cryoröhrchen im Gefrierschrank (-80°C) oder in flüssigem Stickstoff gelagert wurden, durch Schwenken des Cryoröhrchens im warmen Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde dann zügig in das mit Medium gefüllte Falcon überführt, um das enthaltene Dimethylsulfoxid (DMSO) zu verdünnen und so Zellschädigungen zu vermeiden. Die Zellsuspension wurde anschließend für 5 min bei 300 xg zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine Zellkulturflasche (T75) überführt, die zuvor mit 9 ml vorgewärmten Medium vorgelegt wurde. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ erfolgte ein Mediumwechsel.

Splitten von Zellen

Um eine gute Proliferation der Zellen zu gewährleisten, müssen diese bei 80 – 90 % Konfluenz in der Zellkulturflasche gesplittet werden. Hierzu wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsin/EDTA vom Flaschenboden abgelöst. Um das Ablösen der Zellen zu beschleunigen, wurde die Zellkulturflasche für 1 min in den Inkubator gestellt und anschließend unter dem Mikroskop kontrolliert.

Um die Wirkung des Trypsins zu neutralisieren, wurde das gleiche Volumen an Medium hinzugegeben, die Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 300 xg zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Die Hälfte der Zellsuspension wurde dann in eine Zellkulturflasche überführt, die zuvor mit Medium befüllt wurde. Anschließend wurden die Zellen wieder bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Einfrieren von Zellen

Für das Einfrieren der Zellen wurden die Zellen wie oben beschrieben abgelöst und die Zellzahl mittels der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Das Zellpellet wurde dann in frischem Medium so resuspendiert, dass in jeweils 900 µl Medium 2×10^6 Zellen gelöst waren. Die Cryoröhrchen wurden jeweils mit 900 µl der Zellsuspension und 100 µl DMSO befüllt, kurz vorsichtig invertiert und anschließend für 24 h im Mr.Frosty bei -80°C schonend um -1°C pro Minute eingefroren, bevor das Cryoröhrchen dann bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff gelagert wurde.

2.2.2 Herstellung der mRNA

Für die Herstellung der mRNA wurde ein Plasmid mit einer eGFP oder KGF Sequenz verwendet, wobei durch die PCR eine bestimmte Sequenz des Plasmids vervielfältigt wurde. Anschließend wurde das entstandene Produkt mit

dem MinElute Kit aufgereinigt. In einer anschließend folgenden in-vitro Transkription (IVT) wurde die erhaltene DNA in mRNA umgeschrieben und anschließend dephosphoryliert.

Amplifikation der Zielsequenz per PCR

Im ersten Schritt wurden die gewünschten Gensequenzen mittels HotStar HiFidelity Polymerase Kit von Qiagen vervielfältigt. Hierzu wurden in ein 0,5 µl Eppendorf-Gefäß 50 ng des Templates, 7 µl eines Forward Primers (0,7 µM), 7 µl des Reverse Primers (0,7 µM), 20 µl der Q-Solution, 20 µl eines 5x-Puffers und 1 µl der Polymerase (2,5U/µl) pipettiert. Der Ansatz wurde anschließend mit Nuklease-freiem Wasser auf 100 µl aufgefüllt.

Danach wurde das Eppendorf-Gefäß in den Thermocycler gestellt und die DNA vervielfältigt. Dafür wurde ein PCR- Programm verwendet, welches folgende sieben Schritte durchläuft:

1. 94°C – 3 min
2. 94°C – 45 sec
3. 55°C – 1 min
4. 72 °C – 1 min
5. Goto 2 30x
6. 72°C – 5 min
7. 4°C hold

Nach erfolgter PCR wurde die gewonnene DNA mit dem MinElute Kit von Qiagen aufgereinigt und anschließend mit 2 x 20 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert. Danach erfolgt die Konzentrationsmessung der DNA im Photometer und die Kontrolle im DNA – Gel. Dafür wurden 0,5 g Agarose in 50 ml TBE gegeben und in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Nachfolgend wurden 3 µl GelRed hinzugefügt und die Lösung in die Polymerisationsvorrichtung gegossen. Von der zu untersuchenden Probe (DNA) wurden dann 200ng mit 2 µl 6x Loading Dye vermischt und mit H₂O auf 12 µl aufgefüllt. Die Proben sowie der Marker wurden anschließend in die Tasche des

Gels pipettiert. Nach einstündigem Anlegen einer Spannung von 100 V wurden die Banden unter UV Licht visualisiert und am Computer dokumentiert. Die DNA-Länge des PCR-Produkts wurde dann mit Hilfe des Markers ermittelt. Die hergestellte DNA wurde bis zur Herstellung der mRNA bei -20°C gelagert.

In-vitro Transkription

Für die in-vitro Transkription (IVT) wurde das T7 MEGAscript Kit von Ambion verwendet. Hierzu wurden 4 µl ATP (7,5mM), 1 µl GTP (1,875mM), 3 µl 5'-Methylcytidin (7,5mM), 3 µl Pseudouridin (7,5mM), 10 µl ARCA (2,5mM) und 1,5 µg des Templates in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert. Außerdem 4 µl eines Reaktionspuffers, 4 µl des T7-Enzym-Mixes und 1 µl RNase Inhibitor. Der Ansatz wurde anschließend mit Nuklease-freiem Wasser auf 40 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und für 4 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde 1 µl TurboDNase zum Ansatz hinzugefügt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung mit und danach die Elution mit 2 x 20 µl.

Für die Dephosphorylierung wurde zum 40 µl mRNA- Ansatz 1µl Antarctic Phosphatase und 4,5 µl 10x Puffer zugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 1 h bei 37°C im Thermoblock.

Dann wurde die mRNA mit dem RNeasy MinElute Cleanup Kit von Qiagen erneut aufgereinigt und die Konzentration am Photometer bestimmt.

Nach der Aufreinigung und Konzentrationsmessung erfolgte die Qualitätskontrolle mittels Gelelektrophorese. Hierbei wurde überprüft, ob die mRNA die für die Zielsequenz spezifische Länge aufweist. Die Herstellung des Gels erfolgte wie zuvor beschrieben. Von der RNA Probe wurden 200 ng in insgesamt 3 µl Nuklease-freiem Wasser und 7 µl RNA-Ladepuffer aufgefüllt. Der Ladepuffer wurde zuvor aus 3,3 µl Formamid, 1 µl 37 % Formaldehyd, 1 µl 10x MEN und 1,7 µl 6x Loading-Dye pro verwendete Geltasche hergestellt.

Als RNA-Marker diente der RNA Ladder, von dem ebenfalls 3 µl mit 7 µl RNA-Ladepuffer versetzt wurden. Im Anschluss wurde sowohl die Probe, als auch der Marker für 10 Minuten bei 65°C denaturiert und danach in die Geltaschen

gegeben. Nach einer 1 h Laufzeit bei 100 V wurden die Proben unter UV-Licht analysiert und dokumentiert.

Die hergestellte mRNA wurde anschließend bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C eingefroren und gelagert.

2.2.3 Herstellung von DC-Chol/DOPE-Liposomen

Für die Herstellung der Liposome wurden die DC-Chol (25mg/ml) sowie die DOPE-Lösung (100mg/ml) im Verhältnis 1:2 in einem Schnappdeckelglas gemischt (DC-Chol, DOPE). Das Gefäß wurde für 24 h unter den Abzug gestellt, sodass das freiwerdende Chloroform verdampfen konnte. Am darauffolgenden Tag wurde die Lipidschicht, welche sich am Boden des Glases gebildet hatte, in einem Milliliter Nuklease-freiem Wassers gelöst. Dafür wurde die Lösung 15 min gevortext und das Glas für mindestens eine Stunde in das Ultraschallbad gestellt.

Anschließend wurde der Extruder vorbereitet. Das aus zwei Teilen, mit Gewinde verbundene und aus Metall bestehende Gehäuse (**Abbildung 5**), wurde auseinandergeschraubt. Auf die darin enthaltenen Teflonzylinder wurde je ein Filtersupport gelegt, welche durch einen weiteren Filter (zuerst 200 µm, dann 100 µm) getrennt sind. Diese wurden zuvor mit Nuklease-freiem Wasser befeuchtet. Anschließend wurden die Teflonzylinder in je ein Teil des Gehäuses gefügt und das Gehäuse zusammengeschaubt.

Die Liposomenlösung wurde dann in eine von zwei Spritzen aufgenommen, welche nun an das eine Ende des Metallmittelteils angebracht wurde. Auf der anderen Seite wurde eine leere Spritze adaptiert. Nun erfolgten 30 Zyklen, in denen die Lösung von einer in die andere Spritze gedrückt wurden. Dabei musste die Lösung jeweils die Filter passieren. Die ersten 30 Zyklen erfolgten mit dem 200 µm Filter, weitere 30 Zyklen erfolgten mit einem 100 µm Filter. Anschließend klarte die Lösung auf und konnte dann bei 4°C gelagert werden.

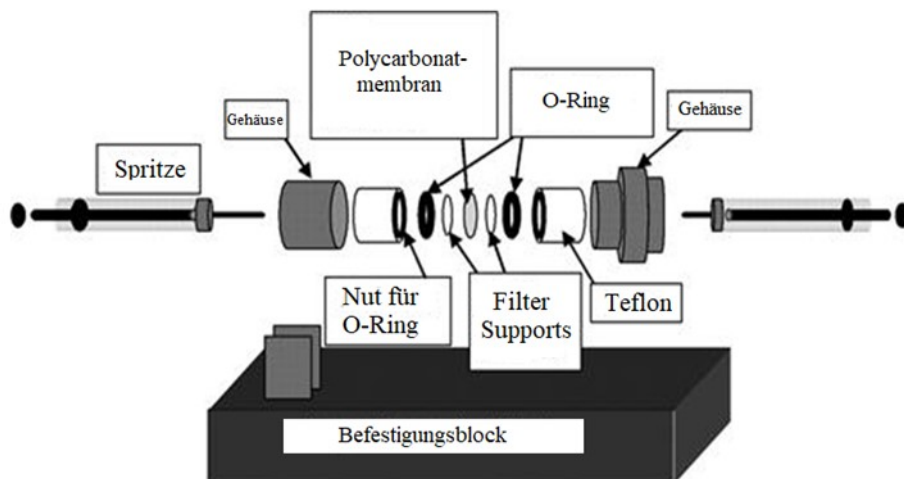


Abbildung 5: Extruder zur Herstellung der Liposome, modifiziert nach [86]: Erkennbar die 2 Spritzen, welche beidseitig an das Gehäuse angebracht werden. Im Gehäuse befindlich sowohl der Filter, als auch die Filter-Supports.

2.2.4 Transfektion von Zellen

Für die Versuche wurden sowohl Lipofectamin, die selbst hergestellten Liposome als auch das Transit-mRNA-Kit verwendet. Am ersten Tag wurden die Zellen (HaCat / HEK) vom Zellkulturflaschenboden gelöst und ausgesät.

Pro Well einer 12-well-Platte wurden entweder 150.000 der HaCat- Zellen oder der HEK- Zellen ausgesät und bei 37°C für 24h inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Transfektionsansätze in Eppendorf DNA LoBind Gefäßen (1,5ml) vorbereitet. Für die Transit Ansätze wurden je 500 µl des serumfreien KGM2 Mediums in einem Eppendorf Gefäß gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 µg mRNA, 1 µl des Boost Reagenz und 1 µl der TransIT-mRNA Reagenz. Die Ansätze wurden dann für 2-5 min inkubiert. Für die Liposomenansätze wurden 500 µl Hek-Medium und für die Lipofectaminansätze 500 µl OptiMEM in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß pipettiert. Anschließend wurden je 1 µl des Transfektionsreagenzes und 1 µg der mRNA zugegeben. Die Ansätze wurden dann für 20 min inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Ansätze, nach Absaugen des Medium, den Wells zugegeben. Die Zellen blieben entweder

unbehandelt, wurden mit jeweils einem Transfektionsmittel inkubiert oder wurden jeweils mit einem Transfektionsmittel und KGF oder eGFP mRNA transfiziert. Die Ansätze mit Lipofectamin wurden nach vier Stunden abgesaugt und durch DMEM (+ 1% Penicillin/Streptomycin, 10% FCS) ersetzt. Alle weiteren verblieben für 24 h. Anschließend wurde die eGFP-Expression unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht, die Zellzahl/Zellviabilität am CASY-Messgerät oder mittels MTT-Assay ermittelt. Des Weiteren wurde die eGFP Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie und die KGF Translation mittels ELISA analysiert.

Für die Isolierung von humanen Keratinozyten und nach Einwilligung der Ethikkommission an der medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Tübingen wurde die benötigte Haut von der Klinik für Hand-, Plastische, Rekonstruktive und Verbrennungschirurgie in Tübingen bereitgestellt. Nach Überführung der menschlichen Haut in einem mit Medium gefüllten Reaktionsgefäßes wurde diese anschließend im Labor mit steriler PBS-Lösung gewaschen. Im Labor wurde unter sterilen Bedingungen das Fettgewebe entfernt und die Haut anschließend in 1 cm² große Stücke mit dem Skalpell geschnitten. Danach wurden die Stücke in jeweils ein Well einer 12-Well-Platte gelegt. Um nun die Epidermis von der Dermis zu lösen, wurde jeweils 1 ml/Well der Dispase II- Lösung, die zuvor nach Herstellerangaben angesetzt wurde, hinzugegeben. Die Hautstücke wurden vollständig mit der Lösung bedeckt und für 17 h bei 4°C inkubiert.

Danach konnte die Epidermis von der Dermis mit sterilen Pinzetten gelöst werden. Die gesammelten Epidermisstücke wurden dann in einem Gefäß in 0,04% Trypsin/0,03% EDTA- Lösung für 9 Minuten bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Keratinozyten durch leichtes Auf- und Abpipettieren aus dem Zellverband gelöst und durch die Zugabe von Medium wurde die Wirkung der Trypsin/EDTA-Lösung inaktiviert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Hilfe eines Zellsiebes (70 µm Porengröße) von restlichen Zelltrümmern getrennt. Nun wurde die Zellsuspension bei 150 xg für 5 min zentrifugiert, das entstandene Zellpellet in KGM2- Medium resuspendiert und die Zellsuspension in eine Zellkulturflasche, gefüllt mit vorgewärmtem KGM2-Medium, gegeben.

2.2.5 Transfektion von Haut und Hautmodellen

Humane Haut

Hierfür wurde die Haut, aus Unterarmstraffungsoptionen, noch während der Operation an einem sterilen Tisch präpariert. Dafür wurde mit einem elektrischen Dermatome, welches in Breite und Tiefe einstellbar ist, die Haut so behandelt, dass Spalt-, deepithelialisierte- und Vollhaut gewonnen werden konnte. Mit zwei Stanzen, unterschiedlichen Durchmesser, wurde die Voll- bzw. Spalthaut in gleich große runde Stücke mit mittig gleich großem Loch gestanzt. Anschließend wurde die Haut in ein 50 ml Falcon, gefüllt mit DMEM (10% FCS, 1% P/S) gelegt, und konnte so ins Labor transportiert werden.

Hier wurde die deepithelialisierte Haut unter sterilen Bedingungen mit dem Skalpell auf die gleiche Größe zugeschnitten und anschließend wurden alle Hautstücke, sortiert nach Voll-, Spalt- oder deepithelialisierter Haut, in eine 12-Well Platte gelegt.

Unter der sterilen Werkbank wurden dann 3 Mal je 12 Eppendorf-Gefäße (1,5ml) für die Behandlungs- und Kontrollgruppen vorbereitet.

Ansätze:

1. 1 ml Opti-MEM
2. 1,5 ml DMEM (10% FCS, 1% P/S)
3. 1 ml Opti-MEM + 10 µl Lipofectamin
4. 1 ml DMEM + 10 µl Liposomen
5. 1 ml Opti-MEM + 2 µl Lipofectamin + 1 µg KGF mRNA
6. 1 ml Opti-MEM + 10 µl Lipofectamin + 10 µg KGF mRNA
7. 1 ml Opti-MEM + 2 µl Lipofectamin + 1 µg eGFP mRNA
8. 1 ml Opti-MEM + 10 µl Lipofectamin + 10 µg eGFP mRNA
9. 1,5 ml DMEM + 2 µl Liposome + 1 µg KGF mRNA
10. 1,5 ml DMEM + 10 µl Liposome + 10 µg KGF mRNA
11. 1,5 ml DMEM + 2 µl Liposome + 1 µg eGFP mRNA
12. 1,5 ml DMEM + 10 µl Liposome + 10 µg eGFP mRNA

Anschließend wurden die Ansätze bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert und dann dem jeweiligen, sich im Well befindenden Hautpräparat, hinzugegeben. Außerdem wurde der Zeitpunkt notiert und die Proben dann für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 4 Stunden wurde das Opti-MEM der Lipofectaminansätze gegen DMEM getauscht. Von jedem Well wurden 200 µl Medium in ein Protein-Low-Bind Eppendorf Gefäß gefüllt. Diese wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend im Gefrierschrank bei -80 °C gelagert. Die Dokumentation und das Einfrieren des Überstandes erfolgten nach 48, 72 und 96 Stunden. Ebenso erfolgte eine tägliche Fotodokumentation. Anschließend wurden die Hautproben in 4%igen Paraformaldehyd für 24 Stunden eingelegt, bevor sie dann in Paraffin eingebettet werden konnten. Zum Schluss erfolgte die Anfertigung von histologischen Präparaten, welche mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt wurden.

Hautmodelle

Für die Kultivierung der sechs Hautmodelle waren sowohl sterile Petrischalen, Abstandshalter und Filterpapiere, als auch Air-Liquid-Interface (ALI) Medium im Kit enthalten.



Abbildung 6: Vorbereitung zur Kultivierung der Hautmodelle, [87].

Die Abstandshalter wurden in jeweils eine kleine Petrischale gelegt und darauf jeweils ein Filterpapier platziert. Drei kleine Petrischalen wurden dann in eine große Petrischale gestellt. Anschließend wurden die kleinen Petrischalen mit fünf Millilitern ALI-Medium befüllt, so, dass das Filterpapier auf Höhe des Mediumpegels war (**Abbildung 6**). Auf jedes Filterpapier wurde dann ein Hautmodell gesetzt (**Abbildung 7**).

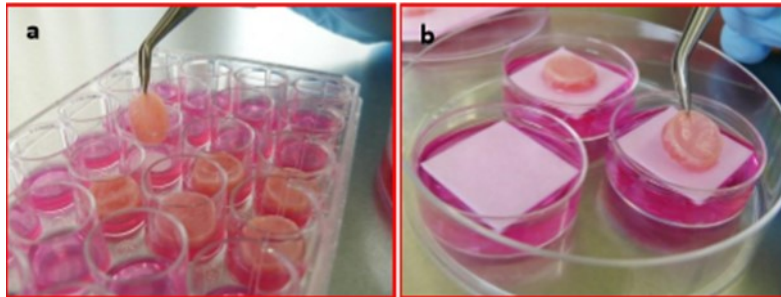


Abbildung 7: Platzieren der sechs Hautmodelle in jeweils eine kleine Petrischale, [87].

Zu Beginn des Transfektionsversuchs wurde in jedes Modell ein gleich großer Schnitt mit einem Skalpell gemacht, welcher einer Wunde nachempfunden sein sollte. Anschließend wurden die Transfektionsansätze in 1,5 ml Eppendorf Gefäßen wie folgt vorbereitet.

Transfektionsansätze:

1. 55 μ l OptiMEM (+ 55 μ l ALI-Medium)
2. 50 μ l OptiMEM + 10 μ l Lipofectamin (+ 50 μ l ALI-Medium)
3. 49 μ l OptiMEM + 2 μ l Lipofectamin + 1 μ g KGF mRNA (+ 49 μ l ALI-Medium)
4. 10 μ l Lipofectamin + 10 μ g KGF mRNA
5. 49 μ l OptiMEM + 2 μ l Lipofectamin + 1 μ g eGFP mRNA (+ 49 μ l ALI-Medium)
6. 10 μ l Lipofectamin + 10 μ g eGFP mRNA

Alle Ansätze wurden gevortext und anschließend für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde jeder Ansatz auf 5 Eppendorf Gefäße je 20 μ l aufgeteilt und diese mit einer Spritze mit Nadeln (Becton Dickinson, 0,4 x 19mm) über 5 Einstiche pro Präparat abgegeben (je Präparat also 100 μ l). Dann erfolgte täglich wiederum die Abnahme von 200 μ l Medium, welches schockgefroren und bei -80°C gelagert wurde. Zudem wurden täglich Bilder gemacht. Nach 48 h wurde wiederum das Medium gewechselt und die Proben mit 1 μ g KGF beziehungsweise eGFP mRNA erneut transfiziert. Nach 96 h wurden die

Hautmodelle in 4 %-iges Paraformaldehyd eingelegt und histologische Schnitte angefertigt.

Transfektion humaner Hautproben

Bei weiteren Transfektionen wurde ebenfalls humane Haut verwendet. Diese wurde nach dem Transport vom Operationssaal zum Labor zur Sterilisation in ein 50 ml Falcon mit Medium und Penicillin/Streptomycin für 30 Minuten gelegt. Anschließend wurde sie unter der sterilen Werkbank mit PBS gewaschen. Im folgenden Schritt wurde dann das Fettgewebe mittels steriler Pinzetten, Skalpelle und Scheren entfernt. Daraufhin wurde die Haut in 1x1 cm große Stücke geschnitten.

Diese wurden dann, wie im obigen Protokoll zur Transfektion der Hautmodelle beschrieben, auf ein Filterpapier gelegt, welches auf einem Abstandshalter in einer Petrischale stand. Anschließend wurden die Petrischalen mit 5 ml KGM2 Medium bis zum Erreichen des Filterpapiers befüllt.

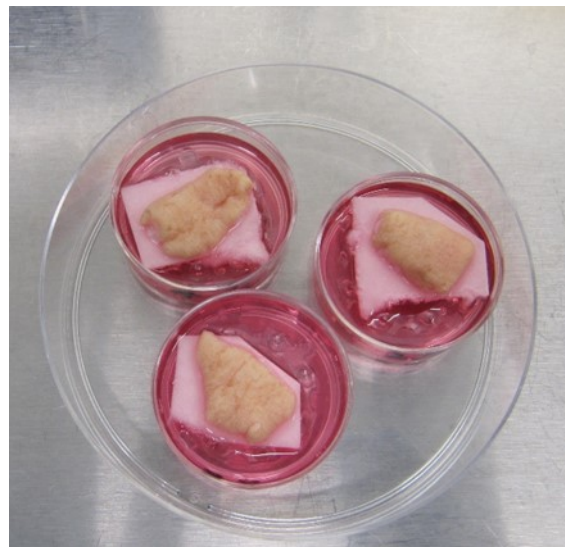


Abbildung 8: humane Hautproben

Im darauffolgenden wurden dieselben Transfektionsansätze vorbereitet. Allerdings wurde auf die Transfektion von KGF mRNA verzichtet und nur eGFP mRNA transfiziert.

Transfektionsansätze:

1. 55 µl OptiMEM (+ 55 µl KGM2)
2. 49 µl OptiMEM + 2 µl Lipofectamin + 1 µg eGFP mRNA (+ 49 µl KGM2)
3. 10 µl Lipofectamin + 10 µg eGFP mRNA

Nach 24 h wurden die Hautproben mittels TissueTack in kleinen Kunststoffgefäßen auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert. Kurz vor Anfertigung der Kryoschnitte in der Hautklinik Tübingen wurden die gefrorenen Hautproben in den -20°C Gefrierschrank überführt. Anschließend wurden die Hautproben am Kryotom geschnitten. Die fertigen Präparate wurden daraufhin mit sowohl zweier Antikörperfärbungen (KA-GFP (1:250) und EAK-Alexa 488 (1:250)), als auch einer DAPI-Färbung gefärbt. Daraufhin wurden sie am Konfokalmikroskop im klinischen Labor der Hautklinik Tübingen untersucht und Bilder angefertigt.

Transfektion von Hanging drops/ Zellspheroide

Für die Herstellung der hanging drops wurden HaCat-Zellen verwendet. Diese wurden wie zuvor kultiviert, abgelöst und anschließend so mit Medium verdünnt, dass sich 2,5 Millionen Zellen in einem Milliliter Medium befanden.

Nun wurden jeweils 10 µl Tropfen auf die Innenseite des Deckels einer Petrischale pipettiert, wobei jeder Tropfen ungefähr 250000 Zellen enthielt. In die Petrischale wurden 10 ml PBS gegeben, wodurch eine Austrocknung der Hanging drops verhindert wurde. Anschließend konnte der Deckel umgedreht und auf die Petrischale gesetzt werden (**Abbildung 9**).

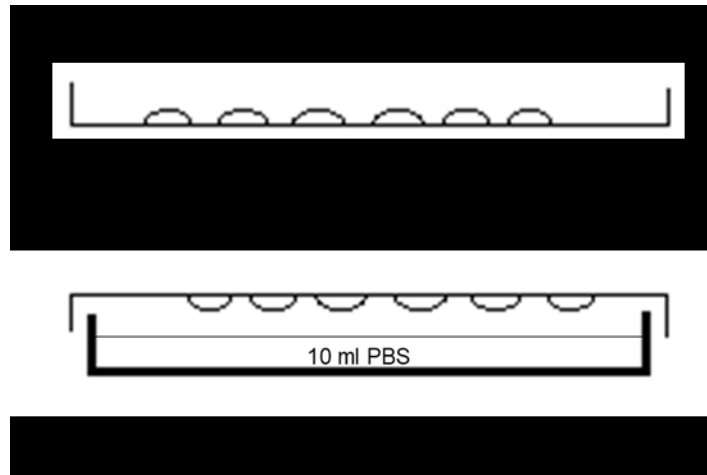


Abbildung 9: Herstellungsverfahren der Zellsphäroide nach der Hanging-drop Methode:

Pipettieren der 10 μ l Tropfen auf die Innenseite des Petrischalendeckels. Anschließend vorsichtiges Wenden des Deckels. Zugabe von 10 ml PBS in die Petrischale, um die Austrocknung der Sphäroide zu vermeiden.

Danach wurden die Zellsphäroide für 24 h bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Transfektionsansätze in 1,5 ml Eppendorf-DNALoBind-Gefäße überführt.

Transfektionsansätze:

1. nur OptiMEM
2. 1 μ l Lipofectamin
3. 1 μ l Lipofectamin + 1 μ g eGFP mRNA

Dafür wurden die Eppendorf-Gefäße mit je 100 μ l DMEM befüllt und die entsprechende Menge an Lipofectamin und eGFP mRNA hinzugegeben. Anschließend erfolgte wiederum eine Inkubationszeit der Ansätze von 20 Minuten bei Raumtemperatur. Danach konnte der Petrischalendeckel wieder vorsichtig gedreht werden und je 10 μ l jedes Ansatzes zu je einem Hanging drop hinzugegeben werden. Nachfolgend wurde der Deckel wieder gedreht und auf die Petrischale gesetzt. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation von 24 Stunden.

2.2.6 Untersuchung am Konfokalmikroskop/Fluoreszenzmikroskop

Nach 24 Stunden wurden die Hanging drops unter dem Konfokalmikroskop und am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Dafür wurden die Sphäroide mit einer 100 µl Pipette aufgesaugt und auf einen Objektträger gegeben. Zwischen Objektträger und Objektglas wurden seitlich des Sphäroids je 2 weitere Objektgläser gelegt, um das Zellsphäroid nicht zu quetschen. Anschließend erfolgte die Überprüfung der eGFP- Expression unter dem Mikroskop.

Nach erfolgreicher Transfektionskontrolle unter dem Mikroskop wurden drei Eppendorfgefäße unter der sterilen Werkbank mit Trypsin/EDTA vorbereitet und pro Gefäß jeweils mehrere Sphäroide desselben Transfektionsansatzes dazu gegeben. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Inkubation der Gefäße im Inkubator bei 37°C. Daraufhin wurden die Sphäroide durch Auf- und Abpipettieren im Trypsin gelöst. Nach erfolgreicher Lösung der Sphäroide wurde jedem Ansatz 500 µl Medium beigemischt um das Trypsin/EDTA zu inaktivieren. Im Folgenden wurden die Zellsuspensionen bei 300 xg für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen, das zurückgebliebene Pellet in 500 µl 1xCellfix gelöst und die Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen überführt. Gemessen wurde im Anschluss der prozentuale Anteil der eGFP-exprimierenden Zellen.

2.2.7 Zellviabilitätsbestimmung (CASY- Cellcounter)

Um die Zellviabilität, bzw. die Zellzahl pro Milliliter zu bestimmen, wurde der CASY Cellcounter und Analyser der Firma Roche Diagnostics GmbH verwendet. Hierfür wurden die Zellen, wie zuvor beschrieben, vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Im nächsten Schritt wurden die CASY Cups mit 5 ml CASY Ton Flüssigkeit gefüllt. Anschließend wurden 50 µl der Zellsuspension in das CASY Ton überführt und kurz vor der Messung weitere 5 ml CASY Ton

hinzugefügt. Nach vorsichtiger Mischung durch Invertieren des CASY Cups erfolgte die Messung am Cellcounter nach Herstellerangaben.

2.2.8 Konzentrationsmessung des KGF-Gehalts mittels ELISA

Die Konzentration des durch die Zellen gebildeten Wachstumsfaktors KGF, welches sich in den eingefrorenen Überständen befand, wurde mittels eines FGF-7 (KGF-)-ELISA Kits der Firma Sigma Aldrich® bestimmt. Die Überstände der mit KGF mRNA transfizierten Zellen wurden zuvor 1:100 verdünnt. Beide Kontrollgruppen, also sowohl die Zellen, die nur mit Medium behandelt wurden, als auch die Zellen, die mit Medium und Lipofectamin/Transit mRNA-Kit behandelt wurden, wurden unverdünnt gemessen.

Alle Proben der Transfektionen von Hautmodellen und humaner Haut wurden ebenso unverdünnt gemessen. Die Durchführung des ELISAs erfolgte anschließend nach Herstellerangaben. Die Auswertung fand schließlich am ELISA Reader bei 450 nm statt.

2.2.9 MTT-Assay

Für die Durchführung des MTT-Tests wurden 5 mg des MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in 1 ml PBS gelöst. Anschließend wurden pro Well 30 µl der MTT-Lösung in 300 µl RPMI Medium (ohne Phenolrot) verdünnt.

Im nächsten Schritt wurde das Medium bzw. der Transfektionsansatz von den Zellen abgenommen und die Zellen vorsichtig dreimal mit RPMI gewaschen. Daraufhin wurde je Well 330 µl der angesetzten MTT-Lösung hinzugegeben und die Well-Platte für vier Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, und pro Well 300 µl DMSO hinzugegeben. Es folgte eine weitere Inkubation für 10 Minuten bei 37°C und

5%CO₂. Daraufhin wurde der Überstand in je ein Eppendorf Gefäß überführt und für 5 Minuten bei 3000 xg zentrifugiert, sodass der Überstand frei von Zelltrümmern war. Da eine zu starke Färbung eingetreten war, musste der Überstand 1:10 mit DMSO verdünnt werden.

Im nächsten Schritt wurden je 100 µl in eine 96-well-Platte (Nunc Maxisorb) in Triplikaten gegeben. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption am Mithras LB 940 Mikroplattenleser bei 540 nm.

2.2.10 Durchflusszytometrie

Für die Messung der eGFP-exprimierenden Zellen wurden die Transfektionsansätze, bzw. das Medium von den Zellen abgesaugt und diese jeweils mit 500 µl PBS gewaschen. Anschließend erfolgte das Ablösen der adhärenierten Zellen mittels 500 µl Trypsin/EDTA pro Well. Das Trypsin/EDTA-Gemisch wurde dann mit demselben Volumen an Medium inaktiviert und das gesamte Volumen von 1000 µl in je ein Eppendorfgefäß überführt. Diese wurden dann bei 300 xg für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand in 500 µl PBS resuspendiert. Anschließend erfolgte wiederum die Zentrifugation, der Überstand wurde wieder abgesaugt und das Pellet in 500 µl 1xCellfix resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in je ein FACS-Röhrchen überführt und am Durchflusszytometer gemessen.

Hierbei werden die Zellen an einem Laserstrahl vorbeigeführt, wobei unter anderem Fluoreszenzsignale der Zellen, aber auch die Größe und Granularität, bzw. Komplexität gemessen werden kann.

2.2.11 Statistik

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Dabei wurden die Daten mit

dem Kolmogorov-Smirnov Test auf ihre Normalverteilung geprüft. Normalverteilte Daten wurden anschließend durch den repeated measure (RM) ANOVA mit Boniferroni's multiple comparison test geprüft. Nicht normalverteilte Daten sind mit dem Friedman test with Dunn's multiple comparison test analysiert worden. War die Anzahl der Versuche für einen Vergleich zu gering, wurde der repeated measure (RM) ANOVA mit Boniferroni's multiple comparison verwendet. Die kompletten statistischen Auswertungen erfolgten mit GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., USA).

(* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$, n.s.=nicht signifikant)

3. Ergebnisse

Im folgenden Kapitel sind die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche dargestellt.

3.1 Erfolgreiche Herstellung der synthetischen mRNA

Zunächst wurde die synthetische mRNA für die folgenden Versuche hergestellt. Dabei wurde die therapeutische KGF- und die eGFP-kodierende mRNA, als Kontrolle, mittels IVT synthetisiert.

Dafür wurde im ersten Schritt mittels PCR die kodierende Sequenz aus dem jeweiligen Plasmid vervielfältigt und die Reinheit der DNA mittels Gelelektrophorese untersucht. Hier zeigte sich, dass sowohl die KGF, als auch eGFP DNA eine Bande auf dem Gel in der erwarteten Größe aufwiesen (**Abbildung 10**). Dadurch wurde die Voraussetzung für die darauffolgende IVT sichergestellt.

Nach der DNA-Synthese erfolgte die IVT zur Herstellung der mRNA. Nach der IVT wurde die mRNA aufgereinigt sowie zusätzlich dephosphoryliert, um die Phosphatreste zu entfernen. Nach der erneuten Aufreinigung erfolgte die Qualitätskontrolle der mRNA mit Gelelektrophorese. Im Gel konnte die mRNA in der erwarteten Größe sichtbar gemacht werden (**Abbildung 11**). Damit konnten die mRNAs für die folgenden Versuche verwendet werden.

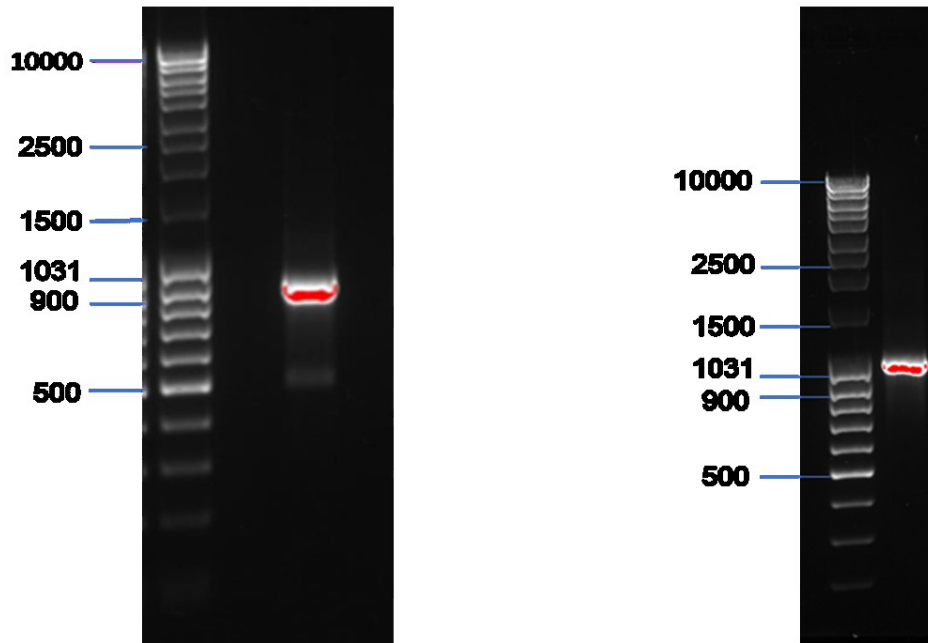


Abbildung 10: Nachweis der DNA-Qualität nach der PCR mittels Gelelektrophorese. Links: DNA Marker 100-10000 bp und KGF DNA mit 900 bp; Rechts: DNA Marker 100-10000 bp und eGFP DNA mit 1000 bp.

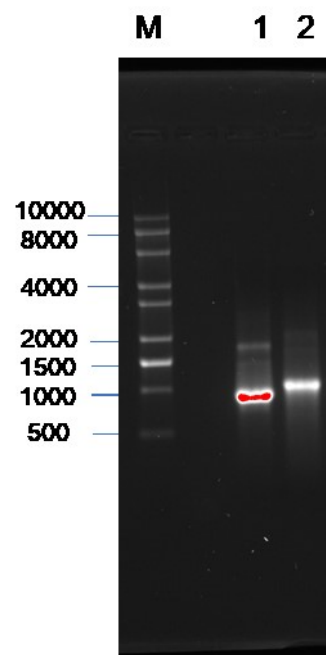


Abbildung 11: Qualitätsnachweis der KGF und eGFP mRNA nach der IVT. M: RNA Ladder 500-10.000 bp, 1: KGF mRNA mit 900 bp, 2: eGFP mRNA mit 1000 bp

3.2 Herstellung und Validierung der kationischen Liposomen

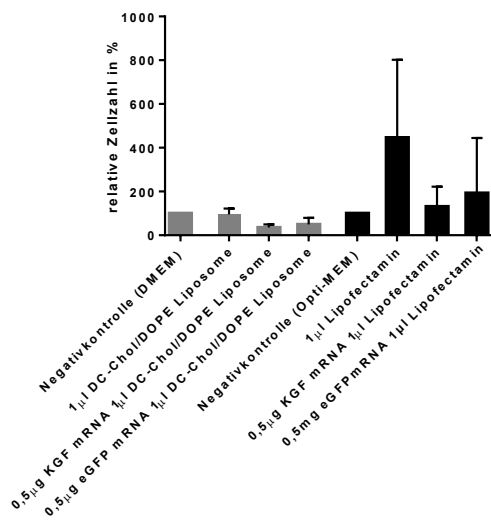
Kationische geladene Liposome versprechen über die Verkapselung der hergestellten mRNA diese durch Fusion mit der Zellmembran in die Zelle einzuschleusen. Dabei bietet diese Methode der Transfektion Vorteile gegenüber herkömmlichen Transfektionsmethoden.

Nach Herstellung der Liposome wurden diese mit der mRNA über einen bestimmten Zeitraum inkubiert, sodass das Genmaterial von den Liposomen aufgenommen werden konnte. Nach Transfektion der Zellen erfolgte die Validierung dieser Transfektionsmethode.

Im ersten Schritt wurde die Transfektionseffizienz der hergestellten Liposome an HaCat-Zellen und HEK293 untersucht und mit der Transfektionseffizienz des Transfektionsmittels Lipofectamin verglichen. Dafür wurden Zellen ausgesät und mit 0,5 µg eGFP oder KGF mRNA verkapselt in 1 µl Liposomen oder 1 µl Lipofectamin transfiziert. Als Kontrollgruppen dienten für die mit Liposomen transfizierte mRNA jeweils ein unbehandelter Ansatz (nur DMEM), und ein Ansatz mit ausschließlich 1 µl Liposomen. Für die mit Lipofectamin transfizierte mRNA dienten ein unbehandelter Ansatz (nur OptiMEM) und ein Ansatz mit 1 µl Lipofectamin als Kontrollgruppen. Nach Transfektion der Zellen mit KGF- und eGFP-mRNA mit dem jeweiligen Transfektionsreagenz wurde die Zellviabilität nach 24 h mittels des CASY® Cell Counter + Analyzer und die Transfektionseffizienz der eGFP mRNA am Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Um die Verträglichkeit der Liposome und Lipoplexe mit den Zellen zu untersuchen, wurden 24 h nach Transfektionsbeginn die Zellzahlen gemessen. Die **Abbildung 12** zeigt die gemessenen relativen Zellzahlen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

A



B

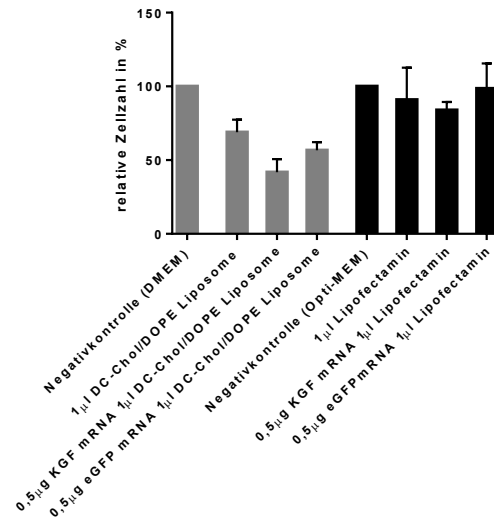


Abbildung 12: Relative Zellzahl 24 h nach Transfektion der HaCaT und HEK293 Zellen. A: Bestimmung der Zellzahl nach der Transfektion von HaCaT Zellen (A) und HEK293 Zellen (B) mit Liposomen und Lipofectamin sowie KGF und eGFP verkapselter mRNA (n=3, MW ± SEM)

In Diagramm A der transfizierten HaCat-Zellen fällt nur ein geringer Unterschied der relativen Zellzahlen in % bei der Betrachtung der mit Liposomen transfizierten Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle (DMEM) auf. Dahingegen ist die relative Zellzahl bei den mit Lipofecatmin behandelten Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle (OptiMEM) stärker angestiegen, besonders bei der Behandlung der Zellen mit 1 µl Lipofecatmin ist die Zellzahl sehr hoch. Allerdings zeigt dieses Ergebnis eine große Standardabweichung.

In Diagramm B zeigen die mit Liposomen behandelten Hek293-Zellen deutlich geringere Zellzahlen im Vergleich zur Negativkontrolle (DMEM). Besonders der Ansatz mit KGF mRNA zeigt eine geringe relative Zellzahl von unter 50%. Die mit Lipofectamin behandelten Zellen zeigen dagegen im Vergleich zur Negativkontrolle (OptiMEM) annähernd gleiche relative Zellzahlen, wohingegen auch hier die mit KGF mRNA transfizierten Zellen die geringsten Zellzahlen aufweisen.

Zusätzlich erfolgte die Detektion der Expression von eGFP in den Zellen. Dazu wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop 24 h nach der Transfektion untersucht. Sowohl in HaCat als auch in HEK293 Zellen zeigte sich, dass mit Lipofectamin und eGFP mRNA ein gutes Transfektionsergebnis zu erreichen ist, wohingegen bei den Ansätzen mit den Liposomen und eGFP mRNA nur ein leichtes Fluoreszenzsignal bei den HaCaT Zellen am Mikroskop gemessen werden konnte (**Abbildung 13 und 14**).

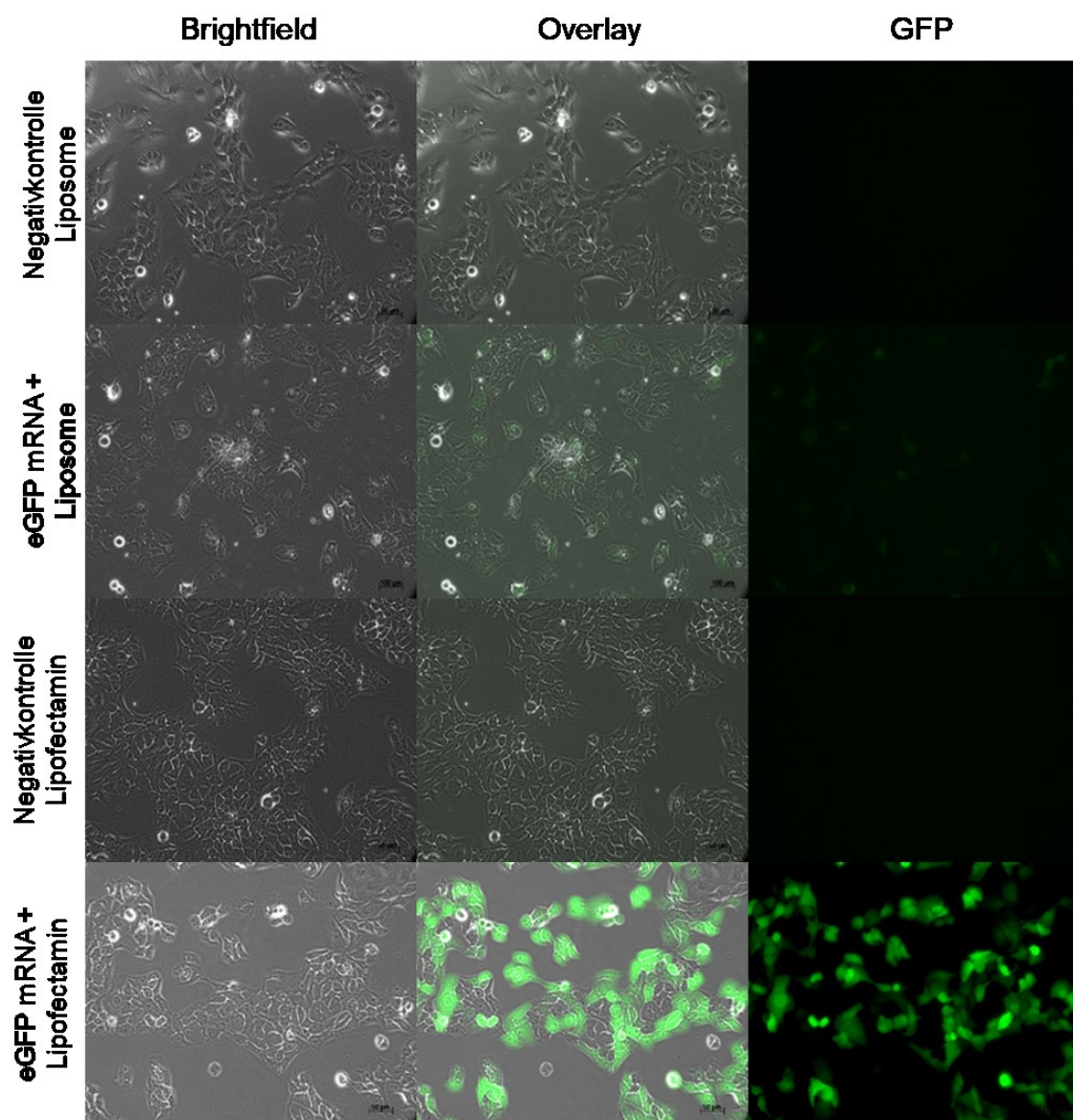


Abbildung 13: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der transfizierten HaCat-Zellen 24 h nach Transfektionsbeginn.

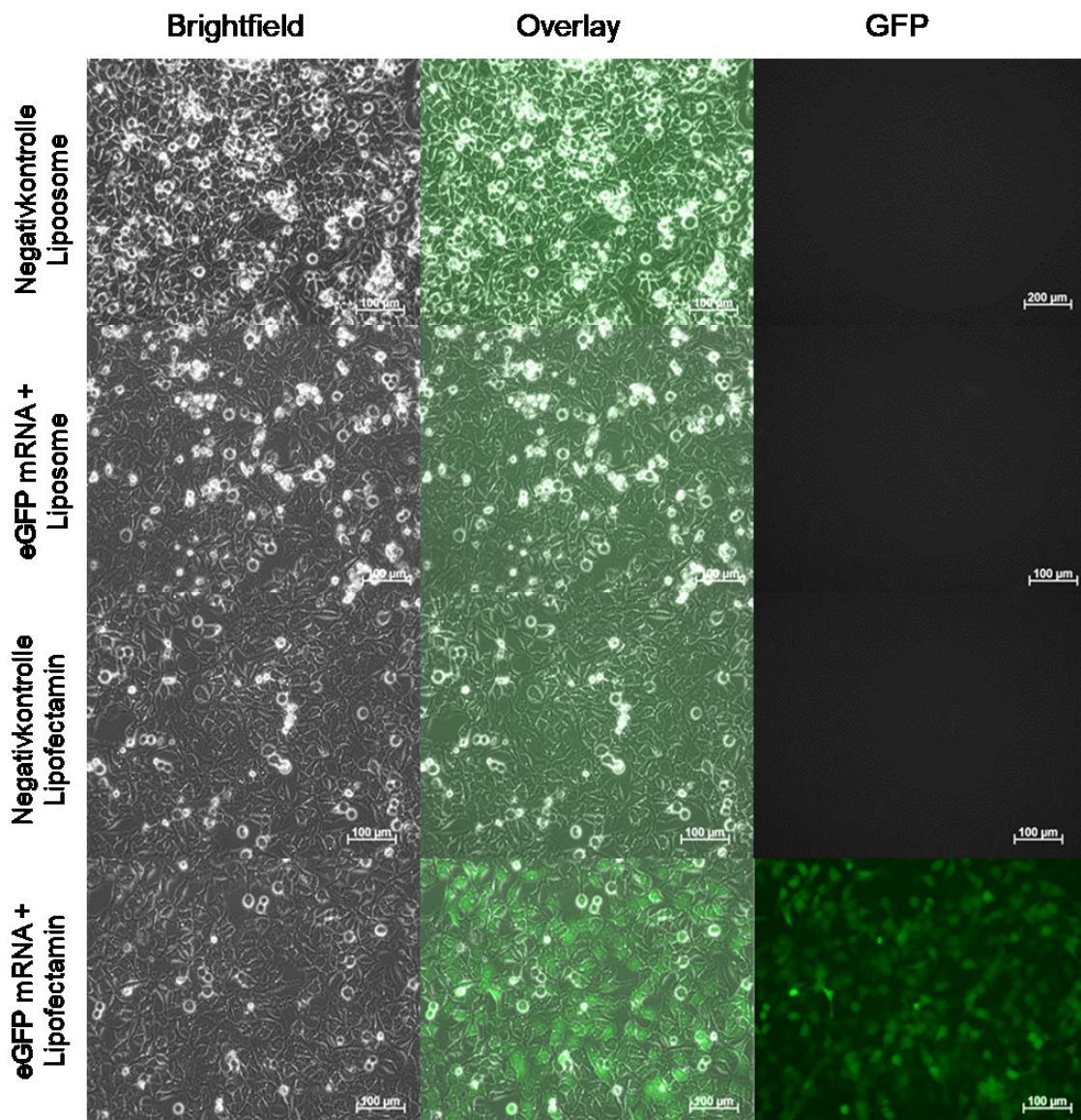


Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der transfizierten Hek293-Zellen 24 h nach Transfektionsbeginn.

3.3 Transfektion von HaCat-Zellen mit KGF und eGFP mRNA

Nachdem Lipofectamin erfolgreich sowohl bei den HaCat- als auch den Hek293 Zellen und die Liposomen zumindest bei den HaCat Zellen eGFP mRNA transfiziert hatten, sollte in einem weiteren Versuch nochmals eGFP und KGF mRNA in HaCat-Zellen transfiziert werden. Um verschiedene Transfektionsreagenzien zu vergleichen und die Transfektionseffizienz zu optimieren, sollte nun ein weiteres Transfektionsmittel auf dessen Effizienz untersucht werden. So wurde neben den nun bekannten Liposomen und dem Lipofectamin das Transit mRNA Transfection Kit in die Transfektionsversuche mit einbezogen. Von den Transfektionsreagenzien wurde je Ansatz 1 μ l verwendet, wobei bei der Verwendung von Transit zudem 1 μ l des zum Kit gehörigen Boosters verwendet wurde. An mRNA wurde je 1 μ g eingesetzt.

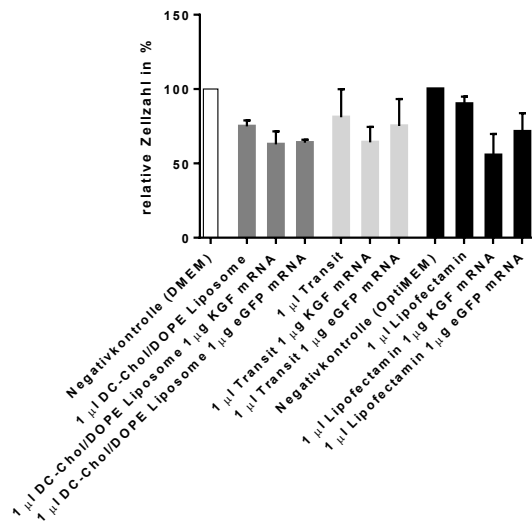
Nach Transfektion von KGF und eGFP mRNA der HaCat-Zellen mittels der drei Transfektionsreagenzien wurde nach 24 h die Zellviabilität am Casy-Cellcounter und mittels MTT-Assay bestimmt. Die eGFP-Expression wurde am Fluoreszenzmikroskop, sowie am Durchflusszytometer untersucht und die KGF-Expression mittels FGF-7- (KGF-) ELISA gemessen.

Um die Verträglichkeit der Transfektion auf die Zellen bestimmen zu können wurden 24 h nach Transfektion die Zellzahlen mittels Casy-Cellcounter und die Viabilität mittels MTT- Assay bestimmt (**Abbildung 15**).

Dieser beruht auf einem gelben Farbstoff, der in den Mitochondrien der Zellen zu einem violetten Farbstoff umgesetzt wird. Die Menge des metabolisierten Farbstoffs lässt auf die Viabilität der Zellen schließen und lässt sich photometrisch quantifizieren. Daraus kann der Vergleich gemacht werden, ob die Transfektionen sich negativ auf die Viabilität der Zellen auswirken.

Es zeigte sich, dass weder das Transfektionsmittel, noch die Komplexe aus mRNA und Transfektionsmittel, keine negativen Auswirkungen auf die relative Zellzahl im Vergleich zu den nicht transfizierten Kontrollen haben.

A



B

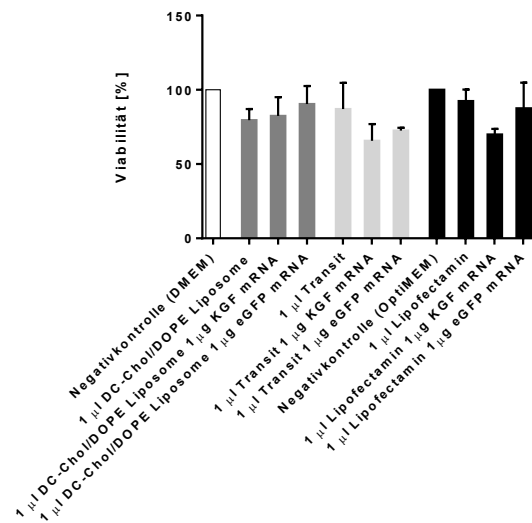


Abbildung 15: Zellviabilitätsmessung durch Bestimmung der relativen Zellzahl (A), sowie Viabilitätsbestimmung mittels MTT-Assay (B) 24 h nach Transfektion. Gute Verträglichkeiten der nur mit den Transfektionsmitteln behandelten Zellen; nicht signifikante Unterschiede der Zellzahl bei Transfektionen mit KGF mRNA; Negativkontrolle gleich 100%, weitere Gruppen im Verhältnis dazu dargestellt, HaCat-Zellen (n=3, MW \pm SEM)

Im Diagramm A der **Abbildung 15** ist die Toxizität der jeweiligen mRNA erkennbar, wobei die Zellviabilität bei den Zellen, welche mit KGF mRNA transfiziert wurden, schlechter ist, als die der mit eGFP mRNA transfizierten Zellen. Die mit Liposomen und KGF transfizierten Zellen zeigen eine relative Zellzahl von nur $62 \pm 8\%$, die mit Transit + KGF mRNA transfizierten Zellen zeigen eine relative Zellzahl von $64 \pm 10\%$ im Vergleich zur Negativkontrolle (DMEM). Die nur mit Liposomen und Transit behandelten Zellen zeigen im Gegensatz zu den mit Lipofectamin behandelten Zellen eine deutlich stärkere Abnahme der Zellzahl von $25 \pm 4\%$, bzw. $19 \pm 18\%$ im Vergleich zur Negativkontrolle (DMEM).

Zusätzlich wurde die Zellzahl mit dem MTT Assay bestimmt. Wie in Diagramm B der **Abbildung 15** ersichtlich, wurde die Zellviabilität durch die Transfektionsansätze des jeweiligen Transfektionsmittels in Kombination mit der KGF mRNA am deutlichsten verringert, hier jedoch besonders bei der

Verwendung von Lipofectamin und des Transit mRNA Transfection Kits. Alle drei Transfektionsmittel wirken auch ohne die Transfektion von mRNA toxisch auf die Zellen, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

Nach Transfektionsende wurden alle Ansätze wiederum unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. **Abbildung 16** zeigt die Aufnahmen.

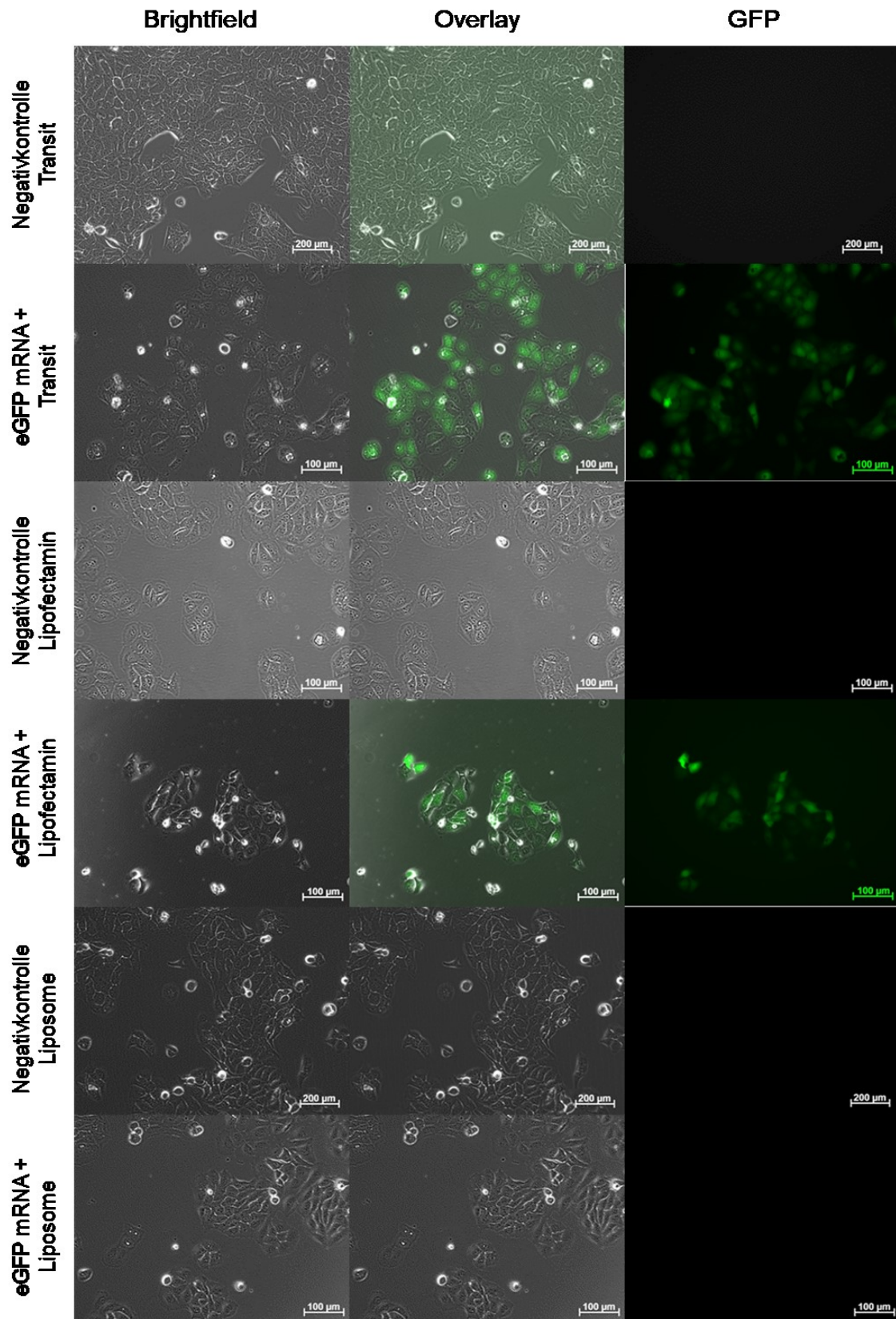


Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der transfizierten HaCat-Zellen 24 h nach Transfektionsbeginn.

Wie in **Abbildung 16** erkennbar, wurde bei der Transfektion mit den Liposomen keine eGFP-Expression induziert. Bei den Ansätzen mit Lipofectamin und dem Transit mRNA Kit ist eine eGFP-Expression zu sehen, wenngleich bei den mit Lipofectamin transfizierten Zellen mehr Zellen das eGFP Protein exprimiert haben.

Für die Untersuchung der Transfektionseffizienz am Durchflusszytometer wurden die Zellen von den Well-Platten gelöst und in Cellfix fixiert. **Abbildung 17** zeigt die erhobenen Daten.

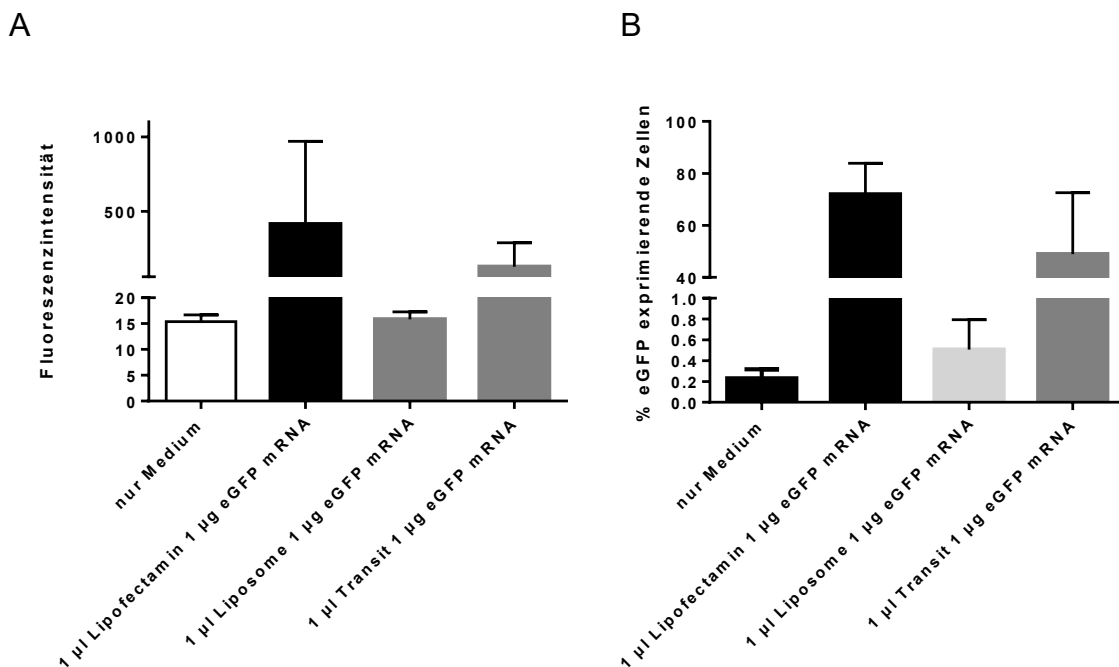


Abbildung 17: Durchflusszytometrischen Analyse 24 h nach Transfektion; in A die gemessene Fluoreszenzintensität, in B die in Prozent angegebenen eGFP- exprimierenden Zellen; jeweils für die Transfektionsansätze mit Lipofectamin, Liposomen, des Transit mRNA Kits und einer unbehandelten Kontrollprobe; (n=3, MW ± SEM)

Unter Verwendung von Lipofectamin konnte am meisten eGFP mRNA von den Zellen aufgenommen und translatiert werden. Mehr als 70 % der mit eGFP mRNA transfizierten HaCat-Zellen haben das Protein hergestellt. Bei den Zellen, die mit dem Transit mRNA Kit und eGFP transfiziert wurden, exprimierten immerhin noch

50 % der Zellen das eGFP Protein. Mittels der Liposomen als verwendetes Transfektionsmittel konnte keine eGFP- Expression induziert werden.

Die Kontrolle der KGF- Expression der HaCat-Zellen erfolgte mit Hilfe eines FGF-7-ELISA Kits. Hierfür wurde der Überstand der mit KGF mRNA transfizierten Zellen verwendet. Anschließend erfolgte der ELISA nach Herstellerangaben, woraufhin die Adsorption mittels eines ELISA-Readers gemessen und daraus die Konzentrationen bestimmt werden konnten. Da die Ergebnisse der zuvor durchgeführten Versuche zeigten, dass die Liposome als Transfektionsmittel nur wenig eGFP mRNA transfiziert hatten, wurden aus Platz- und Kostengründen die Liposomenansätze nicht mit in den KGF-ELISA aufgenommen. In **Abbildung 18** sind die KGF Konzentrationen dargestellt.

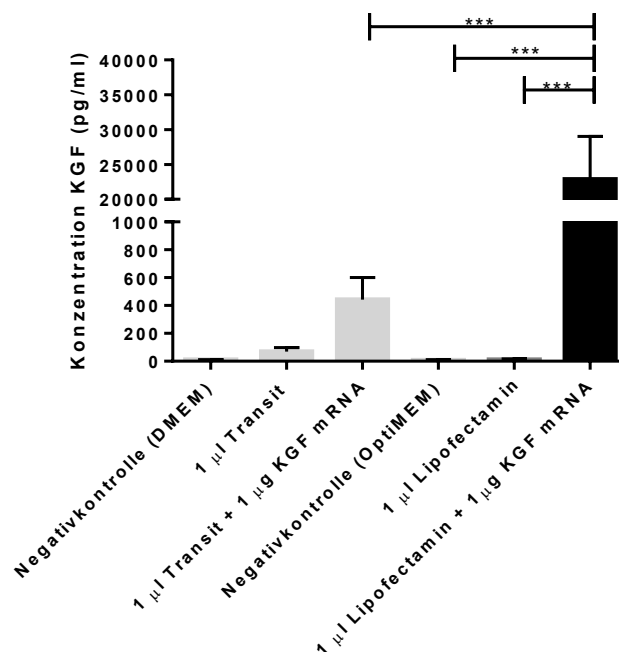


Abbildung 18: Gemessene Konzentration an KGF (in pg/ml) 24 h nach Transfektion, je eine Kontrolle mit Medium (DMEM, OptiMEM) und eine Kontrolle mit Medium und des jeweiligen Transfektionsmittels; nur geringe Expression an KGF bei den mit dem Transfektionsmittel Transit transfizierten Zellen, bei den mit Lipofectamin als Transfektionsmittel transfizierten Zellen war eine Konzentration von deutlich über 20000 pg/ml des KGF Proteins nachweisbar; One-Way ANOVA, *** $p < 0,001$, (n=3, MW \pm SEM)

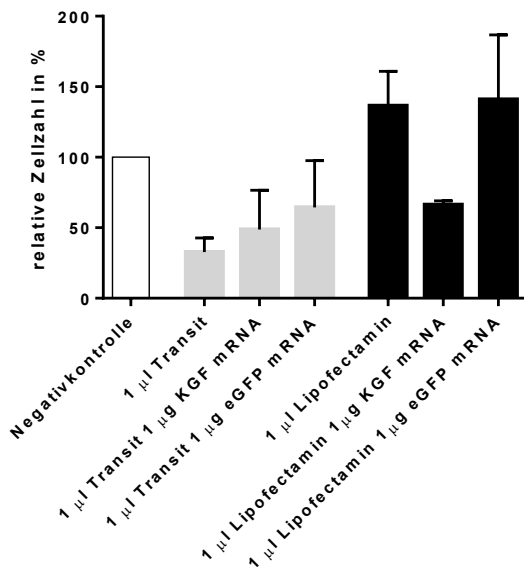
Der Ansatz mit 1 µl Lipofectamin + 1 µg KGF mRNA zeigt hier sowohl einen signifikanten Unterschied zu dessen Kontrollen, als auch zum Ansatz 1 µl Transit + 1 µg KGF mRNA. Durch Transfektion der KGF mRNA mit dem Transit mRNA Transfection Kit konnte eine KGF-Konzentration von 443 ± 157 pg/ml erzielt werden, wohingegen mittels des Lipofectamin eine weitaus höhere Konzentration an KGF von von 22850 pg/ml erreicht werden konnte.

3.4 Transfektion von primären Keratinozyten mit KGF und eGFP mRNA

Da die Transfektion der HaCat-Zelllinie mit den beiden Transfektionsreagenzien Lipofectamin und Transit mRNA-Kit erfolgreich war, wurden anschließend humane primäre Keratinozyten verwendet. Die Liposome wurden, aufgrund der schlechten Transfektionseffizienz, nicht mehr verwendet.

Nachdem die primären Keratinozyten, wie im Abschnitt der Methoden beschrieben, isoliert wurden, wurden diese in KGM2- Medium in mit Kollagen-I beschichteten 12-Well-Platten kultiviert. Je Well wurden 150.000 Zellen ausgesät und nach fünf Tagen Inkubation im Brutschrank bei 37 °C sowie 5% CO₂ war eine 90 prozentige Zellkonfluenz erreicht. Die Zellen wurden dann mit eGFP und KGF mRNA transfiziert wobei es für jedes Transfektionsreagenz zwei Kontrollgruppen gab. Nach 24 h wurde dann wiederum die eGFP-Expression am Fluoreszenzmikroskop und am Durchflusszytometer untersucht, die Zellzahl bestimmt, ein MTT-Assay durchgeführt und der Überstand für die Kontrolle der KGF-Expression mittels ELISA entnommen. Die **Abbildung 19** zeigt die am Casy-Cellcounter gemessenen Zellzahlen.

A



B

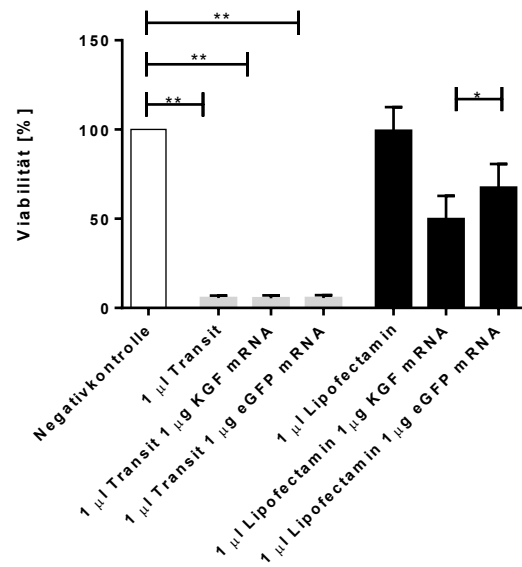


Abbildung 19: Zellviabilitätsmessung durch Bestimmung der relativen Zellzahl (A), sowie Viabilitätsbestimmung mittels MTT-Assay (B) 24 h nach Transfektion. Bei Vergleich beider Diagramme deutlich bessere Verträglichkeit von Lipofectamin als das Transit Transfection Kit. **A:** nicht signifikante Unterschiede der Zellzahl bei Transfektionen mit KGF mRNA; **B:** signifikante Unterschiede der Negativkontrolle zu allen Transitansätzen, ebenso ein signifikanter Unterschied der mit Lipofectamin transfizierten KGF, und eGFP mRNA; HaCat-Zellen (n=3, MW ± SEM, * p < 0,05, ** p < 0,01)

Im Vergleich zur Negativkontrolle zeigte sich durch die Behandlung der Zellen mit Transit eine Reduktion sowohl der Zellzahl, als auch deren Viabilität. Die Zellzahlen zeigen für die Transfektionen mit Transit deutliche Unterschiede im Vergleich zu den Transfektionen mit Lipofectamin. Auffällig ist hier jedoch der Einbruch der Zellzahl bei Transfektion von KGF mRNA mit Lipofectamin, wobei nach 24 Stunden nur noch ungefähr $66,3\% \pm 3$ im Vergleich zur Negativkontrolle vorhanden sind. Die Viabilität der mit Transit behandelten Zellen liegt für alle drei Ansätze unter 6 % (** p < 0,01). Dahingegen liegt die Viabilität der nur mit Lipofectamin behandelten Zellen bei 99,3 % und ist damit fast genauso hoch wie die Zellen der Negativkontrolle. Werden die Zellen jedoch mittels Lipofectamin mit KGF, bzw. eGFP mRNA transfiziert, sinkt deren Viabilität nach 24 Stunden deutlich. Nach 24 Stunden ist die Viabilität der mit KGF mRNA transfizierten Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle gesunken ($49,8\% \pm 13$), wohingegen die

mit eGFP mRNA transfizierten Zellen eine mit $67,4\% \pm 13$ höhere Viabilität aufweisen. Beide Ansätze zeigen einen signifikanten Unterschied * $p < 0,05$.

Nach Transfektionsende wurden alle Ansätze wiederum unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die **Abbildung 20** zeigt die Aufnahmen.

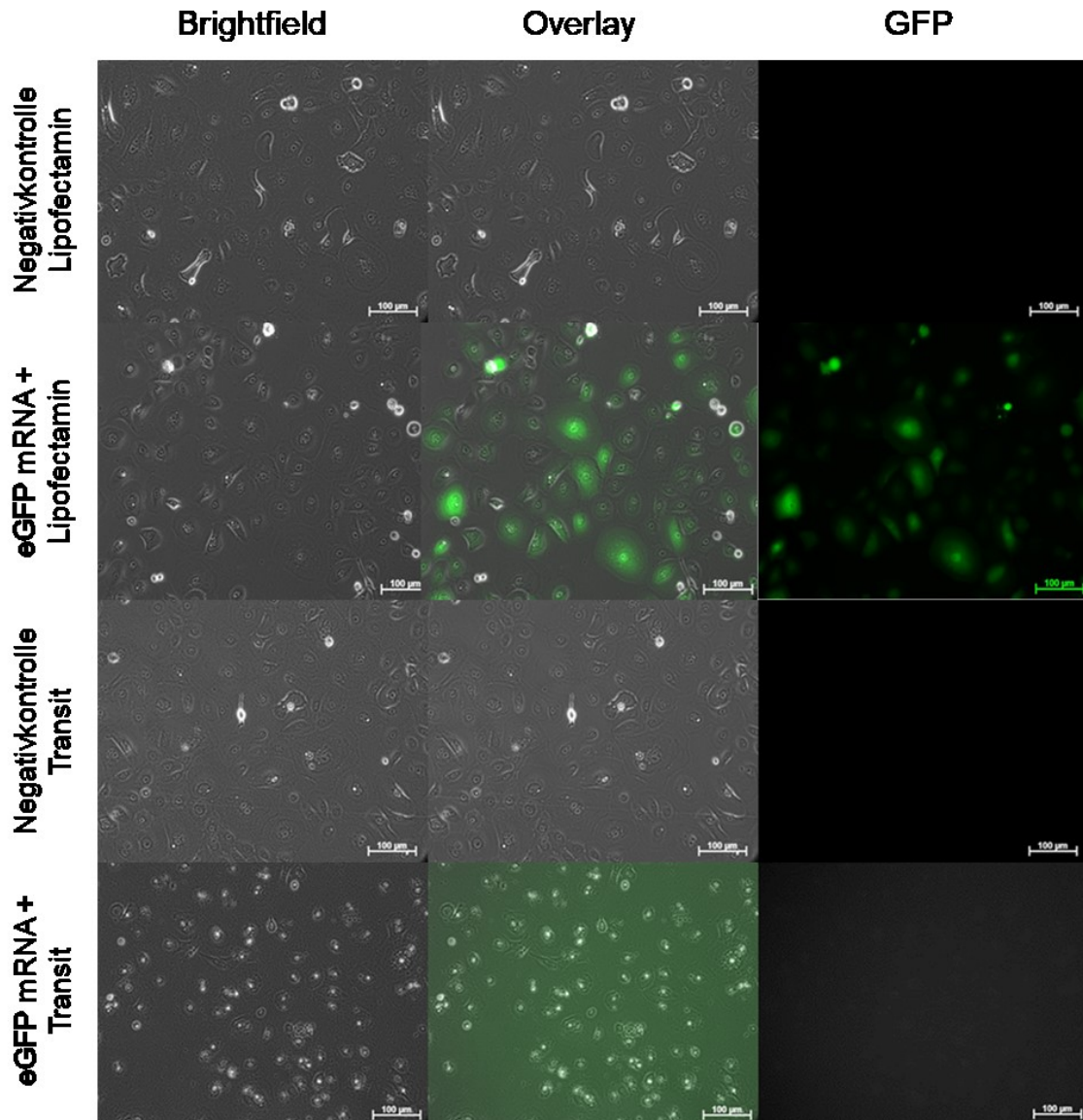


Abbildung 20: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der transfizierten HaCat-Zellen 24 h nach Transfektionsbeginn.

Bei der Sichtkontrolle der mit dem Transit mRNA Transfection Kit transfizierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop fiel auf, dass innerhalb von 24 h sehr

viele Zellen abgestorben und viele Zelltrümmer erkennbar waren. Die Zellen, die mit Transit und eGFP mRNA transfiziert wurden zeigten kein Fluoreszenzsignal, was darauf schließen lässt, dass kein eGFP-Protein exprimiert wurde. Die Zellen, die mit Lipofectamin und eGFP mRNA transfiziert wurden, zeigten hingegen eine eGFP Expression, wobei diese nur mäßig ausfiel.

Die **Abbildung 21** veranschaulicht nochmals in einem größeren Ausschnitt die mit Transit inkubierten Zellen 24 h nach Transfektionsbeginn. Hier besser erkennbar die Zelltrümmer und viele abgestorbene und schwimmende Zellen.

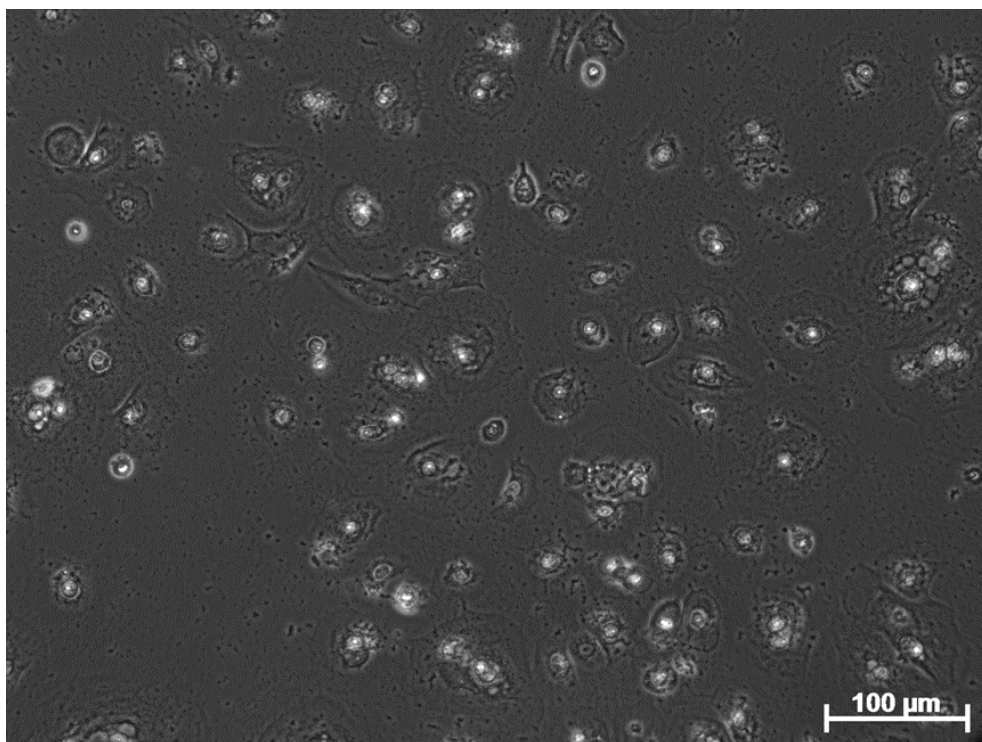


Abbildung 21: Kontrolle mit 1 µl Transit (20x)

Die eGFP-Expression wurde anschließend zusätzlich am Durchflusszytometer untersucht. Da die Zellzahl bei den mit Transit behandelten Zellen deutlich sank, konnte der Durchflusszytometer keine Zellen mehr erfassen, weswegen in **Abbildung 22** nur noch die Ansätze mit Lipofectamin dargestellt wurden.

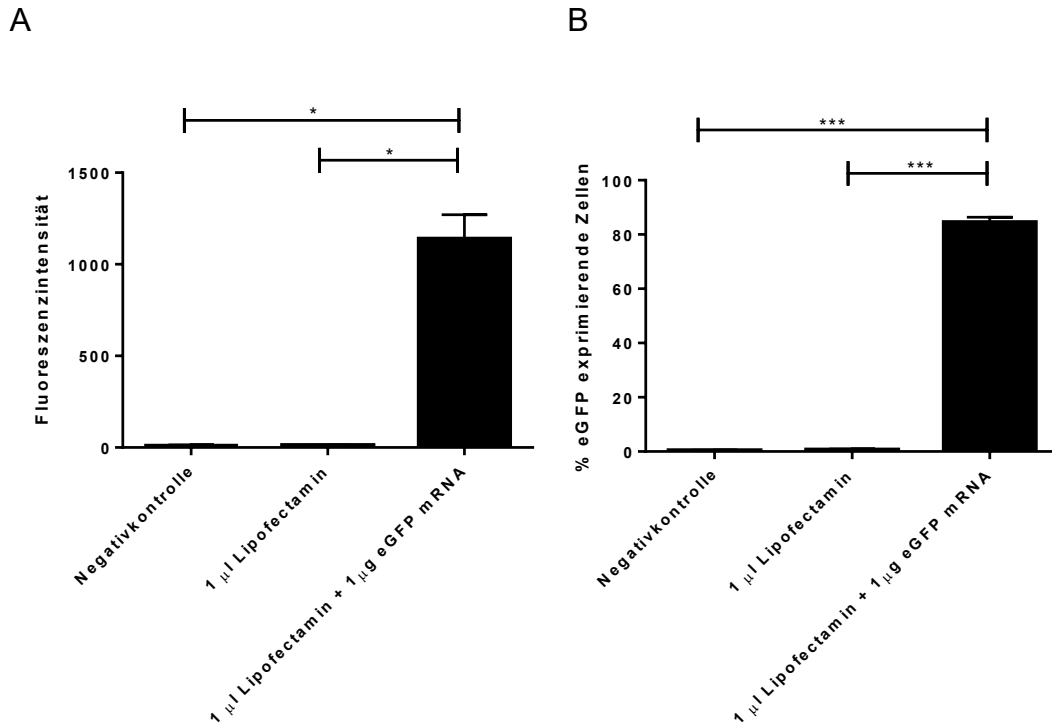


Abbildung 22: Durchflusszytometrischen Analyse 24 h nach Transfektion; in A die gemessene Fluoreszenzintensität, in B die in Prozent angegebenen eGFP- exprimierenden Zellen; jeweils für die Transfektionsansätze mit Lipofectamin 2000 und Transit mRNA Kit und einer unbehandelten Kontrollprobe; mit etwa 80 Prozent eGFP exprimierender Zellen für Lipofectamin eine hohe Transfektionsrate und Expressionsrate (n=3, MW \pm SEM, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

Das linke Diagramm zeigt eine Fluoreszenzintensität für die mit eGFP mRNA transfizierten primären Keratinozyten von etwas über 1000 RFU an. Sowohl die Kontrolle mit Lipofectamin, als auch die Kontrolle der nur mit OptiMEM behandelten Zellen zeigen signifikante Unterschiede zu den mit eGFP mRNA transfizierten Zellen ($p < 0,05$). Das rechte Diagramm zeigt, dass ungefähr 80 Prozent aller Zellen eGFP exprimiert haben. Auch hier gibt es signifikante Unterschiede der transfizierten Zellen zu beiden Kontrollgruppen ($p < 0,001$).

Nach der Transfektion der Zellen mit KGF mRNA wurde die KGF Proteinkonzentration im Überstand der primären Keratinozyten mittels eines FGF-7-ELISAs bestimmt.

Der Überstand der Ansätze der mit KGF mRNA transfizierten Zellen wurde zuvor 1:10 mit OptiMEM verdünnt. Da mittels Transit keine eGFP Expression induziert wurde und die Viabilität der mit Transit behandelten Zellen sehr niedrig war, wurden diese Proben nicht mittels ELISA auf die Expression von KGF untersucht. Die **Abbildung 23** zeigt die Konzentration von KGF in pg/ml der untersuchten Proben. Im Ansatz der mit KGF- mRNA transfizierten Zellen konnte eine Konzentration von 3813,76 pg/ml KGF nachgewiesen werden. Beide Kontrollgruppen zeigen zudem signifikante Unterschiede (** $p < 0,01$) zu dem mit KGF mRNA behandelten Ansatz.

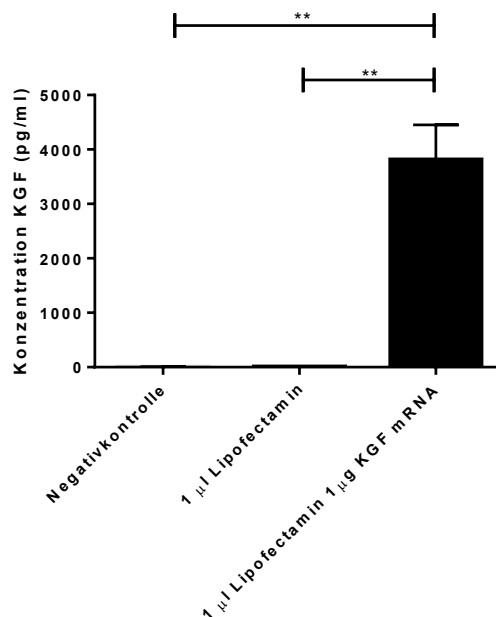


Abbildung 23: gemessene Konzentration (in pg/ml) an KGF 24 h nach Transfektion, eine unbehandelte Kontrolle (OptiMEM), eine Kontrolle mit 1 µl Lipofectamin; eine Konzentration an KGF von etwa 3500 pg/ml konnte über die Transfektion mit Lipofectamin erreicht werden. Allerdings ist dies deutlich weniger im Vergleich zu den zuvor transfizierten HaCat-Zellen mit über 20.000 pg/ml des KGF-Proteins; n=3, One-Way ANOVA, MW ± SEM, ** $p < 0,01$

3.5 Herstellung eines einfachen 3D-Hautmodells

Bei der Herstellung von dreidimensionalen in-vitro Hautmodellen kann zwischen zwei verschiedenen Herstellungsmethoden unterschieden werden. Zum einen gibt es die Möglichkeit Modelle ohne Gerüst (Scaffold-free), zum anderen mit Gerüst (Scaffold-based) herzustellen. In dieser Arbeit wurde die Methode der gerüstfreien Herstellung gewählt und einfache dreidimensionale Modelle nach der Hanging drop Methode hergestellt. Dabei wurden Zellen, hier HaCat-Zellen (Zelllinie), verwendet, die in einem Tropfen Medium auf die Innenseite eines Petrischalendeckels pipettiert wurden. Dieser wurde anschließend gewendet, möglichst so, dass die Tropfen nicht verliefen. Durch die Gravitationskraft sammelten sich die Zellen an einem Punkt im Tropfen und bildeten sogenannte Sphäroide aus. So sollten anschließend, nach erfolgreicher Herstellung der Sphäroide, die Transfektionseffizienzen der zweidimensionalen zur dreidimensionalen Zellkultur verglichen werden.

Nach 24 h Inkubation der Hanging drops bei 37°C und 5% CO₂ hatten sich kleine Sphäroide gebildet, so dass diese mit eGFP- mRNA mittels Lipofectamin transfiziert werden konnten. Nach Transfektionsende wurden die Sphäroide unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet, anschließend in Trypsin/EDTA vereinzelt und die eGFP- Expression am Durchflusszytometer bestimmt.

Die eGFP- Expression wurde mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops untersucht. Die **Abbildung 24** zeigt die mikroskopischen Aufnahmen, sowie zwei Kontrollgruppen.

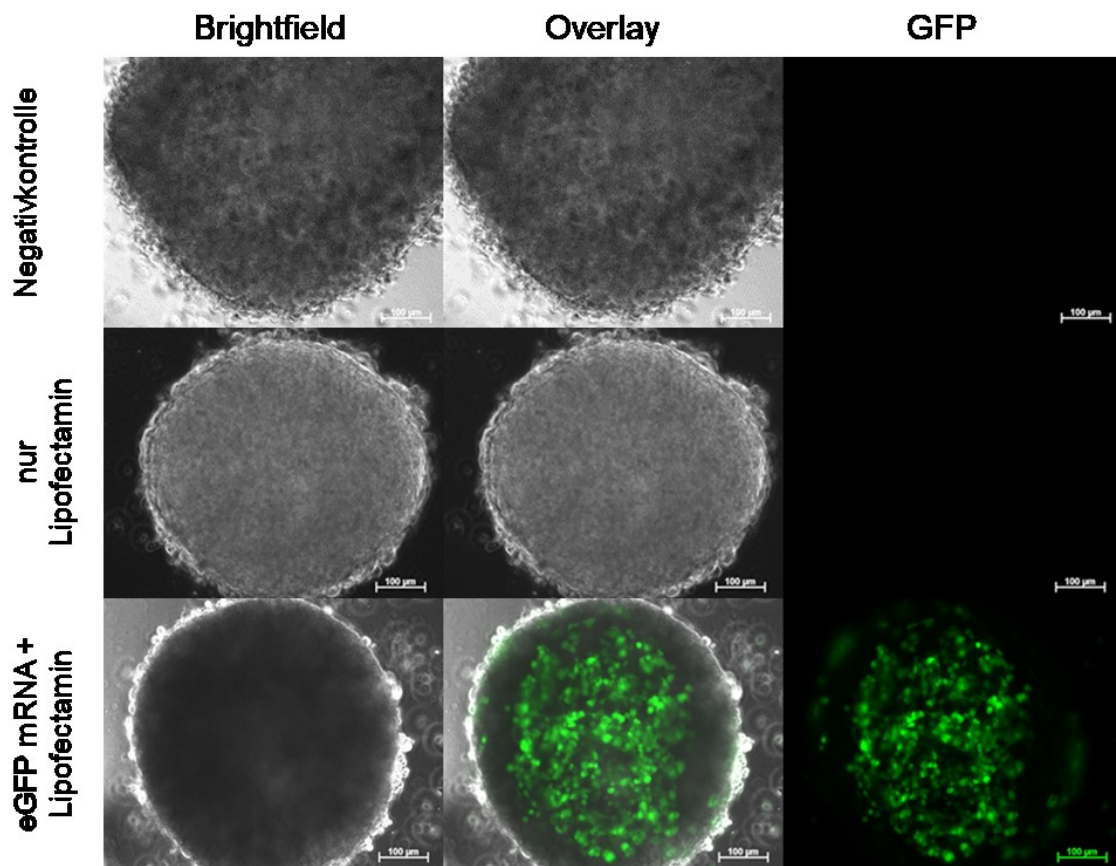


Abbildung 24: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der transfizierten Hanging drops 24 h nach Transfektionsbeginn.

Nachdem die Sphäroide am Fluoreszenzmikroskop auf deren eGFP-Expression untersucht worden waren, wurden sie in Trypsin/EDTA resuspendiert und die einzelnen Zellen anschließend in Cellfix fixiert. Die **Abbildung 25** zeigt die ermittelte Fluoreszenzintensität, bzw. den prozentualen Anteil der eGFP-exprimierenden Zellen. Wie aus beiden Diagrammen ersichtlich, zeigen beide Kontrollgruppen eine leichte Autofluoreszenz. Die Fluoreszenzintensität liegt bei den mit eGFP mRNA transfizierten Zellen bei 250,81, nur etwa 18 % der Zellen haben im dreidimensionalen Verband die transfizierte eGFP mRNA translatieren und so das eGFP Protein bilden können. Dabei gibt es einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) der Kontrolle der behandelten Sphäroide mit Lipofectamin zu den mit eGFP mRNA transfizierten Zellen.

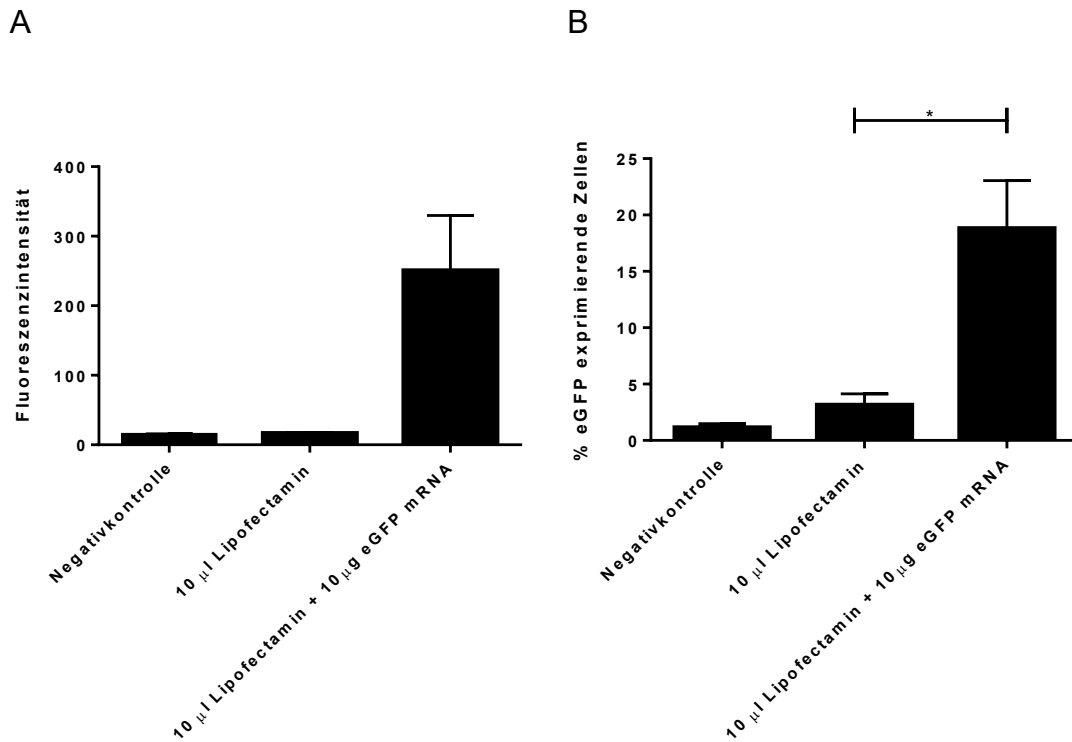


Abbildung 25: Durchflusszytometrischen Analyse 24 h nach Transfektion; in A die gemessene Fluoreszenzintensität, in B die in Prozent angegebenen eGFP-exprimierenden Zellen; jeweils für die beiden Kontrollgruppen, wie auch die mit eGFP mRNA transfizierten Sphäroide; mit nur etwa 20 Prozent eGFP exprimierender Zellen konnten innerhalb der Sphäroide deutlich weniger Zellen transfiziert werden im Vergleich zur zweidimensionalen Zellkultur (n=3, MW ± SEM, * p < 0,05)

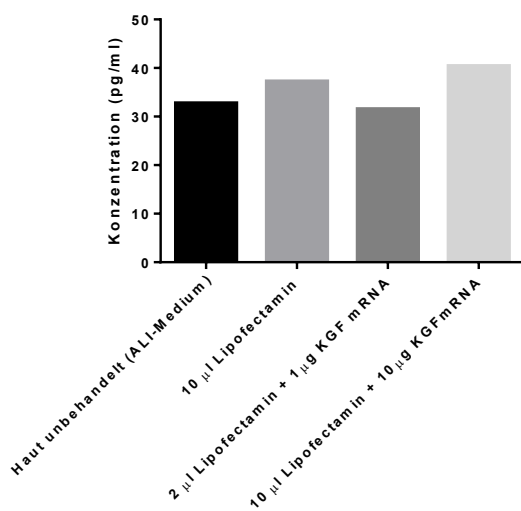
3.6 Transfektion von Hautmodellen (Phenion)

Nachdem die Transfektion der Sphäroide im dreidimensionalen Zellverband erfolgreich getestet wurde, wurde die Transfektion schließlich an Hautmodellen durchgeführt. Um die möglichst beste Transfektionseffizienz zu erzielen, wurden zu Beginn der Versuchsreihen verschiedene Methoden der Durchführung der Versuche überlegt. Nach zahlreichen Recherchen wurden bei der Firma Phenion die im Labor hergestellten Hautmodelle erworben. Diese wurden nach Herstellerangaben auf Filterpapieren an der Luft-Mediumgrenze kultiviert und mit KGF mRNA transfiziert. In diesem Versuch erfolgte die Transfektion über

Injektion der Transfektionsansätze. Als Transfektionsmittel wurde wiederum Lipofectamin, sowie die hergestellten Liposome verwendet. Es erfolgte eine tägliche Medientnahme für den später durchgeführten FGF-7 (KGF-) ELISA. Die **Abbildung 26** zeigt die jeweils ermittelten Konzentrationen an KGF für den Zeitpunkt 24 h und 48 h nach Transfektionsbeginn.

Leider konnte in diesem Versuch keine KGF mRNA erfolgreich transfiziert, bzw. anschließend von den Zellen der Hautmodelle translatiert werden. Die Ergebnisse zeigen nur geringe Konzentrationen an gebildetem KGF-Protein. Auch beide Kontrollgruppen zeigen eine gewisse Konzentration an gebildetem KGF-Protein.

A



B

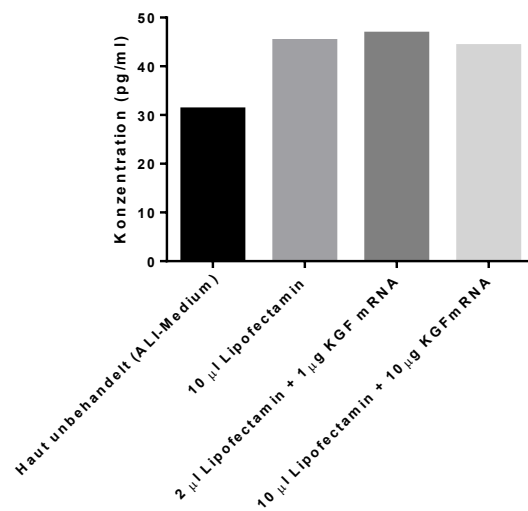


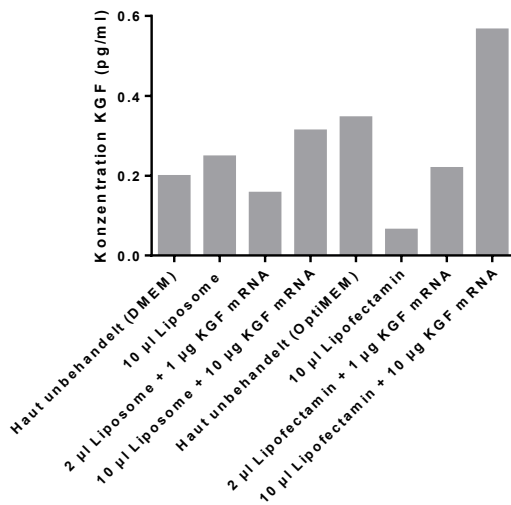
Abbildung 26: ermittelte Konzentrationen des KGF-Proteins in pg/ml für 24 (A) und 48 (B) h nach Transfektionsbeginn (n=1); keine Tendenz der erfolgreichen Transfektion der KGF mRNA und anschließender Expression des KGF Proteins im Vergleich zu den Kontrollen erkennbar.

3.7 Transfektion humaner Haut

Die dafür erhaltene Haut wurde von der Klinik für Hand-, Plastische, Rekonstruktive und Verbrennungschirurgie in Tübingen gestellt. Diese wurde noch im Operationssaal mit dem Dermatome so behandelt, dass Spalthaut, Vollhaut und deepithelialisierte Proben zur Verfügung gestellt wurden. Anhand der zuvor unterschiedlich behandelten Hautproben sollte die Wundheilung nach Transfektion von KGF mRNA überprüft werden.

Im Labor wurden die Hautproben anschließend in PBS gewaschen und die Transfektionsansätze vorbereitet. Hierfür wurde die Transfektionsmittel Lipofectamin und die selbst hergestellten Liposome verwendet, mit denen sowohl eGFP als auch KGF mRNA transfiziert wurden. Die einzelnen Hautproben wurden dieses Mal im Medium schwimmend in 12-Well-Platten kultiviert, zu denen jeweils der Transfektionsansatz hinzugegeben wurde. Danach erfolgte über fünf Tage täglich eine Entnahme des Überstandes, der für den KGF-ELISA verwendet wurde. Die entnommene Menge an Medium wurde durch frisches Medium ersetzt. Die **Abbildung 27** zeigt die erhobenen Konzentrationen in pg/ml des durchgeführten FGF7- (KGF-) ELISAs 24, bzw. 48 h nach Transfektionsbeginn. Als Kontrollen dienten je Transfektionsreagenz eine unbehandelte Probe und eine mit 10 µl des jeweiligen Transfektionsmittels behandelte Probe.

A



B

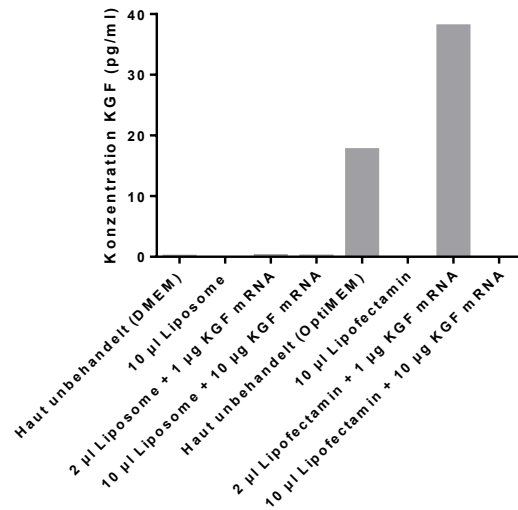


Abbildung 27: gemessene Konzentration (in pg/ml) an KGF nach 24 h (A) und 48 h (B) nach Transfektionsbeginn (n=1); in A: höhere Konzentration von etwa 0,6 pg/ml KGF für den Ansatz 10 µl Lipofectamin + 10 µg KGF mRNA, allerdings auch erhöhte Konzentrationen bei den Kontrollgruppen; **in B:** hohe Konzentration von 40 pg/ml für den Ansatz 2 µl Lipofectamin + 1 µg KGF mRNA.

Wie in Schaubild A erkennbar, zeigen die mit KGF mRNA behandelten Proben nur teilweise eine höhere Konzentration als die nicht mit mRNA behandelten Proben. Einzig die Probe mit 10 µl Lipofectamin + 10 µg KGF mRNA zeigt eine etwas höhere Konzentration an KGF von 0,566 pg/ml. In Graph B, 48 h nach Transfektionsbeginn, zeigt die Probe der unbehandelten Haut (OptiMEM) und die Probe mit 2 µl Lipofectamin und 1 µg KGF mRNA, eine KGF-Protein Produktion. Den jeweiligen anderen Proben, die mit KGF mRNA transfiziert wurden, konnte keine KGF-Produktion nachgewiesen werden.

Auch die tägliche Fotodokumentation der einzelnen Proben, welche mögliche Wundheilungsprozesse festhalten sollte, zeigte keine Veränderungen der Hautproben.

Die **Abbildung 28** stellt exemplarisch die Bilder der Voll- Spalt-, sowie der deepithelialisierten Haut dar, welche zuvor mittels Lipofectamin mit KGF mRNA

transfiziert wurden. Es waren keine positiven Veränderungen bezüglich der Wundheilung 96 h nach Transfektionsbeginn erkennbar.

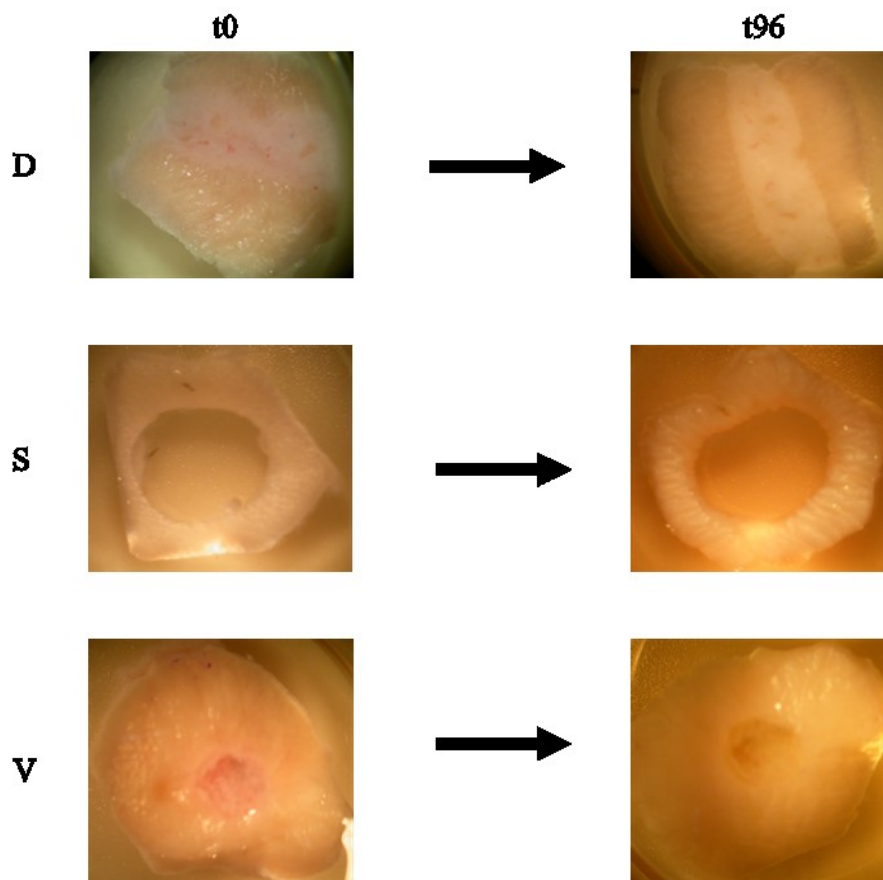


Abbildung 28: Bilder der deepithelialisierten Haut (D), Spalthaut (S) und Vollhaut (V) zum Zeitpunkt der Transfektion (t0) und 96 h danach (t96)

Nach 96 h wurden die Präparate in Paraformaldehyd (4%) eingelegt und anschließend für die Anfertigung histologischer Paraffinschnitte vorbereitet, die anschließend mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt wurden. Die in **Abbildung 29** dargestellten mikroskopischen Aufnahmen zeigen jeweils eine unbehandelte, sowie eine mit KGF-mRNA behandelte Probe.

Bei Vergleich der beiden Proben ist eine stärkere Reepithelialisierung bei der mit KGF mRNA transfizierten im Gegensatz zur unbehandelten Hautprobe erkennbar.

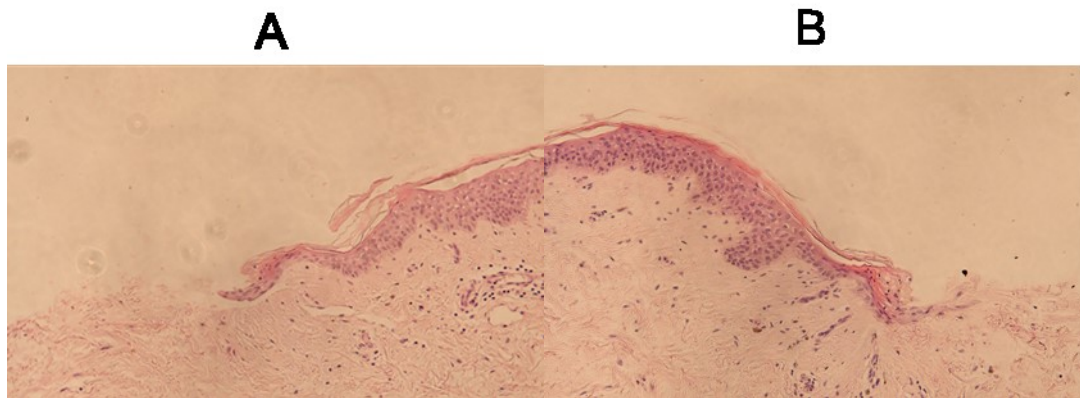


Abbildung 29: A: unbehandelt (OptiMEM), B: 10 µl Lipofectamin und 10 µl KGF mRNA

3.8 Transfektion humaner Haut (nach Modell Phenion)

Nachdem die gekauften Hautmodelle nicht die gewünschten Ergebnisse zeigten, wurde nochmals humane Haut transfiziert. Der Versuchsaufbau glich dieses Mal jedoch dem der Hautmodelle. Da bei den Versuchen zuvor die KGF mRNA sowohl in der humanen Haut, als auch im Hautmodell nicht translatiert wurde, wurde nun eGFP mRNA transfiziert und 24 h nach Transfektion die eGFP-Expression am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Hautproben wurden dafür am Kryotom geschnitten, anschließend wurde eGFP immunhistochemisch über Antikörper markiert und schließlich eine DAPI-Färbung durchgeführt.

Die **Abbildung 30** zeigt die drei Proben, jeweils in einer kleinen Petrischale. Diese wurden wie im Versuch zuvor über Injektion mittels Nadeln transfiziert. Ebenfalls wurde nur Lipofectamin als Transfektionsmittel verwendet.

Die **Abbildung 31** zeigen die jeweils transfizierten Hautproben. Eine unbehandelte Probe wurde als Kontrolle eingesetzt. Erkennbar ist, dass je höher die Menge an verwendeter eGFP mRNA, bzw. in Kombination des Transfektionsmittels Lipofecatmin, desto mehr fluoreszierende Anteile wurden im Haut-Kryoschnitt detektiert. Das bedeutet, dass bei der Probe, die mit einer größeren Menge an eGFP mRNA transfiziert wurde, mehr eGFP gebildet wurde.

Die unbehandelte Probe emittiert hingegen deutlich weniger Licht, welches mit einer gewissen Eigenfluoreszenz des Gewebes zu erklären ist.

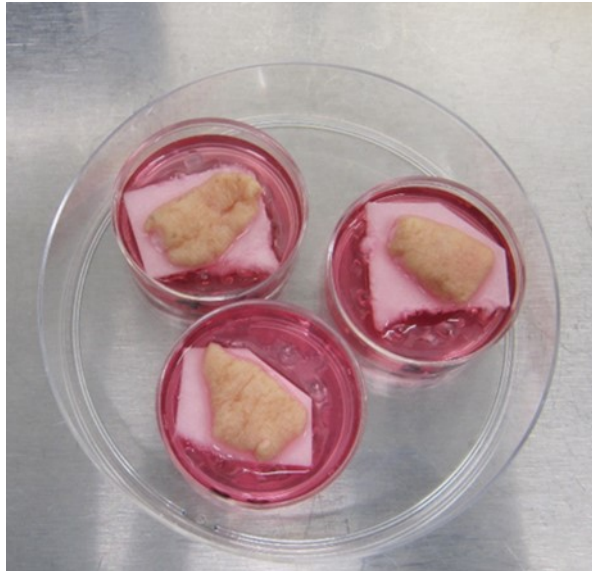


Abbildung 30: Hautproben auf je einem Filterpapier, kultiviert an der Luft-Medium Grenze

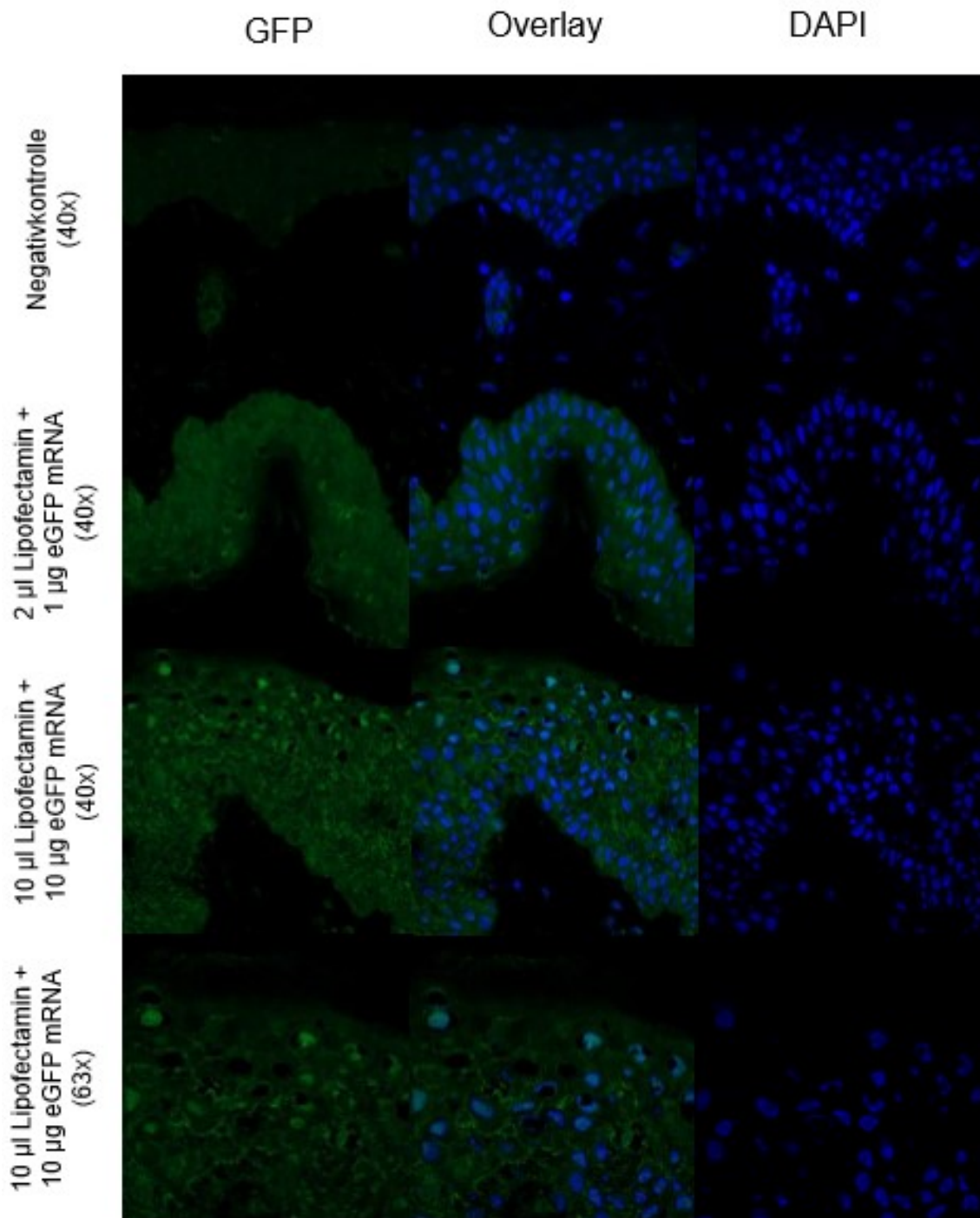


Abbildung 31: transfizierte Haut nach Kryofixierung und Untersuchung am Fluoreszenzmikroskop; Die Abbildungen zeigen, dass mit zunehmender Menge an transfizierter eGFP mRNA und steigender Menge an Lipofectamin die Fluoreszenzintensität stärker ist und somit auch mehr eGFP-Protein exprimiert wurde.

4. Diskussion

Für die Therapie von Wunden gibt es heutzutage verschiedene Behandlungsmöglichkeiten. Zu diesen gehören unter anderem die Verwendung von Wundauflagen und Hautersatz, die Durchführung negativer Druckbehandlung oder hyperbaren Sauerstofftherapie, aber auch der Einsatz von Wachstumsfaktoren [88]. Besonders der Einsatz von Wachstumsfaktoren bietet große Chancen für die Wundheilung der Zukunft.

Die schon länger bekannte Therapiestrategie Krankheiten durch Einschleusung von DNA und RNA in menschliche Körperzellen zu heilen, soll nun auch für die Heilung von Wunden genutzt werden. In dieser Arbeit sollte nun durch Einschleusung von mRNA, welche das Protein KGF codiert, die Wundheilung mittels in-vitro und ex-vivo Versuchen untersucht werden.

Bereits 1990 wurde die weltweit bekannt gewordene Ashanti DeSilva, als erste Patientin, mittels Gentherapie behandelt, wobei später eine Debatte über die Wirksamkeit deren Behandlung aufkam [89]. Für die Therapie zahlreicher Erkrankungen arbeiten derzeit viele Forschungsgruppen an der Optimierung dieser Therapiestrategien. Bei der Gentherapie können sowohl DNA, als auch RNA zum Einsatz kommen. RNA, in Form von mRNA, bietet hierbei, im Gegensatz zu DNA, zahlreiche Vorteile. Sie hat eine geringere immunogene Aktivität, muss nicht in den Zellkern der transfizierten Zelle gelangen und wird nicht ins Genom des Wirts integriert [90]. Der in unserer Forschungsgruppe verwendete Wachstumsfaktor KGF, welcher unter anderem für die Reepithelisation von Wunden von großer Bedeutung ist und bereits in in-vitro Zellversuchen sein Potential unter Beweis gestellt hat, soll nun in ex-vivo Versuchen auf die Heilung von provozierten Wunden untersucht werden. Dafür wurde zuvor aus einem KGF-Plasmid die KGF mRNA synthetisiert, welche anschließend in in-vitro, als auch ex-vivo Versuchen auf deren Potential die Wundheilung zu optimieren, untersucht wurde.

Zunächst jedoch sollte in durchgeführten in-vitro Zellversuchen die Transfektionsmethode der mRNA in Zellen anhand verschiedener Transfektionreagenzien untersucht, und die Transfektionseffizienz optimiert werden. Dabei sollen verschiedene Transfektionsmittel verglichen und deren Effektivität untersucht werden. Anschließend sollen die erworbenen Erkenntnisse auf die Transfektion primärer humaner Keratinozyten und schließlich in ex-vivo Versuchen auf die Transfektion humaner Haut angewandt werden.

4.1 Etablierung der synthetischen mRNA als therapeutisches Mittel zur Induktion der KGF-Expression

Um die Expression von KGF durch Transfektion von KGF mRNA in Zellen untersuchen und anschließend auch optimieren zu können, wurden in zahlreichen Versuchen an Hek293 und HaCat Zellen die Transfektionseffizienzen untersucht. Sowohl durch den Einsatz verschiedener Transfektionsreagenzien, als auch durch verschiedene Konzentrationen an mRNA sollte so die möglichst größte Effizienz erreicht werden. Hierfür wurden die Zellen mittels Transfektionskomplexen bestehend aus selbst hergestellter Liposomen oder des im Handel erhältlichen Lipofectamins mit eGFP- oder KGF-kodierender mRNA transfiziert und nach 24 h die Zellviabilität und die Transfektionseffizienz bestimmt.

Sowohl die Liposome, als auch Lipofectamin haben die eGFP mRNA im ersten Transfektionsversuch an den HaCat-Zellen in die Zellen freisetzen können. Dies konnte durch die fluoreszierenden mikroskopischen Aufnahmen bewiesen werden. Jedoch wurde, bei der Untersuchung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop, deutlich weniger eGFP bei den mit Liposomen und eGFP mRNA transfizierten HaCat-Zellen gebildet. Dies lässt darauf schließen, dass weniger mRNA transfiziert wurde und somit deutlich weniger eGFP gebildet werden konnte. Den Ergebnissen zufolge hat sowohl das Transfektionsmittel Lipofectamin, als auch die Liposome in Kombination mit dem transfizierten

Genmaterial toxische Wirkungen auf die Zellen. Vor allem die Transfektion der KGF mRNA zeigte nach Versuchsende deutlich reduzierte Zellviabilitäten. Neben den Transfektionen der HaCat-Zellen zeigten auch die Hek293-Zellen nach Transfektion von KGF mRNA deutliche niedrigere Viabilitäten als bei den Transfektionen von eGFP mRNA. In den Versuchen, in denen die HaCat-Zellen mehr als die Hälfte der Viabilität während der Transfektion der KGF mRNA eingebüßt haben, zeigten die Ergebnisse für die Hek293-Zellen höhere Viabilitäten nach Transfektionsende.

Sowohl die Liposome, als auch das verwendete Lipofectamin zählen zu der Strategie des nicht-viralen Gentransfers, welche auch nach Jahrzehnten und zahlreichen Optimierungsversuchen nach wie vor toxische Wirkungen auf Zellen haben. Sie haben allerdings auch zahlreiche Vorteile im Gegensatz zum viralen Gentransport, wie geringere Immunantworten des transfizierten Organismus oder eine größere Kapazität für die Aufnahme von Genmaterial. Sie können unterschiedlich morphologische Gestalten annehmen und wichtige therapeutisch nutzbare Biomoleküle aufnehmen [91-94]. Allerdings ist ihre Effektivität, besonders in in-vivo Experimenten, geringer [93].

Nachdem die Lipofektion zu Beginn nur zur Transfektion von Plasmid-DNA (pDNA) eingesetzt wurde, wurde die erste mRNA von Malone et al. mit Hilfe von Lipofektion transfiziert. Sie transfizierten mehrere Zelllinien mit Luziferase mRNA unter Nutzung von DOTMA/DOPE ((N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchloride/1,2 dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine). Dabei entdecken sie eine lineare Beziehung zwischen der eingesetzten Menge an mRNA und der Aktivität der Luziferase [95].

Allerdings können Serumproteine, welche sich beispielsweise im Medium bei in-vitro Versuchen befinden, das Zeta-Potential neutralisieren und durch die Bindung an die Komplexe deren Größe verändern, so, dass die Transfektion deutlich geringer ausfällt [96].

So kann es bei in-vitro Versuchen dazu kommen, dass das im Medium enthaltene Serum, welches für die Kultivierung der Zellen notwendig ist, Interaktionen mit dem Bilayer der Liposome eingehen und diese destabilisieren [97]. Außerdem

können Serumproteine die Koppelung der Liposome an die Zellmembran blockieren [98] und die Fähigkeit derer, mit der Membran zu verschmelzen, verringern [99]. Sie verringern die Fähigkeit der Aggregation der Komplexe mit der Zellmembran und führen zur Freisetzung und Degradation des genetischen Materials [100]. Da in den in-vitro Versuchen die Zellen mit Lipoplexen im Vollmedium, welches FCS enthält, durchgeführt wurden, kann die geringere Transfektionsrate auch darauf zurückzuführen sein. So könnte in zukünftig durchgeführten Versuchen zum Vergleich Medium mit oder ohne den Zusatz von Serum durchgeführt werden.

Auch die Größe der verwendeten Lipoplexe spielt bei der Transfektionseffizienz eine entscheidende Rolle. Bei der Herstellung nach einem etablierten Protokoll wurde die lipidhaltige Lösung mehrmals durch einen Polycarbonatfilter mit der Porengröße von 0,1 µm gepresst. Die entstandenen Liposome haben so eine ungefähre Größe von 100 nm. Dies konnte auch in einer zuvor in der Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchung mit einem Zetasizer-Spektrometer nachgewiesen werden [101]. Ebenso veränderte sich deren Größe nach Lagerung bei 4°C nach 30 Tagen nicht. In zahlreichen Publikationen wird die Wichtigkeit der Größe der Liposome im Verhältnis zu deren Effektivität erwähnt [102-105].

So konnte in einer Publikation von Turek et al. [106] ein Zusammenhang der Größe der kationischen Lipoplexe mit der Anwesenheit von Serum bei in vitro Transfektionen gefunden werden. Sind die Lipoplexe größer als 700 nm ist die Transfektionseffizienz für die Anwesenheit oder Abwesenheit von Serum gleich, wohingegen bei einer Größe von unter 250 nm eine effiziente Transfektion nur in Abwesenheit von Serum möglich ist. Brgles et al. [107] beschreiben in ihrer Publikation den Zusammenhang der Größe der Liposome und die Ladungsverhältnisse des Liposom/DNA-Komplexes auf dessen Transfektionseffizienz. Mit abnehmender Größe der Liposome steigt zwar die Transfektionseffizienz, gleichzeitig steigt jedoch auch die Zytotoxizität.

Ebenso hängt die Toxizität mit dem Ladungsverhältnis zwischen den positiv geladenen Liposomen und den negativ geladenen Nukleinsäuren zusammen.

Höhere Ladungsverhältnisse haben so höhere Toxizitäten im Vergleich zu geringeren Ladungsverhältnissen [108]. Hohe Ladungsverhältnisse und hohe Ladungsdichten tragen zur Transfektionseffizienz bei, wahrscheinlich bedingt durch stärkere Interaktionen der Lipoplexe mit der Zellmembran oder auch die einfachere Freisetzung des Genmaterials aus den Endosomen im Zytoplasma [107].

So könnten für künftige Transfektionen mittels der Liposome vorerst an der Optimierung derer gearbeitet werden. Dies betrifft deren Größe, welche durch Filter unterschiedlicher Porengröße verändert werden könnte, wie auch deren Zusammensetzung.

Des Weiteren wirken auch die verwendeten mRNA toxisch auf die Zellen. Sie aktivieren über Toll-like Rezeptoren deren Immunsystem. Bei Menschen wurden bislang 13 Toll-like-Rezeptoren identifiziert, von denen besonders TLR3, TLR7 und TLR8, welche in den Endosomen vorkommen, für die Erkennung fremder mRNA zuständig sind [72]. Die Erkennung und somit die Aktivierung der Toll-like Rezeptoren kann durch die Verwendung modifizierter Nukleotide wie beispielsweise 2-Thiouridin, Pseudouridin und 5-Methylcytidine verringert werden [38, 75]. So tragen die Modifikationen dazu bei, die mRNA zu stabilisieren, sie vor Degradation zu schützen und deren Expressionrate zu verbessern [90, 109]. Des Weiteren werden von der mRNA sogenannte retinoic acid-inducible gene I - Rezeptoren (RIG-Rezeptoren) aktiviert, welche sowohl zu einer Hochregulierung und Produktion von Interferonen, zu einer Verminderung der Translation, als auch zum Zelltod führen können [110, 111].

Generell hängt die Stabilität der mRNA von deren struktureller Zusammensetzung und zellulären Faktoren ab, wozu unter anderem das 5'-Cap, die 5'- und 3' nicht-translatierten Bereiche und der Poly-A-Schwanz zählt [112].

Beim Vergleich der Transfektionen von HaCat-Zellen mit den primären humanen Keratinozyten wurde zudem ein weiteres im Handel erhältliches Transfektionsreagenz mit dem Namen Transit mRNA Transfection Kit verwendet, wohingegen die Liposome, aufgrund der zuvor ermittelten schlechten Transfektionseffizienzen, nicht mehr verwendet wurden.

Das Transfektionsreagenz Transit hat bei den Transfektionsversuchen an den HaCat-Zellen ähnliche Viabilitäten der Zellen nach Transfektion hervorgerufen wie das verwendete Lipofectamin. Bei der Viabilitätsmessung mittels des durchgeführten MTT-Assays konnte es sogar sowohl für die Transfektion der KGF mRNA, als auch für die eGFP mRNA die beste Zellverträglichkeit nach Transfektionsende im Vergleich zu den Liposomen und dem verwendeten Lipofectamin zeigen. Bei der Untersuchung der eGFP-Expression der HaCat-Zellen konnte am Durchflusszytometer jedoch gezeigt werden, dass die mit eGFP mRNA mittels Lipofectamin transfizierten Zellen deutlich mehr eGFP exprimierten als die Zellen, welche mit Transit behandelt wurden. Ebenso fielen die gemessenen KGF Konzentrationen bei der Überprüfung mittels des KGF-ELISAs für das Transfektionsmittel Transit deutlich geringer aus als für Lipofectamin. Das bedeutet also, dass das Transfektionsreagenz Transit relativ geringe toxische Wirkung auf die immortalisierten Keratinozyten zeigte, jedoch die Effektivität die mRNA in die Zellen freizusetzen, gering ausfiel.

Bei der Anwendung von Transit im Zuge der Transfektion der primären humanen Keratinozyten konnte hingegen schon wenige Stunden nach Beginn der Transfektion ein Zellsterben erkannt werden. Bei der nach 24 h folgenden Zellviabilitätsmessung zeigten die Werte deutliche Viabilitätseinbrüche der Zellen. Die Ansätze mit Lipofectamin wurden, bis auf den Ansatz der mit KGF mRNA transfizierten Zellen, gut von den Zellen vertragen. Im Vergleich zur unbehandelten nur mit KGM2 kultivierten Kontrolle konnten sogar höhere Viabilitäten erzielt werden. Somit scheint das Transit mRNA Transfection Kit in Kombination mit serumfreien KGM2-Medium toxisch auf die primären Zellen gewesen zu sein. Gleiche Ergebnisse lieferten die MTT-Assays, welche ebenfalls die Viabilitäten der Zellen nach Transfektionende erkennen ließen.

Möglicherweise könnte bei künftigen Transfektionen mit Transit auf die Zusätze des KGM2 Mediums verzichtet oder auch OptiMEM verwendet werden. Offensichtlich scheinen die Zusätze, welche dem serum-feien KGM2 Medium zugegeben werden und eigentlich für eine ausreichende Proliferation sorgen sollen, Interaktionen mit den Inhalten des Transfektionsmittels eingegangen zu

sein. Dies könnte schlussendlich toxisch auf die primären Keratinozyten gewirkt haben.

Während die mit Transit behandelten Zellen nur knapp 5,5 % Viabilität nach 24 h besaßen, zeigten die mit Lipofectamin behandelten primären Zellen deutlich bessere Viabilitäten. Allerdings konnte gezeigt werden, dass auch hier wiederum die mRNA toxisch auf die Zellen einwirkt. Besonders die KGF mRNA wurde relativ schlecht von den Zellen vertragen.

Da die wenigen übrig gebliebenen Zellen der Transitansätze nach Trypsinierung und somit Lösung der Zellen vom Zellenboden weiter geschwächt und auch zerstört wurden, konnten anschließend am Durchflusszytometer auch keine Zellen mehr detektiert werden. Dafür konnte für die mit Lipofectamin und eGFP mRNA transfizierten Zellen gezeigt werden, dass 84,5 % der Zellen eGFP exprimiert haben. Im Vergleich dazu hat die Transfektion mit Lipofecatmin und eGFP mRNA bei den HaCat-Zellen mit nur knapp 79 % der Zellen schlechter funktioniert. Dies zeigt, dass auch primäre Zellen gut transfizierbar sind, trotz dem, dass sie deutlich schwerer kultivierbar sind als immortalisierte Zellen.

Nach Transfektionsende wurde auch bei den primären Keratinozyten Medium entnommen und für den Nachweis von exprimiertem KGF ein ELISA durchgeführt. Allerdings wurde auf die Untersuchung der mit Transit behandelten Zellen verzichtet. Die ermittelte Konzentration von 3813,76 pg/ml KGF für die Transfektion mit Lipofecatmin zeigt im Vergleich zu den mit KGF mRNA behandelten HaCat- Zellen mit einer Konzentration von 22850,2 pg/ml eine deutlich geringere Expression von KGF der primären Zellen.

Primäre humane Keratinozyten sind, wie alle primären Zellen, schwierig zu isolieren und zu kultivieren [113]. Sie können zudem nur eine bestimmte Anzahl an Passagen kultiviert werden [114]. Wie oben beschreiben, wurde zwar prozentual etwas mehr eGFP von ihnen exprimiert, jedoch deutlich weniger KGF. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die primären Zellen deutlich empfindlicher gegenüber toxischen Stoffen sind und das exogene Genmaterial in

Form von Nukleinsäuren von primären Zellen im Zytoplasma schneller degradiert wird [115], weswegen sich Transfektionen bei primären Zellen deutlich schwieriger gestalten.

Generell kann bei der in-vitro Kultivierung von primären Keratinozyten zwischen zwei Arten unterschieden werden, welche beide Vor- und Nachteile besitzen.

Rheinwald und Green haben 1975 eine Methode entwickelt, wobei Keratinozyten in Anwesenheit von Fibroblasten in-vitro kultiviert werden [116]. Ebenso können Keratinozyten in serum-freien Medium ohne die Anwesenheit von Fibroblasten kultiviert werden. Diese Methode wurde zur Kultivierung der in unseren Versuchen verwendeten und untersuchten Keratinozyten eingesetzt. In serum-freiem Medium mit niedrigem Kalziumspiegel können mögliche andere Zellen nicht wachsen und die Kontaminationsrate bleibt gering. Andererseits können hohe Kalziumspiegel die Differenzierung der Keratinozyten hervorrufen [113]. Zellen, welche in Medium mit Serum und Fibroblasten kultiviert werden, zeigen eine schnelle Proliferation und widerstandfähiger gegen Apoptosen [117].

So ist der große Vorteil der in Fibroblasten kultivierten Keratinozyten eine hervorragende Proliferation der Keratinozyten. Allerdings überwiegen die Nachteile, da Bestandteile des Serums und die metabolische Aktivität der Fibroblasten die Aktivität der Keratinozyten verschleiern oder zugesetzte Substanzen behindern können. Deshalb sollte für biologische Untersuchungen der Keratinozyten die zuverlässigere serum-freie Kultivierung bevorzugt werden [118].

Eine weitere Möglichkeit bestände darin, weitere Transfektionsreagenzien zu untersuchen, um die Transfektionseffizienzen zu optimieren. Dickens et al. [119] beschreiben in ihrer Publikation die Anwendung verschiedener Transfektionsreagenzien an primären humanen und porcinen Keratinozyten, wobei Plasmid GFP-DNA transfiziert wurde. Für die Transfektionreagenz Fugene HD konnten sie gute Transfektionseffizienzen erzielen, wobei der prozentuale Anteil der GFP-Expimierenden Zellen ebenfalls am Durchflusszytometer gemessen wurde.

4.2 Etablierung von Transfektionsmodellen zur Optimierung der Wundheilung

In der Dissertationsschrift von Markus Denzinger am THG-Labor in Tübingen konnte anhand von Scartch Assays eine gestiegene Proliferationsrate durch die Transfektion von KGF mRNA und damit die schnellere Schließung des provozierten Kratzers auf in well-Platten kultivierten HaCat-Zellen bewiesen werden.

Dass KGF eine positive Wirkung auf die Wundheilung hat, konnte schon in zahlreichen Studien bewiesen werden. Besonders die Anwendung der Scratch-Assays, bei denen ein einheitlich großer Kratzer in einem konfluenten Zellrasen provoziert wird, scheint für die Untersuchung der Wirkung von Wachstumsfaktoren von Vorteil. So konnte Koivisto et al. in einer Studie die positive Wirkung von KGF auf die Proliferation von HaCat-Zellen nachweisen. Bereits bei einer Konzentration von 2 ng/ml KGF zeigte sich eine erhöhte Proliferation-, bzw. Migration der Keratinozyten [120]. Kopp et al. konnten durch die Anwendung von Transplantaten, welche genetisch modifizierte HaCat-Zellen beinhalten und dauerhaft KGF produzieren, die dadurch beschleunigte Wundheilung von Brand-, bzw. chronischen Wunden beobachten [121].

Marti et al. konnten ebenso in ihrer in-vivo Studie die positive Wirkung von KGF auf die Wundheilung beweisen. Hierfür verwendeten sie u.a. die Transfektionsmethode der Elektroporation, wobei durch eine angelegte elektrische Spannung die Zellmembran permeabel gemacht werden kann und so die KGF Plasmid DNA in die Zelle eingeschleust wird. Sie konnten nachweisen, dass die mit KGF behandelten Wunden an Mäusen nach 12 Tagen um 38 % kleiner waren als die unbehandelten Wunden [122].

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst jedoch ein sehr einfaches, dreidimensionales Hautmodell im Labor hergestellt werden, wobei in anschließenden Versuchen die Wirkung von KGF auf in-vitro hergestellte Hautmodelle und humane Haut umgesetzt wurde. Für die einfachen,

dreidimensionalen Hautmodelle wurden immortalisierte Keratinozyten (HaCat) verwendet, welche nach der Hanging drop Methode sogenannte Zellsphäroide ausbilden. Diese Sphäroide können aufgrund der Schwerkraft auch ohne die Anwesenheit von Zellgerüsten auskommen, weswegen diese Methode als Gerüst-freies Verfahren bekannt ist. Allein die von den Zellen gebildete Extrazellulärmatrix hält alle Zellen in Kugelform zusammen.

Nachdem die Herstellung der Sphäroide gelungen war, wurden diese, als Beispiel eines einfachen Hautmodells, mit mRNA transfiziert. Dafür wurde ausschließlich das Transfectionsmittel Lipofectamin verwendet, da dieses zuvor die besten Transfektionsergebnisse zeigte. Anstatt der KGF mRNA wurde jedoch eGFP mRNA verwendet, da das von den Zellen exprimierte eGFP-Protein einfacher nachzuweisen ist als das KGF-Protein. Sowohl das Transfektionsreagenz, als auch die eGFP mRNA wurden dem Medium zugegeben, in welchem die Sphäroide kultiviert wurden. Bei dieser Methode kann die vom Transfektionsreagenz komplexierte mRNA die Zellen also nur über Diffusion im Medium erreichen.

So sollte also die Transfektionseffizienz, nachdem sie bei der Transfektion zweidimensional wachsender Zellen relativ hoch war, am dreidimensionalen Modell untersucht werden.

24 h nach Transfektionsbeginn konnte eine erfolgreiche Transfektion und auch Exprimierung des eGFP-Proteins am Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. Um die Effizienz jedoch auch am Durchflusszytometer messen zu können, wurden die Sphäroide in Trysin/EDTA resuspendiert bis die Zellen einzeln vorlagen.

Es konnte gezeigt werden, dass im dreidimensionalen Zellverband nur 18,83% der Zellen eGFP exprimiert haben. Im Vergleich zu den in zweidimensionaler Zellkultur transfizierten Zellen mit ca. 72 %, ist dies deutlich weniger. Das lässt darauf schließen, dass im Zellverband deutlich weniger Zellen von der in Lipofectamin komplexierter eGFP mRNA erreicht worden und transfiziert worden sind.

Für die danach durchgeführten Transfektionsversuche an humaner Haut, bzw. den Hautmodellen konnte also, bei Zugabe des Transfektionsmittels und der mRNA ins Medium, mit nur einer maximalen Transfektionseffizienz von nicht mehr als 20 % ausgegangen werden.

Für die durchgeführten ex-vivo Hautversuche wurde die humane Haut noch im Operationssaal mit dem Dermatom, sowie mit Hautstanzen behandelt. Diese verschiedenen Behandlungen der Haut sollten Wunden nachempfunden sein, wobei nach Transfektionsende eine mögliche eingetretene Wundheilung untersucht werden sollte.

Die so gewonnene Spalt-, Voll- bzw. deepithelialisierte Haut wurde anschließend mit dem Skalpell im Labor unter sterilen Bedingungen in gleich große Stücke geschnitten. Noch am selben Tag erfolgte die Transfektion der Hautproben. Dafür wurde sowohl das Transfektionsmittel Lipofectamin, als auch die selbst hergestellten Liposome verwendet. Wiederum sollten die KGF-, bzw. die eGFP-mRNA transfiziert werden, wobei die Wirkung von KGF auf die Wundheilung untersucht werden sollte. eGFP hingegen wurde nur als Kontrolle eingesetzt, um eine mögliche gelungene Transfektion nachzuweisen.

Leider konnten auf den Bildern auch nach 96 h keine Unterschiede in der Wundheilung erkannt werden. Zudem konnte weder unter dem Fluoreszenzmikroskop eGFP, noch im KGF-ELISA KGF nachgewiesen werden.

Die Gründe für das Nichtgelingen dieses Versuches sind vielfältig. Wie schon im Abschnitt zuvor beschriebenen Transfektion der Sphäroide, kann die einfache Zugabe der Transfektionsansätze ins Medium höchstwahrscheinlich nicht von den Hautproben aufgenommen werden. Dies würde bedeuten, dass die Transfektionsansätze nur oberflächliche Hautschichten erreicht hatten, jedoch nicht tiefer eindringen konnten. Auch in den Hautproben vorhandene Proteine können die komplexierte mRNA degradieren und so die Transfektion, trotz Einsatz serum-freien Mediums, wirkungslos machen.

Im weiteren Vorgehen wurden die im Handel erhältlichen Phenion Full-Thickness Skin Models transfiziert. Die Transfektionsansätze wurden wie zuvor hergestellt. Die Hautmodelle wurden allerdings nicht wie zuvor im Medium kultiviert, sondern auf Höhe der Luft-Medium Grenze. Zudem wurde das Verfahren der Applikation der Transfektionsansätze aufgrund der zuvor gewonnenen Ergebnisse verändert. Die jeweiligen Ansätze wurden über je 5 Einstiche pro Hautmodell mit einer Spritze abgegeben. Der weitere Verlauf erfolgte wie im Versuch zuvor.

Leider konnte auch in diesem Versuch keine mRNA transfiziert, bzw. anschließend das jeweilige Protein exprimiert werden.

Die Hautmodelle wurden auf Papierfiltern kultiviert, welche sich zwar mit dem Nährmedium vollsaugen und die Zellen so ernähren können, allerdings ist es fraglich, ob gebildetes KGF-Protein durch den Filter ins Medium gelangt, welches für den Nachweis von KGF im ELISA verwendet wurde. Zudem werden dreidimensionale, im Labor hergestellte Hautersatzmodelle, meist durch den Einsatz von Gerüsten hergestellt. Diese können aus den unterschiedlichsten Materialien aufgebaut, wobei Zellen in dieses Gerüst eingebettet werden. Dieses Gerüst besteht bei den Full Thickness skin models aus quervernetztem, lyophilisiertem Rinderkollagen [123].

Da die Hautmodelle, durch das bei der Herstellung verwendete Rinderkollagen, eine gallertartige Konsistenz aufwiesen, konnten die pro Ansatz injizierten 100 µl nur schlecht oder gar nicht vom Gewebe aufgenommen werden. Dies zeigte sich dadurch, dass die jeweils über fünf Einstiche injizierten 20 µl größtenteils während der Injektion, wozu ein gewisser Druck aufgewendet werden muss, direkt über den Einstich wieder abfließen.

Sollte doch eine Transfektion stattgefunden haben, hätte diese über den Nachweis von eGFP unter dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden können. Allerdings könnte sowohl das Einlegen der Proben nach Transfektionsende in Paraformaldehyd, als auch die spätere Alkoholreihe zur Dehydrierung der Präparate und schließlich das Einbetten in Paraffin, die exprimierten Proteine denaturiert haben.

In einem weiteren und letzten Versuch wurde nochmals an humaner Haut transfiziert. Diese wurde jedoch, auch wie die erworbenen Hautmodelle, auf Filterpapieren an der Luft-Medium Grenze kultiviert.

Da sich bis zu diesem Zeitpunkt die Transfektion von Haut als sehr schwierig herausstellte, wurde auf die Transfektion von KGF mRNA verzichtet. Zudem wurde nur Lipofectamin als Transfektionsmittel verwendet und eGFP mRNA in zwei unterschiedlichen Konzentrationen. Nach Inkubation der Ansätze wurden die unterschiedlichen Ansätze wiederum mit Spritzen in die humane Haut injiziert.

Hier jedoch, im Vergleich zu den Hautmodellen, konnte der injizierte Ansatz von insgesamt 100 µl komplett von der Haut aufgenommen werden, was sich dadurch zeigte, dass sich die Haut leicht aufblähte. Im Gegensatz zu den Transfektionen zuvor wurden die Hautproben schon 24 h nach Transfektionsbeginn für die histologischen Untersuchungen vorbereitet. Zudem wurden die Hautproben dieses Mal nicht in Paraformaldehyd eingelegt und in Paraffin gegossen, sondern sofort in TissueTack auf Trockeneis eingefroren, bevor schließlich am Kryotom Gefrierschnitte angefertigt wurden. Anschließend wurde das eGFP Protein immunhistochemisch markiert und die Präparate einer DAPI- (4',6-Diamidino-2-phenylindol-) Färbung unterzogen. Unter dem Konfokalmikroskop konnten so Fluoreszenzsignale empfangen werden, was auf das Dasein von eGFP schließen lässt. D. h. im Umkehrschluss, dass die Transfektion erfolgreich gewesen sein muss. Es konnte zudem nachgewiesen werden, dass bei der Transfektion einer größeren Menge an eGFP mRNA auch mehr eGFP produziert wurde.

Um die Transfektionsmechanismen von humaner Haut in ex-vivo Versuchen künftig zu optimieren und auch das von den Zellen exprimierte KGF-Protein nachweisen zu können, was bisher nicht gelungen ist, bedarf es weiterer Anstrengungen.

Da im letzten Versuch die Transfektion von eGFP mRNA und auch die Exprimierung von eGFP gelungen ist, sollte das auch für transfizierte KGF mRNA

gelten. Allerdings ist es gut möglich, dass, wenn KGF von den Zellen exprimiert wurde, dieses nicht durch den Filter und somit ins Medium gelangen konnte, welches wiederum für den Nachweis von KGF im ELISA verwendet wurde.

Aufgrund dessen sollte eventuell die Methode des Nachweises von KGF geändert werden. Möglich wäre dies über die Lyse des transfizierten Gewebes in einem Lysepuffer, wie es sie im Handel gibt. Nach Lyse des Gewebes könnte so das gewonnene Lysat zentrifugiert werden, um Zell- bzw. Gewebereste von flüssigen Anteilen zu trennen. Sollte KGF im Lysat enthalten sein, könnte dieses anschließend über immunologische Nachweisverfahren detektiert werden. Dafür ständen der Western-Blot, sowie der ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) zur Verfügung.

Sollte KGF erfolgreich nach Transfektion von den Zellen mit KGF mRNA gebildet worden sein, könnte es möglich sein, dass KGF nicht nachweisbar ist, da es bereits an Rezeptoren umliegender Zellen gebunden hat. Da Wachstumsfaktoren, gebunden an Rezeptoren, intrazellulär komplexe Signalkaskaden auslösen, welche schlussendlich zur Transkription von bestimmten Genen führt, könnten möglicherweise Endprodukte nachgewiesen werden. Di Domenico und Giordano [124] beschreiben in ihrer Publikation diese intrazelluläre Signalkaskade, welche die Expressierung von Proteinen wie SNAI 1, FOXC2 und ZEB2 zur Folge hat. Diese könnten ebenso, nach Lyse der Zellen, mittels Proteinnachweisverfahren detektiert werden.

4.3 Ausblick

Die mRNA-Therapie mittels Transfektion des Keratinozyten-Wachstumsfaktors (KGF) eignet sich für die Etablierung neuer Behandlungsstrategien im Bereich der Wundheilung. Allerdings steht man in der Forschung erst am Beginn ausgereifter Therapien.

Nachdem im Rahmen dieser Arbeit die Transfektionen sowohl in-vitro, als auch ex-vivo erfolgreich waren, bedarf es zukünftig großen Anstrengungen, dass die mRNA-Therapie im klinischen Bereich Anwendung finden kann. Bis dahin gibt es für künftige Versuche zahlreiche Optimierungsansätze, wie beispielsweise:

- Optimierung der KGF mRNA, d.h. über den möglichen Einsatz anderer chemisch modifizierter Nukleotide kann die teilweise starke Toxizität der mRNA weiter verringert werden
- Optimierung der Liposome: zahlreiche Parameter bestimmen deren Effektivität, wie Größe, Ladungsverhältnisse, Ladungsdichte, Zusammensetzung und die Anwesenheit von Serum im Medium. So kann in weiteren Versuchen durch Veränderung der Parameter die Effektivität von Liposomen erhöht werden
- Optimierung der Applikation der Transfektionsansätze über Injektion: eventuell könnte anstatt handelsüblicher Nadeln auf Mikronadeln zurückgegriffen werden
- Optimierung des Nachweises des von den Zellen gebildeten KGF-Proteins: durch Lyse des transfizierten Gewebes kann das gewünschte Protein direkt im Lysat nachgewiesen werden
- Nutzung der synergistischen Effekte mehrerer Wachstumsfaktoren auf die Wundheilung

Gerade weil im abschließenden Versuch eGFP erfolgreich in den ex-vivo Hautproben nach Transfektion von eGFP mRNA nachgewiesen werden konnte, scheint es plausibel, dass dies auch für die KGF mRNA gilt. Da KGF entscheidende Auswirkungen auf den Wundheilungsprozess hat, und die Gentherapie zukünftig sicher eine immer stärkere Rolle spielt, hat deren Kombination für die Entwicklung neuer Therapiestrategien mit Sicherheit großes Potential.

5. Zusammenfassung

Wunden und deren Behandlung sind Dinge, mit welchen jeder Mensch im Laufe eines Lebens mehrmals in Kontakt kommt. Gerade deshalb, aber auch weil unsere Gesellschaft immer älter wird, wird es sich lohnen, in neue Strategien der Wundheilung Zeit und Mühe zu investieren. Viele Menschen leiden an chronischen Wunden, auch weil Systemerkrankungen wie Diabetes mellitus weltweit zunehmen. So wird die Behandlung, sowie Therapie von Wunden, zukünftig ein immer größeres Problem darstellen.

Da herkömmliche Therapien der Wundheilung nur noch wenig optimierbar sind, geht man in letzter Zeit mehr und mehr den Weg über Einschleusung von Genen in Zellen den Wundheilungsprozess zu beeinflussen, wenn nicht sogar zu beschleunigen. KGF, als Wachstumsfaktor mit großem Einfluss auf Keratinozyten und somit auf die Reepithelialisierung von Wunden, verspricht hierfür viel Potential in sich zu tragen.

Die messengerRNA (mRNA) erwies sich als geeignete Struktur, Genmaterial in Zellen einzuschleusen, da sie einige Vorteile gegenüber anderen Mechanismen des Gentransports aufweist. Deshalb sollten in dieser Arbeit die positiven Effekte der KGF mRNA auf die Wundheilung überprüft werden.

In dieser Arbeit sollte, nach zahlreichen Vorarbeiten auf diesem Forschungsgebiet, die Kombination aus KGF und mRNA nicht nur mittels in-vitro, sondern auch mittels ex-vivo Versuchen untersucht werden. So wurde zu Beginn der durchgeführten Versuche die Transfektion von KGF mRNA in verschiedene immortalisierte Zellen anhand verschiedener Transfektionsreagenzien und deren Einfluss und Verträglichkeit auf die Zellen mittels Viabilitätstests untersucht. Als Transfektionskontrolle wurde eGFP mRNA genutzt, welche die Effizienz der verwendeten Transfektionreagenzien erkennen ließ. So konnte mittels fluoreszenzmikroskopischer und durchflusszytometrischer Untersuchungen die Transfektionseffizienz von eGFP kontrolliert und für die verschiedenen Transfektionsmittel verglichen werden. Nachdem die Transfektionen an

immortalisierten Keratinozyten erfolgreich war, konnten auch primäre humane Keratinozyten, welche zuvor aus menschlicher Haut isoliert wurden, erfolgreich sowohl mit eGFP, also auch KGF mRNA transfiziert werden. Das von den Zellen exprimierte KGF Protein konnte anschließend mittels eines durchgeführten ELISAs nachgewiesen werden.

Da die Wundheilungsprozesse im menschlichen Organismus jedoch deutlich komplizierter sind, und man sich nicht nur auf die Transfektion von Zellen in durchgeführten in-vitro Versuchen beschränken kann, konnte, nach Herstellung eines einfachen dreidimensionalen Hautmodells, dieses ebenfalls erfolgreich mit eGFP mRNA transfiziert werden.

Durch Resuspension der Sphäroide in einem Trypsin/EDTA-Gemisch konnte anschließend der dreidimensionale Zellverband wieder aufgeschlossen und die Zellen vereinzelt werden. Nach durchflusszytometrischer Untersuchung wurde daraufhin gezeigt, dass nur ca. 20 % der transfizierten Zellen eGFP exprimiert haben. Dies macht deutlich, dass in dreidimensionaler Kultur mit der herkömmlichen Transfektionsmethode, also Zugabe des Transfektionsansatzes zum Kulturmedium, deutlich weniger Zellen die mRNA aufnehmen konnten, sowie daraufhin erfolgreich das eGFP-Protein exprimiert haben, als in herkömmlicher zweidimensionaler Kultur. Dies lässt darauf schließen, dass für die Applikation des Transfektionsansatzes eine andere Methode, wie beispielsweise die Injektion, von Vorteil wären.

Nachdem die Sphäroide erfolgreich transfiziert worden waren, wurden sowohl in ex-vivo Versuchen humane Haut, als auch in-vitro Hautmodelle transfiziert. Jedoch konnte nach durchgeführter Transfektion kein KGF Protein im ELISA nachgewiesen werden, womit also auch in diesem Setting keine Verbesserung der Wundheilung durch KGF feststellbar war. In einem weiteren Versuch, in welchem die Transfektionsansätze mittels Spritzen injiziert wurden, konnte schließlich jedoch erfolgreich eGFP mRNA transfiziert und somit von den Zellen in ex-vivo Hautproben exprimiert werden. Die Menge der transfizierten mRNA korrelierte mit dem am Fluoreszenzmikroskop empfangenen Signal.

Somit sollte für weiterführende Versuche die Methode der Injektion der Ansätze verfolgt und eventuell eine andere Nachweismethode für exprimiertes KGF gefunden werden. Hiermit sollte es auch möglich sein KGF mRNA erfolgreich zu transfizieren.

6. Literaturverzeichnis

1. Schubert, I.K.D.I., *Abschlussbericht für MedInform - Informations- und Seminarservice Medizintechnologie* PMV Forschungsgruppe, 2015.
2. Chong, E.J., et al., *Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution*. *Acta Biomater*, 2007. **3**(3): p. 321-30.
3. Ulfig, N., *Kurzlehrbuch Histologie*. 2015, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
4. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. 2015 Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2003: p. 726.
5. Bhora, F.Y., et al., *Effect of growth factors on cell proliferation and epithelialization in human skin*. *J Surg Res*, 1995. **59**(2): p. 236-44.
6. Welsch, *Lehrbuch Histologie*. 5. Auflage 2018 © Elsevier GmbH, Urban & Fischer. München.
7. Matthias Goebeler, H.H., *Basiswissen Dermatologie*. 2017: © Springer-Verlag GmbH Deutschland
8. Proksch, E., J.M. Brandner, and J.M. Jensen, *The skin: an indispensable barrier*. *Exp Dermatol*, 2008. **17**(12): p. 1063-72.
9. Di Meglio, P., G.K. Perera, and F.O. Nestle, *The multitasking organ: recent insights into skin immune function*. *Immunity*, 2011. **35**(6): p. 857-69.
10. Rawlings, A.V. and C.R. Harding, *Moisturization and skin barrier function*. *Dermatol Ther*, 2004. **17 Suppl 1**: p. 43-8.
11. Hoppe, P.R., *Heat balance modelling*. *Experientia*, 1993. **49**(9): p. 741-6.
12. Holick, M.F., *Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D*. *Am J Clin Nutr*, 1995. **61**(3 Suppl): p. 638S-645S.
13. Lippert, H., *Wundatlas; 3. Auflage Thieme Verlag; Stuttgart*. 2012.
14. Velnar, T., T. Bailey, and V. Smrkolj, *The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms*. *J Int Med Res*, 2009. **37**(5): p. 1528-42.
15. Broughton, G., 2nd, J.E. Janis, and C.E. Attinger, *The basic science of wound healing*. *Plast Reconstr Surg*, 2006. **117**(7 Suppl): p. 12S-34S.
16. Wallace, H.A. and S.S. Bhimji, *Wound, Healing, Phases*, in *StatPearls*. 2018: Treasure Island (FL).
17. Kujath, P. and A. Michelsen, *Wounds - from physiology to wound dressing*. *Dtsch Arztebl Int*, 2008. **105**(13): p. 239-48.
18. Barrientos, S., et al., *Growth factors and cytokines in wound healing*. *Wound Repair Regen*, 2008. **16**(5): p. 585-601.
19. Behm, B., et al., *Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing*. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2012. **26**(7): p. 812-20.
20. Gurtner, G.C., et al., *Wound repair and regeneration*. *Nature*, 2008. **453**(7193): p. 314-21.
21. Raja, et al., *Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing*. *Front Biosci*, 2007. **12**: p. 2849-68.
22. Bennett, N.T. and G.S. Schultz, *Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors*. *Am J Surg*, 1993. **165**(6): p. 728-37.
23. Yu, F.S., et al., *Growth factors and corneal epithelial wound healing*. *Brain Res Bull*, 2010. **81**(2-3): p. 229-35.
24. Werner, S., *Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 1998. **9**(2): p. 153-65.

25. Werner, S., et al., *Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(15): p. 6896-900.
26. Staiano-Coico, L., et al., *Human keratinocyte growth factor effects in a porcine model of epidermal wound healing*. J Exp Med, 1993. **178**(3): p. 865-78.
27. Madlener, M., et al., *Regulation of the expression of stromelysin-2 by growth factors in keratinocytes: implications for normal and impaired wound healing*. Biochem J, 1996. **320 (Pt 2)**: p. 659-64.
28. Guo, S. and L.A. Dipietro, *Factors affecting wound healing*. J Dent Res, 2010. **89**(3): p. 219-29.
29. Doris Henne-Bruns, M.D., Bernd Kremer *Chirurgie, Duale Reihe*. 2008: Georg Thieme Verlag KG.
30. Gantwerker, E.A. and D.B. Hom, *Skin: histology and physiology of wound healing*. Clin Plast Surg, 2012. **39**(1): p. 85-97.
31. Leaper, D., O. Assadian, and C.E. Edmiston, *Approach to chronic wound infections*. Br J Dermatol, 2015. **173**(2): p. 351-8.
32. van Uchelen, J.H., P.M. Werker, and M. Kon, *Complications of abdominoplasty in 86 patients*. Plast Reconstr Surg, 2001. **107**(7): p. 1869-73.
33. Tajirian, A.L. and D.J. Goldberg, *A review of sutures and other skin closure materials*. J Cosmet Laser Ther, 2010. **12**(6): p. 296-302.
34. Bennett, R.G., *Selection of wound closure materials*. J Am Acad Dermatol, 1988. **18**(4 Pt 1): p. 619-37.
35. Fonder, M.A., et al., *Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings*. J Am Acad Dermatol, 2008. **58**(2): p. 185-206.
36. Davidson, J.R., *Current concepts in wound management and wound healing products*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 2015. **45**(3): p. 537-64.
37. T. Horn, D.K., HELIOS-Klinikum, Krefeld, *Lokale Wundauflagen Übersicht und Klassifikation*, in *Der Unfallchirurg*. 2012, © Springer-Verlag
38. Kormann, M.S., et al., *Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(2): p. 154-7.
39. Sahin, U., K. Kariko, and O. Tureci, *mRNA-based therapeutics--developing a new class of drugs*. Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(10): p. 759-80.
40. Avci-Adali, M., et al., *In vitro synthesis of modified mRNA for induction of protein expression in human cells*. J Vis Exp, 2014(93): p. e51943.
41. Rabinovich, P.M., et al., *Synthetic messenger RNA as a tool for gene therapy*. Hum Gene Ther, 2006. **17**(10): p. 1027-35.
42. Kauffman, K.J., M.J. Webber, and D.G. Anderson, *Materials for non-viral intracellular delivery of messenger RNA therapeutics*. J Control Release, 2016. **240**: p. 227-234.
43. Yamamoto, A., et al., *Current prospects for mRNA gene delivery*. Eur J Pharm Biopharm, 2009. **71**(3): p. 484-9.
44. Geertrui Tavernier, O.A., Jo Demeester, Niek N.Sanders, Stefaan C., De Smedt, JoannaRejman, *mRNA as gene therapeutic: How to control protein expression*. Elsevier, 30 March 2011.
45. Brennan, C.M. and J.A. Steitz, *HuR and mRNA stability*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(2): p. 266-77.
46. Rejman, J., et al., *mRNA transfection of cervical carcinoma and mesenchymal stem cells mediated by cationic carriers*. J Control Release, 2010. **147**(3): p. 385-91.
47. Jemielity, J., et al., *Synthesis of novel mRNA 5' cap-analogues: dinucleoside P1, P3-tri-, P1, P4-tetra-, and P1, P5-pentaphosphates*. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2003. **22**(5-8): p. 691-4.

48. Elango, N., et al., *Optimized transfection of mRNA transcribed from a d(A/T)₁₀₀ tail-containing vector*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **330**(3): p. 958-66.
49. Peng, J., E.L. Murray, and D.R. Schoenberg, *In vivo and in vitro analysis of poly(A) length effects on mRNA translation*. *Methods Mol Biol*, 2008. **419**: p. 215-30.
50. Bettinger, T., et al., *Peptide-mediated RNA delivery: a novel approach for enhanced transfection of primary and post-mitotic cells*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(18): p. 3882-91.
51. Mockey, M., et al., *mRNA transfection of dendritic cells: synergistic effect of ARCA mRNA capping with Poly(A) chains in cis and in trans for a high protein expression level*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **340**(4): p. 1062-8.
52. Preiss, T., M. Muckenthaler, and M.W. Hentze, *Poly(A)-tail-promoted translation in yeast: implications for translational control*. *RNA*, 1998. **4**(11): p. 1321-31.
53. Shaw, G. and R. Kamen, *A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation*. *Cell*, 1986. **46**(5): p. 659-67.
54. Ross, J., *mRNA stability in mammalian cells*. *Microbiol Rev*, 1995. **59**(3): p. 423-50.
55. Isaka, Y. and E. Imai, *Electroporation-mediated gene therapy*. *Expert Opin Drug Deliv*, 2007. **4**(5): p. 561-71.
56. Van Tendeloo, V.F., et al., *Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells*. *Blood*, 2001. **98**(1): p. 49-56.
57. Lin, M.T., et al., *The gene gun: current applications in cutaneous gene therapy*. *Int J Dermatol*, 2000. **39**(3): p. 161-70.
58. Sohn, R.L., et al., *In-vivo particle mediated delivery of mRNA to mammalian tissues: ballistic and biologic effects*. *Wound Repair Regen*, 2001. **9**(4): p. 287-96.
59. Wasungu, L. and D. Hoekstra, *Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes*. *J Control Release*, 2006. **116**(2): p. 255-64.
60. Li, W. and F.C. Szoka, Jr., *Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery*. *Pharm Res*, 2007. **24**(3): p. 438-49.
61. Karra, D. and R. Dahm, *Transfection techniques for neuronal cells*. *J Neurosci*, 2010. **30**(18): p. 6171-7.
62. Tros de Ilarduya, C., M.A. Arangoa, and N. Duzgunes, *Transferrin-lipoplexes with protamine-condensed DNA for serum-resistant gene delivery*. *Methods Enzymol*, 2003. **373**: p. 342-56.
63. Woodle, M.C., *Controlling liposome blood clearance by surface-grafted polymers*. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998. **32**(1-2): p. 139-152.
64. Li, S.D. and L. Huang, *Gene therapy progress and prospects: non-viral gene therapy by systemic delivery*. *Gene Ther*, 2006. **13**(18): p. 1313-9.
65. Ogris, M., et al., *Tumor-targeted gene therapy: strategies for the preparation of ligand-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes*. *J Control Release*, 2003. **91**(1-2): p. 173-81.
66. Crook, K., et al., *Inclusion of cholesterol in DOTAP transfection complexes increases the delivery of DNA to cells in vitro in the presence of serum*. *Gene Ther*, 1998. **5**(1): p. 137-43.
67. Dabkowska, A.P., et al., *The effect of neutral helper lipids on the structure of cationic lipid monolayers*. *J R Soc Interface*, 2012. **9**(68): p. 548-61.
68. Faneca, H., S. Simoes, and M.C. de Lima, *Evaluation of lipid-based reagents to mediate intracellular gene delivery*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1567**(1-2): p. 23-33.
69. Gao, X. and L. Huang, *A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991. **179**(1): p. 280-5.

70. Zhang, Y., et al., *DC-Chol/DOPE cationic liposomes: a comparative study of the influence factors on plasmid pDNA and siRNA gene delivery*. *Int J Pharm*, 2010. **390**(2): p. 198-207.
71. Luo, D. and W.M. Saltzman, *Synthetic DNA delivery systems*. *Nat Biotechnol*, 2000. **18**(1): p. 33-7.
72. Sergeeva, O.V., V.E. Koteliansky, and T.S. Zatsepin, *mRNA-Based Therapeutics - Advances and Perspectives*. *Biochemistry (Mosc)*, 2016. **81**(7): p. 709-22.
73. Diebold, S.S., et al., *Nucleic acid agonists for Toll-like receptor 7 are defined by the presence of uridine ribonucleotides*. *Eur J Immunol*, 2006. **36**(12): p. 3256-67.
74. Alexopoulou, L., et al., *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3*. *Nature*, 2001. **413**(6857): p. 732-8.
75. Kariko, K., et al., *Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA*. *Immunity*, 2005. **23**(2): p. 165-75.
76. Foty, R., *A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids*. *J Vis Exp*, 2011(51).
77. Reijnders, C.M., et al., *Development of a Full-Thickness Human Skin Equivalent In Vitro Model Derived from TERT-Immortalized Keratinocytes and Fibroblasts*. *Tissue Eng Part A*, 2015. **21**(17-18): p. 2448-59.
78. Knight, E. and S. Przyborski, *Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro*. *J Anat*, 2015. **227**(6): p. 746-56.
79. Ravi, M., et al., *3D cell culture systems: advantages and applications*. *J Cell Physiol*, 2015. **230**(1): p. 16-26.
80. Barrientos, S., et al., *Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing*. *Wound Repair Regen*, 2014. **22**(5): p. 569-78.
81. Gainza, G., et al., *Advances in drug delivery systems (DDSs) to release growth factors for wound healing and skin regeneration*. *Nanomedicine*, 2015. **11**(6): p. 1551-73.
82. Peplow, P.V. and M.P. Chatterjee, *A review of the influence of growth factors and cytokines in in vitro human keratinocyte migration*. *Cytokine*, 2013. **62**(1): p. 1-21.
83. Smiell, J.M., et al., *Efficacy and safety of becaplermin (recombinant human platelet-derived growth factor-BB) in patients with nonhealing, lower extremity diabetic ulcers: a combined analysis of four randomized studies*. *Wound Repair Regen*, 1999. **7**(5): p. 335-46.
84. Robson, M.C., et al., *Platelet-derived growth factor BB for the treatment of chronic pressure ulcers*. *Lancet*, 1992. **339**(8784): p. 23-5.
85. Mohan, V.K., *Recombinant human epidermal growth factor (REGEN-D 150): effect on healing of diabetic foot ulcers*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2007. **78**(3): p. 405-11.
86. Lincoln, J.E., et al., *Fas signaling induces raft coalescence that is blocked by cholesterol depletion in human RPE cells undergoing apoptosis*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006. **47**(5): p. 2172-8.
87. *Protocol Phenion FT Skin Model Instructions for Use, Version 17.11*, www.phenion.com. Available from: www.phenion.com.
88. Murphy, P.S. and G.R. Evans, *Advances in wound healing: a review of current wound healing products*. *Plast Surg Int*, 2012. **2012**: p. 190436.
89. Wirth, T., N. Parker, and S. Yla-Herttuala, *History of gene therapy*. *Gene*, 2013. **525**(2): p. 162-9.
90. Yin, H., et al., *Non-viral vectors for gene-based therapy*. *Nat Rev Genet*, 2014. **15**(8): p. 541-55.
91. Balazs, D.A. and W. Godbey, *Liposomes for use in gene delivery*. *J Drug Deliv*, 2011. **2011**: p. 326497.

92. Montier, T., et al., *Progress in cationic lipid-mediated gene transfection: a series of bio-inspired lipids as an example*. *Curr Gene Ther*, 2008. **8**(5): p. 296-312.
93. Tros de Ilarduya, C., Y. Sun, and N. Duzgunes, *Gene delivery by lipoplexes and polyplexes*. *Eur J Pharm Sci*, 2010. **40**(3): p. 159-70.
94. Koltover, I., T. Salditt, and C.R. Safinya, *Phase diagram, stability, and overcharging of lamellar cationic lipid-DNA self-assembled complexes*. *Biophys J*, 1999. **77**(2): p. 915-24.
95. Malone, R.W., P.L. Felgner, and I.M. Verma, *Cationic liposome-mediated RNA transfection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(16): p. 6077-81.
96. Lv, H., et al., *Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery*. *J Control Release*, 2006. **114**(1): p. 100-9.
97. Bonte, F. and R.L. Juliano, *Interactions of liposomes with serum proteins*. *Chem Phys Lipids*, 1986. **40**(2-4): p. 359-72.
98. Yang, J.P. and L. Huang, *Overcoming the inhibitory effect of serum on lipofection by increasing the charge ratio of cationic liposome to DNA*. *Gene Ther*, 1997. **4**(9): p. 950-60.
99. Ross, P.C. and S.W. Hui, *Lipoplex size is a major determinant of in vitro lipofection efficiency*. *Gene Ther*, 1999. **6**(4): p. 651-9.
100. Xiong, F., Z. Mi, and N. Gu, *Cationic liposomes as gene delivery system: transfection efficiency and new application*. *Pharmazie*, 2011. **66**(3): p. 158-64.
101. Abraham, M.K., et al., *Nanoliposomes for Safe and Efficient Therapeutic mRNA Delivery: A Step Toward Nanotheranostics in Inflammatory and Cardiovascular Diseases as well as Cancer*. *Nanotheranostics*, 2017. **1**(2): p. 154-165.
102. Samadikhah, H.R., et al., *Preparation, characterization, and efficient transfection of cationic liposomes and nanomagnetic cationic liposomes*. *Int J Nanomedicine*, 2011. **6**: p. 2275-83.
103. Yang, S.Y., et al., *Comprehensive study of cationic liposomes composed of DC-Chol and cholesterol with different mole ratios for gene transfection*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013. **101**: p. 6-13.
104. Rejman, J., et al., *Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis*. *Biochem J*, 2004. **377**(Pt 1): p. 159-69.
105. Rejman, J., M. Conese, and D. Hoekstra, *Gene transfer by means of lipo- and polyplexes: role of clathrin and caveolae-mediated endocytosis*. *J Liposome Res*, 2006. **16**(3): p. 237-47.
106. Turek, J., et al., *Formulations which increase the size of lipoplexes prevent serum-associated inhibition of transfection*. *J Gene Med*, 2000. **2**(1): p. 32-40.
107. Brgles, M., et al., *Influence of charge ratio of liposome/DNA complexes on their size after extrusion and transfection efficiency*. *Int J Nanomedicine*, 2012. **7**: p. 393-401.
108. Dass, C.R., *Vehicles for oligonucleotide delivery to tumours*. *J Pharm Pharmacol*, 2002. **54**(1): p. 3-27.
109. Anderson, B.R., et al., *Nucleoside modifications in RNA limit activation of 2'-5'-oligoadenylate synthetase and increase resistance to cleavage by RNase L*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(21): p. 9329-38.
110. Wilkins, C. and M. Gale, Jr., *Recognition of viruses by cytoplasmic sensors*. *Curr Opin Immunol*, 2010. **22**(1): p. 41-7.
111. Nallagatla, S.R., R. Toroney, and P.C. Bevilacqua, *Regulation of innate immunity through RNA structure and the protein kinase PKR*. *Curr Opin Struct Biol*, 2011. **21**(1): p. 119-27.
112. Kuhn, A.N., et al., *mRNA as a versatile tool for exogenous protein expression*. *Curr Gene Ther*, 2012. **12**(5): p. 347-61.
113. Zare, S., et al., *Isolation, cultivation and transfection of human keratinocytes*. *Cell Biol Int*, 2014. **38**(4): p. 444-51.

114. Liu, S.C. and M. Karasek, *Isolation and growth of adult human epidermal keratinocytes in cell culture*. J Invest Dermatol, 1978. **71**(2): p. 157-62.
115. Hunt, M.A., et al., *Optimizing transfection of primary human umbilical vein endothelial cells using commercially available chemical transfection reagents*. J Biomol Tech, 2010. **21**(2): p. 66-72.
116. Rheinwald, J.G. and H. Green, *Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells*. Cell, 1975. **6**(3): p. 331-43.
117. Aasen, T. and J.C. Izpisua Belmonte, *Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells*. Nat Protoc, 2010. **5**(2): p. 371-82.
118. Tenchini, M.L., C. Ranzati, and M. Malcovati, *Culture techniques for human keratinocytes*. Burns, 1992. **18 Suppl 1**: p. S11-6.
119. Dickens, S., et al., *Nonviral transfection strategies for keratinocytes, fibroblasts, and endothelial progenitor cells for ex vivo gene transfer to skin wounds*. Tissue Eng Part C Methods, 2010. **16**(6): p. 1601-8.
120. Koivisto, L., et al., *HaCaT keratinocyte migration is dependent on epidermal growth factor receptor signaling and glycogen synthase kinase-3alpha*. Exp Cell Res, 2006. **312**(15): p. 2791-805.
121. Kopp, J., et al., *Accelerated wound healing by in vivo application of keratinocytes overexpressing KGF*. Mol Ther, 2004. **10**(1): p. 86-96.
122. Marti, G., et al., *Electroporative transfection with KGF-1 DNA improves wound healing in a diabetic mouse model*. Gene Ther, 2004. **11**(24): p. 1780-5.
123. Groeber, F., et al., *Skin tissue engineering--in vivo and in vitro applications*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(4-5): p. 352-66.
124. Di Domenico, M. and A. Giordano, *Signal transduction growth factors: the effective governance of transcription and cellular adhesion in cancer invasion*. Oncotarget, 2017. **8**(22): p. 36869-36884.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die hier vorliegende Dissertationsschrift wurde im klinischen Forschungslabor der Thorax-, Herz-, und Gefäßchirurgie der Universität Tübingen durchgeführt, welches von Prof. Dr. H.P. Wendel geleitet wird. Für die Betreuung, sowie für fachliche Gespräche war Frau Dr. Stefanie Krajewski zuständig. Sowohl das Konzept, als auch die praktische Durchführung wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Krajewski erarbeitet.

Die im Labor durchgeführten Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Dr. Meike-Kristin Abraham von mir durchgeführt. Alle anschließend in der Zellkultur durchgeführten Versuche wurden von mir erledigt. Das betrifft die durchgeführten Transfektionsversuche von Zellen, die mikroskopischen Auswertungen, sowie die Auswertungen am Durchflusszytometer. Die dafür benötigte mRNA wurde durch mich hergestellt. Alle durchgeführten Viabilitätsmessungen mittels des CASY® Cell Counter+Analyzer, sowie durch den MTT-Test, wurden von mir selbstständig durchgeführt.

Nachfolgende Konzentrationsbestimmungen des KGF-Proteins durch den ELISA wurden in Zusammenarbeit mit Julia Kurz durchgeführt.

Die humane Haut wurde mir freundlicherweise von Frau Dr. Sabrina Krauss und Markus Denzinger aus der Klinik für Hand-, Plastische, Rekonstruktive und Verbrennungschirurgie in Tübingen bereitgestellt. Die porcine Haut konnte durch die Zusammenarbeit unseres Labors mit dem CUT - Chirurgie und Technik Institut Tübingen durch Herrn Bernd Neumann bereitgestellt werden.

Nach den von mir durchgeführten Transfektionen an der humanen beziehungsweise porcinen Haut wurden diese histologisch untersucht. Dies geschah zum einen nach kurzer Einarbeitung am pathologischen Institut in Tübingen durch mich selbst, zum anderen in Zusammenarbeit mit Frau Eva Mueller-Hermelink und Frau Birgit Fehrenbacher im histologischen Labor der Universitäts-Hautklinik Tübingen.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Einarbeitung und Erklärung durch Frau Dr. Stefanie Krajewski durch mich selbst.

Ich versichere, dass diese Dissertationsschrift selbstständig nach Anleitung durch Frau Dr. Stefanie Krajewski von mir verfasst wurde.

8. Danksagung

Zu aller erst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H.P. Wendel dafür bedanken, dass er es mir ermöglicht hat, meine Doktorarbeit am klinischen Labor der Thorax-, Herz-, und Gefäßchirurgie in Tübingen durchzuführen. Großer Dank gilt ihm für die Zeit, die er sich für mich bei Fragen genommen hat, sowie für zahlreiche nette Gespräche.

Außerdem möchte ich mich sehr bei Frau Dr. Stefanie Krajewski für die Betreuung der Doktorarbeit bedanken. Fragen an Sie wurden immer zügig und gut beantwortet. Bei Problemen, sowie für fachliche Anregungen war sie stets ansprechbar und bereit, sich Zeit für mich zu nehmen.

Ebenso möchte ich mich besonders bei Frau Dr. Meike-Kristin Abraham für die Einarbeitung in die praktischen Arbeiten der Zellkultur bedanken.

Besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Sabrina Krauss und Markus Denzinger, die sich sehr für die Zusammenarbeit unseres Labors mit der Klinik für Hand-, Plastische, Rekonstruktive und Verbrennungschirurgie in Tübingen einsetzten.

Ebenso möchte ich mich bei Julia Kurz für die Durchführungen der ELISA bedanken, sowie bei Bernd Neumann, der sich um die Bereitstellung der porcinen Haut kümmerte. Zudem war er immer, auch bei technischen Herausforderungen im Labor, bereit Lösungen zu finden und bot seine Hilfe an.

Außerdem möchte ich mich auch bei Ludmilla Hann bedanken, die immer bei Problemen in jeder Hinsicht ansprechbar war und Lösungen dafür suchte. Auch war sie bei Fragen stets bereit, diese ausführlich zu erklären, wobei Sie sich immer sehr viel Zeit nahm.

Ein großer Dank gilt ebenso allen weiteren Mitarbeitern des Forschungslabors für die herzliche Aufnahme, ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Labor.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie für die Unterstützung während dieser Zeit bedanken.