

Entwicklung eines mRNA basierten Transkript
Therapieansatzes zur Behandlung der Erkrankung
Epidermolysis bullosa

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Mezger, Markus Torsten

2015

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. R. Handgretinger

2. Berichterstatter:

Professor Dr. G. Fierlbeck

*Meiner Frau Helena und unserem Sohn Jonas
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet*

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	Aufbau der Haut	1
1.2	Die Erkrankung Epidermolysis bullosa (EB)	3
1.3	EB Mausmodelle	5
1.4	Gentherapeutische Therapieansätze zur Behandlung der EB	6
1.5	Zellbasierte Therapieansätze zur Behandlung der EB.....	8
1.6	mRNA als Therapeutikum.....	11
1.7	Ziele der Arbeit	12
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	13
2.1	Material.....	13
2.1.1	Geräte.....	13
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	14
2.1.3	Kits	14
2.1.4	Reagenzien	15
2.1.5	Restriktionsenzyme	16
2.1.6	Plasmide	16
2.1.7	Medien und Medienzusätze.....	17
2.1.8	Primer und Sonden.....	18
2.1.9	Antikörper	19
2.2	Methoden	19
2.2.1	Herstellung der mRNAs.....	19
2.2.1.1	Plasmid Transformation von Bakterien.....	19
2.2.1.2	Plasmidpräparation	20
2.2.1.3	Restriktionsenzymverdau und Agarosegelelektrophorese	20
2.2.1.4	Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen.....	21
2.2.1.5	Sequenzierung	21
2.2.1.6	mRNA Synthese und poly A tailing	21
2.2.1.7	Aufreinigung und Qualitätskontrolle der mRNAs	22
2.2.2	Mauszucht und Genotypisierung der Tiere.....	23

2.2.3 Zellkulturarbeiten	24
2.2.3.1 Isolation und Kultivierung von murinen Keratinozyten und Fibroblasten.....	24
2.2.3.2 Isolation und Kultivierung von HEK293T, humanen TR146, Fibroblasten und MSCs	25
2.2.3.3 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer.....	26
2.2.3.4 Plasmid und mRNA Transfektion von HEK293T, MSCs, Fibroblasten und Keratinocyten	26
2.2.4 Expressionsanalysen	27
2.2.4.1 Durchflusszytometrie	27
2.2.4.2 Isolierung von Total-RNA.....	27
2.2.4.3 Umschreibung von RNA in cDNA	28
2.2.4.4 Quantitative <i>Realtime</i> PCR (qRT-PCR).....	28
2.2.4.5 Immunhistologische <i>Chamberslide</i> Färbungen	30
<u>3 ERGEBNISSE</u>	<u>31</u>
3.1 Amplifikation der Plasmid-Konstrukte	31
3.2 Sequenzierung des <i>Dsg3</i> pcDNA1.1/Amp Konstruktes	32
3.3 Herstellung von <i>Dsg3</i>, <i>Col7</i> und <i>DsRed</i> mRNA.....	34
3.4 Screening der DSG3 <i>knockout</i> Mäuse.....	34
3.5 Verwendete Zellkulturen.....	35
3.6 <i>DsRed</i> mRNA Transfektion in HEK293T Zellen	36
3.7 Variation der Transfektionsreagenzmenge.....	37
3.8 Variation der <i>DsRed</i> mRNA Menge.....	38
3.9 Variation des Transfektionsreagenz.....	39
3.10 <i>DsRed</i> mRNA Expression in humanen und murinen Keratinozyten und Fibroblasten im Zeitverlauf	40
3.11 <i>DsRed</i> Plasmid Expression in humanen und murinen Keratinozyten und Fibroblasten im Zeitverlauf	42
3.12 <i>Dsg3</i> mRNA und <i>Dsg3</i> Plasmid Transfektion in murine <i>Dsg3</i> <i>knockout</i> Keratinozyten.....	44
3.13 <i>Col7</i> mRNA und <i>Col7</i> Plasmid Transfektion in murine <i>Col7</i> hypomorphe Fibroblasten	45

<u>4</u>	<u>DISKUSSION</u>	<u>47</u>
4.1	Vor- und Nachteile von viralen Vektoren zur Therapie der EB.....	47
4.2	Plasmid und mRNA Therapie zur Behandlung der EB.....	48
4.3	Vor- und Nachteile zellbasierter Therapieansätze zur Behandlung der EB	50
4.4	Ausblick	53
<u>5</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>54</u>
<u>6</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>55</u>
<u>7</u>	<u>ERKLÄRUNGEN ZUM EIGENANTEIL</u>	<u>63</u>
	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>64</u>
	<u>CURRICULUM VITAE.....</u>	<u>65</u>

Abkürzungen

α	anti
AB	Antibiotikum
AK	Antikörper
allo	allogen
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare (<i>base pair</i>)
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
Col7	Kollagen 7
Col17	Kollagen 17
CP	Crossing-Point
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig (<i>double stranded</i>)
Dsg3	Desmoglein-3
EB	Epidermolysis bullosa
EBD	Epidermolysis bullosa dystrophica
EBJ	Epidermolysis bullosa junctionalis
EBS	Epidermolysis bullosa simplex
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
EtOH	Ethanol
F	<i>forward</i> (Primer)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GMP	<i>good manufacturing practice</i>
GvHD	<i>graft versus host disease</i>
H ₂ O	Wasser
HEK293T	humane Nierenzellen (<i>human embryonic kidney cell</i>)
het	heterozygot
HSC	Hämatopoietische Stammzelle
Ig	Immunglobulin
IPC	<i>induced pluripotent stem cell</i>
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
KGM	<i>keratinocyte growth medium</i>
ko	<i>knockout</i>
KRT5	Keratin 5

Abkürzungsverzeichnis

KRT14	Keratin 14
LAMB3	Laminin beta 3
LB	<i>Luria Broth</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
LV	Lentiviraler Vektor
MEM	<i>minimal essential medium</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSC	Mesenchymale Stromazelle
MT	Mikrotiterplatte
NEAA	<i>non-essential amino-acids</i>
Nt	Nukleotid
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
R	<i>reverse</i> (Primer)
RDEB	rezessive dystrophe Epidermolysis bullosa
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SCT	Stammzelltransplantation
SP-B	<i>Surfactant protein B</i>
ss	einzelsträngig (<i>single stranded</i>)
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
TALEN	<i>transcription-activator like effector nuclease</i>
üN	über Nacht

1 Einleitung

1.1 Aufbau der Haut

Die Haut ist das größte Organ des Menschen und erfüllt zahlreiche wichtige Aufgaben, die für das Überleben von zentraler Bedeutung sind. Sie bildet die Grenze zur Außenwelt und hat somit eine wichtige Barriere- und Schutzfunktion. Dazu zählen die Regulation des Wasser- und Salzhaushaltes, die Abwehr von Erregern und der Schutz vor Kälte, Wärme, Strahlung oder Auskühlung, um nur einige wesentliche Funktionen zu nennen (Proksch *et al.*, 2008).

Die Haut gliedert sich in mehrere Schichten: die Oberhaut (Epidermis), die Lederhaut (Dermis, Corium) und die Unterhaut (Subcutis). Die einzelnen Schichten lassen sich noch mal weiter unterteilen (s. Abbildung 1). So besteht die Epidermis aus dem Stratum corneum, Stratum granulosum, Stratum spinosum und dem Stratum basale. Im Stratum basale befinden sich Keratinozyten, die sich teilen und somit Tochterzellen für die darüberliegenden Schichten bilden (Fuchs & Horsley, 2008). Im Zuge der Wanderung in höhere Schichten erfolgt die Verhornung der Zellen, bis es letztlich im Stratum corneum zur Abschilferung der toten Keratinozyten kommt. Die Dermis lässt sich weiter in das Stratum papillare und das Stratum reticulare einteilen und wird von der Epidermis durch eine Basalmembran abgegrenzt. Hauptbestandteil der Dermis ist extrazelluläre Matrix, die hauptsächlich von Fibroblasten produziert wird.

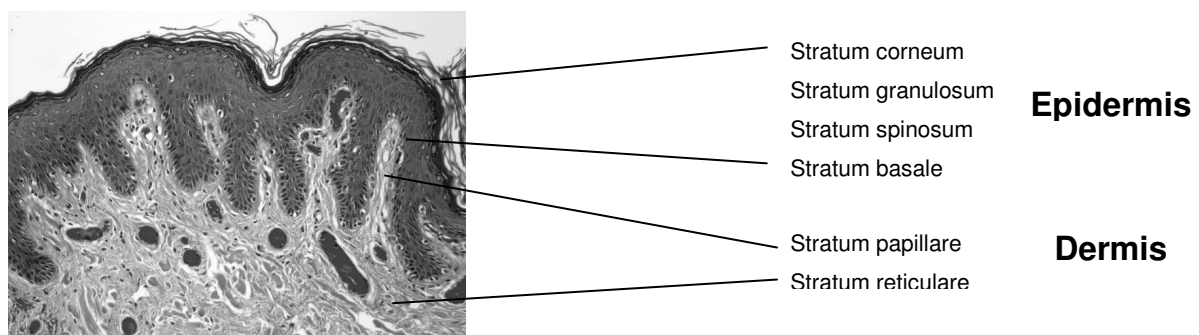


Abbildung 1: Histologischer Aufbau der Haut, bestehend aus Epidermis und Dermis (Abbildungen entnommen von PathoPic, Universität Basel, <http://alf3.urz.unibas.ch/pathopic/intro.htm>, © PathoPic).

Wichtig für die mechanische Stabilität der Haut sind verschiedene Zell-Zell Verbindungen, wie z.B. Integrine, Laminine, Kollagene und Desmosomen (s. Abbildung 2). Bei den Desmosomen handelt es sich um Proteinkomplexe, die über ihren extrazellulären Teil mit der benachbarten Zelle eine feste Verbindung eingehen und intrazellulär mit dem Cytoskelett, bestehend aus Keratin 5 (KRT5) und Keratin 14 (KRT14), der Zelle verankert sind. Somit können Zug- und Druckkräfte, die auf die Haut einwirken, sehr gut ausgeglichen werden.

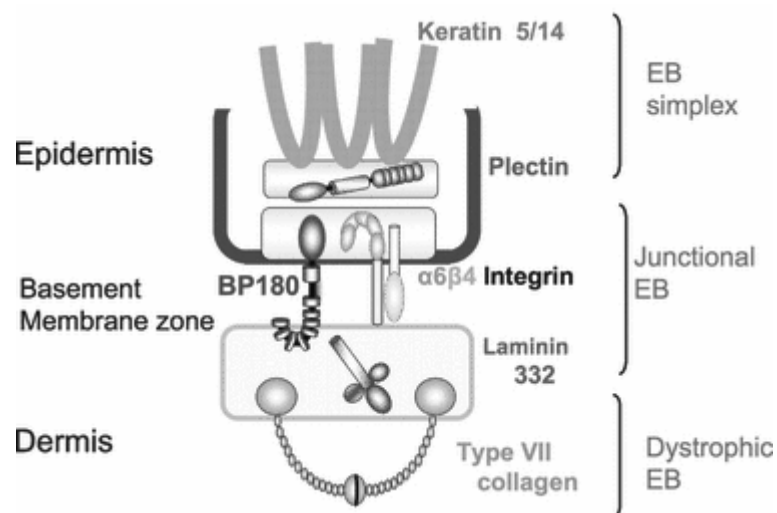


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Basalmembran unter Angabe wichtiger Strukturproteine (Abbildung entnommen aus Sawamura *et al.*, 2009).

Wenn diese Stabilität verloren geht, dann führt dies zur Blasenbildung der Haut (Masunaga, 2006). Neben immunologischen Reaktionen und Autoimmunerkrankungen gibt es auch angeborene Gendefekte, die dieses Krankheitsbild verursachen können. Letztere sollen im Weiteren näher vorgestellt werden.

1.2 Die Erkrankung Epidermolysis bullosa (EB)

Bei der hereditären Epidermolysis bullosa (EB) handelt es sich um eine Gruppe von genetisch bedingten Hautkrankheiten, die durch Defekte in epidermalen und dermo-epidermalen Adhäsionsproteinen verursacht werden. Umgangssprachlich wird die Krankheit auch als Schmetterlingskrankheit bezeichnet, da die Haut ähnlich zart und verletzlich ist wie die Flügel eines Schmetterlings. Die Inzidenz aller EB Formen beläuft sich weltweit zwischen 1:17.000 bis 1:500.000 Geburten (Featherstone, 2007). In Deutschland beträgt die derzeitige Inzidenz 1:39.000 Lebendgeburten (www.netzwerk-eb.de). Somit zählt die hereditäre EB zu den seltenen genetischen Erkrankungen.

Das Krankheitsbild zeichnet sich dadurch aus, dass bereits minimale Traumata und geringe mechanische Belastungen zu einer Blasenbildung der Haut und Schleimhäute führen (Epstein, 1992). In Bereiche der Haut, die besonders hohen mechanischen Beanspruchungen ausgesetzt sind, entstehen daraus häufig Erosionen und Geschwüre. Diese Läsionen unterliegen kontinuierlicher Wundheilung und Gewebereparatur, die oft mit erheblichen Komplikationen wie Narbenbildung, Fibrose oder chronischer Entzündung einhergehen. Des Weiteren haben Patienten mit rezessiv vererbter dystropher EB (RDEB) ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen, was ebenfalls einen starken Einfluss auf die Morbidität und Mortalität der Patienten hat (Fine *et al.*, 2008; Fine *et al.*, 2009; Fine, 2010; Larocca *et al.*, 2012).

Anhand des ultrastrukturellen Blasenbildungsniveaus unterscheidet man drei Haupttypen: die EB simplex (EBS), mit einer Blasenbildung innerhalb der basalen Keratinozyten, die EB junctionalis (EBJ), mit einer Blasenbildung entlang der Basalmembran, und die EB dystrophica (EBD), mit einer Blasenbildung unterhalb der Basalmembran (Sawamura *et al.*, 2010).

Die Ursache der EB liegt in Mutationen von Genen begründet, die für Verankerungsproteine der dermo-epidermalen Basalmembranzzone codieren (KRT-5, KRT-14, Laminin-332, Kollagen VII [ColVII], Kollagen XVII [ColXVII], usw.). Sind diese Gene mutiert, werden keine oder lediglich defekte Strukturproteine in der Haut und den Schleimhäuten exprimiert, wodurch die betroffenen Hautzellen

nur mangelhaft verankert werden und eine gestörte Zell-Zell-Adhäsion aufweisen (Uitto, 2009).

Seit der Beschreibung der ersten Genmutation bei Patienten mit EB in den frühen 90er Jahren (Christiano *et al.*, 1993), sind inzwischen viele weitere identifiziert und beschrieben worden. Derzeit gibt es mindestens 1.500 bekannte Mutationen in 17 Genen und mehrere klinische Subtypen, von denen die Wichtigsten in folgender Tabelle aufgelistet sind (Uitto, 2010; Uitto, 2012; Has & Kiritsi, 2013):

Tabelle 1: Übersicht über die verschiedenen Formen der EB unter Angabe der jeweiligen Gendefekte.

Hauptform	häufigste Subtypen	Gendefekt	Blasenbildung
EB simplex (EBS)	EBS Weber-Cockayne EBS Koebner EBS Dowling Meara	<i>Keratin 5</i> <i>Keratin 14</i>	innerhalb der Epidermis
EB junctionalis (EBJ)	EBJ Herlitz EBJ non-Herlitz	<i>Laminin beta 3</i> <i>Col17a1, Integrin $\alpha 6 \beta 4$</i>	entlang der BM
EB dystrophica (EBD)	EBD Hallopeau-Siemens EBD non-Hallopeau-Siemens	<i>Col7a1</i>	obere Dermis

Das klinische Bild der EB reicht von schweren, oft schon im Säuglingsalter letalen Formen mit Beteiligung angrenzender Schleimhäute, bis hin zu milden Formen, mit vorzugsweise leichtem Befallsmuster peripherer Extremitäten. Klinisch stellen vor allem die schwer betroffenen, oft sehr jungen Patienten, eine interdisziplinäre Herausforderung dar. Diese Kinder versterben oft sehr früh oder weisen bereits in den ersten Lebensmonaten eine starke Unterentwicklung auf (s. Abbildung 3). Bislang gibt es keine kurative Therapie und alle Behandlungsansätze zielen lediglich darauf ab, das unvorstellbare Leiden der Patienten durch entsprechende Wundversorgung und Schmerzbehandlung zu verringern (Fine *et al.*, 2010).



Abbildung 3: Blasenbildung bei einem Neugeborenen mit RDEB (Abbildung entnommen aus Sawamura *et al.*, 2009)

1.3 EB Mausmodelle

Bis heute gibt es nur eine begrenzte Anzahl an Mausmodellen zur Untersuchung der EB (Bruckner-Tuderman *et al.*, 2010). Die *Col7a1* (*Col7*) hypomorphe Maus (Mausmodell einer EBD) und die *Desmoglein 3* (*Dsg3*) *knockout* Maus (Mausmodell vergleichbar mit einer EBS) sind für experimentelle Untersuchungen von besonderem Interesse, da die jeweiligen Nachkommen eine höhere Lebenserwartung haben, als andere Mausmodelle einer EB, wie z.B. bei einem vollständigem Fehlen von *ColVII* oder Kollagen XVII (*ColXVII*), die oft schon vor Geburt letal sind.

Die *DSG3 knockout* Maus wurde bereits 1997 von Koch und Kollegen durch einen *knock-in* des Neomycin Gens in das Exon 1 des *Dsg3* Gens generiert. Ein Verlust von *Dsg3*, welches hauptsächlich von basalen Keratinozyten exprimiert wird, führt mikroskopisch zu einem Verlust von stabilisierenden Zell-Zell-Adhäsionsverbindungen basaler Keratinozyten und einer suprabasalen Blasenbildung. Makroskopisch zeigen diese Mäuse eine charakteristische mukokutane Blasenbildung vor allem der oralen Mundschleimhaut, einen zyklisch auftretenden telogenen Haarverlust und ein permanentes Gewichtsdefizit, das vermutlich auf eine inadäquate Nahrungsaufnahme zurückzuführen ist (Koch *et al.*, 1997 und 1998).

Die *Col7* hypomorphe Maus wurde im Labor der Hautklinik Freiburg bei Prof. Leena Bruckner-Tuderman durch die Insertion einer Neomycin Kasette in das Intron 2 des *Col7* Gens hergestellt. Diese Insertion führt zu einer Reduktion der ColVII Expression auf ca. 10% des ursprünglichen Wildtyp Wertes (Fritsch *et al.*, 2008). ColVII ist ein wichtiger Bestandteil von Verankerungsfibrillen der dermo-epidermalen Verbindungszone und wird sowohl von basalen Keratinozyten als auch von dermalen Fibroblasten exprimiert. Der Phänotyp ähnelt dem klinischen Bild einer RDEB, mit einer mukokutanen Blasenbildung, Nageldysthropien und Deformitäten peripherer Extremitäten.

Beide Mausmodelle wurden im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projektes „Stammzelltherapie schwerer Strukturproteindefekte der Haut durch Knochenmarkvorläuferzellen“ verwendet und näher untersucht (Hautklinik Tübingen Prof. Martin Röcken und Kinderklinik Tübingen Prof. Rupert Handgretinger, Laufzeit: 04/2009–12/2012). Mittels einer Transplantation von Knochenmarksstammzellen sollte in diesen Mausmodellen überprüft werden, ob Spenderzellen von transgenen EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) bzw. DsRed transgenen Mäusen in die Haut einwandern und eine Korrektur des Hautdefektes, d.h. eine Restauration der Expression von Dsg3 bzw. ColVII, bewirken.

1.4 Gentherapeutische Therapieansätze zur Behandlung der EB

Erste Versuche, eine stabile Expression von ColVII in Keratinozyten und Fibroblasten von RDEB Patienten *ex vivo* zu erreichen wurden im Jahr 2002 veröffentlicht (Chen *et al.*, 2002). Chen und Kollegen verwendeten hierfür einen Lentiviralen Vektor (LV), der die komplette cDNA des *COL7A1* (9 kb) enthielt. In ihren Experimenten konnten sie zeigen, dass transfizierte Keratinozyten und Fibroblasten eine normale Morphologie, Motilität und Adhäsion aufwiesen und humane Hautgrafts auf immundefizienten Mäusen die Stabilität der Haut wiederherstellten.

Dieselbe Gruppe startete anschließend die ersten *in vivo* Gentherapie Versuche bei Mäusen durch intradermale Injektionen von selbst inaktivierenden LVs (Woodley *et al.*, 2004). Eine einzelne Intrakutaninjektion dieser selbst-inaktivierenden LVs in immundefiziente Mäuse führte zu einem Einbau von humanem ColVII in die Basalmembran der Haut. Bemerkenswerterweise blieb die Expression für mehr als 12 Wochen stabil.

Der erste klinische Erfolg für eine funktionelle Korrektur des Gen-Defektes wurde durch eine *ex vivo* Gentherapie von Mavilio und Kollegen im Jahr 2006 erzielt (Mavilio *et al.*, 2006). Dabei wurde die Mutation im *Laminin beta 3 (LAMB3)* Gen eines Patienten mit JEB durch den Einsatz einer retroviralen Transfektion von Keratinozyten und die anschließende Transplantation von *in vitro* gezüchteter Epidermis korrigiert (Mavilio *et al.*, 2006; Di Nunzio *et al.*, 2008). Nach Transplantation der epithelialen Grafts zeigten die zuvor nicht-heilenden Wunden bereits am Tag 8 eine vollständige Regeneration und eine stabile Expression des Transgens während des gesamten Follow-up von mehr als einem Jahr (De Luca *et al.*, 2009).

Eine Protein-Ersatz-Therapie wurde ebenfalls als möglicher neuer therapeutischer Ansatz zur Behandlung von Hautfragilität Syndromen beschrieben (Nyström *et al.*, 2013). Diese Technik hat sich bereits für das Management von enzymatischen Störungen, wie lysosomale Speicherkrankheiten, A1AT Mangel und das hereditäre Angioödem bewährt (Desnick *et al.*, 2012; Frank & Jiang, 2008; Kueppers, 2011). Erste Belege für eine erfolgreiche Proteintherapie wurden im Jahr 2008 von Igoucheva und Kollegen publiziert. Ihnen gelang der Nachweis, dass rekombinat hergestelltes Lamin 332 *in vitro* von Keratinozyten eines Neugeborenen mit JEB aufgenommen werden kann (Igoucheva *et al.*, 2008).

Angeichts der Größe von ColVII und seiner komplexen Interaktion mit anderen Proteinen, gab es zunächst einige Skepsis bezüglich der Machbarkeit einer Protein-Ersatz-Therapie für RDEB. Inzwischen aber deuteten Daten aus präklinischen Studien darauf hin, dass die Injektionen von rekombinant hergestelltem humanem ColVII in die Haut von *Col7 knockout* Mäusen zu einem Einbau in die dermo-epidermale Übergangszone und zu einer Restauration der Haut führte

(Remington *et al.*, 2009). Darüber hinaus zeigten die Mäuse eine längere Lebensdauer und eine drastisch erhöhte Gewichtszunahme.

Die neuesten Überlegungen gehen dahin, das mutierte Gen in der Zelle mit Hilfe von sogenannten *transcription-activator like effectors nucleases* (TALEN) auszuschneiden und durch ein funktionierendes Gen zu ersetzen (Osborn *et al.*, 2013). Nachdem dies *in vitro* gezeigt werden konnte, bleibt abzuwarten, ob dies auch *in vivo* möglich sein wird.

1.5 Zellbasierte Therapieansätze zur Behandlung der EB

Beide Hauptzelltypen der Haut, epidermale Keratinozyten und dermale Fibroblasten produzieren ColVII, das Protein, welches bei Patienten mit RDEB mutiert ist (Van Agtmael & Bruckner-Tuderman, 2010). Ursprünglich hatte man Keratinozyten als die vorherrschenden Produzenten dieses Proteins betrachtet, weshalb sich die meisten therapeutischen Bemühungen zunächst auf diesem Zelltyp konzentriert hatten. Während des letzten Jahrzehnts hat sich aber gezeigt, dass Hautfibroblasten physiologischerweise eine relevante Quelle für ColVII darstellen (Ito *et al.*, 2009; Woodley *et al.*, 2003). Nach der Sekretion durch Fibroblasten, kann das ColVII in die dermal-epidermale Basalmembran transportiert und dort eingebaut werden (Kern *et al.*, 2009).

Viel versprechende Berichte erschienen im Jahr 2008 und 2009, in denen nachgewiesen wurde, dass die Injektion von humanen Fibroblasten eines Fremd-Spenders in die betroffenen Hautareale von Patienten mit einer RDEB, eine Besserung der Blasenbildung zur Folge hatte (Wong *et al.*, 2008; Poocheiron *et al.*, 2008; Kern *et al.*, 2009).

Aus dem adulten Knochenmark lassen sich zwei Populationen von Stammzellen isolieren. Hämatopoietische Stammzellen (HSCs), aus denen alle Zelllinien des Blutes entstehen (Weissman & Shizuru., 2008), und mesenchymale Stromazellen (MSCs), welche sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in Knochen, Knorpel und Fettgewebe differenzieren können (Pittenger *et al.*, 1999; Dominici *et al.*, 2006). Neben dieser eigentlichen physiologischen Hauptfunktion von adulten

Stammzellen, ihr lokales Gewebe zyklisch zu erneuern und lokale Gewebsdefekte zu reparieren, konnten viele regenerativen Therapieansätze zeigen, dass adulte Stammzellen, insbesondere HSCs und MSCs aus dem Knochenmark, in der Lage sind, diverse ektope Gewebsdefekte nach einer allogenen Stammzelltransplantation (alloSCT) zu regenerieren (Grove *et al.*, 2004).

Seit mehreren Jahren erregen MSCs aufgrund ihres regenerativen Potenzials, ihrer Plastizität und immunmodulatorischen Aktivität besondere klinische Aufmerksamkeit. In klinischen Studien wurden *in vitro* expandierte MSCs aus dem Knochenmark erfolgreich zur Behandlung von *Graft-versus-Host-Disease* (GvHD) Reaktionen und zur Kontrolle von unkontrollierbaren Immunreaktionen verwendet (Müller *et al.*, 2008; Le Blanc *et al.*, 2008).

Interessanterweise sind MSCs in der Lage, ausreichend ColVII zu produzieren, wodurch eine Umkehr des RDEB Phänotyps nach lokaler Injektion von murinen MSCs in die Haut von *Col7 knockout* Mäusen möglich war (Alexeev *et al.*, 2011).

Ein ermutigender Bericht für die Behandlung von blasenbildenden Krankheiten wurde 2010 von Conget und Kollegen veröffentlicht: die intradermale Injektion von allogenen MSCs in die Haut von 2 Patienten führte zu vermehrt vorhandenem ColVII in der dermo-epidermalen Basalmembran (Conget *et al.*, 2010).

Weitere Hinweise darauf, dass Knochenmarkszellen in der Lage sind einen genetisch bedingten Hautdefekt zu verbessern wurde im Jahr 2008 von Chino und Kollegen erbracht (Chino *et al.*, 2008). Sie injizierten isolierte, GFP-exprimierende Knochenmarkszellen in die Vitellinvene von schwangeren *Col7 knockout* Mäusen. 12 Wochen nach der embryonalen Transplantation betrug der Chimärismus weniger als 1% im Knochenmark und ca. 0,5% in der Haut. Dennoch zeigten diese Mäuse eine verlängerte Überlebenszeit von zwei auf 17-19 Tage, mit einer restaurierten ColVII Expression. Diese Daten werden von Arbeiten mit Stammzellen aus der Nabelschnur gestützt, nachdem klar wurde, dass diese in der Lage sind, den Wundheilungsprozess zu fördern (Liao *et al.*, 2013).

Ein weiterer Beleg einer erfolgreichen Stammzell-Gabe für die Behandlung der gleichen *Col7 knockout* Maus wurde im Jahr 2009 durchgeführt (Tolar *et al.*,

2009). Tolar *et al.* injizierten verschiedene Arten von Stammzellen aus dem Knochenmark, allerdings ohne myeloablative Bestrahlung. Weder Gesamt-Knochenmark, noch MSCs oder epidermale Stammzellen, konnten das Überleben der Mäuse verlängern. Lediglich eine spezielle Subpopulation von angereicherten HSCs (CD150+ CD48+), in einer hohen Dosis gegeben, verlängerte die Überlebenszeit. Drei der 20 behandelten Mäuse konnten mehr als 21 Tage nach dem Zelltransfer überleben. Immunhistochemische Färbungen wiesen zahlreiche GFP positive Spenderzellen in der Dermis und gleichzeitige Expression von ColVII nach.

Eine neue Arbeit, die letztes Jahr im *New England Journal of Medicine* von Wagner und Kollegen vorgestellt wurde, hat inzwischen für einige Aufregung gesorgt. Sieben Kinder mit einer RDEB, die ein ColVII Defekt aufwiesen, wurden einer alloSCT unterzogen. Zwei der sieben transplantierten Kinder verstarben bei dem Eingriff, die anderen fünf zeigten immunhistologisch teilweise eine Erhöhung der ColVII Expression und eine subjektiv empfundene Besserung der Blasenbildung (Wagner *et al.*, 2010; Tolar *et al.*, 2011).

Dieser klinische Ansatz wird von experimentellen Daten aus einem Mausmodell mit einem *Col17a1* Gendefekt gestützt (Fujita *et al.*, 2010). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl HSCs, als auch MSCs in der Lage waren, in die Haut einzuwandern und dort eine Neusynthese von ColXVII zu vermitteln. Dabei konnte eine Restauration der Haut insbesondere dann beobachtet werden, wenn die Haut der Mäuse zusätzlich verwundet wurde. Eine weitere Veröffentlichung ein Jahr später beschrieb ebenfalls, dass Keratinozyten aus in die Haut eingewanderten Knochenmarkszellen entstehen können (Tamai *et al.*, 2011).

1.6 mRNA als Therapeutikum

Die Idee für dieses Projekt basierte nun auf der Überlegung, dass die fehlende Expression der Strukturproteine der Haut dadurch wieder hergestellt wird, dass die notwendige genetische Information in Form einer mRNA in die Zellen mit dem Gendefekt eingeschleust wird. Im Rahmen dieses Projektes sollte die Machbarkeit einer mRNA Transkript Therapie zur Behandlung eines genetisch bedingten Hautdefektes untersucht werden, und es sollte auch die Frage beantwortet werden, über welchen Zeitraum ein mRNA vermittelter restaurierender Effekt anhält.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das ColVII-Protein nach einer Gabe von allogenen Fibroblasten über 100 Tage vorhanden war, obwohl die gegebenen Zellen sehr viel kürzer in der Haut nachgewiesen werden konnten (Kern *et al.*, 2009). Dies deutet darauf hin, dass ColVII ein stabiles Protein mit einer langen Halbwertszeit ist, weshalb die mRNA Therapie sehr viel versprechend sein könnte. Beim DSG3 Protein, welches zur Gruppe der desmosomalen Cadherine gehört, ist ebenfalls von einer vergleichbar langen Halbwertszeit auszugehen.

Ferner sind bei der Verwendung von modifizierten mRNAs kaum bis keine immunologischen Reaktionen gegenüber Fremdspendermaterial, wie bei der Fibroblasteninjektion, zu erwarten (Kariko *et al.*, 2005). Ein weiterer Vorteil von mRNAs gegenüber transfizierter Plasmid DNA ist die bessere Transfereffizienz an den gewünschten Zielort innerhalb der Zellen. Bei mRNAs entfällt der Transport in den Nukleus, so dass lediglich eine Plasmamembran überwunden werden muss, bevor es dann zur Translation im Cytoplasma kommt. Außerdem müssen keine starken Promotoren, wie zur Expression von Plasmid-Genen mit eingeschleust werden, was ebenfalls das Risiko einer Zellentartung minimiert (Yamamoto *et al.*, 2009).

Dass Gendefekte mit Hilfe von mRNAs korrigiert werden können, konnte unlängst von Kormann *et al.* 2011 nachgewiesen werden. Die in Nature Biotechnology publizierte Arbeit demonstrierte eindrucksvoll, dass ein Surfactant Protein B (SP-B) Defekt durch die Gabe einer SP-B mRNA mittels spezieller Zerstäubertechnik in das Lungenepithelgewebe dort zu einer deutlichen Besserung

der Lungensymptomatik führte und das Überleben der Mäuse sicherte. Dieser Effekt hielt über einen Zeitraum von mehreren Wochen an.

Aufgrund von hier in Tübingen durchgeführter Experimente in der Arbeitsgruppe von Prof. Rammensee ist ein klinischer Einsatz von *good manufacturing practice* (GMP) konform hergestellten mRNAs bereits Realität (Probst *et al.*, 2007). In einem beeindruckenden Selbstversuch ist den Forschern der Nachweis gelungen, dass derartig hergestellte Luciferase mRNAs direkt in die menschliche Haut appliziert werden können und dort zu einer Genexpression und zum „Leuchten“ der entsprechenden Hautareale führten. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass auch ein genetisch bedingter Hautdefekt durch mRNAs vorübergehend geheilt werden kann, ohne dass größere Nebenwirkungen dieser Therapie zu erwarten sind.

1.7 Ziele der Arbeit

Primäres Ziel der hier vorliegenden Dissertation war es zu untersuchen, ob sich der Einsatz von mRNA als Therapie für die EB eignet. Hierfür sollte zunächst festgestellt werden, ob von den beiden Adhäsionsmolekülen *Dsg3* und *Col7* entsprechende mRNAs hergestellt werden können. Anschließend sollte untersucht werden, wie erfolgreich sich aus der Haut isolierte Keratinozyten und Fibroblasten mit mRNA transfizieren lassen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit sollte es dann sein, die fehlende Expression von *Dsg3* bzw. *ColVII* wiederherzustellen und mit entsprechenden molekularbiologischen Methoden nachzuweisen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Der vorliegende Materialteil enthält eine Auflistung der verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Kits, Reagenzien, Restriktionsenzyme, Plasmide, Medien & Medienzusätze, Primer & Sonden und Antikörper.

2.1.1 Geräte

Tabelle 2: Geräteliste.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	Varioklav	H+P Labortechnik GmbH
Bakterienschrank		Heraeus Instruments
Bakterienschüttler		GFL
Brutschrank	HERA cell 150	Thermo Scientific
Digitalkamera	Camedia C-70 Zoom	Olympus
Durchflusszytometer	FACS Calibur	Becton Dickinson
Elektrorasierer	Pocket Pro	Wahl
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200	Zeiss
Gel-Dokumentationssystem		Raytest
Gelkammer		Peqlab
Kühl-Gefrierschränke	4°C Kühlschrank -20°C Gefrierschrank -80°C Gefrierschrank	Kirsch Kirsch Thermo Scientific
Mikroskop	IX50	Olympus
Mikrowelle	EMD MW 311	De'Longhi GmbH
Photometer	Gen Quant II NanoDrop ND-1000	Pharmacia Biotech Peqlab
Pipetten	2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf
Pipettierhilfe	SWIFTPET	Abimed
qRT-PCR Gerät	Light Cycler 480 Real-Time PCR System	Roche GmbH
Spannungsgerät	Power Pac	Biorad

Sterilbank	Herasafe	Thermo Scientific
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waage	E400D	Ohaus Europe GmbH
Wasserbad	K10	Thermo Haake GmbH
Zentrifuge	Mikrozentrifuge Centrifuge 5415C Rotina 48R Multifuge 3 S-R	Carl Roth GmbH Eppendorf Hettich Thermo Scientific

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Liste über die verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Kennzeichen	Hersteller
<i>Cell Strainer</i>	70 µm Nylon	Becton Dickinson
<i>Chamberslides</i>	8 Well, 4 Well	Becton Dickinson
Einfrierröhrchen	1 ml	Corning
FACS-Röhrchen	5 ml, 12 x 75 mm	Becton Dickinson
MT-Platten	6 Well / 24 Well / 96 Well	Becton Dickinson Corning
Petrischalen	15x60 mm	Zentrallager
Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Biozym
Reaktionsgefäße	0,5 ml / 1,5 ml / 2 ml Tubes 15 ml / 50 ml Falcontubes	Eppendorf Becton Dickinson
Serologische Pipetten	1 ml / 5 ml / 10 ml / 25 ml	Corning
Zellkulturflaschen	25 cm ² , 75 cm ² , 168 cm ²	Greiner Bio-One

2.1.3 Kits

Tabelle 4: Auflistung der eingesetzten Kits.

Kit	Hersteller
<i>DyNAmo cDNA Synthesis Kit</i>	Biozym
<i>High Pure PCR Template Preparation KIT</i>	Roche
<i>LightCycler 480 Probes Master</i>	Roche GmbH
<i>LightCycler 480 SYBR Green I Master</i>	Roche GmbH

<i>MEGAclear Kit</i>	Ambion
<i>MinElute PCR-Purification Kit</i>	QIAGEN
<i>mMESSAGE mMACHINE Kit SP6</i>	Ambion
<i>mMESSAGE mMACHINE Kit T7</i>	Ambion
<i>Plasmid Midi Kit</i>	Qiagen
<i>Poly(A) Tailing Kit</i>	Ambion
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	Qiagen
<i>QIAshredder</i>	QIAGEN
<i>RNeasy Micro Kit</i>	QIAGEN
<i>Taq all inclusive</i>	Peqlab
<i>XL-1 Blue Competent Cells</i>	Agilent

2.1.4 Reagenzien

Tabelle 5: Reagenzienliste.

Reagenz	Hersteller
Aceton	Sigma
Agarose	Lonza
Ampicillin	Carl Roth GmbH
DAPI	Invitrogen
Dispase	Sigma
<i>DNA Ladder (1kb, 100 bp)</i>	Invitrogen
DNase	Qiagen
Ethanol absolut	AppliChem
FACS-Flow	Becton Dickinson
FACS-Rinse	Becton Dickinson
FACS-Safe	Becton Dickinson
Fluorescent Mounting Medium	DAKO
<i>Gel Loading Dye, Orange</i>	Biolabs
<i>GelRed Nucleic Acid Gel Stain 10.000x in water</i>	Biotium
Glycerin (87%)	Merck
Isopropanol	AppliChem
Kollagenase NB8	Serva
LB-Medium	Carl Roth GmbH
Lipofektamin 2000	Invitrogen
Methanol	Sigma

PBS (1x)	PAA
Poly-L-Ornithin	Sigma
Protein Block	Dako
ssRNA Ladder	NEB
TAE Puffer	Apotheke Universität Tübingen
<i>TransMessenger Transfection Reagent</i>	Qiagen
Trypanblau 0,4 %	Sigma
Trypsin/EDTA Lösung	Biochrom
<i>Xfect Transfection Reagent</i>	Clontech

2.1.5 Restriktionsenzyme

Tabelle 6: Restriktionsenzymliste.

Restriktionsenzyme	Hersteller
BamHI, EcoRI, HindIII, SphI, XbaI	NEB

2.1.6 Plasmide

Tabelle 7: Plasmid-Konstrukte mit Angabe der Plasmidgrößen und der Größe des jeweiligen Inserts. Außerdem ist angegeben, von welchem Kooperationspartner das jeweilige Plasmid-konstrukt erhalten wurde.

Plasmid	Insert	Herkunft
pCS2+ (4,1 kb)	<i>DsRed</i> (728 bp)	Jun.-Prof. Michael Kormann, Kinderklinik Tübingen
pcDNA1.1/Amp (4,8 kb)	<i>Dsg3-FLAG</i> (3 kb)	Dr. Manabu Ohyama, Hautklinik Tokyo, Japan
pcDNA5/FRT (5,1 kb)	<i>Col7a1</i> (9 kb)	Prof. Leena Bruckner-Tuderman, Hautklinik Freiburg

Folgende Abbildung zeigt die schematischen Vektorkarten der hier verwendeten Plasmide:

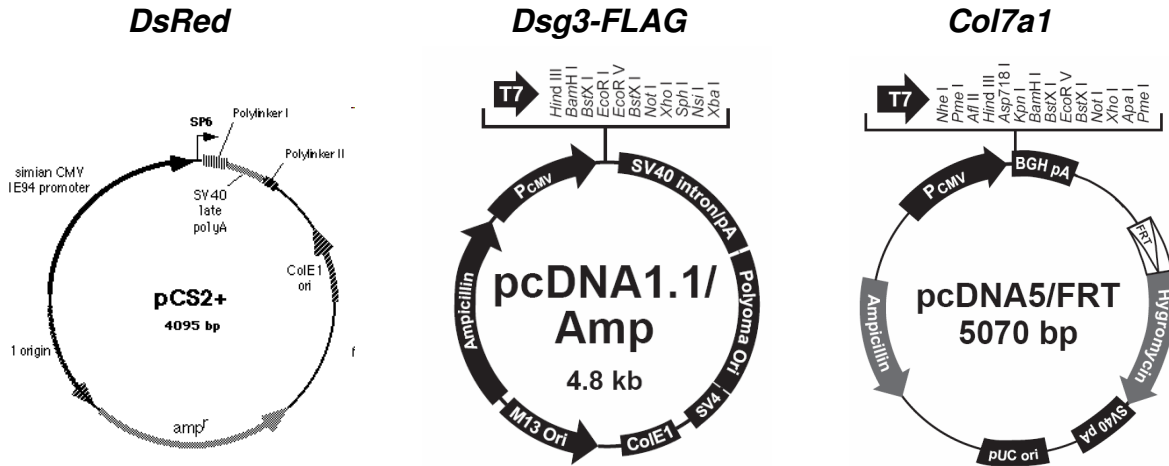


Abbildung 4: Schematischer Aufbau der verwendeten Plasmide pCS2+ (*DsRed*), pcDNA1.1/Amp (*Dsg3-FLAG*) und pcDNA5/FRT (*Col7a1*). Die Abbildungen von pcDNA1.1/Amp und pcDNA5/FRT stammen aus dem Datasheet der Firma Invitrogen, die für pCS2+ von der Universität Michigan, USA (<http://sitemaker.umich.edu/dlturner.vectors>).

2.1.7 Medien und Medienzusätze

Tabelle 8: Zusammensetzung der verwendeten Zellkultur-Medien. Angegeben sind jeweils die Endkonzentrationen der Zusätze in den einzelnen Medien, sowie deren Hersteller.

HEK293T, humane Fibroblasten, TR146, humane MSCs	
DMEM, <i>low Glucose</i>	PAA
10% FCS	GIBCO
1 mM L-Glutamin	Biochrom
1% Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Murine Fibroblasten	
DMEM / Ham's F-12 (1:1)	PAA
10% FCS (MSC-grade)	GIBCO
1 mM L-Glutamin	Biochrom
1x NEAA	PAA
1x Natrium-Pyruvat	Biochrom
1% Penicillin/Streptomycin	Biochrom
100 µM β-Mercaptoethanol	Sigma

Murine Keratinozyten	
Medium 1:	
64,5 ml DMEM	Sigma
21,5 ml Nutrient Mix F-12 Ham	Sigma
1 ml L-Glutamin (200 mM)	Sigma
1 ml Natrium-Pyruvat (100 mM)	Sigma
10% FCS	GIBCO
2% Penicillin/Streptomycin	Sigma
Medium 2:	
94 ml MCDB	Biochrom
1 ml L-Glutamin	Sigma
1 ml Natrium-Pyruvat	Sigma
2 ml FCS	GIBCO
2 ml Penicillin/Streptomycin	Sigma
Medium 3 (Kulturmedium):	
KGM-Gold BulletKit inkl. aller Zusätze	Lonza

2.1.8 Primer und Sonden

Die Primer und Sonden wurden mit Ausnahme der T7_F und Sp6_R Primer (Firma MWG Eurofings Operon) von der Firma TIB MOLBIOL bezogen. In der folgenden Tabelle sind diese in 5'-3' Richtung aufgelistet.

Tabelle 9: Primer- und Sondenliste.

Primer	Sequenz (5'-3')	Verwendung
Dsg3_Wt_F	ATGACCTGCCTCTTCCCTAGAGCCTT	Genotypisierung der <i>Dsg3</i> knockout Mäuse
Dsg3_Wt_R	AGGCATGCAGAGTTCTTAGCTATATT	
Dsg3_ko_F	CTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCT	
Dsg3_ko_R	AGGTGAGATGACAGGAGATCCTGCCC	
Dsg3_F	GAGTGTACAATGTCCCAGTCATCGT	<i>Dsg3</i> Expressionsanalysen
Dsg3_R	TTCCTTGTCTTCGGGCTGAG	
Dsg3_FAM	6FAM-TGTCGCTGCTCCTCCAATGGGA-BBQ	
Col7_F	CTGCAGAGATCCTGATGGGA	<i>Col7</i> Expressionsanalysen
Col7_R	CAGGACGTGTTAGACGAGGC	
Actin_F	ACCCACACTGTGCCCATCTA	<i>Actin</i> Expressionsanalysen
Actin_R	GCCACAGGATTCCATACCCA	
Actin_FAM	6FAM-CATCCTGCGTCTGGACCTGGC-BBQ	
T7_F	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung
SP6_R	ATTTAGGTGACACTATAG	

2.1.9 Antikörper

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Antikörper unter Angabe der Konjugation, der Herkunft und der eingesetzten Verdünnung.

Primäre Antikörper	Konjugation	Herkunft	Verdünnung
α -Dsg3 Ak18 (MBL)	-	Maus	1:500
α -ColVII (Calbiochem)	-	Kaninchen	1:500
Sekundäre Antikörper	Konjugation	Herkunft	Verdünnung
α -Maus IgG (Biotrend)	Alexa594	Ziege	1:350
α -Kaninchen IgG (Invitrogen)	Alexa594	Ziege	1:350

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung der mRNAs

2.2.1.1 Plasmid Transformation von Bakterien

Um die Plasmid-Konstrukte aus Abschnitt 2.1.6 zu amplifizieren, wurden zunächst 50 μ l XL-1 mit 0,85 μ l 1,42 M β -Mercaptoethanol gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nachdem 50 ng Plasmid für 30 min zugegeben und auf Eis inkubiert wurden, erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 sec und eine weitere Inkubation für 2 min auf Eis. Danach wurden die XL-1 mit 0,95 ml vorgewärmten LB-Medium (ohne Ampicillin) gemischt und für 1h bei 37°C bei 250 rpm geschüttelt. Danach wurden die Bakterien bei 10.000 rpm für 2 min zentrifugiert, dekantiert, das Pellet in 50 μ l LB Medium aufgenommen und auf LB-Amp Platten ausplattiert. Als Kontrolle wurden 50 μ l XL-1 Zellen, die nicht mit Plasmid transformiert wurden, ebenfalls auf LB-Amp Platten ausplattiert.

Am nächsten Tag wurden Einzelklone mit einer sterilen Pipettenspitze in 5 ml LB Medium mit Ampicillin (100 μ g/ml) überführt und über Nacht bei 37°C und 250 rpm im Schüttler inkubiert. Um einen Bakterienstock herzustellen wurden am nächsten Tag 800 μ l XL-1 mit 200 μ l 87%-igem Glycerin gemischt und bei -80°C eingefroren.

2.2.1.2 Plasmidpräparation

Am ersten Tag wurden 2 ml LB-Amp Medium mit dem entsprechenden Glycerolstock mit einer sterilen Pipettenspitze angeimpft und für 8 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde 1 ml entommen, in 100 ml LB-Amp Medium gegeben und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Bakterienlösung für 15 min bei 6.000 g und 4°C zentrifugiert, das Medium dekantiert, das Pellet in 4 ml P1 Puffer resuspendiert und in ein 50 ml Falcon überführt. Anschließend wurden 4 ml P2 Puffer für 5 min bei RT zugegeben, sowie 4 ml P3 Puffer für 15 min auf Eis. Als nächstes wurde für 40 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in neues 50 ml Falcon gegeben und dieser noch mal für 15 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde auf eine Säule gegeben, die zuvor mit 4 ml QBT Pufferlösung äquilibriert wurde. Danach wurde die Säule zweimal mit je 10 ml QC Lösung gewaschen und die Plasmid mit 5 ml QF Lösung eluiert. Nachdem 3,5 ml Isopropanol hinzugegeben wurden, wurde für 45 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert, das Plasmid-Pellet mit 2 ml 70% EtOH gewaschen, erneut für 15 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert und danach das Pellet bei RT getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 250 µl TE Puffer gelöst.

2.2.1.3 Restriktionsenzymverdau und Agarosegelelektrophorese

Der Kontroll-Verdau des pcDNA1.1/Amp *mDsg3-FLAG* Plasmid-Konstruktes wurde wie folgt beschrieben, durchgeführt:

Tabelle 11: Restriktionsenzymverdau.

Reagenz	Menge	Endkonzentration
Plasmid	1,0 µl	~ 500 ng
Puffer 10x	1,0 µl	1x
BSA 100x	0,1 µl	1x
Restriktionsenzym	0,5 µl	10 u
H ₂ O	7,4 µl	-

Die Inkubation des Restriktionsenzymverdaus erfolgte für 2 h bei 37 °C, woran sich die elektrophoretische Auftrennung auf einem Agarosegel anschloss.

In allen Fällen wurde ein 1,5%-iges Agarosegel hergestellt: Dazu wurde 1,5 g Agarose mit 100 ml 1x TAE-Puffer gemischt und in der Mikrowelle für 1 min bei 600 W aufgekocht. Nach einer 5-minütigen Abkühlphase wurden 10 µl GelRed dazugegeben und das flüssige Gel zur Auspolymerisation in die vorbereitete Kammer gegossen. Um das Gel mit einem Aliquot der Probe zu beladen, wurden 9 µl Probe mit 1 µl *Blue Juice* versetzt. Die DNA Größen wurden durch Auftragen von 5 µl 100 bp bzw. 1 kb DNA-Marker abgeschätzt. Nach 45 min bei 120 V erfolgte die Auswertung mit dem Gel-Dokumentationssystem.

2.2.1.4 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Zur Ermittlung der DNA- und RNA Konzentrationen wurden 2 µl Probe im NanoDrop Spectrophotometer in einer Doppelbestimmung vermessen. Dabei wurde darauf geachtet, dass als Referenz immer das Lösungsmittel verwendet wurde, in dem die RNA bzw. DNA gelöst war.

2.2.1.5 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon durchgeführt. Hierzu wurden 15 µl pcDNA1.1/Amp-mDsg3-FLAG Plasmid in einer Konzentration von 100 ng/µl, sowie 15 µl der beiden Sequenzierprimer T7_F und SP6_R (2 pmol/µl, s. 2.1.8), verschickt.

2.2.1.6 mRNA Synthese und poly A tailing

Vor Beginn der mRNA Synthese mussten die Plasmide zunächst linearisiert werden. Hierzu wurden 20 µg Plasmid mit einem 1 µl Restriktionsenzym (20 u) für 2h bei 37°C verdaut (s. 2.2.1.3), welches am 3' Ende des Inserts schnitt und dabei einen 5' Überhang erzeugte. In folgender Tabelle ist zusammengefasst, welches Plasmid-Konstrukt mit welchem Restriktionsenzym verdaut wurde. Gleichzeitig ist auch aufgelistet, welches *mMESSAGE mMACHINE Kit* für die mRNA Synthese eingesetzt wurde.

Tabelle 12: Linearisierung der Plasmid-Konstrukte und anschließende mRNA Synthese unter Angabe des entsprechenden Kits.

Plasmidkonstrukt	Linearisierung	<i>In vitro</i> Transkriptionskit
pCS2+ <i>DsRed</i>	XbaI	mMESSAGE mMACHINE Kit SP6
pcDNA1.1/Amp <i>Dsg3-FLAG</i>	SphI	mMESSAGE mMACHINE Kit T7
pcDNA5/FRT <i>Col7a1</i>	EcoRI	mMESSAGE mMACHINE Kit T7

Das linearisierte Plasmid wurde mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* aufgereinigt. Hierzu wurden die 20 µl des Verdau mit 100 µl PB Puffer versetzt, auf eine Säule gegeben und für 30 sec bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit 750 µl PE Puffer, konnte das linearisierte Plasmid mit 50 µl EB Puffer eluiert und die DNA Konz. ermittelt werden.

Jeweils 1 µg des linearisierten Plasmids (gelöst in 10 µl H₂O) wurde zur mRNA Synthese eingesetzt. Für die *in vitro* Transkription wurden 2 µl 10x Puffer, 10 µl 2x NTP/CAP und 2 µl SP6 bzw. T7 Polymerase hinzugefügt und 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das linearisierte Plasmid durch Zugabe von 1 µl Turbo DNase für 15 min bei 37°C abgebaut. Das Anhängen eines poly A tails an die mRNA erfolgte durch Zugabe von 36 µl H₂O, 20 µl 5x E-PAP Puffer, 10 µl 25 mM MnCl₂, 10 µl 10mM ATP und 4 µl Poly A Polymerase und Inkubation für 1h bei 37°C.

2.2.1.7 Aufreinigung und Qualitätskontrolle der mRNAs

Die Aufreinigung der mRNAs erfolgte mit Hilfe des MEGAclean Kits von Ambion. Zu jeder 20 µl Reaktion aus 2.2.1.6 wurden 80 µl *Elution Solution*, 350 µl *Binding Solution* und 250 µl 100 % Ethanol zugegeben. Die 700 µl wurden auf eine Säule gegeben und für 15 sec bei 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde zweimal mit 500 µl *Wash Solution* gewaschen und die RNA mit 2 x 40 µl *Elution Solution* eluiert. Die Konzentrationen der mRNAs wurde mit Hilfe des Photometers ermittelt (s. 2.2.1.4) und die Qualität der RNA auf einem 1,5%-igen Agarosegel kontrolliert (s. 2.2.1.3). Die Lagerung der mRNAs erfolgte aliquotiert bei -80°C bis zur weiteren Verwendung.

2.2.2 Mauszucht und Genotypisierung der Tiere

Die *DSG3 knockout* Mäuse wurden im roten und gelben Bereich der Tierhaltung im Forschungsverfügungsgebäude der Medizinischen Fakultät, Otfried-Müller-Str. 27, 72076 Tübingen gehalten. Die Zucht der DSG3 Tiere erfolgt in so genannten Harems-Zuchten, d.h. zwei heterozygote Weibchen wurden mit einem *knockout* Männchen verpaart. Anschließend erfolgte die getrennte Haltung der männlichen und weiblichen Nachkommen in standardisierten Käfigen (Typ II long), wo sie die übliche kommerziell erhältliche Pellet Nahrung und Milchpulver als zusätzliches Krafftutter *ad libitum* erhielten. Zur Verbesserung der Lebensbedingungen wurden Zellstoff und verschiedene Unterschlupfmöglichkeiten als *Enrichment* angeboten. In der Regel wurden zwischen zwei und fünf Tiere gemeinsam in einem Käfig gehalten.

Alle Nachkommen aus den Zuchten wurden bezüglich ihres Genotyps mittels konventioneller PCR gescreent. Hierzu wurde jeder Maus mit Hilfe einer Ohrlochzange eine kleine Ohrbiopsie entnommen, dann die DNA gemäß den Instruktionen des Herstellers des *High Pure PCR Template Preparation Kits* isoliert und das Neomycin Gen im *Dsg3* Gen mittels konventioneller PCR (*Taq all inklusive Kit*, Peqlab) und Agarosegelelektrophorese nachgewiesen. Für die PCR wurden folgende Komponenten pipettiert:

Tabelle 13: Pipettierschema für die Genotypisierungs-PCR. Die Primer finden sich unter 2.1.8.

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
H ₂ O (PCR-grade)	10,8 µl	-
je Primer	2,5 µl	12,5 pmol
Puffer	2,5 µl	1x
MgCl ₂	1,0 µl	1 mM
dNTPs	0,5 µl	0,2 mM
<i>Taq Pol</i>	0,2 µl	1 u
genomische DNA	5,0 µl	-

Die PCR lief wie folgt ab:

Tabelle 14: PCR Bedingungen zum Screenen der DSG3 Tiere.

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	94 °C	3 min
Amplifikation	30	94 °C	30 s
		62 °C	30 s
		72 °C	30 s
Elongation	1	72 °C	8 min

Die *Col7* hypomorphen Mäuse wurden seit 2008 in der Hautklinik in Freiburg gezüchtet (Fritsch *et al.*, 2008). Im Rahmen dieses Versuchsvorhabens wurden bereits isolierte und eingefrorene Fibroblasten auf Trockeneis nach Tübingen verschickt.

Alle im Folgenden beschriebenen Tierversuche waren vor Aufnahme der experimentellen Arbeiten vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt worden (Versuch-Nr. HT 4/11, Projektleiter Herr Prof. Dr. Martin Röcken, Stellvertreter Herr Dr. Markus Mezger).

2.2.3 Zellkulturarbeiten

Im Folgenden ist, wenn nicht anders angegeben, mit der Bezeichnung Medium jeweils das komplette Medium mit allen Zusätzen gemeint (s. 2.1.7). Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5-10% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.2.3.1 Isolation und Kultivierung von murinen Keratinozyten und Fibroblasten

Die Versuchstiere wurden mittels CO₂ Asphyxie getötet. Danach wurden die Rückenhaare mit einem Elektrorasierer entfernt, die Rückenhaut mit einer Schere präpariert und in eine Petrischale mit MCDB Medium überführt. Dort wurde diese zerkleinert und mit der Epidermis nach unten in eine weitere Petrischale überführt, in die zuvor 5 ml Dispase (1 mg/ml in MCDB-Medium) vorgelegt wurde. Die anschließende Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht. Am

nächsten Tag konnte die Epidermis von der Dermis mit einer gebogenen Pinzette abgelöst und jeweils in eine separate Petrischale mit je 5 ml PBS überführt werden.

Zur Isolation der Keratinozyten wurden in ein 15 ml Falcon 5 ml Trypsin/EDTA vorgelegt und die Epidermissuspension, die zuvor durch Mischen mit einer Pipette hergestellt wurde, hinzugegeben. Nach 20 min bei 37°C im Rotator wurde die Zellsuspension durch ein 70 µm Zellsieb pipettiert und in einem 50 ml Falcon, wo 10 ml PBS vorgelegt waren, aufgefangen. Nach einem weiteren Spülschritt mit 5 ml PBS wurden die Keratinozyten für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und dann in Medium 1 aufgenommen. Am dritten Tag wurde auf Medium 2 gewechselt und am 6. Tag auf KGM Gold Medium (s. 2.1.7).

Parallel zu den Keratinozyten wurden aus der Dermis die Fibroblasten isoliert. Hierfür wurde 5 ml Kollagenase NB8 (1 mg/ml in PBS) in ein 15 ml Falcon vorgelegt und die Dermis darin für 20 min bei 37°C im Rotator inkubiert. Um eine Einzelzellsuspension zu erhalten, wurde wie bei den Keratinozyten ein 70 µm Zellsieb eingesetzt und zusätzlich die Dermisstücke mit einem Spritzenstempel zerrieben. Die Fibroblasten wurden ebenfalls für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und dann in Fibroblasten-Medium aufgenommen (s. 2.1.7).

2.2.3.2 Isolation und Kultivierung von HEK293T, humanen TR146, Fibroblasten und MSCs

Die HEK293T Zellen stammten aus dem Zellkulturbestand der Kinderklinik Tübingen, der im Stickstoff-Tank gelagert war. Um die Zellen zu verwenden, wurde ein Vial im Wasserbad aufgetaut und in 49 ml warmes Medium überführt. Nach der Zentrifugation bei 350 g wurde dekantiert und die Zellen in 25 ml frischem Medium aufgenommen, um sie in T162 cm² Zellkulturflaschen zu kultivieren. Am nächsten Tag wurde das Medium noch mal gewechselt. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden die HEK293T einmal mit PBS gespült und für 3 min mit Trypsin abgelöst, zentrifugiert und 1/10 der Zellsuspension neu ausge-

sät bzw. für die Transfektionsexperimente gezählt. Analog zu den HEK293T Zellen wurden die TR146 Zellen, die aus dem Zellkulturbestand der Hautklinik Tübingen stammten, kultiviert und gesplittet. Bei den TR146 handelt es sich um undifferenzierte, nicht-verhornte, humane Keratinozyten, die ursprünglich aus der Mundschleimhaut eines Tumorpatienten angezüchtet worden waren (Nielsen et al., 1999).

Humane Fibroblasten wurden aus dem Neurometabolischen Labor der Kinderklinik erhalten, die dort im Rahmen der Diagnostik zur Metachromatischen Leukodystrophie aus einer Hautstanzbiopsie angelegt wurden.

Humane MSCs wurden aus Resten von Knochenmarkspunktaten angelegt, welche aus dem Hämatologischen Labor stammten. Hierzu wurde das Knochenmarkpunktat in 6 ml Medium aufgenommen und in T25 cm² Flaschen für mehrere Tage kultiviert.

2.2.3.3 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe der Neubauer Zählkammer. Hierfür wurde die Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau gemischt und zwischen Zählkammer und Deckglas gegeben. Unter dem Mikroskop wurden dann die nicht gefärbten (lebenden) Zellen gezählt. Bei der Bestimmung der Gesamtzellzahl der Zellsuspension wurden das Gesamtvolumen und die Verdünnung mit PBS bzw. Trypanblau mit berücksichtigt. Daher errechnet sich diese wie folgt: Zellzahl x 10^4 x Verdünnung x Gesamtvolumen.

2.2.3.4 Plasmid und mRNA Transfektion von HEK293T, MSCs, Fibroblasten und Keratinozyten

Am ersten Tag wurden die Zellen abends in 24-Well Platten ausgesät ($\sim 2 \times 10^5$ / 1 ml kompletten Medium ohne AB). Am nächsten Tag wurden 800 ng mRNA bzw. Plasmid in 50 μ l H₂O aufgenommen und 2 μ l Lipofektamin 2000 in 50 μ l Medium (ohne Zusätze) gemischt und für 5 min bei RT gelagert. Die Medium-Lipofektamin-Mischung wurde langsam zur mRNA hinzugegeben und für 20 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen einmal mit PBS

gewaschen und dann 100 µl Medium (ohne Zusätze) hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe der 100 µl Lipofektamin-mRNA-Mischung bzw. Lipofektamin-Plasmid-Mischung zu den Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 4h bei 37°C wurden die Zellen einmal mit 1 ml PBS gewaschen und dann in 1 ml Medium (komplett mit Serum, Zusätzen und AB) im Brutschrank inkubiert. 24h bzw. 48h später wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin geerntet, zentrifugiert und mittels Durchflusszytometrie (s. 2.2.4.1) analysiert.

Die Transfektionsversuche mit dem *TransMessenger Transfection Reagent* (Qiagen) bzw. *Xfect Transfection Reagent* (Clontech) wurden gemäß den Vorgaben des jeweiligen Herstellers durchgeführt.

2.2.4 Expressionsanalysen

2.2.4.1 Durchflusszytometrie

Die zu analysierenden Zellen wurden in PBS aufgenommen, in ein FACS-Röhrchen überführt und mittels Durchflusszytometer analysiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der *CellQuest Software* von Becton Dickinson.

2.2.4.2 Isolierung von Total-RNA

Hierfür wurden die Zellen zunächst in 2 ml Eppendorf-Gefäße aufgenommen und bei 5.400 rpm für 5 min abzentrifugiert. Das Medium wurde dekantiert, das Pellet in 350 µl RLT-Puffer (+ 1% β-Mercaptoethanol) gelöst und gevortext. Die Zellsuspension wurde in lila Tubes überführt und bei 13.200 rpm für 2 min zentrifugiert. Danach wurde zum Eluat 350 µl 70% Ethanol zugegeben. Nach Resuspension mit der Pipette, folgte der Transfer in rosa Tubes und ein Zentrifugations-Schritt bei 10.000 rpm für 15 s, um die RNA an die Säule zu binden. Die Reinigung der RNA wurde durch Verwendung mehrerer Waschschriffe vollzogen, wobei einmal mit 700 µl RW1-Waschpuffer und zweimal mit 500 µl RPE-Waschpuffer gewaschen wurde. Dazwischen wurde jeweils bei 10.000 rpm für 15 s bzw. beim letzten Waschschriff mit RPE für 2 min, zentrifugiert. Die Eluierung der Total-RNA erfolgte dadurch, dass die Säulen auf neue 1,5 ml Eppen-

dorf-Gefäße transferiert und die RNA mit 35 µl RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation bei 10.000 rpm für 1 min eluiert wurde. Direkt im Anschluss wurde die RNA-Konzentration im Photometer bestimmt (s. 2.2.1.4) und die RNA direkt weiterverwendet (s. 2.2.4.3) oder bei -80 °C eingefroren.

2.2.4.3 Umschreibung von RNA in cDNA

500 ng RNA wurden in 7 µl H₂O aufgenommen. Für die Umschreibung wurden folgende Komponenten hinzugefügt und bei 37 °C für 60 min inkubiert:

Tabelle 15: cDNA Synthese.

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
<i>Reverse Transcriptase</i>	2,0 µl	-
<i>RT Buffer [2x]</i>	10,0 µl	1x
<i>Random Hexamer Primer</i>	1,0 µl	-

Die Reverse Transkriptase wurde durch Erhitzen auf 85 °C für 5 min inaktiviert und die cDNA entweder direkt weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert. In allen Fällen wurde eine Negativ-Umschreibe-Kontrolle mitgeführt, die alle Komponenten (auch Total RNA), außer der Reversen Transkriptase, enthielt.

2.2.4.4 Quantitative *Realtime* PCR (qRT-PCR)

Bei Verwendung des *LightCycler 480 SYBR Green I Master* wurde die PCR wie folgt pipettiert:

Tabelle 16: Pipettierschema für die *SYBR* PCR.

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
H ₂ O (<i>PCR-grade</i>)	2,0 µl	-
je Primer	1,0 µl	5 pmol
<i>Sybr Green Mix [2x]</i>	5,0 µl	1x
cDNA	1,0 µl	-

Hierfür eigneten sich nachstehende PCR-Bedingungen:

Tabelle 17: PCR-Bedingungen für die qRT-PCR mit dem *SYBR Green I Master Kit* im *Light Cycler 480 Real-Time PCR System* zum Nachweis von β -Actin und Col7.

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	95°C	5 min
Amplifikation	45	95°C	10 s
		60°C	20 s
		72°C	20 s
Schmelzkurve	1	95°C	5 s
		65°C	1 s
		97°C	0,1°C/s
Kühlen	1	40°C	10 s

Die qRT-PCRs, bei denen Taqman Sonden eingesetzt wurden, wurden mit dem *LightCycler 480 Probes Master* durchgeführt.

Tabelle 18: Mastermix für die qRT-PCR im *Light Cycler*.

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
H ₂ O (PCR-grade)	2,5 μ l	-
je Primer [5 μ M]	0,5 μ l	125 nM
je Sonde [3 μ M]	0,5 μ l	75 nM
<i>Probe Master</i> [2x]	5,0 μ l	1x
cDNA	1,0 μ l	-

Anschließend lief die PCR unter folgenden Bedingungen ab:

Tabelle 19: PCR-Bedingungen für die qRT-PCR mit Hybridisierungssonden zum Nachweis der Dsg3 Expression.

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	95°C	10 min
Amplifikation	50	95°C	10 s
		60°C	20 s
Kühlen	1	40°C	10 s

Anhand der *Crossing-Points* (CP) erfolgte eine Berechnung einer erhöhten oder erniedrigten Expression. Der *Crossing-Point* ist definiert als die Zyklenzahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal des PCR-Produktes signifikant vom Hintergrundsignal abhebt. Somit lässt sich mit Hilfe der *Crossing-Points* eine vergleichende quantitative Aussage über die Ausgangs-DNA Menge in einer Probe machen. Die Normalisierung unter Zuhilfenahme von *Crossing-Points* geschah unter der Annahme einer maximalen Amplifikationseffizienz, mit folgender Formel (Johnson *et al.*, 2000; Krauter *et al.*, 2003):

$$\text{Normalisierter Wert} = 2^{(\text{CP Referenzgen} - \text{CP Zielgen})}$$

2.2.4.5 Immunhistologische *Chamberslide* Färbungen

Die *Chamberslides* wurden mit Poly-L-Ornithine (1:10 in PBS verdünnt) für 30 min bei 37°C beschichtet. Anschließend wurden die Zellen in Medium (ohne AB) ausgesät und mit mRNA bzw. Plasmid transfiziert (s. 2.2.3.4).

Nach 48h wurde das Medium abgenommen, einmal mit PBS gewaschen und die Zellen dann mit einer eiskalten Mischung aus Methanol und Aceton (1:1) für 10 min bei 4°C fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 3 min bei RT, wurde mit Protein Block für 10 min bei RT geblockt und anschließend der erste Antikörper (α -DSG3 AK18 bzw. α -COLVII, 1:500 in 0,1% PBST) üN bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde wieder dreimal mit PBS gewaschen und der 2. Antikörper Alexa594 Ziege α -Maus bzw. α -Kaninchen (in einer 1:350 Verdünnung) in 0,1% PBST für 1h bei RT hinzugegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde DAPI (1:300 in 0,1% PBST verdünnt) für 10 min bei RT hinzugegeben und danach zweimal mit PBS gewaschen. Vor dem Mikroskopieren wurden die gefärbten Zellen mit Fluorescent Mounting Medium eingedeckt.

3 Ergebnisse

3.1 Amplifikation der Plasmid-Konstrukte

Die für dieses Projekt notwendigen Plasmidkonstrukte wurden freundlicherweise von verschiedenen Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt (s. 2.1.6). Das pCS2+ *DsRed* Plasmid stammte von Jun.-Prof. Michael Kormann, Kinderklinik Tübingen (Korman *et al.*, 2011), das pcDNA5/FRT *Col7a1* Plasmid von Prof. Leena Bruckner-Tuderman, Hautklinik Freiburg und das pcDNA1.1/Amp *Dsg3-FLAG* von Dr. Manabu Ohyama, Hautklinik Tokyo, Japan. Letzteres war bereits erfolgreich in Mausversuchen eingesetzt worden, in denen die intradermale Injektion dieses Plasmids in die Haut von *DSG3 knockout* Mäusen zu einer Restauration geführt hatte (Ohyama *et al.*, 2002; Ohyama *et al.*, 2003).

Alle Plasmidkonstrukte wurden zur Amplifikation in XL-1 Bakterien transformiert (s. 2.2.1.1) und anschließend mittels Plasmidpräparation aufgereinigt (s. 2.2.1.2). In Kontroll-Verdaus (s. 2.2.1.3) wurden die zu erwartenden Fragmentgrößen bestätigt (Abbildung 5). So konnte beispielsweise durch einen Verdau mit BamHI und XbaI die 728 bp umfassende Gensequenz von *DsRed* aus dem pCS2+ Plasmid ausgeschnitten werden. Beim Verdau des pcDNA1.1/Amp *Dsg3-FLAG* Plasmids mit EcoRI und XbaI wurde ein etwa 4,8 kb großes Fragment des Vektors und die ca. 3 kb umfassende Gensequenz von *Dsg3* erhalten.

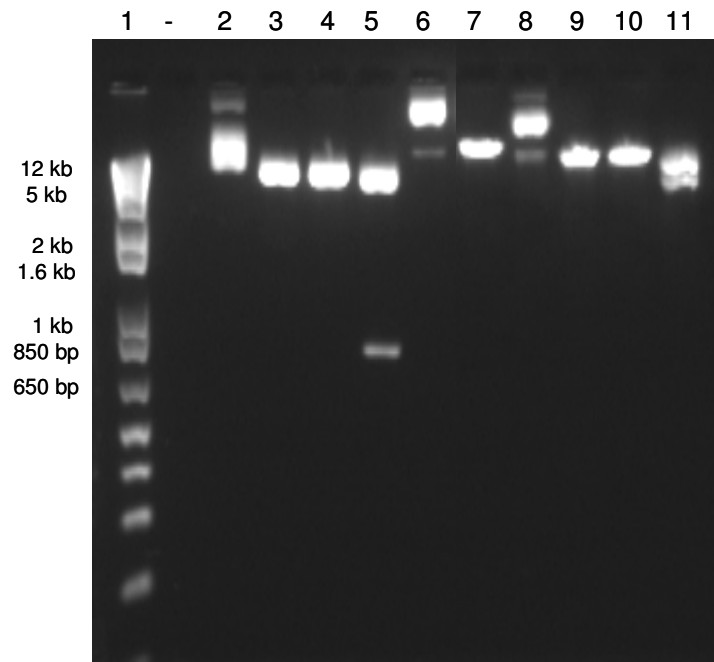


Abbildung 5: Restriktionsenzymverdau der Plasmidkonstrukte und anschließende Agarosegelelektrophorese. 1) Marker, **2-5) pCS2+ *DsRed*:** 2 unverdaut, 3 BamHI, 4 XbaI, 5 BamHI + XbaI (4.1 kb + 728 bp), **6-7) pcDNA5/FRT *Col7a1*:** 6 unverdaut, 7 EcoRI (14.1 kb), **8-11) pcDNA1.1/Amp *mDsg3*-FLAG:** 8 unverdaut, 9 EcoRI, 10 XbaI, 11 EcoRI + XbaI (4.8 kb + 3 kb).

3.2 Sequenzierung des *Dsg3* pcDNA1.1/Amp Konstruktes

Das pCS2+ *DsRed* und das pcDNA5/FRT *Col7a1* Plasmid war bereits von den jeweiligen Kooperationspartnern sequenziert worden. Da das pcDNA1.1/Amp *Dsg3*-FLAG aus Japan geschickt wurde, wurde zur Sicherheit noch mal sowohl vom 5' Ende, als auch vom 3' Ende das Insert sequenziert. Hierbei konnte die murine *Dsg3* Sequenz bestätigt werden (Abbildung 6). Weiterführende Informationen zur cDNA von *Dsg3* finden sich in Ishikawa *et al.*, 1994.

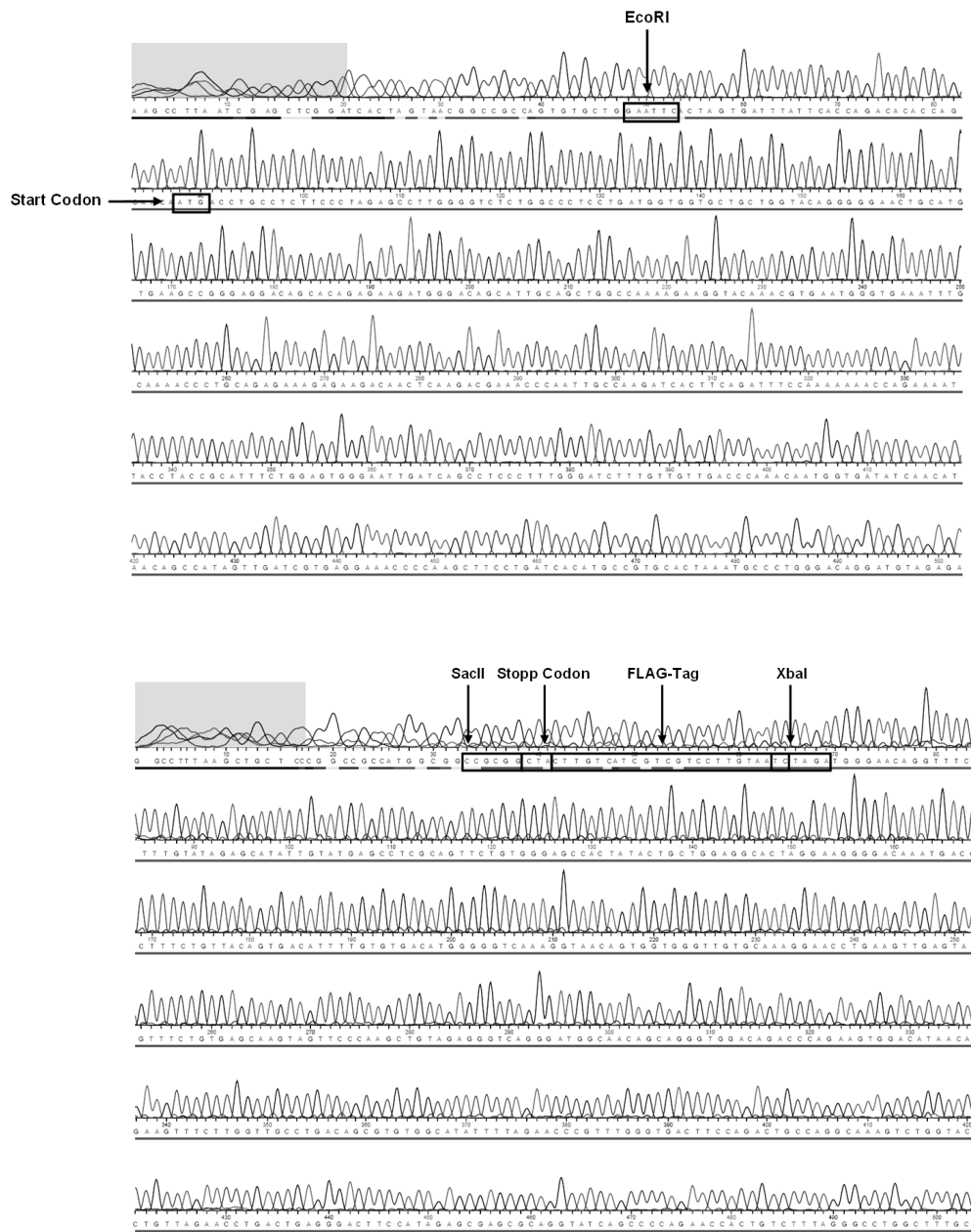


Abbildung 6: Sequenzierungs-Ergebnis des pcDNA1.1/Amp *mDsg3-FLAG* Plasmids mit den beiden Sequenzierprimern T7_F und Sp6_R (s. 2.1.8). Man erkennt, dass am 3' Ende der cDNA von Dsg3 ein zusätzliches FLAG-tag vorhanden ist.

3.3 Herstellung von *Dsg3*, *Col7* und *DsRed* mRNA

Alle hier verwendeten Plasmidkonstrukte wurden vor ihrer Verwendung zur mRNA Synthese linearisiert (s. 2.2.1.6). Sowohl von *DsRed*, als auch *Dsg3* und *Col7* konnten die jeweiligen mRNAs synthetisiert und aufgereinigt werden. Mit Hilfe eines ssRNA Markers konnten die mRNA Größen abgeschätzt werden (Abbildung 7). Für *DsRed* wurde eine mRNA von etwa 728 bp erhalten, für *Dsg3* von ca. 3 kb und für *Col7* von ca. 9 kb.

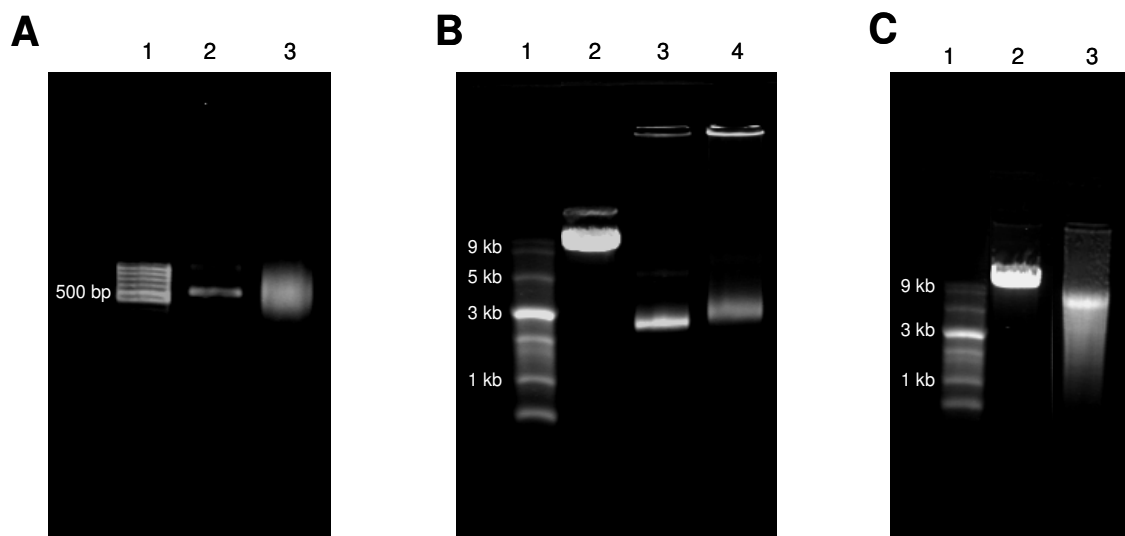


Abbildung 7: Größenermittlung der *in vitro* transkribierten mRNAs mittels Agarosegelelektrophorese: **A) DsRed:** 1 Marker, 2 *DsRed* mRNA ohne *poly A tail* (~728 bp), 3 *DsRed* mRNA mit *poly A tail*, **B) Dsg3:** 1 Marker, 2 pcDNA1.1/Amp *mDsg3-FLAG* Plasmid unverdaut, 3 *Dsg3* mRNA ohne *poly A tail* (~3 kb), 4 *Dsg3* mRNA mit *poly A tail* und **C) Col7:** 1 Marker, 2 pcDNA5/FRT *Col7a1* Plasmid *EcoRI* verdaut, 3 *Col7* mRNA mit *poly A tail* (~9 kb).

3.4 Screening der *DSG3 knockout* Mäuse

Die *DSG3 knockout* Mäuse wurden in der Tierhaltung im Forschungsverfügungsgebäude der Medizinischen Fakultät, Tübingen gehalten. Phänotypisch konnten die *knockout* Tiere von heterozygoten Tieren aufgrund des Haarverlustes, des geringeren Gewichtes und der Hauterosionen, v.a. im Mundbereich, identifiziert werden (Abbildung 8 A). Zusätzlich wurden alle Nachkommen mittels PCR auf ihren Genotyp hin untersucht (s. 2.2.2). In heterozygoten Tieren konnte sowohl das Wildtyp Allel, als auch die Insertion des Neomycin-Gens nach-

gewiesen werden, wohingegen *knockout* Tiere nur für das Neomycin-Gen positiv waren. Als Positivkontrolle ist hier noch das Screening Ergebnis einer Wildtyp Maus gezeigt, sowie eine Negativkontrolle (H₂O).

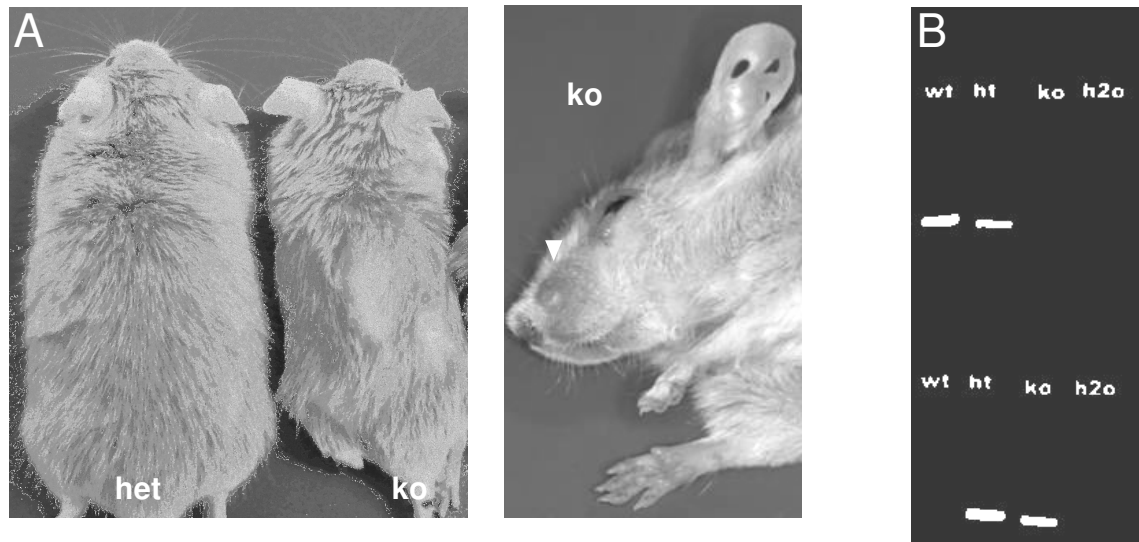


Abbildung 8: A) Photographische Aufnahme von *Dsg3* heterozygoten (*het*) und *knockout* (*ko*) Tieren, die in der Tierhaltung im Forschungsverfügungsgebäude der Medizinischen Fakultät, Otfried-Müller-Str. 27, 72076 Tübingen für dieses Projekt gezüchtet wurden. B) Genotypisierungsergebnis der Mäuse mittels konventioneller PCR.

3.5 Verwendete Zellkulturen

HEK293T und TR146 stammten aus dem Zellkulturbestand der Kinderklinik bzw. Hautklinik Tübingen. Die MSCs wurden aus Resten von Knochenmarkspunktaten angelegt und die humanen Fibroblasten aus Hautstanzbiopsien (s. 2.2.3.2). Murine Keratinozyten und Fibroblasten wurden aus der Rückenhaut von *DSG3 knockout* Mäusen bzw. *Col7 hypomorphen* Mäusen isoliert (s. 2.2.3.1).

Folgende Abbildung gibt einen Überblick über die verschiedenen Zelltypen, wie sie für anschließende Transfektionsexperimente eingesetzt wurden (Abbildung 9). Die Fibroblasten und MSCs zeigten dabei die typische längliche, spindelförmige Morphologie, die Keratinozyten hingegen eine kopfsteinpflasterartige Anordnung.

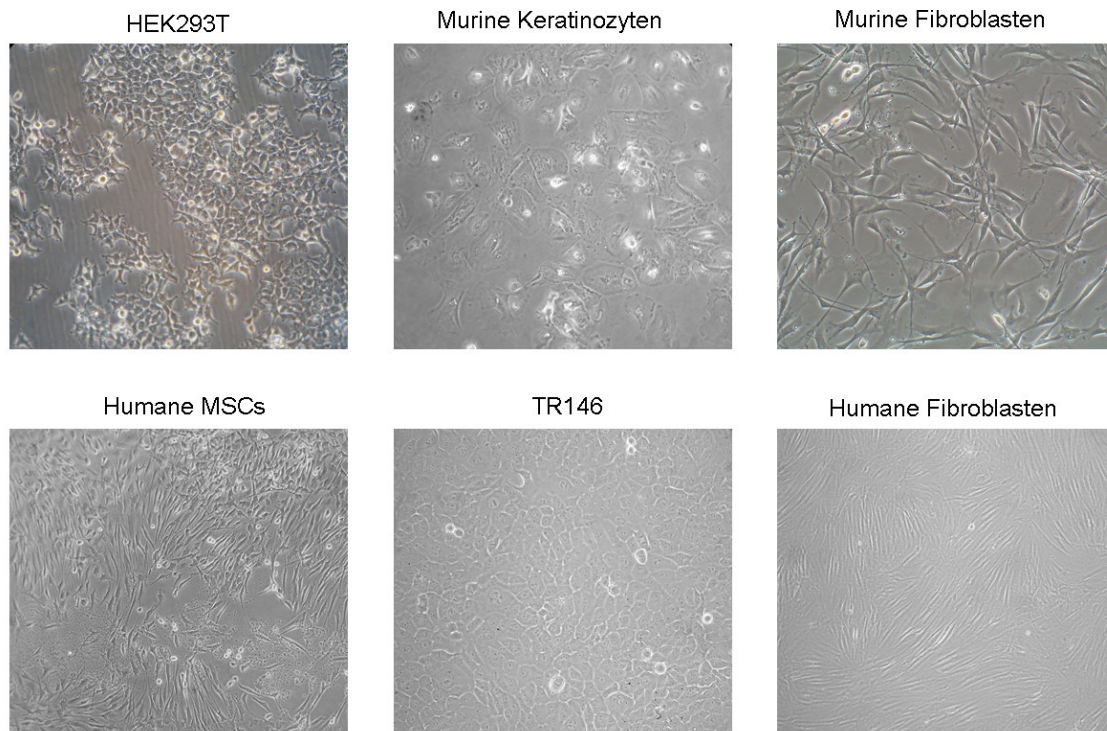


Abbildung 9: Mikroskopische Aufnahmen von HEK293T, murinen Keratinozyten, murinen Fibroblasten, MSCs, TR146 und humanen Fibroblasten.

3.6 *DsRed* mRNA Transfektion in HEK293T Zellen

Da es sich bei HEK293T um vergleichsweise einfach zu handhabende Zellen handelt, die einfach kultiviert und transfiziert werden können, wurden diese herangezogen, um ein mRNA Transfektionsprotokoll zu etablieren. Hierzu wurden 1×10^6 HEK293T in 24-Well Platten ausgesät und mit 500 ng *DsRed* mRNA transfiziert (s. 2.2.3.4). Nach 1d, 4d und 7d Tagen wurden die Zellen geerntet und mittels Durchflusszytometrie der prozentuale Anteil an *DsRed* exprimierenden Zellen ermittelt (s. 2.2.4.1). Dabei zeigte sich, dass die Expression im Laufe der Zeit von 76,7% auf 22,89% abnahm (Abbildung 10 A). Die *DsRed* Expression konnte auch fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden (Abbildung 10 B).

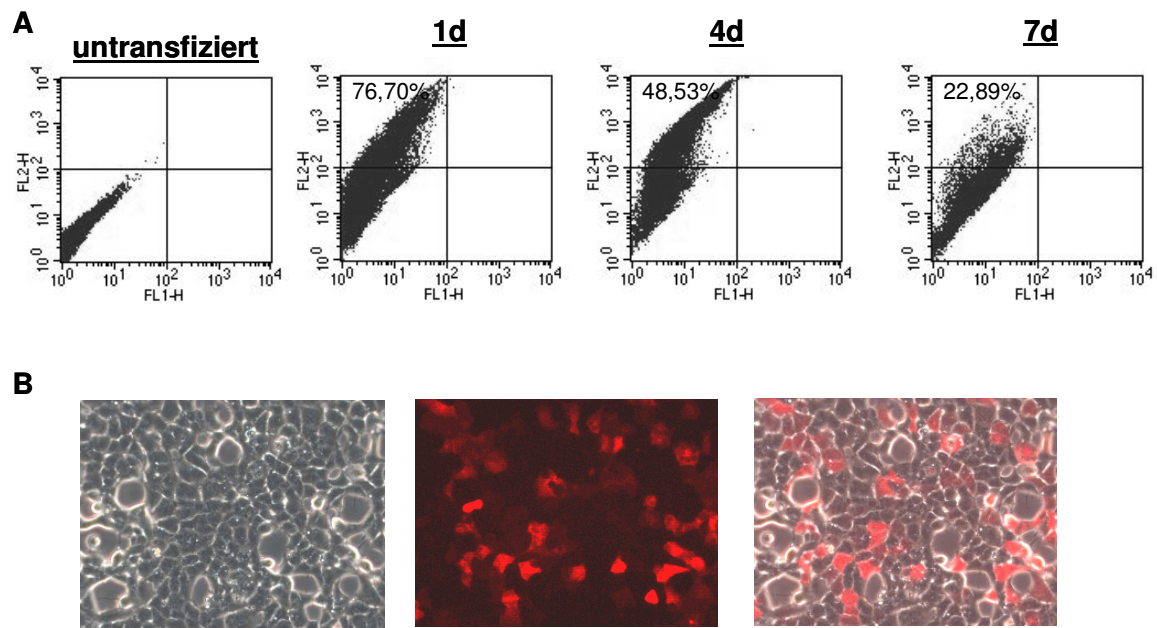


Abbildung 10: A) Durchflusszytometrische Analyse zur Bestimmung des prozentualen Anteils an *DsRed* mRNA exprimierenden HEK293T Zellen 1d, 4d und 7d nach Transfektion mit Lipofektamin 2000. B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von transfizierten HEK293T nach 1d.

3.7 Variation der Transfektionsreagenzmenge

Im nächsten Schritt sollte ermittelt werden, welche Menge an Transfektionsreagenz benötigt wird, um eine ausreichende Expression in HEK293T Zellen zu erhalten. Dieser Versuch wurde mit 500 ng *DsRed* mRNA und Lipofektamin 2000 in verschiedenen Verdünnungen durchgeführt (Abbildung 11). Es zeigte sich, dass bereits eine 1:10 Verdünnung des Transfektionsreagenz zu einer Abnahme von 66,41% auf 16,8% führte. Ab einer 1:100 Verdünnung wurde kein *DsRed* mehr exprimiert. Daraus wurde geschlossen, dass die *DsRed* mRNA nur durch Zugabe eines Transfektionsreagenz in die Zellen aufgenommen und dort exprimiert wird.

Variation der Transfektionsreagenzmenge

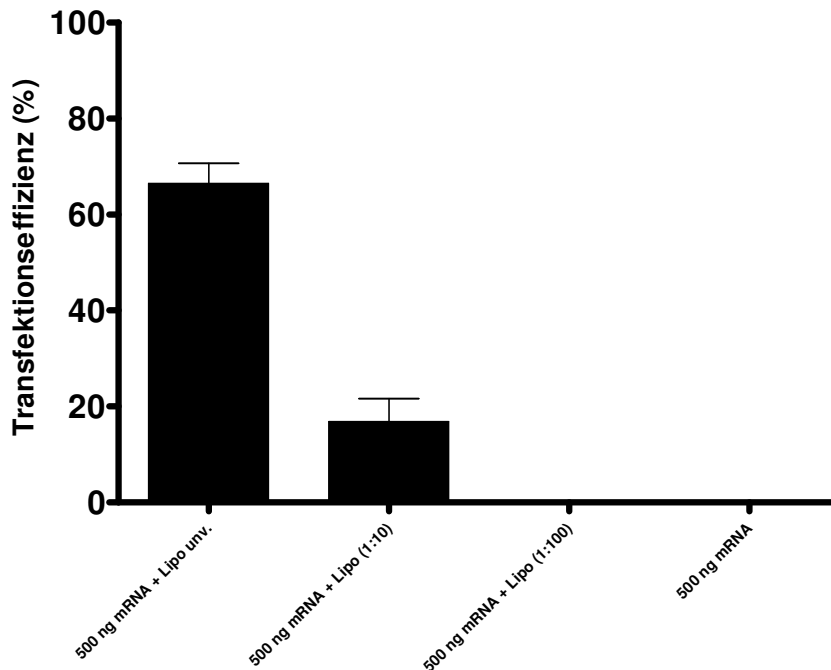


Abbildung 11: Durchflusszytometrische Analyse zur Bestimmung des prozentualen Anteils an *DsRed* mRNA exprimierenden HEK293T Zellen nach Transfektion von 500 ng und Lipofektamin 2000 in verschiedenen Verdünnungen (n=4).

3.8 Variation der *DsRed* mRNA Menge

Welche Menge an *DsRed* mRNA für eine erfolgreiche Transfektion benötigt wird, wurde im nächsten Schritt ermittelt. Hierzu wurden HEK293T mit 1.000 ng, 500 ng und 250 ng *DsRed* mRNA transfiziert und nach 1d, 4d und 7d die Expression bestimmt. Die Verwendung von 1.000 ng und 500 ng führte zu ähnlich guten Ergebnissen, bei 250 ng wurde eine deutlich geringere Expression beobachtet (Abbildung 12). Für alle weiteren Versuche wurde daher entschieden, eine *DsRed* mRNA Menge zwischen 500 ng und 1.000 ng zu verwenden.

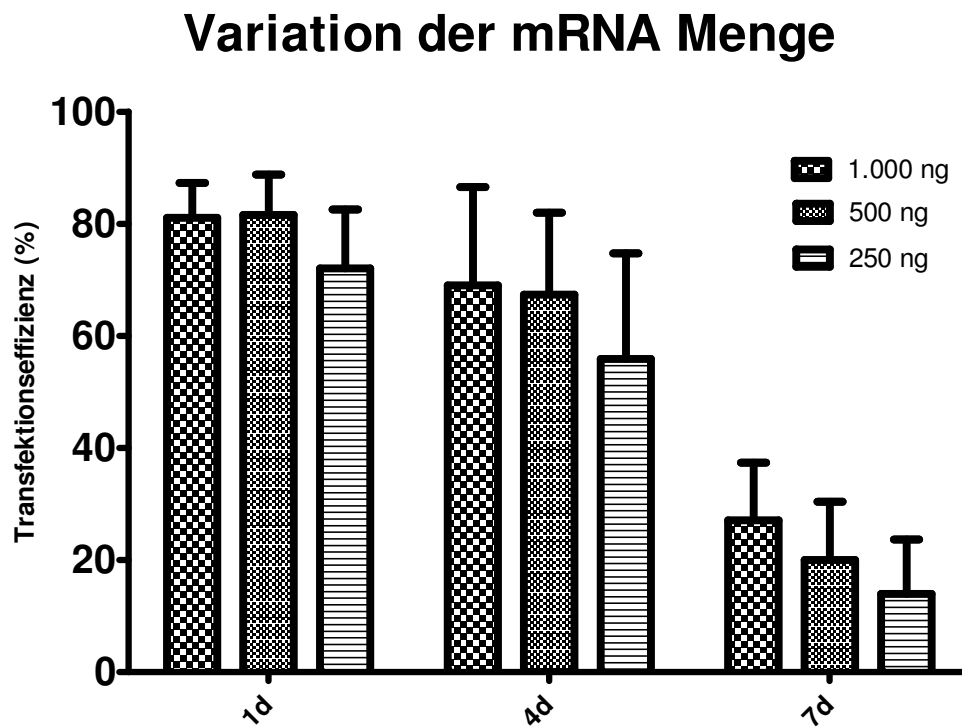


Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analyse zur Bestimmung des prozentualen Anteils an *DsRed* mRNA exprimierenden HEK293T Zellen nach Transfektion von 1.000 ng, 500 ng und 250 ng *DsRed* mRNA mit Lipofektamin 2000 (n=4).

3.9 Variation des Transfektionsreagenz

Um zu untersuchen, welches Transfektionsreagenz sich am besten für mRNA eignet, wurden drei verschiedene Transfektionsreagenzien (Lipofektamin 2000, TransMessenger, Xfect) miteinander verglichen. Diese Versuche wurden für HEK293T, MSCs, humane Fibroblasten, TR146, sowie murinen Fibroblasten und murinen Keratinozyten durchgeführt, und zwar mit jeweils 800 ng *DsRed* mRNA (Abbildung 13).

Es zeigte sich, dass die Verwendung von Lipofektamin 2000 und TransMessenger wesentlich effizienter war als Xfect, und das für alle getesteten Zelltypen. Da Lipofektamin 2000 für murine Keratinozyten und Fibroblasten geringfügig bessere Ergebnisse lieferte als TransMessenger wurde entschieden, dieses für alle weiteren Versuche einzusetzen.

Variation des Transfektionsreagenz

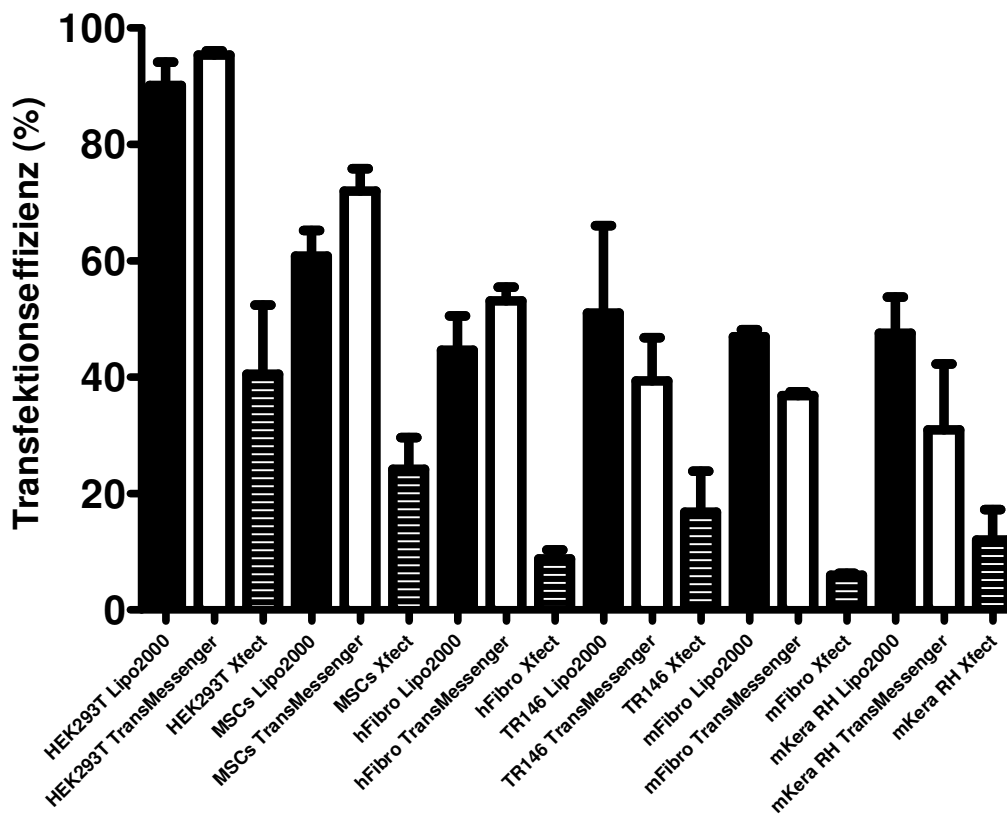


Abbildung 13: Vergleich von drei verschiedenen Transfektionsreagenzien (Lipofektamin 2000, TransMessenger, Xfect) zur erfolgreichen Expression von *DsRed* mRNA in HEK293T, MSCs, humanen Fibroblasten [hFibro], TR146, murinen Fibroblasten [mFibro] und murinen Keratinozyten [mKera] (jeweils n=3).

3.10 *DsRed* mRNA Expression in humanen und murinen Keratinozyten und Fibroblasten im Zeitverlauf

Nachdem sich in den bisherigen Experimenten Lipofektamin 2000 und die Verwendung von 800 ng *DsRed* mRNA für eine erfolgreiche Transfektion bewährt hatten, wurden humane und murine Hautzellen in einer Zeitkinetik näher analysiert (Abbildung 14). Interessanterweise wurden die schlechtesten Transfektionsraten dabei für murine Fibroblasten erzielt (17,0% am Tag 1, 11,7% am Tag 4 und 4,6% am Tag 7), die besten Werte für humane Fibroblasten (66,5% am Tag 1, 28,89% am Tag 4 und 32,23% am Tag 7). Bei den murinen Keratinozy-

ten exprimierten am Tag 1 33,3%, am Tag 4 16,0% und am Tag 7 7,4% *DsRed* mRNA, bei den TR146 am Tag 1 53,4%, am Tag 4 43,2% und am Tag 7 42,6%.

DsRed mRNA Transfektion

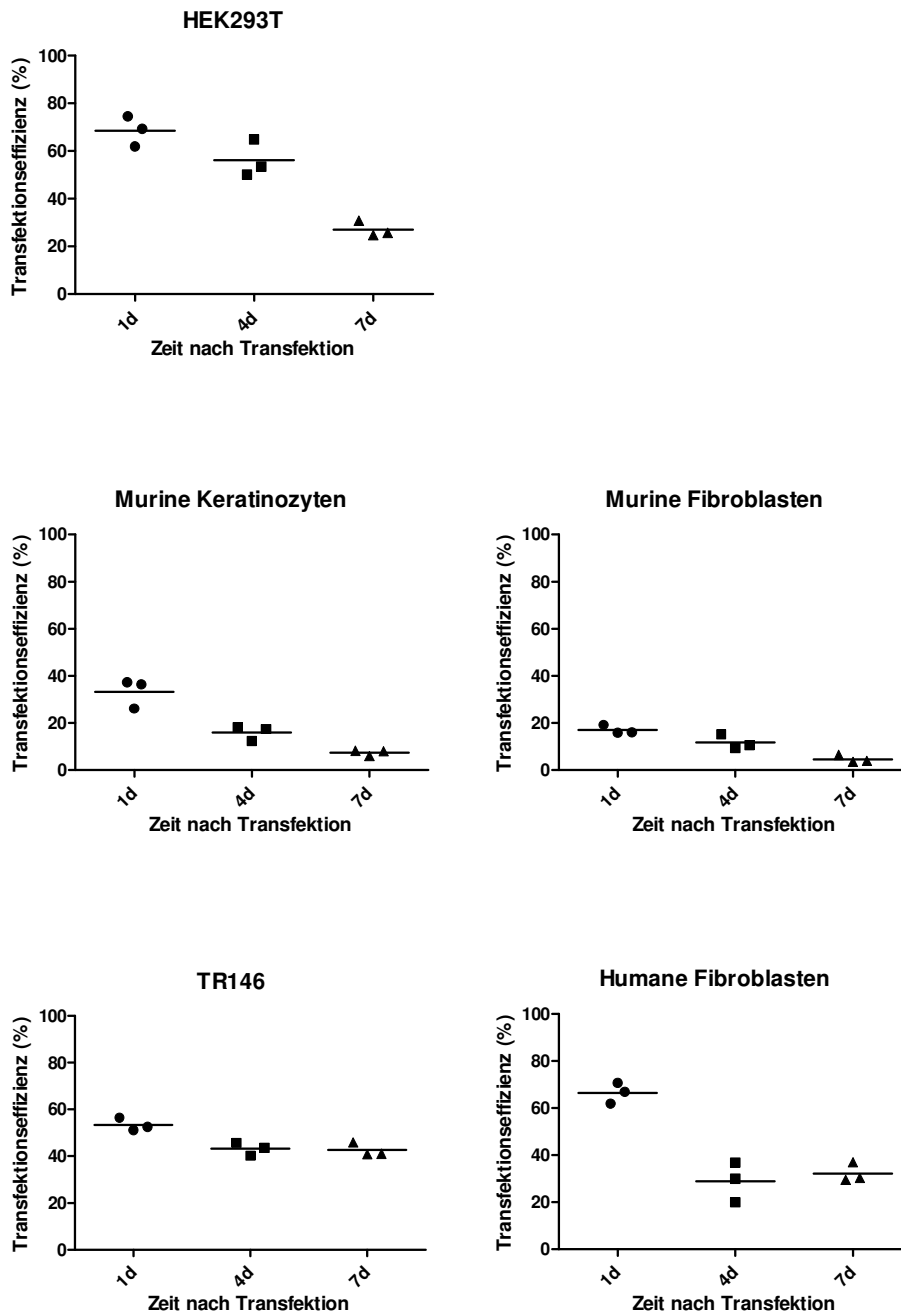


Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analyse zur Bestimmung des prozentualen Anteils an *DsRed* mRNA exprimierenden Keratinozyten und Fibroblasten 1d, 4d und 7d nach Transfektion mit Lipofektamin 2000 (n=3).

3.11 *DsRed* Plasmid Expression in humanen und murinen Keratinozyten und Fibroblasten im Zeitverlauf

Als Vergleich zu den mRNA Transfektionen sollte als nächstes ein Vergleich mit Zellen gemacht werden, die mit pCS2+ *DsRed* Plasmid transfiziert wurden (Abbildung 15). Es zeigte sich dabei, dass die Transfektionseffizienz für alle Zelltypen deutlich niedriger ausfiel, sich aber im Verlauf der 7d ein wenig stabiler zeigte als mit *DsRed* mRNA. Murine Fibroblasten ließen sich nur mit weniger als 1% transfizieren (im Vergleich dazu mit mRNA 17,0%) und auch für humane Fibroblasten konnten keine Werte über 2,5% erreicht werden (mRNA 66,5%). Für murine Keratinozyten fielen die Transfektionsergebnisse mit Plasmid ebenfalls deutlich niedriger aus als mit mRNA (15,7% nach 24h im Vergleich zu 33,3%). Noch deutlicher wurde dieser Unterschied für die TR146: 24h nach Plasmid Transfektion exprimierten 3,9% DsRed, wohingegen es 53,4% nach mRNA Transfektion waren.

Somit wurde geschlussfolgert, dass die *DsRed* mRNA Transfektion sowohl für Fibroblasten, als auch für Keratinozyten effizienter funktioniert als unter Verwendung des pCS2+ *DsRed* Vektors.

DsRed Plasmid Transfektion

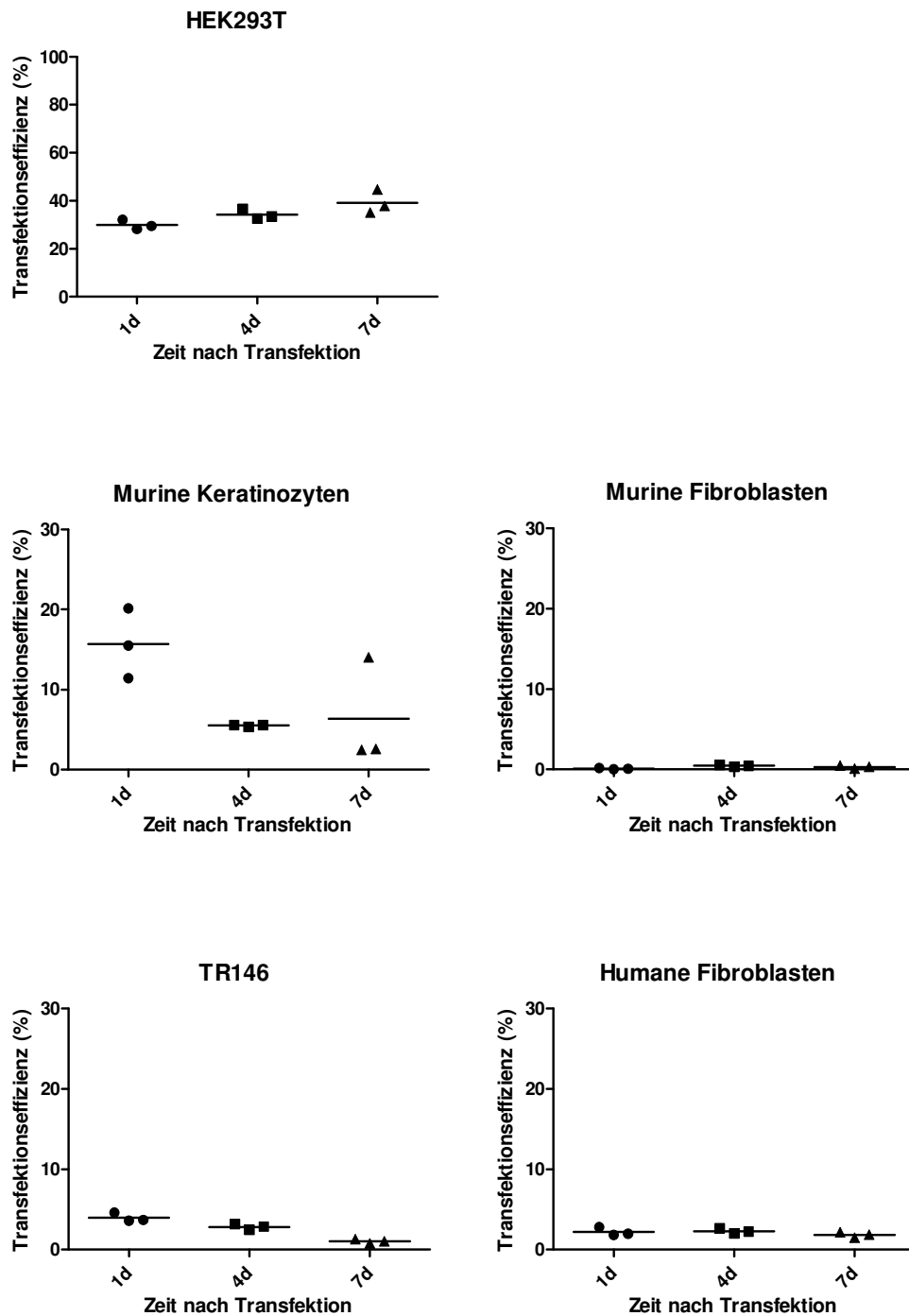


Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse zur Bestimmung des prozentualen Anteils an *DsRed* Plasmid exprimierenden Keratinozyten und Fibroblasten 1d, 4d und 7d nach Transfektion mit Lipofektamin 2000 (n=3).

3.12 *Dsg3* mRNA und *Dsg3* Plasmid Transfektion in murine *Dsg3* knockout Keratinozyten

In den vorherigen Abschnitten konnte nachgewiesen werden, dass sich murine Keratinozyten erfolgreich mit *DsRed* mRNA transfizieren lassen. Um zu überprüfen, ob dies auch mit *Dsg3* mRNA möglich ist, und ob dies zu einer Expression des fehlenden Gens führt, wurde im Folgenden untersucht.

Mittels qRT-PCR (Abbildung 16 A) und immunhistologischer Färbungen (Abbildung 16 B) konnte der Nachweis erbracht werden, dass *Dsg3* knockout Keratinozyten sowohl nach Plasmid, als auch nach mRNA Transfektion eine entsprechende Expression zeigten. Erstaunlicherweise war die Expression der transfizierten knockout Keratinozyten ähnlich stark wie die Expression in heterozygoten Keratinozyten.

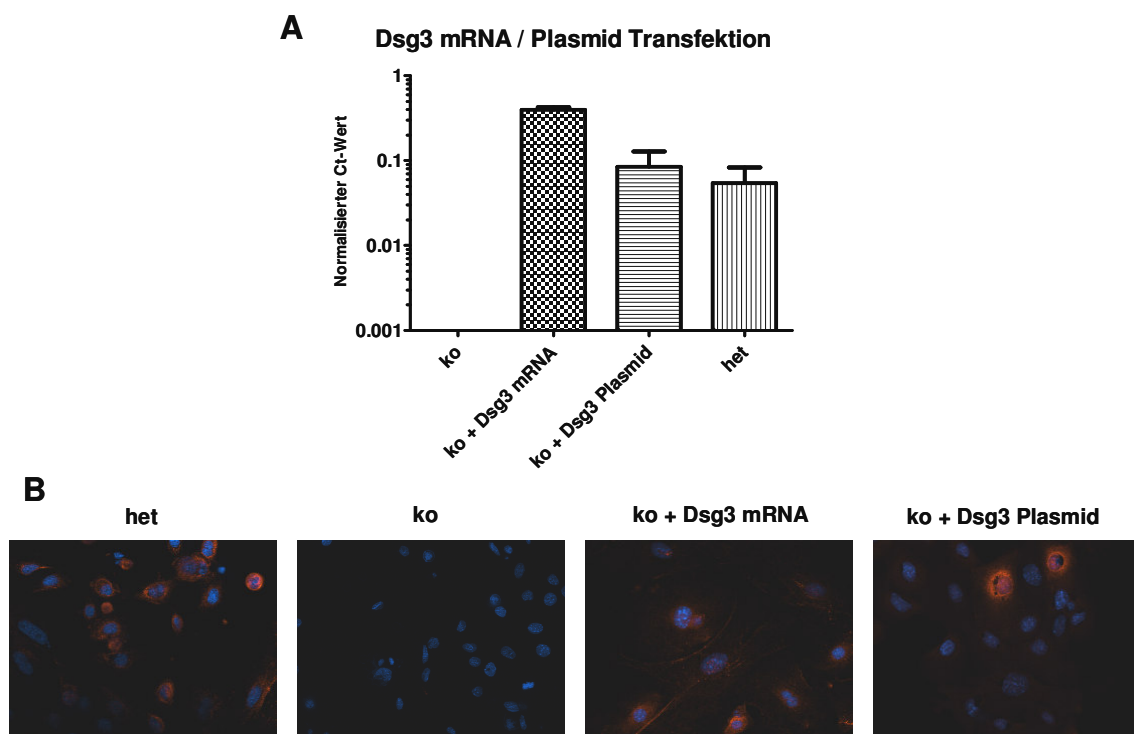


Abbildung 16: Transfektion von *Dsg3* mRNA bzw. Plasmid in murine Keratinozyten, die aus *DSG3* knockout Mäusen isoliert wurden, sowie anschließender Nachweis der Expression mittels A) qRT-PCR (n=4) und B) immunhistologischen Färbungen. Blau gefärbt sind die Zellkerne der Keratinozyten, rot markiert sind Zellen mit DSG3 Expression zu sehen. Als Vergleich dienten Keratinozyten, die von heterozygoten *Dsg3* Tieren stammten.

Alle mitgeführten Negativ-Umschreibe-Kontrollen, die alle Komponenten (auch Total RNA), außer der Reversen Transkriptase, enthielten, zeigten in der qRT-PCR kein Expressionssignal (Daten nicht gezeigt).

3.13 *Col7* mRNA und *Col7* Plasmid Transfektion in murine *Col7* hypomorphe Fibroblasten

Murine Fibroblasten aus *Col7* hypomorphen Mäusen wurden freundlicherweise von Dr. Alexander Nyström, Hautklinik Freiburg bekommen. Diese wurden hier zunächst *in vitro* expandiert und anschließend mit *Col7* mRNA transfiziert. Die Expressionskontrolle erfolgte mit Hilfe der qRT-PCR (Abbildung 17 A) und immunhistologischer Färbungen (Abbildung 17 B).

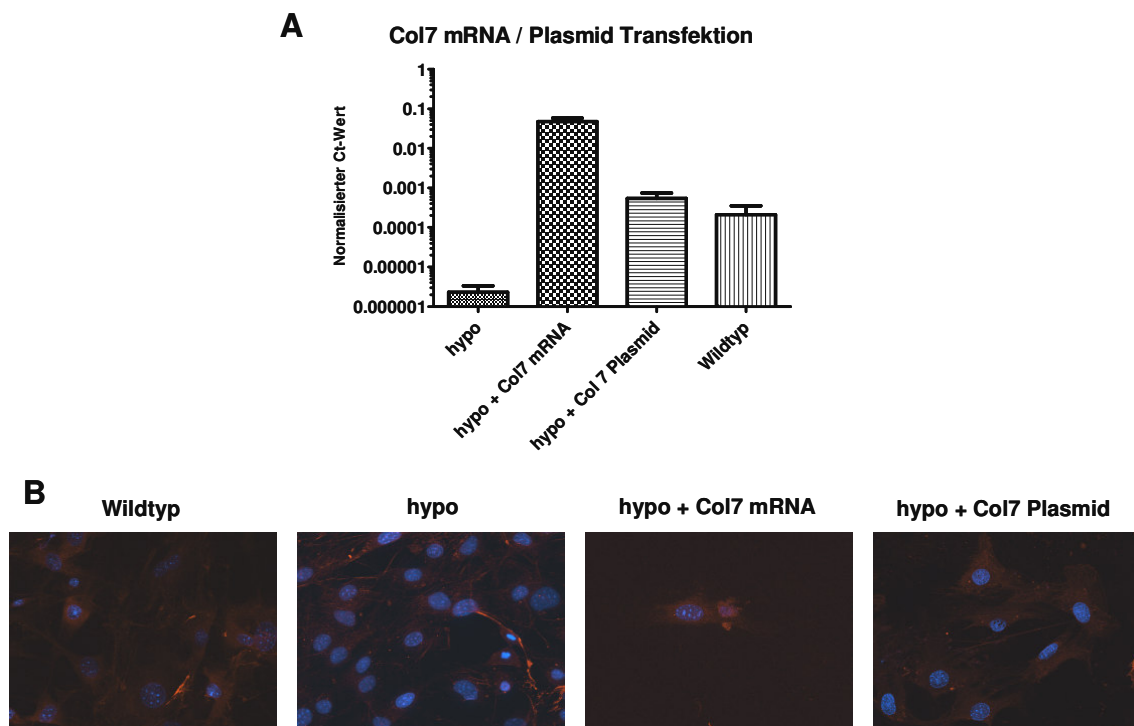


Abbildung 17: Transfektion von *Col7* mRNA bzw Plasmid in murine Fibroblasten, die aus *Col7* hypomorphen Mäusen stammten, sowie anschließender Nachweis der Expression mittels A) qRT-PCR (n=4) und B) immunhistologischen Färbungen. Blau gefärbt sind die Zellkerne der Fibroblasten, rot markiert sind Zellen mit COLVII Expression zu sehen. Als Vergleich dienten Fibroblasten, die von Wildtyp Mäusen stammten.

Mittels qRT-PCR konnte hierbei eine deutliche Zunahme der *Col7* Expression sowohl nach *Col7* mRNA, als auch nach *Col7* Plasmid Transfektion beobachtet werden. Eine Bestätigung der COLVII Protein Expression durch immunhistologische Färbungen konnte nicht eindeutig erbracht werden, da sich bereits die jeweiligen Immunfluoreszenzsignale von Wildtyp und *Col7* hypomorphen Fibroblasten nur geringfügig unterschieden.

4 Diskussion

4.1 Vor- und Nachteile von viralen Vektoren zur Therapie der EB

Die EB stellt eine schwere Erkrankung der Haut dar, die mit lebenslangen Schmerzen für die betroffenen Patienten verbunden ist (Denyer, 2012). In schweren Fällen ist die EB bereits im Kindesalter mit einer hohen Letalität verbunden. Im Moment gibt es keine kurative Therapie, obgleich es inzwischen vielversprechende experimentelle Ansätze gibt (Uitto, 2009; Petrova & McGrath, 2010; Hünefeld & Mezger *et al.*, 2013). Der erste Erfolg für eine funktionelle Korrektur des Gen-Defektes wurde durch den Einsatz einer retroviralen Transfektion von Keratinozyten und die anschließende Transplantation von *in vitro* gezüchteter Epidermis erzielt (Mavilio *et al.*, 2006). Hierbei gab es keine Hinweise einer humoralen oder cytotoxischen Immunantwort auf das Neoantigen, und vor allem wurde keine klonale Expansion der Keratinozyten beobachtet.

Dennoch ist es wichtig anzumerken, dass es andere Beispiele für die Verwendung von viralen Vektoren gibt, die zu Krebs geführt haben. So konnte mittels Gentransfer mit einem MLV-basierten Retrovirus zwar ebenfalls eine Genkorrektur von CD34 Knochenmarkszellen bei Patienten mit schwerer kombinierter Immunschwäche (SCID) erreicht werden, zwei der neun Gen-korrigierten Patienten entwickelten aber eine unkontrollierte Proliferation von reifen T-Zellen mit Leukämie-ähnlichen Eigenschaften (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003). Diese Genotoxizität wurde höchstwahrscheinlich durch die im Retrovirus enthaltenen *long terminal repeats* (LTR) und deren Wirkung auf verschiedene Gen-Promotoren verursacht. So konnten die Autoren zeigen, dass es zu einer Insertion des Vektors in der Nähe eines zentralen Regulators, der die Blutbildung kontrolliert, gekommen war. Basierend auf dieser Beobachtung hielten die meisten europäischen und US-Regulierungsbehörden die MLV-basierenden Vektoren nicht mehr für Gen-Therapien geeignet.

Aufgrund dieser Erkenntnisse entwickelte die Arbeitsgruppe von Mavilio alternative Genvektoren (Di Nunzio *et al.*, 2008). In diesen modifizierten Vektoren wurde *LAMB3* unter der Regulation von Promotor *Enhancer* Elementen aus dem *KRT14* Gen exprimiert. Derartiges Vektor-Design garantierte eine physiologische, *KRT14* Gewebe-spezifische Expression in den basalen Schichten der Epidermis. Allerdings wurden diese Vektoren bislang nicht in Menschen getestet, weil auch für sie gezeigt wurde, dass eine Onkogen-Aktivierung und Immortalisierung der Zellen möglich ist (Bosticardo *et al.*, 2009).

Somit weisen die bisherigen Studien gewisse Limitierungen im Hinblick auf eine sichere und längerfristige Heilung der EB auf. Dies reicht von einer Diskussion über die Vektor-Sicherheit, bis hin zu Beschränkungen was die behandelbaren Hautareale betrifft. So konfrontieren uns die oben genannten Studien sowohl mit experimentellen als auch mit juristischen Problemen, die in den kommenden Jahren wohl nicht gelöst werden können.

Auf viralen Vektoren basierende Gentherapien sind bei Genodermatosen in Europa momentan (und wohl auch in den kommenden Jahren) gesetzlich nicht zugelassen. So wartet der von Mavilio und Kollegen beschriebene Patient seit mehr als 5 Jahren auf eine Fortführung seiner Therapie. Die Vektoren, die für denkbare Gentherapien bislang zur Verfügung stehen, können klinisch leider noch nicht eingesetzt werden, da sie ein potentielles Risiko darstellen, Krebs auszulösen. Hier hätte die Verwendung von mRNAs den entscheidenden Vorteil, dass sie nicht in das Erbgut der Zelle eingreift und somit keine mutagene Wirkung aufweist (Yamamoto *et al.*, 2009).

4.2 Plasmid und mRNA Therapie zur Behandlung der EB

Im Vergleich zur Verwendung von Plasmiden zeigte die mRNA den Vorteil, dass sie viel leichter in Zellen transfiziert werden konnte (s. 3.10). So ließen sich insbesondere murine Fibroblasten fast überhaupt nicht mit Plasmid transfizieren (s. 3.11). Dies liegt vermutlich daran, dass die mRNA lediglich über die Plasmamembran der Zelle eingeschleußt werden muss und direkt im Cy-

toplasma translatiert werden kann. Das Plasmid hingegen muss zusätzlich in den Zellkern gelangen, um dort transkribiert zu werden (Weide *et al.*, 2008).

Bei den Kontroll-Experimenten mit HEK293T fiel auf, dass die Expression der *DsRed* mRNA im Verlauf von 7d sehr viel stärker abnahm als dies bei Keratinozyten und Fibroblasten der Fall war (s. 3.10). Aller Wahrscheinlichkeit nach kann dies darauf zurückgeführt werden, dass sich HEK293T sehr viel schneller in Kultur teilen als Hautzellen. Mit jedem Teilungsvorgang wird die mRNA Menge in den Tochterzellen verringert, bis zu dem Punkt, dass keine mRNA mehr vorhanden ist und exprimiert werden kann. Es ist davon auszugehen, dass sich eine Abnahme der mRNA Expression *in vitro* deutlich unterscheiden wird, wie sie eventuell dann *in vivo* zu beobachten sein wird.

In eigenen Experimenten war entscheidend für die Aufnahme und Expression von mRNA bzw. Plasmid in die Zelle die Verwendung eines geeigneten Transfektionsreagenz. Dabei wurde deutlich, dass sich Lipofektamin 2000 für die Transfektion von Hautzellen gut eignete (s. 3.9). Ob damit auch *in vivo* eine Expression und Aufnahme erreicht werden kann, muss durch weiterführende Experimente untersucht werden. Interessanterweise gelang die Expression von verschiedenen mRNAs im Lungengewebe der Maus auch ohne den Einsatz von Transfektionsreagenzien (Kormann *et al.*, 2011; Mays *et al.*, 2013). Dabei scheint es so zu sein, dass nackte mRNA über Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen werden kann (Lorenz *et al.*, 2011). Inzwischen wurden bereits Tumorpatienten mit „nackter“ mRNA behandelt und profitierten auch klinisch von einer derartigen Therapie (Rittig *et al.*, 2011).

Als Nachteil der mRNA Therapie wäre zu nennen, dass mit diesem Ansatz keine lebenslange Heilung und keine systemische Korrektur erreicht werden kann. So würden Schleimhäute oder andere Organe bei EB Patienten nicht von dieser Art der Therapie profitieren. Es wäre daher vorstellbar, die Gaben in regelmäßigen Abständen durchzuführen, um eine stabile Expression an Hautarealen zu erreichen, die besonderen mechanischen Belastungen ausgesetzt sind.

4.3 Vor- und Nachteile zellbasierter Therapieansätze zur Behandlung der EB

Während Keratinozyten in Kultur nur mühsam zu propagieren und zu halten sind, sind Fibroblasten leicht zu kultivieren (s. 2.2.3.1). Aus therapeutischer Sicht haben Fibroblasten weiterhin den Vorteil gegenüber Keratinozyten, dass die intradermale Injektion technisch viel einfacher ist als die Transplantation von Keratinozyten. Somit werden Fibroblasten inzwischen eher als mögliche Therapie für die RDEB in Betracht gezogen als Keratinozyten (Goto *et al.*, 2006; Zupancic *et al.*, 2012).

Präklinische und erste klinische Studien mit Fibroblasten haben eine Zunahme von ColVII an der dermo-epidermalen Basalmembran, sowie eine langfristige Stabilisierung der Haut in einem Mausmodell der RDEB und bei einzelnen Patienten berichtet (Kern *et al.*, 2009; Woodley *et al.*, 2007; Fritsch *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2008; Venugopal *et al.*, 2010; Nagy *et al.*, 2011). Allerdings gibt es gewisse Limitierungen der Fibroblasten-basierten Therapie. Da nur eine kleine Fläche pro Injektion erreicht werden kann und große Mengen an Zellen benötigt werden, sind mehrere Injektionen erforderlich. Eine weitere Einschränkung ist die Lebensdauer der injizierten Fibroblasten. Nach der Injektion in die Haut, überleben die Zellen nur für ein paar Wochen; das stabile ColVII verbleibt für ungefähr 3 Monate in der dermo-epidermalen Zone (Kern *et al.*, 2009).

Hautfibroblasten ähneln vom Phänotyp her MSCs, einem weiteren Zelltyp von potentiell therapeutischen Interesse (Haniffa *et al.*, 2007). Sowohl Fibroblasten als auch MSCs besitzen immunmodulierenden Eigenschaften; sie supprimieren die Aktivität von dendritischen Zellen, B-, T- und Natürlichen Killerzellen und fördern somit eine periphere und zentrale Immuntoleranz (Haniffa *et al.*, 2009). Dieser Aspekt macht die Therapie mit Wildtyp- oder allogenen Fibroblasten / MSCs zu einem attraktiven Ansatz, da schädliche Wirkungen durch die Aktivierung des Immunsystems reduziert oder sogar verhindert werden können.

Obwohl nach intradermaler Injektion von MSCs in die Haut von zwei Patienten mit RDEB keine unerwünschten Nebenwirkungen beobachtet wurden, weist die

Studie von Conget und Kollegen dennoch gewisse ungeklärte Fragen auf (Conget *et al.*, 2010). Erstens ist es wegen der geringen Anzahl der Patienten notwendig, die Untersuchungen zu wiederholen und das therapeutische Potential mit weiteren molekularbiologischen Methoden, wie z.B. qRT-PCR oder Western-Blot zu ermitteln, idealerweise inklusive einer Zeitkinetik der ColVII Expression. Auch mit diesem Ansatz können nur kleine Hautareale behandelt und die Verbesserung der Schleimhautdefekte kann nicht erwartet werden. Aus diesem Grund sollte auch untersucht werden, ob sich die systemische Gabe von MSCs als Therapieoption für die Blasenbildung der Haut eignet. Denkbar wäre eine solche Migration von systemisch gegebenen MSCs in die Haut. Bei Patienten mit Pemphigus vulgaris, einer blasenbildenden Autoimmunerkrankung, die durch Autoantikörper gegen Desmogleine verursacht wird, ergaben immunhistochemische Analysen, dass über bestimmte proinflammatorische Zytokine Stammzellen in entzündete Hautareale gelockt werden (Rodrigues *et al.*, 2009; Lopez-Robles *et al.*, 2001; Narbutt *et al.*, 2008; Baroni *et al.*, 2002). Solche Mediatoren sind auch bei der Wundheilung beteiligt und regulieren die Transdifferenzierung von MSCs in verschiedene Zelltypen der Haut (Sasaki *et al.*, 2008). Lokale und systemische Gaben von MSCs werden aktuell in der Kinderklinik in Tübingen (DEBRA Grant, Prof. Rupert Handgretinger, Dr. Markus Mezger) in Kooperation mit der Hautklinik in Freiburg (Prof. Leena Bruckner-Tuderman) durchgeführt, um die folgenden Fragen zu beantworten: wandern systemisch gegebene MSCs in die blasenbildenden Bereiche der Haut? Kann die systemische Gabe von MSCs zu einem besseren Verlauf der Erkrankung führen? Produzieren MSCs auch *in vivo* genügend ColVII, oder vermitteln sie eventuell über parakrine Effekte die ColVII Expression anderer Zellen?

Obwohl die SCT nun eine interessante Möglichkeit für eine neuartige Therapie zur systemischen Behandlung der EB darstellt, gibt es leider weiterhin einige wichtige Punkte, die in diesem Zusammenhang bislang nur unvollständig beantwortet sind (Wagner *et al.*, 2010; Tolar & Wagner, 2012). Zunächst einmal ist hervorzuheben, dass die SCT eine sehr belastende Therapie ist, die dadurch erschwert wird, dass RDEB Patienten schwere Haut- und Schleimhautdefekte aufweisen. Mittels myeloablativer Chemotherapie muss nun das komplette

Knochenmark zerstört werden, um anschließend die Stammzellen des Spenders im Knochenmark des Empfängers anzusiedeln. Leider ist der Allgemeinzustand vieler Patienten so schlecht, dass eine SCT nicht immer durchführbar ist.

Eine weitere interessante Möglichkeit gentherapeutische und zellbasierte Therapien zu kombinieren sind induzierte pluripotente Stammzellen (iPCs). Im Jahr 2012 wurde hierfür der Nobelpreis für Medizin an Prof. Shinya Yamanaka aus Japan vergeben, dessen Arbeitsgruppe es gelungen war, eine Reprogrammierung von adulten Zellen hin zu Stammzellen vorzunehmen (Takahashi *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2007). Seit dieser Entdeckung hat es zahlreiche Publikationen zu diesem Thema gegeben, die eine Rückdifferenzierung bestätigen konnten (Yu *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008). Nachdem gezeigt worden war, dass auch Keratinozyten reprogrammiert werden können (Aasen *et al.*, 2008; Bilousova *et al.*, 2011), dauerte es nicht lange bis iPCs auch von Patienten mit RDEB generiert wurden (Itoh *et al.*, 2011; Tolar *et al.*, 2011). Denkbar wäre es nun, iPCs von Patienten mit EB zu generieren und nach Korrektur des Gendefektes autologe Zellen den Patienten zurückzugeben.

4.4 Ausblick

Im Moment gibt es breite Forschungsanstrengungen mit dem Ziel bessere Strategien zur Linderung oder Heilung der EB zu finden. Diese Ansätze müssen sorgfältig auf ihre Effizienz, Spezifität und Sicherheit abgewogen werden. Die Knochenmarkstransplantation könnte eine systemische Behandlung mit der Absicht zu heilen sein, ist aber zugleich auch ein riskanter Ansatz mit potentiell tödlichen Nebenwirkungen (Bruckner-Tuderman, 2010). Daher müssen die Effizienz und langfristige Vorteile in weiteren Studien untersucht und dokumentiert werden.

Dahingegen haben Genersatz-Studien einen hohen Wirkungsgrad für lokale Ansätze gezeigt, aber sie sind aufgrund der Bedenken der Genotoxizität und Vektorsicherheit limitiert. Topische Ansätze, wie die intradermale Applikation von Zellen, Proteinen oder auch von mRNA scheinen sicherer zu sein und könnten somit das Potential für eine breite klinische Anwendung haben.

Allen gentherapeutischen, aber auch zellbasierten Ansätzen ist gemeinsam, dass die Möglichkeit einer Immunreaktion gegenüber dem Neoantigen in Betracht gezogen werden muss (Hünefeld *et al.*, 2012). Bei einer Immunantwort auf das Neoantigen könnte gegebenenfalls eine immunsuppressive Behandlung erforderlich werden, um einen Zustand der Toleranz zu erzielen (Ghoreschi *et al.*, 2011).

Um eine optimale Therapie in der Zukunft zu finden, sind weitere klinische Untersuchungen, einschließlich Gentherapie (Titeux *et al.*, 2010), Fibroblasten (Yan & Murrell, 2010) und MSC-Gabe, Protein Ersatz (Tamai *et al.*, 2009), SCT (Kiuru *et al.*, 2010; Abdul-Wahab *et al.*, 2012) und mRNA (van Tendeloo *et al.*, 2007) unverzichtbar. Diese Forschungsarbeiten sollen bei der Beantwortung der vielen immer noch ungelösten Fragen helfen.

5 Zusammenfassung

Die Hauterkrankung Epidermolysis bullosa (EB) zeichnet sich durch eine Blasenbildung der Haut und Schleimhäute aus, die mit immensem Leid für die betroffenen Patienten verbunden ist. Seit Jahrzehnten werden intensiv neue Behandlungsoptionen gesucht, wobei sich bisherige Strategien auf gentherapeutische und zellbasierte Ansätze konzentrieren. Bis heute umfassen diese Untersuchungen den Einsatz von retroviralen Vektoren, die intradermale Injektion von Fibroblasten bzw. mesenchymalen Stromazellen, die intradermale Applikation von rekombinant hergestellten Proteinen, sowie die Durchführung einer Knochenmarksstammzelltransplantation.

Im Rahmen dieser Dissertation sollten die bisherigen therapeutischen Möglichkeiten dahingehend erweitert werden, dass mit Hilfe von synthetisch hergestellten mRNAs eine fehlende Genexpression in Hautzellen wiederhergestellt wird. Dabei ist es gelungen, für eine Kontroll mRNA (codierend für das Fluoreszenzprotein *DsRed*) und zwei verschiedene Adhäsionsmoleküle der Haut (*Desmoglein-3* und *Kollagen 7*) entsprechende mRNAs *in vitro* zu synthetisieren und aufzureinigen. Nach Etablierung eines Protokolls zur erfolgreichen mRNA Transfektion von humanen und murinen Keratinozyten und Fibroblasten war es möglich die *Dsg3* codierende mRNA in *Dsg3* knockout Keratinozyten bzw. die *Col7* codierende mRNA in *Col7a1* hypomorphen Fibroblasten *in vitro* zu exprimieren. Der Nachweis der Expression konnte sowohl auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR erbracht werden, als auch auf Protein-Ebene mittels immunhistochemischer Färbungen.

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Keratinozyten und Fibroblasten in Zellkultur mit mRNA transfiziert werden können und eine fehlende Genexpression dadurch kompensiert werden kann. Somit stellen diese Experimente den Ausgangspunkt für weiterführende *in vivo* Untersuchungen dar, mit dem Ziel, in den entsprechenden Mausmodellen eine Genkorrektur herbeizuführen. Sollte dies gelingen, stünde eine vielversprechende Therapieoption für Patienten mit EB zur Verfügung.

6 Literaturverzeichnis

1. Aasen T, Raya A, Barrero M J, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 1276-1284.
2. Abdul-Wahab A, Petrof G, McGrath J A. Bone marrow transplantation in epidermolysis bullosa. *Immunotherapy* 2012; 4: 1859-1867.
3. Alexeev V, Uitto J, Igoucheva O. Gene expression signatures of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the cutaneous environment and therapeutic implications for blistering skin disorder. *Cytotherapy* 2011; 13: 30-45.
4. Baroni A, Perfetto B, Ruocco E, Greco R, Criscuolo D, Ruocco V. Cytokine pattern in blister fluid and sera of patients with pemphigus. *Dermatology* 2002; 205: 116-121.
5. Bilousova G, Chen J, Roop D R. Differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into a multipotent keratinocyte lineage. *J Invest Dermatol* 2011; 131: 857-864.
6. Bosticardo M, Ghosh A, Du Y, Jenkins N A, Copeland N G, Candotti F. Self-inactivating retroviral vector-mediated gene transfer induces oncogene activation and immortalization of primary murine bone marrow cells. *Mol Ther* 2009; 17: 1910-1918.
7. Bruckner-Tuderman L. Systemic therapy for a genetic skin disease. *N Engl J Med* 2010; 363: 680-682.
8. Bruckner-Tuderman L, McGrath J A, Robinson E C, Uitto J. Animal models of epidermolysis bullosa: update 2010. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 1485-1488.
9. Chen M, Kasahara N, Keene D R, et al. Restoration of type VII collagen expression and function in dystrophic epidermolysis bullosa. *Nat Genet* 2002; 32: 670-675.
10. Chino T, Tamai K, Yamazaki T, et al. Bone marrow cell transfer into fetal circulation can ameliorate genetic skin diseases by providing fibroblasts to the skin and inducing immune tolerance. *Am J Pathol* 2008; 173: 803-814.
11. Christiano A M, Greenspan D S, Hoffman G G, et al. A missense mutation in type VII collagen in two affected siblings with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Nat Genet* 1993; 4: 62-66.
12. Conget P, Rodriguez F, Kramer S, et al. Replenishment of type VII collagen and re-epithelialization of chronically ulcerated skin after intradermal administration of allogeneic mesenchymal stromal cells in two patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Cytotherapy* 2010; 12: 429-431.
13. De Luca M, Pellegrini G, Mavilio F. Gene therapy of inherited skin adhesion disorders: a critical overview. *Br J Dermatol* 2009; 161: 19-24.

14. Denyer J. Managing pain in children with epidermolysis bullosa. *Nurs Times* 2012; 108: 21-23.
15. Desnick R J, Schuchman E H. Enzyme replacement therapy for lysosomal diseases: lessons from 20 years of experience and remaining challenges. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2012; 13: 307-335.
16. Di Nunzio F, Maruggi G, Ferrari S, et al. Correction of laminin-5 deficiency in human epidermal stem cells by transcriptionally targeted lentiviral vectors. *Mol Ther* 2008; 16: 1977-1985.
17. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-317.
18. Epstein E H, Jr. Epidermolysis bullosa and the search for the basis of hereditary disorders of the skin. *J Dermatol* 1992; 19: 790-792.
19. Featherstone C. Epidermolysis bullosa: from fundamental molecular biology to clinical therapies. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 256-259.
20. Fine J D. Inherited epidermolysis bullosa: past, present, and future. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1194: 213-222.
21. Fine J D, Eady R A, Bauer E A, et al. The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): Report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB. *J Am Acad Dermatol* 2008; 58: 931-950.
22. Fine J D, Mellerio J E. Extracutaneous manifestations and complications of inherited epidermolysis bullosa: part II. Other organs. *J Am Acad Dermatol* 2009; 61: 387-402; quiz 403-384.
23. Fine J D, Mellerio J E. Extracutaneous manifestations and complications of inherited epidermolysis bullosa: part I. Epithelial associated tissues. *J Am Acad Dermatol* 2009; 61: 367-384; quiz 385-366.
24. Frank M M, Jiang H. New therapies for hereditary angioedema: disease outlook changes dramatically. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 272-280.
25. Fritsch A, Loeckermann S, Kern J S, et al. A hypomorphic mouse model of dystrophic epidermolysis bullosa reveals mechanisms of disease and response to fibroblast therapy. *J Clin Invest* 2008; 118: 1669-1679.
26. Fuchs E, Horsley V. More than one way to skin. *Genes Dev* 2008; 22: 976-985.
27. Fujita Y, Abe R, Inokuma D, et al. Bone marrow transplantation restores epidermal basement membrane protein expression and rescues epidermolysis bullosa model mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 14345-14350.
28. Ghoreschi K, Bruck J, Kellerer C, et al. Fumarates improve psoriasis and multiple sclerosis by inducing type II dendritic cells. *J Exp Med* 2011; 208: 2291-2303.
29. Goto M, Sawamura D, Ito K, et al. Fibroblasts show more potential as target cells than keratinocytes in COL7A1 gene therapy of dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 766-772.

30. Grove J E, Bruscia E, Krause D S. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* 2004; 22: 487-500.
31. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2003; 348: 255-256.
32. Haniffa M A, Collin M P, Buckley C D, Dazzi F. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica* 2009; 94: 258-263.
33. Haniffa M A, Wang X N, Holtick U, et al. Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *J Immunol* 2007; 179: 1595-1604.
34. Has C, Kiritsi D. Molecular therapies for epidermolysis bullosa. *G Ital Dermatol Venereol* 2013; 148: 65-72.
35. Hunefeld C, Mezger M, Kern J S, et al. One goal, different strategies - molecular and cellular approaches for the treatment of inherited skin fragility disorders. *Exp Dermatol* 2013; 22: 162-167.
36. Hunefeld C, Mezger M, Rocken M. The three dimensions of functional T-cell tolerance: from research to practice. *J Invest Dermatol* 2012; 132: 508-511.
37. Igoucheva O, Kelly A, Uitto J, Alexeev V. Protein therapeutics for junctional epidermolysis bullosa: incorporation of recombinant beta3 chain into laminin 332 in beta3^{-/-} keratinocytes in vitro. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 1476-1486.
38. Ishikawa H, Silos S A, Tamai K, et al. cDNA cloning and chromosomal assignment of the mouse gene for desmoglein 3 (Dsg3), the pemphigus vulgaris antigen. *Mamm Genome* 1994; 5: 803-804.
39. Ito K, Sawamura D, Goto M, et al. Keratinocyte-/fibroblast-targeted rescue of Col7a1-disrupted mice and generation of an exact dystrophic epidermolysis bullosa model using a human COL7A1 mutation. *Am J Pathol* 2009; 175: 2508-2517.
40. Itoh M, Kiuru M, Cairo M S, Christiano A M. Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 8797-8802.
41. Johnson M R, Wang K, Smith J B, Heslin M J, Diasio R B. Quantitation of dihydropyrimidine dehydrogenase expression by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 2000; 278: 175-184.
42. Kariko K, Buckstein M, Ni H, Weissman D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity* 2005; 23: 165-175.
43. Kern J S, Loeckermann S, Fritsch A, et al. Mechanisms of fibroblast cell therapy for dystrophic epidermolysis bullosa: high stability of collagen VII favors long-term skin integrity. *Mol Ther* 2009; 17: 1605-1615.

44. Kiuru M, Itoh M, Cairo M S, Christiano A M. Bone marrow stem cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Dermatol Clin* 2010; 28: 371-382, xii-xiii.
45. Koch P J, Mahoney M G, Cotsarelis G, Rothenberger K, Lavker R M, Stanley J R. Desmoglein 3 anchors telogen hair in the follicle. *J Cell Sci* 1998; 111 (Pt 17): 2529-2537.
46. Koch P J, Mahoney M G, Ishikawa H, et al. Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. *J Cell Biol* 1997; 137: 1091-1102.
47. Kormann M S, Hasenpusch G, Aneja M K, et al. Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nat Biotechnol* 2011; 29: 154-157.
48. Krauter J, Gorlich K, Ottmann O, et al. Prognostic value of minimal residual disease quantification by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients with core binding factor leukemias. *J Clin Oncol* 2003; 21: 4413-4422.
49. Kueppers F. The role of augmentation therapy in alpha-1 antitrypsin deficiency. *Curr Med Res Opin* 2011; 27: 579-588.
50. Larocca C A, Cordova A C, Price L A, Milner S M. Squamous cell carcinoma as a complication of epidermolysis bullosa. *Am Surg* 2012; 78: E418-419.
51. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008; 371: 1579-1586.
52. Liao Y, Itoh M, Yang A, et al. Human Cord Blood Derived Unrestricted Somatic Stem Cells Promote Wound Healing and Have Therapeutic Potential for Patients With Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Cell Transplant* 2013.
53. Lopez-Robles E, Avalos-Diaz E, Vega-Memije E, et al. TNFalpha and IL-6 are mediators in the blistering process of pemphigus. *Int J Dermatol* 2001; 40: 185-188.
54. Lorenz C, Fotin-Mleczek M, Roth G, et al. Protein expression from exogenous mRNA: uptake by receptor-mediated endocytosis and trafficking via the lysosomal pathway. *RNA Biol* 2011; 8: 627-636.
55. Masunaga T. Epidermal basement membrane: its molecular organization and blistering disorders. *Connect Tissue Res* 2006; 47: 55-66.
56. Mavilio F, Pellegrini G, Ferrari S, et al. Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat Med* 2006; 12: 1397-1402.
57. Mays L E, Ammon-Treiber S, Mothes B, et al. Modified Foxp3 mRNA protects against asthma through an IL-10-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2013; 123: 1216-1228.

58. Muller I, Kordowich S, Holzwarth C, et al. Application of multipotent mesenchymal stromal cells in pediatric patients following allogeneic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis* 2008; 40: 25-32.
59. Nagy N, Almaani N, Tanaka A, et al. HB-EGF induces COL7A1 expression in keratinocytes and fibroblasts: possible mechanism underlying allogeneic fibroblast therapy in recessive dystrophic epidermolysis Bullosa. *J Invest Dermatol* 2011; 131: 1771-1774.
60. Narbutt J, Lukamowicz J, Bogaczewicz J, Sysa-Jedrzejska A, Torzecka J D, Lesiak A. Serum concentration of interleukin-6 is increased both in active and remission stages of pemphigus vulgaris. *Mediators Inflamm* 2008; 2008: 875394.
61. Nielsen H M, Verhoef J C, Ponec M, Rassing M R. TR146 cells grown on filters as a model of human buccal epithelium: permeability of fluorescein isothiocyanate-labelled dextrans in the presence of sodium glycocholate. *J Control Release* 1999; 60: 223-233.
62. Nystrom A, Bruckner-Tuderman L, Kern J S. Cell- and protein-based therapy approaches for epidermolysis bullosa. *Methods Mol Biol* 2013; 961: 425-440.
63. Ohyama M, Amagai M, Tsunoda K, et al. Immunologic and histopathologic characterization of an active disease mouse model for pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 199-204.
64. Ohyama M, Ota T, Aoki M, et al. Suppression of the immune response against exogenous desmoglein 3 in desmoglein 3 knockout mice: an implication for gene therapy. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 610-615.
65. Osborn M J, Starker C G, McElroy A N, et al. TALEN-based Gene Correction for Epidermolysis Bullosa. *Mol Ther* 2013.
66. Park I H, Zhao R, West J A, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2008; 451: 141-146.
67. Petrova A, Ilic D, McGrath J A. Stem cell therapies for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol* 2010; 163: 1149-1156.
68. Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.
69. Poocheron V, Hu S, Kirsner R S. Allogeneic cell therapy for epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 2134.
70. Probst J, Weide B, Scheel B, et al. Spontaneous cellular uptake of exogenous messenger RNA in vivo is nucleic acid-specific, saturable and ion dependent. *Gene Ther* 2007; 14: 1175-1180.
71. Proksch E, Brandner J M, Jensen J M. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 2008; 17: 1063-1072.
72. Remington J, Wang X, Hou Y, et al. Injection of recombinant human type VII collagen corrects the disease phenotype in a murine model of dystrophic epidermolysis bullosa. *Mol Ther* 2009; 17: 26-33.

73. Rittig S M, Haentschel M, Weimer K J, et al. Intradermal vaccinations with RNA coding for TAA generate CD8+ and CD4+ immune responses and induce clinical benefit in vaccinated patients. *Mol Ther* 2011; 19: 990-999.
74. Rodrigues D B, Pereira S A, dos Reis M A, et al. In situ detection of inflammatory cytokines and apoptosis in pemphigus foliaceus patients. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133: 97-100.
75. Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol* 2008; 180: 2581-2587.
76. Sawamura D, Nakano H, Matsuzaki Y. Overview of epidermolysis bullosa. *J Dermatol* 2010; 37: 214-219.
77. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861-872.
78. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-676.
79. Tamai K, Kaneda Y, Uitto J. Molecular therapies for heritable blistering diseases. *Trends Mol Med* 2009; 15: 285-292.
80. Tamai K, Yamazaki T, Chino T, et al. PDGFRalpha-positive cells in bone marrow are mobilized by high mobility group box 1 (HMGB1) to regenerate injured epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 6609-6614.
81. Titeux M, Pendaries V, Hovnanian A. Gene therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Dermatol Clin* 2010; 28: 361-366, xii.
82. Tolar J, Blazar B R, Wagner J E. Concise review: Transplantation of human hematopoietic cells for extracellular matrix protein deficiency in epidermolysis bullosa. *Stem Cells* 2011; 29: 900-906.
83. Tolar J, Ishida-Yamamoto A, Riddle M, et al. Amelioration of epidermolysis bullosa by transfer of wild-type bone marrow cells. *Blood* 2009; 113: 1167-1174.
84. Tolar J, Wagner J E. Management of severe epidermolysis bullosa by haematopoietic transplant: principles, perspectives and pitfalls. *Exp Dermatol* 2012; 21: 896-900.
85. Tolar J, Xia L, Riddle M J, et al. Induced pluripotent stem cells from individuals with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 2011; 131: 848-856.
86. Uitto J. Progress in heritable skin diseases: translational implications of mutation analysis and prospects of molecular therapies*. *Acta Derm Venereol* 2009; 89: 228-235.
87. Uitto J, Has C, Bruckner-Tuderman L. Cell-based therapies for epidermolysis bullosa - from bench to bedside. *J Dtsch Dermatol Ges* 2012; 10: 803-807.

88. Uitto J, McGrath J A, Rodeck U, Bruckner-Tuderman L, Robinson E C. Progress in epidermolysis bullosa research: toward treatment and cure. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 1778-1784.
89. Van Agtmael T, Bruckner-Tuderman L. Basement membranes and human disease. *Cell Tissue Res* 2010; 339: 167-188.
90. Van Tendeloo V F, Ponsaerts P, Berneman Z N. mRNA-based gene transfer as a tool for gene and cell therapy. *Curr Opin Mol Ther* 2007; 9: 423-431.
91. Venugopal S S, Yan W F, Frew J W, et al. First double-blind randomized clinical trial of intradermal allogeneic fibroblast therapy for severe generalized recessive dystrophic epidermolysis bullosa randomized against placebo injections resulted in similar wound healing that is independent of collagen VII expression. In: *J Invest Dermatol* 2010: 67.
92. Wagner J E, Ishida-Yamamoto A, McGrath J A, et al. Bone marrow transplantation for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *N Engl J Med* 2010; 363: 629-639.
93. Weide B, Garbe C, Rammensee H G, Pascolo S. Plasmid DNA- and messenger RNA-based anti-cancer vaccination. *Immunol Lett* 2008; 115: 33-42.
94. Weissman I L, Shizuru J A. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood* 2008; 112: 3543-3553.
95. Wong T, Gammon L, Liu L, et al. Potential of fibroblast cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 2179-2189.
96. Woodley D T, Keene D R, Atha T, et al. Intradermal injection of lentiviral vectors corrects regenerated human dystrophic epidermolysis bullosa skin tissue in vivo. *Mol Ther* 2004; 10: 318-326.
97. Woodley D T, Krueger G G, Jorgensen C M, et al. Normal and gene-corrected dystrophic epidermolysis bullosa fibroblasts alone can produce type VII collagen at the basement membrane zone. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 1021-1028.
98. Woodley D T, Remington J, Huang Y, et al. Intravenously injected human fibroblasts home to skin wounds, deliver type VII collagen, and promote wound healing. *Mol Ther* 2007; 15: 628-635.
99. Yamamoto A, Kormann M, Rosenecker J, Rudolph C. Current prospects for mRNA gene delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2009; 71: 484-489.
100. Yan W F, Murrell D F. Fibroblast-based cell therapy strategy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Dermatol Clin* 2010; 28: 367-370, xii.

101. Yu J, Vodyanik M A, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318: 1917-1920.
102. Zupancic T, Ozir M, Torma H, Komel R, Liovic M. Keratinocyte-based cell assays: their potential pitfalls. *Arch Dermatol Res* 2012; 304: 765-768.

7 Erklärungen zum Eigenanteil

Die vorliegende Dissertation wurde in der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin unter Anleitung von Herrn Prof. Rupert Handgretinger angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Diese Arbeit wurde vom Fortüne Programm Tübingen finanziell unterstützt (Antrag Nr. 2021-0-0). Der Antrag wurde von mir geschrieben, ebenso der dazugehörige Tierversuchsantrag (Versuch-Nr. HT 4/11). Die Ideen zu diesem Projekt wurden von mir entwickelt und die entsprechenden Versuche wurden von mir konzipiert. Teile der Einleitung (s. Abschnitt 1) und der Diskussion (s. Abschnitt 4) enthalten Textpassagen des Fortüne Antrages und des Tierversuchsantrages.

Die Klonierungsarbeiten und Sequenzierungen (s. 3.1 und 3.2), die Etablierung der mRNA Synthesen (s. 3.3), das Kultivieren der verschiedenen Zellkulturen (s. 3.5), sowie deren Transfektion mit *DsRed* mRNA bzw. Plasmid (s. 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10 und 3.11) wurden von mir durchgeführt.

Beim Screenen der *Dsg3* knockout Mäuse (s. 3.4), der Isolation von murinen Keratinozyten (s. 2.2.3.1) und den Transfektionsversuchen mit *Dsg3* und *Col7* mRNA, einschließlich der qRT-PCR Analyse und Chamberslide Färbungen (s. 3.12 und 3.13) war Frau MTA Eva Müller-Hermelink, Hautklinik Tübingen, behilflich.

Die Auswertungen sämtlicher entstandener Daten erfolgte durch mich.

Ferner erkläre ich, dass diese Arbeit noch nicht in einem anderen Studiengang als Prüfungsleistung verwendet wurde.

Danksagung

Mein ganz persönlicher Dank geht an folgende Personen, die dazu beigetragen haben, dass diese Dissertation, in der hier vorliegenden Form, entstehen konnte.

Als erstes sei Herr **Prof. Rupert Handgretinger** genannt, dem mein ganz besonderer Dank gilt. Ohne die großartige Unterstützung wäre das hier nicht möglich gewesen. Vielen, vielen Dank!

An nächster Stelle sei Herr **Junior-Prof. Michael Kormann** erwähnt. Seine Expertise auf dem Gebiet der mRNA Therapie war von zentraler Voraussetzung für dieses Projekt.

Herrn **Prof. Martin Röcken** danke ich ganz besonders für die aufregende und spannende Zusammenarbeit der letzten Jahre. In diesem Zusammenhang seien auch die Kooperationspartner aus Freiburg (**Prof. Leena Bruckner-Tuderman, Dr. Alexander Nyström**) erwähnt.

Frau **MTA Eva Müller-Hermelink** möchte ich besonders hervorheben, da sie bei der praktischen Durchführung der Experimente eine exzellente Unterstützung war. Daneben sei noch Herr **Christian Hünefeld** genannt, mit dem ich während den drei Jahren Forschung zur Stammzelltherapie bei Epidermolysis bullosa durch dick und dünn gegangen bin.

Ein herzliches Dankeschön geht an Frau **MTA Renate Koch** für die hervorragende Arbeit im Labor. Ferner seien noch **Claudia Treuner** und **Dr. Michaela Döring** für die Unterstützung mit den MSCs erwähnt.

Außerordentlicher Dank gebührt meinen **Eltern Erich** und **Irmgard**, meinem **Bruder Alexander** und meinen **Schwiegereltern Ivana und Radimir**, die mir immer den notwendigen Rückhalt gegeben haben. Sie waren zu jeder Zeit eine großartige Unterstützung für mich. Tausend Dank!

Ganz speziell erwähnen möchte ich noch meine **Frau Helena** und unseren **Sohn Jonas**. Danke für Alles!

Curriculum vitae

Zur Person

Dr. rer. nat. Markus Torsten Mezger

geboren am 22.06.1978 in Marbach am Neckar

Studium der Humanmedizin

2011 - 2015	Studium der Humanmedizin an der Universität Tübingen
2006 - 2009	Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg

Wissenschaftliche Anstellungen

05/2009 - heute	Postdoc an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Tübingen, Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie (Prof. Handgretinger)
2007 - 2009	Postdoc am Universitätsklinikum in Würzburg, Innere Medizin, Institut für Infektionsimmunologie (Prof. Einsele, Prof. Löffler)

Promotion zum Dr. rer. nat.

2004 - 2007	Universitätsklinikum Würzburg, Innere Medizin, Institut für Infektionsimmunologie (Prof. Einsele, Prof. Löffler) Titel der Arbeit: „Interaktion zwischen dem humanen Cytomegalievirus, <i>Aspergillus fumigatus</i> , dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten“
02/2005 – 07/2007	Universitätsklinikum Würzburg, Innere Medizin
10/2004 - 01/2005	Universitätsklinikum Tübingen, Innere Medizin

Studium der Biologie (Diplom)

1999 - 2004
10/2003 - 03/2004

Universität Hohenheim
Diplomarbeit am Institut für Genetik, Universität Hohenheim
Titel der Arbeit: „Molekulargenetische Charakterisierung potentieller Apoptosemodifikatoren und ihre Beziehung zu Hairless in *Drosophila melanogaster*“
Abschluss mit Auszeichnung durch den Studienpreis des Universitätsbundes Hohenheim

Zivildienst

1998 - 1999

Karlshöhe Ludwigsburg, Technisches Büro

Schulbildung

1989 - 1998

Friedrich-Schiller Gymnasium in Marbach am Neckar

1985 - 1989

Grundschule in Marbach am Neckar