

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. T. Ruzicka

**Synthese und Sekretion von Erythropoetin durch genetisch modifizierte Zellen
der Haut**

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

vorgelegt von
Maria Löser
aus Aachen
Jahr
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Frau Priv. Doz. Dr. Carola Berking
Mitberichterstatter:	Herr Priv. Doz. Dr. Stephan Segerer
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Herrn Priv. Doz. Dr. Wolfgang Neuhofer Herr Dr. Wolfgang Pfützner
Dekan:	Herr Prof. Dr. Dietrich Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	24.04.2008

<u>Inhaltsverzeichnis:</u>		Seite
1.	Einleitung	6
1.1.	Gentherapie	6
1.1.1.	Kutane Gentherapie	
1.2.	Aufbau der Haut	7
1.3.	Gentransfer in die Haut	9
1.3.1.	Gentransfer von Plasmiden (Transfektion)	9
1.3.2.	Gentransfer mit Hilfe viraler Vektoren (Transduktion)	10
1.3.2.1.	Gentransfer mit Hilfe retroviraler Vektoren	11
1.3.2.1.1.	Aufbau von Retroviren	11
1.3.2.1.2.	Aufbau retroviraler Transferkonstrukte	12
1.3.2.1.3.	Verpackungszellen	13
1.3.2.1.4.	Menschliche Haut und retroviraler Gentransfer	14
1.4.	Anwendungsbeispiele für eine kutane Gentherapie	14
1.4.1.	Therapie angeborener Hauterkrankungen, die durch das Fehlen einer Substanz in der Haut bedingt sind	14
1.4.2.	Therapie systemischer Erkrankungen, die durch das Fehlen eines Enzyms zur Anreicherung giftiger Stoffwechselprodukte im Blutkreislauf führen	15
1.4.3.	Immuntherapie	15
1.4.4.	Wundtherapie	16
1.4.5.	Tumorthherapie	16
1.4.6.	Therapie systemischer Erkrankungen, die zum Fehlen einer Substanz im Blutkreislauf führen	16
1.5.	Erythropoetin	17
1.5.1.	Funktion im Organismus	17
1.5.2.	Erythropoetin-Produktion	18
1.5.3.	Therapeutischer Einsatz von Erythropoetin	19
1.5.3.1.	Chronische Niereninsuffizienz	19
1.5.3.2.	Chronisch entzündliche und maligne Erkrankungen	20
1.5.3.3.	Maligne Infiltration des Knochenmarks	20
1.5.3.4.	Chemotherapie	21
1.5.3.5.	Hämoglobinopathien	21
1.5.3.6.	Protektion von Nervenzellen	21
1.5.3.7.	Derzeit etablierter klinischer Einsatz von Erythropoetin	21
1.6.	Interessante Forschungsergebnisse auf dem Gebiet der Erythropoetin-Gentherapie	23
1.7.	Ziel dieser Arbeit	26
2.	Material und Methoden	27
2.1.	Zellkulturen	27
2.2.	Herstellung retroviraler Vektorpartikel zum Transfer des Erythropoetin-Gens	27
2.2.1.	Vermehrung des Erythropoetin-Plasmids (Transformation)	27

2.2.2.	Isolierung einer kleinen Menge Plasmid-DNS (Miniprep)	29
2.2.3.	Schneiden und Auftrennen von Plasmid-Stücken (Restriktionsverdau und Elektrophorese)	29
2.2.4.	Isolierung einer größeren Menge Plasmid-DNS aus Bakterien (Maxiprep)	31
2.2.5.	Transfer des Erythropoetin-Plasmids in amphotrope 293-Zellen (Transfektion)	31
2.3.	Transfer des Erythropoetin-Gens in Keratinozyten und Fibroblasten mit Hilfe eines retroviralen Erythropoetin-Vektors (Transduktion)	32
2.4.	Bestimmung der Konzentration von Erythropoetin-Vektoren im Überstand der Verpackungszellen (Vektor-Titer)	33
2.5.	Überprüfung auf replikations-kompetente Retroviren	34
2.6.	Herstellung von Hautkonstrukten	35
2.6.1.	Kollagen-Fibroblasten-Phase	35
2.6.2.	Keratinozyten-Phase	36
2.6.3.	Luftexpositions-Phase	37
2.7.	Bestimmung der Erythropoetin-Sekretion von Zellkulturen und Hautkonstrukten transduzierter Zellen	37
2.8.	Fixierung der Hautkonstrukte und Herstellung histologischer Schnitte	40
2.9.	Statistische Auswertung	40
3.	Ergebnisse	42
3.1.	Gewinnung retroviraler Erythropoetin-Vektoren	42
3.1.1.	Untersuchung des Erythropoetin-Plasmids	42
3.1.2.	Erythropoetin-Produktion der transfizierten Verpackungszellen	42
3.1.3.	Bestimmung des Titers retroviraler Erythropoetin-Vektoren aus transfizierten Verpackungszellen	43
3.2.	Produktion und Sekretion von Erythropoetin durch transduzierte primäre humane Keratinozyten und Fibroblasten in Zellkultur	43
3.3.	Durchführung einer Negativkontrolle	46
3.4.	Überprüfung auf replikationskompetente Retroviren	46
3.5.	Herstellung der Hautkonstrukte	46
3.5.1.	Einstellung des pH-Wertes	46
3.5.2.	Fibroblasten und Kollagen	47
3.5.3.	Keratinozyten	49
3.5.4.	Differenzierung der Epidermis	50
3.6.	Bildung einer regelrecht strukturierten Haut durch genetisch modifizierte Keratinozyten und Fibroblasten	51
3.7.	Produktion und Sekretion von Erythropoetin durch transduzierte humane primäre Keratinozyten und Fibroblasten in Hautkonstrukten	52

3.8.	Negativkontrolle der Hautkonstrukte	55
4.	Diskussion	56
4.1.	Hautkonstruktmodelle	57
4.1.1.	Verschiedene Varianten von Hautkonstrukten	57
4.1.2.	Vergleich von Hautkonstrukten mit Monolayer-Zellkulturen	59
4.1.3.	Vergleich von Hautkonstrukten mit natürlicher menschlicher Haut	60
4.1.4.	Morphologie der hergestellten Hautkonstrukte – Beurteilung und Diskussion eigener Ergebnisse	63
4.2.	Erythropoetin-Sekretion transduzierter Keratinozyten und Fibroblasten	64
4.2.1.	Erythropoetin-Sekretion in Monolayer-Zellkultur – Vergleich zwischen Keratinozyten und Fibroblasten	64
4.2.2.	Erythropoetin-Sekretion genetisch modifizierter Hautkonstrukte – Beurteilung der Ergebnisse	66
4.3.	Medizinische Anwendung von Erythropoetin sezernierenden Hautkonstrukten als Ausblick	71
4.3.1.	Erythropoetin-Dosis bei therapeutischer Anwendung	71
4.3.2.	Möglichkeiten zur Optimierung der Erythropoetin-Sekretion eines Transplantats durch Selektion genetisch modifizierter Zellen	72
4.3.3.	Sicherheit retroviraler Gentherapie	73
4.3.3.1.	Verwendung retroviraler Vektoren	73
4.3.3.2.	Nebenwirkungen von Erythropoetin	74
4.3.3.3.	Steuerungsmöglichkeiten von Transferyenen	75
5.	Zusammenfassung	80
6.	Literatur	83
7.	Anhang	93
7.1.	Verwendete Abkürzungen	93
7.2.	Verwendete Materialien	93
7.2.1.	Verwendete Feststoffe	93
7.2.2.	Verwendete Chemikalien	94
7.2.3.	Verwendete Medien	95
7.2.4.	Verwendete Zellen	96
7.2.5.	Verwendete Vektoren	96
7.3.	Danksagung	97
7.4.	Lebenslauf	99

1. Einleitung

1.1. Gentherapie

Gentherapie kann definiert werden als die Einschleusung genetischen Materials in die Zellen eines Individuums, um einen therapeutischen Nutzen zu erzielen¹³³.

Ursprünglich verstand man unter Gentherapie die Behandlung angeborener Erkrankungen durch Korrektur des zugrunde liegenden Gendefektes in den körpereigenen Zellen. Seit langem sieht man in ihr allerdings auch eine Möglichkeit zur Therapie maligner, infektiöser, chronisch entzündlicher oder metabolisch systemischer Erkrankungen. Verschiedene Anwendungsmöglichkeiten der Gentherapie wurden in präklinischen und klinischen Studien untersucht, mit teilweise viel versprechenden Ergebnissen (siehe 1.4.).

1.1.1. Kutane Gentherapie

Die Haut ist aus unterschiedlichen Gründen ein sehr attraktives Organ für gentherapeutische Verfahren¹⁴⁵. Sie ist eines der größten und als Oberflächenorgan das am einfachsten zugängliche Gewebe des menschlichen Körpers. Dies ist sowohl bei direktem Einbringen von genetischem Material in die Haut von Vorteil, als auch bei der Gewinnung und Replantation von Zellen nach genetischer Modifikation außerhalb des Organismus. Auch eine mögliche Steuerung der Expression transferierter Gene ist einfacher als in anderen Organen, da zu diesem Zweck Substanzen topisch appliziert werden können¹⁶⁶. Zur Beurteilung des behandelten Gewebes sowie im Fall von Komplikationen kann dieses zudem ohne größere Schwierigkeiten wieder entfernt werden. Ein weiterer Vorteil der Haut ist ihre hohe Sekretionsleistung (siehe 1.2.). Ferner stehen zur Gentherapie von Hautzellen verschiedene etablierte Verfahren zur Verfügung (siehe 1.3.).

1.2. Aufbau der Haut

Die Haut (Kutis) besteht aus zwei Schichten, der äußeren Epidermis und der Dermis. Die Epidermis stellt ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel dar (siehe Abb. 1). Sie enthält hauptsächlich Keratinozyten, aber auch Melanozyten, Langerhanszellen und sehr vereinzelt Merkelzellen.

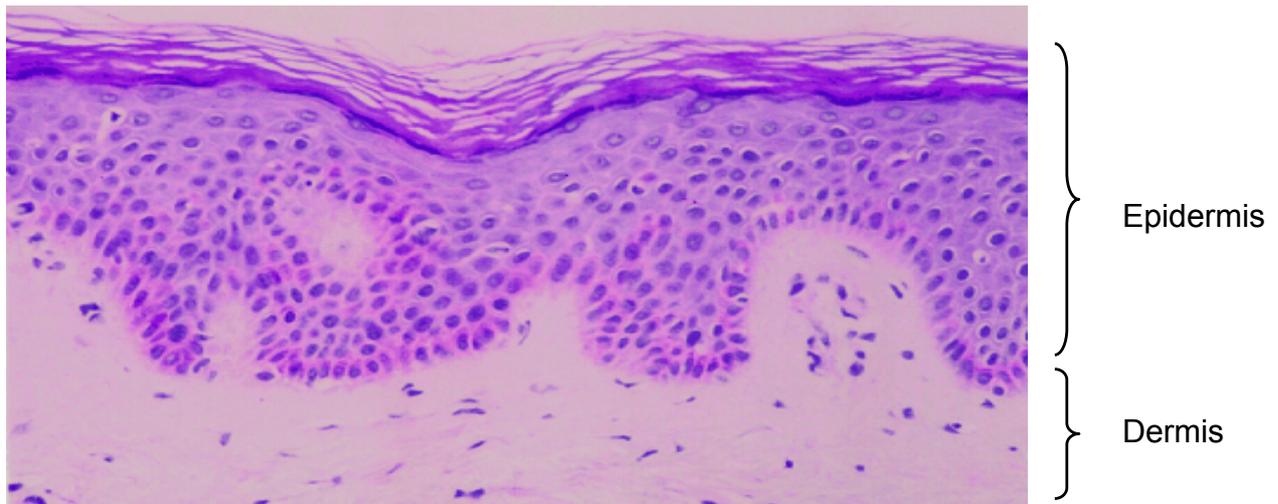


Abbildung 1: Histologisches Bild menschlicher Epidermis und Dermis

Die Keratinozyten bilden mehrere nach Lokalisation und mikroskopischen Charakteristika definierte Schichten. Die unterste Schicht ist die so genannte Basalzellschicht (Stratum basale). In ihr findet die Proliferation der Keratinozyten statt. Sie beinhaltet die epidermalen Stammzellen, die sich relativ langsam aber zeitlebens teilen und zur Regeneration der Epidermis befähigt sind¹⁵¹. Aus ihnen bilden sich schnell teilende Tochterzellen, die in der Lage sind, sich zu differenzieren und in suprabasale Schichten (Stratum spinosum und granulosum) zu wandern³¹. Diese sind nur zu einer begrenzten Anzahl von Teilungen fähig. Die oberste Schicht der Epidermis ist die Hornschicht, in der sich abgestorbene Keratinozyten befinden. Die Hornschicht wird laufend abgeschilfert, während sich die restlichen Schichten innerhalb von circa 30 Tagen erneuern¹⁰⁰.

Aus dieser funktionellen Anatomie ergibt sich, dass ein in die Epidermis eingeführtes Gen nur dann längere Zeit persistieren kann, wenn es sich im Genom der Stammzellen integriert hat. Leider ist es bis heute noch nicht gelungen, effizient eine

reine Population epidermaler Stammzellen zu isolieren, um sie gezielt genetisch verändern und anschließend vermehren zu können^{14, 85}.

Die wesentliche Funktion der Epidermis ist der Aufbau eines äußeren Schutzmantels. Sie schafft eine Permeabilitätsbarriere, Schutz vor UV-Strahlung und mechanischem Stress. Des Weiteren spielt sie eine wesentliche Rolle bei zahlreichen immunologischen Prozessen. Die Epidermis sezerniert sowohl Stoffe, die lokal benötigt werden (beispielsweise Filamente zur Verankerung der Epidermis an der Dermis wie Laminin und Kollagen VII), als auch solche, die in den Blutkreislauf gelangen (beispielsweise Apolipoprotein E, das von undifferenzierten basalen Zellen der Epidermis sezerniert wird)^{24, 75}. Die Blutversorgung der Epidermis erfolgt über Gefäße der Dermis. Durch die Verzahnung beider Schichten über epidermale Reteleiste und dermale Papillen (siehe Abb. 1) wird die Kontaktfläche vergrößert und somit die Ernährung und die Sekretionsleistung der Epidermis ins Blut verbessert.

Die Dermis gliedert sich in die obere feinfaserige Papillarschicht und die Retikularschicht, die aus kräftigen Kollagenfaserbündeln besteht. Beide Schichten sind reich an wasserbindenden Glykosaminoglykanen, die von den Fibroblasten, die den wesentlichen Anteil der dermalen Zellen ausmachen, gebildet werden. In der Dermis befinden sich zudem Blutgefäße, Nerven, Rezeptororgane, Schweiß- und Talgdrüsen, Haarpapillen und verschiedene Immunzellen.

Dermale Fibroblasten stabilisieren durch Produktion der kollagenen und retikulären Fasern die mechanische Belastbarkeit der Haut (große Zerreißfestigkeit). Des Weiteren nimmt die Dermis eine wichtige Rolle bei der immunologischen Abwehr ein und ist durch ihre reichhaltigen Gefäße in der Lage, zur Thermo- und Kreislaufregulation beizutragen¹⁰⁰.

1.3. Gentransfer in die Haut

Es gibt prinzipiell zwei Ansätze, menschliche Haut genetisch zu verändern. Entweder man überführt das gewünschte Gen direkt in die Haut (In-vivo-Transfer) oder man isoliert aus der Haut die gewünschten Zellen und modifiziert diese in der Zellkultur (Ex-Vivo-Transfer, siehe Abb. 2). Anschließend entwickelt man aus den veränderten Zellen Hautkonstrukte und transplantiert diese zurück auf den Patienten.

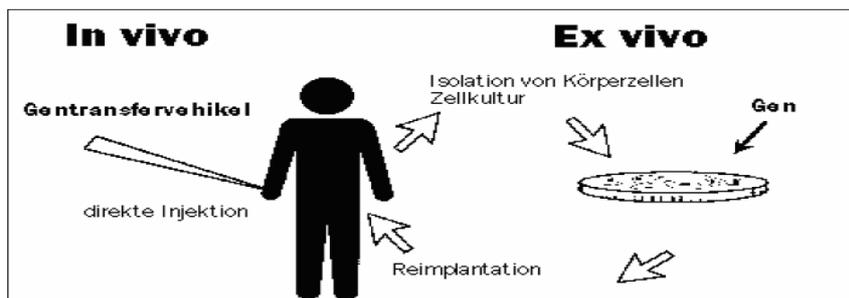


Abbildung 2: Schematische Darstellung des In-vivo- und Ex-vivo-Gentransfers³⁶

Das genetische Material lässt sich in verschiedenen Formen und unterschiedlichen Verpackungen in die Zielzellen transferieren.

1.3.1. Gentransfer von Plasmiden (Transfektion)

Die Einschleusung genetischen Materials in eukaryonte Zellen als Plasmid-DNS nennt man Transfektion. Plasmide sind extrachromosomale ringförmige DNS-Moleküle, die sich unabhängig von der chromosomalen DNS im Zellkern replizieren können. Bei einer Transfektion von Plasmiden verbleibt die DNS episomal und wird in der Regel nicht in das Genom integriert¹⁰⁸. Folglich eignet sich dieses Verfahren am besten für Anwendungen, bei denen das Genprodukt nur für kurze Zeit benötigt wird, beispielsweise zur Immunisierung gegen Infektionserreger oder der temporären Expression von Immunmodulatoren¹⁸¹. Hierbei sind besonders In-vivo-Methoden zu bevorzugen, da sie meist einfacher und schonender anzuwenden sind. Zudem lassen sich unterschiedliche Plasmide bei Bedarf problemlos miteinander kombinieren. Die gewünschte genetische Information lässt sich durch direkte Injektion⁸³ (siehe Abb. 3) oder durch topische Applikation¹⁸¹ überführen.

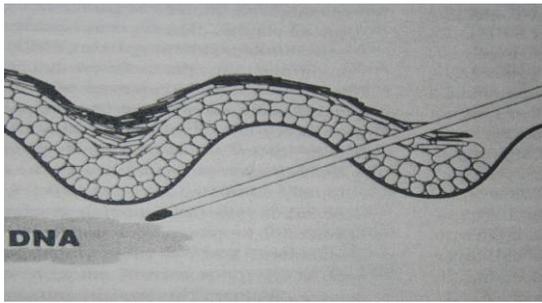
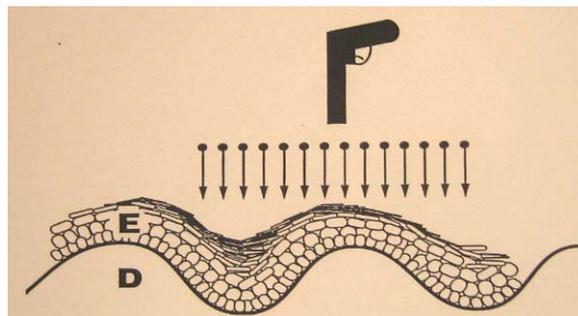


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer DNS-Injektion in die Haut¹⁸¹

Eine spezielle Form der Injektion ist das „Mikroseeding“, bei dem in Liposomen verpackte DNS durch oszillierende Mikronadeln in die Haut eingebracht wird⁴⁸. Eine weitere Möglichkeit zur In-vivo-Überführung genetischen Materials sind ballistische Verfahren. Dabei werden DNS-beschichtete Goldpartikel mit einer so genannten Gen-Pistole in die Haut geschossen und so in die Zielzellen eingebracht (siehe Abb. 4 und 5)^{99, 172}.



Abbildung 4: „Gen-Pistole“¹¹⁹



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Applikation von DNS mit Hilfe einer „Gen-Pistole“
E: Epidermis, D: Dermis¹⁸²**

Bei der Elektroporation wird der zyttoplasmatische Übertritt der negativ geladenen DNS mit Hilfe elektrischer Felder unterstützt⁷².

1.3.2. Gentransfer mit Hilfe viraler Vektoren (Transduktion)

Virale Methoden zeichnen sich durch eine hohe Effizienz besonders beim Ex-Vivo-DNS-Transfer aus. Voraussetzungen zum Gebrauch von Viren sind vorherige Veränderungen ihres Erbguts, um pathologische Effekte auszuschalten und ihre

selbstständige Vermehrung zu verhindern. Einen Überblick über die häufiger verwendeten viralen Vektoren gibt Tabelle 1.

Virustyp	Integration ins Genom	Vorteile	Grenzen
Adenovirus	nein	Transduktion sowohl sich teilender als auch sich nicht teilender, postmitotischer Zellen, hohe Effizienz	Kurzzeitexpression, Immunologische Reaktion gegen transduzierte Zellen
Adeno-assoziiertes Virus	möglich	Transduktion sowohl sich teilender als auch sich nicht teilender, postmitotischer Zellen, Langzeitexpression	geringe Verpackungskapazität für DNS (Verwendung für Gene mit nur wenigen Basenpaaren)
Herpes simplex	nein	Transduktion von Neuronen und Gliazellen, hohe Verpackungskapazität für DNS	Kurzzeitexpression
Retroviren			
Molony murine leukaemia virus	Ja	Hohe Effizienz bei Ex-Vivo-DNS-Transfer	keine Transduktion sich nicht teilender, postmitotischer Zellen, evtl. onkogen
Lentivirus	Ja	Transduktion sowohl sich teilender als auch sich nicht teilender, postmitotischer Zellen	Risiko der Mutation zu replikationskompetentem Immundefizienz-Virus (HIV)

Tabelle 1: Für den Einsatz viraler Vektoren verwendete Virustypen¹¹⁹

1.3.2.1. Gentransfer mit Hilfe retroviraler Vektoren

Retroviren haben die Fähigkeit, ihr RNS-Genom in DNS zu konvertieren und ins Chromosom der befallenen Zelle zu integrieren, was Voraussetzung einer Langzeitexpression des genetischen Materials ist. Sie sind allerdings in der Regel nur dann in der Lage zur genomischen DNS vorzudringen, wenn sich die Zielzelle in der Teilungsphase befindet und die Kernmembran aufgelöst ist.

1.3.2.1.1. Aufbau von Retroviren

Das retrovirale Genom beinhaltet drei Genabschnitte: „gag“, „pol“ und „env“, die sogenannten Funktionsgene (siehe Abb. 6). Das Genprodukt von „gag“ stellt das retrovirale Kapsid dar. „Pol“ codiert unter anderem für das Enzym „Reverse Transkriptase“, das die retrovirale RNS in DNS umschreibt. Die Produkte von „env“ sind Proteine, die in die äußere Virushülle integriert werden und für die virale Bindung am Rezeptor der Membran der Zielzelle notwendig sind.

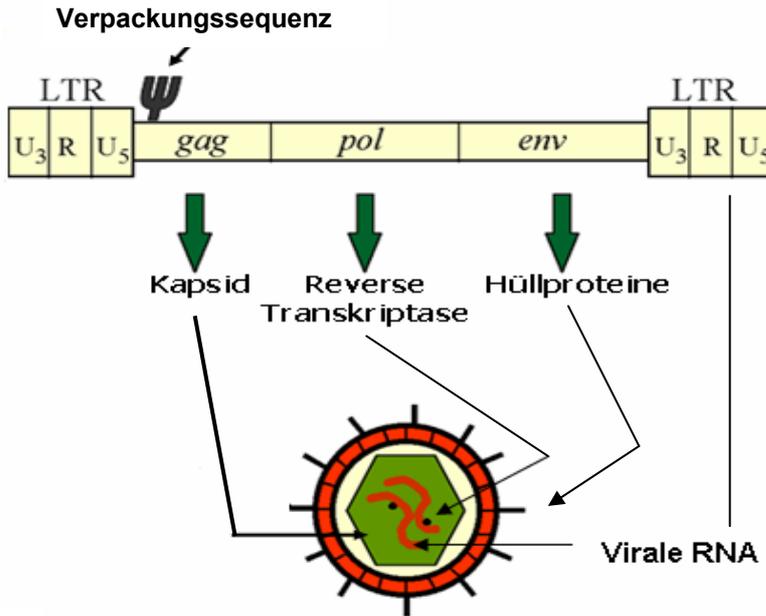


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Retrovirus und dessen genetischen Materials.
 LTR = Long Terminal Repeats. Ψ = Verpackungssequenz (siehe Text).

Das Genom eines Retrovirus ist durch virale Promotoren, so genannte LTR (Long Terminal Repeats) eingefasst. Diese sind zur chromosomalen Integration notwendig und definieren den Beginn und das Ende des viralen Genoms. Außerdem werden sie zur Kontrolle der viralen Transskription benötigt. Die Verpackungssequenz ψ stellt eine Signalsequenz dar, die zur Verpackung der RNS in die Vektorhülle benötigt wird.

1.3.2.1.2. Aufbau retroviraler Transferkonstrukte

Das genetische Material, das mit Hilfe eines retroviralen Vektors in menschliche Zellen übertragen werden soll, kann man als Transferkonstrukt bezeichnen (siehe Abb. 7). Dieses wird durch Manipulation eines natürlichen retroviralen Genoms hergestellt. Dazu werden die Funktionsgene des Virus durch gewünschte Fremd-Gene ersetzt. Die Transkription dieser Gene kann unter Kontrolle der LTR-Sequenzen belassen werden oder es können alternative Promotorsequenzen hinzugefügt werden¹⁷⁹. Wichtig ist, dass das Verpackungssignal erhalten bleibt, anhand dessen die RNS der eingebrachten Gene in Vektorhüllen verpackt wird.



Abbildung 7: Retrovirales Transferkonstrukt mit integriertem Transfergen und Verpackungssequenz ψ

1.3.2.1.3. Verpackungszellen

Die Verpackung eines Transferkonstrukts in Vektorhüllen geschieht in so genannten retroviralen Verpackungszellen (siehe Abb. 8). Diese Zellen sind so verändert, dass sie retrovirale Vektorhüllen produzieren, ohne die viralen Funktionsgene darin zu verpacken. Alle retroviralen Funktionsgene sind getrennt voneinander in das Genom der Verpackungszellen integriert. Ihnen fehlt die Verpackungssequenz (ψ). Folglich sind die Verpackungszellen in der Lage, alle zur Bildung einer funktionsfähigen Vektorhülle benötigten Bausteine selbst herzustellen, ohne dass replikationsfähige (also vermehrungsfähige) Viren entstehen.

Ein gewünschtes Transferkonstrukt wird meist als Plasmid-DNS durch Transfektion in die Verpackungszellen eingebracht. Es wird in RNS umgeschrieben und aufgrund der integrierten Verpackungssequenz in die hergestellten Vektorhüllen verpackt (siehe Abb. 8). Die Verpackungszellen setzen sodann Vektorpartikel frei, die das Transferkonstrukt enthalten. Die Übertragung des Transferkonstrukts durch die Vektorpartikel auf Zielzellen nennt man Transduktion.

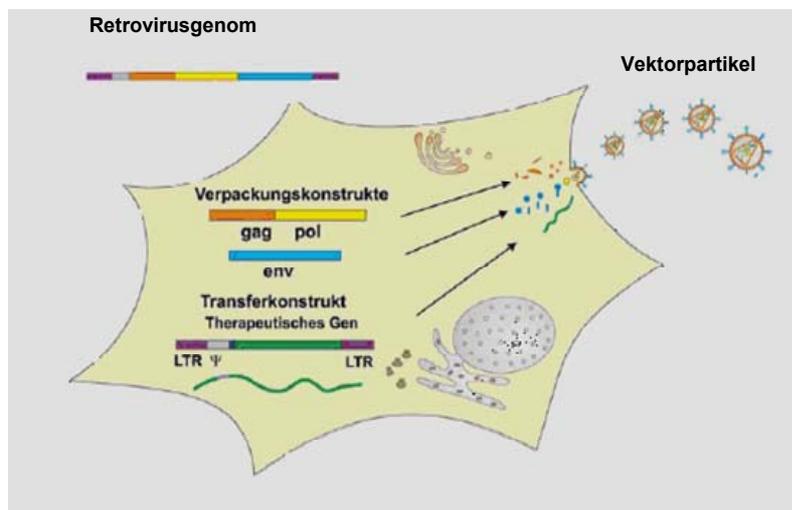


Abbildung 8: Schematische Darstellung einer Verpackungszelle, die ein Transfergen in replikationsdefiziente Retrovirushüllen (Vektorhüllen) verpackt¹⁷⁸

Je nach Art der Verpackungszelle werden Vektoren gebildet, die tierische oder zusätzlich menschliche Zellen infizieren können. Sie werden dementsprechend entweder ecotrophe oder amphotrophe Viren genannt.

1.3.3.1.4. Menschliche Haut und retroviraler Gentransfer

Hautzellen lassen sich ex-vivo sehr effizient durch Retroviren transduzieren. Bei Keratinozyten kam es nach retroviralem Ex-vivo-Gentransfer zu Langzeitexpression in vivo, was darauf schließen lässt, dass auch epidermale Stammzellen transduziert wurden¹⁸⁸. Auch konnten nach retroviraler Transduktion keine Wachstumsnachteile der Keratinozyten festgestellt werden⁶⁷. Ebenso wurde in Fibroblasten eine persistierende In-vivo-Expression retroviral vermittelter Gene erreicht¹⁸⁵.

1.4. Anwendungsbeispiele für eine kutane Gentherapie

Es gibt verschiedene mögliche Indikationen, Zellen der Haut genetisch zu modifizieren.

1.4.1. Therapie angeborener Hauterkrankungen, die durch das Fehlen einer Substanz in der Haut bedingt sind

Die Haut ist für die Aufrechterhaltung einer wirksamen Barriere gegenüber der Umwelt zuständig. Um diese ständig intakt zu halten, produzieren Keratinozyten unterschiedliche Proteine, die die Verhornung regulieren oder die Verankerung der Epidermis an der Dermis gewährleisten. Bei einem Verlust eines dieser Proteine kommt es daher entweder zu einer Verhornungsstörung (Ichthyosis) oder zu blasenförmigen Ablösungen der Epidermis (Epidermolyse). Präklinische Studien haben gezeigt, dass die hierfür verantwortlichen Gendefekte gentherapeutisch behandelbar sein können (siehe Tabelle 2).

Krankheit	defekte Substanzen/Enzyme	Referenz
Junktionale Epidermolysis bullosa	BP 180 β3-Kette von Laminin 5	Seitz et al. (1999) Dellambra et al. (1998), Vailly et al. (2000)
Dystropische Epidermolysis bullosa ⁹	Kollagen VII	Baldeschi et al. (2001)
X-chromosomale hereditäre Ichthyose	Steroid-Sulfatase	Jensen et al. (1993), Freiberg et al. (1997)
Lamelläre Ichthyose	Transglutaminase 1	Choate et al. (1996)

Tabelle 2: Beispiele angeborener Hauterkrankungen, bei denen eine Gentherapie im Kultur-oder Tiermodell getestet wurde³¹

1.4.2. Therapie systemischer Erkrankungen, die durch das Fehlen eines Enzyms zur Anreicherung giftiger Stoffwechselprodukte im Blutkreislauf führen

Eine erblich bedingte defekte Adenosin-Desaminase führt zu einer Anreicherung von Desoxyadenosinen und Adenosinen im Blut erkrankter Patienten. Da beide Stoffe toxisch auf Lymphozyten wirken, leiden die Patienten an einer Immunkrankheit, dem sogenannten SCID (severe combined immunodeficiency) Syndrom. Neben einer ausgeprägten allgemeinen Infektanfälligkeit kann es außerdem zu Skelettfehlbildungen, Hepatitis, Schwerhörigkeit und renalen, sowie neurologischen Symptomen kommen. Nach Transfer der genetischen Informationen zur Herstellung von Adenosin-Desaminase in Keratinozyten⁵⁴ und Fibroblasten^{140, 185} findet eine Metabolisierung der giftigen Stoffwechselprodukte in der Haut statt.

1.4.3. Immuntherapie

Durch Gentherapie können verschiedene Zellen zur Herstellung von Immunmodulatoren angeregt werden. So könnten Erreger wie genitale Humane Papilloma-Viren mit Hilfe eines Transfergens, das Interferon-α kodiert, durch eine verstärkte Immunantwort bekämpft werden¹⁸¹. Außerdem kann man maligne Zellen durch ähnliche Modulation des Immunsystems bekämpfen. Eine transgene Produktion von Interleukin 2 kann beispielsweise durch die Aktivierung von T-Lymphozyten zur Erkennung und Abtötung maligner Zellen führen¹⁵⁰.

Durch intradermale Injektion von Plasmiden können zudem Impfungen durchgeführt werden. Auf diese Weise transfizierte Hautzellen exprimieren ein Antigen, das kutane Langerhanszellen als fremd erkennen und daraufhin eine protektive Immunantwort einleiten⁵¹. Ein gelungenes Beispiel hierfür war die erfolgreiche Transfektion von Mauszellen mit der DNS eines Glykoproteins von Leishmanien¹⁸³.

Bestimmte adjuvant immunstimulierende Nukleotide können eine solche Immunantwort noch verstärken^{161, 186}.

1.4.4. Wundtherapie

In chronische, schlecht heilende Wunden kann genetisches Material eingebracht werden, das Wachstumsfaktoren kodiert, die die Wundheilung fördern⁹⁷.

1.4.5. Tumorthherapie

Die Einbringung von sogenannten Suizidgenen⁶¹ in Tumorzellen führt zu deren gezielter Abtötung. Beispielsweise wurde in Tumorzellen das Gen für die Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase eingebracht. Diese konvertiert Ganciclovir in eine toxische Form, die die DNS-Replikation stoppt und dadurch zum Tod der genetisch modifizierten Zelle führt. Auch Tumorzellen in Nachbarschaft der modifizierten Zellen sterben durch Diffusion der toxischen Substanzen („Bystander-Effekt“)¹¹⁹.

Eine weitere Möglichkeit der Tumorthherapie ist die genetische Veränderung des Tumors durch Einbringung immunmodulatorischer Gene (siehe 1.4.5.). So kann eine Zerstörung von Tumorzellen durch die körpereigene Immunabwehr stimuliert werden.

1.4.6. Therapie systemischer Erkrankungen, die zum Fehlen einer Substanz im Blutkreislauf führen

Bei Patienten mit Hämophilie A, die durch das Fehlen des Gerinnungsfaktors VIII an vermehrter Blutungsneigung leiden, kann genetisch veränderte Haut das fehlende Protein herstellen und ins Blut sezernieren. So werden großflächige Blutungen und Arthropatien durch Gelenkblutungen verhindert⁵⁰.

In der folgenden Tabelle sind weitere mögliche Substanzen aufgeführt, die die Haut nach genetischer Modifikation ins Blut sezernieren kann:

Substanz	Referenz
Apolipoprotein E	Fenjves et al. (1989)
hGH	Jensen et al. (1994)
Gerinnungsfaktor IX	Gerrard et al. (1993)
Gerinnungsfaktor VIII	Fakharzadeh et al. (2000)
β -Glucuronidase	Moullier et al. (1993)
α -Glucuronidase A	Medin et al. (1996)
IGF-II	Da Costa et al. (1994)
TNF α	Cheng et al. (1992)
Interleukin-6	Sun et al. (1995)
Interleukin-8	Hengge er al. (1995)
Interleukin-10	Meng et al. (1998)
Menschliches α 1-Antitrypsin	Setoguchi et al. (1994)
β -hCG	Krueger et al. (1994)
VEGF	Rio et al. (1999)
Transferrin	Petersen et al. (1995)
Erythropoetin	Fenjves et al. (1994)

Tabelle 3: Beispiele von Substanzen, die die Haut nach gentherapeutischer Modifikation ins Blut sezernieren kann^{31, 55}

1.5. Erythropoetin

Erythropoetin (Epo) ist ein hitzestabiles Glykoprotein-Hormon aus 165 Aminosäuren und einem 40-prozentigem Zuckeranteil. Sein Molekulargewicht beträgt 30400 Da. Die physiologische Plasmakonzentration von Erythropoetin beträgt 10-25 U/l.

1.5.1 Funktion im Organismus

Erythropoetin stimuliert die Proliferationsrate und die Differenzierung erythrozytärer Vorläuferzellen im Knochenmark und somit die Zahl der hämoglobinbildenden Erythroblasten (siehe Abb. 9). Außerdem wirkt es antiapoptotisch auf diese Zellen¹⁰⁵. Ein Anstieg der Erythropoetin-Konzentration führt zu einer Verkürzung der Reifungszeit in der Erythropoese.

Erythropoetin-Rezeptoren werden auch auf verschiedenen anderen Zelltypen exprimiert (unter anderem auf Endothelzellen¹⁹¹, mesangialen Zellen, glatten Muskelzellen¹³² und Zellen neuralen Ursprungs¹²⁸). Ihr Einfluss auf diese Zellen ist bis heute nur in Ansätzen geklärt. In der Fetalperiode sind Erythropoetin-Rezeptoren über den ganzen Körper verteilt, was darauf schließen lässt, dass Erythropoetin hier in mehreren Geweben als Wachstumshormon und/oder Differenzierungsfaktor wirkt¹⁰¹.

1.5.2. Erythropoetin-Produktion

Beim Absinken des Sauerstoff-Partialdruckes im Gewebe (Hypoxie) wird Erythropoetin durch peritubuläre interstitielle Fibroblasten in der Niere^{96, 106, 168} und zu geringem Anteil auch durch parenchymale Leberzellen und andere Zellen (Makrophagen, Astrozyten²⁰) ausgeschüttet^{120, 187}.

Über den Sauerstoff-Partialdruck besteht auch eine Beziehung zwischen Hämoglobin, dem Sauerstoffträger in den roten Blutkörperchen, und Erythropoetin. Sobald die Hämoglobinkonzentration im Blut unter 12 g/dL sinkt, steigt die Erythropoetin-Konzentration an⁵⁶. Ebenso kommt es bei einer zu niedrigen Menge funktionsfähiger roter Blutkörperchen (Anämie) zu vermehrter Ausschüttung von Erythropoetin¹⁷.

Auch bei vermindertem Blutvolumen kommt es zur Hypoxie des Gewebes. Somit ist die Erythropoetin-Konzentration abhängig vom zentralen Venendruck, wodurch die Langzeitkontrolle des Blutvolumens geregelt wird⁸⁷. Letzlich beeinflussen verschiedene Hormone, Mediatoren und anorganische Stoffe die Ausschüttung von Erythropoetin in unterschiedlicher Weise: Schilddrüsenhormone⁶⁵, Androgene¹⁶⁴, IGF (insulin like growth factor, Somatomedin)³⁷, Interleukin 6, TGF- β (Transforming Growth Factor β) und Kobalt⁷³ erhöhen den Erythropoetin-Spiegel. Interleukin 1⁶⁰, TNF- α (Tumor Nekrose Faktor)⁹⁸, β -Interferon und γ -Interferon inhibieren die Erythropoetin-Produktion^{94, 95}. Die Verminderung des freien Eisens führt zu verstärkter Erythropoetin-Produktion¹⁰³, die Erhöhung der Eisenkonzentration vermindert hingegen die Erythropoetin-Produktion^{38, 74}.

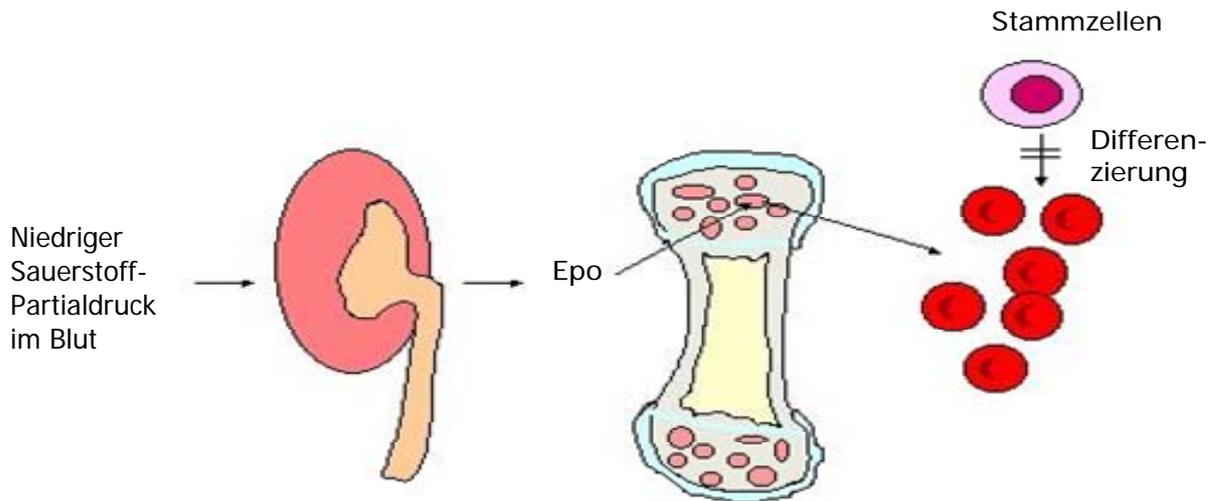


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Ausschüttung und Funktion von Erythropoetin im menschlichen Körper

1.5.3. Therapeutischer Einsatz von Erythropoetin

Aufgrund seiner physiologischen Wirkungen kann Erythropoetin bei verschiedenen Erkrankungen therapeutisch eingesetzt werden.

1.5.3.1. Chronische Niereninsuffizienz

Bei einer chronischen Niereninsuffizienz kommt es häufig zum Verlust der Erythropoetin produzierenden Zellen. Zusätzlich werden die verbliebenen Zellen durch Entzündungsvorgänge und –mediatoren (näheres dazu unter 1.5.3.2.) fehlreguliert, so dass es zu einem Abfall des Erythropoetinspiegels kommt und sich eine chronische Anämie entwickelt. Weitere Pathomechanismen tragen bei chronischer Niereninsuffizienz zur Entstehung einer Anämie bei. Durch akkumulierende toxische harnpflichtige Substanzen im Rahmen einer Urämie wird die Erythropoese supprimiert. Außerdem kommt es bei niereninsuffizienten Patienten gehäuft zu Blutverlusten bei diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen (beispielsweise bei einer Dialyse)²².

Die Anämie mindert durch Symptome wie Müdigkeit, Kälteintoleranz, mentale Verlangsamung und Impotenz die Lebensqualität und kann eine verminderte Lebenserwartung beispielsweise durch Linksherzhypertrophie verursachen¹¹⁴.

Durch eine Behandlung mit Erythropoetin kann bei einem Großteil der Patienten der Hämatokrit signifikant erhöht und eine Anämie vermindert werden⁴⁹. So wurden beispielsweise bei Diabetikern mit chronischer Niereninsuffizienz durch eine Erythropoetin-Behandlung Leistungsfähigkeit, diabetische Retinopathie¹², muskuläre³⁹, kardiale⁵³ und immunologische⁶⁴ Funktionen verbessert⁴⁹.

1.5.3.2. Chronisch entzündliche und maligne Erkrankungen

Bei Infektionen wie AIDS und chronisch entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder chronischen Darmerkrankungen⁵⁷ sowie bei Neoplasien¹³¹ werden vermehrt Mediatoren wie TNF- α , Interleukin-1, γ -Interferon und β -Interferon ausgeschüttet. Sie bewirken durch eine Störung des Eisenstoffwechsels eine Inhibierung der Erythropoetin-Sekretion und durch die direkte Blockierung der Erythropoese eine Anämie⁹⁰. Es entwickelt sich eine hypoblastische Anämie mit Müdigkeit, Kopfschmerz, Atemnot und depressiven Symptomen, die körperliche Leistungsfähigkeit und Lebensqualität drastisch verschlechtern. Klinische Studien haben gezeigt, dass regelmäßige Erythropoetin-Gaben die Anämie korrigieren und diese Symptome lindern können^{63, 107}.

1.5.3.3. Maligne Infiltration des Knochenmarks

Nicht nur durch verschiedene Mediatoren, sondern auch durch eine Infiltration des Knochenmarks mit malignen Tumorzellen – besonders bei bösartigen Bluterkrankungen – kommt es häufig zu einer Anämie. Auch hier hat sich gezeigt, dass rekombinantes Erythropoetin die Anämie lindern kann¹²².

Besonders erfolgreich wirkte rekombinantes Erythropoetin in verschiedenen Studien beim Multiplen Myelom¹³⁴, in denen die meisten der behandelten Patienten auf eine Behandlung ansprachen. Ein mäßiges Ansprechen wurde beim Non-Hodgkin-Lymphom¹³⁹ beobachtet. Patienten mit einem Myelodysplastischen Syndrom⁶⁶ sprachen eher schlechter an.

1.5.3.4. Chemotherapie

Bei einer Chemotherapie kommt es durch Myelosuppression, aber auch durch die direkte Zerstörung renaler Erythropoetin produzierender Zellen häufig zu einer Anämie¹³⁷, die in der Mehrzahl der Fälle auf Erythropoetin-Behandlung anspricht⁸⁶. Auch der prophylaktische Einsatz von Erythropoetin kann hier indiziert sein⁴⁰.

1.5.3.5. Hämoglobinopathien

Hämoglobinopathien wie die β -Thalassämie lassen sich ebenfalls mit Erythropoetin behandeln¹⁵. Die β -Thalassämie ist eine hereditäre Erkrankung mit einer fehlerhaften Synthese der β -Globin-Kette des Hämoglobins A ($\alpha_2\beta_2$). Es kommt zu einer Hämolyse mit Eisenüberladung und Splenomegalie und einer mikrozytären Anämie. Die Behandlung mit Erythropoetin ist eine mögliche Strategie, um eine vermehrte Bildung des fetalen Hämoglobins F($\alpha_2\gamma_2$) zu stimulieren und so die Anämie zu verringern¹¹³.

1.5.3.6. Protektion von Nervenzellen

Kürzlich wurde herausgefunden, dass Erythropoetin die Blut-Hirnschranke passieren kann. Durch Rezeptoren auf den Kapillaren der Hirnperipherie sorgt Erythropoetin für eine Protektion des Gehirns vor ischämischem und inflammatorischem Stress durch eine bisher ungeklärte Modulation von Zelltod und/oder Entzündungsreaktion²⁰. Diese Mechanismen könnten das therapeutische Einsatzspektrum von Erythropoetin möglicherweise erweitern.

Daneben wurde festgestellt, dass Erythropoetin die Photorezeptoren des Auges vor verschiedenen Formen der Degeneration schützen kann¹⁵².

1.5.3.7. Derzeit etablierter klinischer Einsatz von Erythropoetin

Derzeit sind drei Formen von Erythropoetin auf dem Markt: Darbepoetin alfa, Epoetin alfa und Epoetin beta. Sie unterscheiden sich in Halbwertszeit, Dosierung, Anwendungsform und Nebenwirkungen. Durch eine veränderte Molekülstruktur besitzt Darbepoetin alfa eine besonders lange Halbwertszeit. Tabelle 4 gibt einen

Überblick über die Unterschiede der verschiedenen Erythropoetin-Formen. Auf die Nebenwirkungen wird in Kapitel 4.3.3.2 ausführlicher eingegangen.

	Initialdosis bei chronischer Niereninsuffizienz	Spezielle unerwünschte Wirkungen	Kontraindikationen
Darbepoetin alfa	0,45 µg/kg, 1/Woche, Erhaltungsdosis nach Hb	Kopfschmerz, Hypertonie, Shuntthrombose, Schmerzen der Einstichstelle	Bek. Überempfindlichkeit gegen Inhaltsstoffe, schwer kontrollierbare Hypertonie, Stillzeit, Gravidität (fehlende Daten)
Epoetin alfa	50 IU/kg (+/-25 IU/kg), 3/Woche, Ziel: Hb 10-12 g/dl	Hypertonie, Hautreaktion, Schwindel, Kopfschmerz, grippeähnliche Symptome, epileptische Anfälle	Bek. Überempfindlichkeit gegen Inhaltsstoffe, schwer kontrollierbare Hypertonie, Kinder unter 2 Jahren
Epoetin beta	20 IU/kg (40 IU/kg, wenn i.v.), 3/Woche, Erhaltungsdosis 50% der Initialdosis	s. Epoetin alfa	

Tabelle 4: Verschiedene im Handel erhältliche Arten von Erythropoetin, ihre Halbwertszeit, Dosierung bei Niereninsuffizienz, unerwünschten Wirkungen und Kontraindikationen
IU: International Units¹⁵⁹

Die Behandlung einer Anämie bei chronischer Niereninsuffizienz mit Darbepoetin alfa besteht beispielsweise aus zwei Phasen, der Korrekturphase und der Erhaltungsphase. Die Anfangsdosis liegt bei 0,45 µg/kg Körpergewicht als einzelne Injektion einmal pro Woche unter Kontrolle der Hämoglobinkonzentration. Als Hämoglobin-Sollwert wird 11 g/dl im Blut angestrebt. Es hat sich gezeigt, dass das individuelle Ansprechen der Patienten unterschiedlich sein kann. Daher wird die Dosis bei zu hohem Hämoglobin gesenkt und bei zu niedrigem Hämoglobin alle vier Wochen um etwa 25 % erhöht. Bei Tumorpatienten mit Anämie werden erheblich höhere Dosen eingesetzt.

Eine Langzeittherapie mit rekombinantem Erythropoetin ist sowohl sehr teuer, als auch für den Patienten unangenehm, da Erythropoetin meist (außer bei Dialysepatienten) subkutan injiziert werden muss. Es bietet sich im Falle eines

lebenslangen medikamentösen Erythropoetin-Bedarfs die Durchführung einer Gentherapie an. Dabei könnten, wie in dieser Arbeit untersucht, Hautzellen des Patienten genetisch modifiziert werden, die dann das benötigte Hormon produzieren und in den Blutkreislauf abgeben (siehe 4.3.).

1.6. Interessante Forschungsergebnisse auf dem Gebiet der Erythropoetin-Gentherapie

Zurzeit werden auf dem Gebiet der Gentherapie laufend neue Erkenntnisse gesammelt. Neben der in dieser Arbeit verwendeten Methoden finden sich auch weitere zukunftsweisende Wege, durch Gentherapie den Erythropoetin-Spiegel im Blut eines Patienten zu erhöhen.

Orive et al. arbeiteten an einem Prinzip, bei dem eine Zellkultur wie in dieser Arbeit in vitro genetisch verändert wird. Sie stellten transgene Mauszellen her, die Erythropoetin produzieren und schlossen diese in polymere Mikrokapseln (0,5 ml) ein. Diese wurden in das Peritoneum und ins subkutane Gewebe von Mäusen implantiert, wo sie für mehr als 100 Tage Erythropoetin produzierten (15 490 IU/ 24 h), was sich konstant auf den Hämatokrit auswirkte¹³⁸. Es wurde keine Immunreaktion gegen die Mikrokapseln festgestellt, die in der Peritonealflüssigkeit meist frei umher schwammen und subkutan reich vaskularisierte Strukturen bildeten. Beide Orte scheinen sich gut für die Implantation von Mikrokapseln zu eignen. Yanay et al. wiesen an Ratten nach, dass auch dann keine immunologische Abwehrreaktion gegen Mikrokapseln gebildet wird, wenn körperfremde Zellen in diesen eingeschlossen sind. Vorteil dieser Methode ist es, dass ein direkter Kontakt der transduzierten Zellen mit den Körperzellen des Patienten verhindert wird¹⁹². So ist es möglich, eine standardisierte und sichere, langlebige Zelllinie zu entwickeln, die für eine Vielzahl von Patienten verwendet werden kann¹⁵⁴.

Eine weitere Möglichkeit der Gentherapie ist die direkte Injektion von Erythropoetin-Plasmid in den Muskel eines zu behandelnden Patienten. Dies ist einfacher und preiswerter als die beschriebenen In-vitro-Methoden. Im Tierversuch wurde das Plasmid nach Injektion allerdings meist nur ineffizient von den Muskelzellen aufgenommen, so dass nur niedrige Spiegel von Erythropoetin erreicht wurden¹⁹⁰. Zur Verbesserung des Ergebnisses entwickelte man die Methode der

anschließenden Elektroporation des Muskels. Rizzulo et al. behandelten Muskelzellen von Mäusen nach Injektion von 1 µg Erythropoetin-Plasmid durch hochfrequente elektrische Impulse niedriger Spannung. Anschließend stieg der Erythropoetin-Spiegel um das 100fache (bis zu 104 mU/ml) und ein anhaltend hoher Hämatokrit (75-85%) wurde beobachtet (bis zu 170 Tage lang)¹⁵⁷. Attka et al. verwendeten die Methode der Elektroporation von Erythropoetin-Plasmid bei niereninsuffizienten Ratten. Der Hämatokrit dieser Tiere konnte so von etwa 32,6% auf 64,5% angehoben und sieben Wochen auf diesem Spiegel gehalten werden⁵. Um die Effizienz dieses Verfahrens besonders bei Primaten zu erhöhen, stellten Fattori et al. eine modifizierte Form des Erythropoetin-Gens her. Mit diesem wurden signifikant höhere Erythropoetin-Spiegel beobachtet als mit der Wild-Typ-Version⁵².

Trotz aller Risiken bei der Verwendung viraler Vektoren direkt am Patienten (siehe 4.3.3.), sind virale In-vivo-Methoden besonders effektiv und einfach durchzuführen, weshalb sie auch weiterhin im Fokus aktueller Forschung stehen.

Eine besonders lange, kontrollierte Expression von transgenem Erythropoetin durch Primaten gelangen Rivera et al.. Sie injizierten in den Muskel dieser Tiere zwei vom Adeno-assoziierten-Virus (AAV) hergeleitete Vektoren, von denen einer das Erythropoetin-Gen mit Promotor enthielt und der zweite Transkriptionfaktoren zur Regulation exprimiert (siehe 4.3.3.3., Abb. 35). Sechs Jahre lang wurde Erythropoetin (50 -150 mIU/ml) durch Regulation mit Rapamycin (26 mal 0,1 – 0,02 mg/kg) oder ein Analogon von den Muskelzellen der Primaten relativ konstant ausgeschüttet. Bei Weglassen von Rapamycin sank die Erythropoetin-Konzentration wieder auf ursprüngliche Werte ab. Diese Methode wurde optimiert, indem die Transfer-RNS minimiert und in einen gemeinsamen AAV-Vektor verpackt wurde¹⁵⁶.

Auch weitere Forschungsgruppen verwendeten Vektoren aus Adeno-assoziierten Viren zur Transduktion. Kessler et al. verglichen die Effizienz von AAV-Vektoren und reinen Plasmiden bei einer intramuskulären Injektion. Etwa tausendmal mehr Plasmide ($2,8 \times 10^{13}$) als virale Vektoren ($1-3 \times 10^{10}$) mussten injiziert werden, um eine etwa gleich hohe Erythropoetin-Konzentration zu erhalten (etwa 8 mIU/ml). Außerdem sank nach Injektion des Plasmids das sezernierte Erythropoetin innerhalb von 41 Tagen drastisch ab ($\leq 2,5$ mU/ml). Nach Transduktion durch den viralen Vektor dagegen stieg das Erythropoetin mindestens bis zum 83. Tag an (etwa 65

mIU/ml). Bei Einsatz höherer Konzentration von Vektoren (3×10^{11}) wurde bereits nach 20 Tagen eine Erythropoetin-Konzentration von 445 mIU/ml erreicht, die bis zum 83. Tag auf 723 mIU/ml anstieg.

Auch Lentiviren werden heute bevorzugt zum Gentransfer verwendet. Sie integrieren übermittelte Gene in die DNS einer befallenen Zelle, auch wenn sich diese nicht in der Teilungsphase befindet (siehe 1.3.2.1.). Siprashvili et al. injizierten lentivirale Vektoren in menschliche Haut, die vorher Nacktmäusen transplantiert worden war. Neben dem Erythropoetin-Plasmid transportierten diese einen Promotor, der auf Glukokortikoide reagiert und nur in Anwesenheit dieser die Transkription des Erythropoetin-Gens zulässt. Eine Woche nach der Vektor-Injektion wurde Dexamethason bzw. Clobetason entweder topisch oder systemisch appliziert. Innerhalb von vier Wochen stieg der Hämatokrit über 60% und die Erythropoetin-Konzentration auf 24 mIU/ml und sank anschließend wieder ab. Dabei machte es keinen Unterschied, ob das Steroid topisch oder systemisch angewendet worden war. Auch nach einer weiteren Behandlung mit Glukokortikoiden stiegen Hämatokrit und Erythropoetin erneut auf ähnliche Werte an¹⁶⁶. Baek et al. wiesen nach, dass bei oben beschriebener Injektion von Lentiviren in die Haut sowohl Fibroblasten als auch Endothelzellen, Keratinozyten und Makrophagen transduziert werden. Die Erythropoetin-Sekretion durch lentiviral transduzierte Hautzellen ohne regulierenden Promotor blieb nach zweiwöchigem Anstieg über sechs Monate konstant hoch. Nach Entfernung der transgenen Haut sanken sowohl Erythropoetin als auch Hämatokrit auf ursprüngliche Konzentrationen ab⁸.

Die Ergebnisse solcher experimenteller Versuche sind vielversprechend; dennoch muss sich der Erfolg in weiteren Studien bewähren, um abschätzen zu können, inwieweit die Methoden realistische Behandlungsmöglichkeiten für Patienten darstellen.

1.7. Ziel dieser Arbeit

Die Haut ist ein attraktives Organ für gentherapeutische Verfahren. So ist auch ihre Verwendung als eine Art „metabolische Fabrik“ zur systemischen Produktion von Erythropoetin nach entsprechender genetischer Modifikation denkbar. Die häufigsten Zellarten der Haut, Keratinozyten und Fibroblasten, zeigen eine hohe sekretorische Aktivität. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, in welchem Maße die jeweiligen Zellen nach retroviraler In-vitro-Transduktion das Erythropoetin-Gen aufnehmen und anschließend exprimieren können.

Um möglichst genaue Rückschlüsse auf eine mögliche klinische In-vivo-Anwendung ziehen zu können, wurde dies nicht nur in der Zellkultur untersucht, sondern auch an einem Hautmodell, das hierfür entwickelt wurde.

Der Vergleich beider Zellarten durch die Bestimmung der jeweiligen Sekretionsleistung des Transgens Erythropoetin ist ein weiterer Schritt in der Erforschung gentherapeutischer Verfahren. Schon heute denkbar ist eine mögliche spätere klinische Anwendung der In-vitro-Transduktion von Hautzellen, der folgenden Herstellung von Hautkonstrukten und deren anschließender Transplantation auf Patienten als Therapie einer Erkrankung.

2. Material und Methoden

(siehe auch Kapitel 7 zu sämtlichen verwendeten Materialien einschließlich Firmenangabe und Sitz des Unternehmens)

2.1. Zellkultur

Die Zellkulturen wurden in Zellkulturflaschen (BD) bei 37 °C und 5 % CO₂ angezchtet. Ampho-239-Zellen und Fibroblasten wurden mit Fibroblasten-Medium (Fb-Medium, Zusammensetzung siehe 7.) und Keratinozyten mit Keratinozyten-Medium (Kc-Medium, Zusammensetzung siehe 7.) versorgt. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen in einer Schicht (als „Monolayer“) am Boden der Kulturflaschen wuchsen. Bevor die Zelldichte zu groß wurde, wurden sie separiert. Bei Keratinozyten geschah dies bei einer Dichte von etwa 70%, bei amphotropen 293-Zellen bei einer Dichte von 80% und bei Fibroblasten bei einer Dichte von 100%. Zum Lösen der Zellen wurde 2 ml Trypsin-EDTA (Gibco) verwendet. Anschließend wurden sie bei 4°C und 1500 U/min zentrifugiert, der Überstand abgegossen und ein Teil der Zellen mit dem entsprechenden Medium resuspendiert und neu ausgesät. Da Keratinozyten mit der Zeit differenzieren und aufhören, sich zu vermehren⁹², wurden diese nach der sechsten Separation nicht mehr verwendet.

Zum Auszählen von Zellen wurde eine Neubauer-Zellkammer verwendet.

2.2. Herstellung retroviraler Vektorpartikel zum Transfer des Erythropoetin-Gens

2.2.1. Vermehrung des Erythropoetin-Gens in Bakterien (Transformation)

Es wurde ein Plasmid verwendet, das das humane Erythropoetin-Gen in einem retroviralen Transfervektor integriert hat (siehe Abb. 10)¹⁴².

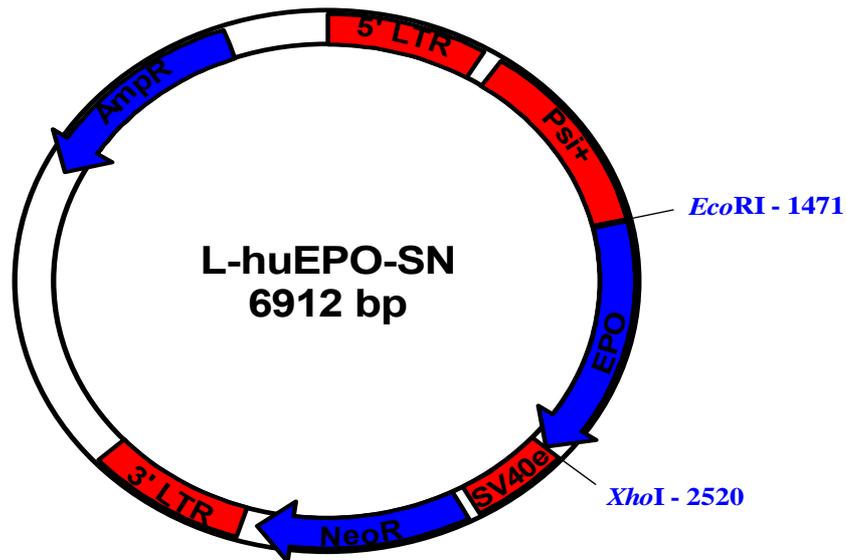


Abbildung 10: Schematische Darstellung des verwendeten Erythropoetin-Plasmids L-huEPO-SN 6912 bp: 5'- und 3'-LTR: LTR des Moloney Murine Leukemia Virus, Psi+: Verpackungssignal (Psi+) des Moloney Murine Leukemia Virus, SV40e: Early SV40 Promoter (P_{SV40e}) des Simian Virus 40, NeoR: Neomycin-Resistenz-Gen. Das Resistenz-Gen wurde eingebaut, um erfolgreich transfizierte Verpackungszellen selektiv vermehren zu können. AmpR: Ampizillin-Resistenz-Gen. Es ist standardmäßig in verwendeten Plasmiden enthalten, um bei der Transformation Bakterien zu selektieren, die das Plasmid aufgenommen haben. EcoRI-147, XhoI-2520 sind spezifische Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoRI und XhoI

Zur Vervielfältigung des Erythropoetin-Plasmids wurden Bakterien verwendet, die Plasmide aufnehmen, vervielfältigen und an ihre Nachkommen weitergeben. Die Übertragung von genetischem Material in Bakterien ohne Hilfe von Viren nennt man Transformation.

100 μ l kompetente Bakterien (Invitrogen) und 4 μ l Erythropoetin-Plasmid wurden auf Eis aufgetaut, vorsichtig vermischt und 30 Minuten lang dort belassen. Die Suspension wurde für 45 Sekunden auf 42°C erhitzt, in zwei Minuten auf Eis abgekühlt und sodann 900 μ l SOC-Medium (Invitrogen) hinzugefügt. Die Mischung wurde 60 Minuten lang bei 37°C in einem Schüttler geschüttelt. Anschließend wurden jeweils 50-100 μ l der Bakteriensuspension auf einer Ampizillin-enthaltenden Agar-Platte (Zusammensetzung siehe 7.) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch das Ampicillin wurden Bakterien selektiert, die das Plasmid mit dem entsprechenden Resistenz-Gen aufgenommen hatten.

Am Tag nach einer solchen Transformation finden sich auf der Agar-Platte Bakterienklone, die das Erythropoetin-Plasmid enthalten. Um das Wachstumspotential der

Klone abschätzen zu können, wurden 52 von ihnen auf einer Agar-Platte in verschiedene beschriftete Bezirke ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 8 gut entwickelte Klone vermehrt. Dazu wurden sie mit der Pipettenspitze in ein Glasröhrchen (Nunc) gegeben, mit jeweils 5 ml LB-Medium und 5 µl Ampicillin vermischt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

2.2.2. Isolierung einer kleinen Menge Plasmid-DNS (Miniprep)

Das Erythropoetin-Plasmid wurde aus den transformierten Bakterien mit Hilfe des „Miniprep-Kit“ von Qiagen isoliert. Jeweils 2 ml Bakteriengemisch wurde während mehrerer Pufferschritte und Zentrifugationen unter alkalischen Bedingungen lysiert und sodann stark salzhaltige Lösung zugegeben. Die gewonnene Plasmid-Lösung wurde in die im Kit enthaltenen QIA-Prep-Säulen gefüllt, die mit einer Silizium-Membran ausgestattet sind, an der Plasmid-DNS in salzigem Milieu selektiv adsorbiert. Die Säulen wurden mehrmals zentrifugiert und mit verschiedenen Puffern gewaschen, um Protein- und RNS-Reste zu entfernen. Auch die genomische Bakterien-DNS wurde mitsamt ihrer integrierten Proteine denaturiert und herausgelöst. Anschließend wurde das Erythropoetin-Plasmid in weniger salzhaltigem Milieu durch einen Puffer und erneute Zentrifugation herausgelöst.

Durch eine fotometrische Messung bei 260 nm wurde die optische Dichte jeder Probe bestimmt. Da eine Einheit optischer Dichte bei 260 nm einem DNS-Gehalt von 50 µg/ml entspricht, konnte aus dem fotometrischen Wert jeder Probe die DNS-Menge berechnet werden.

2.2.3 Schneiden und Auftrennen von Plasmid-Stücken (Restriktionsverdau und Elektrophorese)

Nach der Plasmid-Isolierung wurde untersucht, ob in den hergestellten Proben das gewünschte Erythropoetin-Plasmid auch wirklich vorhanden war. Dazu wurde das Plasmid mit sogenannten Restriktionsenzymen an bestimmten Basenfolgen geschnitten und die spezifische Länge der entstandenen DNS-Stücke durch eine Elektrophorese nachgewiesen. Bei einer Elektrophorese werden DNS-Partikel nach unterschiedlicher Ladung und Größe entsprechend ihrer Wandergeschwindigkeit im elektrischen Feld getrennt.

Um das ringförmige Erythropoetin-Plasmid in 2 lineare Teile zu zerschneiden, wurden die Restriktionsenzyme Xho 1 (Fermentas) und Eco R1 (Fermentas) verwendet. Diese schneiden DNS an einer bestimmten, durch eine spezifische Basensequenz definierten Stelle (siehe Abb.10). Da im Erythropoetin-Plasmid die entsprechenden Basensequenzen für beide Enzyme nur je einmal vorkommen, wird das Plasmid in genau zwei Teilstücke aufgetrennt. Die Längen der gewonnenen Stücke sind für das so zerteilte Erythropoetin-Plasmid spezifisch.

Das Erythropoetin-Plasmid besitzt insgesamt 6912 Basenpaare. Nach dem Zerschneiden durch Eco R1 und Xho1 entstehen Stücke von 5863 und 1049 Basenpaaren. Zum Zerschneiden des Erythropoetin-Plasmids wurde eine Mischung aus 11 µl destilliertem Wasser, 5 µl der Plasmid-DNS, jeweils 1 µl beider Enzyme (Xho1 und Eco R1) und 2 µl des dazugehörigen Puffers 4 Stunden lang bei 37°C inkubiert.

Den Proben wurden je 4 µl sogenannter Loading Dye (Fermentas) zugegeben. Dies ist eine Pufferlösung, die ein unkontrolliertes Fortschwimmen der Proben verhindert, kombiniert mit einem Farbstoff, der anzeigt, wie weit die Wanderung im elektrischen Feld fortgeschritten ist.

Zur Elektrophorese wurde ein 1%iges Agarosegel aus folgenden Komponenten hergestellt: 100 ml TAE Puffer (Herstellung siehe 7.) und 1 g Agarosepulver (BMA) wurden bis zur Verflüssigung des Pulvers aufgekocht und in gewünschter Form wieder erkaltet. Anschließend wurden jeweils 20 µl jeder Probe in eine Vertiefung des Agarosegels gefüllt. Als Matrixvorlage wurden zusätzlich 10 µl einer DNS-Leiter (Fermentas) aufgetragen. Durch die Matrixvorlage kann abgeschätzt werden, wo Fragmente bestimmter Länge zu suchen sind. Die Elektrophoresekammer wurde mit TAE-Puffer aufgefüllt, der mit etwa 20 µl Ethidiumbromid (Sigma) versetzt war. Ethidiumbromid wurde verwendet, um die DNS der Proben in UV-Bestrahlung sichtbar zu machen. Ethidiumbromid baut sich in den Doppelstrang der DNS ein und fluoresziert im UV-Licht.

Es wurden 80 Volt Spannung angelegt. Anschließend bewegte sich die negativ geladene DNS in den Proben in Richtung Anode. Kürzere Fragmente wandern dabei schneller als lange Fragmente. Durch einen UV-Transluminator wurden die verschiedenen lokalisierten DNS-Fragmente sichtbar gemacht und fotografiert (siehe Abb. 19).

2.2.4. Isolierung einer größeren Menge Plasmid-DNS (Maxiprep)

Um einen größeren Ertrag an Erythropoetin-Plasmid aus transformierten Bakterien zu erhalten, wurde ein „Maxiprep-Kit“ (Qiagen) verwendet. Über Nacht wurden 400 ml transformierter Bakterien in 500 ml ampizillinhaltigem LB-Medium vermehrt. Aus dieser Bakteriensuspension wurden die Erythropoetin-Plasmide isoliert. Nach lysierenden Puffer- und Zentrifugationsschritten wurde die wenig salzige, plasmidhaltige Suspension in sogenannte Qiagen-Spitzen gefüllt, die mit einem Anionen-Austausch-Material beschichtet sind. Durch verschiedene Puffer wurden Proteine und andere unerwünschte Substanzen herausgewaschen, wobei die negativ geladene Plasmid-DNS an der Austauschsubstanz hängen blieb. Sie wurde anschließend durch eine stark salzhaltige Lösung herausgewaschen, entsalzt und in Tris-Cl (Sigma) resuspendiert. Die Menge der DNS wurde photometrisch bestimmt.

2.2.5. Transfer des Erythropoetin-Plasmids in amphotrope 293-Zellen (Transfektion)

Amphotrope 293-Zellen (Clontech) stammen von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-293-Zellen) ab und sind durch Einbringen entsprechender viraler Gene zu Verpackungszellen gestaltet worden, die virale Partikel (Vektorhüllen) produzieren und ausscheiden (siehe 1.3.2.1.3.). Diese stammen vom Moloney Murine Leukemia Virus. Die produzierten Vektorhüllen sind in der Lage, menschliche Zellen zu befallen, weshalb die 293-Zellen auch als amphotrop bezeichnet werden.

Eine Transfektion ist die Übertragung genetischen Materials in eine Zelle ohne Hilfe viraler Vektoren. Man bedient sich dazu positiv geladener Stoffe wie Kalzium-Phosphat, die die Barriere zwischen negativ geladener Zellmembran und DNS zu überwinden helfen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Transfektion mit den Materialien und nach dem Protokoll von Gibco (Transfection System) durchgeführt. 24 Stunden vor der Transfektion wurden eine Million amphotrope 293-Zellen in eine 10 ml Zellkulturschale ausgesät; 3 Stunden vorher wurde das Medium erneuert. Zur Transfektion wurde eine DNS-Kalzium-Suspension (Zusammensetzung siehe 7.) hergestellt und durch Einbringen von Luftblasen schonend mit einer phosphathaltigen Lösung (Zusammensetzung siehe 7.) gemischt. So wurden DNS-

Kalzium-Phosphat-Komplexe hergestellt. 1 ml der Lösung wurde in jede Zellkulturschale mit 293-Zellen gemischt und 24 Stunden inkubiert.

Amphotrope 293-Zellen sind so beschaffen, dass sich ein kleiner Teil der transfizierten Plasmide stabil in die chromosomale DNS integriert und bei einer Vermehrung an die Tochterzellen weitergegeben wird. Da sich in dem verwendeten Erythropoetin-Plasmid auch ein Gen befindet, das Resistenz gegen Neomycin verleiht, konnten amphotrope 293-Zellen, die das Plasmid stabil aufgenommen hatten, mit G418 (PAA), einem Neomycin-Derivat selektiert werden.

Die derart angereicherten amphotropen 293-Zellen stellten retrovirale Vektorhüllen her, in die das Erythropoetin-Gen verpackt aus den Zellen in den Kulturüberstand ausgeschleust wurde. Es entstanden sogenannte Erythropoetin-Vektoren.

2.3. Transfer des Erythropoetin-Gens in Keratinozyten und Fibroblasten mit Hilfe eines retroviralen Erythropoetin-Vektors (Transduktion)

Eine Transduktion ist die Übertragung genetischen Materials durch einen replikationsunfähigen Virus (Vektor) in eine Zelle. Retroviren sind dabei in der Lage, das genetische Material in die genomische DNS der Zielzelle zu integrieren (siehe 1.3.2.1.) Im Rahmen dieser Arbeit transfizierte amphotrope 293-Zellen produzieren retrovirale Vektoren, die das Erythropoetin-Gen beinhalten, und sezernieren diese in das umgebende Kulturmedium. Die Halbwertszeit dieser Vektoren beträgt etwa 4,5 +/- 1 Stunden⁸⁸. Für eine Transduktion wurde deshalb jede 293-Zellkultur bei einer Zelldichte um 80% mit 5 ml Fb-Medium 8 Stunden lang inkubiert. Anschließend wurde das Medium direkt verwendet oder bei -80°C eingefroren und bei Bedarf im Wasserbad wieder aufgetaut.

$2-4 \times 10^5$ Fibroblasten oder Keratinozyten wurden 16-18 Stunden vor jeder Transduktion in eine Zellkulturschale (10 cm Durchmesser, Peske) ausgesät. Zur Transduktion wurden 5 ml des Vektor enthaltenden Mediums durch einen 0,45 µm Filter gegossen. Der Filter verhindert die Übertragung von amphotropen 293-Zellen, die möglicherweise beim Ernten der Vektorpartikel durch Abpipettieren des Zellkulturüberstandes mit aufgenommen wurden. Anschließend wurde Polybrene (Sigma) zu einer Konzentration von 8 µg/ml beigemischt. Polybrene unterstützt als kationische Substanz den Kontakt zwischen Vektor und anionischer Zellmembran.

Das Vektor-Polybrene-Gemisch wurde dann an aufeinander folgenden Tagen für je 4 Stunden auf die Keratinozyten und die Fibroblasten gegeben⁶⁷ (siehe Abb. 11).

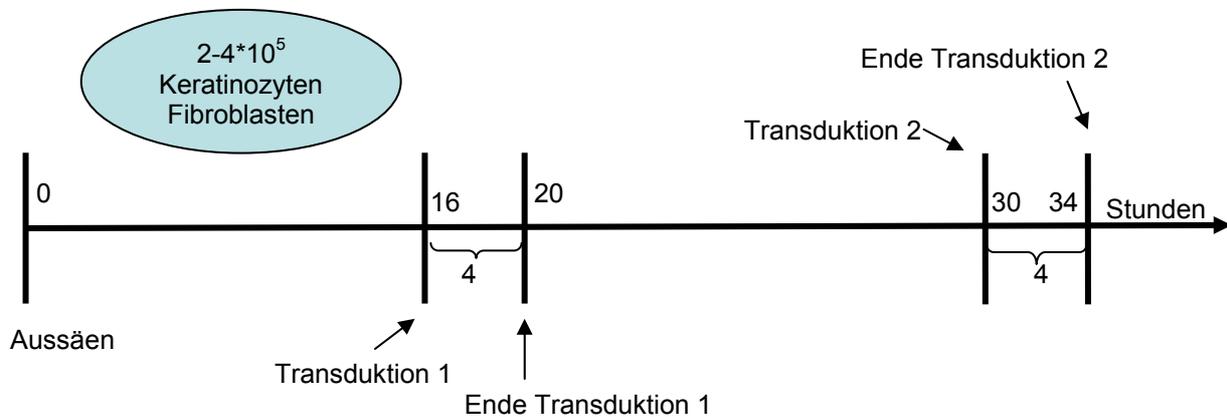


Abbildung 11: Zeitverlauf bei der Transduktion von Fibroblasten und Keratinozyten in Stunden

2.4. Bestimmung der Konzentration von Erythropoetin-Vektoren im Überstand der Verpackungszellen (Vektor-Titer)

Zur Beurteilung der Effizienz einer retroviralen Verpackungszelllinie wird üblicherweise der Anteil sezernierter funktionstüchtiger viraler Vektorpartikel im Medium bestimmt. Der retrovirale Titer bezeichnet die Anzahl viraler Partikel pro zu transduzierender Zielzelle.

Daher wurden humane Fibroblasten (wie unter 2.3. beschrieben) mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen des Zellkulturüberstandes transfizierter Verpackungszellen inkubiert (1:10, 1:100, 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶). Da sich im verwendeten Erythropoetin-Plasmid (L-hu EPO-SN) neben dem Erythropoetin-Gen auch das Gen befindet, das Resistenz gegen Neomycin verleiht (siehe Abb. 10), ließen sich erfolgreich transduzierte Fibroblasten mit dem Neomycin-Derivat G418 (PAA) selektiv anreichern (innerhalb von 8 Tagen). Die Anzahl selektierter Kolonien lässt auf die Menge funktionsfähiger Erythropoetin-Vektoren im Überstand der Verpackungszellen schließen.

2.5. Überprüfung auf replikationskompetente Retroviren

Um nachzuweisen, dass die retroviralen Verpackungszellen keine replikationsfähigen Retroviren produzieren, wurde folgender Versuch durchgeführt: Von transduzierten Keratinozyten und Fibroblasten wurde der Überstand abgenommen, filtriert und auf primäre humane Fibroblasten aufgetragen (siehe Abb. 12). Bei Vorhandensein replikationsfähiger Retroviren vervielfältigen sich diese in den infizierten Keratinozyten und Fibroblasten und werden von ihnen ins Kulturmedium sezerniert. Mit diesem Medium inkubierte Zellkulturen werden ebenfalls infiziert und produzieren Erythropoetin, das durch ELISA (siehe Kapitel 2.7.) nachweisbar ist.

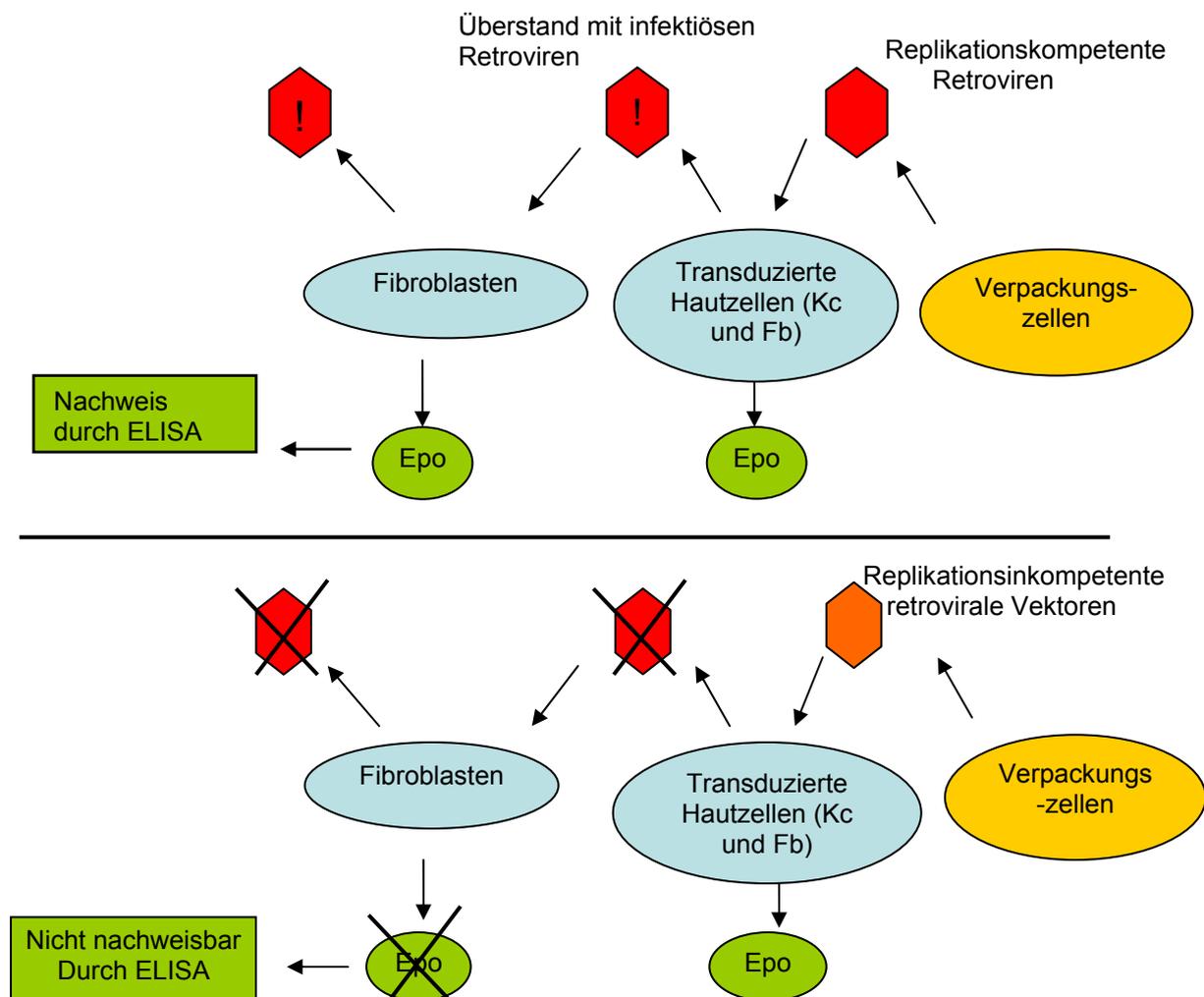


Abbildung 12: Schematische Darstellung zum Nachweis, dass hergestellte Verpackungszellen keine replikationskompetenten Retroviren produzieren

2.6. Herstellung von Hautkonstrukten

Um die Eigenschaften transduzierter Keratinozyten und Fibroblasten in menschlicher Haut zu untersuchen, wurden aus beiden Zellarten In-vitro-Hautkonstrukte hergestellt, die der menschlichen Haut vom Aufbau und der Struktur weitestgehend identisch sein sollten.

Die Hautkonstrukte wurden in Einsätze (Nunc) kultiviert, die in die Vertiefungen von 6-well-Platten (Organogenesis) eingelassen waren (siehe Abb. 13). Die Einsätze besitzen auf ihrer Unterseite eine 0,4 µm Polykarbonat-Membran, durch die das darunter liegende Medium diffundieren kann.

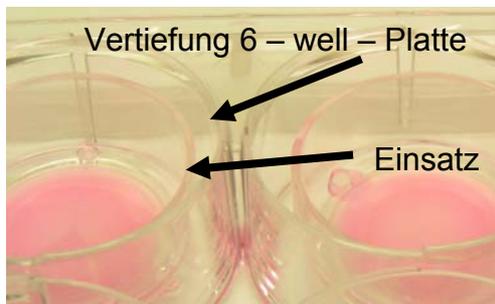


Abbildung 13: Zwei Hautkonstrukte in Einsätzen, die in eine 6-well-Platte eingebracht sind

Die Konstrukte entstanden in 3 Phasen: der Kollagen-Fibroblasten-Phase, der Keratinozyten-Phase und der Luftexpositions-Phase.

2.6.1. Kollagen-Fibroblasten-Phase

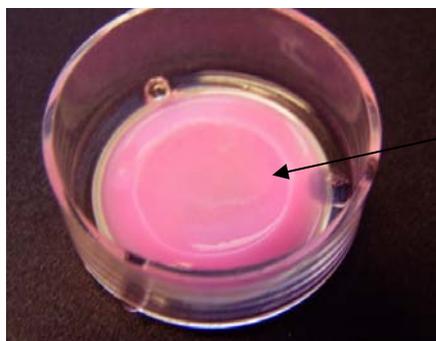
Zuerst wurde 1 ml azelluläre Kollagenmatrix in die Einsätze gegossen. Nachdem diese ausgehärtet war, wurden 3 ml einer Fibroblasten-Kollagenmischung hergestellt und darüber geschichtet. Die einzelnen Schritte wurden wie folgt durchgeführt:

Das Kollagen aus Rattenschwänzen (BD) wurde mit ein-normaler Essigsäure auf die Konzentration von 3 mg/ml verdünnt. Von der azellulären Schicht wurde pro Einsatz 1 ml hergestellt. Dazu wurden 8 Teile Kollagen (BD) mit 1 Teil DMEM (10x) (Biochrom) vermischt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von ein-molarem NaOH (Sigma) auf etwa 8,0 erhöht, was an einem Farbumschlag des Gemisches von gelb nach rosa erkennbar war. Anschließend wurde 1 Teil fötales Kälberserum (Biochrom)

hinzugefügt. Zum Mischen wurde ein Glasstab verwendet. Mit einer Pipette wurde die flüssige Substanz in die Einsätze gegeben und durch Schwenken gleichmäßig verteilt.

Für die zelluläre Schicht wurden 3 ml pro Einsatz hergestellt. Während die azelluläre Schicht bei Raumtemperatur erhärtete, wurden für jeden Einsatz 5×10^5 Fibroblasten ausgezählt und mit 1 Teil fötalem Kälberserum resuspendiert. 8 Teile Kollagen wurden mit 1 Teil DMEM (10x) vermischt und wie bei Herstellung der azellulären Schicht mit NaOH (Sigma) titriert. Anschließend wurden die resuspendierten Fibroblasten zugegeben und das Gemisch auf die Einsätze mit der azellulären Schicht pipettiert. Zum Aushärten wurde das Konstrukt für etwa eine Stunde im Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ belassen, bevor im und unter dem Einsatz Hautkonstrukt-Medium (siehe 7.) eingefüllt wurde. Das Medium wurde durchgehend alle zwei Tage gewechselt.

Nach einigen Tagen in Kultur kontrahieren sich die Konstrukte und sie bildeten in ihrer Mitte eine Vertiefung (siehe Abb. 14).



Vertiefung

Abbildung 14:
Form eines Hautkonstrukts
gegen Ende der Fibroblasten-
Phase

2.6.2. Keratinozyten-Phase

Nach vier Tagen wurde das Medium entfernt und eine Millionen Keratinozyten in 30 µl Hautkonstrukt-Medium (Hk-Medium, Zusammensetzung siehe 7.) in die zentrale Vertiefung des Konstrukts pipettiert. Es wurde 15 min gewartet, bis die Keratinozyten sich auf die Kollagenschicht gesetzt hatten, dann wurde das Hautkonstrukt für eine Stunde in den Inkubator gestellt, um eine Keratinozyten-Adhärenz an das Kollagen zu ermöglichen. Anschließend wurde Hk-Medium mit Ascorbinsäure (50 µg/ml) in und unter jeden Einsatz gegeben.

2.6.3. Luftexpositions-Phase

Vier Tage später begann die letzte, die sogenannte Luftexpositions-Phase, in der die Keratinozyten luftexponiert wurden, um eine Differenzierung zu ermöglichen. Dazu wurden fünf Gummistopfen (Sarstedt) unter jeden Einsatz gelegt, um einen Zwischenraum zwischen Einsatz und Kulturschalenboden zu bilden. In diesen wurde so viel Medium gefüllt, dass der Boden des Einsatzes gerade von unten bedeckt war. So wurden die Hautkonstrukte von der Unterseite, durch die Kollagenschicht hindurch mit Medium versorgt, wodurch die Blutversorgung der Dermis imitiert wurde (siehe Abb. 15).

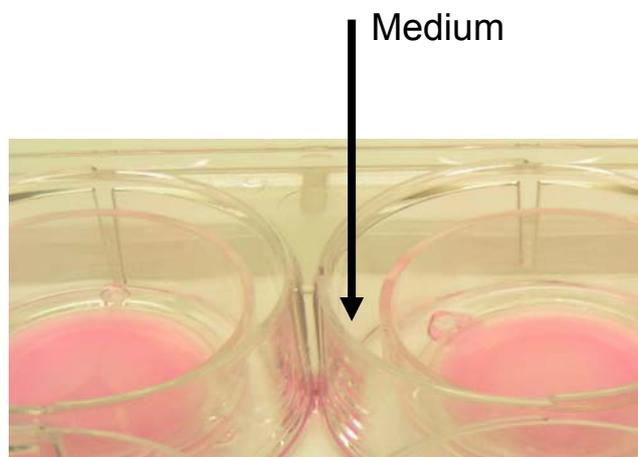


Abbildung 15: Zwei Hautkonstrukte in Einsätzen, die in eine 6-well-Platte eingebracht sind; markiert ist der Bereich in den das Medium während der Luftexpositions-Phase eingefüllt wird.

Wie in der Keratinozyten-Phase wurde dem Medium Ascorbinsäure beigemischt. Der Kalziumgehalt des Mediums wurde auf 1,4 mM angehoben. Dies führte dazu, dass die Keratinozyten differenzierten und die verschiedenen Zellschichten einer Epidermis bildeten. Die Hautkonstrukte wurden für drei Tage in Luftexposition belassen.

2.7. Bestimmung der Erythropoetin-Sekretion von Zellkulturen und Hautkonstrukten aus transduzierten Zellen

Der Überstand transduzierter Zellen (Keratinozyten und Fibroblasten in Zellkultur oder Hautkonstrukt) wurde gewonnen, um darin die Konzentration sezernierten Erythropoetins zu messen.

Zellen aus jeder Zellkultur wurden 1-2 Tage nach Transduktion in Kulturplatten mit 6 Vertiefungen (6-well-Platten, Organogenesis) gesät (100 000 Zellen pro Einsatz) und zu einer Dichte von etwa 70% herangezüchtet. 4 ml des Kultur-Mediums (Kc-Medium für Keratinozyten, Fb-Medium für Fibroblasten) wurden für vier Stunden in die jeweilige Vertiefung gegeben und anschließend auf den Gehalt an Erythropoetin untersucht. Die Zellzahl jeder Kultur wurde nach Ablösen der Zellen durch Trypsin mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Bei Hautkonstrukten wurde am dritten Tag der Luftexpositions-Phase Kulturmedium zur Bestimmung des Erythropoetin-Gehaltes gewonnen. Das Medium wurde unter die Einsätze gefüllt, um den Abtransport von Erythropoetin durchs Blut von der Dermis aus zu imitiert. Das Medium wurde dort etwa 24 Stunden belassen. Anschließend wurde es in mehreren Verdünnungsschritten um 1:100 verdünnt.

Um die Erythropoetin-Menge in den Überständen quantitativ zu bestimmen, wurde ein Enzymimmunoassay durchgeführt. Es wurde mit den Reagenzien und nach dem Protokoll von IBL gearbeitet. Dazu wurden mit Kaninchen-anti-Erythropoetin Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatten verwendet (siehe Abb. 16).



Abbildung 16: Schematische Darstellung einer mit Anti-Erythropoetin beschichteten Mikrotiterplatte

In diese wurden die Standardlösungen, Kontrollseren und Proben pipettiert, deren Erythropoetin sodann während 3-4 stündigen Schüttelns von den Antikörpern spezifisch gebunden wurde (siehe Abb. 17). Zum Schütteln wurde die Mikrotiterplatte auf einem Orbitalschüttler befestigt, der 500 Bewegungen pro Minute ausführte.

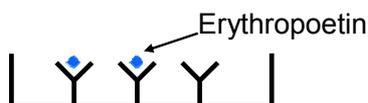


Abbildung 17: Mikrotiterplatte mit Anti-Erythropoetin-Beschichtung und daran gebundenem Erythropoetin

Nach Entfernung der übrigen Inhaltsstoffe der Proben durch mehrmaliges Waschen wurden Kaninchen-anti-Erythropoetin-Antikörper, die an Biotin gekoppelt waren, dazugegeben. Während einer 16 bis 18 stündigen Inkubationszeit banden sich diese an das fixierte Erythropoetin (siehe Abb. 18).

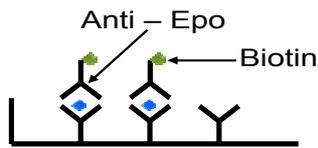


Abbildung 18: Mikrotiterplatte mit Anti-Erythropoetin-Beschichtung, daran gebundenes Erythropoetin und Anti-Erythropoetin-Antikörper gekoppelt mit Biotin

Nach erneutem Waschen wurden Anti-Biotin Antikörper von der Ziege, gekoppelt an alkalische Phosphatase, in die Mikrotiterplatten gegeben. Während eines zweistündigen Schüttelns haften sich diese an das Biotin (siehe Abb. 19).

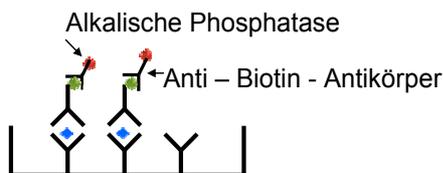


Abbildung 19: Mikrotiterplatte mit Anti-Erythropoetin-Beschichtung, daran gebundenes Erythropoetin und Anti-Erythropoetin-Antikörper, gekoppelt mit Biotin, sowie daran gebundenen Anti-Biotin-Antikörpern, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase

Die Vertiefungen wurden ausgewaschen und gelöstes p-Nitrophenyl-Phosphat hinzugegeben. Von diesem spaltet die Phosphatase während einer zweistündigen Inkubation auf dem Orbitalschüttler enzymatisch den Phosphatteil ab. Je mehr Phosphatase vorhanden ist, desto mehr p-Nitrophenyl entsteht bei diesem Vorgang. Da p-Nitrophenyl ein gelber Farbstoff ist und bei 405 nm Licht absorbiert, kann dieses Substrat quantitativ mit einem Mikrotiter-Photometer gemessen werden.

Der Gehalt an gelbem Farbstoff ist somit direkt proportional zu dem in den Proben vorhandenen Erythropoetin. Anhand einer Standardkurve wurde aus den Absorptionswerten die Konzentration von Erythropoetin in jeder Probe berechnet. Die Ergebnisse wurden in IU/ml (International Units pro ml) angegeben. 1000 IE entsprechen etwa 4,2 µg Erythropoetin.

2.8. Fixierung der Hautkonstrukte und Herstellung histologischer Schnitte

11 Tage nach Herstellung und 3 Tage nach Beginn der Luftexpositions-Phase, wurden die Hautkonstrukte fixiert. Für mindestens 24 Stunden wurde Formalin (Sigma) in und unter jeden Einsatz gefüllt und die 6-well-Platte luftdicht verschlossen. Anschließend wurden die Konstrukte mit einer Pinzette aus den Einsätzen gelöst, halbiert und in Einbettkassetten (Merck) in 80 % Ethanol gelegt. Sie wurden maschinell entwässert und in Paraffinblöcke gebettet. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden sie in 5 µm dicke Stücke geschnitten und erst in ein lauwarmes Wasserbad und dann auf Glycerin beschichtete Objektträger gelegt. Nach dem Trocknen wurden diese mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

2.9. Statistische Auswertung

Der T-Test für unverbundene Stichproben (Student-Test) wurde angewandt, um jeweils zwei Stichproben (mit Umfang n_1/n_2 , Mittelwerten \bar{x}_1/\bar{x}_2 und Standardabweichung s_1/s_2) miteinander zu vergleichen. Ziel war, herauszufinden, ob die Erwartungswerte der Stichproben sich signifikant voneinander unterscheiden. Voraussetzung für die Anwendung dieses Tests ist, dass quantitative Merkmale vorliegen und beide Stichproben aus Verteilungen kommen, die normalverteilt sind und eine gleiche Streuung haben. Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte mit dem χ^2 -Test, die Prüfung auf gleiche Standardabweichung der Verteilungen durch eine Varianzanalyse.

Konkret wurden die sezernierten Erythropoetin-Mengen von transduzierten Keratinozyten und Fibroblasten, sowie die Erythropoetin-Mengen von den verschiedenen Hautkonstrukten in jeweils drei Ansätzen gemessen und durch χ^2 -Test und Varianzanalyse untersucht, welche Normalverteilung und Streuung besteht. So wurden die Voraussetzungen zur Verwendung des Student T-Tests geprüft. Anschließend wurden die Erythropoetin-Mengen-Mittelwerte von Keratinozyten mit denen von Fibroblasten und jeweils die Erythropoetin-Mengen-Mittelwerte von zwei Hautkonstrukt-Varianten miteinander durch den Student-Test verglichen. Ziel war es, herauszufinden, ob sich die Ergebnisse signifikant voneinander unterscheiden oder nicht.

Bei einem T-Test ist die Prüfgröße t als Quotient aus Differenz der Mittelwerte einer Stichprobe (x_1 und x_2) und dem mittleren Fehler dieser Differenz zu verstehen. Die Prüfgröße t beträgt bei $n_1, n_2 = 3$:

$$t = (x_1 - x_2) / s_{1,2} \times \sqrt{2/3}, \text{ wobei } s_{1/2} = \sqrt{[(2s_1^2 + 2s_2^2) / 4]}$$

Auch die Anzahl der Freiheitsgrade (v) spielt eine Rolle: $v = n_1 + n_2 - 2 = 4$

In statistischen Tabellen kann ein sogenannter kritischer Wert t_{krit} für verschiedene Freiheitsgrade (v) und bei verschiedenen Irrtumswahrscheinlichkeiten abgelesen werden. Man geht davon aus, dass die Stichproben sich signifikant voneinander unterscheiden, wenn gilt: t größer als t_{krit} .

Beim χ^2 -Test zur Prüfung auf Normalverteilung einer Stichprobe werden die Differenzen zwischen den wahrgenommenen Resultaten und den Erwartungswerten (annäherungsweise Mittelwerten) quadriert, durch den jeweiligen Erwartungswert dividiert und dann untereinander addiert. Auch hier kann in statistischen Tabellen ein kritischer Wert χ_{krit} abgelesen werden. Wenn χ^2 kleiner ist als χ_{krit} bedeutet dies, dass die untersuchte Verteilung mit einer festgelegten Wahrscheinlichkeit der theoretischen Normalverteilung unterliegt.

Eine Varianzanalyse wird durchgeführt, um herauszufinden, ob zwei oder mehr Stichproben, die einer normalverteilten Grundgesamtheit angehören, gleiche Varianzen ($= s^2$) besitzen. Die Prüfgröße $F = s_{\text{max}}^2$ (größte Varianz der Stichprobe) / s_{min}^2 (kleinste Varianz der Stichprobe) wird mit einem kritischen Wert F_{krit} verglichen, der für die Freiheitsgrad $v_1 = \text{Anzahl der Stichproben}$ und $v_2 = n-1$ aus einer statistischen Tabelle zu entnehmen ist.

Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 0,05 wurden als signifikant, Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 0,001 wurden als hoch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Gewinnung retroviraler Erythropoetin-Vektoren

Um retrovirale Vektoren herzustellen, die das Erythropoetin-Gen auf Hautzellen übertragen können, wurde eine Verpackungszelllinie mit einem Plasmid transfiziert, das das humane Erythropoetin-Gen beinhaltet (siehe Abb. 10).

3.1.1. Untersuchung des Erythropoetin-Plasmids

Das Plasmid wurde durch spezifische Enzyme geschnitten und sein Aufbau durch Elektrophorese bestätigt (siehe Abb. 20).

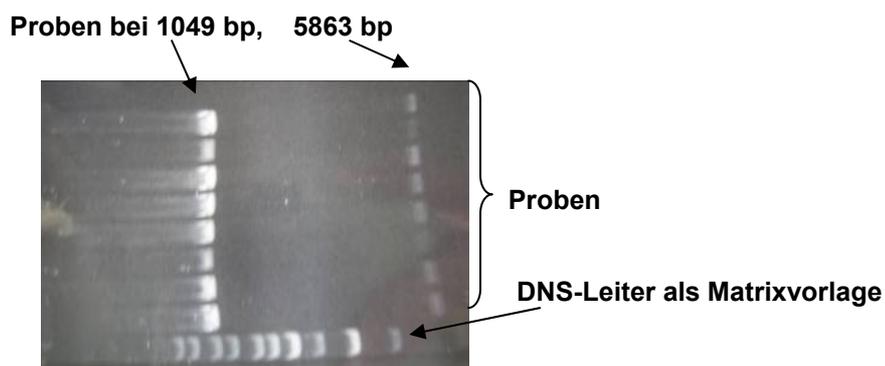


Abbildung 20: Fotografie von acht Proben mit aufgetrennten Plasmidstücken des geschnittenen Erythropoetin-Plasmids

Die dabei entstandenen Signalstreifen bei 1049 bp und 5863 bp entsprechen den Fragmenten des Erythropoetin-Plasmids (siehe Abb. 10). Das Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass die untersuchten Proben aus Plasmiden bestehen, die das Erythropoetin-Gen beinhalten.

3.1.2. Erythropoetin-Produktion der transfizierten Verpackungszellen

Mit Hilfe eines ELISA wurde der Überstand von transfizierten und nicht transfizierten Verpackungszellen untersucht. Während im Überstand nicht veränderter Zellen kein Erythropoetin gefunden wurde, konnte im Überstand der transfizierten Zellen eine hohe Erythropoetin-Konzentration nachgewiesen werden. Diese war so hoch, dass

sie unverdünnt die photometrisch exakt messbare Grenze überschritt. Das Ergebnis zeigt, dass die transfizierten Zellen nicht nur das gewünschte Plasmid mit dem Erythropoetin-Gen aufgenommen haben, sondern auch Erythropoetin daraus bilden. Auf eine Quantifizierung wurde verzichtet, da sie lediglich das Ausmaß der Erythropoetin-Sekretion durch die Verpackungszelllinie charakterisiert hätte, jedoch nicht die für die Effizienz der Zelllinie entscheidende Sekretionsleistung an viralen Partikeln, die das Erythropoetin-Gen transferieren. Diese wurde durch die Titerbestimmung quantifiziert (siehe 3.1.3.)

3.1.3. Bestimmung des Titers retroviraler Erythropoetin-Vektoren aus transfizierten Verpackungszellen

Es wurde außerdem bestimmt, in welchem Ausmaß die transfizierten Verpackungszellen funktionstüchtige, das Erythropoetin-Gen transportierende Vektoren sezernieren (siehe 2.4.).

Nach Inkubation von Fibroblasten mit dem Überstand transfizierter Verpackungszellen, der auf 10^{-5} verdünnt war, und anschließender Selektion mit G418, wuchsen noch durchschnittlich 5 Fibroblasten-Kolonien heran. Deshalb ergab sich ein retroviraler Titer von 5×10^5 retroviraler Partikel pro ml.

Bei einer Fibroblasten-Dichte von $4-8 \times 10^5$ vor der Selektion berechnet sich die sogenannte MOI (Multiplicity of Infection, die der Anzahl der transduzierenden Partikel pro befallener Zelle entspricht) aus $5 \times 10^5 \times 5 \text{ ml} / 4-8 \times 10^5$ auf etwa 3 bis 6.

3.2. Produktion und Sekretion von Erythropoetin durch transduzierte primäre humane Keratinozyten und Fibroblasten in Zellkultur

Humane Keratinozyten und Fibroblasten wurden mit dem Erythropoetin-Vektor transduziert (siehe 2.3.). Vier bis sechs Tage später wurde der Überstand beider Zellarten gewonnen. Es wurde untersucht, ob die Zeitspanne, in der das produzierte Erythropoetin gesammelt wird, einen Einfluss auf das Ergebnis hat. Möglich wäre beispielsweise, dass eine Zellkultur nach einem Medium-Wechsel vorerst nur wenig sezerniert und erst eine Erholungsphase braucht. Auch wäre denkbar, dass die Zellen einen produzierten Stoff nicht kontinuierlich, sondern in größeren Abständen

abgeben. Es zeigte sich, dass die Erythropoetin-Konzentration einer Keratinozyten- und Fibroblasten-Probe während der Inkubationszeit linear steigt (durchschnittlich 30 mIU/2h, 68 mIU/4h, 102 mIU/6h, 143 mIU/8h, siehe Abb. 21; ein IU (International Unit) entspricht 4,2 ng Erythropoetin). Somit scheint die Inkubationszeit keinen Einfluss auf das Ergebnis zu haben.

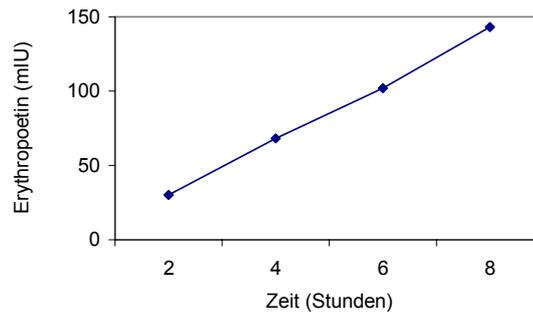


Abbildung 19: Veranschaulichung der Erythropoetin-Konzentration vom Überstand transduzierter Keratinozyten im Laufe von 2, 4, 6 und 8 Stunden, für Fibroblasten zeigte sich ein ähnlicher Verlauf

Nach diesem Vorversuch wurde die Menge sezernierten Erythropoetins im Medium transduzierter Keratinozyten und Fibroblasten nach vierstündiger Inkubationszeit mit Hilfe eines ELISA bestimmt. Die Erythropoetin-Mengen von jeweils drei transduzierten Keratinozyten-Populationen und die von drei transduzierten Fibroblasten-Populationen wurden durch X^2 -Test und Varianzanalyse untersucht und nachgewiesen, dass diese normalverteilt sind und die gleiche Streuung haben. Bei den Keratinozyten fand sich ein Mittelwert von $80,2 \pm 11$ mIU/ 10^5 Zellen und bei den Fibroblasten ein Mittelwert von $82,0 \pm 10$ mIU/ 10^5 Zellen (siehe Abb. 23). Anschließend wurde durch den Student-Test nachgewiesen, dass sich die Erwartungswerte beider Stichproben nicht signifikant voneinander unterscheiden. Transduzierte Keratinozyten und Fibroblasten produzierten statistisch gesehen die gleiche Menge Erythropoetin (siehe Tabelle 5 und Abb. 22).

Transduzierte Zellen	Erythropoetin-Konzentration (mIU/10 ⁵ Zellen)
Keratinocyten Nr. 1 (Kc-E 1)	92,72
Keratinocyten Nr. 2 (Kc-E 2)	77,06
Keratinocyten Nr. 3 (Kc-E 3)	70,78
Mittelwert	80,19
Fibroblasten Nr. 1 (Fb-E 1)	90,47
Fibroblasten Nr. 2 (Fb-E 2)	84,90
Fibroblasten Nr. 3 (Fb-E 3)	70,68
Mittelwert	82,01

Tabelle 5: Erythropoetin-Konzentration im Überstand transduzierter Keratinocyten (Kc) und Fibroblasten (Fb), E steht für das in diese Zellen integrierte Erythropoetin-Gen; es wurden jeweils drei unterschiedliche Populationen primärer Zellen transduziert und untersucht.

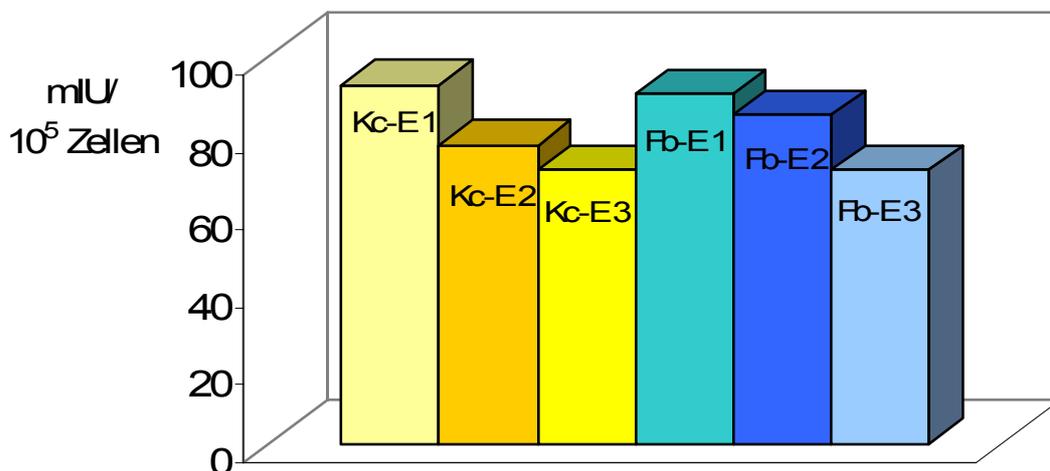


Abbildung 20: Erythropoetin-Sekretion transduzierter humaner Keratinocyten (Kc-E 1 – 3) und Fibroblasten (Fb-E 1 – 3) in mUnits pro 10⁵ Zellen nach 4 Stunden Einwirkzeit

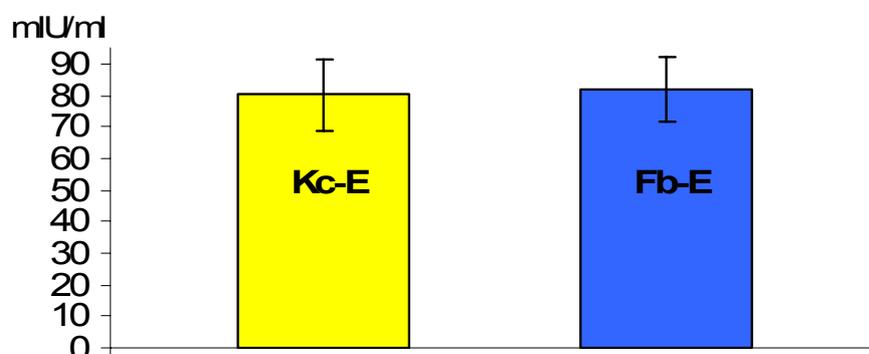


Abbildung 21: Durchschnittliche Erythropoetin-Sekretion transduzierter humaner Keratinocyten (Kc-E) und Fibroblasten (Fb-E) in mIU/ml pro 10⁵ Zellen mit Standardabweichung nach vierstündiger Inkubation

3.3. Durchführung einer Negativkontrolle

Als Negativkontrolle wurde eine Transduktion mit dem retroviralen Vektor pHa MDR 1/A durchgeführt, der das MDR- („multi drug resistance“) Gen enthält¹⁴⁴. Im Medium von Keratinozyten und Fibroblasten, die mit dem MDR-Gen transduziert worden waren, wurde kein Erythropoetin gefunden.

3.4. Überprüfung auf replikationskompetente Retroviren

Um nachzuweisen, dass die zur Transduktion benutzten retroviralen Vektoren sich nicht selbstständig in einer transduzierten Zielzelle vermehren können, wurde der Überstand transduzierter Keratinozyten und Fibroblasten auf replikationskompetente Viren untersucht (siehe 2.5., Abb. 12). Es wurde nachgewiesen, dass der Überstand keine replikationskompetenten Erythropoetin-Viren enthält.

3.5. Herstellung der Hautkonstrukte

Ein entscheidendes Ziel dieser Arbeit war, Hautkonstrukte aus Keratinozyten und Fibroblasten zu etablieren, die menschlicher Haut möglichst ähnlich sind, um mit deren Hilfe wichtige Fragen zu einer möglichen klinischen Anwendung einer kutanen Erythropoetin-Gentherapie zu beantworten. Es gibt verschiedene Ansätze zur Herstellung von Hautkonstrukten. Gemeinsam ist ihnen eine kollagene Grundsubstanz, in die Fibroblasten eingebettet werden und auf die eine Keratinozytenschicht gesät wird.

3.5.1. Einstellung des pH-Wertes

Wichtig bei der Herstellung eines Hautkonstrukts ist, dass das Kollagen, in das die Fibroblasten eingebettet werden, innerhalb einer bestimmten Zeit polymerisiert und dadurch die Konsistenz hart wird⁴⁷. Einfluss darauf hat unter anderem der pH-Wert des Gemisches. Anfangs wurde das saure Kollagen mit Hilfe von Bikarbonat auf einen pH-Wert von etwa 7,5 eingestellt. Bei diesem Wert kam es jedoch nur zu einer ungenügenden Aushärtung der Kollagengele. Deshalb wurde der pH-Wert in der Folgezeit schrittweise mit NaOH angehoben. Bei einem pH-Wert von 8,0 härteten die

Konstrukte in etwa 60 Minuten aus, so dass anschließend das Kulturmedium eingefüllt werden konnte.

3.5.2. Fibroblasten und Kollagen

Die Aushärtung des Kollagen-Gels geht durch die Aktivität der Fibroblasten mit einer Kontraktion des Hautkonstrukts einher. Hierdurch bildet sich innerhalb der ersten Tage eine zentrale Vertiefung im Gel, in die man die Keratinozyten-Suspension einfüllen kann. Allerdings kann es durch die Kontraktion des Gels auch zur Lösung des Konstruktes vom Boden des Kulturschalen-Einsatzes mit Verlust seiner gewünschten Struktur kommen. Um dies zu verhindern, wurde ein Teflon-Ring als Gewicht auf den Rand des Kollagengels gelegt. Das Konstrukt wird durch den Ring an den Boden gedrückt, der zudem als zusätzliche Begrenzung für die eingefüllte Keratinozyten-Suspension dient (siehe Abb. 24).

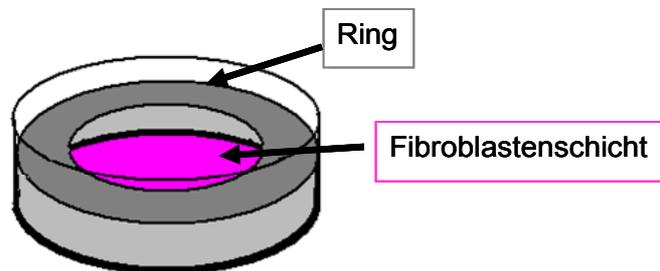


Abbildung 24: Hautkonstrukt mit Teflonring (grau), die Fibroblasten-Kollagen-Schicht befindet sich unter dem Ring (rosa)

Es zeigte sich allerdings, dass der Ring das Konstrukt an den Seiten meist so stark herabdrückte, dass zum Rand hin ein Gefälle entstand, durch welches die Keratinozyten-Suspension nach außen herabfloss (siehe Abb. 25).

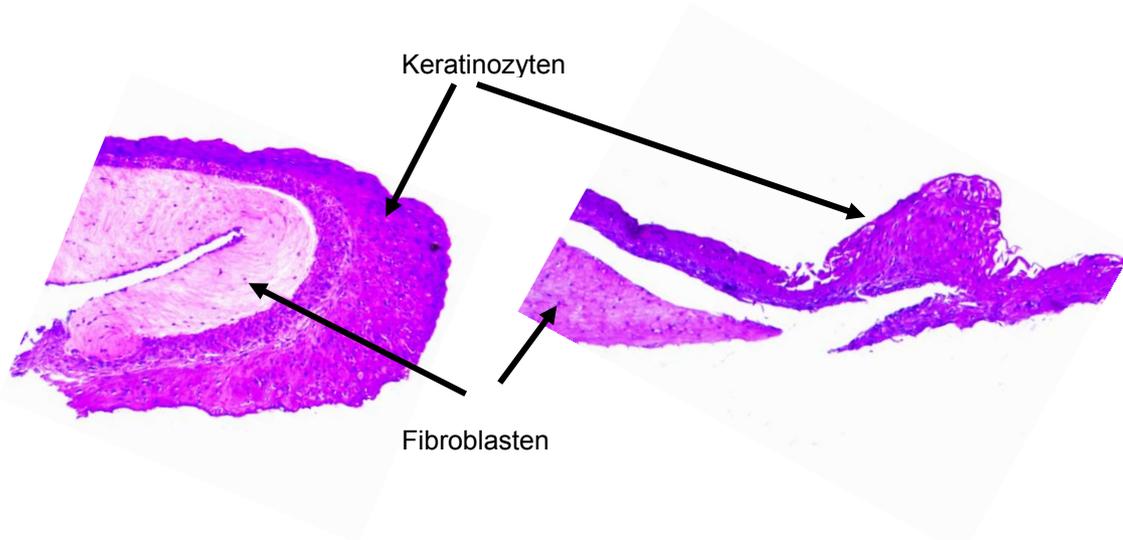
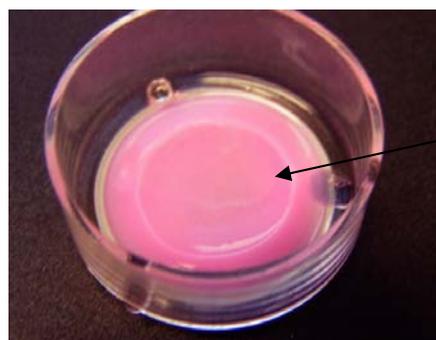


Abbildung 25: Rand eines Hautkonstrukts mit deutlich verdickter, überhängender Schicht an Keratinozyten, die von der Kollagen-Fibroblasten-Schicht herabgefließen sind

Aus diesem Grund wurde das Konstrukt weiter modifiziert: Es wurde zuerst eine azelluläre Kollagenschicht in den Kulturschalen-Einsatz gegossen, auf die nach ihrer Aushärtung die zelluläre Fibroblasten-Kollagenschicht aufgetragen wurde. Dies führte dazu, dass das Konstrukt besser am Boden haftete. Eine Kontraktion der obersten Schicht durch die Fibroblasten führte innerhalb von vier Tagen zu einer zentralen Vertiefung, in die die Keratinozyten-Suspension gefüllt werden konnte (siehe Abb. 26).



Vertiefung

Abbildung 26: Form eines Hautkonstrukts gegen Ende der Fibroblasten-Phase (ab Tag 4)

Da diese Vertiefung recht flach war, sodass beim Einfüllen der Keratinozyten-Suspension zeitweise eine kleine Menge herausfloss, wurde die Form der Hautkonstrukte weiter optimiert. Es wurde festgestellt, dass durch Variation der Fibroblastenzahl die Vertiefung in den Hautkonstrukten beeinflusst wird. Auch ein Einfluss der Fibroblasten-Zahl auf die Anzahl der Schichten in der Epidermis und deren Stratifizierung wurde beobachtet. Nach einem mikroskopischen Vergleich von

Hautkonstrukten mit verschiedenen Fibroblasten-Konzentrationen wurde die Fibroblastenzahl von 10^5 pro Einsatz schrittweise auf 5×10^5 erhöht, was zu einer deutlichen Verbesserung der morphologischen Struktur der Epidermis führte (siehe Abb. 30). Eine weitere Steigerung der Fibroblastenkonzentration brachte keine sichtbare Verbesserung.

3.5.3. Keratinozyten

Auch die Zahl der ausgesäten Keratinozyten stellt eine kritische Größe dar. Bei der Verwendung von weniger als 10^6 Keratinozyten kam es oft zu einer ungenügenden Stratifizierung der Epidermis (siehe Abb. 27). Dafür ursächlich war vermutlich, dass ein nicht unerheblicher Teil der ausgesäten Keratinozyten nach Einfüllen des Mediums weggespült wird und so verloren geht.

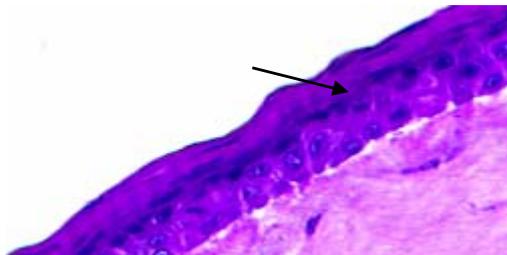


Abbildung 27: Epidermis mit wenigen Schichten und abrupter Differenzierung (→)

Wenn sich durch Kontraktion der Fibroblastenschicht die gewünschte Vertiefung gebildet hatte und anschließend eine ausreichende Menge von Keratinozyten darauf ausgesät wurde, konnte man nach einigen Tagen die Epidermis als feine gelbliche Schicht auf jedem Hautkonstrukt sehen. In der Luftexpositions-Phase kann eine Verhornung in Form von gelblichen Erhebungen erahnt werden.

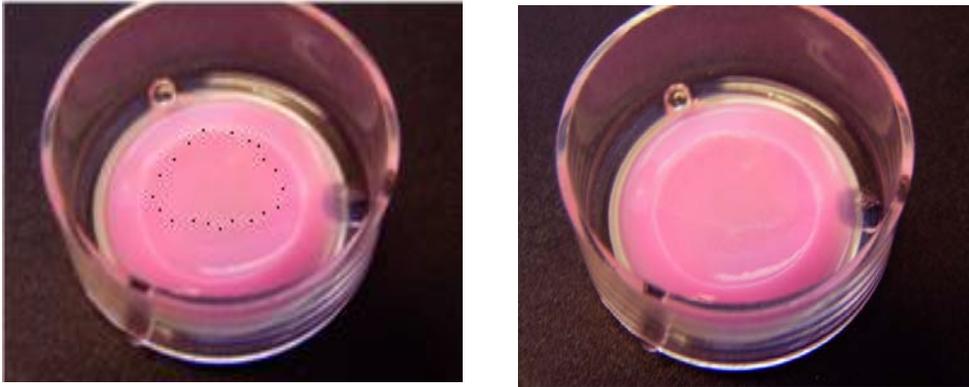


Abbildung 28: Hautkonstrukt mit Epidermis, links durch schwarze Markierung hervorgehoben

3.5.4. Differenzierung der Epidermis

Der zeitliche Verlauf der Herstellung eines Hautkonstrukts wurde ebenfalls variiert. Eine Verlängerung der viertägigen Phase nach Aussaat der Keratinozyten, in der das Hautkonstrukt komplett von Medium bedeckt ist (Keratinozyten-Phase), veränderte das mikroskopische Ergebnis der Hautkonstrukte nicht. Dagegen beeinflusste die Dauer der Luftexpositions-Phase, die für die Differenzierung und Stratifizierung der Epidermis bedeutsam ist, die Morphologie der Hautkonstrukte stark. So zeigte die Epidermis nach fünf Tagen Luftexposition nicht nur bedeutend mehr Schichten, sondern auch eine stärkere Verhornung (Hyperkeratose) mit einer deutlichen Verhornungsstörung (Auftreten kernhaltiger Zellen im Stratum corneum (Parakeratose)). Desweiteren kam es zu einer Differenzierungsstörung der Keratinozyten in den mittleren und unteren Schichten der Epidermis mit vorzeitiger Verhornung der Zellen (Dyskeratose) (siehe Abb. 29).

Im Gegensatz dazu zeigte sich nach einer Luftexpositions-Phase von drei Tagen eine regelrecht stratifizierte und differenzierte Epidermis, die von einer dünnen, kernlosen Hornschicht bedeckt war (siehe Abb. 30).

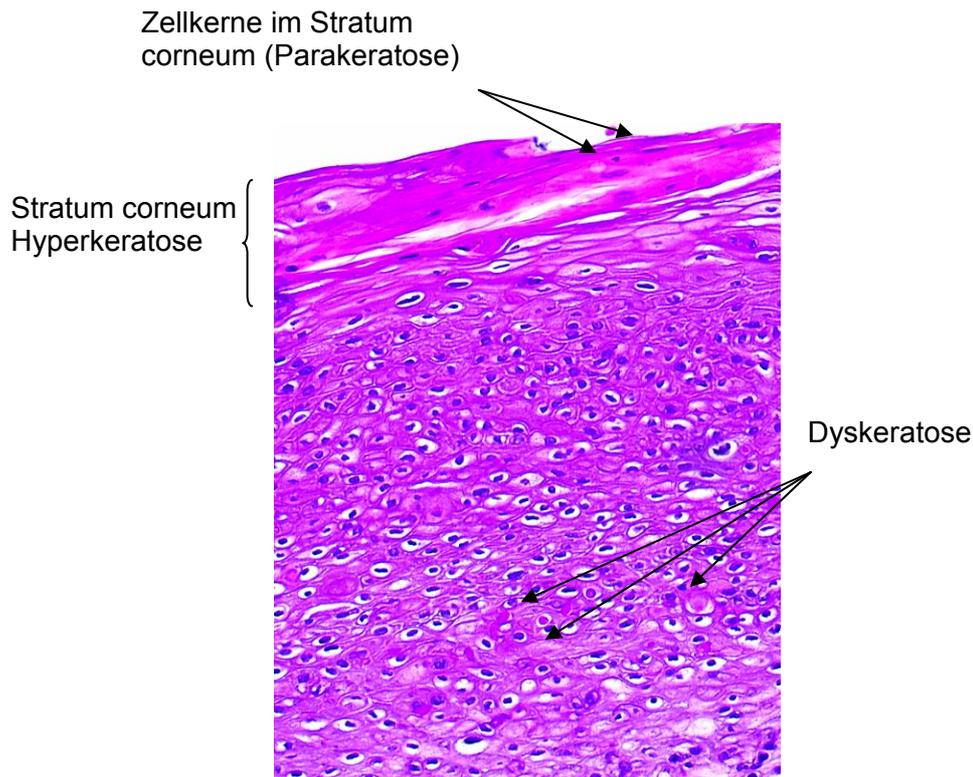


Abbildung 29: Hyper- und parakeratotische Epidermis mit multiplen dystrophischen Zellen nach fünftägiger Luftexpositions-Phase

3.6. Bildung einer regelrecht strukturierten Haut durch genetisch modifizierte Keratinozyten und Fibroblasten

Im Zusammenhang mit den Hautkonstrukten war auch von Interesse, ob die genetische Modifikation von Keratinozyten und Fibroblasten Einfluss auf die Ausbildung einer ausgereiften, regelrecht stratifizierten Epidermis und einer wohlgebildeten Dermis nimmt.

Es wurden Hautkonstrukte aus verschiedenen Kombinationen veränderter und unveränderter Zellen hergestellt: Hautkonstrukte, in denen sowohl Erythropoetin-transduzierte Keratinozyten als auch Fibroblasten integriert wurden, Hautkonstrukte, in denen natürliche, nicht transduzierte Keratinozyten, aber transduzierte Fibroblasten verwendet wurden und Hautkonstrukte mit unbehandelten Fibroblasten, auf die transduzierte Keratinozyten gesät wurden. Zur Kontrolle wurden Hautkonstrukte mit ausschließlich natürlichen Zellen hergestellt. Es fand sich kein

erkennbarer morphologischer Unterschied zwischen den verschiedenen Hautkonstrukten.

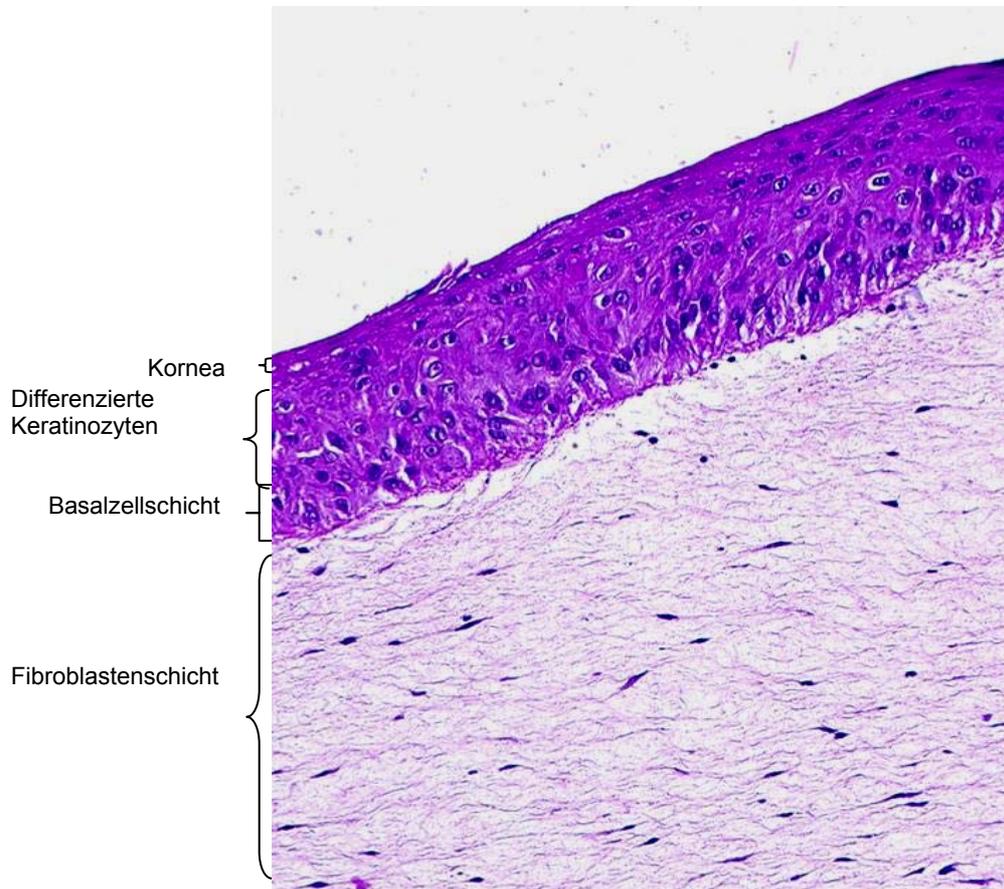


Abbildung 30: Darstellung eines Hautkonstrukts nach elftägiger Kultivierung

3.7. Produktion und Sekretion von Erythropoetin durch transduzierte humane primäre Keratinozyten und Fibroblasten in Hautkonstrukten

Es wurden Hautkonstrukte hergestellt, in denen entweder nur die Keratinozyten, die Fibroblasten oder aber beide Zellarten mit dem Erythropoetin-Vektor transduziert worden waren. Anschließend wurde am 12. Tag der Kultivierung Kulturmedium zur Bestimmung des Erythropoetin-Gehalts entnommen.

Die Menge des innerhalb von 24 Stunden sezernierten Erythropoetins wurde mit Hilfe eines quantitativen ELISA bestimmt. Es wurden drei unterschiedliche Hautkonstrukte jeder Variante untersucht und durch χ^2 -Test und Varianzanalyse statistisch ausgewertet. So wurde festgestellt, dass die Ergebnisse jeweils einer

Normalverteilung mit gleicher Streuung unterliegen. Bei den Mittelwerten zeigten sich deutliche Unterschiede je nach Versuchsbedingungen. Hautkonstrukte mit Erythropoetin-transduzierten Keratinozyten und unveränderten Fibroblasten sezernierten lediglich $2,70 \pm 1,25$ IU Erythropoetin ins Medium. Dagegen produzierten Hautkonstrukte, in die unveränderte Keratinozyten und transduzierte Fibroblasten integriert worden waren, $25,31 \pm 1,58$ IU Erythropoetin und Hautkonstrukte, bei denen beide Zellarten transduziert worden waren, sogar $30,54 \pm 2,32$ IU (siehe Tabelle 6, Abb. 31 u. 32). Dem Student-Test zufolge sind diese Unterschiede signifikant bzw. sehr signifikant.

	HK	Hautkonstrukt mit		Erythropoetin-Menge (IU/HK)	Mittelwerte
Gruppe 1	(HK a)	Kc-E 1	Fb 1	3,6370	2,7036
	(HK b)	Kc-E 2	Fb 2	1,2884	
	(HK c)	Kc-E 3	Fb 3	3,1855	
Gruppe 2	(HK d)	Fb-E 1	Fb 1	24,1128	25,3079
	(HK e)	Fb-E 2	Fb 2	27,1017	
	(HK f)	Fb-E 3	Fb 3	24,7093	
Gruppe 3	(HK g)	Kc-E 1	Fb-E 1	28,4615	30,5390
	(HK h)	Kc-E 2	Fb-E 2	30,1189	
	(HK i)	Kc-E 3	Fb-E 3	33,0367	

Tabelle 6: Erythropoetin-Mengen im 24 Stunden-Überstand von Hautkonstrukten (HK) aus verschiedenen Kombinationen transduzierter Keratinozyten (Kc-E) und Fibroblasten (Fb-E) und unveränderten Zellen (Keratinozyten (Kc) und Fibroblasten (Fb))

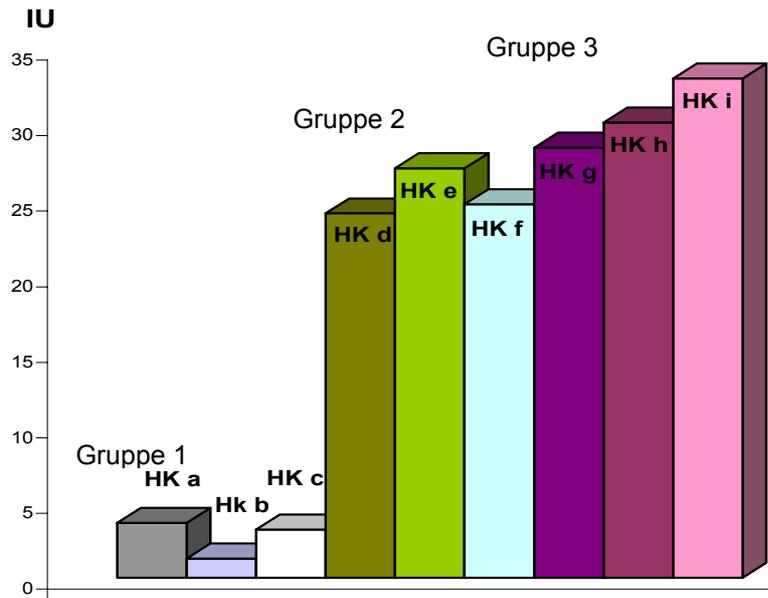


Abbildung 31: Erythropoetin-Konzentration in Units im 24 Stunden-Überstand von Hautkonstrukten aus verschiedenen Kombinationen transduzierter Keratinozyten und Fibroblasten

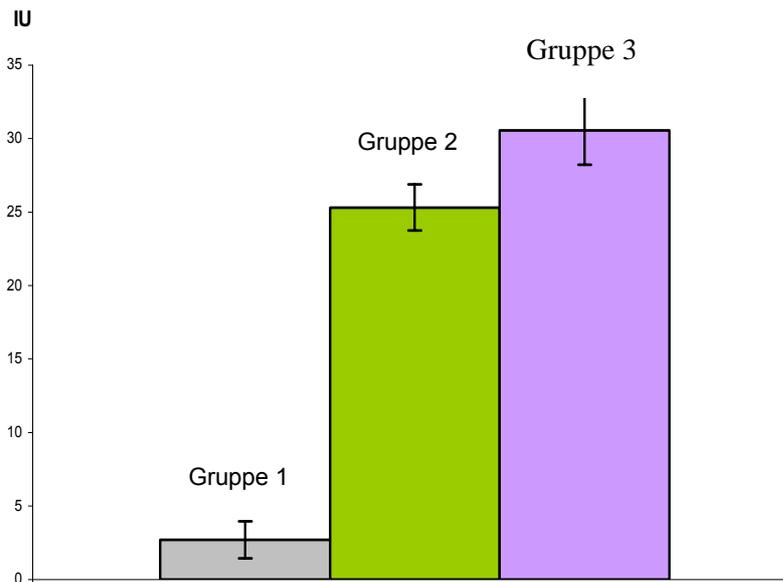


Abbildung 32: Durchschnittliche Erythropoetin-Sekretion genetisch modifizierter Hautkonstrukte. Gruppe 1: Keratinozyten wurden mit Epo-Vektor transduziert, Gruppe 2: Fibroblasten wurden mit Epo-Vektor transduziert, Gruppe 3: Keratinozyten und Fibroblasten wurden mit Epo-Vektor transduziert.

3.8. Negativkontrolle der Hautkonstrukte

Auch für Hautkonstrukte wurde eine Negativ-Kontrolle durchgeführt. Aus MDR-transduzierten Keratinozyten und Fibroblasten wurden Hautkonstrukte angefertigt.

Bei diesen fand sich kein Erythropoetin im Kulturmedium.

4. Diskussion

Rekombinantes Erythropoetin ist bei einer Vielzahl von Krankheiten therapeutisch wirksam (siehe 1.5.3.). Dennoch wird es heutzutage aufgrund seiner hohen Behandlungskosten zu selten angewendet²⁷. Die bisherige Erythropoetin-Therapie ist umständlich, da das Hormon in regelmäßigen Abständen subkutan oder intravenös gespritzt werden muss. Dadurch riskiert man sowohl Infektionen als auch lokale Unverträglichkeiten an der Injektionsstelle und verlangt vom Patienten eine hohe Compliance. In dieser Arbeit wurde die alternative Möglichkeit einer Gentherapie behandlungsbedürftiger Patienten näher untersucht. Hierzu wurde das Transfer-Gen Erythropoetin in Hautzellen eingebracht.

Die Haut eignet sich aus mehreren Gründen besonders für eine derartige Gentherapie. Sie ist für eine Entnahme von Zellen direkt zugänglich. Keratinozyten und Fibroblasten lassen sich unkompliziert in Kultur vermehren und genetisch verändern. Mit Hilfe von Hautkonstrukten lassen sich präklinische Untersuchungen durchführen, die die Eigenschaften von genetisch veränderten Zellen über die Monolayer-Zellkultur hinaus demonstrieren. Haut lässt sich im Vergleich zu anderen Organen einfach transplantieren. Sie ist äußerst gut durchblutet. Nach genetischer Veränderung eines Hautareals lässt sich dieses gut kontrollieren und bei Nebenwirkungen einfach entfernen¹⁰⁸.

Ziel dieser Arbeit war insbesondere zu untersuchen, welche Zellen der Haut für eine genetische Modifikation mit dem Erythropoetin-Gen am besten geeignet sind. Es wurde ein Vergleich der beiden häufigsten Zellarten, Keratinozyten und Fibroblasten, in Bezug auf ihre Sekretionsleistung nach retroviralem Transfer des Erythropoetin-Gens durchgeführt. Hierzu wurde ein Hautkonstruktmodell entwickelt, in dem die Sekretionsleistung beider Zellarten ähnlich wie in menschlicher Haut untersucht werden konnte.

Im Folgenden werden verschiedene Varianten von Hautkonstrukt-Modellen vorgestellt und sowohl ihre Vorzüge im Vergleich zu Monolayer-Kulturen als auch ihre Grenzen als Modell für natürliche Haut aufgeführt. Dabei wird besonders auf die in dieser Arbeit hergestellten Hautkonstrukte eingegangen. Ferner wird die Sekretionsleistung transgener Keratinozyten und Fibroblasten in Monolayer-Kultur

und im Hautkonstrukt diskutiert. Eine mögliche klinische Anwendung dieses Modells wird unter Berücksichtigung der Effizienz und der Möglichkeiten einer weiteren Optimierung sowie zu beachtender Sicherheitsrisiken diskutiert.

4.1. Hautkonstruktmodelle

4.1.1. Varianten von Hautkonstrukten

Es gibt unterschiedliche Verfahren zur Herstellung von Hautkonstrukten. Die einfachsten Formen bestehen lediglich aus Epidermis, die auf semipermeablen Membranen¹⁵⁸ oder auf toter Dermis¹⁴⁸ kultiviert wird. Vorteil der Verwendung solcher Dermis ist die vorhandene Basalmembran, an die sich Keratinozyten hervorragend anheften.

Allerdings unterstützt der Kontakt zu lebenden Fibroblasten sowohl das Wachstum als auch die Epithelialisierung von Keratinozyten, beispielsweise durch Sekretion parakriner Mediatoren, erheblich¹¹⁸. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit ausschließlich Hautkonstrukte hergestellt, die aus einem Kollagen-Fibroblasten-Gemisch als dermales Äquivalent bestehen, auf das eine Keratinozyten-Suspension gesät wird^{6, 91}. Durch Luftexposition und Zugabe von Kalziumchlorid differenzieren diese in eine stratifizierte Epidermis^{141,169}. Immunhistochemische Untersuchungen wiesen nach, dass Keratinozyten in einem solchen Hautkonstrukt charakteristische Differenzierungsmarker einer Epidermis produzieren, wie Filaggrin, Involukrin und Transglutaminase⁵⁸. Elektronenmikroskopisch wurden typische Strukturen wie Desmosomen, Fibrillen und eine reguläre dermal-epidermale Basalmembran-Architektur dargestellt³³. Zudem wurde gezeigt, wie Differenzierung und Stabilität der Epidermis durch Fibroblasten beeinflusst werden^{124,167}.

Es wurden unterschiedliche Varianten von Hautkonstrukten mit integrierten Fibroblasten beschrieben. Für die Herstellung der Epidermis ergeben sich dabei folgende Herausforderungen: Für jedes Hautkonstrukt wird eine große Anzahl Keratinozyten benötigt, was entweder ein großes Stück Haut zur Isolierung der Zellen erfordert oder einen langen Zeitraum zu ihrer Anzucht und Vermehrung, wobei sich dadurch Morphologie und Verhalten der Keratinozyten verändern¹⁴⁹. Eine elegante Lösung ist die Implantation von Haarfollikeln in das dermale Äquivalent, aus

deren Wurzeln Keratinozyten auswandern, um innerhalb von durchschnittlich 14 Tagen eine Epidermis zu formen⁹². Eine weitere Möglichkeit ist die Optimierung der Keratinozyten-Proliferation schon vor der Herstellung eines Hautkonstrukts. Dies ist beispielsweise mit Hilfe von Fibroblasten und Wachstums Komponenten möglich⁹³.

Das dermale Äquivalent kann sowohl durch die Art des Kollagens, als auch durch die Dichte der Fibroblasten¹¹⁰ variiert werden¹⁹³. Auch in dieser Arbeit wurde die Fibroblasten-Dichte mehrfach verändert und optimiert (siehe 2.6.1.).

Die mechanische Stabilität des dermalen Äquivalents wird durch Einsatz von Materialien, die die Haftung von Kollagen ermöglichen, verbessert¹³⁰. Als Alternative zum Kollagen als Trägersubstanz verwendeten andere Forschungsgruppen auch erfolgreich Fibringel¹²⁹ und synthetische Polymere³⁴. Lee et al. entwickelten ein dermales Äquivalent, das ohne zugegebene Trägersubstanz aus Fibroblasten besteht, die über mehrere Wochen in speziellem Medium kultiviert wurden und so selbstständig extrazelluläre Matrix produzierten¹¹².

In der Literatur sind etliche Varianten von Kulturmedien für Hautkonstrukte beschrieben⁷. Dies ist ein Zeichen dafür, dass es schwierig ist, den Bedürfnissen beider Zellarten, Keratinozyten und Fibroblasten, zu genügen und außerdem die Differenzierung einer Epidermis zu unterstützen. Neben Variationen der Konzentration von Wachstums- und Differenzierungshormonen wird beispielsweise diskutiert, ob es sinnvoll ist, autologes, zum Zellspender passendes Serum zu benutzen, um das Wachstum zu verbessern und Komplikationen bei eventueller Transplantation zu vermeiden⁹¹. Andere Forschungsgruppen propagieren den völligen Verzicht auf Serum¹⁶⁹. In dieser Arbeit wurde erfolgreich fötales Kälberserum in niedriger Konzentration im Hautkonstrukt-Medium verwendet.

Jede der vielen Hautkonstrukt-Varianten bringt Vor- und Nachteile mit sich. Insgesamt lässt sich jedoch sagen, dass die Verwendung einer vitalen, Fibroblasten enthaltenden Dermis eine wesentliche Voraussetzung für die Herstellung eines hochwertigen Hautkonstrukts ist.

4.1.2. Vergleich von Hautkonstrukten mit Monolayer-Zellkulturen

Es wurden Hautkonstrukte entwickelt, um das Verhalten von Keratinozyten und Fibroblasten unter natürlichen Bedingungen zu untersuchen. Während der Differenzierung in ein Hautkonstrukt verändert sich die Morphologie der Zellen, wie auch ihre physiologischen Eigenschaften.

Besonders Keratinozyten sind davon betroffen⁴³. So entwickeln sich aus den basalen Keratinozyten mehrere Schichten differenzierter Keratinozyten, die letztendlich eine intakte Hornschicht als äußere Schutzbarriere ausbilden (siehe 1.2.)⁴⁶. Meist wird diese Differenzierung durch schichtspezifische Aktivierung von Promotoren verschiedener Gene nach Kontakt mit bestimmten Stoffen wie Kalzium und Vitamin A ausgelöst. Beispielsweise wird durch Aktivierung des Involukrin-Promotors in oberflächlichen Schichten Involukrin produziert⁴⁵.

Dies machte man sich in der Gentherapie zur Behebung von Strukturdefekten in bestimmten Epidermis-Schichten zu Nutze (siehe 1.4.1.). Dabei wurde die Expression eines Transfgens auf die gewünschten Keratinozytenschichten beschränkt¹¹⁹. Wird einem Transgen beispielsweise der Involukrin-Promotor vorangestellt, so wird es nur in den oberflächlichen Schichten exprimiert⁶⁸. Die Promotoren von Keratin 5²³-und 14¹⁸⁴-Promotor bewirken dagegen eine Genexpression in basalen Keratinozyten.

Keratinozyten werden durch ihre Differenzierung und durch die Aktivität verschiedener Promotoren in ihrem Produktionsverhalten beeinflusst. Um dieses untersuchen zu können, reichen deshalb Monolayer-Kulturen nicht aus, da es hier zu keiner epidermalen Differenzierung kommt.

Eine weitere Funktion der Haut, die in Keratinozyten-Monolayer-Kultur nicht vorhanden ist, ist deren gezielte Sekretion in den Blutkreislauf. In einer Epidermis ist jede Sekretion, die das Blut erreichen soll, zur Seite oder nach innen gerichtet, da die Hornschicht eine Diffusions-Barriere darstellt. Ein Transgen, das systemisch benötigt wird, muss die Strecke durch die Epidermis hindurch diffundieren bis es Anschluss an das in der Dermis liegende Gefäßsystem bekommt (siehe 1.2.). Um diesen Weg zu untersuchen, sind Hautkonstrukte unabdingbar.

Fibroblasten verhalten sich ebenfalls im Hautkonstrukt anders als in Monolayer-Kultur. So verändern sich Proliferationsfähigkeit und Morphologie der Fibroblasten nach Einbettung in eine Kollagenmatrix. Sie treten untereinander und mit den Kollagen-Fasern in Kontakt, formen diese und beginnen selbst Kollagen und andere Substanzen zu sezernieren⁷⁹. Dies könnte auch einen Einfluss auf die Produktion eines Transgens haben. Im Vergleich zu Monolayer-Kulturen stellen Hautkonstrukte also ein ideales Modell zur präklinischen Analyse gentherapeutischer Anwendungen dar.

4.1.3. Vergleich von Hautkonstrukten mit natürlicher menschlicher Haut

Hautkonstrukte mit dermale Äquivalent dienen als Modelle, die menschliche Haut bestmöglich nachbilden. Trotzdem unterscheiden sie sich in einigen Punkten von natürlicher menschlicher Haut.

Zum einen befinden sich auf jedem Quadratcentimeter Hautkonstrukt weniger Keratinozyten. Dies ist durch das Fehlen der Papillenstruktur, einer Verzahnung zwischen Epidermis und Dermis bedingt (siehe Abb. 33, siehe 1.2.).

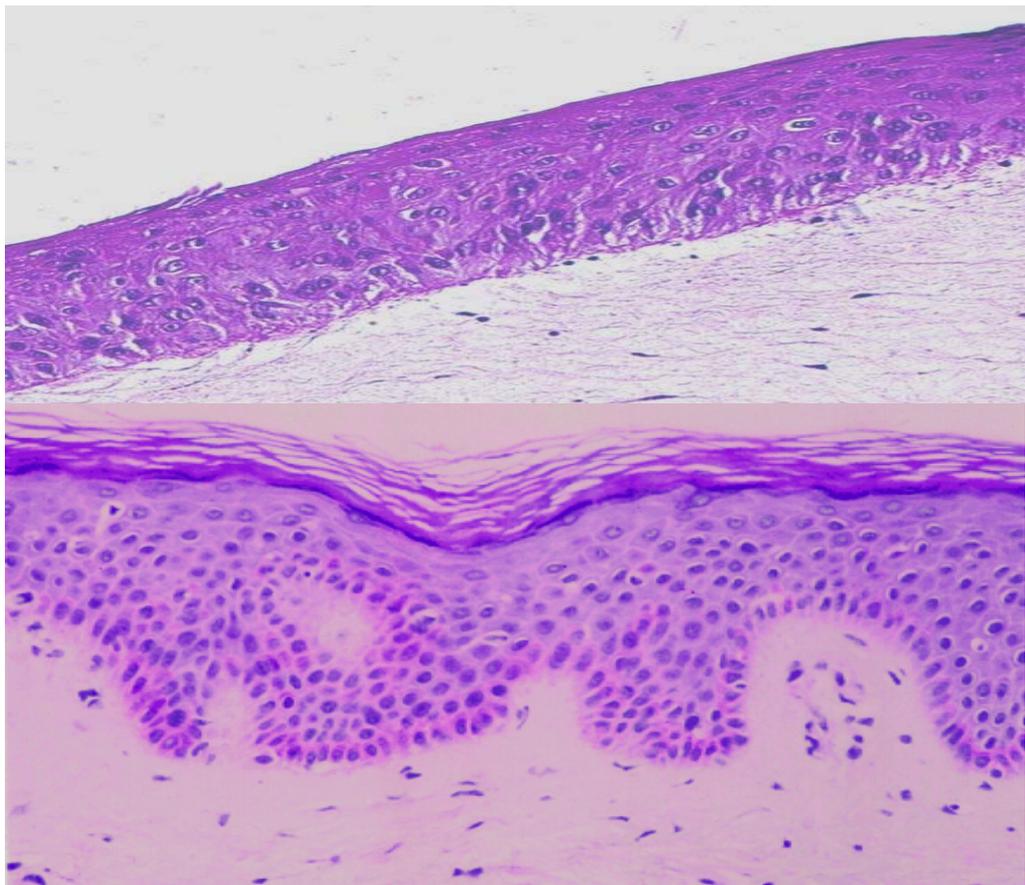
Zusätzlich verkürzt die Papillenstruktur die Diffusionsstrecke zwischen Epidermis und den in die Papillen integrierten Kapillaren in vivo bzw. die Strecke zum Medium im Hautkonstrukt. So gelangt ein sezernierter Stoff aus natürlicher Haut leichter und schneller in den Blutkreislauf¹⁸.

Es besteht die Möglichkeit, Hautkonstrukte herzustellen, die eine solche Papillenstruktur aufweisen (siehe 4.1.1.)¹⁴⁸. Dazu denaturiert man eine menschliche Dermis und besät diese mit Keratinozyten. Die Papillen der Dermis gehen durch die Denaturierung nicht verloren, so dass sich die entstehende Epidermis der natürlichen Form anpassen kann. Ein großer Nachteil dieser Konstrukte ist, dass keine Fibroblasten integriert und untersucht werden können. Aus diesem Grund kamen derartige Hautkonstrukte für diese Arbeit nicht in Frage.

Auch das Fehlen von Blutgefäßen an sich stellt eine Abweichung des verwendeten Hautmodells von menschlicher Haut dar. Ein sezerniertes Protein diffundiert gemäß dem Fick Diffusionsgesetz im extrazellulären Raum in Richtung niedriger Eiweißkonzentration ins Medium. Je höher der Konzentrationsgradient zwischen

Extrazellulärraum und Medium ist, desto schneller erfolgt die Diffusion und je niedriger er ist, desto mehr sezerniertes Protein bleibt im Extrazellulärraum. Da das Medium sich statisch unter jedem Hautkonstrukt befindet und das gebildete Protein nicht laufend abtransportiert wird, bleibt der Konzentrationsunterschied zwischen Medium und Gewebe nicht konstant hoch. Je mehr Protein schon ins Medium diffundiert ist, desto kleiner wird er. Deshalb erreicht das Medium auch nicht das Aufnahmepotential fließenden Blutes in dermalen Kapillaren. Der dadurch entstehende Fehler dürfte allerdings gering sein.

Es ist möglich, Hautkonstrukte mit Endothelzellen herzustellen, die mikrovaskuläre Netze bilden¹⁴⁶. Diese führen aber natürlich erst nach Transplantation des Hautkonstrukts und nach Anschluss an das vorhandene Gefäßsystem¹⁶⁰ zu einem laufenden Abtransport des sezernierten Proteins.



177

Abbildung 33: Histologisches Bild eines Hautkonstrukts (oben) und menschlicher Haut (unten)

Nicht nur für den Abtransport sezernierter Substanzen, sondern auch für die Versorgung eines Hautkonstrukts mit Nährstoffen und für seine Produktionsleistung ist ein Anschluss an das Gefäßsystem von Vorteil. Dies zeigt sich dadurch, dass sich die Differenzierung und Barrierefunktion eines Hautkonstrukts nach Transplantation verbessern⁸⁹. Ein transplantiertes Hautkonstrukt, das optimal in vivo versorgt wird, könnte möglicherweise auch auch mehr Transgen produzieren als ein Hautkonstrukt in vitro.

Es lässt sich folglich vermuten, dass sich die Erythropoetin-Sekretion von Keratinozyten nach Transplantation der hergestellten Hautkonstrukte erhöhen würde. Das in dieser Arbeit genutzte Modell liefert folglich eher zu niedrige als zu hohe Ergebnisse.

Ein weiterer Unterschied zwischen hergestellten Hautkonstrukten und natürlicher Haut besteht in der Morphologie und den Eigenschaften des dermalen Äquivalents. Fibroblasten, die in eine am Boden haftende Kollagenmatrix eingebettet sind, bilden ein Granulationsgewebe wie es nach Verletzungen vorkommt⁷⁹. Sie proliferieren und bilden Kollagen-Fasern, die sich parallel zum Boden anlagern. Nach Hatamochi et al. finden diese Umbauvorgänge während der ersten zwei Tage nach Herstellung eines Hautkonstrukts statt⁸⁰. Anschließend proliferieren die Fibroblasten nicht mehr. Interessanterweise verhalten sich Fibroblasten und Kollagen anders, wenn das dermale Äquivalent nicht am Boden haftet und im Medium schwimmt. Hier verhalten sich die Fibroblasten wie in natürlicher, unverletzter Dermis und proliferieren weniger.

Die Produktion eines Transgens könnte sowohl durch die Dichte der Fibroblasten als auch durch deren Sekretionsverhalten beeinflusst werden. Deshalb wäre es für gentherapeutische Versuche erstrebenswert, dermale Äquivalente herzustellen, die natürlicher, unverletzter Dermis ähnlich sind. Die Herstellung eines schwimmenden Hautkonstrukts kam allerdings für diese Arbeit nicht in Frage, da sich hier die Epidermis nicht entsprechend entwickelt. Um zu untersuchen, wie das Sekretionsverhalten von Fibroblasten in natürlicher, unverletzter Dermis ist, müsste als weiterführender Versuch eine Transplantation der hergestellten Hautkonstrukte vorgenommen werden.

Auch immunhistologisch lassen sich einige Abweichungen der dermalen Äquivalente zur natürlichen Dermis nachweisen, deren pathophysiologische Konsequenzen zum Teil noch nicht aufgeklärt sind^{4,91}.

4.1.4. Morphologie der hergestellten Hautkonstrukte – Beurteilung und Diskussion eigener Ergebnisse

Die Ähnlichkeit der in dieser Arbeit hergestellten Hautkonstrukte zu menschlicher Haut wurde zunächst morphologisch beurteilt (siehe 3.6., Abb. 30). Die Hautkonstrukte enthalten der Dermis entsprechend zahlreiche Fibroblasten, die gleichmäßig in eine Kollagen-Matrix eingebettet, typische Ausläufer in alle Richtungen aufweisen. Keratinozyten haften auf dieser Matrix und bilden ein mehrschichtiges Epithel.

In der Literatur wird beschrieben, dass Hautkonstrukte aus genetisch veränderten Zellen morphologisch meist keine Auffälligkeiten aufweisen^{1,171}. Auch die hier beschriebenen Hautkonstrukte aus Keratinozyten und Fibroblasten, die mit dem Erythropoetin-Gen transduziert worden waren, unterschieden sich morphologisch nicht von denen aus unbehandelten Zellen. Nach retroviraler Transduktion behielten die Zellen ihre Fähigkeit, sich regulär zu entwickeln. Folglich wurden keine für das Wachstum und die Differenzierung wichtigen Gene durch Integration des Erythropoetin-Gens inaktiviert (vgl. 4.3.3.).

Erythropoetin kann das Wachstum und die Differenzierung einer Vielzahl von Zellen beeinflussen. Neben Zellen im Blut und Knochenmark reagieren beispielsweise auch mesangiale, myokardiale und glatte Muskelzellen auf Erythropoetin (siehe 1.5.1.)²¹. Es wirkt dort vor allem als Wachstumshormon. Theoretisch wäre es möglich, dass Fibroblasten, die wie glatte Muskelzellen mesodermalen Ursprungs sind, im Hautkonstrukt durch Erythropoetin beeinflusst werden. So wurde beispielsweise bei transgener Produktion von GM-CSF (Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Factor) in Hautkonstrukten ein unterschiedliches Differenzierungsmuster der Epidermis zur Kontrolle festgestellt¹.

Da weder die genetische Modifikation noch das Transgen Erythropoetin die hergestellten Hautkonstrukte in ihrer Struktur beeinflussten, kann man davon ausgehen, dass diese Hautkonstrukte auf menschliche Haut transplantiert und zur systemischen Sekretion von Erythropoetin eingesetzt werden könnten.

4.2. Erythropoetin-Sekretion transduzierter Keratinozyten und Fibroblasten

4.2.1. Erythropoetin-Sekretion in Monolayer-Zellkultur – Vergleich zwischen Keratinozyten und Fibroblasten

Durch Verpackungszellen wurden retrovirale Erythropoetin-Vektoren hergestellt, mit denen humane Keratinozyten und Fibroblasten transduziert wurden (siehe 2.3.). Nach Integration des retroviralen Erythropoetin-Gens in die DNS von Keratinozyten und Fibroblasten (vgl. 1.3.2.1.), produzierten beide Populationen erwartungsgemäß Erythropoetin, dessen Konzentration im Kulturmedium mittels ELISA gemessen wurde. Dabei stellte sich heraus, dass Keratinozyten und Fibroblasten etwa die gleiche Menge Erythropoetin sezernierten (Keratinozyten durchschnittlich 80 mIU, Fibroblasten 82 mIU).

Bereits frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass Keratinozyten und Fibroblasten nach entsprechender genetischer Modifikation Proteine herstellen und sezernieren können, die sie natürlicherweise nicht produzieren. Hautzellen wurden zur transgenen Produktion von Enzymen, Hormonen, Gerinnungsfaktoren und anderen Proteinen genetisch verändert (siehe Kapitel 1.4.).

Es wurden beispielsweise Keratinozyten mit dem Gen des humanen Wachstumshormons hGH transduziert. Vor Selektion produzierten durchschnittlich 10^6 Keratinozyten $3,8 \mu\text{g}$ hGH und nach Selektion $7,7 \mu\text{g}$ hGH¹⁰. Alexander et al. wiesen nach, dass transgener, von Keratinozyten produzierter Faktor IX im Mausmodell die Blutzirkulation erreicht. Dort kam es zu einer gleichbleibenden Konzentration von etwa 46 ng/ml Faktor IX². Leider wurde die Sekretionsleistung pro Anzahl transgener Keratinozyten nicht bestimmt. Auch Fibroblasten wurden mit dem Gerinnungsfaktor IX transduziert³⁵. Dai et al. wiesen eine Produktionsleistung von 549 ng Faktor IX durch jeweils 10^6 retroviral transduzierte Zellen pro 24 Stunden nach.

Naffakh et al. transduzierten Fibroblasten durch retrovirale Vektoren mit dem Erythropoetin-Gen. Diese sezernierten anschließend 60 IU Erythropoetin pro 10^7 Zellen in 24 Stunden (entspricht 100 mIU pro 10^5 Zellen in 4 Stunden), was vergleichbar mit den in dieser Arbeit durchschnittlich erhaltenen 80 mIU ist. Die Fibroblasten wurden zusammen mit einer Kollagenmatrix in das Peritoneum von

Mäusen implantiert, wo sie 10 Monate lang Erythropoetin ins Blut sezernierten und den Hämatokrit auf über 80% anhoben¹³⁵.

Zum Transfer des Erythropoetin-Gens in Keratinozyten sind bis heute nur In-vivo-Versuche bekannt, bei denen nicht beurteilt wurde, wie viel Erythropoetin die einzelnen Zellen produzierten.

Nur selten wurde die Fähigkeit zur Sekretion eines Transgens bei Keratinozyten und Fibroblasten direkt verglichen. Christensen et al. veröffentlichten eine Studie, in der Keratinozyten und Fibroblasten mit dem Gen für Phenylalanin-Hydroxylase transduziert wurden. Im Vergleich nahmen Keratinozyten eine höhere Menge an Genkopien auf (etwa viermal soviel) und wiesen eine zehnfach höhere Phenylalanin-Aktivität auf als Fibroblasten³⁰.

In der vorliegenden Arbeit dagegen produzierten beide Zellpopulationen eine ähnliche Menge des Transgens Erythropoetin. Es ist nachvollziehbar, dass die Produktionsleistung von transgenen Zellen durch Eigenschaften wie Größe und Aminosäuresequenz des Transgens beeinflusst wird. Interessant ist allerdings, dass Keratinozyten und Fibroblasten hierbei scheinbar nicht gleichermaßen beeinflusst werden. Möglicherweise gibt es Transgene, für deren Produktion sich die eine oder die andere Zellpopulation besser eignet. Aus diesem Grund sind vergleichende Untersuchungen sowie Versuche mit unterschiedlichen Transgenen äußerst wichtig.

Die Ergebnisse legen den Verdacht nahe, dass für eine gentherapeutische Produktion von Erythropoetin durch die Haut Keratinozyten und Fibroblasten in gleichem Maße geeignet sind. Allerdings ist ein Vergleich beider Zellarten in Kultur allein nicht aussagekräftig genug. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Erythropoetin-Produktion durch Keratinozyten und Fibroblasten im Hautkonstrukt diskutiert.

4.2.2. Erythropoetin-Sekretion genetisch modifizierter Hautkonstrukte – Beurteilung und Diskussion der Ergebnisse

In der Literatur ist mehrfach beschrieben, dass transgene Keratinozyten und Fibroblasten im Hautkonstrukt Produkte ihrer Transfgene ausscheiden und diese nach Transplantation eines Hautkonstrukts in den Blutkreislauf gelangen¹⁷³.

Transduzierte Keratinozyten, die mit Hilfe eines AAV-Vektors genetisch verändert worden waren, sezernierten nach Einbettung in ein Hautkonstrukt bis zu 25 ng/cm² GM-CSF (Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Factor) in 48 Stunden¹. Dies wäre umgerechnet etwa soviel Protein wie in 6 IU Erythropoetin (1 IU entspricht jeweils 4,2 ng Protein). Zum Vergleich produzierten transgene Keratinozyten in dieser Arbeit etwa 4 IU Erythropoetin pro cm².

Ferner gelang es, Keratinozyten genetisch so zu modifizieren, dass sie 7,7 µg pro 10⁶ Zellen vom humanen Wachstumshormon hGH sezernierten (siehe 4.2.1.). Eine Epidermis aus diesen Keratinozyten produzierte 38 µg hGH pro Tag. Nach Transplantation der Epidermis auf Mäuse wurde hGH im Blut nachgewiesen. Interessanterweise reduzierten die Transplantate ihre Sekretionsrate in vivo auf 0,4 % ihrer vorherigen Leistung¹⁰. Für diesen hohen Abfall wurde keine Erklärung gefunden. Das Trauma durch Lösung der Epidermis vom In-vitro-Material und die Transplantation spielten vermutlich eine Rolle¹⁷⁵. Möglicherweise fiel die Sekretionsleistung auch wegen des Abbruchs der In-vitro-Selektion mit Genetizin ab.

Fenjves et al. transduzierten Keratinozyten durch einen retroviralen Vektor mit einer markierten Form des Apo E-Gens. Vorher hatten sie nachgewiesen, dass Apo E natürlicherweise von basalen Keratinozyten produziert und ins Blut abgegeben wird. In Zellkultur produzierten die Zellen nun beide Formen von Apo E. Nach Transplantation einer Epidermis aus den veränderten Keratinozyten auf Mäuse kam es zu einem bis zu 20mal höheren Anstieg des markierten Apo E im Blut. Folglich wurde dieses im Gegensatz zum natürlichen Apo E in allen Schichten der Epidermis exprimiert¹⁷³. Grundsätzlich sind also mehrere Schichten einer Epidermis fähig, ein Transgen zu produzieren und zu sezernieren, dem der retrovirale LTR-Promotor vorangestellt ist. Ob dies allerdings für jedes beliebige Transgen gilt, muss jeweils untersucht werden.

Transduzierte Fibroblasten sezernierten im Hautkonstrukt wie Keratinozyten hohe Mengen an Genprodukt. In den meisten Studien wurden allerdings entweder Fibroblasten anderer Säugetiere verwendet oder humane Fibroblasten in hautfernes Gewebe transplantiert wie Peritoneum⁴⁴ oder Striatum¹¹¹.

Lu et al. betteten mit dem Gerinnungsfaktor IX transduzierte humane Fibroblasten (siehe 4.2.1.) in eine Kollagenmatrix und injizierten diese in die Haut von Patienten. Neben der Konzentration des Gerinnungsfaktors IX im Patientenblut, die um etwa 70 ng/ml anstieg, verbesserte sich auch die Gerinnbarkeit für mindestens 6 Monate¹²¹. Ebenso wurden humane Fibroblasten mit dem menschlichen Gerinnungsfaktor VIII transduziert und jeweils etwa 25×10^4 Zellen in Kollagenmatrix eingebettet ins Peritoneum von Mäusen transplantiert. Daraufhin stieg die Plasma-Konzentration des Gerinnungsfaktors auf etwa 50 ng/ml.

Leider gibt es bisher keinen direkten Vergleich zwischen transgenen Keratinozyten und Fibroblasten im Hautkonstrukt. In dieser Arbeit wurde deren Sekretionsleistung im Hautkonstrukt erstmals direkt miteinander verglichen.

Nach retroviraler Transduktion produzierten und sezernierten Keratinozyten und Fibroblasten das Transgen Erythropoetin. Allerdings fand sich im Überstand von Hautkonstrukten, in denen nur die Keratinozyten transduziert waren, eine kleine Menge Erythropoetin (3 IU/24 Stunden). Dagegen produzierten Hautkonstrukte mit ausschließlich genetisch veränderten Fibroblasten etwa das Neunfache (25,3 IU/24 Stunden). Hautkonstrukte, bei denen beide Zellarten mit dem Erythropoetin-Vektor transduziert worden waren, produzierten durchschnittlich 30,5 IU/24 Stunden, etwa die Summe der Erythropoetin-Produktion von Hautkonstrukten aus transduzierten Keratinozyten und aus transduzierten Fibroblasten.

Um die Sekretionsleistung transduzierter Zellen im Hautkonstrukt zu beurteilen, ist die Anzahl eingebetteter Keratinozyten und Fibroblasten zum Zeitpunkt der Probenentnahme bedeutsam. Etwa eine Million Keratinozyten wurden auf jedes Hautkonstrukt gesät, von denen einige vor Adhärenz vom Medium herausgespült wurden. Der Rest wuchs schätzungsweise wieder auf eine Million an. Dies ist nach Hengge et al. umgerechnet die geschätzte Summe der Keratinozyten eines 0,79 cm² großen Hautstücks⁸⁴ (Die hergestellten Hautkonstrukte wiesen bei etwa 1 cm

Durchmesser eine Fläche von $0,79 \text{ cm}^2$ auf). In jedes Hautkonstrukt wurden 5×10^5 Fibroblasten eingebracht. Bekanntermaßen proliferieren diese nach Einbettung in eine am Boden haftende extrazelluläre Matrix⁷⁹. Laut Hatamochi et al. kommt diese Proliferation allerdings nach etwa 2 Tagen zum Stehen, weshalb die Fibroblastenzahl auf etwa 2×10^6 geschätzt wurde⁸⁰.

Um die Sekretionsleistung in Hautkonstrukten mit der in Monolayer-Zellkulturen vergleichen zu können, wurde errechnet, wie hoch die Erythropoetin-Menge im Medium von Monolayer-Kulturen wäre, deren Inkubationszeit und Zellzahl den Bedingungen der hergestellten Hautkonstrukte entsprachen hätten (24 Stunden, 1×10^6 Keratinozyten, 2×10^6 Fibroblasten). Da das Erythropoetin im Medium mit der Inkubations-Zeit linear ansteigt (siehe 3.2. Abb. 20), ergeben sich folgende theoretische Werte:

Die transduzierten Keratinozyten sezernierten in Zellkultur 4,8 IU Erythropoetin pro 1×10^6 Zellen in 24 Stunden ($80 \text{ mIU} \times 6 \text{ h} \times 10 \text{ Zellen}$). Im Hautkonstrukt verringerten sie ihre Leistung auf 2,7 IU (1×10^6 Zellen, 24 Stunden). Fibroblasten dagegen steigerten ihre Sekretionsleistung von umgerechnet 9,8 mIU in Zellkultur ($82 \text{ mIU} \times 6 \text{ h} \times 20 \text{ Zellen}$) auf 25 IU im Hautkonstrukt (2×10^6 Zellen, 24 Stunden). Grob halbierten die Keratinozyten ihre Sekretionsleistung im Hautkonstrukt im Vergleich zur Monolayer-Kultur, wogegen die Fibroblasten diese mehr als verdoppelten.

Eine mögliche Ursache dafür wäre beispielsweise ein verändertes Produktionsverhalten der Keratinozyten und Fibroblasten im Hautkonstrukt. Dies könnte möglicherweise durch Wechselwirkungen mit der Umgebung oder durch eigene Gen-Regulation der Zellen erfolgen.

Die Keratinozyten könnten beispielsweise während ihrer Differenzierung die Expression des Erythropoetin-Gens abgeschaltet oder verloren haben, sodass nur die unteren epidermalen Schichten Erythropoetin produzierten. Das transduzierte Erythropoetin-Gen wird allerdings durch den retroviralen LTR-Promotor gesteuert, der nicht epidermal beeinflusst wird. Neben einer Steuerung über Promotoren sind auch andere Formen von schichtspezifischer Expression denkbar. Heise et al. fanden heraus, dass das Cytochrom P450 – Enzym 26A1 in Hautkonstrukten wie in natürlicher Haut im Gegensatz zu Monolayer-Zellkulturen lediglich in den basalen

Keratinocyten exprimiert wurde. Sie vermuten einen mesenchymalen Einfluss auf dessen basale Expression⁸².

Um die Rolle der Differenzierung bei der Expression des Erythropoetin-Gens zu untersuchen, wurden in unserem Labor konfluierende, transduzierte Keratinocyten mit Hilfe einer erhöhten Konzentration von Kalzium im Medium¹⁴⁹ zur Differenzierung angeregt. Dabei sank die Erythropoetin-Konzentration deutlich ab. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass differenzierte Keratinocyten und somit im transgenen Hautkonstrukt die oberen Epidermis-Schichten kein oder weniger Erythropoetin produzieren.

Wäre dies der Fall, könnte die Produktion eventuell durch Verwendung eines anderen Promotors verbessert werden. Weitere Untersuchungen in unserem Labor legen beispielsweise den Verdacht nahe, dass möglicherweise durch die Verwendung eines CMV-Promotors eine höhere Expression des Erythropoetin-Gens in der Epidermis ermöglicht wird. Eine weitere Möglichkeit wäre die Kopplung eines Selektionsgens an das Erythropoetin-Gen, um in den oberen Schichten einer Epidermis durch Selektion ausschließlich genetisch modifizierte Keratinocyten zu erhalten (siehe 4.3.2.).

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit des Ergebnisses ist eine gleich bleibende Produktion von Erythropoetin durch Keratinocyten in Hautkonstrukten bei geändertem Sekretionsverhalten der Zellen oder bei anschließend behindertem Transfer ins Medium.

Dabei spielt besonders die Morphologie der Hautkonstrukte eine Rolle. Es könnte beispielsweise sein, dass Sekretionsprodukte von Keratinocyten der höheren Schichten in der Epidermis in Vergleich zu den basalen Keratinocyten nur in geringem Ausmaß in die darunterliegende Dermis gelangen.

Dagegen sprechen Studien zur Sekretion von Apo E im Hautkonstrukt, durch die Fenjves et al. nachwiesen, dass suprabasale Keratinocyten prinzipiell zur systemischen Sekretion von Transgenen in der Lage sind¹⁷³. Auch in Versuchen, bei denen das Erythropoetin-Gen in menschliche und Maus-Haut eingebracht wurde, ließ sich eine Sekretion von Erythropoetin ins Serum nachweisen. Die genetische Modifikation wurde allerdings in vivo auf Mäusen durchgeführt, so dass neben Keratinocyten auch andere Zelltypen das Erythropoetin-Gen erhielten und exprimierten^{8, 104}.

Hautkonstrukte bilden wie menschliche Haut eine Basalmembran zwischen Epidermis und Dermis⁴⁷. Obwohl diese kaum eine Barrierefunktion hat, kann nicht ausgeschlossen werden, dass bestimmte Proteine wie Erythropoetin diese Basalmembran nur schlecht durchdringen können¹⁷³.

Die Tatsache, dass für die Untersuchungen dieser Arbeit künstliche Hautkonstrukte als Hautmodell für natürliche Haut verwendet wurden, könnte ebenfalls ein Faktor sein, der das Ergebnis beeinflusste (siehe 4.1.3.). Möglich wäre, dass andere transgene Haut-Modelle im Vergleich kleinere oder größere Mengen Erythropoetin ins Medium sezernieren würden. Ebenso könnte die Erythropoetin-Sekretion der hergestellten Hautkonstrukte nach einer Transplantation von den In-vitro-Ergebnissen abweichen.

Bei Hautkonstrukten, die eine Papillenstruktur mit einer vergrößerten Kontaktfläche zur Dermis aufweisen, würde man vermutlich mehr Erythropoetin im Verhältnis zur Epidermis-Fläche messen. Außerdem würde, so wie es in vivo der Fall wäre, die Diffusionsstrecke durch Papillen verkürzt und der Diffusionsgradient durch laufenden Abtransport des Erythropoetins aus dem Medium erhöht (siehe 4.1.3.).

Eine optimale Versorgung der Hautkonstrukte mit Nährstoffen und Sauerstoff durch Kapillaren in vivo würde vermutlich zu einer optimierten Erythropoetin-Produktion führen. In den hergestellten Hautkonstrukten ist die Ernährung der Keratinozyten durch das dermale Äquivalent nicht derart ideal; die intakte Morphologie der Epidermis spricht allerdings für eine relativ gute Versorgung der Keratinozyten in den Hautkonstrukten.

Auch Abweichungen des dermalen Äquivalents von natürlicher Dermis könnten den Erythropoetin-Gehalt des Mediums beeinflusst haben. Die Proliferation der Fibroblasten und die Umbauvorgänge im Kollagen, wie sie bei am Boden haftenden Hautkonstrukten vorkommen⁷⁹, könnte die Herstellung und Ausschüttung von Erythropoetin beeinflusst haben. Allerdings dürften diese Vorgänge Hatamochi et al. zufolge zum Zeitpunkt der Entnahme des Mediums zur Erythropoetin-Messung bereits abgeschlossen gewesen sein⁸⁰.

Es ist bekannt, dass Fibroblasten nach Verringerung ihrer Kontraktionsfähigkeit durch mechanische Irritationen eine vermehrte Protein-Synthese-Aktivität zeigen¹⁰⁹.

Möglich wäre eine Irritation der Zellen durch Vibration des verwendeten Inkubators oder allein durch den Vorgang des Medium-Wechsels.

Obwohl die hergestellten Hautkonstrukte Unterschiede zur natürlichen Haut aufweisen, stellen sie die bestmöglichen und im Vergleich zur Zellkultur wesentlich aussagekräftigeren Modelle für präklinische In-vitro-Untersuchungen dar.

4.3. Medizinische Anwendung von Erythropoetin sezernierenden Hautkonstrukten als Ausblick

Die zukünftige therapeutische Anwendung der in dieser Arbeit untersuchten Form der Gentherapie ist folgendermaßen denkbar: Bei in Frage kommenden Patienten wird ein kleines Hautstück entnommen (siehe Abb. 2). Keratinozyten und Fibroblasten werden daraus isoliert und mit dem retroviralen Erythropoetin-Vektor transduziert. Anschließend werden Hautkonstrukte aus diesen Zellen hergestellt und dem Patienten wieder transplantiert.

4.3.1. Erythropoetin-Dosis bei therapeutischer Anwendung

Es stellt sich die Frage, wie groß eine genetisch modifizierte Hautfläche für die Transplantation sein müsste, um einen ähnlichen Effekt zu erzielen wie bei einer Therapie mit rekombinantem Erythropoetin.

Der Erythropoetin-Serumspiegel eines gesunden Erwachsenen beträgt etwa 10-25 IU/Liter. In der Schwangerschaft steigt die Erythropoetinmenge im Blut auf 35-80 IU/Liter und im hypoxischen Zustand kann sie sich um das 1000-fache erhöhen.

Die Dosierung einer Erythropoetin-Therapie hängt sowohl stark von der individuellen Konstitution eines Patienten als auch von der Ursache der bestehenden Anämie ab. Bei subkutaner Anwendung reduziert sich im Gegensatz zur intravenösen Injektion die benötigte Dosis durchschnittlich um 25 bis 50 Prozent¹⁰², da sich die Halbwertszeit von Erythropoetin im Körper von unter 9 Stunden auf 24 Stunden erhöht. Durchschnittlich könnte man eine Dosierung von 30 IU/kg Erythropoetin s.c. bei renaler Anämie und 150 IU/kg s.c. bei Tumoranämie dreimal wöchentlich annehmen^{81, 19}. Vorausgesetzt ein Patient wiege 70 kg, entspräche dies einer täglichen Dosis von $3/7 \times 30-150 \text{ IU/kg} \times 70 \text{ kg} = 900 \text{ IU}$ (4500 IU).

Da ein Patient bei kontinuierlicher Anwendung eine niedrigere Dosis Erythropoetin benötigt⁷⁸, sind diese Schätzwerte eher zu hoch als zu niedrig.

Jedes in dieser Arbeit hergestellte Hautkonstrukt weist etwa eine kreisrunde epithelialisierte Fläche von 0,79 cm² auf (Durchmesser etwa 1 cm). Hautkonstrukte dieser Größe mit genetisch veränderten Fibroblasten produzierten pro Tag im Durchschnitt jeweils 25,3 IU Erythropoetin. Das sind pro Quadratzentimeter 25,3 IU ÷ 0,79 cm² = 32,0 IU/cm². Um eine Dosis von 900 IU (4500 IU) Erythropoetin pro Tag zu erreichen, müsste eine Fläche von 900 IU ÷ 32,0 IU/cm² = 28,1 cm² bzw. maximal 4500 IU ÷ 32,0 IU/cm² = 140,6 cm² rekombinanter Hautkonstrukte transplantiert werden. Eine solche Fläche lässt sich in der Regel ohne größere Probleme transplantieren.

4.3.2. Möglichkeiten zur Optimierung der Erythropoetin-Sekretion eines Transplantats durch Selektion genetisch modifizierter Zellen

Um Hautkonstrukte herzustellen, die aus möglichst vielen genetisch modifizierten Zellen bestehen, ist es erstrebenswert, diese Zellen anzureichern. Anschließend stellt sich oft das Problem dass die genetische Information nach einiger Zeit verloren geht. Entweder geht die veränderte Zelle zugrunde, beispielsweise ein Keratinozyt durch Differenzierung in eine Hornhaut-Zelle, oder das übermittelte Gen wird abgeschaltet.

Durch Einbringung von zusätzlichen Genen, die den genetisch modifizierten Zellen einen Selektionsvorteil verschaffen, könnte sowohl eine Anreicherung bewerkstelligt als auch ein Gen-Verlust verhindert werden. Dazu transferiert man zusätzlich zu dem Erythropoetin-Gen ein an dieses gekoppeltes Resistenzgen. Dieses macht die genetisch veränderten Zellen unempfindlich gegen Substanzen, die natürlichen Zellen schaden oder deren Teilung verhindern. Beispiele für solche Substanzen sind Neomycin und Kolchizin. Während sich Neomycin nur zur In-vitro-Selektion eignet, da es bei direkter Applikation systemisch toxisch wirkt, kann Kolchizin auch topisch verabreicht werden. Dazu benötigt man niedrige Dosen, die keinen systemischen Schaden anrichten. Die Resistenz gegenüber Kolchizin funktioniert auf folgende Weise: Nach Transduktion menschlicher Keratinozyten mit dem MDR 1-Gen (multidrug resistance), exprimieren diese P-Glykoproteine (transmembrane Proteine) die eine Vielzahl toxischer Stoffe wie Anthracycline, Epipodophyllotoxine,

Vinalkaloide, Taxane oder Kolchizin aus der Zelle schleusen^{117,170}. Keratinozyten, die mit MDR transduziert und anschließend durch Kolchizin angereichert wurden, behielten ihre Fähigkeit, zu proliferieren und eine differenzierte Epidermis zu bilden¹⁴³. Damit Keratinozyten nun das gewünschte Transfer-Gen zusammen mit dem MDR-Gen aufnehmen, lassen sich bicystronische Vektoren herstellen, in denen beide Gene aneinander gekoppelt sind und von einem gemeinsamen Promotor aus gesteuert werden.

Dies eröffnet die Möglichkeit einer gezielten Anreicherung transduzierter Zellen und einer Herstellung von Hautkonstrukten, in denen sichergestellt ist, dass sämtliche Zellschichten mit Ausnahme der kernlosen Zellen das Erythropoetin-Gen exprimieren. Außerdem wäre es möglich, transduzierte Keratinozyten auch in vivo durch topisches Auftragen von Kolchizin-Creme anzureichern und auf diese Weise einen Verlust des Erythropoetin-Gens zu verhindern¹⁴⁴.

4.3.3. Sicherheit retroviraler Gentherapie

Vor jeder klinischen Verwendung von genetisch verändertem Gewebe, sollte man sich ernsthaft mit den Risiken auseinandersetzen, die ein Gentransfer mit sich bringt.

4.3.3.1. Verwendung retroviraler Vektoren

Besonders der Einsatz von therapeutischen, retroviralen Vektoren in der humanen Gentherapie verlangt ein hohes Maß an Sicherheit.

Zum einen besteht die Gefahr, dass ein transferierter Vektor sich an einen ungünstigen Ort des Wirtgenoms integriert und dadurch Onkogene aktiviert oder Tumor- Suppressorgene ausschaltet (Insertionsmutagenese).

Des Weiteren könnten sich replikationskompetente Retroviren (RCR) bilden, die sich unkontrolliert im Organismus ausbreiten und ebenso durch Insertionsmutagenese pathogene Effekte, wie die Entstehung von malignen Tumoren, hervorrufen²⁹. Die Bildung von T-Zell-Lymphomen durch amphotrope RCR in nicht-humanen Primaten wurde nach Gentherapie beobachtet⁴². Deshalb ist die Verwendung von RCR-freien Vektoren aus sicheren Verpackungszellen in der humanen Gentherapie unerlässlich. Die Bildung von RCR beruht auf Rekombinationsereignissen. Erstens sind Rekombinationen zwischen retroviralem Vektor und endogenen, zufällig im

Verpackungszellgenom integrierten, retroviralen Sequenzen möglich. Allerdings besitzen humane Verpackungszellen wie Ampho 293-Zellen kaum endogene Retrovirussequenzen, die Homologien zu den Funktionsgenen und den rekombinanten Virusgenomen aufweisen^{153, 176}. Damit wird die Wahrscheinlichkeit von homologen Rekombinationen und der Entstehung von RCR deutlich reduziert. Zweitens spielen bei der Bildung von RCR Homologien zwischen retroviralem Vektor und den viralen Funktionsgenen in Verpackungszellen eine wichtige Rolle¹⁸⁹. Um diese Wahrscheinlichkeit möglichst gering zu halten, modifizierte man die viralen Funktionsgene folgendermaßen: Gag-pol- und env-Gene wurden auf zwei separaten transkriptionellen Einheiten in die Zelllinien eingebracht (siehe Kapitel 1.3.2.1.3., Abb. 8). Sie enthalten statt weiteren retroviralen Sequenzen heterologe Promotoren¹⁵³. Die Bildung von RCR kann jedoch auch hier nicht völlig ausgeschlossen werden, da noch immer geringfügige Sequenzüberlappungen zwischen dem rekombinanten Virusgenom und den Funktions-Gen-Sequenzen bestehen.

Aus diesem Grund werden in der klinischen Forschung zurzeit virale Vektoren hauptsächlich bei derart schweren Krankheiten verwendet, bei denen der mögliche Nutzen höher ist als das Risiko⁷¹. Für eine Gentherapie mit Erythropoetin bedeutet dies, dass im Moment vor allem Tumorkranken im Spätstadium für eine solche Therapie in Frage kämen. Auch in Zukunft wird Gentherapie immer nach einer strengen Nutzen-Risiko-Analyse beurteilt werden müssen. Allerdings wird daran gearbeitet, virale Vektoren noch sicherer zu machen. Denkbar wäre beispielsweise ein Vektor, dessen Bestandteile aus ursprünglich verschiedenen Viren besteht, weshalb eine Bildung von RCR ausgeschlossen wäre.

4.3.3.2. Nebenwirkungen von Erythropoetin

Neben den allgemeinen Risiken einer Gentherapie sollte man sich auch damit auseinandersetzen, welche Nebenwirkungen das Produkt des therapeutischen Transfers sowohl bei physiologischer Dosierung als auch bei Überdosierung haben kann. Eine zu hohe Dosierung von Erythropoetin kann zu einer massiven Vermehrung von roten Blutkörperchen führen^{163, 180}. Daraus folgt eine deutliche Erhöhung der Blut-Viskosität, wodurch die Herzarbeit steigt und Herzversagen, venöse Thrombosen und durchblutungsbedingte zerebrale Schäden entstehen können^{11, 165}.

Auch bei mäßiger Dosierung von Erythropoetin sind Nebenwirkungen möglich. So wurden grippeähnliche Symptome, Durchfälle und eine verstärkte Ödemneigung beschrieben¹²³. Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, die mit Erythropoetin behandelt wurden, kam es verstärkt zu einer Hypertonie. Es wird allerdings diskutiert, ob dies nicht allein auf die defekte Blutdruckregulation der kranken Niere zurückzuführen war¹²⁷. In Einzelfällen wurden nach subkutaner Behandlung mit rekombinantem Erythropoetin spezifische Antikörper gegen dieses nachgewiesen²⁵. Eine Erklärung dafür könnte das Glykosilierungsmuster von rekombinantem Erythropoetin sein²⁶. Bei seiner Herstellung erhält das heute im Handel erhältliche Erythropoetin die artspezifische Glykosilierung von Hamsterzellen, die es produzieren. Doch auch nach Transfer der homologen Erythropoetin-DNS in Primaten entwickelten diese Antikörper gegen Erythropoetin, wofür es noch keine Erklärung gibt²⁸.

4.3.3.3. Steuerungsmöglichkeiten von Transfergen

Da Erythropoetin für den Menschen in zu hoher Konzentration schädlich ist (siehe 4.3.3.2.), ist es notwendig, seine Ausschüttung in genetisch veränderten Zellen in vivo zu kontrollieren.

Zum Ersten müsste bereits vor der Transplantation eines Hautkonstrukts untersucht werden, wie viel Erythropoetin voraussichtlich in vivo sezerniert wird. Somit kann bestimmt werden, wie viele Hautkonstrukte transplantiert werden müssen, um eine bestimmte Blut-Erythropoetin-Konzentration zu erzielen. Durch Messungen des Blut-Erythropoetin-Wertes, des Hämoglobins und des Hämatokrits eines behandelten Patienten kann die Erythropoetin-Konzentration kurz- und langfristig beobachtet werden. Wenn diese dauerhaft zu hoch ist, kann sie durch Entfernung eines Stückes veränderter Haut gesenkt werden. Dies ist allerdings eine sehr ungenaue und umständliche Methode.

Viel eleganter ist die Kopplung bestimmter Enhancer-Promotor-Kombinationen an das Transgen, um seine Expression von außen beeinflussen zu können. Dazu werden zusätzlich spezifische Transkriptionsfaktoren benötigt, die direkt mit dem dem Transgen vorgeschalteten Promotor kommunizieren können. Die genetische Information zur Herstellung solcher passenden Transkriptionsfaktoren wird

gleichzeitig mit dem gewünschten Transgen übermittelt. Eine Steuerung der Genexpression bewirken die eingesetzten Transkriptionsfaktoren allerdings ausschließlich zusammen mit einem Medikament, das oral oder topisch zugeführt wird.

Verschiedene solcher beschriebenen Systeme sind in Entwicklung³². Das folgende System, das beispielsweise mit Hilfe des Antibiotikums Doxycyclin wirkt, hat im Maus-Modell zu einer Langzeitexpression von Erythropoetin geführt. Das Erythropoetin-Gen wurde an einen mit Tetracyclin-Operator-Sequenzen modifizierten Cytomegalie-Virus-Promotor gekoppelt⁷⁶. Zusätzlich wurde ein Gen in die Zielzellen eingebracht, das für ein Transaktivator-Protein kodiert, das an den modifizierten Cytomegalie-Promotor in Gegenwart von Doxycyclin bindet und so eine Transkription des Erythropoetin-Gens aktiviert¹⁶. Mit diesem System konnte die Produktion von Erythropoetin willkürlich an- und abgeschaltet werden.

Ein weiteres System wirkt mit Hilfe von Antiprogestinen: Eine modifizierte Bindungs-Region des Progesteron-Rezeptors hat die Eigenschaft, auf Antiprogestine (z.B. Mifepriston) als Agonisten zu reagieren. Nach Kopplung spezifischer DNS-Bindungsstellen und Transkriptions-Aktivator-Bereiche an dieses Protein funktioniert es als Antiprogestin-induzierbarer Transkriptionsfaktor für Transgene, gebunden an Promotoren mit spezifischen DNS-Bindungs-Einheiten (siehe Abb. 34)¹³⁶. Dieses System führte nach In-vitro- und In-vivo-Gentransfer im Tierversuch durch orale Mifepriston-Gabe zu Langzeitsekretion von Erythropoetin im Muskel.

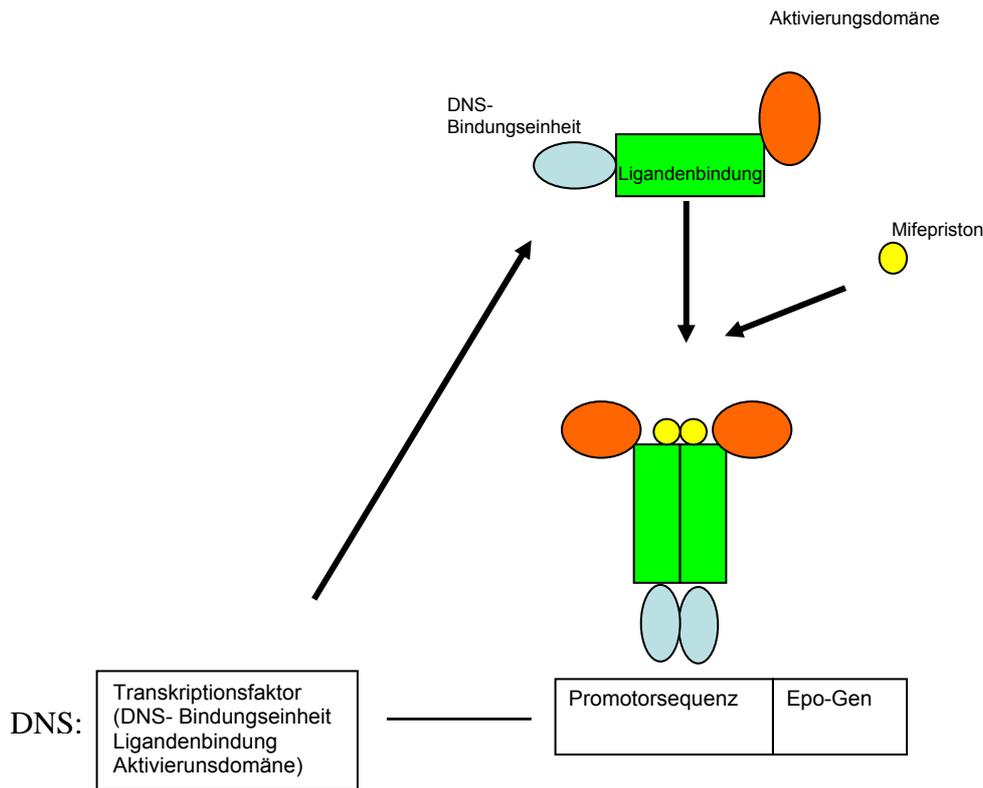


Abbildung 34: Links unten schematische Darstellung der Gene zur Herstellung eines Transkriptionsfaktors, der aus DNS-Bindungseinheit, einer Ligandenbindungseinheit und einer Aktivierungsdomäne besteht. Oben mittig durch Pfeil verbunden Transkriptionsfaktor aus DNS-Bindungseinheit, Ligandenbindungseinheit und Aktivierungsdomäne. Durch Anlagerung des Antiandrogens Mifepriston (gelber Kreis) wird ein Dimer aus zwei Fusionsproteinen gebildet. Dieses lagert sich an die Promotorsequenz des Erythropoetin-Gens (Epo-Gen) (unten rechts) und bewirkt dessen Transkription¹⁷⁴.

Auch die Gen-Regulation mit Hilfe endogener Glukokortikoidrezeptoren, ist möglich. Durch Kopplung des Transgens an Steroid-Promotoren und Steuerung der Expression durch topische Glukokortikoid-Gabe konnte in Hautzellen die Produktion von Erythropoetin reguliert werden¹⁶⁶. Vorteil dieser Methode ist, dass ein körpereigenes Protein benutzt wird, gegen das eine Immunreaktion unwahrscheinlich ist. Weitere Regulationssysteme wirken mit Hilfe chemischer Dimere wie Rapamycin und seinen Analoga. Ein Dimer hat die Fähigkeit, zwei Proteine gleichzeitig zu binden. Ein solches System führte mehrere Monate lang erfolgreich zur Erythropoetin-Produktion bei Mäusen und Primaten. Hierbei wurden heterologe Transkriptionsfaktoren hergestellt, die sich selektiv an einen Erythropoetin-Promotor lagerten und in Anwesenheit von Rapamycin eine Transkription aktivierten^{194, 156} (siehe Abb. 35).

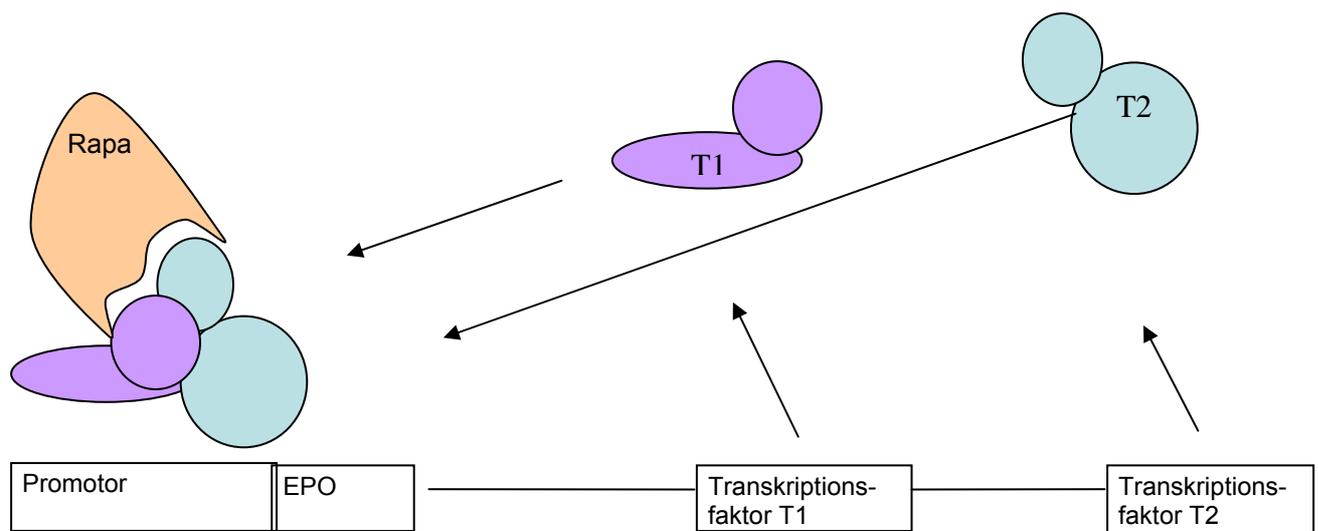


Abbildung 35: Links unten Darstellung des Erythropoetin-Gens (EPO) und eines vorgeschalteten Transkriptionsfaktor-abhängigen Promotors. Rechts davon Gene zur Herstellung des Transkriptionsfaktors T1 (genaue Bezeichnung ZFHD1-FKBP, welcher aus dem DNS-Bindungsprotein (ZFHD 1) und Rapamycin-Bindungsprotein (FKBP) besteht). Am rechten unteren Rand Gene zur Herstellung des Transkriptionsfaktors T2 (genaue Bezeichnung FRB, welcher sich aus DNS-Aktivierungsprotein p65 und Rapamycin-Bindungsprotein FRAP zusammensetzt). Rechts oben Transkriptionsfaktoren T1 und T2, links oben der Komplex aus den Transkriptionsfaktoren T1 und T2 mit Rapamycin (Rapa). Dieser bewirkt nach Bindung des transkriptionsfaktor-abhängigen Erythropoetin-Promotors, eine Transkription des Erythropoetin-Gens.

Um eine möglichst natürliche Regulation des Erythropoetin-Gens zu erreichen, wurden auch modifizierte physiologische Erythropoetin-Promotoren und Enhancer eingesetzt, die durch Sauerstoffmangel aktiviert werden. Natürlicherweise wird bei Hypoxie ein Transkriptionskomplex (HIF-1: hypoxia-inducible factor 1) von verschiedenen Zellen im Körper ausgeschüttet¹⁶². Dieser Komplex bindet an eine Enhancer-Struktur (HRE: hypoxia-response element), die anschließend die Transkription des Erythropoetin-Gens stimuliert¹²⁶. In vitro und In vivo kam es mit Hilfe von Erythropoetin-Vektoren, die Promotoren auf Basis dieser Enhancer-Struktur enthielten, zu einer verstärkten Erythropoetin-Sekretion bei Sauerstoffmangel¹⁵⁵. Nach intramuskulärer Injektion eines solchen Vektors wurde bei Mäusen mit angeborener Anämie (Epo-Tag^h-Mäuse, Hämatokrit durchschnittlich 18%) der Hämatokrit auf 46-50% für die Dauer einer sieben Monate langen Studie angehoben. Bei gesunden „Kontroll-Mäusen“ dagegen blieb der Hämatokrit nach der Gen-Therapie auf physiologischen Werten¹³.

Noch sind geeignete Regulationsgen-Systeme nicht ausgereift, doch wird dieses Prinzip in Zukunft eine wichtige Rolle in der Gentherapie spielen, besonders bei der Produktion von Stoffen, deren Blutkonzentration nur gering vom Sollwert abweichen darf (zum Beispiel Insulin).

5. Zusammenfassung

Erythropoetin ist ein menschliches Hormon, das die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen kontrolliert und beschleunigt. Eine Vielzahl von Patienten leidet durch relativen und absoluten Erythropoetin-Mangel an Anämie. Therapeutisch ist eine regelmäßige intravenöse oder subkutane Verabreichung möglich, doch aufgrund von hohen Kosten werden weit weniger Patienten mit Erythropoetin behandelt als davon profitieren könnten.

Eine mögliche alternative Behandlungsform ist die Gentherapie der Hautzellen von behandlungsbedürftigen Patienten. Keratinozyten und Haut-Fibroblasten könnten das mangelnde Hormon wie natürlicherweise die renalen Fibroblasten ins Blutssystem sezernieren.

Menschliche Haut ist aus verschiedenen Gründen ein ideales Zielorgan für gentherapeutische Behandlungen. Sie ist für die Entnahme von Zellen, zur Transplantation und zur Überwachung eines genetisch veränderten Areals direkt zugänglich. Keratinozyten und Fibroblasten lassen sich unkompliziert in Kultur vermehren, genetisch verändern und in Form eines Hautkonstrukts anzüchten.

Neben einer Gentherapie mit dem Erythropoetin-Gen sind auch andere Formen der genetischen Veränderung von Hautzellen denkbar. Wissenschaftliche, gentherapeutische Untersuchungen an Hautzellen sind die Basis für eine Vielzahl möglicher zukünftiger Behandlungsformen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Keratinozyten und Fibroblasten für eine retrovirale Transduktion mit dem Erythropoetin-Gen geeignet sind. Es wurde geprüft, ob beide Zellarten anschließend eine unterschiedliche Menge an Erythropoetin produzieren und sezernieren.

Dazu wurde zunächst das humane Erythropoetin-Gen mit Hilfe einer Verpackungszelllinie in replikationsdefiziente retrovirale Vektorhüllen eingebracht.

Anschließend wurden sowohl menschliche Keratinozyten als auch Fibroblasten mit dem hergestellten Vektor transduziert. Um die Produktions- und Sekretionsleistung der veränderten Zellen zu vergleichen, wurde ihr Kultur-Medium mit Hilfe eines ELISA auf Erythropoetin untersucht.

Es zeigte sich, dass transduzierte Keratinozyten und Fibroblasten statistisch die gleiche Menge Erythropoetin ins Medium sezernieren.

Zusätzlich wurde ein Hautkonstruktmodell etabliert, das menschlicher Haut morphologisch und funktionell sehr ähnlich ist. Da Hautzellen ihre Morphologie und ihr Verhalten nach Differenzierung in eine Haut stark ändern, ist deren Untersuchung mit Hilfe von Hautkonstrukten allgemein von großem Interesse.

Aus den genetisch modifizierten Zellen wurden Hautkonstrukte hergestellt, die in fertigem Zustand von Seite der Fibroblastenschicht mit Medium versorgt wurden. Auch hier wurde die Erythropoetin-Konzentration im Medium gemessen und die Werte von Konstrukten verschiedener Kombinationen von veränderten und nicht veränderten Keratinozyten und Fibroblasten miteinander verglichen.

Es stellte sich heraus, dass Fibroblasten im Hautkonstrukt deutlich mehr Erythropoetin ins Medium sezernieren als Keratinozyten. Sie verdoppelten ihre Sekretionsleistung im Vergleich zur Monolayer-Kultur, im Gegensatz zu den Keratinozyten, die diese halbierten.

Möglicherweise stoppten die Keratinozyten im Rahmen ihrer Differenzierung die Produktion von Erythropoetin. Die alternative Erklärung wäre ein behinderter Sekretionsweg des Erythropoetins aus Keratinozyten durch die Dermis hindurch ins Medium.

Den Ergebnissen zufolge könnten Fibroblasten für eine Gentherapie mit Erythropoetin besser geeignet sein als Keratinozyten.

Hautkonstrukte aus genetisch veränderten Fibroblasten produzierten eine für die klinische Anwendung ausreichende Menge Erythropoetin. Wenige Hautkonstrukte könnten nach Transplantation eine ausreichende Menge Erythropoetin zur Behandlung eines Patienten bereitstellen. Es ist also konkret vorstellbar, dass

Hautkonstrukte wie sie in dieser Arbeit hergestellt wurden, am Patienten zu dessen therapeutischem Nutzen angewendet werden.

Für diesen Fall ist es allerdings wünschenswert, retroviralen Gentransfer noch sicherer zu gestalten.

Zusätzlich wäre die Kopplung des Transgens Erythropoetin an einen eventuell topisch steuerbaren Promotor für eine zukünftige Anwendung denkbar.

5. Literatur

- 1) Agrawal N, You H, Liu Y, Chiriva-Internati M, Bremner J, Garg T, Grizzi F, Krishna Prasad C, Nehta JL, Hermonat PL: Generation of recombinant skin in vitro by adeno-associated virus type 2 vector transduction (2004) *Tissue Eng* 10(11-12):1707-15
- 2) Alexander MY, Bidichandani SI, Cousins FM, Robinson CJ, Duffie E, Akhurst RJ: Circulating human factor IX produced in keratin-promotor transgenic mice: a feasibility study for gene therapy of haemophilia B (1995) *Hum Mol Genet* 4(6):993-9
- 3) Archambault M, Yaar M, Gilchrist BA: Keratinocytes and fibroblasts in a human SE model enhance melanocyte survival and melanin synthesis after ultraviolet irradiation (1995) 104:859-67
- 4) Asselineau D, Bernard BA, Bailly C, Darmon M, Prunieras M: Human epidermis reconstructed by culture: is it „normal“? (1986) *J Invest Dermatol* 86(2):181-6
- 5) Ataka K, Maruyama H, Neichi T, Miyazaki J, Gejyo F: Effects of erythropoietin-gene electrotransfer in rats with adenine-induced renal failure (2003) *Am J Nephrol* 23(5):315-23
- 6) Auger FA, Lopez Valle CA, Guignard R, Tremblay N, Noel B, Goulet F, Germain L: Skin equivalent produced with human collagen (1995) *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31:432-39
- 7) Auger FA, Pouliot R, Trambly M, Guignard R, Noel P, Juhasz J, Germain L, Goulet F: Multistep production of bioengineered skin substitutes: sequential modulation of culture conditions (2000) *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 36:96-103
- 8) Baek SC, Lin Q, Robbins PV, Fan H, Khavari PA: Sustainable systemic delivery via a single injection of lentivirus into human skin tissue (2001) *Hum Gene Ther* 12(12):1551-8
- 9) Baldeschi C, Gache Y, Rattenholl A., Bouillé P, Danos O, Ortonne J-P, Bruckner-Tuderman L, Meneguzzi G: Genetic Correction of canine dystrophic epidermolysis bullosa mediated by retroviral vectors (2003) *Hum Mol Genet* Vol.12 No 15 1897-1905
- 10) Bellini MH, Peroni CN, Bartolini P: Increases in weight of growth hormone-deficient and immunodeficient (lit/scid) dwarf mice after grafting of hGH-secreting, primary human keratinocytes (2003) *FASEB Jour* 10.1096/fj.03-0018fje.
- 11) Bennett WM: Side effects of erythropoietin therapy (1991) *Am J Kidney Dis* 18(Suppl 1):84-6
- 12) Berman DH, Friedman EA: Partial absorption of hard exudates in patients with diabetic en-stage renal disease and severe anaemia after treatment with erythropoietin (1994) *Retina* 14:1-5
- 13) Binley K, Askham Z, Iqbal S, Spearman H, Martin L, De Alwis M, Thrasher AJ, Ali RR, Maxwell PH, Kongsman S, Naylor S: Long-term reversal of chronic anemia using a hypoxia-regulated erythropoietin gene therapy (2002) *Gene Ther* 10(7) 2406-13
- 14) Birkenbach JB, Roop DR: Transduction of a Preselected Population of Human Epidermal Stem Cells: Consequences for Gene Therapy (1999) *Proceedings of the Assoc of Am Phys VIII*, N3.pp.184-189
- 15) Bohl D, Bosch A, Cardona A, Salvetti A, Heard JM: Improvement of erythropoietin delivery from muscle (2000) *Blood* 95: 9
- 16) Bohl D, Naffakh N, Heard JM: Long-term control of erythropoietin secretion by doxycycline in mice transplanted with engineered primary myoblasts (1997) *Nat Med* 3: 3
- 17) Bondurant MC, Koury MJ: Anemia induces accumulation of erythropoietin mRNA in the kidney and liver (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:2731-2733
- 18) Braverman IM: The cutaneous microcirculation (2000) *J Invest Dermatol Symp Proc* 5(1):3-9
- 19) Brimble KS, Rabbat CG, McKenna P: Protocolized anemia management with erythropoietin in hemodialysis patients: a randomized controlled trial (2003) *J Am Soc Nephrol.* 14:2654
- 20) Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A: Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury (2000) *PNAS* Vol 97 Nr 19 10526-10531
- 21) Buemi, M, Aloisi C, Cavallaro, E, Corica F, Floccari F, Grasso G, Lasco A, Pettinato G, Ruello A, Sturiale A, Frisina N: Recombinant human erythropoietin (rHuEPO): More than just the correction of uremic anemia (2002) *J Nephrol* 15:97-103

- 22) Burk M, Schneider W: Anämien. In: Freund M (hrsg) Thiemes Innere Medizin, Hämatologie/internistische Onkologie (1999) Stuttgart S. 835
- 23) Byrne C, Fuchs E: Probing kartinocyte and differentiation specificity of the human K5 promoter in vitro and in transgenic mice (1993) *Mol Cell Biol* 13:3176
- 24) Cao R, Wang X-J, Roop DR: Regulated cutaneous gene delivery: The skin as a bioreactor (2000) *Hum Gene Ther* 11:2297-300
- 25) Casadevall N, Dupuy E, Molho-Sabatier P, Tobelem G, Varet B, Mayeux P: Brief Report: Autoantibodies against erythropoietin in a patient with pure red-cell aplasia (1996) *N Engl J Med* 334-630
- 26) Casadevall N: Antibodies against rHuEPO: native and recombinant (2002) *Nephrol Dial Transplant* 17 Suppl 5:42-47
- 27) Cazzola M: Use of recombinant human erythropoietin in anemia of malignancy (1998) *Med Onco* 15, Suppl. 1 1-2
- 28) Chenuaud P, Larcher T, Rabinowitz JE, Provost N, Cherel Y, Casadevall N, Samulski RJ, Moullier P: Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy (2004) *Blood*. 103(9):3303-4
- 29) Chong H, Starkey W, Vile RG: A replication-competent retrovirus arising from a split-function packaging cell line was generated by recombination events between the vector, one of the packaging constructs, and endogenous retroviral sequences (1998) *J Virol* 72, 2663-3670
- 30) Christensen R, Güttler F, Jensen TG: Comparison of epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts as potential target cells for somatic gene therapy of phenylketonuria (2002) *Mol Gen Meta* 76:313-8
- 31) Christensen R, Jensen UB, Jensen TG: Cutaneous gene therapy – an update (2001) *Histochem Cell Biol* 115:73-82
- 32) Clackson T: Regulated gene expression systems (2000) *Gene Ther* 7: 120-125
- 33) Contard P, Bartel RL, Jacobs L, Perlish JS, MacDonald ED, Handler L, Cone D, Fleischmajer R: Culturing keratinocytes and fibroblasts in a three-dimensional mesh results in epidermal differentiation and formation of a basal lamina-anchoring zone (1993) *J Invest Dermatol*. 100(1):35-9
- 34) Cooper ML, Hansbrough JF, Spielvogel RL, Cohen R, Bartel RL, Naughton G: In vivo optimization of a living dermal substitute employing cultured human fibroblasts on a bio-degradable polyglycolic acid or polyglactin mesh (1991) *Biomaterials* 12:243-8
- 35) Dai YF, Qiu XF, Xue JL, Liu ZD: High efficient transfer and expression of human clotting factor IX cDNA in cultured human primary skin fibroblasts from hemophilia B patient by retroviral vectors (1992) *Sci China B* 35(2):183-93
- 36) Daigl M: Die somatische Gentherapie – Technologie und Erwartungen; Semesterarbeit im Rahmen Technik und Gesellschaft
- 37) Dainiak N: Control of haematopoietic cell growth by somatomedins (1993) *Ex- Hematol* 21:1405-1407
- 38) Dalle B, Payen E, Beizard Y: Modulation of transduced erythropoietin expression by iron (2000) *Exp Hem* 28 760-764
- 39) Davenport A: The effect of treatment with recombinant human erythropoietin on skeletal muscle function in patients with end-stage renal failure treated with regular haemodialysis (1993) *Am J Kidney Dis* 22:685-690
- 40) De Campos E, Radford J, Steward W, Milroy R, Dougal M, Swindell R, Testa N, Thatcher N: Clinical and in vitro effects of recombinant human erythropoietin in patients receiving intensive chemotherapy for small-cell lung cancer (1995) *J Clin Oncol* 13:1623-1631
- 41) Descamps V, Blumenfeld N, Beuzard Y, Perricaudet M: Keratinocytes as a target for gene therapy. Sustained production of erythropoietin in mice by human keratinocytes transduced with an adenoassociated virus vector (1996) *Arch Dermatol* 132(10):1207-1211

- 42) Donahue RE, Kessler SW, Bodine D, McDonagh K, Dunbar C, Goodman S, Agricola B, Byrne E, Raffeld M, Moen R, Bacher J, Zsebo KM, Nienhuis AW: Helper virus induced T-cell lymphomas in non-human primates after retroviral mediated gene transfer (1992) *J Exp Med* 176 1125-1135
- 43) Dotto GP: Signal transduction pathways controlling the switch between keratinocyte growth and differentiation (1999) *Crit Rev Oral Biol Med* 10(4):442-57
- 44) Dwarki VJ, Belloni P, Nijjar T, Smith J, Couto L, Rabier M, Clift S, Berns A, Cohen LK: Gene therapy for hemophilia A: Production of therapeutic levels of human factor VIII in vivo in mice (1995) *Proc Natl Acad Sci* 92:1023-27
- 45) Eckert RL, Crish JF, Efimova T, Dashti SR, Deucher A, Bone F, Gautam A, Huang G, Gopalakrishnan R, Balasubramanian S: Regulation of involucrin gene expression (2004) *J Invest Derm* 123:13-22
- 46) Eckert RL, Sturniolo MT, Broome AM, Ruse M, Rorke EA: Transglutaminase function in epidermis (2005) *J Invest Dermatol* 124:481-492
- 47) Ehrlich H P: Understanding experimental biology of skin equivalent: from laboratory to clinical use in patients with burns and chronic wounds (2004) *Am Journ of Surgery* V187, I 5, Supp 1
- 48) Eriksson E, Yao F, Svensjo T, Winkler T, Slama J, Macklin MD, Andree C, McGregor M, Hinshaw V, Swaub WF: In-Vivo gene transfer to skin and wound by microseeding (1998) *J Surg Res* 78:85-91
- 49) Erslev A, Soltan A: Erythropoietin in the pathogenesis and treatment of the anemia of chronic renal failure (1997) *Kidney Int Vol51* pp622-630
- 50) Fakhazadeh SS, Zhang Y, Sarkar R, Kazazian HH Jr: Correction of the coagulation defect in hemophilia A mice through factor VIII expression in skin (2000) *Blood* 95(9):2799-805
- 51) Falo LD: Targeting the skin for genetic immunization (1999) *Proc Assoc Am Phys* 111:211-219
- 52) Fattori E, Cappelletti M, Zampaglione I, Mennuni C, Calvaruso F, Arcuri M, Rizzuto G, Costa P, Perretta G, Ciliberto G, La Monica N: Gene electro-transfer of an improved erythropoietin plasmid in mice and non-human primates (2004) *J Gene Med*.
- 53) Fellner Sk, Lang RM, Neumann A, Korcarz D, Borow KM: Cardiovascular consequences of the correction of the anemia of renal failure with erythropoietin. (1993) *Kidney int* 44:1309-1315
- 54) Fenjves ES, Schwartz PM, Blaese RM, Taichman LB: Keratinocyte gene therapy for adenosine desaminase deficiency: a model approach for inherited metabolic disorders (1997) *Hum Gene Ther* 8:911-917
- 55) Fenjves ES, Smith J, Zaradic S, Taichman LB: Systemic delivery of secreted protein by grafts of epidermal keratinocytes: prospects for keratinocyte gene therapy (1994) *Hum Gene Ther.* 5:1241-1248
- 56) Finch CA: Erythropoiesis, erythropoietin, and iron (1982) *Blood* 60:1241-1246
- 57) Fischl M, Galpin JE, Levine JD, Groopman JE, Henry DH, Kennedy Pm Miles S, Rovvins W, Starrett B, Zalusky R, et al: Recombinant human erythropoietin for patients with AIDS treated with zidovudine (1990) *N Engl J Med* 322:1488
- 58) Fleischmajer R, MacDonald ED, Contard P, Perlish JS: Immunochemistry of a keratinocyte-fibroblast co-culture model for reconstruction of human skin (1993) 41(9):1359-66
- 59) Fransson J, Heffler LC, Tengvall Linder M, Scheynius A: Culture of epidermal Langerhans cells in a SE (1998) *Br J Dermatol* 139:598-604
- 60) Frede S, Fandrey J, Pagel H, Hellwig T, Jeklmann W: Erythropoietin gene expression is suppressed after lipopolysaccharide or interleukin-1 beta injections in rats (1997) *Am J Physiol* 273:R 1067
- 61) Freeman SM, Ramesh RM, Marrogi AJ: Immune system in suicide-gene therapy (1997) *Lancet* 349:2
- 62) French NS, Norton JD: Structure and functional properties of mouse VL30 retrotransposons (1997) *Biochem Biophys Acta* 1352: 33-47
- 63) Gabrilove J: Overview: Erythropoiesis, Anemia, and the Impact of Erythropoietin (2000) *Semin Hematol* 37(6):1-3

- 64) Gaffer U, Kalechman Y, Orlin JB, Levi J, Sredni B: Anemia of uremia is associated with reduced in vitro cytokine secretion: Immunopotentiating activity of red blood cells (1994) *Kidney Int* 45:224-231
- 65) Ganser A: Anämie bei weiteren chronischen Erkrankungen. In: Freund M (hrsg), Hämatologie/internistische Onkologie, Thiemes Innere Medizin. Georg Thieme Verlag Stuttgart (1999) 835
- 66) Ganser A: Myelodysplastische Syndrome. In: Freund M (eds), Hämatologie/internistische Onkologie, Thiemes Innere Medizin. Georg Thieme Verlag Stuttgart (1999) 864
- 67) Garlick JA, Katz AB, Fenjves ES, Taichman LB: Retrovirus – mediated transduction of cultured epidermal keratinocytes (1991) *J Invest Dermatol* 97:824-829
- 68) Ghazizadeh S, Doumeng C, Taichman LB: Durable and stratum-specific gene expression in epidermis (2002) *Gene Ther* 9(19):1278-85
- 69) Ghazizadeh S, Harrington R, Garfield J, Taichman LB: Retrovirus mediated transduction of porcine keratinocytes in organ culture (1998) *J Invest Dermatol* 111:492-496
- 70) Gibbs S, Vicanova J, Bouwstra J, Valstar D, Kempenaar J, Ronc M: Culture of reconstructed epidermis in a defined medium at 33°C shows a delayed epidermal maturation, prolonged lifespan and improved stratum corneum (1997) *Arch Dermatol Res* 289:585-95
- 71) Ginn SL, Curtin JA, Kramer B, Smyth CM, Wong M, Kakakios A, McCowage GB, Watson D, Alexander SI, Latham M, Cunningham SC, Zheng M, Hobson L, Rove TB, Fischer A, Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey-Abina S, Alexander IE: Treatment of an infant with X-linked severe combined immunodeficiency (SCID-X1) by gene therapy in Australia (2005) *Med J Aust.* 2.182(9):458-63
- 72) Glasspool-Malone J, Somiari S, Drabick JJ, Malone RW: Efficient nonviral cutaneous transfection (in process citation) (2000) *Mol Ther* 2:140-146
- 73) Goldwasser E, Jacobson LO, Fried W, Plzak LF: Studies of erythropoiesis, V: The effect of cobalt on the production of erythropoietin (1958) *Blood* 13:55
- 74) Goodnough LT, Skikne B, Brugnara C: Erythropoietin, iron and erythropoiesis (2000) *Blood Vol* 96 Nr 3
- 75) Gordon DA, Fenjves ES, William DL, Taichman LB: Synthesis and secretion of apolipoprotein E by cultured human keratinocytes (1998) *J Invest Dermatol* 92:96-99
- 76) Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujatrd H: Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells (1995) *Science (Washington DC)* 268:1766-1769
- 77) Graham FL, Smiley JR, Russel WC, Nairn R: Characteristics of a human cell line transformed by DNS from adenovirus type 5 (1977) *J Gen Virol* 36:59-72
- 78) Granolleras C, Branger B, Beau MC: Experience with daily self-administered subcutaneous erythropoietin (1989) *Contrib Nephrol* 76:143
- 79) Grinnell F: Fibroblasts, Myofibroblasts and wound contraction (1994) *J Cell Biol* 124,401-4
- 80) Hatamochi A, Aumailley M, Mauch C, Chu ML, Timpl R, Krieg T: Regulation of collagen VI expression in fibroblasts. Effects of cell density, cell-matrix interactions, an chemical transformation (1989) *J Biol Chem* 264:3494-3499
- 81) Haustein KO: Mittel zur Behandlung von Blutbildungsstörungen, zum Blutersatz zur Thromboseprophylaxe, zur Behandlung von Hämostase- und Fibrinolysestörungen und zur Verbesserung der Fließeigenschaften des Blutes. In: Estler CJ (eds) Schattauer: Stuttgart (2000) S. 364
- 82) Heise R, Mey J, Neis M, Jousen S, Marquardt Y, Ott H, Merk HF, Baron J: Retinoid homeostasis in skin is dependent on expression of CYP26A1 that is restricted to basal keratinocytes in normal human skin, inflammatory skin diseases and differentiated 3d-skin models (2005) *Journ Invest Dermatol*
- 83) Hengge UR, Chan ER, Foster RA, Walker PS, Vogel JC: Cytokine gene expression in epidermis with virological effects following injection of naked DNS (1995) *Nat Genet* 10:161-166
- 84) Hengge UR, Mirmohammadsadegh A: Adeno-associated virus expresses transgenes in native follicles and epidermis (2000) *Mol Ther* 2(3):188-94

- 85) Hengge UR, Taichman LB, Kaur P, Rogers G, Jensen TG, Goldsmith LA, Rees JL, Christiano AM: How realistic is cutaneous gene therapy? (1999) *Exp Dermat Viewpoint 2 Commentary 2*
- 86) Henry DH, Abels RI: Recombinant human erythropoietin in the treatment of cancer and chemotherapy-induced anemia: Results of double-blind and open-label follow-up studies (1994) *Semin Oncol 21(3):21-28*
- 87) Hierholzer K, Fromm M: Wasser- und Elektrolythaushalt. In: Robert F.S., Thews G. (hrsg): *Physiologie des Menschen*. Erschienen 1936 Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 27. Auflage 1997, 411-447
- 88) Higashikawa F, Chang L-J: Kinetic analysis of stability of simple and complex retroviral vectors (2001) *Virology 280:124-131*
- 89) Higounenc I, Démarchez M, Régnier M, Schmidt R, Ponc M, Shroot B (1994) Improvement of epidermal differentiation and barrier function in reconstructed human skin after grafting onto athymic nude mice. *Arch Dermatol Res 286:107-114*
- 90) Hillman RS, Finch DA: *Red Cell Manual* (1996) Philadelphia, PA, Davis 7
- 91) Hinterhuber G, Marquardt Y, Diem E, Rappersberger K, Wolff K, Foedinger D: Organotypic keratinocyte coculture using normal human serum: an immunomorphological study at light and electron microscopy levels. (2002) *Exp Dermatol 11:413-20*
- 92) Hoeller D, Huppertz B, Roos TC, Poblete Gutierrez P, Merk HF, Frank J, Jugert FK: An improved and rapid method to construct skin equivalents from human hair follicles and fibroblasts (2001) *Exp Dermatol 10:264-71*
- 93) Huang Y-C, Wang T-W, Sun J-S, Lin F-H: Investigation of mitomycin-c-treated fibroblasts in 3-d collagen gel and conditioned medium for keratinocyte proliferation (2006) *Artificial Organs 30(3):150-9*
- 94) Jelkman WE, Fandrey J, Frede S, Pagel H: Inhibition of erythropoietin production by cytokines. Implications for the anemia involved in inflammatory states (1994) *Ann N Y Acad Sci 718:300*
- 95) Jelkmann W, Wolff M, Fandrey J: Modulation of the production of erythropoietin by cytokines in vitro studies and their clinical implications (1990) *Contrib Nephrol 87:68*
- 96) Jelkmann W: Erythropoietin: structure, control of production, and function (1992) *Physiol Rev 72:449*
- 97) Jeschke MG, Barrow RE, Hawkins HK, Yang K, Hayes RL, Lichtenbelt BJ, Perez-Polo JR, Herndon DN (1999) IGF-I gene transfer in thermally injured rats. *Gene Ther 6:1015-1020*
- 98) Johnson C, Cook C, Furmanski P: In-Vivo suppression of erythropoiesis by tumor necrosis factor- α (TNF- α): reversal with exogenous erythropoietin (Epo) (1990) *Exp Hematol 18:109*
- 99) Johnston SA, Tang DC: The use of microparticle injection to introduce genes into animal cells in vitro and In-Vivo (1993) *Genet Eng 15:225-236*
- 100) Junqueira LCV, Carneiro J, Gratzl M (Hrsg), Schiebler TH (Übersetzung, Überarbeitung, Ergänzung): *Histologie*, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1996) 412-23
- 101) Juul SE, Yachnis AT, Christensen R: Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus (1998) *Earl Hum Dev 52 235-249*
- 102) Kaufman JS, Reda d, Fye CL : Subcutaneous compared with intravenous epoetin in patients receiving hemodialysis (1998) *N Engl J Med. 339-578*
- 103) Kling PJ, Dragsten PR, Roberts RA, Dos Santos B, Brooks DJ, Hedlund BE, Taetle R: Iron deprivation increases erythropoietin production in vitro, in normal subjects and patients with malignancy (1996) *Br J Haematol 95:249*
- 104) Klinman DM, Conover J, Leiden JM, Rosenberg AS, Sechler JMG: Safe and effective regulation of hematocrit by gene gun administration of an erythropoietin-encoding DNA plasmid (1999) *Hum Gene Ther 10:659-665*
- 105) Koury MJ, Bondurant MC: The mechanism of erythropoietin action (1991) *Am J Kidney Dis. 18(1) 20-3*
- 106) Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ: Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridisation (1988) *Blood 71:524-527*

- 107) Krantz SB, Erythropoietin and the anaemia of chronic disease (1995) *Nephrol Dial Transplant* 10(2): 10-17
- 108) Krueger GG, Morgan JR, Jorgensen CM, Schmidt L, Li HL, Kwan MK, Boyce ST, Wiley HS, Kaplan J, Petersen MJ: Genetically modified skin to treat disease: potential and limitations (1994) *J Invest Dermatol* 103:76-84
- 109) Lambert CA, Soudant EP, Nusgens BV, Lapiere CM: Pretranslational regulation of extra cellular matrix macromolecules and collagenase expression in fibroblasts by mechanical forces (1992) *Lab Invest* 66(4):444-51
- 110) Lamme EN, Van Leeuwen RT, Brandsma K, Vam Marle J, Middlekoop E: Higher numbers of autologous fibroblasts in an artificial dermal substitute improve tissue regeneration and modulate scar tissue formation (2000) *J Pathol* 190:595-603
- 111) Lee WY, Chang JW, Nemeth N, Kang UJ: Vesicular monoamine transporter-2 and aromatic L-amino acid decarboxylase enhance dopamine delivery after L-3,4-dihydroxyphenylalanine administration in parkinsonian rats (1999) *Jour Neurosci* 19(8):3266-74
- 112) Lee, D-Y, Lee J-H, Yang J-M, Lee E-S, Park K-H, Mun G-H: A new dermal equivalent: The use of dermal fibroblast culture alone without exogenous materials (2006) *Jour of Dermatol Sci*
- 113) Leroy-Viard K, Rouyer-Fessard P, Beuzard Y: Improvement of mouse β -thalassemia by recombinant human erythropoietin (1991) *Blood* 78:1596-1602
- 114) Levin A, Singer J, Thompson CR, Ross H, Lewis M: Prevalent left ventricular hypertrophy in the pre-dialysis population identifying opportunities for intervention (1996) *Am J Kid Dis* 27:347-354
- 115) Lewis P, Hensel M, Emerman M (1992) *EMBO J*. 11. 3053-3058
- 116) Li A, Pouliot N, Revers R, Kaur P: Extensive tissue-regenerative capacity of neonatal human keratinocyte stem cells and their progeny (2004) *J Clin Invest* 113:390-400
- 117) Licht T, Herrmann F, Gottesman MM, Pastan I: In-Vivo drug-selectable genes: a new concept in gene therapy (1996) *Stem Cells* 15:104-111
- 118) Limat A, Mauri D, Hunziker T: Successful treatment of chronic leg ulcers with epidermal equivalents generated from cultured autologous outer root sheath cells (1996) *J Invest Dermatol* 107:128-35
- 119) Lin MTS, Polkkinen L, Uitto J: Cutaneous Gene Therapy, Principles auf Prospects (2000) *Dermatol Clinics* Vol 18, Nr 1
- 120) Lippi G, Guidi G: Laboratory Screening for Erythropoietin Abuse in Sport an Emerging Challenge (2000) *Clin Chem Lab Med* 38(1):13-19
- 121) Lu DR, Zhou JM, Zheng B, Qiu XF, Xue JL, Wang JM, Meng PL, Han FL, Ming BH, Wang XP: Stage I clinical trial of gene therapy for hemophilia B (1993) *Sci China B* 36(11):1342-51
- 122) Ludwig H, Chott C, Fritz E, Krainer M: Increase of bone marrow cellularity during erythropoietin treatment in myeloma (1995) *Stem Cells* 13(2):77-87
- 123) Ludwig H, Fritz E: Pathogenese und Therapie der therapie- und tumorbedingten Anämie, In: Schmoll HJ, Höffken K, Peters JD (Hrsg) *Kompodium internistische Onkologie*. Springer, Berlin Heidelberg, S 1118-1127
- 124) Maas-Szavowski N, Szybowski A, Stark HJ, Andrecht S, Kolbus A, Schorpp-Kistner M, Angel P, Fusenig NE: Organotypic cocultures with genetically modified mouse fibroblasts as a tool to dissect molecular mechanisms regulating keratinocyte growth and differentiation (2001) *J Invest Dermatol* 116:816-20
- 125) Mackenzie IC: Retroviral transduction of murine epidermal stem cells demonstrates clonal units of epidermal structure (1997) *J Invest Dermatol* 109:377
- 126) Madan A, Curtin PT: A 24-base-pair sequence 3' to the human erythropoietin gene contains a hypoxie-responsive transcriptional enhancer (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3928
- 127) Maschio G: Erythropoietin and systemic hypertension. (1995) *Nephrol Dial Transplant* 10(2):4-79

- 128) Masuda S, Nagao M, Takahata K, Konishi Y, Gallyas Jr. F, Tabira T, Sasaki R: Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells(1993) *J Biol Chem* 268:11208-16
- 129) Meana A, Iglesias J, Del Rio M, Larcher F, Madrigal B, Fresno MF, Martin C, San Roman F, Tevar F: Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels (1998) *Burns* 24(7):621-30
- 130) Michel M, Auger FA, Germain L: Anchored skin equivalent cultured in vitro: a new tool for percutaneous absorption studies (1993) *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 29A(11):834-7
- 131) Miller CB, Jones RJ, Piantadosi S, Abeloff MD, Spivak JL: Decreased erythropoietin response in patients with the anemia of cancer (1990) *N Engl J Med* 322:1689
- 132) Morakkabati N, Gollnick F, Meyer R, Fandrey J, Jelkmann W: Erythropoietin induces Ca²⁺ mobilisation and contraction in rat mesangial and aortic smooth muscle cultures. (1996) *Exp Hematol* 24:392-7
- 133) Morgan R, Anderson WF: Human gene therapy (1993) *Ann Rev Biochem* 62:191-217
- 134) Musto P, Falcone A, Darena G, Scalzulli PR, Matera R, Minervini MM, Lombardi GF, Modoni S, Songo A, Carotenuto M: Clinical results of recombinant erythropoietin in transfusion-dependent patients with refractory multiple myeloma: Role of cytokines and monitoring of erythropoiesis (1997) *Eur J Haematol* 58:314-319
- 135) Naffakh N, Henri A, Villeval JL, Rouyer-Fessard P, Moullier P, Blumenfeld N, Danos O, Vainchenker W, Heard JM, Beuzard Y: Sustained delivery of erythropoietin in mice by genetically modified skin fibroblasts (1995) 92:3194-98
- 136) Nordstrom JL: The antiprogestin-dependent gene switch system for regulated gene therapy (2003) *Steroids*. 68(10-13):1085-94
- 137) Nowrousian MR, Kasper C, Oberhoff C: Pathophysiology of cancer-related anemia. In: Smyth JF, Boogaert MA, Ehmer BRM (eds): *rhErythropoietin in Cancer Supportive Treatment*. Marcel Dekker: New York (1996) 13-34
- 138) Orive G, De Castro M, Ponce S, Hernsdez RM, Gascon AR, Bosch M, Alberch J, Pedraz JL: Long-term expression of erythropoietin from myoblasts immobilized in biocompatible and neovascularized microcapsules (2005) *Mol Ther* 12(2):1525-0016
- 139) Österborg A, Boogaerts MA, Cimino V, Essers U, Holowiecki J, Juliusson G, Jäger G, Najman A, Peest D: Recombinant human erythropoietin in transfusion-dependent anemic patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma – A randomized multicenter study. The European Study Group of Erythropoietin (Epoetin Beta) treatment in multiple myeloma and non-Hodgkin's Lymphoma. (1996) *Blood* 87:2675-2682
- 140) Palmer RD, Hock RA, Osborne WR, Miller AD: Efficient retrovirus-mediated transfer and expression of a human adenosine desaminase gene in diploid skin fibroblasts from an adenosine desaminase-deficient human (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84:1055-1059
- 141) Parenteau NL, Nolte CM, Bilbo P, Rosenberg M, Wilkins LM, Johnson EW, Watson S, Mason VS, Bell E: Epidermis generated in vitro: practical considerations and applications (1991) *J Cell Biochem* 45(3):245-51
- 142) Pepper KA, Division of Research Immunology/Bone Marrow Transplantation, Childrens Hospital Los Angeles, Freundlicherweise zur Verfügung gestellt
- 143) Pfützner W, Hengge UR, Joari MA, Foster RA, Vogel JC: Selection of keratinocytes transduced with the multidrug resistance (MDR) gene in an in vitro skin model presents a strategy for enhancing gene expression In-Vivo (1999) *Hum Gene Ther* 10(17):2811-21
- 144) Pfützner W, Terunuma A, Tock CL, Snead EK, Kolodka TM, Gottesman MM, Taichman L, Vogel JC: Topical colchicine selection of keratinocytes transduced with the multidrug resistance gene (MDR1) can sustain and enhance transgene expression In-Vivo (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(20):13096-101
- 145) Pfützner W, Vogel J: Advances in skin gene therapy (2000) *Expert Opin Investig Drugs* 9(9):2069-83

- 146) Ponec M, Ghalbzouri AE, Dijkman R, Kempenaar J, Pluijm G, Koolwijk P: Endothelial network formed with human dermal microvascular endothelial cells in autologous multicellular skin substitutes (2005) *Angiogenesis* 7 (4):295-305
- 147) Ponec M, Weerheim A, Kempenaar J, Mulder A, Gooris GS, Bouwstra J, Mommaas AM: The formation of competent barrier lipids in reconstructed human epidermis requires the presence of vitamin C (1997) *J Invest Dermatol*, 109:348-55
- 148) Ponec M: Reconstruction of human epidermis on deepidermized dermis: expression of differentiation-specific protein markers and lipid composition (1991) *Toxic. In vitro* Vol 5 pp
- 149) Pottern CS, Morris RJ: Epithelial stem cells in vivo (1988) *J Dell Sci* 10:45-62
- 150) Quintin-Colonna F, Devauchelle P, Fradelizi D, Mourot B, Faure T, Kourilsky Ü, Roth C, Mehtali M: Gene therapy of spontaneous canine melanoma and feline fibrosarcoma by intratumoral administration of histocompatible cells expressing human interleukin-2 (1996) *Gene Ther* 3: 1104-1112
- 151) Redd MJ, Cooper L, Wood W, Stramer V, Martin P: Wound healing and inflammation: embryos reveal the way to perfect repair (2004) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 29;359(1445):777-84
- 152) Rex TS, Allocca M, Domenici L, Surace EM, Maguire AM, Lyubarsky A, Cellerino A, Bennett J, Auricchio A: Systemic but not intraocular Epo gene transfer protects the retina from light-and genetic-induced degeneration. (2004) *Mol Ther* 10(5):855-61
- 153) Rigg RJ, Chen J, Dando JS, Forestell SP, Plavec I, Bohnlein E: A novel human amphotropic packaging cell line: High titer, complement resistance, and improved safety (1996) *Virolog* 218: 290-295
- 154) Rinsch C, Dupraz P, Schneider BL, Deglon N, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Aebischer P: Delivery of erythropoietin by encapsulated myoblasts in a genetic model of severe anemia (2001) *Kidney internat* 62:1395-1401
- 155) Rinsch C, Regulier E, Deglon N, Dalle B, Beuzard Y, Aebischer P: A gene therapy approach to regulated delivery of erythropoietin as a function of oxygen tension (1997) *Hum Gene Ther.* 8(16):1840-1
- 156) Rivera VM, Gao GP, Grant RL, Schnell MA, Zoltick PW, Rozamus LW, Clackson T, Wilson JM: Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer (2005) *Blood* 105(4) 1424-30
- 157) Rizzuto G, Cappelletti M, Maione D, Savino R, Lazzaro D, Costa P, Mathiesen I, Cortese R, Ciliberto G, Laufer R, La Monica M, Fattori E: Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation (1999) *Proc Natl Acad Sci* 96(11):6217-22
- 158) Rosdy M, Claus LC: Terminal epidermal differentiation of human keratinocytes grown in chemically defined medium on inert filter substrates at the air-liquid interface (1990) *J Invest Dermatol* 95:409-14
- 159) Ruß A, Endres S (hrsg): *Arzneimittel pocket plus*, 2. Auflage 2005, Börm Bruckmeier Verlag GmbH Grünwald, S. 108
- 160) Sahota PS, Burn JL, Brown NJ, Macneil S: Approaches to improve angiogenesis in tissue-engineered skin (2004) *Wound Rep Reg* 12:635-642
- 161) Sato Y, Roman M, Tighe H, Lee D, Corr M, Nguyen MD, Silverman GJ, Lotz M, Carsson DA, Raz E: Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunisation (1996) *Science*
- 162) Semenza GL, Wang GL: A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. (1992) *Mol Cell* 12:5447-5454
- 163) Semenza GL, Traystman MD, Gearhart JD, Antonarakis SE: Polycythemia in transgenic mice expressing the human erythropoietin gene (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol 86, pp. 2301-2305
- 164) Shahidi NT: Androgens and erythropoiesis (1973) *N Engl J Med* 289:72-44
- 165) Singbartl G: Adverse events of erythropoietin in long-term and in acute or short-term treatment. (1994) *Clin Invest* 72:536-43

- 166) Siplashvili Z, Khavari PA: Lentivectors for regulated and reversible cutaneous gene delivery (2004) *Mol Ther* 9(1):93-100
- 167) Smola H, Thiekötter G, Fusenig NE: Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal-dermal cell interaction (1993) *J Cell Biol* 122:417-29
- 168) Spivak JL, Watson AJ: Hematopoiesis and the kidney. In: Seldin DW, Giebisch G (hrsg) *The kidney: physiology and pathophysiology*, 2.Auflage Raven, New York, pp 1553-1593
- 169) Stark HJ, Baur M, Breitzkreutz D, Mirancea N, Fusenig NE: Organotypic keratinocyte cocultures in defined medium with regular epidermal morphogenesis and differentiation (1999) *J Invest Dermatol* 112(5) 681-91
- 170) Stavrovskaya AA: Review: Cellular mechanisms of Multidrug Resistance of Tumor Cells (2005) *Bio Prot Network*
- 171) Stockschlader MA, Schuening FG, Graham TC, Storb R: Transplantation of retrovirus-transduced canine keratinocytes expressing the beta-galactosidase gene (1994) *Gene Ther* 1(5):317-22
- 172) Sun WH, Burkholder JK, Sun J, Culp J, Turner J, Lu XG, Pugh TK, Ershler WB, Yang NS: In-Vivo cytokine gene transfer by gene gun reduces tumor growth in mice (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92:2889-2893
- 173) Taichman LB: Systemic replacement therapy from genetically modified epidermal keratinocytes (1999) *Proc Assoc Am Phys* 111(3)206-10
- 174) Terada Y, Tanaka H, Okado R, Shimamura H, Knoshita S, Kuwahara M, Akiba T, Sasaki S: Ligand-regulatable erythropoietin production by plasmid injection and In-Vivo electroporation (2002) *Kid Int* 62:1966-76
- 175) Teumer J, Lindahl A, Green H: Human growth hormone in the blood of athymic mice grafted with cultures of hormone-secreting human Keratinocytes (1990) *FASEB J* 4:3245-50
- 176) Torrent C, Bordet R, Darlix JL: Analytical study of rat retrotransposon VL30 RNA dimerization in vitro and packaging in murine leukaemia virus (1994) *J Mol Biol* 240: 434-444
- 177) Trainer AH, Alexander MY: Gene delivery to the epidermis (1997) *Hum Mol Genet* 6(10):1761-7
- 178) Überla K (2004) Rubin
- 179) Verma IM, Somia N: Gene therapy – promises, problems and prospects (1997) *Nature* 389(6648):239-42
- 180) Villevall JL, Metcalf D, Jahnsen GR: Fatal polycythemia induced in mice by dysregulated erythropoietin production by hematopoietic cells (1992) *Leukemia* 6:107-15
- 181) Vogel JC: A direct In-Vivo approach for skin gene therapy (1999) *Proc Assoc Am Phys* VIII(3)190-197
- 182) Vogel JC, Walker MC, Hengge UR: Gene therapy for skin diseases (1996) *Adv Dermatol* 11:383-98
- 183) Walker PS, Scharton-Kerten T, Rowton ED, Hengge U, Bouloc A, Udey MC, Vogel JC: Genetic immunization with glycoprotein 63 cDNA results in a helper T cell type 1 immune response and protection in a murine model of leishmaniasis (1998) *Hum Gene Ther* 9(13):1899-1907
- 184) Wang X, Zinkel S, Polonsky K, Fuchs E: Transgenic studies with a keratin promoter-driven growth hormone transgene: Prospects for gene therapy (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94:219
- 185) Wei MQ, Lejniaks DV, Ramesh N, Lau S, Seppen J, Osborne WR: Sustained gene expression in transplanted skin fibroblasts in rats(1999) *Gene Ther* 6:840-844
- 186) Weiner G, Liu H-M, Wooldridge J, Dahle C, Krieg A: Immunostimulatory oligodesoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10833-10837
- 187) Weiss CH, Jelkmann W: Funktionen des Blutes. In: Robert FS, Thews G (hrsg): *Physiologie des Menschen* (1936) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 27. Auflage 1997, 411-447

- 188) White SJ, Page SM, Margaritis P, Brownlee GG: Long-term expression of human clotting factor IX from retrovirally transduced primary human keratinocytes in vivo (1998) Hum gene Ther 9:1187-1195
- 189) Wilson CA, Ng TH, Miller AE: Evaluation of recommendations for replication-competent retrovirus testing associated with use of retroviral vectors (1997) Hum Gene Ther 8:869-874
- 190) Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL: Direct gene transfer into mouse muscle In-Vivo (1990) Science 47:1465-1468
- 191) Yamaji R, Okada T, Moriya M, Naito M, Tsuruo T, Miyatake K, Nakano Y: Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA (1996) Eur J Biochem 239:494-500
- 192) Yanay O, Barry SC, Flint LY, Brzezinski M, Barton RW, Osborne WR: Long-term erythropoietin gene expression from transduced cells in bioisolator devices (2003) Hum gene Ther 14(17):1587-93
- 193) Yang EK, Seo YK, Youn HH, Lee DH, Park JK: Tissue engineered artificial skin composed of dermis and epidermis (2000) Artif Organs 24:7-17
- 194) Ye X, Rivera VM, Zoltick P, Cerasoli F Jr., Schnell M.A., Gao G, Hughes JV, Gilman M, Wilson JM: Regulated Delivery of Therapeutic Proteins After In-Vivo Somatic Cell Gene Transfer (1999) Science Vol 383

7. Anhang

7.1. Abkürzungen

AAV	Adeno-Assoziierter Virus
Apo E	Apolipoprotein E
Bp	Basenpaare
CO ₂	Kohlendioxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Elisa	Enzym-linked immunosorbent assay
Env	Envelope, retrovirales Hüllprotein
Epo	Erythropoetin
Fb	Fibroblasten
Fb-e	Fibroblasten, die mit dem Erythropoetin-Gen transduziert wurden
HK	Hautkonstrukt
Gag	retrovirales Kapsid
GM-CSG	Granulocyte Makrophage Stimulating Factor
hGH	Human Growth Hormone, menschliches Wachstumshormon
HPV	Humanes Papilloma Virus
HSV	Herpes Simplex Virus
IU	International Units
Kc	Keratinocyten
Kc-e	Keratinocyten, die mit dem Erythropoetin-Gen transduziert wurden
LTR	Long Terminal Repeats, retroviraler Promotor
MDR	Multidrug resistance
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
NaOH	Natriumlauge
Ph	Potenz und Maß für Wasserstoffionenkonzentration
Pol	Retrovirale Enzyme
RCR	Replikationskompetente Retroviren
RNS	Ribonukleinsäure
UV-	ultraviolett

7.2. Verwendete Materialien

7.2.1. Verwendete Feststoffe

	Eigenschaften	Firma, Ort
Einbettkassetten		Merck, Darmstadt
Einsätze Hautkonstrukte	25 mm; 0,4 µl Polycarbonat-Membran	Nunc, Wiesbaden
Filter	0,45 µl	Peske, Aindling-Pichl
Gefrier Röhrchen		Nunc, Wiesbaden
Glasröhrchen		Nunc, Wiesbaden
Gummistopfen		Sarstedt, Nümbrecht
Maxiprep-Säulen		
Mikrotiterplatte Elisa	Mit Kaninchen-anti-Erythropoetin Antikörpern beschichtet	IBL, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	0,1 mm Tiefe; 0.0025 mm ²	
QIA-Prep-Spin-Säulen	Silizium-Gel-Membran	Qiagen, Hilden
6-well-Platten		Organogenesis,

Hautkonstrukte:		
Sammel-Behälter		Qiagen, Hilden
Zellkulturflaschen	75 cm ²	BD, Heidelberg
Zellkulturschalen	100 × 20 mm	Peske, Aindling-Pichl
Zellkultur-Testplatte	6 Vertiefungen	Peske, Aindling-Pichl
Zentrifugenbecher		Nunc, Wiesbaden

7.2.2. Verwendete Chemikalien

Acetic Acid		Sigma, Taufkirchen
Agarosepulver		BMA, Rockland, USA
Ampizillin		Sigma, Taufkirchen
Calcium Phosphat		Gibco, Karlsruhe
Transfection System		
HBS (HEPES, Na Cl)	10X	Gibco, Karlsruhe
Na OH	1N	Gibco, Karlsruhe
Calcium Solution		Gibco, Karlsruhe
Phosphate Solution		Gibco, Karlsruhe
Transfection Qualified		Gibco, Karlsruhe
Water		
Carrier DNS		Gibco, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid	Minimum 95,5 %	Sigma, Taufkirchen
DMEM	10X	

Elisa KIT:

Standards		IBL, Hamburg
Kontrollseren		IBL, Hamburg
Kaninchen-anti-		IBL, Hamburg
Erythropoetin-Antikörper		IBL, Hamburg
gekoppelt mit Biotin		
Anti-Biotin-Antikörper		IBL, Hamburg
(Ziege) gekoppelt an		
alkalische Phosphatase		
P-Nitrophenyl-Phosphat		IBL, Hamburg
Assaypuffer		IBL, Hamburg
Verdünnungspuffer		IBL, Hamburg
Ethanol		

Ethidiumbromid	500 µg/ml	Sigma, Taufkirchen
Formalin		Sigma, Taufkirchen
G418	50 mg/ml	PAA,
Glycerin (Objektträger)		Roth, Karlsruhe
Isopropanol		Merck, Darmstadt
Kollagen Hautkonstrukte		BD, Heidelberg
Loading Dye		Fermentas,
NaOH		Sigma, Taufkirchen
PBS (Splitten)	10 X	Gibco, Karlsruhe
Penizillin/Streptomycin	10 000 U; 10 000 µg/ml	Biochrom, Berlin
Polybrene		Sigma, Taufkirchen

Puregene Genomic DNS

Purification Kit

Cell Lysis Solution		Genra, Minneapolis, USA
RNAse A Solution		Genra, Minneapolis, USA

LB-Medium

Pepton	10 g für 1000 ml	Gibco, Karlsruhe
Hefe	5 g für 1000 ml	Sigma, Taufkirchen
NaCl	2 g für 1000 ml	Merck, Darmstadt

Zusatz für Agar-Platten

Agar	18 g für 1000ml	Merck, Darmstadt
------	-----------------	------------------

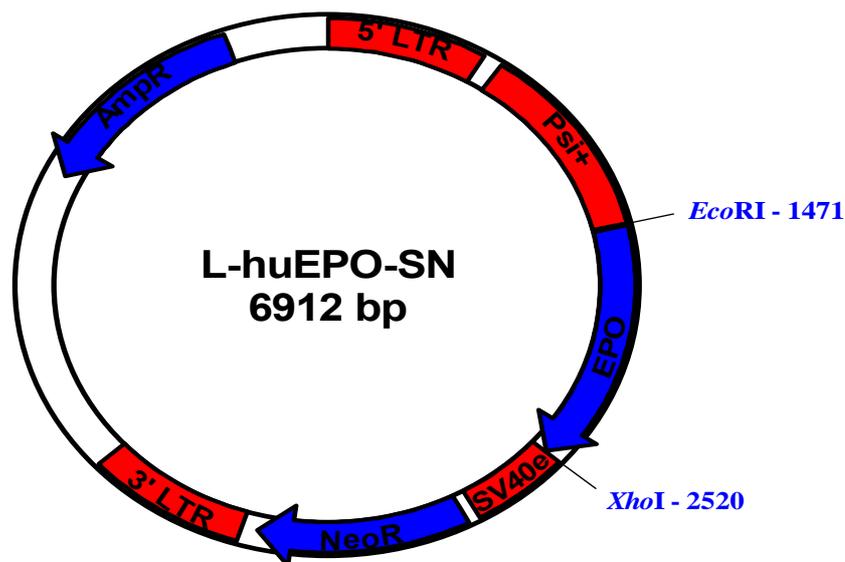
Hautkonstruktmedium (Hk-Medium)

Verwendete Substanzen (verwendete Konzentration; Firma)	Herstellung Aliquots	Menge für 510 ml	Endkonzentration
DMEM (Biochrom, Berlin)	450 ml	450 ml	
Kälberserum (Biochrom, Berlin)	50 ml; 10%	50 ml	
Penizillin/Streptomycin (10 000 U/10 000µg/µl; Biochrom, Berlin)	5 ml; 1%	5 ml	1%
Nichtessentielle Aminosäuren (100x; PAA)	2,5 ml; 0,5%	2,5 ml	0,5%
Transferrin (Sigma, Taufkirchen) 100 mg in 25 ml PBS gelöst	650 µl; 5 mg/ml	650 µl	5 mg/ml
Adenin (HCl; Sigma, Taufkirchen)	500 µl; $1,8 \times 10^{-4}$	500 µl	$1,8 \times 10^{-4}$
Amphotericin B (250 µg/ml; Biochrom, Berlin)	500 µl; 0,25 µg/ml	500 µl	0,25 µg/ml
Gentamicin (50 mg/ml; Gibco, Karlsruhe)	500 µl; 50 µg/ml	500 µl	50 µg/ml
Epidermaler Wachstumsfaktor (Gibco, Karlsruhe) 100 mg mit 10 ml PBS gelöst	500 µl; 10 µg/l	500 µl	10 µg/l
Triiodthyronin (ICN) 54 mg in 40 ml Ethanol abs.: 1N HCL (2:1) gelöst steril filtriert und 1:100 mit FB-Medium verdünnt		50 µl	2×10^{-9} M
Cholera Toxin (Sigma, Taufkirchen) 87 mg in 100 ml PBS gelöst	5 µl; 10^{-10} M	5 µl	10^{-10} M
Als Zusatz, wenn Keratinozyten aufgesät sind (pro 50 ml Medium)			
Ascorbinsäure (Merck, Darmstadt) 500 mg in 100 ml PBS gelöst, steril filtriert		500 µl	50 µg/ml
<i>Als Zusatz während der Luftexpositions-Phase</i>			
<i>(pro 50 ml Medium X)</i>			
Calciumchlorid 666 mg in 100 ml A. bidest gelöst, steril filtriert		500 µl	1,4 mM (0,8 mM sind bereits durch das Serum vorhanden)

7.2.4. Verwendete Zellen

Zellart	Firma	Herkunft
Amphotrope 293-Zellen, Verpackungszellen	Clontech, Heidelberg	Hergeleitet von menschlichen embryonalen Nierenzellen (Hek-293-Zellen)
Menschliche Keratinozyten	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J. Vogel, Leiter des Forschungslabors Genterapie, Dermatology Branch, National Cancer Institute, National Institute of Health, Bethesda, USA	Isoliert aus operativ entnommenen kindlichen Vorhäuten
Menschliche Fibroblasten		
MAX Efficiency DH5 α TM Competent Cells	Invitrogen, Karlsruhe	E. coli Bakterien

7.2.5. Viraler Vektor



Schematische Darstellung des verwendeten Erythropoetin-Plasmids: 5'- und 3'-LTR: LTR des Moloney Murine Leukemia Virus, **Psi+**: Verpackungssignal (Psi⁺) des Moloney Murine Leukemia Virus, **SV40e**: Early SV40 Promoter (P_{SV40e}) des SimianVirus 40, NeoR: Neomycin-Resistenz-Gen, **AmpR**: Resistenzgen für Ampizillin.

Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Karen A. Pepper, Division of Research Immunology/Bone Marrow Transplantation, Childrens Hospital Los Angeles

7.3. Danksagungen

Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. mult. G. Plewig und Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. T. Ruzicka danke ich für die Arbeitsmöglichkeiten in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med C. Berking für die freundliche Beratung beim Entstehen dieser Arbeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. med Pfützner für die Anregung des Dissertationsthemas, seine engagierte Betreuung während der gesamten Arbeitsphase, sowie seine praktischen Ratschläge und hilfreichen Ideen.

Weiter möchte ich Frau I. Nachtigall danken, die mich geduldig in die entsprechenden Arbeitstechniken eingeführt und bei der Durchführung der Experimente tatkräftig unterstützt hat.

Abschließend möchte ich mich noch ganz herzlich bei meinem Ehemann für seine seelische Unterstützung und sein Verständnis bedanken, sowie bei meiner Mutter für die freundliche Korrekturlesung während unseres Rhodos-Urlaubs.

7.4. Lebenslauf

Maria Löser

Walldorfer Str.3
60598 Frankfurt
Tel. 069/69869885
maria.loeser@gmx.de

Geburtsdatum
Geburtsort
Familienstand

1986-1987
1987-1990

1990-1999
1999

1999-2006
2002
2004
2006

seit 12/06

Persönliche Daten

03. 03.1980
Aachen
verheiratet

Schulbesuch

Grundschule Aachen
Grundschule Riemerling

Gymnasium Ottobrunn
Abitur

Hochschulausbildung

LMU München Studium der Humanmedizin
Erstes Staatsexamen
Zweites Staatsexamen
Drittes Staatsexamen

Assistenzärztin Medizinische Abteilung II
Markus Krankenhaus Frankfurt