

Universitätsklinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie
Tübingen

**Synthetische mRNA-basierte Induktion von
Elastinsynthese in porciner Haut**

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

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

vorgelegt von

Pilz, Martin Johannes

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. Meltem Avci-Adali
2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Liebau

Tag der Disputation: 09.08.2018

Für Peter, Regina und Reinhard.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	1
Tabellenverzeichnis.....	1
Abkürzungsverzeichnis	2
1 Einleitung.....	4
1.1 Allgemeine Einleitung	4
1.2 Fragestellung.....	19
1.3 Literatur mit ähnlicher Fragestellung.....	19
1.4 Notwendigkeit der Arbeit.....	20
1.5 Zielsetzung	20
2 Material und Methoden	22
2.1 Material.....	22
2.2 Generierung der Luciferase- und Elastin-mRNA	33
2.3 Konzentrationsbestimmung der dsDNA mittels Photometer	35
2.4 Aufreinigung der mRNA.....	36
2.5 Konzentrationsbestimmung der mRNA mittels Photometer	37
2.6 Schweinehaut-Präparation	38
2.7 Inkubationsbedingungen.....	39
2.8 Transfektion von hGLuc-mRNA.....	41
2.9 Intradermale Verabreichung von Tropoelastin mRNA	46
3 Ergebnisse	51
3.1 Etablierung der Transfektionsmethode zur Einbringung der hGLuc-mRNA in die Haut	51
3.2 Nachweis der synthetischen Tropoelastin mRNA vermittelten Elastinsynthese.....	57
4 Diskussion	67

4.1	Intradermale Verabreichung von hGLuc-mRNA in Schweinehaut	67
4.2	Elastin-mRNA Transfektion	69
4.3	Ausblick	73
5	Zusammenfassung	77
6	Literaturverzeichnis	79
7	Erklärung zum Eigenanteil	91
8	Veröffentlichungen	92
9	Danksagung	93

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Repräsentation der Hautstruktur.....	5
Abb. 2: Elastische Faser aus der Haut der Maus	7
Abb. 3: Schema der Transfektion synthetischer mRNA in Zellen.....	13
Abb. 4: Aufbau einer Franz-Zelle.....	14
Abb. 5: Klassifizierung der Mikronadeln in vier Klassen	16
Abb. 6: Veranschaulichung der Franz-Zellen	40
Abb. 7: Schema der Inkubation in einer 12-Well Platte	41
Abb. 8: Veranschaulichung des MicronJet 600™	44
Abb. 9: α -Elastin Standard-Gerade	49
Abb. 10 Untersuchung der hGLuc-Synthese.....	52
Abb. 11: Intradermale Verabreichung von synthetischer hGLuc-mRNA.....	53
Abb. 12: Vergleich verschiedener Transfektionsmethoden	54
Abb. 13. Vergleich der Luciferaseaktivität in Haut und Medium	56
Abb. 14: Vergleich der Inkubationsbedingungen	59
Abb. 15: Einfluss der Inkubationsmedien auf die Elastinproduktion	61
Abb. 16: Injektionswinkel mit dem MicronJet 600™	63
Abb. 17: Einfluss der Inkubationszeit auf die Steigerung der Elastinmenge.....	58
Abb. 18: Einfluss der Prozessierungszeit auf das Hautgewicht.....	65
Abb. 19: Ermittlung der Elastinmenge nach der Transfektion.....	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungen sowie deutsche und ggf. englische Bezeichnungen. ...	2
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Reagenzien bzw. Chemikalien.	22
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Medien bzw. Lösungen.	25
Tabelle 4: Verwendete Plasmide.....	26
Tabelle 5: Verwendete Primer	26
Tabelle 6: Verwendete Kit Systeme	26
Tabelle 7: Verwendete Geräte.....	27
Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien.....	30
Tabelle 9: Zusammensetzung des Ansatzes für die PCR	34
Tabelle 10: PCR-Programm	34
Tabelle 11: IVT der DNA in mRNA.....	36

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungen sowie deutsche und ggf. englische Bezeichnungen.

Abkürzung	Deutsche Bezeichnung	Englische Bezeichnung
Bpm	Schläge pro Minute	Beats per minute
cDNA	Komplementäre DNA	Complementary DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Desoxyribonucleic Acid
dsDNA	Doppelsträngige DNA	Double-stranded DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	Ethylenediaminetetraacetic acid
eGFP	Verbessertes grün fluoreszierendes Protein	Enhanced Green Fluorescent Protein
ELN	Elastin	
GPa	Gigapascal	
HEK-Zellen	Menschliche embryonale Nierenzellen	Human Embryonic Kidney - cells
hGLuc	Humanisierte Gaussia Luciferase	Humanized Gaussia luciferase
IVT	In vitro Transkription	
miRNA	Mikro-RNA	
mRNA	Boten-RNA	Messenger RNA
OD	Optische Dichte	
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	Polymerase chain reaction
g	Erdbeschleunigung	Gravitational acceleration
rhTE	Rekombinantes humanitäres Tropoelastin	
RLU	Relative Lichteinheiten	Relative light units

Abkürzung	Deutsche Bezeichnung	Englische Bezeichnung
RNA	Ribonukleinsäure	Ribonucleic acid
rpm	Rotationen pro Minute	
RT	Raum Temperatur	
SEM	Standardfehler des Mittelwertes	Standard Error of the Mean
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor	Transforming growth factor
UTR	Nicht translatierte Region	Untranslated Region
UV	Ultraviolett	

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einleitung

1.1.1 Haut und Elastizität

Mit etwa 16% des Körpergewichtes beim Menschen und 20% beim Schwein ist die Haut das schwerste und zugleich größte Organ des Körpers (Dickerson und Mccane 1964, Gawkrödger 2003). Sie ist ein wichtiges Sinnesorgan und wesentlich an der Thermoregulation beteiligt. Außerdem übernimmt sie eine wichtige Schutzfunktion vor Verletzungen, ungewolltem Wasserverlust und ultravioletter Sonnenstrahlung. Als primäre Immunbarriere schützt sie zudem vor infektiösen Pathogenen. Darüber hinaus beinhaltet die Haut zur weiteren Abwehr Zellen des angeborenen Immunsystems, welche durch das adaptive Immunsystem (via Lymph- und Blutgefäße) unterstützt wird. In der Haut findet auch die Produktion einer Reihe von Hormonen statt - inklusive Vitamin-D Bildung - sowie Energiespeicherung, der Aufbau von Lipid-Metaboliten und Heilungsprozesse bei Verletzungen (Kielty und Shuttleworth 1997, Kendall und Nicolaou 2013).

Die Haut besteht aus drei Schichten: Der Epidermis, der Dermis und der Hypodermis (Abb. 1). Die äußerste Schicht, die Epidermis oder auch Oberhaut genannt, besteht vor allem aus Keratinozyten und hat eine Dicke von 150 – 200 µm. Die Keratinozyten differenzieren sich aus der Basalzellschicht nach außen hin zur Hornschicht (Stratum Corneum, 10 – 20 µm dick). Sie werden dann auch Hornzelle genannt. Diese Hornzellen sind sehr proteinreich und in eine lipidreiche Matrix eingebettet. Diese Schicht ist hauptsächlich verantwortlich für die Immunbarriere und verhindert bzw. erschwert das Eindringen von Pathogenen, aber auch Pharmaka, in die Haut (Elias 1981). Weitere Zellen der Epidermis sind die hautspezifischen Immunzellen, genannt Langerhans-Zellen, und die Merkel-Zellen, die an der Basalmembran zwischen Epidermis und der darunterliegenden Dermis liegen und der Mechanorezeption dienen (Lüllmann-Rauch 2009, Aumüller et al. 2010, Faller und Schünke 2012).

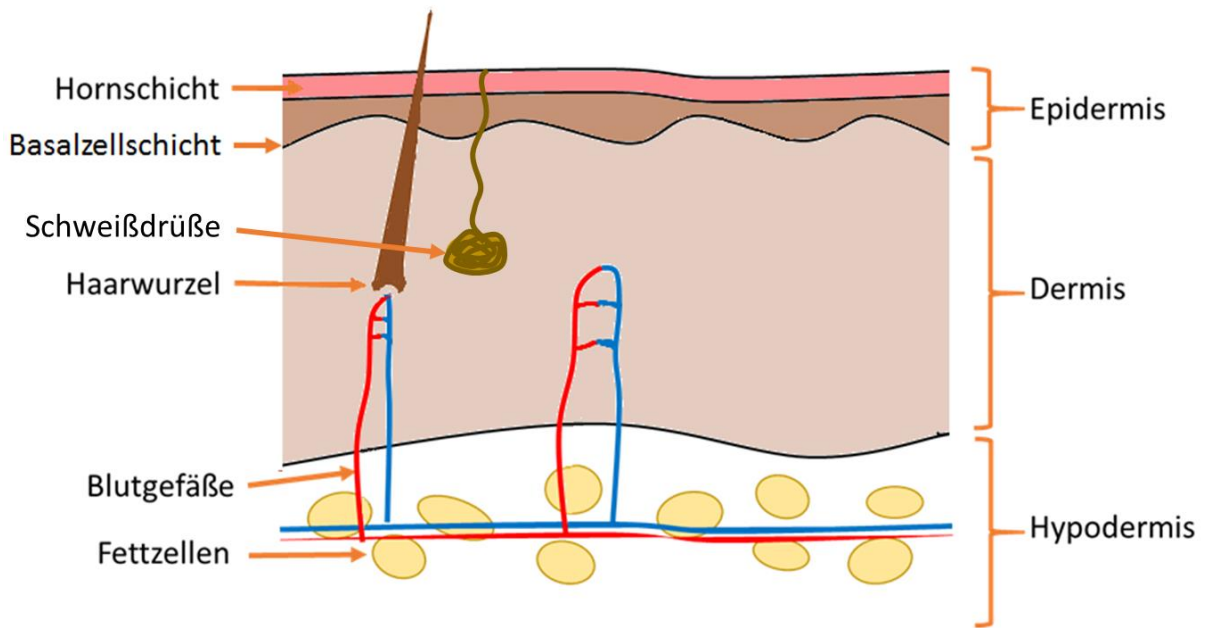


Abb. 1: Schematische Repräsentation der Hautstruktur. Die Haut besteht aus drei Hauptschichten, der Epidermis (Oberhaut), der Dermis (Lederhaut) und der Hypodermis (Unterhaut). Sie bilden eine effektive Barriere gegen äußere Einflüsse. Abbildung adaptiert nach Gawkrödger (2003).

Die Dermis (Lederhaut) ist 0,6 – 3 mm dick (Gawkrödger 2003). Sie besteht hauptsächlich aus Fibroblasten und einer extrazellulären Matrix. Die Dermis enthält außerdem kapillare Blutgefäße, Haarfollikel, Schweißdrüsen, sensorische Nerven und verschiedene Immunzellen. Melanozyten schützen den Körper vor UV-Strahlung.

Die Hypodermis, auch Subkutis, Unterhaut oder Unterhautgewebe genannt, enthält Blutgefäße und Fettzellen, welche das Fettgewebe bilden. Letzteres ist wichtig für die Fettspeicherung als Energiereserve, aber auch zur Bildung wichtiger Lipid-Metaboliten und zur thermischen Isolation. Dies resultiert in einer Dicke von bis zu 3 cm oder mehr am Abdomen (Gawkrödger 2003). Störungen der Hypodermis führen unter anderem zu Störungen der Elastinproduktion und aufgrund der hier liegenden Keratinozyten- sowie Fibroblasten-Stammzellnischen auch zur Störung der Zellproliferation und der Wundheilung

(Kielty und Shuttleworth 1997, Gawkrödger 2003, Kendall und Nicolaou 2013, Lagali et al. 2013, Levin et al. 2014).

Die Haut des hellhäutigen deutschen Hausschweines ist der des Menschen sehr ähnlich (Laurent et al. 2007) und kann als biologisches Modell für humane dermale Funktionen verwendet werden. Beispielsweise wurden weitgehende Übereinstimmungen gezeigt für die epidermale Barriere, Permeationsverhalten, Stoffwechsel in Epidermis und Dermis sowie Zusammensetzung der Hautschichten (Meyer 1996).

1.1.2 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix der Dermis ist hauptverantwortlich für die Elastizität der Haut (Kielty und Shuttleworth 1997, Lagali et al. 2013). Bei verschiedenen Säugetieren besteht diese Matrix im Mittel zu 70% des Trockengewichts aus Kollagen (Neuman und Logan 1950) und zu 4,8% des Trockengewichts (Starcher 1977, Rodrigues et al. 2010) bzw. 2,1% bezogen auf das Nassgewicht (Uitto et al. 1983) aus Elastin. Hinzu kommen noch Glykosaminoglykane (Lagali et al. 2013). Kollagen vermittelt die Festigkeit der Haut, Elastin die Elastizität und die Glykosaminoglykane sorgen für die Hydratation (Obagi 2006). Die Substanz der extrazellulären Matrix wird von den Fibroblasten (Baldwin et al. 2013, Lagali et al. 2013) sezerniert, wobei ein Durchschnittsmensch mit einer Gesamtzellanzahl von $37,2 \cdot 10^{12}$ etwa $1,85 \cdot 10^{12}$ dermale Fibroblasten besitzt (Bianconi et al. 2013).

1.1.3 Elastische Fasern

Die Elastizität wird der Haut nicht allein von Elastin, sondern von einer Elastin-enthaltenden Überstruktur, den elastischen Fasern (Abb. 2), verliehen. Elastische Fasern werden hauptsächlich von Fibroblasten gebildet. Allerdings kann ein Teil der Produktion auch von glatten Muskelzellen sowie von Chondrozyten des elastischen Knorpels übernommen werden. Ein Großteil dieser Fasern besteht aus Elastin. Die Bildung von Elastin erfolgt aus der intrazellulär gebildeten Vorstufe Tropoelastin (60 – 70 Kilodalton). Das Tropoelastin hat mehrere Domänen: Abwechselnd hydrophobe und Lysin-reiche

kovalent bindende („Cross-Link“) Domänen (Bashir et al. 1989, Baldwin et al. 2013). Nach dem Verlassen der Zelle aggregiert Tropoelastin in der extrazellulären Matrix mit Hilfe des Enzyms Lysyloxidase durch Quervernetzung zu Elastin. Die elastischen Fasern werden hierbei durch Elastin sowie der zweiten wichtigen Komponente, den Mikrofibrillen, gebildet (Rosenbloom et al. 1993, Baldwin et al. 2013). Die Fasern bestehen zu 90% aus der amorphen Phase Elastin und zu 10% aus den Mikrofibrillen mit einem Durchmesser von 10 – 12 nm (Rosenbloom et al. 1993). Licht- (Rosenbloom et al. 1993), Laser- (Fecht 2012) sowie rasterelektronenmikroskopische (Ushiki 2002) Aufnahmen bestätigen diesen Aufbau.

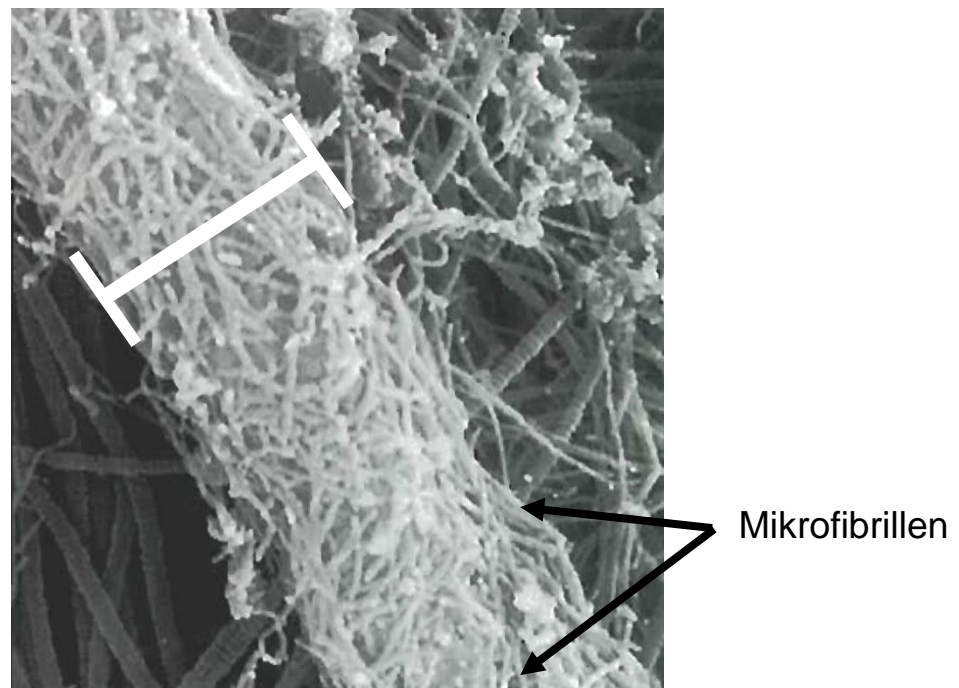


Abb. 2: Elastische Faser aus der Haut der Maus. Auf einem Strang von Elastin (—|—) sind Mikrofibrillen (Pfeile) aufgelagert. Vergrößerung: 55.000 (Bildbreite entspricht 1,5 µm) (Ushiki 2002).

Das Elastizitätsmodul (oder Youngscher Modul) beschreibt das Dehnungs-Spannungsverhalten bei Verformung eines festen Körpers (Chabay und Sherwood 2011). Das Elastizitätsmodul der steifen Anteile der Dermis, also von Kollagen und Mikrofibrillen, ist mit 2 GPa im mittleren oberen Bereich (Vergleich:

Knochen = 19 GPa, Zahnschmelz = 75 GPa). Die hohe Elastizität der elastischen Fasern wird mit einem Wert von nur 0,002 GPa ausgedrückt (Vergleich: Gummi = 0,001 GPa) (Howard 2001).

Elastische Fasern besitzen eine Halbwertszeit von 74 Jahren (Shapiro et al. 1991). Hochgerechnet muss zum Beispiel das Herz einer 90-jährigen Frau, welches mit 90 Bpm schlägt, in ihrem Leben über 4 Milliarden Kontraktionen überstehen. Da Elastin fast nur früh juvenil gebildet wird, ist dies ein überzeugender Hinweis auf eine lebenslange Funktionalität dieses Moleküls.

Elastin ist auch in anderen lebenswichtigen Organen vorhanden. Im Gegensatz zur Haut mit 2,1% Elastin (Uitto et al. 1983) beträgt der Elastin-Anteil in der Aorta ca. 50% und ca. 5% in der Lunge verschiedener Säugetiere (Neuman und Logan 1950, Starcher 1977, Rodrigues et al. 2010). Da Elastin für die Elastizität der Gewebe verantwortlich ist, also den gestreckten Zustand in den relaxierten umkehrt (Rosenbloom et al. 1993) ohne dabei zu reißen (Alberts et al. 2012), ist dieses Protein von entscheidender Wichtigkeit. Trotz dieser primär dauerhaften Funktionalität besteht ein großes Problem des Alterns im zunehmenden Verlust von Elastizität, sei es in der Haut, in Blutgefäßen oder der Lunge.

1.1.4 Verlust der Haut-Elastizität

Es gibt verschiedene Einflüsse, welche zu einer Hautalterung und damit zu einer Verminderung der Elastizität führen können. Die Haut wird dünner und fragiler, die Elastizität sinkt und die Funktion der Schweiß- und Talgdrüsen wird eingeschränkt. Bei der Hautalterung wird das Stratum Corneum verdickt, die Menge an Kollagen, funktionalem Elastin sowie der Glykosaminoglykane nimmt ab. Die Haut beginnt Falten zu bilden (Talwar et al. 1995, Obagi 2006, El-Domyati et al. 2014).

Bei den Einflüssen auf die Hautalterung spielen intrinsische wie extrinsische Faktoren eine Rolle. Als extrinsisch werden die Umwelteinflüsse bezeichnet, welche sich auf die Haut auswirken. Hier steht vor allem die UV-Strahlung im Vordergrund. So sind die photochemischen Prozesse für über 80% der Hautalterung im Gesicht verantwortlich. Eine langanhaltende UV-Einwirkung

zerstört vor allem die extrazelluläre Matrix und hier besonders die Mikrofibrillen der elastischen Fasern. Durch beide Faktoren der Hautalterung kann eine Akkumulation von amorphem Elastin-Material entstehen, welches für Tropoelastin als auch für Fibrillin-1, dem Baustein der Mikrofibrillen, immunpositiv ist („Solare Elastose“) (Langton et al. 2010). Als weitere extrinsische Einflüsse kommen Tabakrauch, radioaktive Strahlung, Entzündungen wie z.B. Dermatosen (häufige Nebenwirkung von Medikamenten), Verbrennungen sowie zahlreiche weitere Faktoren hinzu, welche zu einer Abnahme der Elastizität in der extrazellulären Matrix führen können.

Als intrinsische Hautalterung wird die Abnahme der Produktion der Extrazellulärbestandteile bezeichnet. Ab dem 20. Lebensjahr sinkt z.B. die Kollagenproduktion um 1% pro Jahr. Auch die Glykosaminoglykane werden vermindert sezerniert. Bezüglich der Frage, ob Elastin im Alter vermindert produziert wird oder nicht, gibt es widersprüchliche Studien (Pierce und Hocott 1960, Sephel et al. 1986, Zhang et al. 1999, Sellheyer 2003, Pittet et al. 2014). Es wird davon ausgegangen, dass Elastin fast ausschließlich früh postnatal sezerniert wird und im adulten Lebensabschnitt durch einen posttranskriptionellen Prozess die Bildung der Elastin-mRNA vermindert wird (Zhang et al. 1999, Naylor et al. 2011). Zhang und Mitarbeiter gehen dabei davon aus, dass in adulten Fibroblasten gegenüber juvenilen die Elastinproduktion um mindestens den Faktor 50 – 100 verringert ist. Obwohl dieser Punkt in der Literatur strittig ist, waren sich die Studien einig, dass die Elastizität der Haut im Alter abnimmt, und dabei eine verminderte Funktion von Elastin vorliegt. Histologische Schnitte zeigen, dass die schwerwiegendsten Veränderungen infolge des Hautalters in den Komponenten der Elastin-Struktur stattfinden (Naylor et al. 2011). Man kann also zusammenfassen, dass es eine drastische Verminderung der Elastizität aufgrund von verminderter Elastin-Funktion (extrinsisch oder intrinsisch) in der Haut gibt. Ein Verlust an funktionellem Elastin, egal ob extrinsisch oder intrinsisch entstanden, schränkt die Funktion von Haut, aber auch von Blutgefäßen und Lunge zum Teil deutlich ein. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die Erhöhung des Elastingehalts in der Haut mittels mRNA (Botenstoff-Ribonukleinsäure) Transfektion. Das Einbringen von Fremd-

mRNA oder -DNA nennt man Transfektion. Dies wäre ein erster Schritt, Hautkrankheiten wie z.B. das faltige Haut Syndrom (wrinkly skin syndrom) mit erheblich reduziertem Elastin-Gehalt in der Extrazellulären Matrix (Boente et al. 1999) oder altersbedingten Fehlfunktionen der Haut (El-Domyati et al. 2014) entgegenzuwirken.

1.1.5 Boten-Ribonukleinsäure oder messenger RNA (mRNA)

Gene tragen die Information für die Herstellung von Proteinen. In einem ersten Schritt, der Transkription, wird die Information von der DNA mithilfe von RNA-Polymerasen in eine mRNA übersetzt. Die Ribonukleinsäuresequenz der mRNA kodiert für eine Aminosäuresequenz. Diese wird an den zytoplasmatischen Ribosomen unter Zuhilfenahme von Transfer-RNA Molekülen und zahlreichen Hilfsfaktoren (wie z.B. Elongationsfaktoren) im Prozess der Translation gebildet. Durch Faltung dieser Aminosäuresequenz entstehen funktionsfähige Proteine (Campbell und Reece 2009). Die mRNA ist am Gesamtanteil der RNA einer menschlichen Zelle mit 5% am geringsten vertreten (Warner 1999, Herman 2007). Die Halbwertszeit humaner mRNA, also die Zeit in welcher die Hälfte der mRNA abgebaut wird und nicht mehr an der Proteinsynthese beteiligt ist, beträgt im Mittel 10 Stunden (Palsson 2006).

1.1.6 Ribonukleasen

Die mRNA wird von Ribonukleasen abgebaut. Diese Enzymgruppe wirkt nicht nur intrazellulär (Zhang et al. 1999), sondern ist auch ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Komponenten der Haut (Percoco et al. 2012). Es gibt Viren auf RNA-Basis, gegen welche die RNA-Abbau Maschinerie des Körpers und vor allem der Haut einen wichtigen Abwehrmechanismus darstellt (Dickson und Wilusz 2011). Aus diesem Grund wird RNA bei Berührung mit Haut sofort abgebaut (Probst et al. 2006). Ein Ziel der Arbeit war es, RNA so in die Haut einzubringen, dass sie dort ihre Funktion als Übersetzungsmatrix für Proteine ausüben kann. Aufgrund der Abwehrmechanismen der Haut muss diese RNA

daher mittels spezieller Techniken der RNA-Transfektion in die Haut eingebracht werden.

1.1.7 Transfektion mit synthetischer mRNA

Es gibt heutzutage eine Vielzahl von Möglichkeiten, um die in einer Zelle erzeugte Proteine zu beeinflussen. Hier soll nur auf solche Verfahren eingegangen werden, welche auf Einschleusen von Fremd-DNA oder -RNA in Zellen basieren; diese Verfahren werden zusammenfassend Transfektion genannt. Verschiedene Techniken stehen hierbei zur Verfügung. Das Einbringen spezieller DNA-Sequenzen in das Genom einer Zelle erfolgt z.B. durch Virus-Vektoren, Liposomen oder Gold-Partikel - dabei werden Zellen mittels einer Genkanone beschossen. Hierdurch kann eine nachhaltige Proteinproduktion herbeigeführt werden (Thieman und Palladino 2013). Da DNA kontinuierlich in das eigene Genom eingebaut wird, besteht bei Verwendung dieser Methoden in der Gentherapie ein Sicherheitsrisiko wie schädliche Mutationen bis hin zu Krebs oder starke Immunreaktionen durch Überproduktion der Proteine (Donnelly et al. 2003, Baum et al. 2006).

Noch aktueller ist die auf synthetischer mRNA basierte Therapie. Bei dieser wird mit speziell modifizierter synthetischer mRNA transfiziert, welche für ein Protein kodiert. Die Vorteile der mRNA-Methode gegenüber der DNA basierten Gentherapie sind zahlreich. Hervorzuheben ist besonders, dass diese Art der Behandlung nicht kanzerogen wirkt, denn die mRNA ist nur zeitweise präsent und kann das Genom der Zelle nicht verändern (Abraham et al. 2015, Michel et al. 2015). Die mRNA Therapie erlaubt dadurch eine kontrollierte de novo Proteinsynthese. Sie kann risikoarm mit Patienten durchgeführt werden und ist deutlich kostensparender und einfacher zu kontrollieren als die Transfektion mit DNA. Wichtig bei dieser Art der Therapie ist allerdings, dass die mRNA modifiziert wird. Ohne entsprechende Modifikation wäre diese zu instabil und würde eine zu hohe Immunogenität aufweisen. Hierzu werden z.B. die modifizierten Nukleotide 5-Methylcytidin und Pseudouridin in die mRNA eingebracht, was einen starken Effekt auf ihre Wirksamkeit hat: So wird nicht nur die Stabilität erhöht, sondern

auch die Immunantwort unterdrückt und die gewünschte Protein-Produktion erreicht. Zusätzlich zu den modifizierten Nukleotiden zeigt eine Dephosphorylierung der mRNA eine weitere Wirkungserhöhung (Avci-Adali et al. 2014a, Avci-Adali et al. 2014b). Hierzu wird die mRNA mittels Antarktischer Phosphatase dephosphoryliert, was zu einer verbesserten Translationsrate führt (Abraham et al. 2015, Michel et al. 2015).

1.1.8 Chemische Verpackung synthetischer mRNA

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Möglichkeiten der intradermalen Transfektion synthetischer mRNA getestet. Gemeinsam ist den Methoden der Weg über die Lipoplex Bildung mittels Lipofectamine 2000™, auch Lipofektion genannt. Hierbei wird die unterschiedliche Ladung der Nukleinsäuren und der Liposomen genutzt. Kationische Lipide (= Lipofectamine 2000™), welche aus amphiphilen Molekülen bestehen, werden mit der mRNA für 15 Minuten inkubiert. In dieser Zeit findet die Komplexbildung statt. Die negativ geladenen Phosphate der mRNA reagieren elektrostatisch mit den positiv geladenen Köpfen der Lipide des Lipofectamine 2000™, was zu spontaner Komplexbildung führt (Abb. 3). Die entstandenen Lipoplexe sind nun auf der Oberfläche positiv geladen und vermitteln somit die Interaktion der Lipoplexe mit der negativ geladenen Zellmembran. Es wird davon ausgegangen, dass die Lipoplexe mittels Endozytose in die Zellen gelangen (Son et al. 2000, Bio-Rad Laboratories, Inc., Thermo Fisher Scientific Inc.). Um eine optimale Transfektion zu gewährleisten, ist bei der Lipofektion besonders das Verhältnis der Menge des Transfektionsmittels (Lipofectamine 2000™) gegenüber der mRNA sowie des Mediums (OptiMEM®) wichtig. Eine Studie mit Fibroblasten und eGFP-mRNA zeigte, dass diese mit mehr als 2 µL Lipofectamine 2000™ im Transfektionsansatz (2,5 µg mRNA; 500 µL OptiMEM®) die beste Transfektionseffizienz lieferten. Bei dieser Menge an mRNA wurden nur geringe Schwankungen in der Menge der transfizierten Zellen festgestellt (Avci-Adali et al. 2014a).

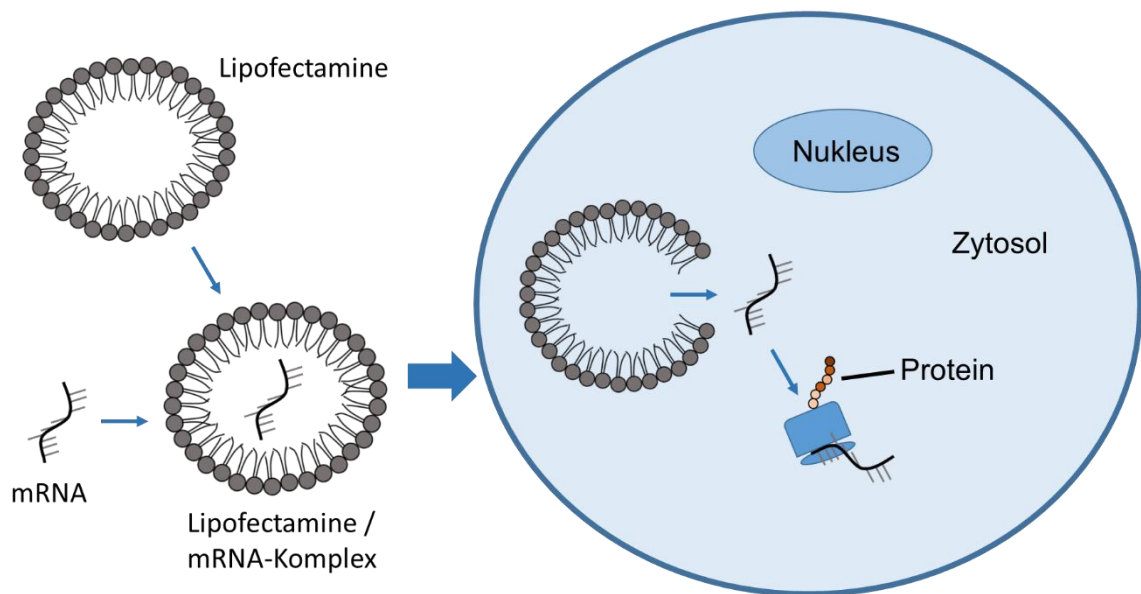


Abb. 3: Schema der Transfektion synthetischer mRNA in Zellen. Zuerst komplexiert die mRNA mit dem Lipofectamine 2000™ und bildet den „Lipoplex“. Die Lipoplexe werden durch Endozytose in die Zielzelle aufgenommen. Dort wird die Lipidschicht abgebaut und die mRNA freigesetzt. Im Zytosol wird die mRNA durch Ribosomen in das gewünschte Protein translatiert (modifiziert nach Michel et al., 2015).

1.1.9 Einbringen komplexierter mRNA in das Gewebe

Es gibt verschiedene in vitro Methoden, um die Lipoplexe intradermal an die Zellen zu bringen und die Proteinsynthese zu analysieren. Hierfür kann eine modifizierte Permeationszelle nach Franz (Franz 1975), heute auch Franz-Zelle genannt, eingesetzt werden. Diese Zelle wurde für die Untersuchung der Permeation von Substanzen durch die Haut entwickelt. Sie besteht aus einem oberen (nach oben offenen) und einem unteren, rundlichen Glasanteil, an welchem das Probe-Entnahme Röhrchen sitzt (Abb. 4). Eine Hautprobe wird zwischen diesen beiden trennbaren Teilen fixiert und tritt mit dem Medium im unteren Reservoir (Lunter und Daniels 2012) in Kontakt. Der Transfektionsansatz kann als Überstand auf das Gewebe gegeben werden und hat nun zwei Möglichkeiten der Permeation, zum einen durch die intakte Hornschicht, zum

anderen durch die Hautanhangsgebilde, also Haarfollikel, Schweiß- und Talgdrüsen (Daniels 2004).

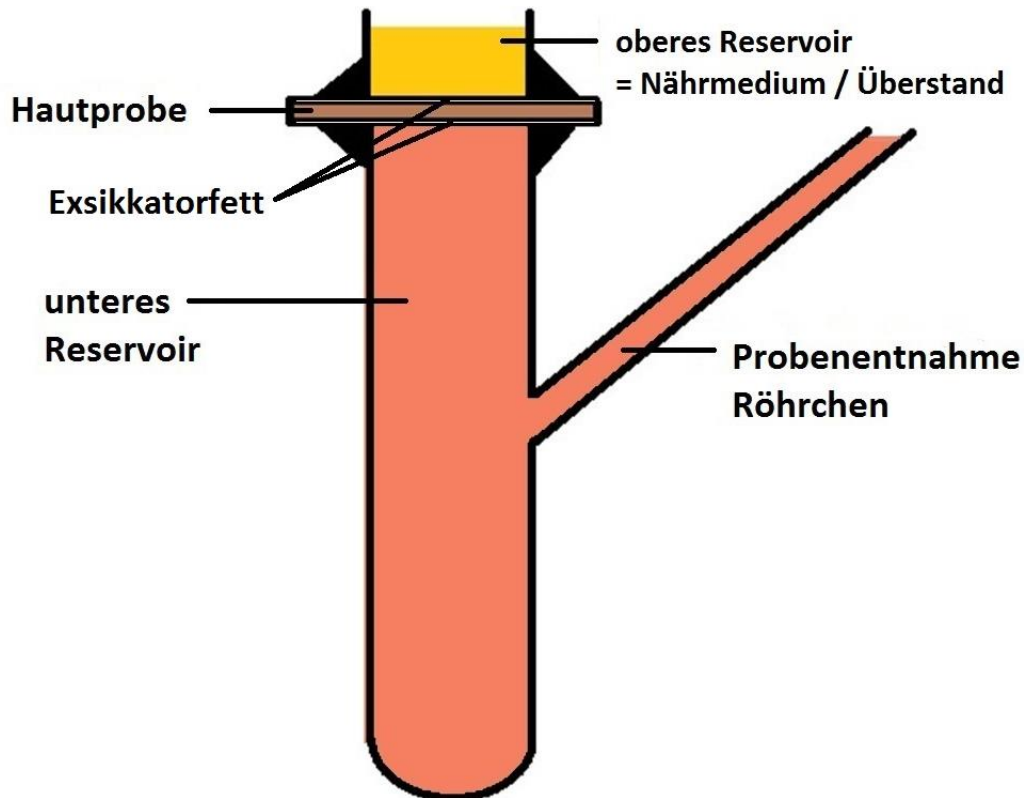


Abb. 4: Aufbau einer Franz-Zelle. Die beiden Glaskompartimente über und unter der Haut wurden mittels einer Klammer (nicht eingezeichnet) fixiert.

Eine weitere Methode ist die intradermale Injektion des Transfektionsansatzes mit einer Spritze per Mantoux-Technik (Mantoux 1910, Laurent et al. 2007, Lambert und Laurent 2008). Man spricht man von einer intradermalen Injektion, wenn nicht tiefer als 1,2 mm injiziert wird (Dacso 1990), darüber hinaus von transdermalen Injektion (Donnelly et al. 2012).

Für die intradermalen Injektionen können auch Mikronadeln eingesetzt werden. Mikro bedeutet hier eine Nadellänge von unter 1 mm (Levin et al. 2014). Hierbei wurde der MicronJet 600™ von der Firma NanoPass verwendet. Der MicronJet 600™ ist eine Vorrichtung aus drei hohlen Mikronadeln mit jeweils 0,6 mm Länge,

welche auf eine Spritze platziert wird. Die pyramidenförmigen Nadeln sind aus Silikonkristallen hergestellt, um präzise intradermale Injektionen in die oberflächliche Dermis vornehmen zu können (Van Damme et al. 2009, Levin et al. 2014).

1.1.10 Mikronadeln

Bei intra- sowie transdermalen Darreichungsformen werden drei Generationen unterschieden. Die erste, das transdermale Pflaster, setzt den Wirkstoff direkt auf der Hautoberfläche frei und setzt auf die Permeation der Moleküle des Wirkstoffes durch die Hornschicht (Prausnitz und Langer 2008). Die Einsatzmöglichkeiten sind jedoch wegen der Durchlässigkeit des Stratum Corneum auf Moleküle von unter 500 Da begrenzt (Muschaweck et al. 2014). Die zweite Generation setzt zusätzlich auf eine Erhöhung der Permeabilität des Stratum Corneum. Hierbei werden chemische Veränderungen der einzuschleusenden Moleküle (z.B. durch den Einsatz von Liposomen), elektrische Veränderungen per Iontophorese (Ladung der Moleküle) oder Ultraschall vorgenommen. Die dritte Generation versucht sich über jegliche Barrieren des Stratum Corneum hinweg zu setzen und wird mit den eben genannten Methoden der Permeationserhöhung kombiniert. Hierbei wird unter anderem das Stratum Corneum abgetragen (Microdermabrasion), mit Strom geöffnet (Elektroporation) oder mit Mikronadeln direkt eingedrungen (Prausnitz und Langer 2008). Die Mikronadeln selbst können ebenfalls klassifiziert werden (Abb. 5): 1.) Solide Mikronadeln, welche nur der Permeationserhöhung dienen; 2.) Solide Nadeln, welche mit Wirkstoff beschichtet werden; 3.) Polymer-Nadeln mit eingekapseltem Wirkstoff, welche sich intradermal auflösen und 4.) hohle Mikronadeln für die direkte Injektion (Kim et al. 2012, Zhang et al. 2012a, Chiappini et al. 2015).

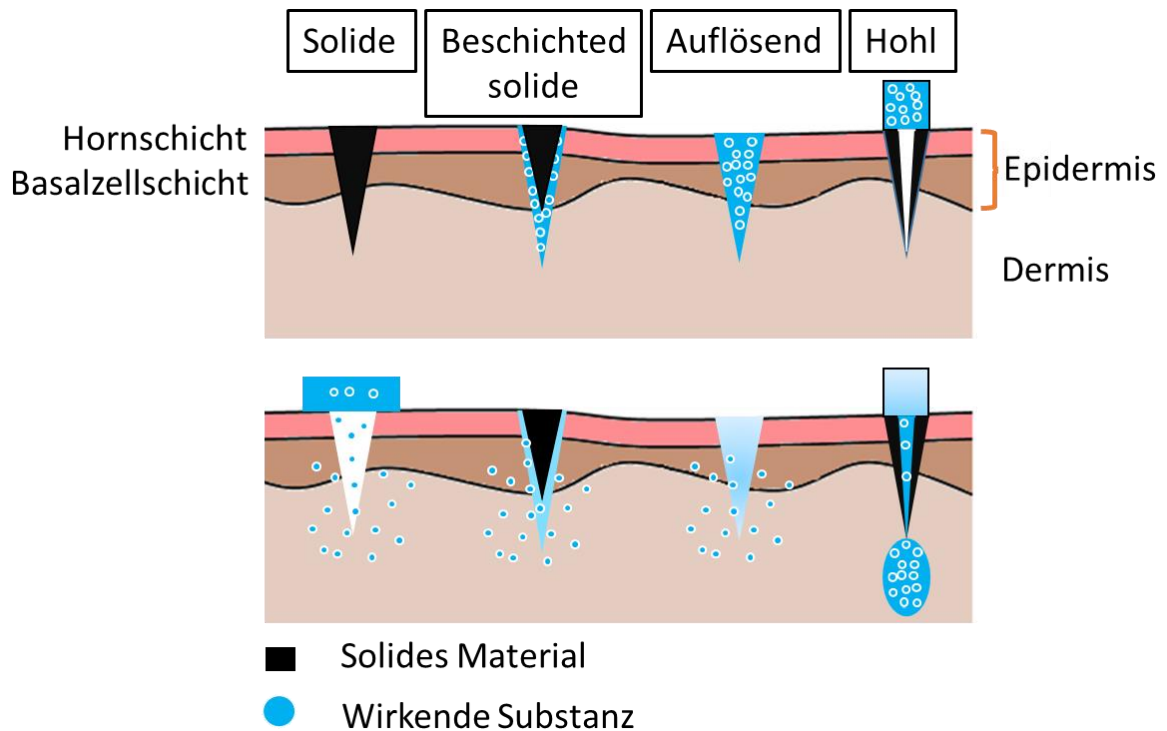


Abb. 5: Klassifizierung der Mikronadeln in vier Klassen. 1.) Solide Mikronadeln dienen der Vorbehandlung von Haut, um Poren im Mikrometerbereich zu erzielen, die eine Permeationserhöhung erwirken 2.) Solide Nadeln, beschichtet mit Wirkstoff 3.) Polymer-Nadeln mit eingekapseltem Wirkstoff, welche sich intradermal auflösen und so den Wirkstoff freisetzen 4.) Hohle Mikronadeln für die direkte Injektion in bestimmte Tiefen (modifiziert nach Kim et al. 2012).

Verschiedene Studien über die Immunogenität eines Impfstoffes konnten die Überlegenheit der intradermalen Injektion mittels Mikronadeln im Vergleich zur intramuskulären Injektion veranschaulichen (Van Damme et al. 2009, Hung et al. 2012, Levin et al. 2014, Troy et al. 2015). Dies zeigt, dass die zellulären Komponenten der Haut aktiv mit den injizierten Substanzen interagieren. Betrachtet man die Schmerzempfindung beim Gebrauch von Mikronadeln im Gegensatz zu Standard-Nadeln (0,46 mm Durchmesser), so zeigte sich, dass der weitaus größte Einfluss durch die Nadellänge gegeben ist. Andere Faktoren wie die Dicke, Durchmesser oder Anzahl der Mikronadeln sind zu vernachlässigen. Demnach verspürten Patienten den geringsten oder keinen

Schmerz bei 0,48 – 0,7 mm Nadellänge (Gill et al. 2008). Eine weitere Studie zeigte bei Injektionen mit bis zu 0,7 mm langen Mikronadeln eine ebenso schmerzärmere sowie teilweise schmerzfreie Injektion gegenüber Standard-Nadeln (Quan et al. 2013). Hierdurch zeigt sich eine bessere Akzeptanz bei Patienten oder bei Kindern (Marshall et al. 2016). Mikronadeln sind somit im Vergleich zu anderen Injektions- bzw. Transfektionsmethoden besser für die klinische Praxis geeignet.

1.1.11 Luciferase

Luciferasen sind biorelative Lichteinheiten verursachende Enzyme. Sie katalysieren eine Reaktion von Luciferinen mit Sauerstoff, bei welcher ein Lichtquant abgegeben wird. Luciferasen werden in der Gentechnik als Reportergene verwendet (Luciferase Assay). Bei vorhanden sein von Luciferase sollte durch die Zugabe von Luciferin biorelative Lichteinheiten auftreten. Als Luciferin kann Coelenterazin verwendet werden, welches ursprünglich in Coelenteraten (Hohltieren, insbesondere Medusen) nachgewiesen wurde. Coelenterazin in Kombination mit einem Luciferase-Enzym ist ein häufig genutzter Ansatz als biorelative Lichteinheiten-Assay (Titushin et al. 2008). Die Methode ist sehr sensitiv und kann für die Etablierung verschiedener Ansätze als Reportermolekül eingesetzt werden. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete hGLuc (humanisierte Gaussia Luciferase) mRNA zeichnet sich aus durch ihre Sekretierbarkeit und stark erhöhte Sensibilität im Vergleich zur humanisierten Form der Renilla oder Firefly Luciferase (Tannous et al. 2005).

1.1.12 Das ELN-Gen

Das Elastin-Gen (ELN), liegt auf Chromosom 7q11.2. Eine Haploinsuffizienz des ELN Gens führt zu suboptimaler Bildung elastischer Fasern in der Aorta (Baldwin et al. 2013). Ein kompletter Verlust, also ELN (-/-), ist aufgrund seiner Defekte bei der Ausbildung von Adern für den Organismus tödlich (Li et al. 1998, Wagenseil et al. 2010). Wagenseil et al. (2010) zeigte in seiner Studie eine reduzierte Blutdruckregulation durch die Aorta in ELN Heterozygoten (-/+).

Eine mögliche Folgeerkrankung bei entsprechenden ELN Mutationen ist die supralvalvuläre Aortenstenose. Diese wird durch über 60 verschiedene Mutationen des ELN-Gens ausgelöst und führt zu einer Aorten-Verengung, verursacht durch eine Reduktion der Tropoelastinsynthese. Das Williams-Beuren Syndrom, ausgelöst durch eine haploide Deletion eines der beiden ELN-Allele, führt zu einer um die Hälfte verringerten Elastin Produktion und damit zu lockerer Haut sowie Herz-Kreislauf-Erkrankungen (unter anderem supralvalvuläre Aortenstenose). Die Erkrankung Cutis-laxa („schlaffe Haut“) wird ebenfalls durch Mutationen im ELN-Gen hervorgerufen. Charakteristisch ist eine lockere Haut und erhöhte Aneurysmengenfahr, da hier verlängertes Tropoelastin produziert wird, welches in elastischen Fasern zu einer strukturell abgeschwächten Formation von adultem Elastin führt (Tassabehji et al. 1998).

1.1.13 Elastin-mRNA

Die Elastin-mRNA unterscheidet sich in ihrer Regulation von den meisten Botenstoff-Ribonukleinsäuren. Wie oben erwähnt wird Elastin bei Säugern nur sehr früh in der Ontogenese gebildet (mit Ausnahme von Verletzungen, da hier Elastin zur Reparatur benötigt und somit wieder gebildet wird). Solange dessen Funktionalität nicht durch beeinträchtigende Prozesse geschädigt wird, ist Elastin dank seiner sehr hohen Halbwertszeit das ganze Leben funktional. Wenn ein Genprodukt nicht mehr benötigt wird, wird bei den meisten Proteinen das Gen für die mRNA abgeschaltet, um eine Überproduktion zu vermeiden; es findet in solchen Fällen also in der Regel eine Transkriptionskontrolle statt. Dies ist bei Elastin allerdings nicht der Fall. Das Gen ist zeitlebens aktiv, es wird also auch in adulten Säugern dauerhaft pre-mRNA gebildet und zu Tropoelastin-mRNA gespleißt. Nach dem Transfer der mRNA aus dem Zellkern in das Zytosol bindet miRNA29 (mikro-RNA) an die Tropoelastin-mRNA. Die Nukleotidsequenz für diese Bindung liegt in der 3'UTR-Region (untranslated region) der mRNA (Ott et al. 2011). Die 3'UTR-Region ist eine nicht-translatierte Region am 3'-Ende der mRNA (zwischen Stop-Codon und PolyA-Schwanz). In der 3'UTR-Region liegen Bindestellen für die mikro-RNA, wie hier im Beispiel für miRNA29. Der Komplex aus Tropoelastin-mRNA und miRNA29 wird abgebaut, es findet keine messbare

Translation in adulten Säugerzellen statt. Dieser Abbau-Mechanismus wird wahrscheinlich bei einer Verwundung außer Kraft gesetzt, damit die Wundheilung beschleunigt erfolgen kann (Zhang et al. 1999, Zhang et al. 2012b).

Dieser Genregulation durch miRNA29 wurde in der vorliegenden Arbeit entgegengewirkt, indem eine modifizierte 3'UTR-Region in der eingesetzten, synthetischen Elastin-mRNA verwendet wurde. Der Abbaumechanismus wird somit umgangen, da sich in dieser modifizierten 3'UTR-Region auch keine Bindungssequenz für miRNA29a-3p (zur Familie der miRNA29 gehörig), finden lässt. Die miRNA29a-3p wird für die Herunterregulation der Elastin-mRNA hauptverantwortlich gemacht (Jin et al. 2016).

1.2 Fragestellung

Wie verhält sich die Elastinsynthese in porciner Haut nach intradermaler Injektion von Elastin-mRNA?

Wie unterscheiden sich verschiedene intradermale Injektionsmethoden (Mikronadeln, Standardnadeln, Permeation) von hGLuc-mRNA auf die Luciferaseaktivität?

1.3 Literatur mit ähnlicher Fragestellung

Um Elastin in der Haut zu erhöhen, wurden in der Vergangenheit bereits einige Studien durchgeführt, jedoch nicht mit Elastin-mRNA. Auch ist die Methode der Mikronadelinjektion ein vergleichsweise neuer Ansatz der RNA Therapie.

Lara und Mitarbeiter (2012) konnten in einer *in vivo* Studie mit auf Mäusen transplantierte menschlicher Haut zeigen, dass siRNA (CD44 sd-siRNA-2 und CD44 non-sd-siRNA-2) mittels auflösender Mikronadeln die Genexpression von CD44 in der Epidermis unterdrücken konnte. Dies zeigt, dass siRNA mittels Mikronadeln die Barrierefunktionen der Haut überwinden kann und sich in den RNA-induced silencing complex (Molekül aus Proteinen und RNA zur Unterdrückung von mRNA (Pratt und MacRae 2009)) eingliedern konnte.

In der *in vivo* Studie von Aust und Mitarbeiter (2008) wurde der Effekt von Mikronadeln in menschlicher Haut untersucht. Sie konnten zeigen, dass nach vier Sitzungen in einmonatigem Abstand allein die oberflächliche Verwundung mit soliden Mikronadeln von 1,5 mm Länge zu einer Erhöhung von 400% Elastin im Vergleich zur unbehandelten Haut führt. Dies zeigt, dass eine Heilungskaskade nach Verletzungen in der Haut gestartet wird wobei Elastin gebildet wird (Singh und Yadav 2016).

Xie und Mitarbeiter (2017) zeigten, dass nach akuten Verbrennungen eine Injektion mit rekombinantem Tropoelastin (rhTE) in Schweinehaut eine signifikant erhöhte Neubildung von elastischen Fasern bewirkte. Hier zeigt sich, dass elastische Fasern durch das Vorhandensein von Tropoelastin gebildet werden.

1.4 Notwendigkeit der Arbeit

Die Elastinsynthese in der Haut ist ein elementarer Prozess, welcher eine der Grundlagen für die Elastizität, Funktionalität und Ästhetik der Haut ist. Verschiedene Faktoren wie UV-Strahlung, Hautverletzungen oder Gendefekte führen zu einem Verlust der Elastinfunktionalität bei nicht ausreichender Neubildung im Alter (Bernstein et al. 1994, Zhang et al. 1999). Bis heute gelingt es nicht, diese Neubildung bei Funktionsverlust medizinisch vollständig wiederherzustellen.

Die Vielzahl an Therapieansätzen zur Wiederherstellung der Hautelastizität zeigt eine Notwendigkeit auf, eine Optimierung der Elastinsynthese in der Haut für medizinische Zwecke zu erreichen. Daher wird in dieser Arbeit der Ansatz der synthetischen mRNA-basierten Induktion der Elastinsynthese in porciner Haut evaluiert.

1.5 Zielsetzung

Zunächst sollte ein Säugetierhaut-Modell aus frischen Schweineohren für die synthetische mRNA vermittelte Proteinexpression etablieren werden. Dazu sollte die intradermale Transfektionsmethode optimiert werden.

Weiterhin sollte synthetische hGLuc-mRNA in die Haut eingebracht werden. Diese Luciferase-mRNA sollte genutzt werden, da sich ihr Proteinprodukt leicht nachweisen lässt. In einer Serie von Versuchen sollten hierfür verschiedene Methoden der Behandlung der Haut, der Zusammensetzung der Transfektions-Ansätze und der Einbringmethoden von mRNA in die Haut getestet und ausgebaut werden. Dabei sollten unter anderem moderne Methoden der Komplexierung und die Nutzung von Mikronadeln eingesetzt werden.

Danach sollte Tropoelastin-mRNA in die Haut eingebracht und die Erhöhung des Elastin-Gehaltes mittels Fastin™ Elastin-Assay ermittelt werden. Hierzu sollten die Methoden weiter optimiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Hautstücke

Die Hautproben stammten von frisch getöteten Tieren aus dem Tier-OP der experimentellen Chirurgie der Universitätsklinik Tübingen. Die Haut hinter dem Ohr von jungen, weiblichen Hausschweinen (nicht älter als 6 Monate) wurde präpariert. Eine Genehmigung zur wissenschaftlichen Tötung der Tiere nach § 4 Abs. 3 des Tierschutzgesetzes lag vor.

2.1.2 Reagenzien bzw. Chemikalien

In Tabelle 2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien und Chemikalien aufgeführt.

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Reagenzien bzw. Chemikalien.

Reagenzien / Chemikalien	Artikel-Nr.	Hersteller, Ort
Agarose	A9539	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Amphotericin B 250 µg / mL	C-42040	PromoCell GmbH, Heidelberg
Ampuwa®	13GGp221	Fresenius Kabi, Bad Homburg vor der Höhe
Antarktische Phosphatase	M0289S	New England Biolabs, Ipswich (USA)
CASYton	05651808001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Coelenterazin	4094.4	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Reagenzien / Chemikalien	Artikel-Nr.	Hersteller, Ort
Ethanol absolut für die Molekularbiologie	A3678,0250	AppliChem GmbH, Darmstadt
Formaldehyd-Lösung 37% stabilisiert mit 10% Methanol	103999	Merck Millipore, Billerica (USA)
Formamid zur Analyse EMSURE®	109684	Merck Millipore, Billerica (USA)
GelRed, 10.000x	41003	Biotium Inc, Hayward (USA)
Gentamycin 50 mg / mL	G1397-10ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
gibco® DMEM, Glucose 4500 mg / L	41965-039	Life Technologies, Carlsbad (USA)
gibco® Dulbecco's Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (DPBS) [- Ca ²⁺ / - Mg ²⁺]	14190094	Life Technologies, Carlsbad (USA)
gibco® Opti-MEM	11058-021	Life Technologies, Carlsbad (USA)
gibco®: Penicillin (10.000 U / mL) & Streptomycin (10.000 µg / mL)	15140-122	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Jod Lösung 0,5 M I ₂	41965-039	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Glutamin 10 mM	LS-1013	Lifeline Cell Technology, Frederick (USA)

Reagenzien / Chemikalien	Artikel-Nr.	Hersteller, Ort
Lipofectamine™ 2000	1445150	Invitrogen, Karlsruhe
Ladepuffer 6x	R0611	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Luciferase Zellkultur Lyse Reagenz 5X	E1531	Promega Corporation, Fitchburg (USA)
NaCl 0,9% Fresenius	13HGP032	Fresenius Kabi, Bad Homburg vor der Höhe
Nuklease Freies Wasser	052913	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
PBS [- Ca ²⁺ / - Mg ²⁺]	1281B	Biochrom GmbH, Berlin
peqGold Range Mix DNA Leiter	25-2210	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
RNA-Leiter 0,5 – 10 kb (µg / µL)	15623-200	Invitrogen, Karlsruhe
VascuLife® EnGS Basal Medium & LifeFactors	LL-0002	Lifeline Cell Technology LLC, Frederick (USA)
Vectashield für Fluoreszenz	H-1000	Vector Laboratories, Burlingame (USA)

2.1.3 Medium, Puffer und Lösungen

In Tabelle 3 sind die für diese Arbeit erstellten Medien und Lösungen aufgeführt.

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Medien bzw. Lösungen.

Medium / Lösung	Zusammensetzung
Antibiotische Lösung	50 mL DMEM, 250 µL Gentamycin (50 mg / mL), 250 µL Amphotericin B (250 µg / mL)
Endothelzellmedium	475 mL VascuLife Basal Medium, 1 mL EnGS Life Factor (0,2%), 0,5 mL rh EGF LifeFactor (5 ng / mL), 0,5 mL Ascorbic Acid LifeFactor (50 µg / mL), 25 mL-Glutamine LifeFactor (10 mM), 0,5 mL Heparin Sulfate LifeFactor (0,75 U / mL), 10 mL FBS LifeFactor (2%), 250 µL Amphotericin B (250 µg / mL), 500 µL Gentamycin (50 mg / mL)
HEK293 DMEM Medium	440 mL DMEM (Glucose 4500 mg / L), 10% FBS, 5 mL Penicillin (10.000 U / mL) / Streptomycin (10.000 µg / mL), 5 mL L-Glutamin (2 mM)
Ladepuffer	3,3 µL Formamid, 1 µL 37% Formaldehyd, 1 µL 10x MEN sowie 1,7 µL 6x Loading-Dye
Lysepuffer	1x Luciferase Zellkultur Lyse Reagenz in Messpuffer
MEN-Puffer, 1 L, 10x	46,2 g (200 mM) MOPS, 4,1 g (50 mM) Natriumacetat, 2,92 g (10 mM) EDTA
Messlösung	3 mL Messpuffer, 120 µL Coelenterazin Substrat
Messpuffer	DPBS 1x, [- Ca / - Mg] mit 5 mM NaCl
TBE-Puffer, 1 L	10,8 g (89 mM) TRIS Base, 5,5 g (89 mM) Borsäure, 0,7 g (2 mM) EDTA-Na ₂ , pH 8,0

2.1.4 Verwendete Plasmide

Es wurden die Plasmide aus Tabelle 4 für die Versuche verwendet:

Tabelle 4: Verwendete Plasmide

Plasmid	Konzentration	Lieferant	LOT	Länge
ELN in pcDNA 3.3	3,46 mg / mL	MWG-Biotech, Ebersberg	42488	2175 bp
pEX-A2-hGLuc	3,6 mg / mL	MWG-Biotech, Ebersberg	Ohne Nr.	761 bp

2.1.5 Primer

Für die Durchführung der PCR wurden die Primer aus Tabelle 5 verwendet:

Tabelle 5: Verwendete Primer

	Forward	Reverse
Tail PCR Primer	5'-TTGGACCCTCGTACA GAAGCTAATACG-3'	5'-T ₁₂₀ CTTCCTACTCAGGCT TTATTCAAAGACCA-3'

2.1.6 Verwendete Kit Systeme

Für die PCR und das Elastin Assay wurden die Kit's aus Tabelle 6 verwendet:

Tabelle 6: Verwendete Kit Systeme

Name des Kit's	Artikelnummer	Lieferant
MinElute PCR Purification Kit zur Aufreinigung der dsDNA	28006	Qiagen, Venlo (Niederlande)

Name des Kit's	Artikelnummer	Lieferant
Fastin™ Elastin-Assay	F4000	Biocolor Ltd., Carrickfergus (Großbritannien)
MEGAscript® T7 Kit für die in vitro Transkription (IVT)	AMB13345	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
HotStar High Fidelity Kit für die PCR	202605	Qiagen, Venlo (Niederlande)
RNeasy Mini Kit zur RNA Aufreinigung	74106	Qiagen, Venlo (Niederlande)

2.1.7 Geräte und Apparaturen

Für die vorliegende Arbeit wurden die Geräte aus Tabelle 7 verwendet:

Tabelle 7: Verwendete Geräte

Gerät	Gerätename	Lieferant
Autoklav	DX-23	Systemec GmbH, Wettenberg
Brutschrank	Incubator TI-0	Incutec GmbH, Mössingen
	BB6220CU	Heraeus Instruments, Hanau
	B5060EC CO2	Heraeus Instruments, Hanau
Dermatom	Acculan 3Ti Dermatom	Aesculap AG, Tuttlingen

Gerät	Gerätename	Lieferant
Franz-Zellen, Volumen 12 mL	Labor- und Kunstglasbläserei Gauer Glas, Püttlingen	
Klammern mit Feststellschraube für die Franz-Zellen	Labor- und Kunstglasbläserei Gauer Glas, Püttlingen	
Henkellocheisen	Durchmesser 1,5 / 2,5 cm	VBW, Remscheid
Homogenisator	MINILYS	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Mikroplattenleser	Mithras LB940; Einheit RLU (relative light units)	Berthold technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad
	EON™ Spektro- photometer, Einheit: OD (Optische Dichte)	BioTek Instruments Inc., Winooski (USA)
Mikroskop	Axio Vent 40CFL	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer	Therrmomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
	Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg

Gerät	Gerätename	Lieferant
Vortex Gerät	Mixer Uzusio VTX 3000L	Laboratory & Medical supplies Co., Ltd., Tokyo (Japan)
	Vortex-Genie 2™	Scientific Industries Inc, Bohemia (USA)
Waagen	R 160P	Sartorius AG, Göttingen
	XP105DR	Mettler Toledo Inc., Columbus (USA)
Werkbank	HeraSafe HS12	Heraeus Instruments, Hanau
	Sicherheitswerkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen
Zellzähler	CASY	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Zentrifugen	Centrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
	MiniSpin plus	Eppendorf AG, Hamburg
	Varifuge 3.2RS	Heraeus Instruments, Hanau
	Cryofuge 5500i	Heraeus Instruments, Hanau

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien

Material	Artikelnummer	Lieferant
96 Well Mikroplatte für Luciferase Assay	23300	Berthold technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad
96 Well Mikroplatte für Fastin™ Elastin-Assay		Nunc®, Sigma-Aldrich, München
Cellstar® 12-Well Zellkultur Platte	665 180	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster (Österreich)
Cellstar® 6 Well Zellkultur Platte	657 160	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster (Österreich)
Cellstar® Zentrifugenröhrchen 15 mL	188271	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster (Österreich)
Cellstar® Zentrifugenröhrchen 50 mL	227261	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster (Österreich)
Pipettenspitze advanced® 10 mL	0030089464	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitze advanced® 5 mL	0030089456	Eppendorf AG, Hamburg

Material	Artikelnummer	Lieferant
Cryo.S™ kryogen Lagervials	126263	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster (Österreich)
CUTFIX® Einmal Skalpelle 21	01868290	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
DNA LoBind® Tubes 0,5 mL	0030108035	Eppendorf AG, Hamburg
DNA LoBind® Tubes 1,5 mL	0030108051	Eppendorf AG, Hamburg
DNA LoBind® Tubes 2,0 mL	0030108078	Eppendorf AG, Hamburg
epT.I.P.S® Dualfilter (PCR clean, steril) Pipettenspitzen 100 µL	0030077.547	Eppendorf AG, Hamburg
epT.I.P.S® Dualfilter (PCR clean, steril) Pipettenspitzen 1000 µL	0030077.577	Eppendorf AG, Hamburg
epT.I.P.S® Dualfilter (PCR clean, steril) Pipettenspitzen 20 µL	0030077.539	Eppendorf AG, Hamburg
epT.I.P.S® Standard Pipettenspitzen 20 µL	0030000.838	Eppendorf AG, Hamburg
epT.I.P.S® Standard Pipettenspitzen 100 µL	0030000.889	Eppendorf AG, Hamburg
epT.I.P.S® Standard	0030000.927	Eppendorf AG, Hamburg

Material	Artikelnummer	Lieferant
Pipettenspitzen 1000 µL		
Exsikkatorfett	1477.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Injekt [®] 10 mL, Spritze	02057926	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
MicronJet 600 [™] , Mikronadelvorrichtung		NanoPass Technologies Ltd., Nes Ziona (Israel)
Millipore Amicon [®] Ultra-4 10k Zentrifugenfilter	UFC801024	Merck Millipore, Billerica (USA)
Parafilm [®] M	09900667	Pechiney Plastic Packaging, Inc., Chicago (USA)
Petrischaalen 94 x 16	633161	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster (Österreich)
Plastikpak [™] Luer- Lock [™] 1 mL, Spritze	309628	BD, Heidelberg
Precellys [®] CK14, Keramik Beads	KT03961-1-003.2	VWR International, Radnor (USA)
Protein LoBind [®] Tubes 0,5 mL	0030108094	Eppendorf AG, Hamburg
Protein LoBind [®] Tubes 1,5 mL	0030108116	Eppendorf AG, Hamburg
Protein LoBind [®] Tubes 2,0 mL	0030108132	Eppendorf AG, Hamburg

Material	Artikelnummer	Lieferant
Sterican® 0,45 x 25 mm, Kanüle	2050858	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterican® 0,9 x 40 mm, Kanüle	02050798	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
UVette® einmal Küvetten	952010.051	Eppendorf AG, Hamburg
Wägepapier	MN 226	Macherey-Nagel, Düren
Wattestäbchen großer Kopf	3213943	Sengewald Klinikprodukte GmbH, Rohrdorf

2.2 Generierung der Luciferase- und Elastin-mRNA

Es wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt. Zuerst wurde die Funktionalität des etablierten Assays mit hGLuc-mRNA getestet und anschließend wurde die Elastin-mRNA vermittelte Elastinsynthese untersucht.

2.2.1 Insert Amplifizierung der Luciferase- und Elastin-Plasmide mittels PCR

Zur Amplifizierung der für Luciferase bzw. Elastin kodierenden Zielsequenz aus dem Trägerplasmid wurde das HotStar HiFidelity Polymerase Kit verwendet. Der Ansatz wurde jeweils nach Tabelle 9 zusammengesetzt und laut PCR Protokoll (Tabelle 10) ausgeführt. Die jeweilige Zyklenanzahl sowie Annealing Temperatur wurden zur Herstellung des PCR Produktes jeweils etabliert.

Tabelle 9: Zusammensetzung des Ansatzes für die PCR

Substanz	Endkonzentration	Menge
Forward Primer	0,7 µM	7 µL
Reverse Primer	0,7 µM	7 µL
Q-Solution	1x	20 µL
5x Buffer	1x	20 µL
Plasmid		50 – 100 ng
Polymerase	2U	1 µL
DNase-freies Wasser		Auffüllen auf 100 µL pro Ansatz

Tabelle 10: PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit
1.	94 °C	3 min
2.	94 °C	45 s
3.	58 °C für Luciferase Insert 57 °C für Elastin Insert	1 min
4.	72 °C	1 min
5. Ab Schritt 2 wiederholen, 25 mal für Luciferase, 30 mal für Elastin		
6.	72 °C	5 min
7.	4 °C	Halten

2.2.2 Aufreinigung nach Amplifikation

Die amplifizierte DNA wurde anschließend in MinElute Säulen mit dem MinElute PCR Aufreinigungs-Kit aufgereinigt. Hierzu wurde das fünffache Volumen des PBI Puffers zu der PCR Lösung hinzugefügt. Die Lösung wurde auf die Säule gegeben und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Anschließend wurde 750 µL Puffer PE auf die Säule gegeben und zweimal je 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Erneut wurde das Filtrat verworfen. Die DNA wurde mittels Auffüllen der Säulen zweimalig mit 20 µL DNase-freiem Wasser eluiert. Zur Elution mit Wasser wurde 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die eluierte Menge wurde in einem Reaktionsgefäß zusammengeführt.

2.3 Konzentrationsbestimmung der dsDNA mittels Photometer

Zur Konzentrationsbestimmung der doppelsträngigen DNA (dsDNA) wurden 2 µL der aufgereinigten DNA mit 48 µL DNase-freiem Wasser in einer Küvette verdünnt und die Konzentration wurde mittels Photometer bestimmt. Zur Kontrolle der Reinheit der DNA wurde ein 1% Agarose-Gel verwendet. Dies bestand aus 0,5 g Agarose, 50 mL 1x TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer, 10,8 g (89 nM) TRIS Base, 5,5 g (89 nM) Borsäure, 0,7 g (2 mM) EDTA-Na₂, pH 8,0) sowie 3 µL GelRed 10.000x.

200 ng der DNA wurde zusammen mit 2 µL 6x Loading-Dye mittels DNase-freiem Wasser auf 10 µL aufgefüllt und auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde das Gel mit 5 µL des Markers peqGold Range Mix DNA Ladder versehen. Anschließend lief die Elektrophorese für 1,5 Stunden bei 100 V in TBE-Puffer 1x.

2.3.1 mRNA-Generierung mittels in vitro Transkription (IVT)

Nach der PCR wurde die genetische Information der DNA mittels T7-MEGAscript-Kit in vitro zu mRNA transkribiert. Der Reaktionsansatz wurde nach Tabelle 11 angesetzt und inkubierte anschließend 4 Stunden bei 37 °C.

Anschließend wurde 1 μL TurboDNase zu jedem Ansatz hinzugegeben und 15 min bei 37° C inkubiert.

Tabelle 11: IVT der DNA in mRNA

Substanz	Stock-Konz.	Endkonzentration	Menge je Ansatz
ATP	75 mM	7,5 mM	4 μL
GTP	75 mM	1,875 mM	1 μL
CTP,UTP	75 mM	-	-
5'-Methylcytidin	100 mM	7,5 mM	3 μL
Pseudouridin	100 mM	7,5 mM	3 μL
ARCA	10 mM	2,5 mM	10 μL
Template	Gemessen	1,5 μg	
Reaktionspuffer	10x	1x	4 μL
T7-Enzym Mix	10x	1x	4 μL
RNase-Inhibitor	40 U / μL	40 U	1 μL
RNase-freies Wasser			Auffüllen auf 40 μL

2.4 Aufreinigung der mRNA

Die Aufreinigung der mRNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit. Hierzu wurde die Probe auf 100 μL mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt, mit 350 μL RLT Buffer vermengt sowie mit 250 μL 100% Ethanol vermischt. Die mRNA-Lösung wurde auf die Säulen gegeben und für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Anschließend wurde 500 μL Buffer RPE auf die Säulen gegeben und für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Erneut wurde das Filtrat verworfen und 500 μL 80% Ethanol wurde auf die Säulen aufgetragen. Anschließend wurde 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert, das Filtrat wurde wieder verworfen. Dann wurde 5 min bei 16.000 rpm zentrifugiert und die Säule in ein

1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Dies diente dem Auffangen der mRNA nach Elution mittels zweifacher Gabe von je 20 µL RNase-freiem Wasser auf die Membran der Säulen. Jeweils wurde nach Gabe von RNase-freiem Wasser 1 min inkubiert und bei 16.000 rpm zentrifugiert.

2.4.1 Behandlung der aufgereinigten mRNA mit Antarktischer Phosphatase

Die aufgereinigte mRNA wurde mit Antarktischer Phosphatase dephosphoriliert. Hierfür wurde 1 µL der Antarktischen Phosphatase mit 4,5 µL 10x Antarktische Phosphatase-Puffer zu 40 µL der aufgereinigten mRNA hinzugefügt und der Ansatz anschließend 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wurde nun ein weiteres Mal mit dem RNeasy Mini Kit aufgereinigt. Die synthetisierte mRNA wurde bei -80 °C gelagert.

2.5 Konzentrationsbestimmung der mRNA mittels Photometer

Zur Konzentrationsbestimmung der mRNA wurden 2 µL der mRNA Lösung mit 48 µL RNase-freiem Wasser in einer Küvette verdünnt und die Konzentration mittels Photometer bestimmt. Zur Kontrolle der Reinheit der mRNA wurde erneut ein 1% Agarose-Gel verwendet. Für die Analyse wurden 200 ng der mRNA als Probe eingesetzt, welche auf 3 µL mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt war. Zusätzlich wurden 3 µL des RNA-Markers 0,5 - 10 kb RNA-Leiter (Invitrogen) als Größen-Kontrolle verwendet. Beide Ansätze wurden anschließend mit 7 µL RNA-Ladepuffer (3,3 µL Formamid, 1 µL 37% Formaldehyd, 1 µL 10x MEN sowie 1,7 µL 6x Loading-Dye) versetzt, 10 min bei 65 °C denaturiert und auf das Gel geladen. Das Gel lief anschließend 1,5 Stunden bei 100 V.

2.6 Schweinehaut-Präparation

2.6.1 Präparation

Zur Gewinnung der porcinen Hautproben wurde die Haut rasiert und anschließend mit einem Skalpell oberflächlich in einer Dicke von 1,5 – 2 mm von den Ohren abpräpariert. Dabei wurde darauf geachtet, nicht durch die wegen Tierkennzeichnung tätowierte Haut zu präparieren.

Anschließend wurde die Haut mit physiologischer Kochsalzlösung gereinigt, in ein mit derselben Lösung getränktes Tuch gewickelt und gekühlt gelagert. Die direkte Lagerung der Haut in 0,9% NaCl ist wegen der vorzeitigen Quellung des Stratum Corneum zu vermeiden. Wenn ein anschließendes Trimmen der Haut nicht sofort möglich war, wurde die Haut bis dahin bei 4 °C zwischengelagert.

2.6.2 Trimmen

Die Haut wurde mit einem Dermatom in der Pharmazie der Universität Tübingen auf 1 mm Dicke getrimmt. Hierzu wurde die Haut in 3 cm breiten Streifen geschnitten und anschließend auf einen Styroporblock mit Nadeln aufgespannt. Nun wurde das Dermatom mit gleichmäßigem Druck über die Hautstreifen gezogen, was in einer 1 mm dicken Hautschicht resultierte. Anschließend wurde die Haut mit einem Henkellocheisen zu einzelnen, runden Proben gestanzt. Als Durchmesser wurde hierbei für Versuche in Franz-Zellen 2,5 cm gewählt, bei 12-Wellen 1,5 cm. Die Proben wurden bis zur Transfektion kühl und feucht gelagert. Die Haut eines Schweineohres reicht für etwa 7 gestanzte Hautproben mit 2,5 cm Durchmesser oder 21 Proben mit 1,5 cm Durchmesser.

2.6.3 Vorbehandlung

Um anfänglich aufgetretener Kontamination der Hautproben vorzubeugen wurden diese vor der Transfektion in einer Petrischale vorbehandelt. Auf die Hautproben wurde mit einem Wattetupfer ein Tropfen 0,5 M Jodlösung verteilt. Daraufhin wurden die Hautproben in der Schale mit PBS überdeckt, welches

anschließend abgesaugt wurde. Eine antibiotische Lösung (50 mL DMEM, 250 µL Gentamycin (50 mg / mL), 250 µL Amphotericin B (250 µg / mL)) wurde angesetzt und auf die Hautproben gegeben. Nach 30-minütiger Lagerung bei Zimmertemperatur wurden die Hautstücke entnommen und in einer neuen Petrischale mit einem weiteren Tupfer getrocknet.

2.7 Inkubationsbedingungen

Transfektionen der Hautproben wurden in Franz-Zellen sowie in 12-Well Platten durchgeführt.

2.7.1 Franz-Zellen

Die Franz-Zelle ist eine aus Glas bestehende Inkubationsbedingung für in-vitro Untersuchungen von Hautproben (Abb. 4). Die Franz-Zellen wurden in Alkohol gelagert, vor dem Versuch mit Ampuwa abgespült und anschließend autoklaviert (20 min auf 121 °C, danach 10 min getrocknet). Die Flächen zwischen oberem und unterem Teil der Franz-Zelle wurden mit Exsikkatorfett, auch Schliff fett genannt, eingefettet. Dies dichtet die Glaskompartimente gegeneinander ab.

Eine Hautprobe wurde zwischen das obere und das untere Reservoir gespannt, und die Kompartimente mittels einer Klammer fixiert. Das obere Reservoir wurde mit Medium gefüllt, das untere Reservoir mit 12 mL PBS sowie 1% Penicillin / Streptomycin bis zu Kontakt mit den Hautproben gefüllt.

Nach dem Einspannen der Hautproben wurden die oberen Reservoirs der Franz-Zellen mit Parafilm verschlossen (Abb. 6) und in einer 37 °C Wärmekammer mit 5% CO₂ für 24 bis maximal 96 Stunden inkubiert. Das Medium wurde nach jeweils 24 Stunden ausgetauscht.

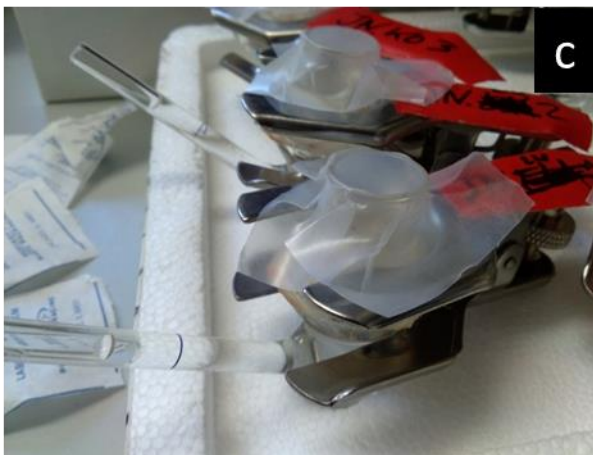
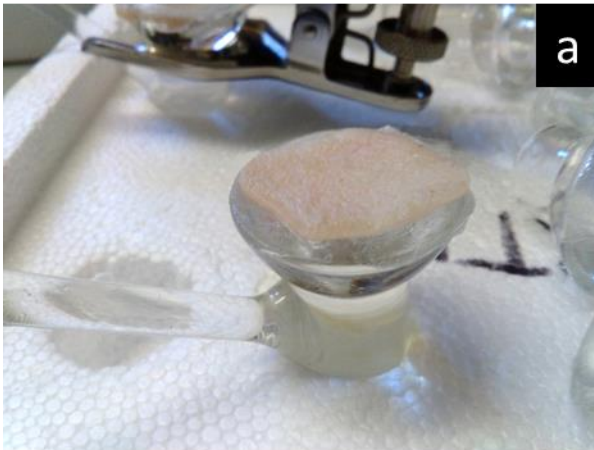


Abb. 6: Veranschaulichung der Franz-Zellen a) Franz-Zelle mit Hautprobe vor der Fixation b) Hautprobe befindet sich zwischen oberem und unterem Kompartiment der Franz-Zelle c) Fixierte Franz-Zellen, abgedeckt mit Parafilm.

2.7.2 Versuche in Well Platten

Transfizierte Hautproben wurden auch in 12-Well Platten inkubiert (Abb. 7), um das Kontaminationsrisiko, welches gelegentlich in Franz-Zellen auftrat, zu verringern. Die Platten wurden in einer 37° C Wärmekammer mit 5% CO₂ für 24 bis 96 h gelagert. Das Medium wurde jeweils am Ende der Versuche abpipettiert und zusammen mit den Hautproben ausgewertet.

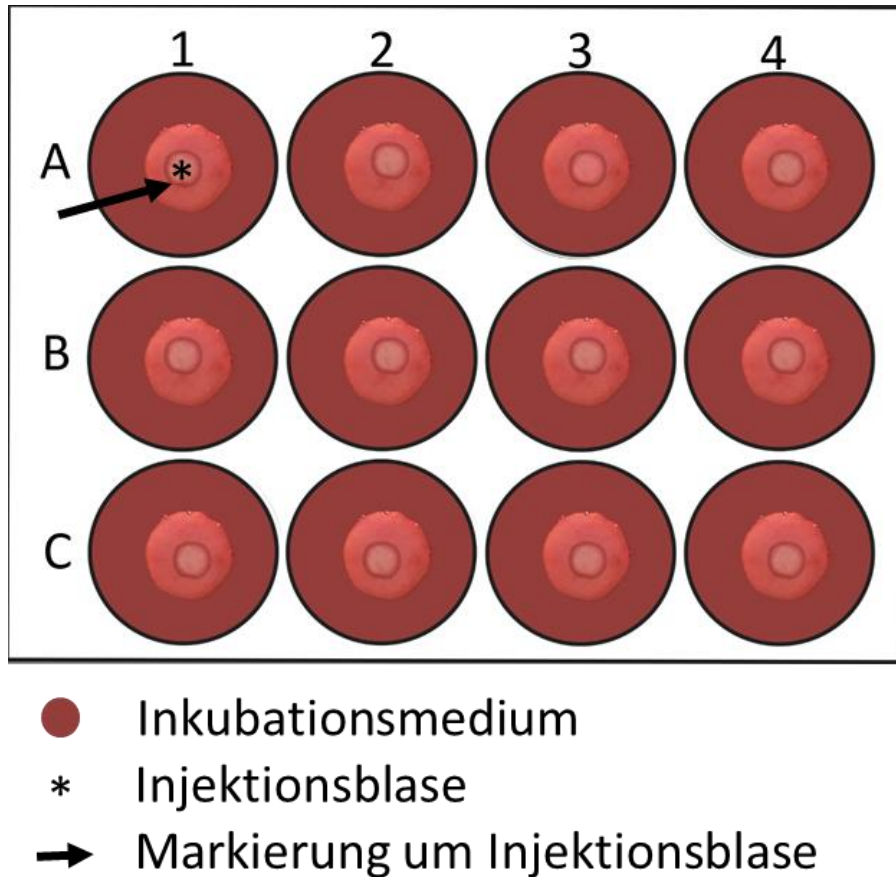


Abb. 7: Schema der Inkubation in einer 12-Well Platte. Hautstücke mit 1,5 cm Durchmesser liegen jeweils in 1 mL Inkubationsmedium. Die Injektionsblase ist mit einem Wasserfesten Marker Markiert.

2.8 Transfektion von hGLuc-mRNA

Zur Etablierung einer erfolgreichen Transfektion wurde als Reporter hGLuc-mRNA verwendet. Die Reporter mRNA wurde zuerst in HEK293 Zellen getestet, und anschließend wurde sie mit drei verschiedenen Methoden intradermal verabreicht: Epidermale Permeation, Standardinjektion und Mikronadel-Injektion.

2.8.1 Generierung der Transfektionskomplexe

Transfektionskomplexe wurden durch die Inkubation von hGLuc-mRNA in OptiMEM[®] und Lipofectamine generiert. Hierzu wurde ein Ansatz aus

Lipofectamine 2000™ zusammen mit der hGLuc-mRNA pipettiert. Dieser Ansatz wurde zusammen mit OptiMEM® und 1% Penicillin / Streptomycin für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zur Transfektion verwendet. Für die einzelnen Versuche wurden die Mengen jeweils angepasst. HEK293-Zellen und epidermale Permeation: 1 mL OptiMEM®, 2,5 µL Lipofectamine 2000™ und 2,5 µg hGLuc-mRNA. Standardinjektion: 50 µL OptiMEM®, 2,5 µL Lipofectamine 2000™ und 2,5µg hGLuc-mRNA. Mikronadelinjektion: 35 µL OptiMEM®, 1,5 µL Lipofectamine 2000™ und 1,5 µg hGLuc-mRNA.

2.8.2 Zu Transfektion der HEK 293 Zellen mit synthetisierter hGLuc mRNA

Die Herstellung der Luciferase wurde in den HEK-Zellen 293 getestet. Dafür wurden ein Tag vor der Transfektion je 300.000 Zellen in jeweils ein Well einer 6-Well Platte gesät. Die Zellen wurden anschließend für 24 h in HEK 293 Medium in einem Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Vor der Transfektion wurden sie mit 2 mL PBS gewaschen. Der Transfektionsansatz wurde auf die Zellen pipettiert. Die Platte mit den Zellen wurde nun für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde 350 µL Lysepuffer (1x Luciferase Zellkultur Lyse Reagenz in Messpuffer) pro Well zugegeben und unter leichtem Schwenken wurden die HEK 293 Zellen 15 min bei Raumtemperatur lysiert. Danach wurde der Inhalt jedes Wells in Eppendorf Gefäße gegeben, mit dem Vortexer gemischt und bei 12.000 x g für 15 s zentrifugiert. Je 40 µL des Mediums wurden für das anschließende Luciferase Assay verwendet.

2.8.3 Intradermale Verabreichung der hGLuc-mRNA

6.8.3.1 Epidermale Permeation

Oberhalb des Hautstückes wurde in Franz-Zellen das Medium mit komplexierter hGLuc-mRNA zugegeben. Zur Kontrolle wurde zu den Hautstücken Medium mit oder ohne Lipofectamine 2000™ zugegeben.

6.8.3.2 Standardinjektion (Mantoux-Technik)

Mit Hilfe von Kanülen mit einem Durchmesser von 0,4 mm wurde der komplexierte Transfektionsansatz flach unter die Hautoberfläche injiziert (Mantoux-Technik). In manchen Fällen formte sich eine Blase unter der Haut. Meist trat jedoch ein Teil des Ansatzes aus der Haut aus. Auf die Haut wurde nach der Injektion 1 mL OptiMEM[®] mit 1% Penicillin / Streptomycin gegeben.

6.8.3.3 Hohle Mikronadeln

Die Transfektionskomplexe wurden mit dem MicronJet 600[™] von NanoPass (Israel) in die Haut injiziert (Abb. 8). Anschließend wurde 1 mL OptiMEM[®] mit 1% Penicillin / Streptomycin auf die Hautproben gegeben. Der MicronJet 600[™] besteht aus 3 Mikronadeln mit jeweils einer Länge von 0,6 mm.

Anfänglich wurde nach Angaben des Herstellers NanoPass injiziert. Der MicronJet 600[™] wurde mit seinem blauen Kontrollstrich zum Injizierenden zeigend in einem 45° Winkel in die Haut gestochen. Unter starkem Druck und unter Verwendung einer LuerLock Spritze (BD Plastikpak) wurde die Lösung ins Gewebe abgegeben, so dass sich eine Blase (Durchmesser ca. 7 mm) bildet. Diese Methode funktionierte jedoch bei bereits abpräparierter, loser Haut unzuverlässig, was laut Herstellerangaben an der geringen Hautdicke von 1,0 mm liegt.

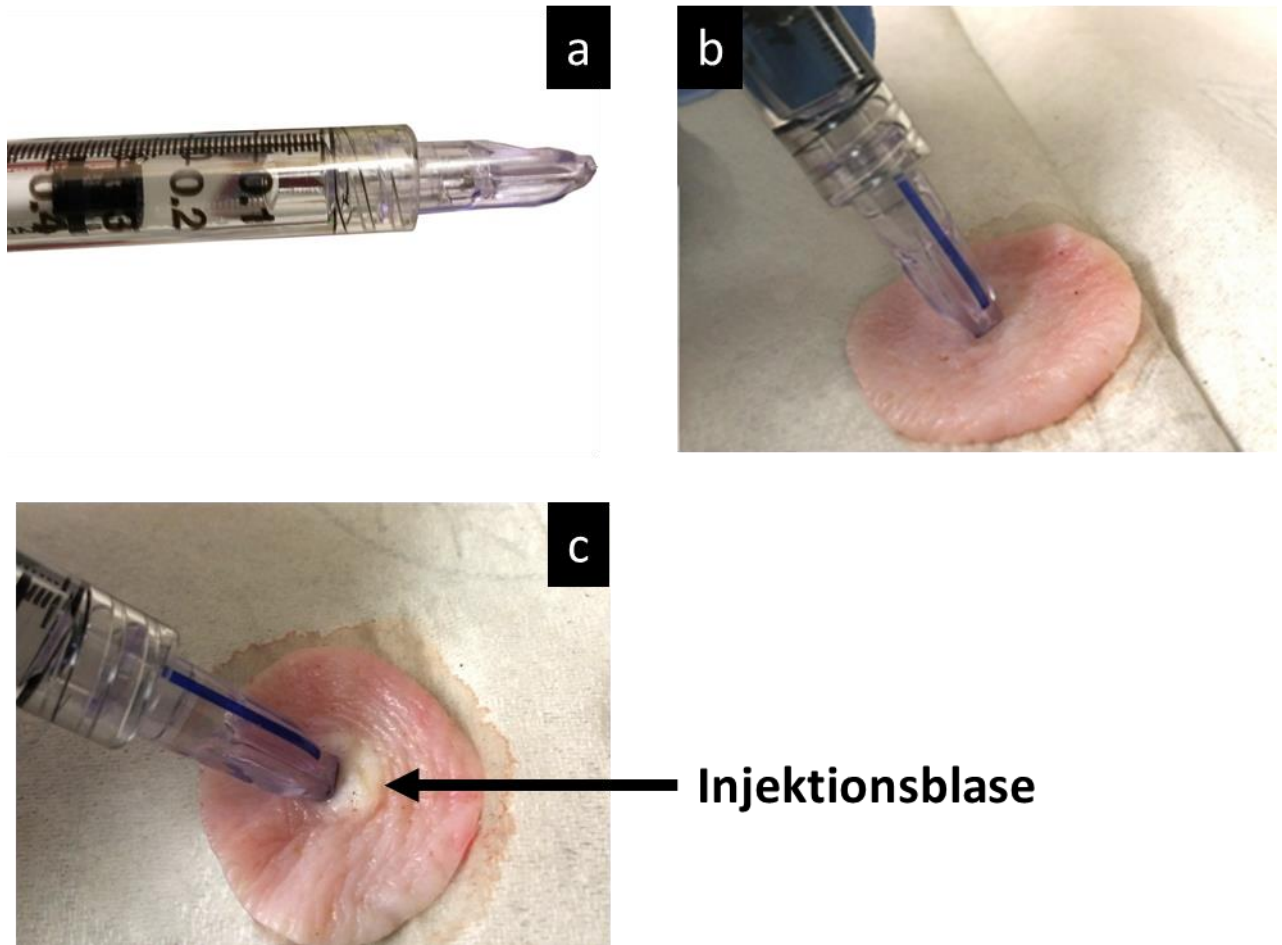


Abb. 8: Veranschaulichung des MicronJet 600™ a) montierter MicronJet 600™ b) MicronJet 600™ vor Injektion (90° Winkel zur Hautoberfläche) c) Injektion mittels aufgerichtetem MicronJet 600™ und Blasenbildung in Haut

Modifizierung der MicronJet 600™ Injektion bei loser Haut

Durch eine Modifikation der Injektionsmethode erfolgten sämtliche darauffolgenden Injektionen mit den Mikronadeln problemlos. Hierzu wurde der blaue Strich des MicronJet 600™ vom Injizierenden weggedreht und wieder mit 45° in die Haut gestochen. Anschließend wurden die Mikronadeln zu senkrechtem Stand aufgerichtet und anschließend mit 90° injiziert.

Bei den 1 mm dicken Hautproben konnte so eine Menge von ca. 40 µL Flüssigkeit intradermal injiziert werden, bei größeren Injektionsmengen trat ein Teil der Injektionsflüssigkeit aus. Aus diesem Grund enthielt der Transfektionsansatz

35 μL OptiMEM[®], 1,5 μL Lipofectamine 2000[™] und 1,5 μg hGLuc-mRNA. Nach Injektion wurde die transfizierte Fläche der Hautproben, sichtbar durch Aufhellung und Blasenbildung (Durchmesser ca. 7mm), mit einem wasserfesten Marker unter Einhaltung von 1 mm Abstand zu der Blase markiert.

Der MicronJet 600[™] hat ein Totraumvolumen von 100 μL . Bei den verwendeten Spritzen (BD Plastikpak) wurde außerdem ein Totraumvolumen von 20 μL festgestellt. Das Totraumvolumen von insgesamt 120 μL musste für die erste Injektion zusätzlich zu den 40 μL Injektionsvolumen aufgezogen werden.

2.8.4 Vorbereitung der Proben für die Luciferase Detektion

Nach der Applikation der Hautproben mit hGLuc-mRNA wurde das Medium aus dem oberen Reservoir der Franz-Zellen oder 12-Well Platten abpipettiert. Das PBS aus dem unteren Reservoir der Franz-Zellen wurde in Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die Hautproben wurden bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend lysiert. Dazu wurde die Haut mit einem Skalpell kleingeschnitten und zusammen mit 700 μL Lysepuffer in bereits vorgefüllte Gefäße mit 0,65 g Keramikugeln gegeben. Diese wurden im peqlab Minilys mit 6 mal 20 Sekunden auf 5000 rpm homogenisiert.

Um das PBS aufzukonzentrieren wurden die 12 mL PBS in 10K Zentrifugenfiltern bei 5000 x g 10 Minuten zentrifugiert und das Filtrat abschließend 2 min bei 1000 x g herunterzentrifugiert. Anschließend erfolgt das Luciferase-Assay.

2.8.5 Luciferase-Assay

Es wurden das Medium, das aufkonzentrierte PBS sowie die Lösung der homogenisierten Haut analysiert. Als Kontrollen wurde OptiMEM[®], PBS, Lysepuffer und Messlösung verwendet.

Es wurden Lysepuffer, Messpuffer und Messlösung angesetzt. Als Messpuffer wurde PBS, ohne Ca^{2+} und ohne Mg^{2+} , mit 5 mM NaCl verwendet. Der Lysepuffer 5x Zellkultur Lyse Reagenz wurde im Verhältnis 1:5 mit diesem Messpuffer

verdünnt. Die Messlösung bestand aus 700 µL Messpuffer sowie 28 µL Coelenterazin Substrat (1 mg / mL) für jede auszuwertende Hautprobe.

Für das Luciferase Assay werden jeweils 40 µL dieser zu untersuchenden Substanzen in eine 96 Well Platte pipettiert. Anschließend wird im Mithras Mikroplattenleser mit der Messlösung die relativen Lichteinheiten (in RLU, relative light units) ermittelt.

2.8.6 Luciferase Auswertung

Die Messungen erfolgten im Mithras Mikroplattenleser mit MircroWin 2000, Version 4.41 (Mikrotek Laborsysteme GmbH). Hierbei wurden die relativen Lichteinheiten gemessen. Die Daten waren nicht normalverteilt. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse teilweise logarithmisch dargestellt (Excel, Version 15, Microsoft) und die Auswertung erfolgte mit nichtparametrischen statistischen Tests (JMP, Version 13, SAS Institute).

2.9 Intradermale Verabreichung von Tropoelastin mRNA

2.9.1 Mikroinjektion von Tropoelastin mRNA in Schweinehaut

Die intradermale Verabreichung von Tropoelastin mRNA wurde ausschließlich mit hohlen Mikronadeln durchgeführt (MicronJet 600™). Für die Verabreichung wurde 35 µL OptiMEM® pro Hautprobe mit 2,5 µL Lipofectamine und 2,5 µg Elastin mRNA eingesetzt. Die Elastin-Versuche fanden in 12-Well Platten oder in Franz-Zellen statt. Die Inkubation fand bei 37°, 5% CO₂, für 24 bis 96 h statt. Als Kontrollen wurden Hautstücke mit oder ohne Transfektionsreagenz verwendet. Bei den Versuchen in Franz-Zellen gab es jeweils zusätzlich eine Kontrolle, bei welcher keine Injektion stattfand (unbehandelte Hautproben).

Die Medien im oberen Reservoir der Franz-Zellen sowie in den 12-Wells wurden variiert. Folgende Medienbedingungen (jeweils 1 mL) wurden verwendet: OptiMEM® mit 1% Penicillin / Streptomycin, Endothelzellmedium, HEK293 DMEM, sowie das Auslassen des Mediums.

2.9.2 Vorbereitung der Hautstücke für das Fastin™ Elastin Assay

Die Hautproben wurden aus den Franz-Zellen bzw. 12-Well Platten nach 24 bis 96 h entnommen, mit Papiertüchern abgetupft und mit einem Skalpell die markierte transfizierte Stelle aus dem Hautstück geschnitten.

Die Hautproben wurden zuerst 15 Minuten getrocknet, dann in ein Eppendorf Gefäß gegeben, welches sofort verschlossen und gewogen wurde, um Gewichtsschwankungen zu verhindern. Das Gewicht der einzelnen Hautproben lag im Mittel bei 17 mg \pm 3 mg.

Die Hautproben konnten nun entweder direkt ausgewertet werden (Fastin™ Elastin Assay) oder nach dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C bis zur Analyse zwischengelagert werden.

2.9.3 Fastin™ Elastin Assay

Die Hautproben wurden mit jeweils 750 μ L 0.25 M Oxal-Säure in Eppendorf-Gefäße gegeben und eine Stunde bei 100 °C gekocht. Für die Überstandsmessungen wurde 75 μ L des jeweiligen Überstandes mit 225 μ L PBS verdünnt und mit 100 μ L 1 M Oxal-Säure gemischt. Die Eppendorf-Gefäße wurden anschließend bei 10.000 rpm 10 min zentrifugiert. Die Überstände der Hautproben wurden in neue Eppendorf-Gefäße pipettiert. Gleichzeitig wurde die α -Elastin Standard Reihe angesetzt. Es wurde eine einheitliche Standardreihe mit 5 μ g – 160 μ g α -Elastin erstellt. Diese Standardreihe wurde zur Messung der Elastinmenge in den Proben verwendet. Als Leerwert diente 1M Oxalsäure.

Allen Proben wurde 500 μ L Precipitation-Reagenz hinzugefügt, 15 min inkubiert und anschließend 10 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Eppendorf-Gefäße ausgeklopft und über Kopf getrocknet. Dann wurde 1 mL Dye-Reagenz hinzugegeben und mit dem Vortexer gemischt. Im Anschluss wurde es für 90 min bei RT (21°C) und 550 rpm im Thermomixer inkubiert und dann 10 min bei 12.000 x g abzentrifugiert. Erneut wurde der Überstand verworfen und die Eppendorf-Gefäße getrocknet. Anschließend

wurde 400 μL Dye-Dissociation-Reagenz hinzugegeben, mit dem Vortexer kurz gemischt, dann 10 min inkubiert. Anschließend wurde im Vortexer das Pellet innerhalb von mindestens 5 min komplett in der Flüssigkeit gelöst.

Je Probe wurde nun $3 \times 100 \mu\text{L}$ in eine 96 Well Platte pipettiert und die Absorption (Einheit OD, optische Dichte) im Mikroplattenleser EON bei 513 nm gemessen.

2.9.4 Elastin Auswertung

Jeder Versuch wurde mit mehreren Kontrollgruppen (Behandlung ohne Elastin mRNA in der Transfektionsreagenz) sowie einer Versuchsgruppe durchgeführt. Zusätzlich wurde für jeden Versuch eine Standardreihe durchgeführt.

Jede Messung wurde mit dem Spektrophotometer EON und der Gen5™ Daten-Analyse Software (Version 02.06.2010, BioTek Instruments Inc.) dreifach durchgeführt und gemittelt. Der Leerwert (1M Oxalsäure ohne α -Elastin) wird von diesem Mittelwert abgezogen und ergibt den jeweiligen Messwert der Proben und des Standards.

Die Standard-Gerade wurde ermittelt, indem für jede eingesetzte mRNA-Konzentration der EON-Messwert in einem XY-Diagramm aufgetragen und eine Ausgleichsgerade berechnet wurde. Eine repräsentative Standardkurve ist in Abb. 9 dargestellt.

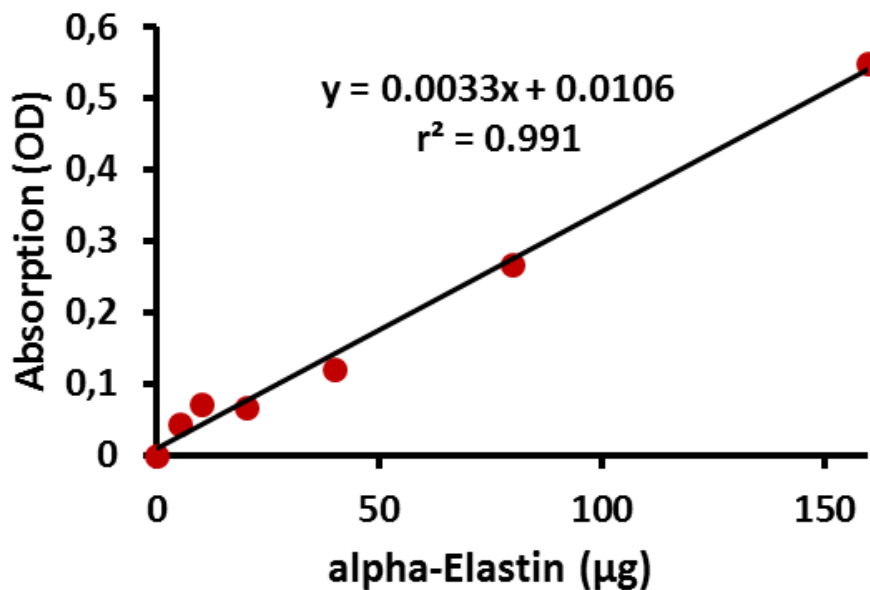


Abb. 9: α -Elastin Standard-Gerade. Repräsentative Darstellung der Standard-Geraden zur Ermittlung des Elastingehalts in den Proben. Auf der X-Achse ist die eingesetzte Elastin Menge in μg angegeben, auf der Y-Achse die gemittelte Absorption nach Abzug des Leerwertes jeder dreifachen EON-Messung.

Für jede Kontroll- und jede Versuchsbedingung kann man mit Hilfe der Standardgerade einen Gewichtsgehalt **Gv** an μg Elastin-Protein bestimmen. Dabei wurde immer der Standard des aktuellen Versuchs genutzt. Formel:

$$Gv = \frac{\text{Messwert} - \text{"Y-Achsenabschnitt"}}{\text{Steigung}}$$

Dieses Gewicht Gv wurde entsprechend der eingewogenen Probenmenge in μg Elastin-Protein pro mg Hautgewicht umgerechnet.

Bei jedem Versuch wurde über die jeweiligen Kontrollen (n=3-8 pro Versuch) gemittelt. Anschließend wurde der Elastinmesswert jedes transfizierten Hautstücks (n=37, 2-7 pro Versuch) zum Kontrollwert seines Versuchs ins Verhältnis gesetzt. Dieses Verhältnis wurde dann über alle durchgeführten Versuche gemittelt und der Standardfehler des Mittelwertes berechnet.

Kriterien für die Aufnahme von Versuchen in die Auswertung waren: Die Proben durften nicht kontaminiert sein, und die Messung musste stabil sein. Kriterium für letzteres war eine Standardabweichung der Kontrollen <16% (also nicht höher als der im Gesamtdurchschnitt gemessene Effekt) oder ein Bestimmtheitsmaß der Standardgeraden von $r^2 > 0,95$.

Die Berechnungen der Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler des Mittelwertes, Relationen sowie Ausgleichsgeraden wurden mit Excel (Version 15, „2013“, Microsoft) durchgeführt.

Mit JMP (Version 11, SAS Institute) wurde getestet, ob die Relationen normalverteilt waren. Da dies bei den Elastinversuchen der Fall war (Shapiro-Wilks-W-Test auf Residuen einer dreifaktoriellen Varianzanalyse mit Inkubationsbedingung, Medium und des Injektionswinkels als Faktoren: $W=0,96$, $p=0,19$) erfolgte die Auswertung mittels parametrischer Statistik. Hierbei wurden Ein-Stichproben t-Tests der Relationen der Versuchsbedingungen gegenüber dem standardisierten Kontrollwert (auf 1 gesetzt) berechnet (einseitiger Test). Eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ wurde als signifikant angenommen. Verschiedene Versuchsbedingungen wurden mit Zwei-Stichproben-t-Tests miteinander verglichen (zweiseitige Tests). Der Einfluss der Überstände wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse verglichen. Als Fehlermaß ist der Standardfehler des Mittelwertes (SEM: standard error of the mean) angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Transfektionsmethode zur Einbringung der hGLuc-mRNA in die Haut

Das Ziel war, die Transfektionsmethode in Säugetierhaut mit synthetischer mRNA zu etablieren und zu optimieren. Zum Nachweis einer erfolgreichen Transfektion sollte synthetische hGLuc-mRNA eingesetzt werden.

3.1.1 Transfektion der HEK 293 Zellen mit synthetisierter hGLuc mRNA

Vor der Transfektion in Haut wurde die verwendete hGLuc-mRNA in HEK293-Zellen eingebracht, um die Proteinsynthese zu testen. Hierzu wurden $6 \cdot 10^5$ HEK293-Zellen in einer 6-Well-Platte eingesät. Nach 24 h wurde 2,5 μg hGLuc-mRNA mit 2,5 μL Lipofectamine 2000™ komplexiert und auf die Zellen gegeben. Das Medium wurde nach 24, 48 oder 72 h entnommen und die relative normierte Luciferaseaktivität im Luciferase-Assay gemessen.

In HEK293-Zellen erzielte die verwendete hGLuc-mRNA eine 67.574 (± 22.214) -fach erhöhte Luciferaseaktivität gegenüber der Kontrolle (Zellen behandelt mit Transfektionsreagenz ohne mRNA). Die Kontrollgruppe wurde auf 1 gesetzt. Im Vergleich dazu wurde die Luciferaseaktivität in der Experimentalgruppe dargestellt (Abb. 10). Die Transfektion der HEK293-Zellen führte zu einer signifikant erhöhten Luciferaseaktivität in der Experimentalgruppe gegenüber der Kontrolle (Wilcoxon-Test, $\text{Chi}^2(1)=5,6$, $p=0,018$).

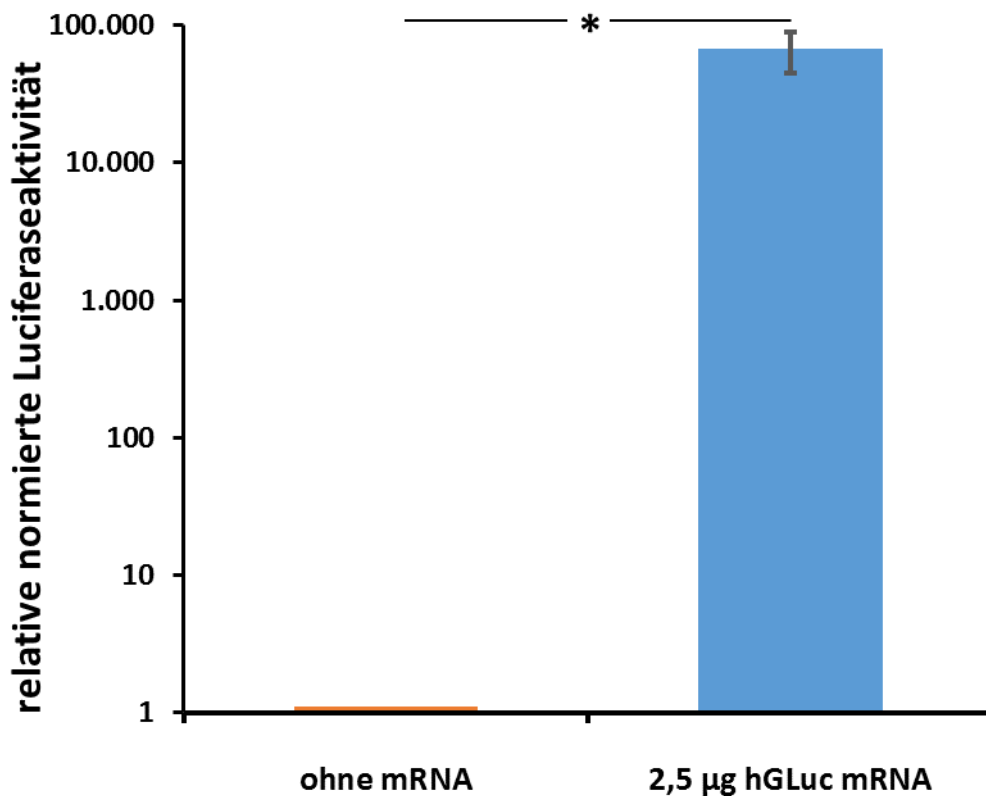


Abb. 10 Untersuchung der hGLuc-Synthese nach der Transfektion mit synthetischer hGLuc-mRNA. Die mit 2,5 µL Lipofectamine 2000™ komplexierte 2,5 µg hGLuc mRNA wurde auf HEK293-Zellen gegeben. Die relative normierte Luciferaseaktivität war in den Zellen mit mRNA um den Faktor 67.574 (±22.214) erhöht gegenüber der Kontrolle (Zellen behandelt mit Transfektionsreagenz ohne mRNA). Die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt; im Vergleich dazu wurde die Luciferaseaktivität in der Experimentalgruppe dargestellt. Dieser Unterschied war signifikant (Wilcoxon-Test, $p=0,018$; $n=4$). Die Ergebnisse sind als Mittelwert ±SEM dargestellt.

3.1.2 Intradermale Verabreichung der hGLuc-mRNA

Um die mRNA in die Haut einzubringen, wurden drei verschiedene Methoden verglichen. Bei der Permeation durch die Epidermis wurde 2,5 µg hGLuc-mRNA mit 2,5 µL Lipofectamine 2000™ komplexiert und zusammen mit dem Inkubationsmedium (1 mL OptiMEM® mit 1% Penicillin / Streptomycin) in das obere Reservoir der Franz-Zelle mit der eingespannten Hautprobe pipettiert.

Ebenso wurde die Methode der Standardinjektion nach Mantoux mit Spritzen (0,4 mm Durchmesser) mit der Injektion mittels hohler Mikronadeln (MicronJet 600™) verglichen. Hier wurde 24, 48 oder 72 h nach der Transfektion mit 1,5 µg Lipofectamine-komplexierter hGLuc-mRNA das Luciferase-Assay durchgeführt. Die Kontrollen enthielten jeweils die Transfektionsreagenz ohne mRNA. Die Kontrollgruppe wurde auf 1 gesetzt. Im Vergleich dazu wurden die relativen Lichteinheiten in der Experimentalgruppe dargestellt.

Die Permeation durch die Epidermis zeigte keine Erhöhung der gemessenen Luciferaseaktivität gegenüber der Kontrolle (-0,02 ±0,10 -fache Veränderung) im Vergleich zu der in jedem Versuch auf 1 gesetzten Kontrolle (Abb. 11). Die Luciferaseaktivität war gegenüber der Kontrolle nicht erhöht (Vorzeichen-Rang-Test: $p= 0.875$).

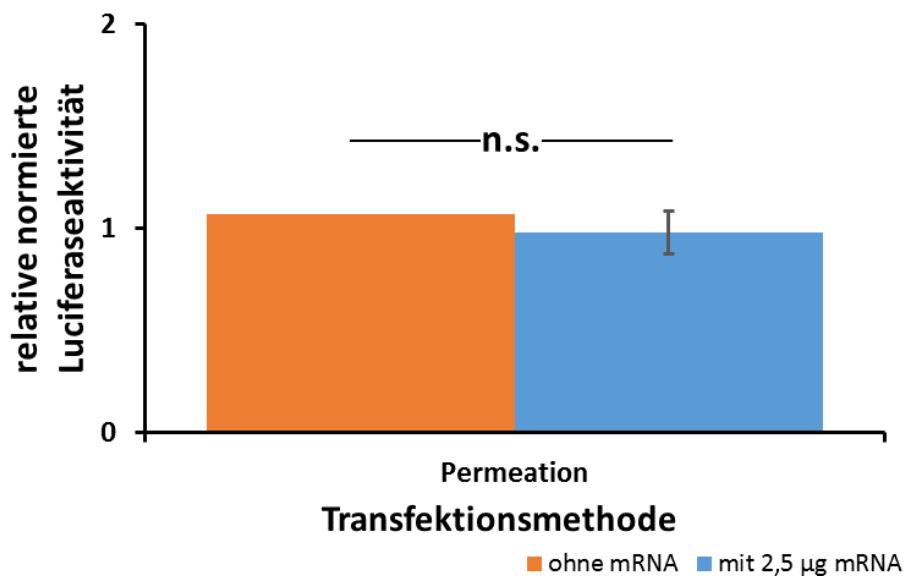


Abb. 11: Intradermale Verabreichung von synthetischer hGLuc-mRNA durch Permeation. Die Kontrollgruppe (Transfektionsreagenz ohne mRNA) wurde auf 1 gesetzt. Im Vergleich dazu wurde die relative normierte Luciferaseaktivität in der Experimentalgruppe dargestellt. Für die Transfektion wurde 2,5 µg hGLuc-mRNA mit 2,5 µL Lipofectamine 2000™ komplexiert. Dargestellt ist die Permeationsmethode, wobei der Transfektionsansatz direkt auf die Hautproben aufgebracht wurde (Veränderung um -0,02 ±0,10; $n=4$). Gemessen wurde die Luciferaseaktivität in den homogenisierten Hautproben. Die Permeationsmethode zeigte gegenüber der Kontrolle keine signifikante Erhöhung der Luciferaseaktivität (Vorzeichen-Rang-Test; Permeation: $p=0,88$). Die Ergebnisse sind als Mittelwert ±SEM dargestellt.

Die Injektion mit einer Spritze ergab einen deutlichen Nachweis der Transfektion ($2,44 \pm 0,96$ -fach erhöht gegenüber der Kontrolle) (Abb. 12). Jedoch ist diese Erhöhung der Luciferaseaktivität statistisch nicht signifikant gesteigert im Vergleich zur Kontrolle (Vorzeichen-Rang-Test: $p=0,46$). Die Menge an exprimierter Luciferase war mit hohlen Mikronadeln in 12-Well Platten höher ($3,62 \pm 1,72$ -fache Erhöhung gegenüber Kontrolle). Hier zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Luciferaseaktivität (Vorzeichen-Rang-Test: $p=0,0012$) im Vergleich zur Kontrolle. In den folgenden Versuchen mit Elastin-mRNA wurde daher nur noch mit Mikronadeln gearbeitet.

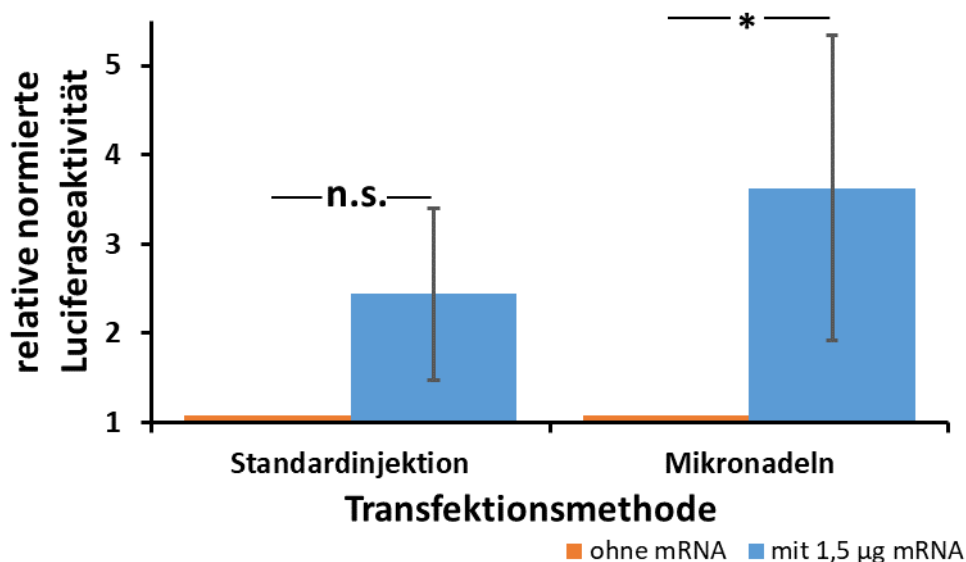


Abb. 12: Vergleich verschiedener Transfektionsmethoden zur intradermalen Verabreichung von synthetischer hGLuc-mRNA. Die Kontrollgruppe (Transfektionsreagenz ohne mRNA) wurde auf 1 gesetzt. Im Vergleich dazu wurde die relative normierte Luciferaseaktivität in der Experimentalgruppe dargestellt. Für die Transfektion der Standard- sowie Mikroinjektion wurde $1,5 \mu\text{g}$ hGLuc-mRNA mit $1,5 \mu\text{L}$ Lipofectamine 2000™ komplexiert. Dargestellt sind die Methoden der Standardinjektion mittels einer flach angesetzten Spritze (Erhöhung um $2,44 \pm 0,96$; $n=11$), sowie die Injektion mit hohlen Mikronadeln des MicronJet 600™ (Erhöhung um $3,62 \pm 1,72$; $n=13$). Gemessen wurde die Luciferaseaktivität in den homogenisierten Hautproben. Nur die Mikronadeln zeigten gegenüber der Kontrolle eine signifikante Erhöhung der Luciferaseaktivität (Vorzeichen-Rang-Test; Mikronadeln: $p=0,0012$; Standardinjektion: $p=0,46$). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

3.1.3 Detektion der Luciferaseaktivität in der Haut und im Inkubationsmedium

Um die Luciferaseaktivität in der lysierten Haut mit der im Inkubationsmedium zu vergleichen, wurde auch mit dem Inkubationsmedium ein Luciferase Assay durchgeführt. Es wurde 1,5 µg hGLuc-mRNA, komplexiert mit 1,5 µL Lipofectamine 2000™, mittels Standard- oder Mikroinjektion in die Haut eingebracht und die Luciferaseaktivität neben der Haut auch in deren Inkubationsmedium (1 mL OptiMEM® mit 1% Penicillin / Streptomycin) bestimmt (Abb. 13). Zur Bestimmung der Luciferaseaktivität im Inkubationsmedium wurde dieses vorerst aufkonzentriert, um es anschließend im Luciferase Assay einzusetzen. Im Inkubationsmedium der Haut, die mit der Standardinjektion mit mRNA transfiziert wurde, war die Luciferaseaktivität signifikant (Vorzeichen-Rang-Test, $p=0,0020$, $n_{\text{Medium}}=10$) um $6,56 \pm 3,19$ -fach erhöht gegenüber der Kontrolle (Transfektionsreagenz ohne mRNA). Die Luciferaseaktivität in den dazugehörigen Hautproben war mit $2,44 \pm 0,96$ ($n_{\text{Haut}}=11$) gegenüber der Kontrolle nicht signifikant erhöht (Vorzeichen-Rang-Test, $p=0,46$). Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Steigerung der Luciferaseaktivität im Inkubationsmedium im Vergleich zu den jeweiligen Hautproben nach hGLuc-mRNA Standardinjektion festgestellt werden (Wilcoxon-Test, $\text{Chi}^2(1)=4,77$, $p=0,029$, $n_{\text{Haut}}=11$, $n_{\text{Medium}}=10$).

Das Inkubationsmedium der Haut, welche mit den Mikronadeln mit mRNA transfiziert wurde, zeigte eine hoch signifikante Steigerung der Luciferaseaktivität um das $224,58 \pm 102,70$ -fach höhere im Vergleich zur Kontrolle ($n_{\text{Medium}}=20$; Vorzeichen-Rang-Test, $p<0,0001$). In den dazugehörigen Hautproben war die Steigerung der Luciferaseaktivität mit $3,62 \pm 1,72$ ($n_{\text{Haut}}=13$) ebenfalls signifikant (Vorzeichen-Rang-Test, $p=0,0012$). Der Unterschied zwischen der Steigerung der Luciferaseaktivität im Inkubationsmedium gegenüber den jeweiligen Hautproben nach hGLuc-mRNA Mikronadelinjektion war ebenfalls signifikant (Wilcoxon-Test, $\text{Chi}^2(1)=6,1$, $p=0,014$, $n_{\text{Haut}}=13$, $n_{\text{Medium}}=20$).

Die Mikroinjektion mittels MicronJet 600 führte zu einer signifikanten Luciferase Expression in der Haut. Da die Luciferase sezerniert wurde, konnte sowohl bei

der Standard- als auch der Mikroinjektion eine signifikant erhöhte Luciferaseaktivität im Medium detektiert werden.

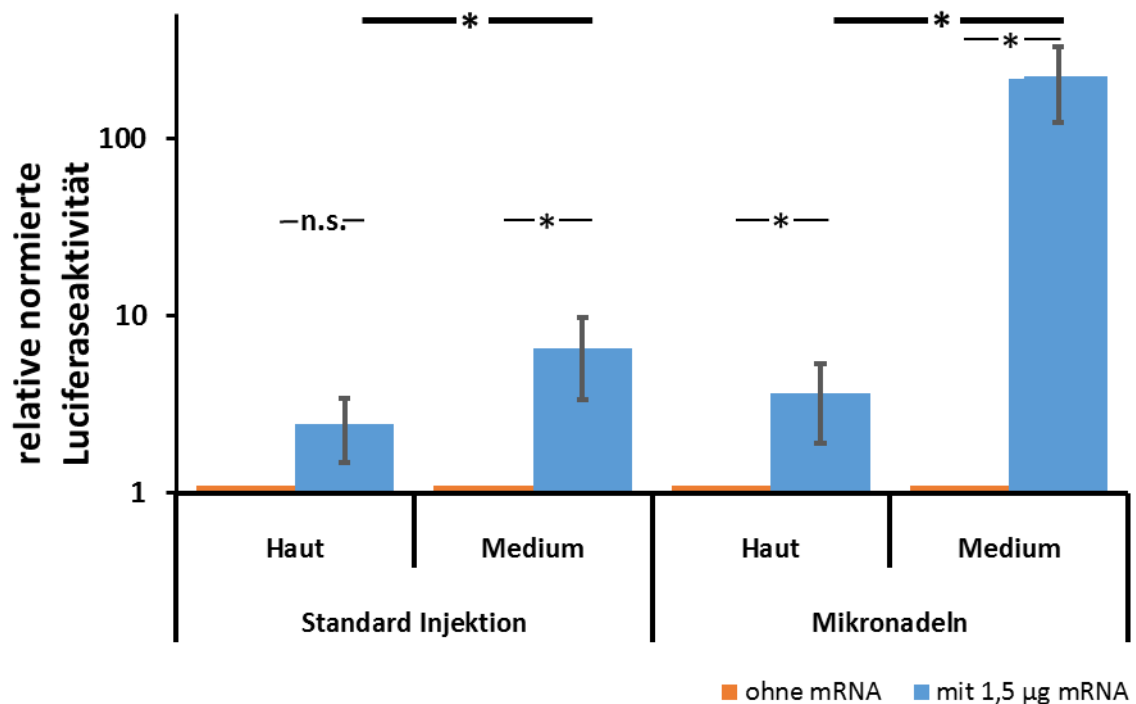


Abb. 13. Vergleich der Luciferaseaktivität in Haut und Medium. Nach der Transfektion der Haut mit 1,5 µg hGLuc-mRNA, die mit 1,5 µL Lipofectamine 2000™ komplexiert wurde, wurde die Luciferaseaktivität der lysierten Haut sowie des Inkubationsmediums bestimmt. Die Ergebnisse sind angegeben als Steigerung der Luciferaseaktivität der Experimentalgruppe gegenüber der Kontrolle, in welcher keine mRNA eingesetzt wurde. Die Kontrolle wurde für den jeweiligen Versuch auf 1 gesetzt.

Bei der Standardinjektion war die Luciferaseaktivität im Inkubationsmedium der mit mRNA transfizierten Haut um $6,56 \pm 3,19$ ($n_{\text{Medium}}=10$) signifikant gesteigert gegenüber der Kontrolle (Vorzeichen-Rang-Test, $p=0.002$). Die Erhöhung der Luciferaseaktivität in den dazugehörigen Hautproben war um $2,44 \pm 0,96$ ($n_{\text{Haut}}=11$) nicht signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle (Vorzeichen-Rang-Test, $p=0.46$). Bei der Injektion mit Mikronadeln war die Luciferaseaktivität im Medium um $224,58 \pm 102,70$ ($n_{\text{Medium}}=20$) signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle (Vorzeichen-Rang-Test, $p<0.001$). Auch bei der zugehörigen Hautprobe war die Luciferaseaktivität um $3,62 \pm 1,72$ ($n_{\text{Haut}}=13$) signifikant erhöht (Vorzeichen-Rang-Test; $p=0.0012$). Bei beiden Injektionsmethoden, Standard sowie Mikronadeln, war die Luciferaseaktivität im Medium signifikant erhöht gegenüber der jeweiligen Hautprobe (Wilcoxon-Test, Standardinjektion $p=0,029$, Mikronadeln $p=0,014$).

3.2 Nachweis der synthetischen Tropoelastin mRNA vermittelten Elastinsynthese

Elastin ist in gesunder Haut in vergleichsweise hohen Mengen vorhanden im Gegensatz zur Luciferase. Für die Erhöhung der Elastinmenge wurde 2,5 µg synthetische Tropoelastin mRNA mit 2,5 µL Lipofectamine 2000™ in 35 µL OptiMEM® komplexiert und mittels Mikronadeln in die Haut injiziert. Die Elastinmenge in der Kontrolle (Transfektionsreagenz ohne mRNA) und der Experimentalgruppe wurde mittels Fastin™ Elastin-Assay bestimmt.

3.2.1 Absoluter Elastin-Gehalt

Der absolute Elastin-Gehalt, der in den Hautstücken gemessen wurde, betrug 19 - 29 µg Elastin / mg Hautgewebe. Dies entspricht dem mittleren Gehalt von 2.1 +/- 1% Elastin in der Haut, wie angegeben von Uitto et al. (1983).

3.2.2 Bestimmung der Elastinmenge nach unterschiedlichen Zeiten

Eine längere Inkubationszeit könnte die gebildete Elastinmenge erhöhen. Die Hautstücke wurden mit 2,5 µg Elastin-mRNA, komplexiert in 2,5 µL Lipofectamine 2000™ transfiziert und die Elastinmenge der Hautstücke nach 24, 48 und 72 Stunden post Transfektion untersucht (Abb. 14). Nach der Inkubation der Hautstücke in einem Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂ wurden die Hautstücke entnommen und der jeweilige Elastingehalt mittels Fastin™ Elastin-Assay bestimmt. Die Elastinmenge ist gegenüber der Kontrolle (Transfektionsreagenz ohne mRNA) angegeben, welche auf 1 gesetzt wurde.

Die Inkubationszeit hatte im hier getesteten Intervall keinen Einfluss auf die Elastinmenge. Eine Korrelationsanalyse ergab im Bereich von 24 (n=7), 48 (n=4) und 72 (n=26) Stunden keine signifikanten Unterschiede in der Elastinmenge ($r(35)=0,083$, $p=0,63$). Es konnte bereits nach 24 Stunden Elastin detektiert werden, die Elastinmenge hat sich über den Zeitraum bis zu 72 Stunden nicht geändert. Deshalb wurden die Ergebnisse über die Zeiträume zwischen 24, 48 und 72 Stunden gepoolt.

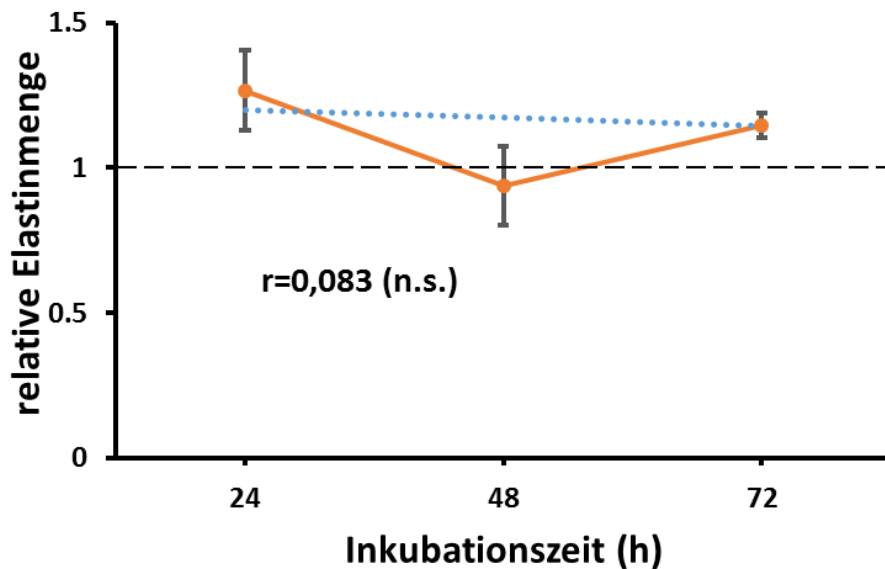


Abb. 14: Einfluss der Inkubationszeit auf die Steigerung der Elastinmenge. Die mit 2,5 µg Elastin-mRNA, komplexiert in 2,5 µL Lipofectamine 2000™ transfizierten Hautstücke wurden über einen Zeitraum von 24 (n=7), 48 (n=4) oder 72 (n=26) Stunden Inkubiert. Angegeben ist die Elastinmenge gegenüber der Kontrolle (Transfektionsreagenz ohne mRNA). Die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt (graue Strichlinie). Der Einfluss der Inkubationszeiten auf die relative Elastinerhöhung war nicht signifikant (Korrelationsanalyse; $r(35)=0,083$, $p=0,63$). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

3.2.3 Inkubationsbedingungen

Die rund gestanzten und auf 1 mm getrimmten Hautstücke wurden mit 2,5 µg Elastin-mRNA, komplexiert mit 2,5 µL Lipofectamine 2000™, transfiziert und anschließend für 24, 48 oder 72 h in einem Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Diese Inkubation fand entweder in Franz-Zellen (Abb. 4) statt, in welchen die Hautstücke eingespannt wurden oder in 12-Well Platten (Abb. 7), in welchen die Hautstücke in ein Medium gelegt wurden. Die Elastinmenge in den Hautstücken, die in 12-Wells inkubiert wurden, wurde mit denen, die in Franz-Zellen inkubiert wurden, verglichen (Abb. 15). Bei den Hautstücken, die in 12-Wells inkubiert wurden, wurde eine um $1,11 \pm 0,05$ (n=14) fach erhöhte Elastinmenge gegenüber der Kontrolle (Behandlung ohne Elastin-mRNA)

festgestellt, dies war signifikant (einseitiger Einstichproben t-Test: $p=0,028$). In 12-Well Platten war die Erhöhung der Elastinmenge somit leicht niedriger als bei der Durchführung der Transfektion in Franz-Zellen ($1,19 \pm 0,06$; $n=23$). Auch in Franz-Zellen zeigte sich eine Signifikanz (einseitiger Einstichproben t-Test: $p=0,0033$). Der Unterschied zwischen der Erhöhung der Elastinmenge beider Inkubationsbedingungen war nicht signifikant (Zwei-Stichproben-t-Test, zweiseitiges $t(35)=0,85$, $p=0,40$). Aus diesem Grund wurden in den folgenden Versuchen die Ergebnisse aus den Franz-Zellen mit denen in 12-Well Platten gepoolt.

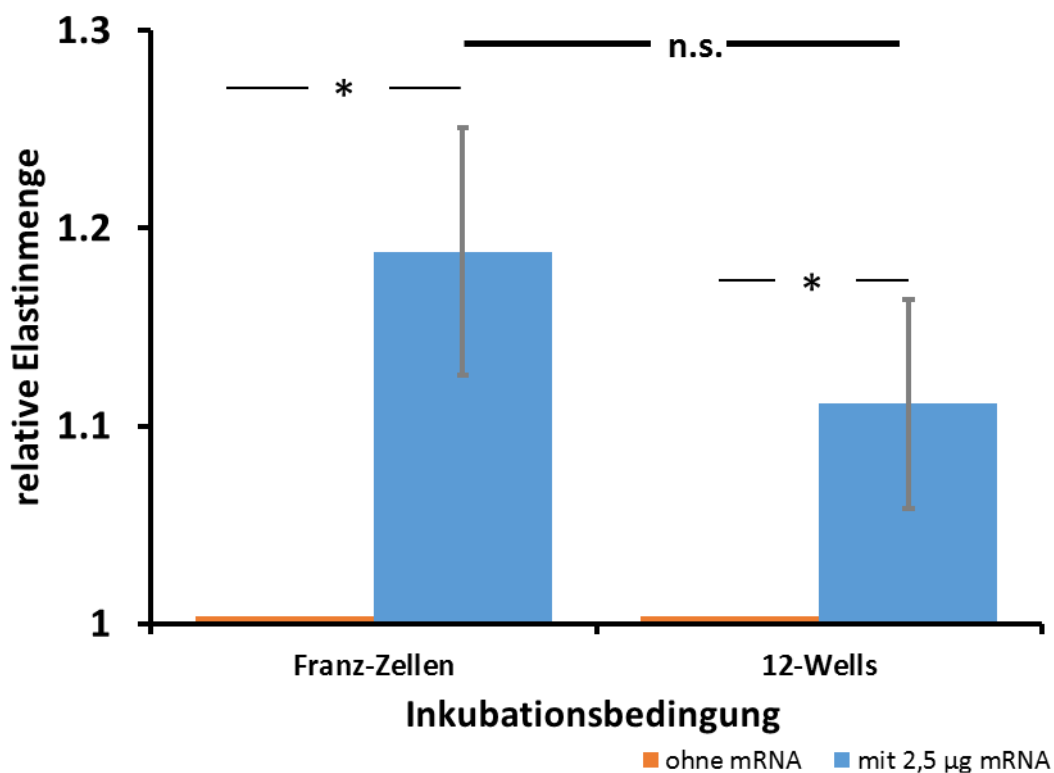


Abb. 15: Vergleich der Inkubationsbedingungen für die Elastin-mRNA Transfektion. Für die Transfektion wurde 2,5 µg Elastin-mRNA mit 2,5 µL Lipofectamine 2000™ komplexiert und mittels MicronJet 600™ in die Hautstücke injiziert. Die Hautstücke wurden in Franz-Zellen oder in 12-Well Platten inkubiert. Die Kontrolle (Transfektionsreagenz ohne mRNA) wurde auf 1 gesetzt und in den Experimentalgruppen die relative Elastinmenge im Vergleich zur Kontrolle berechnet. Die Versuche in Franz-Zellen zeigten eine Erhöhung der Elastinmenge ($1,19 \pm 0,06$; $n=23$), diese Erhöhung ist signifikant (einseitiger Einstichproben t-Test; Franz-Zellen: $p=0,0033$). In 12-Well Platten war die

Elastinmenge ebenfalls signifikant erhöht ($1,11 \pm 0,05$; $n=14$) (einseitiger Einstichproben t-Test: $p=0,028$). Im Vergleich beider Inkubationsbedingungen ergab sich kein signifikanter Unterschied der Erhöhung der Elastinmenge (t-Test, $p=0,40$). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

3.2.4 Einfluss der Inkubationsmedien auf die Elastinproduktion

Unterschiedlich eingesetzte Medien während der Inkubation von Hautstücken während der Inkubation beeinflussen die Transfektionseffizienz sowie die Lebensfähigkeit und somit die Proteinproduktion der Zellen. Aus diesem Grund wurden verschiedene Inkubationsmedien getestet, wobei jeweils 1 mL während der Inkubation auf die mit $2,5 \mu\text{g}$ Elastin-mRNA, komplexiert in $2,5 \mu\text{L}$ Lipofectamine 2000™ transfizierten Hautstücke gegeben wurde. Anschließend inkubierten die Hautstücke im Brutschrank bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$. Es wurde Endothelzellmedium (EZ), HEK293 DMEM, OptiMEM® plus 1% Penicillin / Streptomycin oder Auslassen des Mediums (ohne Medium im oberen Reservoir der Franz-Zellen) miteinander verglichen.

In Abb. 16 ist die gemessene Steigerung der Elastinmenge gegenüber der Kontrolle (Transfektionsreagenz ohne mRNA) angegeben. Die Kontrolle wurde jeweils auf 1 gesetzt. Das Endothelzellmedium führte zu einer auf das $1,16 \pm 0,07$ ($n=11$) -fach erhöhten Elastinmenge im Vergleich zur Kontrolle, dies war signifikant (einseitiger Einstichproben-t-Test: $p=0,044$). HEK293-Medium erhöhte die Elastinmenge um das $1,06 \pm 0,07$ ($n=3$) fache gegenüber der Kontrolle, hier zeigte sich keine Signifikanz (einseitiger Einstichproben-t-Test: $p=0,22$). Ohne Medium war die Elastinerhöhung signifikant um $1,12 \pm 0,04$ ($n=8$) -fach gegenüber der Kontrolle (einseitiger Einstichproben t-Test: $p=0,007$). OptiMEM® führte zu einer $1,22 \pm 0,09$ ($n=15$) -fachen signifikanten Elastinerhöhung (einseitiger Einstichproben-t-Test: $p=0,016$). Die unterschiedlich eingesetzten Medien hatten im Vergleich zueinander statistisch keinen signifikanten Einfluss auf die gemessene Elastinmenge (Varianzanalyse, $F(3,33)=0,54$, $p=0,66$).

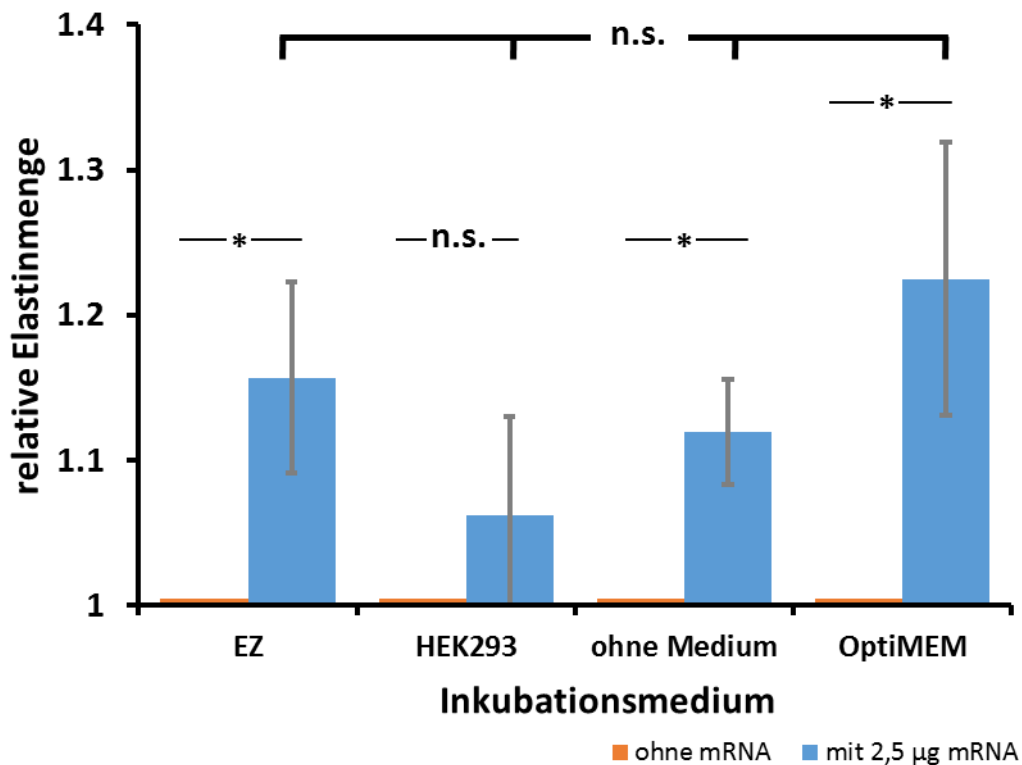


Abb. 16: Einfluss der Inkubationsmedien auf die Elastinproduktion. Es wurden verschiedene Inkubationsmedien zur Inkubation der Hautstücke verwendet, welche mit 2,5 µg Elastin-mRNA, komplexiert in 2,5 µL Lipofectamine 2000™ transfiziert wurden. Angegeben ist die Elastinmenge gegenüber der Kontrolle (Transfektionsreagenz ohne mRNA). Die Kontrolle wurde jeweils auf 1 gesetzt. Ein einseitiger Einstichproben-t-Test zwischen den Experimentalgruppen der verschiedenen Inkubationsmedien und der jeweiligen Kontrolle ergab eine um das 1,16 ± 0,07 -fache signifikante relative Elastinerhöhung im Endothelzellmedium (EZ) (p=0,044, n=11). Eine ebenfalls signifikante Elastinerhöhung um das 1,12 ± 0,04 -fache ergab sich ohne Medium (p=0,007, n=8) und im OptiMEM® plus 1% Penicillin / Streptomycin mit einer 1,22 ± 0,09 -fach erhöhten Elastinmenge (p=0,016, n=15). Kaum einen Unterschied ergab sich im HEK293 DMEM gegenüber der Kontrolle mit einer 1,06 ± 0,07 -fachen Elastinerhöhung (p=0,23, n=3). Die unterschiedlichen Medien hatten im Vergleich zueinander keinen signifikanten Einfluss auf die Elastinmenge in den Hautstücken (Varianzanalyse, p=0,66). Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM dargestellt.

3.2.5 Ermittlung des optimalen Injektionswinkels mit dem MicronJet 600™

Die Durchführung der Mikroinjektion mit den Mikronadeln des MicronJet 600™ nach der empfohlenen Methode des Herstellers NanoPass führte zu Austritt von Transfektionsmedium um die Nadeln herum. Daher wurde eine zweite Methode entwickelt, um eine komplette Injektion sicherzustellen. Nach Herstellerangaben wurde in einem Winkel von 45° injiziert. Bei der modifizierten Methode wurde in einem Winkel von 45° eingestochen, die Mikronadeln dann aber auf 90° gestellt und anschließend injiziert.

Als Transfektionsansatz wurde mit dem MicronJet 600™ in jedes Hautstück 35 µL OptiMEM®, mit 2,5 µL Lipofectamine 2000™ komplexierter 2,5 µg Elastin-mRNA injiziert. Bei der vom Hersteller empfohlenen Technik wurde eine signifikante Elastinmengen-Steigerung auf das $1,20 \pm 0,08$ -fache ($n=18$) gegenüber der Kontrolle erreicht (Transfektionsreagenz ohne mRNA; Einstichproben-t-Test, $t(17)=2,48$, $p=0,012$). Die Kontrolle wurde für beide Methoden jeweils auf 1 gesetzt, im Vergleich dazu wurde die Elastinmenge in den Experimentalgruppen angegeben (Abb. 17). Die modifizierte Methode steigerte die Elastinmenge ebenfalls signifikant auf das $1,12 \pm 0,04$ -fache ($n=19$) gegenüber der Kontrolle (Transfektionsreagenz ohne mRNA; Einstichproben-t-Test, $t(18)=3,06$, $p=0,0034$). Der Unterschied zwischen der Injektion mit einem Winkel von 45° gegenüber der Injektion mit 90° war statistisch nicht signifikant (Zweistichproben-t-Test; $t(35)=0,86$, $p=0,40$). Allerdings war die Standardabweichung bei der 90° Injektion deutlich verringert ($\pm 0,17$ im Vergleich zu $\pm 0,34$ bei 45°). Dieser Unterschied in der Standardabweichung war signifikant (2-Stichproben F-Test: $F(17,18)=3,77$, $p=0,0039$). Die Effektstärke (Differenz des Mittelwertes zur Kontrolle geteilt durch Standardabweichung) war mit 0,70 bei 90° leicht erhöht gegenüber 0,58 bei 45°.

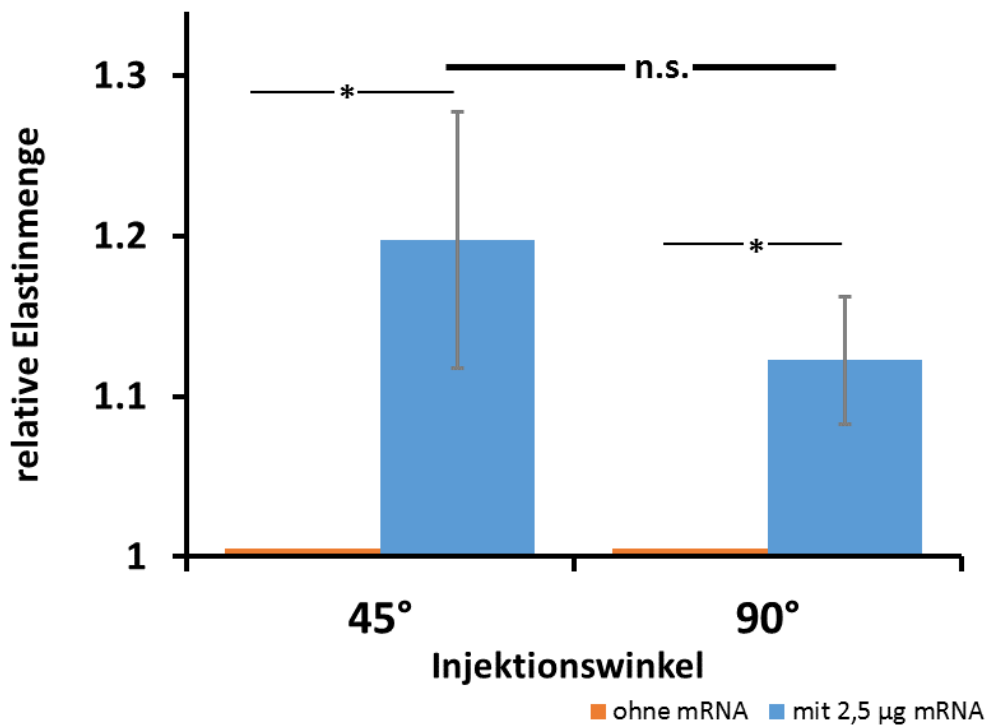


Abb. 17: Injektionswinkel mit dem MicronJet 600™. Zur Injektion des Transfektionsansatzes von 35 µL OptiMEM®, mit 2,5 µL Lipofectamine 2000™ komplexierter 2,5 µg Elastin-mRNA pro Hautstück wurden zwei verschiedene Injektionswinkel verglichen. Einmal wurde nach Herstellerangaben in einem Winkel von 45° eingestochen und injiziert, zum anderen wurde in 45° eingestochen und der MicronJet 600™ vor der Injektion auf 90° aufgerichtet. Angegeben ist die Elastinmenge gegenüber der Kontrolle (Transfektionsreagenz ohne mRNA). Die Kontrolle wurde jeweils auf 1 gesetzt. Bei der Injektion im 45° Winkel war die Elastinmenge $1,20 \pm 0,08$ ($n=18$) -fach höher als bei der Kontrolle (Einstichproben-t-Test, $t(17)=2,48$, einseitiges $p=0,012$). Bei der Injektion mit einem Winkel von 90° war die Elastinmenge $1,12 \pm 0,04$ ($n=19$) -fach signifikant höher als bei der Kontrolle (Einstichproben-t-Test, $t(18)=3,06$, $p=0,0034$). Der Unterschied der Elastinmenge zwischen den beiden Injektionswinkeln war statistisch nicht signifikant (Zweistichproben t-Test, $p=0,40$). Auffällig ist hier, dass der Standardfehler (sowie die zugrundeliegende Standardabweichung) bei 90° um die Hälfte geringer war gegenüber 45°. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

3.2.6 Einfluss der Prozessierungszeit auf das Hautgewicht

Die auf 1 mm getrimmte und auf einen Durchmesser von 1,5 cm gestanzte Schweinehaut nimmt während seiner Inkubation in 1 mL Medium (OptiMEM®, HEK293 DMEM oder Endothelzellmedium) Flüssigkeit auf und gibt diese Flüssigkeit nach der Entnahme aus dem Medium durch Verdunstung wieder ab. Damit würde diese Verdunstung zu einem Gewichtsverlust der Hautproben während des Fastin™ Elastin-Assay führen. Da die Messungen auf die Hautmenge normiert wurden, würde die Veränderung des Gewichts während der Bearbeitung die Ergebnisse beeinflussen. Deshalb wurde eine Zeitreihe mit Liegezeiten von 5, 10 und 15 Minuten durchgeführt. Das Gewicht der Hautstücke wurde nach diesen Zeiten in geschlossenen Behältern gemessen.

Es zeigte sich, dass die Gewichtsabnahme der Haut in den gemessenen Zeiträumen erheblich ist. Abb. 18 zeigt, dass das durchschnittliche Gewicht der Hautstücke bei 5 min $16,2 \pm 0,7$ mg beträgt, bei 10 min $14,3 \pm 0,8$ mg und nach 15 min auf $12,6 \pm 0,4$ mg sinkt. Da die ermittelte Elastinmenge vom Gewicht der Haut abhängt, ist diese Abnahme zwischen 5 min und 15 min um 30% durch Verdunstung der Flüssigkeit durchaus wichtig. Eine lineare Regressionsanalyse ergab eine Abnahme des Hautgewichtes von 1,81 mg pro 5 Minuten, welche hoch signifikant war (lineare Korrelation, $r(19) = -0,680$, $p = 0,0007$). Bei den Elastin-Versuchen wurde daher eine einheitliche Prozessierungszeit eingehalten.

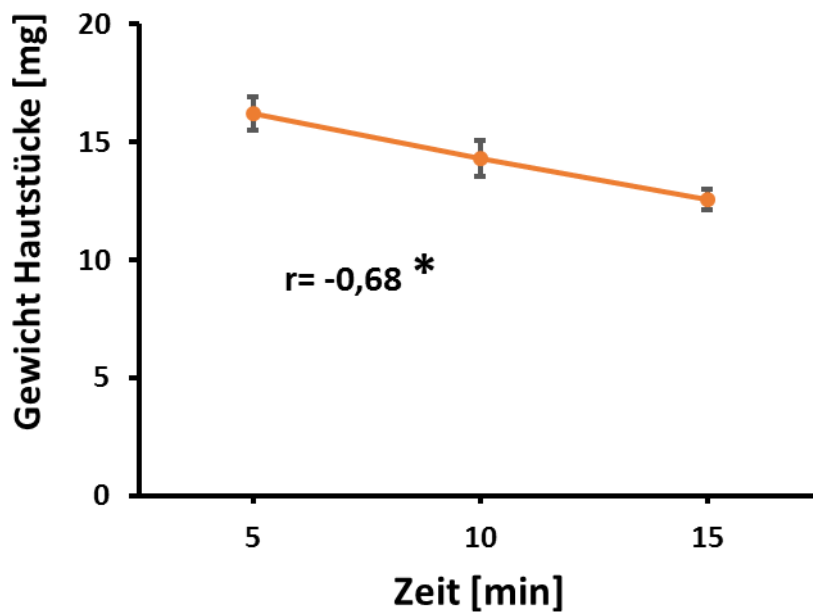


Abb. 18: Einfluss der Prozessierungszeit auf das Hautgewicht. Das Gewicht der Hautstücke wurde nach der Entnahme aus ihrem Inkubationsmedium (OptiMEM®, HEK293 DMEM oder Endothelzellmedium) nach 5, 10 oder 15 min bestimmt (jeweils n=7). Die Gewichtsabnahme der Hautstücke in dieser Zeitspanne war hoch signifikant (lineare Korrelation, $r(19) = -0,680$, $p=0,0007$); Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

3.2.7 Ermittlung der Elastinmenge in Hautstücken & Inkubationsmedium

Es wurde 2,5 μ g Elastin-mRNA mit 2,5 μ L Lipofectamine 2000™ komplexiert und mittels MicronJet 600™ in die Hautstücke injiziert. Nach 72 Stunden ergab sich im Mittel eine Steigerung der Elastinmenge nach Injektion der Transfektionsreagenz um das 1,16 ($\pm 0,04$) -fache im Hautstück (Abb. 19A) gegenüber der Kontrolle (Transfektionsreagenz ohne mRNA). Die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt. Die Erhöhung der Elastinmenge war hoch signifikant gegenüber der Kontrolle (Einstichproben-t-Test: $t(25)=3,75$, einseitiges $p=0,0009$).

Die Überprüfung des Elastin-Gehalts im Inkubationsmedium zeigte nach 72 Stunden einen ähnlichen Effekt wie in den Hautstücken (Abb. 19B). Die Steigerung der Elastinmenge im Medium war mit 1,33 $\pm 0,07$ -fach (n=4) etwas

höher als der Mittelwert der Hautstücke, und zeigte ebenfalls einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (Einstichproben-t-Test: $t(3)=4,49$, $p=0.021$). Dies zeigt, dass das synthetisierte Elastin aufgrund der auf 1 mm dünn getrimmten Hautstücke in das Medium sezerniert wird.

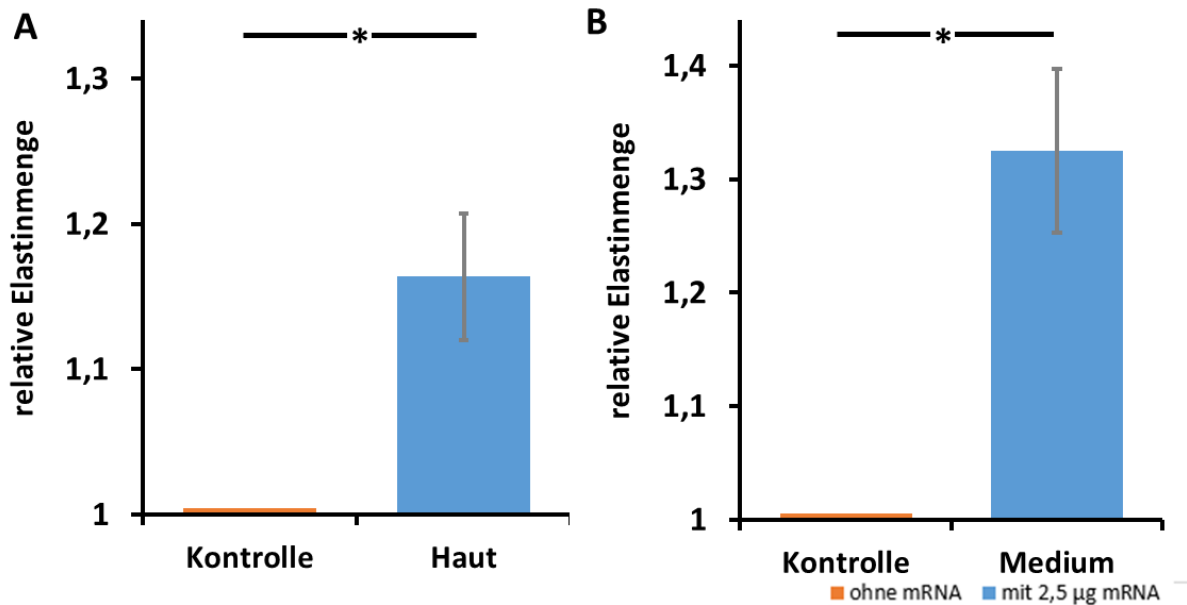


Abb. 19: Ermittlung der Elastinmenge 72 Stunden nach der Transfektion. Es wurde 2,5 µg Elastin-mRNA mit 2,5 µL Lipofectamine 2000™ komplexiert und mittels MicronJet 600™ in die Haut injiziert. Die Kontrolle (Transfektionsreagenz ohne mRNA) wurde auf 1 gesetzt; nach 72 Stunden wurde im Vergleich dazu die jeweilige Elastinmenge in den Hautstücken (A) sowie im Inkubationsmedium (B) dargestellt. In den Hautstücken (n=26) wurde eine hoch signifikante Erhöhung um das $1,16 \pm 0,04$ -fache der Elastinmenge detektiert (Einstichproben-t-Test, $p=0,0009$). Die Bestimmung der Elastinmenge im Inkubationsmedium ergab ebenfalls eine ähnliche Erhöhung um $1,33 \pm 0,07$ -fach (n=4). Die Elastinerhöhung im Medium war signifikant von der Kontrolle verschieden (Einstichproben-t-Test, $p= 0,021$). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst das Schweinehaut-Modell sowie die intradermale mRNA Verabreichung durch hohle Mikronadeln etabliert. Dazu wurde zunächst synthetische hGLuc-mRNA (humanisierte Gaussia Luciferase) zur Bestimmung der erfolgreichen Transfektion eingesetzt. Weiterhin wurde die Transfektion mit synthetischer Tropoelastin-mRNA etabliert, optimiert und die erfolgreiche Elastinsynthese nachgewiesen.

4.1 Intradermale Verabreichung von hGLuc-mRNA in Schweinehaut

Die hGLuc-mRNA wurde mit Lipofectamine 2000™ in OptiMEM® nach Avci-Adali et al. (2014a) komplexiert. Für das Hautmodell wurde die Haut aus dem Ohr von Schweinen entnommen. Die Haut wurde auf 1 mm getrimmt, anschließend wurden verschiedene Methoden zur Transfektion der hGLuc-mRNA getestet. Die nicht invasive Methode der Permeation mittels Inkubation der Hautoberfläche mit den hGLuc-mRNA Komplexen führte zu keiner signifikanten Erhöhung der Proteinproduktion in der Dermis. Die Permeation von Nukleinsäuren in Haut konnte bisher nur für siRNA etabliert werden sowie in neuester Zeit mittels Öl basierter Permeationsunterstützung (Aljuffali et al. 2016, Heck et al. 2016, Vij et al. 2017). Mit einer Standard-Injektionsmethode (Mantoux 1910, Laurent et al. 2007, Lambert und Laurent 2008) konnte mit Kanülen (0,4 mm Durchmesser) die mRNA Transfektionskomplexe sehr flach in die Haut injiziert werden. Damit konnte hGLuc-mRNA erfolgreich transfiziert werden, allerdings ergaben sich in den einzelnen Hautstücken hohe Varianzen zwischen den jeweiligen Messungen der relativen normierten Luciferaseaktivität. Die höchste Luciferaseaktivität konnte mit hohlen Mikronadeln des MicronJet 600™ mit relativ geringer Varianz und einer Erhöhung der Luciferaseaktivität um das 3,62 -fache erreicht werden im Vergleich zur Kontrolle (Transfektionsreagenz ohne mRNA, die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt).

Mikronadeln gehören in den letzten Jahren zu den vielversprechendsten Entwicklungen der Nukleinsäuretransport in die Haut (Prausnitz und Langer

2008, Kim et al. 2012, Chiappini et al. 2015). Verschiedene Ausführungen der Mikronadeln führen zu einer Überwindung der Hautbarriere und zu erfolgreicher transdermaler Verabreichung von Medikamenten. Dazu gehören neben den hohlen Mikronadeln die solide Anfertigung, welche durch eine temporäre Beschädigung der Hautoberfläche und anschließenden Wirkstoffauftrag eine Verabreichung erzielen kann, als auch sich auflösende oder beschichtete Mikronadeln (Ita 2015). Die hohle Variante zeigt hier verschiedene Vorteile: Im Vergleich zu soliden Mikronadeln kann auf den zusätzlichen Schritt des Wirkstoffauftrags nach Insertion verzichtet werden, da der Wirkstoff in einem Schritt verabreicht wird, was zeitlich effizienter ist. Die temporäre Zerstörung der Hautbarriere muss ebenfalls nicht aufrechterhalten werden, was das Infektionsrisiko gegenüber soliden Mikronadeln verringert, da diese gegenüber hohlen Mikronadeln auf eine längerfristig zerstörte Hautbarriere angewiesen sind (Gupta et al. 2011, Tuan-Mahmood et al. 2013). Gupta et al. (2011) zeigten außerdem, dass sich die Wunden nach Mikronadelinsertion besonders schnell schließen, je kürzer die zeitliche Insertion stattgefunden hatte. Weiterhin zeigten histologische Schnitte der Haut nach Injektionen mit dem MicronJet 600™, dass durch den direkten Injektionsvorgang und den entstehenden Druck Mikrounterbrechungen zwischen den Zellen in der Epidermis erzeugt werden, wodurch weitaus mehr Zellen mit der injizierten Lösung in Kontakt kommen (Dul et al. 2017). Dabei konnte gezeigt werden, dass durch die Mikrounterbrechungen eine Steigerung der Transporteffizienz auf zellulärer Ebene stattfindet. Hohle Mikronadeln sind somit, was die verfügbaren Zellen angeht, den beschichteten, soliden und dissoziierenden Mikronadeln überlegen, da diese auf die Hautzellen angrenzend an die Nadeloberfläche beschränkt sind.

Mit Hilfe von Mikronadeln wurden sowohl DNA als auch siRNA intradermal appliziert (Aldawsari et al. 2015, Deng et al. 2016). Lipofectamine 2000™ komplexierte Plasmid DNA konnte zu Impfzwecken eine höhere Steigerung der Immunantwort (Immunglobulin G-Titer) erzeugen, wenn mit hohlen Mikronadeln in die Haut injiziert wurde, im Vergleich zu einer intramuskulären Standardinjektion mittels Kanüle (Pamornpathomkul et al. 2017). Da in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nur mit hohlen Mikronadeln eine signifikante

Erhöhung der Luciferaseaktivität durch hGLuc-mRNA Transfektion erreicht werden konnte, wurden ausschließlich diese in den Versuchen für die Transfektion von Elastin-mRNA genutzt. Lipofectamine 2000™ wurde eingesetzt um Nanokomplexierte mRNA zu bilden. Nanokomplexierte mRNA konnte bereits erfolgreich zu Impfzwecken injiziert werden (Petsch et al. 2012, Persano et al. 2017) und zeigt hier ein deutlich geringeres Risiko als die DNA-Behandlung, da mRNA nicht ins Genom eingebaut wird und somit keine Mutationen auslöst (Persano et al. 2017).

Bei der Transfektion ist auch der Typ der mRNA wichtig. Phua und seine Mitarbeiter zeigten, dass die Transfektion von 4 µg nackter („naked“) hGLuc-mRNA subkutan in die Haut der Ohrmuschel von Mäusen keine signifikante Erhöhung der Luciferaseaktivität erbrachte, erst 8 µg führte zu einer hoch signifikanten Erhöhung (Phua et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde 1,5 – 2,5 µg synthetische hGLuc-mRNA eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine stabilisierte hGLuc-mRNA, wobei sich auf deren Wirksamkeit neben der Dosierung auch das Medium und dessen pH-Wert auswirkt (Phua et al. 2013).

Insgesamt zeigte sich, dass die hier verwendete synthetische mRNA zu einer Translation führte. Die Verwendung von hohlen Mikronadeln war für die Applikation in die Haut am erfolgreichsten. Das Hautmodell wurde für die Elastin-mRNA Transfektion etabliert. Hierzu trugen nicht nur die eingesetzten Mikronadeln bei, sondern auch die Verwendung der modifizierten und in Lipoplexen komplexierten mRNA (Avci-Adali et al. 2014a, Avci-Adali et al. 2014b, Michel et al. 2015).

4.2 Elastin-mRNA Transfektion

Die Transfektion von Hautstücken mit 2,5 µg Elastin-mRNA, komplexiert in 2,5 µL Lipofectamine 2000™ führte zu einer hoch signifikanten Erhöhung des Elastin-Gehalts im Vergleich zur Kontrolle (Transfektionsreagenz ohne mRNA) um das **1,16 -fache**. Diese Erhöhung beweist zum ersten Mal, dass durch Elastin-mRNA Transfektion eine Steigerung der Elastinmenge in der Haut möglich ist.

Es wurden verschiedene methodische Variationen getestet, um den Effekt der mRNA-Einbringung zu erhöhen. Dabei ist es unter anderem gelungen bei den Absolutmessungen von Elastin in der Haut die Werte der Literatur von ca. 2 Gewichtsprozent (Uitto et al. 1983) zu erreichen. Die in dieser Arbeit dargestellten Steigerungen der Elastinmenge über diesen Grundpegel werden als relative Elastinmenge gegenüber der Kontrolle angegeben (Cenizo et al. 2006, Zhao et al. 2009, Pittet et al. 2014).

Im Folgenden wird die Steigerung der Elastinmenge im Vergleich zur Kontrolle nach Transfektion der Hautstücke mit Elastin-mRNA beschrieben. Keinen Einfluss hatte die Inkubationsmethode dieser Hautstücke in Franz-Zellen oder in 12-Well Platten. Auch konnte gezeigt werden, dass bereits nach 24 Stunden Inkubationszeit Elastin nachgewiesen werden kann und eine Erhöhung auf 48 oder 72 Stunden keine signifikanten Unterschiede auf die Steigerung der Elastinmenge im Vergleich zur Kontrolle bringt. Der Einsatz verschiedener Medien während der Inkubation der Hautstücke zeigte, dass Endothelzellmedium, HEK293 DMEM, das Auslassen des Mediums oder OptiMEM® ebenfalls keinen Unterschied ergab. Bei den MicronJet 600™ Mikronadeln wird vom Hersteller eine Injektion mit einem 45° Winkel empfohlen. Bei diesem Winkel stechen die Nadeln mit ihrer Pyramidenform ideal in die Haut. Jedoch zeigte sich, dass eine Injektion in diesem Winkel bei abpräparierten Hautstücken zu dem Problem führte, dass nicht die gesamte Injektionsmenge injiziert wurde. Somit traten kleine Mengen des jeweiligen Transfektionsansatzes am Injektionsort aus. Dies konnte vermieden werden, indem die Mikronadeln vor der Injektion aufgerichtet wurden (90°). NanoPass, der Hersteller des MicronJet 600™ erklärte, dass dies wahrscheinlich ein Problem der abpräparierten Haut sei und man bei Haut in situ mit 45° injizieren sollte. Nach Aufrichten konnte das Injektionsvolumen bei abpräparierter Haut allerdings besser kontrolliert werden.

Die erfolgreiche Transfektion mit Elastin-mRNA zeigte sich zum einen durch die hoch signifikante Steigerung der Elastinmenge in der Haut. Interessant ist aber auch, dass im umgebenden Medium ebenfalls eine Steigerung der Elastinmenge nachgewiesen werden konnte. Dies beweist, dass Tropoelastin in den extrazellulären Raum sezerniert wurde. Der Grund für das hohe Vorkommen im

Medium ist vermutlich die auf nur 1 mm Dicke getrimmte Haut. Der Transport von Tropoelastin in die extrazelluläre Matrix ist die Voraussetzung für die erfolgreiche Bildung von funktionellem Elastin.

Obwohl die methodischen Variationen meist nicht zu statistisch signifikanten Verbesserungen führten, ergaben sich aus kleinen quantitativen Unterschieden oder theoretischen Überlegungen folgende Empfehlungen: Für die Transfektion sollten hohle Mikronadeln genutzt werden und deren Injektionswinkel sollte bei abpräparierter Haut in einem 90° Winkel erfolgen. Das Markieren der während der Transfektion entstehenden Blase und ausschließliches Verwenden dieses Bereichs ergibt eine zuverlässige Messung des transfizierten Areals. Die aufgeführten Maßnahmen wie die Behandlung der Hautstücke vor Transfektion mit antibiotischer- und Jodlösung sowie das Autoklavieren der Franz-Zellen verringerten die Kontaminationen ebenso wie die Verwendung von sterilen 12-Well Platten als Inkubationsbedingung. Die 12-Well Platten zeigten zusätzlich zum geringeren Kontaminationsrisiko gegenüber Franz-Zellen einen Vorteil im Handling (kein aufwendiger Aufbau und Verschluss, kein Autoklavieren). Der Gewichtsverlust durch Verdunstung nach der Entnahme der Hautstücke aus dem Inkubationsmedium vor dem Wiegen war teilweise hoch; dem steht die Gewichtszunahme durch Flüssigkeitsaufnahme entgegen. Hier muss standardisiert unter Einbehaltung genauer Zeitfenster gearbeitet werden.

Die hier beschriebene Steigerung der Elastinmenge durch Transfektion von synthetischer Elastin-mRNA via Mikronadeln ist ein neuer, erfolgversprechender Weg, um pathologischen Hautveränderungen basierend auf einem Elastinverlust in adulter Dermis entgegenzuwirken. Bisherige Ansätze mit dem gleichen Ziel arbeiten zum größten Teil mit Fibroblastenkulturen (Hinek et al. 2014; Deglesne et al. 2016; Diekmann et al. 2016). Hierbei zeigte sich z.B. dass TGF (Transforming Growth Factor: transformierender Wachstumsfaktor) $\beta 1$ und $\beta 2$ potente Stimulatoren der ELN Gen Expression sind, indem sie stabilisierend auf die Elastin-mRNA wirken (Kähäri et al. 1992, Kucich et al. 2002). Beim Menschen konnte jedoch gezeigt werden, dass TGF β maligne Tumor Metastasen fördert (Lebrun 2012).

In der Haut beträgt der physiologische Elastingehalt im Vergleich zu anderen Geweben nur 2% (Uitto et al. 1983). Hier konnte gezeigt werden, dass mit Elastin-mRNA dieser Wert um einen Faktor von 1,16 (16%) erhöht werden kann. Auch ist bekannt, dass endogene Elastin-mRNA in adulten Fibroblasten posttranskriptionell aktiv abgebaut wird (Zhang et al. 1999). Im Gegensatz zur sonst üblichen Genregulation wird das Elastin-Gen nicht abgeschaltet, obwohl kein Protein bei adulten Säugern mehr gebildet wird (Coolen et al. 2010), um eine schnelle Wundreparatur bei Verletzungen zu ermöglichen. Neuere Arbeiten zeigen, dass die Regulation der Elastinbildung noch komplexer ist. So gibt es pro- (z.B. TGF- β) und anti- (z.B. TGF- α) elastogene Zytokine, welche in die transkriptionellen und posttranskriptionellen Prozesse regulierend eingreifen (Sproul und Argraves 2013).

Die miRNA29 bindet an die 3'UTR Region der endogenen Elastin-mRNA und führt dazu, dass die Elastin-mRNA bereits vor der Translation in kurzer Zeit abgebaut wird (Ott et al. 2011, Zhang et al. 2012b). Die miRNA29 Familie hat mindestens 4 Mitglieder, welche neben Tropoelastin auch die mRNA von Kollagen und Fibrillin abbauen (Dong und Majesky 2012). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Elastin-mRNA ist synthetisch und besitzt in der 3'UTR-Region keine komplementären Bereiche für die miRNA29. Weiterhin ist der Pegel an miRNA29 gerade so hoch, dass der normale Pegel von endogener Elastin-mRNA gebunden werden kann. Dadurch sollte selbst eine zusätzliche Gabe von nicht synthetischer Elastin-mRNA eine Tropoelastin-Translation bewirken (Zhang et al. 1999). Man kann insgesamt davon ausgehen, dass unter den in der Dermis gegebenen Umständen, die hier gezeigte hoch signifikante Erhöhung auf die 1,16 -fache Elastinmenge im zu erwartenden Bereich liegt.

4.2.1 Vergleich Elastin- und Luciferase-Transfektion

Eine Zusammenfassung der Luciferase- und der Elastinversuche ergibt, dass methodische Verbesserungen, vor allem die Einführung von hohlen Mikronadeln, zu einer erfolgreichen mRNA-Transfektion in Haut und zu signifikanten Proteinexpressionen geführt haben. Dabei war die Luciferase-Produktion

deutlich besser nachweisbar als die von Elastin. Die vergleichsweise höheren Proteinmengen bei Luciferase lag selbstverständlich daran, dass in Haut keine endogene Luciferase existiert und somit eine erfolgreiche Transfektion sehr leicht mit exzellentem Signal-zu-Rausch Verhältnis nachgewiesen werden kann. Im Falle von Elastin mit dem bekannt hohen physiologischen Elastingehalt der Haut ist dieser Nachweis sehr viel schwieriger. Zusätzliches Elastin addiert sich ja in diesem Fall zum bereits vorhandenen Elastin. Anders als im Falle von Luciferase ist das Signal-zu-Rausch Verhältnis für diesen Nachweis also deutlich schlechter. Es ist daher ein Erfolg, dass trotzdem der Nachweis einer signifikanten Erhöhung gelungen ist.

Im Forschungslabor der THG Chirurgie war die Transfektion von mRNA in Zellen (in vitro Kultur) bereits sehr gut etabliert und in vielen Aspekten gegenüber anderen Laboren deutlich optimiert (Avci-Adali et al. 2014a, Avci-Adali et al. 2014b, Michel et al. 2015). Die vorliegende Arbeit konnte zur zusätzlichen Etablierung dieser Methode für die intradermale Verabreichung von synthetischer mRNA mittels hohlen Mikronadeln beitragen.

4.3 Ausblick

Dem beschriebenen Problem der geringen relativen Steigerung der Elastinmenge aufgrund des bereits hohen Elastingehalts von Schweineohren könnte man entgegenwirken, indem man Gewebe mit weniger Elastin als Kontrolle nutzt, wie z.B. Uterus, Gehirn oder Leber (Neuman und Logan 1950, Starcher 1977). Weitere Versuche mit diesen Geweben könnte die Transfektion von synthetischer Elastin-mRNA weiter optimieren. Man könnte den Elastingehalt in der Haut auch durch ein Ernährungsmodell verringern. Es wurde z.B. gezeigt, dass Gabe von Ascorbinsäure den Elastingehalt in der Haut von jungen Ratten erniedrigt (Quaglino et al. 1991). Ein dritter Ansatz wäre, den Elastingehalt durch Elastase zu verringern (Briones et al. 2003). Brown Norway Ratten haben zudem einen generell erniedrigten Elastin-Gehalt (Gauguier et al. 2005). Schließlich wären für den Ansatz einer Elastinerniedrigung auch haploinsuffiziente Mäuse mit einem Knockout (Abschaltung eines Gens im Genom) eines der beiden ELN-

Gene interessant, da diese nachweislich deutlich niedrigere Elastingehalte aufweisen (Wagenseil et al. 2005); ein vollständiger Knockout ist aufgrund fehlender Elastizität der Gefäßwände und folgender Gefäßverstopfung durch Hyperplasie der glatten Gefäßmuskulatur letal und für diese Fragestellung nicht einsetzbar (Creager et al. 2006).

Für diese Arbeit wurde nur der Elastingehalt in der Haut bzw. dessen Erhöhung gemessen. Der hier durchgeführte Ansatz kann aber nur ein erster Schritt in Richtung Reparatur der Haut sein. So kann durch Tropoelastin-mRNA-Gabe zwar Elastin gebildet und nachgewiesen werden, damit ist aber noch nicht garantiert, dass in ursprünglich Elastin-armem Gewebe auch mehr und effektive elastische Fasern gebildet werden. Langton et al. (2010) beschreiben beispielsweise, dass durch solare Elastose elastische Fasern zerstört werden. Dabei entsteht unter anderem amorphes Elastinmaterial, welches zwar immunopositiv für Tropoelastin ist, funktionell aber Elastizität verloren hat. Zur Bildung elastischer Fasern sind neben Elastin eine Vielzahl anderer Moleküle wie Mikrofibrillen notwendig (Baldwin et al. 2013). Man sollte in künftigen Untersuchungen daher funktionelles Elastin von nichtfunktionellem unterscheiden. Um zu überprüfen, ob eine Erhöhung des Elastins in der Haut die Elastizität funktionell erhöht, müsste man dies messen. Dazu könnte man die Elastizität in den im vorherigen Abschnitt vorgestellten Modellen bei jeweils mit und ohne Elastin-mRNA behandelten Hautproben mechanisch messen. Das Standardverfahren zur Messung der Elastizität ist das plötzliche Ansaugen eines Hautstückes mit dem Cutometer®, gefolgt von plötzlichem Wiederfreigeben (Pittet et al. 2014) mit gleichzeitiger Messung der elastischen Veränderung der Haut. Pittet und Mitarbeiter konnten mit dieser Methode z.B. den Einfluss der nachlassenden Elastizität der Haut mit dem Alter der Probanden nachweisen, korreliert mit dem Elastingehalt der Haut. Dies könnte auch auf einem Hautstück in vitro, wie in der in unserem Labor verwendeten Franz-Zelle oder in 12-Well Platten, funktionieren. Das Cutometer kann mit einem Durchmesser von 2 – 8 mm eingestellt werden (Everett und Sommers 2013) und kann deshalb gut mit der Fläche der durch den MicronJet 600™ entstehenden Injektionsblase von etwa 7 mm Durchmesser verwendet werden.

Der in der vorliegenden Arbeit verfolgte Ansatz verspricht wichtige Vorteile: Zum einen kann man davon ausgehen, dass die komplexen Interaktionen bei der Bildung von elastischen Fasern in der extrazellulären Matrix der Dermis (Rosenbloom et al. 1993, Baldwin et al. 2013, Lagali et al. 2013) durch den Einsatz von mRNA-Gabe besser als in anderen Geweben verstanden werden kann, wobei Elastin hier nur ein erster Schritt ist. Da die extrazelluläre Matrix der Dermis in vivo leicht zugänglich ist, kann die Verbesserung der Funktion der elastischen Fasern hier gut beobachtet werden. Diese Erkenntnisse könnten auch für Untersuchungen der extrazellulären Matrix von z.B. Alveolen der Lunge wichtig sein. Eine weit verbreitete pathologische Lungenveränderung ist die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD). COPD wird durch entzündliche Prozesse (z.B. durch Rauchen) ausgelöst, wobei Metalloproteinasen sezerniert werden, um die Entzündung zu bekämpfen (Skjøt-Arkil et al. 2012, Van Doren 2015). Diese Proteinase lösen auch elastische Fasern der Alveolen und führen somit zu Atemnot durch verminderte Lungenelastizität (Maclay et al. 2012). Eine Regeneration durch eine Steigerung des Elastingehaltes mittels synthetischer mRNA könnte hier eine Behandlungslösung darstellen. Ebenso könnte die Elastin-mRNA Transfektion auch für die Krankheitsbekämpfung von Blutgefäßdefekten eingesetzt werden. Eine der häufigsten Elastin-Gen Defekte von Gefäßen ist die mit 1:20.000 Geburten auftretende supraaortale Aortenstenose, ebenfalls assoziiert mit 75% der Patienten mit Williams-Beuren Syndrom (Metcalf et al. 2000, Morris 2010). Hier bewirkt die verminderte Elastizität der Gefäße eine erhöhte Belastung mit Verdickung der Gefäßwände und kann zu Aneurysmen mit folgenden Rupturen und Herzstillstand führen (Merla et al. 2012).

Die Zugänglichkeit für Lungengewebe und Blutgefäße ist vergleichsweise schlecht; die Optimierung der Behandlung mit Elastin-mRNA in der Dermis ist anfänglich vielversprechender. Diese hat aber auch einen eigenen Wert, z.B. kann sie auch bei Verbrennungen hilfreich sein. Xie und Mitarbeiter (2017) zeigten, dass die Injektion mit rekombinantem Tropoelastin (rhTE) in Schweinehaut nach akuter Verbrennung eine signifikant erhöhte Neubildung von elastischen Fasern bewirkt. Diese neugebildeten elastischen Fasern sind

allerdings von ihrer Vernetzung und Funktionalität her signifikant verringert im Vergleich zu nichtverwundeter Haut (Xie et al. 2017). Es zeigte sich deshalb, dass in den mit rhTE behandelten Verbrennungswunden eine hypertrophe Narbenbildung nicht verhindert werden konnte. Ob Enzyme und z.B. extrazelluläre Glykoproteine in einer bestimmten räumlichen Zusammensetzung an der Zelloberfläche vorhanden sein müssen, um vernetzte elastische Fasern zu bilden, ist noch nicht bekannt. Da durch Elastin-mRNA (im Gegensatz zu rhTE Injektionen) Tropoelastin aber direkt und nur an der Zelloberfläche freigegeben wird, könnte dadurch die Bildung funktioneller, vernetzter elastischer Fasern ermöglicht werden.

Bisher ist unklar, ob durch die erreichte Steigerung der Elastinmenge in der Haut die Elastizität der Haut nachhaltig erhöht wird oder ob dafür noch weitere Schritte notwendig sind. Die durch die Elastin-mRNA Transfektion induzierte Steigerung der Elastinmenge in der Haut ist jedoch ein erster Schritt in Richtung mRNA-basierter Therapie zur Steigerung der Elastizität bei Hautdefekten wie akute Verbrennungen oder Krankheiten wie dem Williams-Beuren Syndrom.

5 Zusammenfassung

Elastin gehört zu den wichtigsten Komponenten der Haut; diese benötigt eine hohe Elastizität, um den Körper vor Verletzungen und Infektionen zu schützen. Elastindefekte durch Alterung, Lichteinwirkung oder Wunden führen zu Beeinträchtigungen dieser Schutzfunktion und sind an der Falten- und Narbenbildung beteiligt. Krankheiten durch Mutationen des Elastin-Gens können die Funktionalität von Organen beeinflussen wie das Williams-Beuren-Syndrom (Supravalvuläre Aortenstenose) oder Cutis-Laxa (Aneurysmenbildung) und führen zu fehlender Elastizität in der Haut.

Ziel der Arbeit war zunächst die Etablierung eines Säugetierhaut-Modells aus frischen Schweineohren für die synthetische mRNA vermittelte Proteinexpression. Dazu sollte die intradermale Transfektionsmethode mit synthetischer hGLuc-mRNA optimiert werden. Danach sollte Tropoelastin-mRNA mittels Mikronadeln in die Haut eingebracht und die Erhöhung des Elastin-Gehaltes der Haut mittels Fastin™ Elastin-Assay ermittelt werden.

Die von den Schweineohren abpräparierte Haut wurde auf 1 mm Dicke getrimmt. Anschließend wurden verschiedene Methoden (nicht invasiv mittels Permeation durch die Epidermis, mit Standardkanülen (0,4 mm Durchmesser) und hohlen Mikronadeln des MicronJet 600™) zur Einbringung von hGLuc-mRNA in die Haut getestet. Anschließend wurde mit einem Luciferase-Assay die Luciferaseaktivität gemessen. Die 2,5 µg Tropoelastin-mRNA wurde ausschließlich mit hohlen Mikronadeln des MicronJet 600™ intradermal injiziert und die Elastinmenge mit dem Fastin™ Elastin-Assay gemessen. Die hGLuc- und Tropoelastin-mRNA wurde mit Lipofectamine 2000™ komplexiert. Die hGLuc-mRNA konnte mittels Permeation nicht in die Haut verabreicht werden, jedoch durch die Injektion mit Standardkanülen. Die stärkste Luciferaseaktivität erbrachten aber die hohlen Mikronadeln des MicronJet 600™. Die Mikroinjektion von synthetischer Tropoelastin-mRNA führte zu einer Elastinsynthese und erhöhte die Elastinmenge in der Haut um den Faktor 1,16 gegenüber der Kontrolle hoch signifikant.

Mit der vorgestellten Methode konnte die Elastinsynthese in der Haut induziert werden. Dieses Vorgehen bietet eine interessante Therapiemöglichkeit, um dem Verlust krankhafter Hautelastizität entgegenzuwirken und damit die Schutzfunktion der Haut wiederherzustellen. Dennoch wurde ersichtlich, dass nachfolgende Untersuchungen über die weitere Vernetzung dieses exprimierten Elastins in der Haut Notwendig ist, um eine Aussage über die entstehenden elastischen Fasern treffen zu können.

6 Literaturverzeichnis

- Abraham, M., Nolte, A., Reus, R., Behring, A., Zengerle, D., Avci-Adali, M., Hohmann, J. D., Peter, K., Schlensak, C., Wendel, H. P. und Krajewski, S., 2015. "In vitro Study of a Novel Stent Coating Using Modified CD39 Messenger RNA to Potentially Reduce Stent Angioplasty-Associated Complications." *PLoS ONE* 10(9), doi: 10.1371/journal.pone.0138375.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Walter, P., 2012. *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie; Kapitel 4.1.12*. 4th ed. Herausgeber: Wiley-VCH. S. 149-50.
- Aldawsari, M., Chougule, M. B. und Babu, R. J., 2015. "Progress in Topical siRNA Delivery Approaches for Skin Disorders." *Curr Pharm Des.* 21(31), S. 4594-605.
- Aljuffali, I.A., Lin, Y. K. und Fang, J. Y., 2016. "Noninvasive approach for enhancing small interfering RNA delivery percutaneously." *Expert Opin Drug Deliv.* 13(2), S. 265-80.
- Aumüller, G., Aust, G., Doll, A., Engele, J., Kirsch, J., Mense, S., Reißig, D. und Salvetter, J., 2010. *Duale Reihe: Anatomie; Teil O: Haut und Hautanhangsgebilde*. 2nd ed. Herausgeber: KG, Georg Thieme Verlag.
- Aust, M., Fernandes, D., Kolokythas, P., H, K. und Vogt, P., 2008. "Percutaneous collagen induction therapy: an alternative treatment for scars, wrinkles, and skin laxity." *Plast Reconstr Surg.* 121(4), S. 1421-29.
- Avci-Adali, M., Behring, A., Keller, T., Krajewski, S., Schlensak, C. und Wendel, H. P., 2014a. "Optimized conditions for successful transfection of human endothelial cells with in vitro synthesized and modified mRNA for induction of protein expression." *Journal of Biological Engineering* 8(8), doi: 10.1186/1754-1611-8-8.
- Avci-Adali, M., Behring, A., Steinle, H., Keller, T., Krajewski, S., Schlensak, C. und Wendel, H. P., 2014b. "In vitro synthesis of modified mRNA for induction of protein expression in human cells." *Vis Exp.* 93, doi: 10.3791/51943.
- Baldwin, A.K., Simpson, A., Steer, R., Cain, S. A. und Kielty, C. M., 2013. "Elastic fibres in health and disease." *Expert Rev Mol Med.* 15, doi: 10.1017/erm.2013.9.

- Bashir, M.M., Indik, Z., Yeh, H., Ornstein-Goldstein, N., Rosenbloom, J. C., Abrams, W., Faziol, M., Uitto, J. und Rosenbloom, J., 1989. "Characterization of the Complete Human Elastin Gene." *The Journal of Biological Chemistry* 264(15), S. 8887-91.
- Baum, C., Kustikova, O., Modlich, U., Li, Z. und Fehse, B., 2006. "Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors." *Human Gene Therapy* 17(3), S. 253-63.
- Bernstein, E., Chen, V., Tarnai, K., Shepley, K., Resnik, K., Zhang, H. und Uitto, J., 1994. "Enhanced Elastin and Fibrillin Gene Expression in Chronically Photo damaged Skin." *J Invest Dermatol* (103), S. 182-86.
- Bianconi, E.P., Facchin, F., Beraudi, A., Casadei, R., Frabetti, F., Vitale, L., Pelleri, M. C., Tassani, S. und Piva, F., 2013. "An estimation of the number of cells in the human body." *Ann. Hum. Biol.* 40, S. 463-71.
- Bio-Rad Laboratories, Inc., . *Transfection Methods Overview*. [Online] Available at: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10-0826_transfection_tutorial_interactive.pdf [Accessed März 2016].
- Boente, M.C., Winik, B. C. und Asial, R. A., 1999. "Wrinkly skin syndrome: ultrastructural alterations of the elastic fibers." *Pediatr Dermatol*; 16(2), S. 113-17.
- Briones, A.M., González, J.M., Somoza, B., Giraldo, J., Daly, C.J., Vila, E., González, M.C., McGrath, J.C. und Arribas, S.M., 2003. "Role of Elastin in Spontaneously Hypertensive Rat Small Mesenteric Artery Remodelling." *J Physiol.* 552(1)., S. 185-95.
- Campbell, N.A. und Reece, J. B., 2009. P. PLC, ed. *Biologie; Kapitel 17.1.2ff: Die Grundlagen der Transkription und Translation*. 8th ed.
- Cenizo, V., André, V., Reymermier, C., Sommer, P., Damour, O. und Perrier, E., 2006. "LOXL as a target to increase the elastin content in adult skin: a dill extract induces the LOXL gene expression." *Exp Dermatol.* 15(8), S. 574-581.
- Chabay, R.W. und Sherwood, B. A., 2011. I. John Wiley & Sons, ed. *Matter & Interactions; Kapitel 4.6: Stress, Strain, and Young's modulus*. 3rd ed.
- Chiappini, C., Martinez, J. O., De Rosa, E., Almeida, C. S., Tasciotti, E. und Stevens, M. M., 2015. "Biodegradable Nanoneedles for Localized Delivery of Nanoparticles in Vivo: Exploring the Biointerface." *ACS Nano* 9(5), S. 5500-09.

- Coolen, N., Schouten, K. C., Middelkoop, E. und Ulrich, M. M., 2010. "Comparison between human fetal and adult skin." *Arch Dermatol Res.* 302(1), S. 47-55.
- Creager, M.A., Loscalzo, J. und Dzau, V. J., 2006. *Vascular Medicine: A Companion to Braunwald's Heart Disease; Kapitel: Elastin Metabolism and Vascular Homeostasis*. 1st ed. Herausgeber: Elsevier Health Sciences. p.47f.
- Dacso, C.C., 1990. H.K. Walker, W.D. Hall und J.W. Hurst, eds. *Clinical Methods, The History, Physical, and Laboratory Examinations; Kapitel 47: Skin Testing for Tuberculosis*. 3rd ed. Herausgeber: Butterworths.
- Daniels, R., 2004. "Strategies for Skin Penetration Enhancement." *Skin Care Forum Issue 37*, S. 1-15.
- Deglesne, P.A., Arroyo, R., Ranneva, E. und Deprez, P., 2016. "In vitro study of RRS HA injectable mesotherapy/biorevitalization product on human skin fibroblasts and its clinical utilization." *Clin Cosmet Investig Dermatol*. doi: 10.2147/CCID.S95108.
- Deng, Y., Chen, J., Zhao, Y., Yan, X., Zhang, L., Choy, K., Hu, J., Sant, H., Gale, B. und Tang, T., 2016. "Transdermal Delivery of siRNA through Microneedle Array." *Sci Rep*. doi: 10.1038/srep21422.
- Dickerson, J.W. und Mccane, R. A., 1964. "The early effects of rehabilitation on the chemical structure of the organs and the whole bodies of undernourished pigs and cockerels." *Clin Sci.* 27, S. 123-32.
- Dickson, A. und Wilusz, J., 2011. "Strategies for viral RNA stability: live long and prosper." *Trends in Genetics*, S. 286-93.
- Diekmann, J., Alili, L., Scholz, O., Giesen, M., Holtkötter, O. und Brenneisen, P., 2016. "A three-dimensional skin equivalent reflecting some aspects of in vivo aged skin." *Exp Dermatol.* 25(1), S. 56-61.
- Dong, X. und Majesky, M., 2012. "Restoring elastin with microRNA-29." *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32(3), S. 548-51.
- Donnelly, R.F., Morrow, T. R. und Woolfson, A. D., 2012. *Microneedle-mediated Transdermal and Intradermal Drug Delivery; Kapitel 1: Transdermal Drug delivery; Kapitel 5.3: Intradermal Vaccination*.
- Donnelly, J.K., Berry, K. und Ulmer, J. B., 2003. "Technical and regulatory hurdles for DNA vaccines." *Int J Parasitol.* 33(5-6), S. 457-67.

- Dul, M., Stefanidou, M., Porta, P., Serve, J., O'Mahony, C., Malissen, B., Henri, S., Levin, Y., Kochba, E., Wong, F. S., Dayan, C., Coulman, S. A. et al., 2017. "Hydrodynamic gene delivery in human skin using a hollow microneedle device." *J Control Release.*; doi: 10.1016/j.jconrel.2017.02.028.
- El-Domyati, M., Medhat, W., Abdel-Wahab, H. M., Moftah, N. H., Nasif, G. A. und Hosam, W., 2014. "Forehead wrinkles: a histological and immunohistochemical evaluation." *Journal of Cosmetic Dermatology* 13, S. 188-94.
- Elias, P., 1981. "Epidermal Lipids, Membranes, and Keratinization." *Int. Journal of Dermatology* 20(1), S. 1-19.
- Everett, J.S. und Sommers, M. S., 2013. "Skin viscoelasticity: physiologic mechanisms, measurement issues, and application to nursing science." *Biol Res Nurs.* 15(3), S. 338-46.
- Faller, A. und Schünke, M., 2012. G.T.V. KG, ed. *Der Körper des Menschen; Kapitel 16: Haut und Hautanhangsgebilde.* 16th ed.
- Fecht, S., 2012. *3-D Microscopy Casts Blood Vessel's Structure in New Light.* [Online] Available at: <http://www.scientificamerican.com/gallery/3-d-microscopy-casts-blood-vessels-structure-in-new-light/> [Accessed März 2016].
- Franz, T.J., 1975. "Percutaneous absorption on the relevance of In Vitro data." *The Journal of Investigative Dermatology* 64, S. 190-95.
- Gauguier, D., Behmoaras, J., Argoud, K., Wilder, S.P., Pradines, C., Bihoreau, M.T., Osborne-Pellegrin, M. und Jacob, M.P., 2005. "Chromosomal Mapping of Quantitative Trait Loci Controlling Elastin Content in Rat Aorta." *Hypertension* 45., S. 460-466.
- Gawkrodger, D.J., 2003. I. Churchill Livingstone, ed. *Dermatology - An Illustrated Colour Text; Kapitel 1: Basic Principles.* 3rd ed.
- Gill, H.S., Denson, D. D., Burris, B. A. und Prausnitz, M. R., 2008. "Effect of microneedle design on pain in human subjects." *Clinical Journal of Pain* 24(7), S. 585-94.
- Gupta, J., Gill, H. S., Andrews, S. N. und Prausnitz, M. R., 2011. "Kinetics of Skin Resealing After Insertion of Microneedles in Human Subjects." *J Control Release.* 154(2), S. 148–55.

- Heck, R., Herman, S., Lunter, D. und Daniels, R., 2016. "Film-forming formulations containing porous silica for the sustained delivery of actives to the skin." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 108, S. 1-8.
- Herman, I.P., 2007. S.S.M. S.A., ed. *Physics of the Human Body - Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering; Seite 22*. 1st ed.
- Hinek, A., Kim, H. J., Wang, Y., Wang, A., Mitts, T. F. und., 2014. "Sodium L-ascorbate enhances elastic fibers deposition by fibroblasts from normal and pathologic human skin." *J Dermatol Sci* 75(3), S. 173-82.
- Howard, J., 2001. *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. 1st ed.
- Hung, I., Levin, Y., To, K., Chan, K., Zhang, A., Li, P., Li, C., Xu, T., Wong, T. und Yuen, K., 2012. "Dose sparing intradermal trivalent influenza (2010/2011) vaccination overcomes reduced immunogenicity of the 2009 H1N1 strain." *Vaccine* 30, S. 6427-35.
- Ita, K., 2015. "Transdermal Delivery of Drugs with Microneedles—Potential and Challenges." *Pharmaceutics* 7(3), S. 90-105.
- Jin, M., Wu, Y., Wang, J., Ye, W., Wang, L., Yin, P., Liu, W., Pan, C. und Hua, X., 2016. "MicroRNA-29 facilitates transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to alleviate pelvic floor dysfunction by repressing elastin." *Stem Cell Res Ther.* (7); doi: 10.1186/s13287-016-0428-7.
- Kähäri, V.M., Olsen, D. R., Rhudy, R. W., Carrillo, P., Chen, Y. Q. und Uitto, J., 1992. "Transforming growth factor-beta up-regulates elastin gene expression in human skin fibroblasts. Evidence for post-transcriptional modulation." *Lab Invest.* 66(5), S. 580-88.
- Kendall, A.C. und Nicolaou, A., 2013. "Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity." *Progress in lipid Research* 52 (1), S. 141-64.
- Kielty, C.M. und Shuttleworth, C. A., 1997. "Microfibrillar elements of the dermal matrix." *Microsc. Res. Tech.* 38, S. 413-27.
- Kim, Y., Park, J. und Prausnitz, M. R., 2012. "Microneedles for drug and vaccine delivery." *Adv Drug Deliv Rev* 64(14), S. 1547-68.
- Kucich, U., Rosenbloom, J. C., Abrams, W. R. und Rosenbloom, J., 2002. "Transforming Growth Factor- β Stabilizes Elastin mRNA by a Pathway Requiring Active Smads, Protein Kinase C- δ , and p38." *Am J Respir Cell Mol Biol.* 26(2), S. 183-88.

- Lagali, N., Rossetti, F. C., Depieri, L. V. und Bentley, M. V., 2013. *Confocal Laser Microscopy - Principles and Applications in Medicine, Biology, and the Food Sciences; Kapitel 6: Confocal Laser Scanning Microscopy as a Tool for the Investigation of Skin Drug Delivery Systems and Diagnosis of Skin Disorders.*
- Lambert, P.H. und Laurent, P. E., 2008. "Intradermal vaccine delivery: Will new delivery systems transform vaccine administration?" *Vaccine* 26, S. 3197-208.
- Langton, A.K., Sherratt, J., Griffiths, C. E. und Watson, R. E., 2010. "A new wrinkle on old skin: the role of elastic fibres in skin ageing." *Int J Cosmet Sci.* 32(5), S. 330-39.
- Lara, M., González-González, E., Speaker, T., Hickerson, R., Leake, D., Contag, C. und Kaspar, R., 2012. "Inhibition of CD44 Gene Expression in Human Skin Models, Using Self-Delivery Short Interfering RNA Administered by Dissolvable Microneedle Arrays." *Hum Gene Ther.* 23(8), S. 816-23.
- Laurent, P.E., Bonnet, S., Alchas, P., Regolini, P., Mikszta, J. A., Pettis, R. und Harvey, N. G., 2007. "Evaluation of the clinical performance of a new intradermal vaccine administration technique and associated delivery system." *Vaccine* 25, S. 8833-42.
- Lebrun, J., 2012. "The Dual Role of TGFbeta in Human Cancer: From Tumor Suppression to Cancer Metastasis." *ISRN Molecular Biology*, doi:10.5402/2012/381428.
- Levin, Y., Kochba, E. und Kenney, R., 2014. "Clinical evaluation of a novel microneedle device for intradermal delivery of an influenza vaccine: Are all delivery methods the same?" *Vaccine* 32, S. 4249-52.
- Li, D.Y., Brooke, B., Davis, E. C., Mecham, R. P., Sorensen, L. K., Boak, B. B., Eichwald, E. und Keating, M. T., 1998. "Ealstin is an essential determinant of arterial morphogenesis." *Nature* 393, S. 276-80.
- Lüllmann-Rauch, R., 2009. G.T.V. KG, ed. *Taschenlehrbuch Histologie; Kapitel 22: Haut und Hautanhangsgebilde.* 3rd ed.
- Lunter, D.J. und Daniels, R., 2012. "New film forming emulsions containing Eudragit® NE and/or RS 30D for sustained dermal delivery of nonivamide." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 82, S. 291-98.

- Maclay, J.D., McAllister, D., Rabinovich, R., Haq, I., Maxwell, S., Hartland, S., Connell, M., Murchison, J. T., van Beek, E. J., Gray, R. D., Mills, N. L. und Macnee, W., 2012. "Systemic elastin degradation in chronic obstructive pulmonary disease." *Thorax* 67(7), S. 606-12.
- Mantoux, C., 1910. "L'intradermo-réaction a la tuberculine et son interprétation clinique." *Presse Medicale* 18, S. 10-13.
- Marshall, S., Sahm, L. J. und Moore, A. C., 2016. "Microneedle technology for immunisation: Perception, acceptability and suitability for paediatric use." *Vaccine* 34(6), S. 723-34.
- Merla, G., Brunetti-Pierri, N., Piccolo, P., Micale, L. und Loviglio, M. N., 2012. "Supravalvular aortic stenosis: elastin arteriopathy." *Circ Cardiovasc Genet.* 5(6), S. 692-96.
- Metcalfe, K., Rucka, A. K., Smoot, L., Hofstadler, G., Tuzler, G., McKeown, P., Siu, V., Rauch, A., Dean, J., Dennis, N., Ellis, I., Reardon, W. et al., 2000. "Elastin: mutational spectrum in supravalvular aortic stenosis." *Eur J Hum Genet.* 8(12), S. 955-63.
- Meyer, W., 1996. "Bemerkungen zur Eignung der Schweinehaut als biologisches Modell für die Haut des Menschen." *Der Hautarzt* 47, S. 178-82.
- Michel, T., Kankura, A., Salina, M.L., Kurz, J., Behring, A., Avci-Adali, M., Nolte, A., Schlensak, C., Wendel, H.P. und Krajewski, S., 2015. "In Vitro Evaluation of a Novel mRNA-Based Therapeutic Strategy for the Treatment of Patients Suffering from Alpha-1-Antitrypsin Deficiency." *Nucleic Acid Therapeutics* 00(00), doi: 10.1089/nat.2015.0537.
- Morris, C.A., 2010. "Introduction: Williams Syndrome." *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 154C(2), S. 203-08.
- Muschaweck, A., Protzer, U. und Scholz, M., 2014. P.S.P.P. Ltd., ed. *Biofunctional Surface Engineering; Kapitel 9: Microneedles and Nanopatches for Transdermal Vaccination.* 1st ed.
- Naylor, E.C., Watson, R. E. und Sherratt, M. J., 2011. "Molecular aspects of skin ageing." *Maturitas* 69, S. 249-56.
- Neuman, R.E. und Logan, M. A., 1950. "The determination of collagen and elastin in tissues." *Biol. Chem.* 186, S. 549-56.
- Obagi, S., 2006. "Why does skin wrinkle with age? How can you slow or prevent this process?" *Scientific American* 294(1), p.100.

- Ott, C.E., Grünhagen, J., Jäger, M., Horbelt, D., Schwill, S., Kallenbach, K., Guo, G., Manke, T., Knaus, P., Mundlos, S. und Robinson, P. N., 2011. "MicroRNAs Differentially Expressed in Postnatal Aortic Development Downregulate Elastin via 3' UTR and Coding-Sequence Binding Sites." *PLoS One* 6(1) doi: 10.1371/journal.pone.0016250..
- Paliwal, S., Fagien, S., Sun, X., Holt, T., Kim, T., Hee, K. C., Van-Epps, D. und Messina, D. J., 2014. "Skin extracellular matrix stimulation following injection of a hyaluronic acid-based dermal filler in a rat model." *Plast Reconstr Surg.* 134(6), S. 1224-33.
- Palsson, B.O., 2006. C.U. Press, ed. *Systems Biology: Properties of Reconstructed Networks*; Seite 12.
- Pamornpathomkul, B., Wongkajornsilp, A., Laiwattanapaisal, W., Rojanarata, T., Opanasopit, P. und Ngawhirunpat, T., 2017. "A combined approach of hollow microneedles and nanocarriers for skin immunization with plasmid DNA encoding ovalbumin." *Int J Nanomedicine*, doi: 10.2147/IJN.S125945.
- Percoco, G., Benard, M., Ramdani, Y., Lati, E., Lefevre, L. und Driouich, A., 2012. "Isolation of human epidermal layers by laser capture." *Experimental Dermatology*, S. 531-34.
- Persano, S., Guevara, M. L., Li, Z., Mai, J., Ferrari, M., Pompa, P. P. und Shen, H., 2017. "Lipopolyplex potentiates anti-tumor immunity of mRNA-based vaccination." *Biomaterials* 125, S. 81-89.
- Petsch, B., Schnee, M., Vogel, A. B., Lange, E., Hoffmann, B., Voss, D., Schlake, T., Thess, A., Kallen, K. J., Stitz, L. und Kramps, T., 2012. "Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection." *Nat Biotechnol.* 30(12), S. 1210-16.
- Phua, K.K., Leong, K. W. und Nair, S. K., 2013. "Transfection Efficiency and Transgene Expression Kinetics of mRNA Delivered in Naked and Nanoparticle Format." *Journal of Controlled Release* 166(3), S. 227-33.
- Pierce, J.A. und Hocott, J. B., 1960. "Studies on the collagen and elastin content of the human lung." *Clin Invest* 39(1), S. 8-14.
- Pittet, J., Freis, O., Vazquez-Duchene, M., Périé, G. und Pauly, G., 2014. "Evaluation of Elastin / Collagen content in Human Dermis in-Vivo by Multiphoton Tomography - Variation with Depth and Correlation with Aging." *Cosmetics* 1(3), S. 211-21.
- Pratt, A. und MacRae, I., 2009. "The RNA-induced Silencing Complex: A Versatile Gene-silencing Machine." *J Biol Chem.* 284(27), S. 17897-901.

- Prausnitz, M.R. und Langer, R., 2008. "Transdermal drug delivery." *Nat Biotechnol.* 26(11), S. 1261-68.
- Probst, J., Brechtel, S., Scheel, B., Hoerr, I., Jung, G., Rammensee, H. und Pascolo, S., 2006. "Characterization of the ribonuclease activity on the skin surface." *Genetic Vaccines and Therapy* 4(4), doi: 10.1186/1479-0556-4-4.
- Quaglino, D., Fornieri, C., Botti, B., Davidson, J.M. und Pasquali-Ronchetti, I., 1991. "Opposing effects of ascorbate on collagen and elastin deposition in the neonatal rat aorta." *Eur. J. Cell Biol.* 54(1), S. 18-26.
- Quan, F., Kim, Y., Song, J., Hwang, H. S., Compans, R. W., Prausnitz, M. R. und Kang, S., 2013. "Long-Term Protective Immunity from an Influenza Virus-Like Particle Vaccine Administered with a Microneedle Patch." *Clin. Vaccine Immunol.* 20(9), S. 1433-39.
- Rodrigues, F.T., Martins, V. C. und Plepis, A. M., 2010. "Porcine Skin as a Source of Biodegradable Matrices: Alkaline Treatment and Glutaraldehyde Crosslinking." *Polimeros* 20(2), S. 92-97.
- Rosenbloom, J., Abrams, W. R. und Mecham, R., 1993. "Extracellular matrix 4: the elastic fiber." *The FASEB Journal* 7, S. 1208-18.
- Sellheyer, K., 2003. "Pathogenesis of solar elastosis: synthesis or degradation?" *Journal of Cutaneous Pathology* 30(2), S. 123-27.
- Sephel, G.C., Davidson, B. S. und Davidson, J. M., 1986. "Elastin Production in Human Skin Fibroblast Cultures and its Decline with Age." *J Invest Dermatol* 86(3), S. 279-85.
- Shapiro, S.D., Endicott, S. K., Province, M. A., Pierce, J. A. und Campbell, E. J., 1991. "Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon." *Clin Invest* 87(5), S. 1828-34.
- Sherratt, M., 2009. "Tissue elasticity and the ageing elastic fibre." *Age* 31 (4), S. 305-25.
- Singh, A. und Yadav, S., 2016. "Microneedling: Advances and widening horizons." *Indian Dermatol Online J.* 7(4), S. 244-54.
- Skjøt-Arkil, H., Clausen, R. E., Nguyen, Q., Wang, Y., Zheng, Q., Martinez, F. J., Hogaboam, C. M., Han, M., Klickstein, L. B., Larsen, M. R., Nawrocki, A., Leeming, D. et al., 2012. "Measurement of MMP-9 and -12 degraded elastin (ELM) provides unique information on lung tissue degradation." *BMC Pulm Med*; doi:10.1186/1471-2466-12-34.

- Son, K.K., Patel, D. H., Tkach, D. und Park, A., 2000. "Cationic liposome and plasmid DNA complexes formed in serum-free medium under optimum transfection condition are negatively charged." *Biochimica et Biophysica Acta* 1466(2000), S. 11-15.
- Sproul, E.P. und Argraves, W. S., 2013. "A cytokine axis regulates elastin formation and degradation." *Matrix Biol.* 32(2), S. 86-94.
- Starcher, B.C., 1977. "Determination of the elastin content of tissues by measuring desmosine and isodesmosine." *Analytical Biochemistry* 79, S. 11-15.
- Talwar, H.S., Griffiths, C. E., Fisher, G. J., Hamilton, T. A. und Voorhees, J. J., 1995. "Reduced type I and type III procollagens in photodamaged adult human skin." *J Invest Dermatol* 105(2), S. 285-90.
- Tannous, B.A., Kim, D. E., Fernandez, J. L., Weissleder, R. und Breakefield, X. O., 2005. "Codon-optimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo." *Mol Ther.* 11(3), S. 435-43.
- Tassabehji, M., Metcalfe, K., Hurst, J., Ashcroft, G. S., Kielty, C. und Wilmot, C., 1998. "An elastin gene mutation producing abnormal Tropoelastin and abnormal elastic fibres in a patient with autosomal dominant cutis laxa." *Hum. Mol. Genet.* 7, S. 1021-28.
- Thermo Fisher Scientific Inc., . *How Cationic Lipid Mediated Transfection Works.* [Online] Available at:
<https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/gene-delivery-technologies/cationic-lipid-mediated-delivery/how-cationic-lipid-mediated-transfection-works.html>
 [Accessed März 2016].
- Thieman, W.J. und Palladino, M. A., 2013. P. PLC, ed. *Introduction to Biotechnology; Kapitel 11.3: Gene Therapy.* 3rd ed.
- Titushin, M., Markova, S., Frank, L., Malikova, N., Stepanyuk, G., Lee, J. und Vysotski, E., 2008. "Coelenterazine-binding protein of *Renilla muelleri*: cDNA cloning, overexpression, and characterization as a substrate of luciferase." *Photochem Photobiol Sci.*, S. 189-96.
- Troy, S.B., Kouliavskaia, D., Siik, J., Kochba, E., Beydoun, H., Mirochnitchenko, O., Levin, Y., Khardori, N., Chumakov, K. und Maldonado, Y., 2015. "Comparison of the Immunogenicity of Various Booster Doses of Inactivated Polio Vaccine Delivered Intradermally Versus Intramuscularly to HIV-Infected Adults." *Journal of Infectious Diseases* 211(12), S. 1969-76.

- Tuan-Mahmood, T., Maeliosa, T. C., McCrudden, B., Torrasi, M., McAlister, E., Garland, M. J., Singh, T. R. und Donnelly, R. F., 2013. "Microneedles for intradermal and transdermal delivery." *Eur J Pharm Sci.* 50(5), S. 623-37.
- Uitto, J., Paul, J.. B.K., Pearce, R. und Clark, J., 1983. "Elastic fibres in human skin: quantitation of elastic fibres by computerized digital image analyses and determination of elastin by radioimmunoassay of desmosine." *Lab. Invest.* 49(4), S. 499-505.
- Ushiki, T., 2002. "Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint." *Arch Histol Cytol* 65, S. 109-26.
- Van Damme, P., Oosterhuis-Kafeja, F., Van der Wielen, M., Almagor, Y., Sharon, O. und Levin, Y., 2009. "Safety and efficacy of a novel microneedle device for dose sparing intradermal influenza vaccination in healthy adults." *Vaccine* 27, S. 454-59.
- Van Doren, S.R., 2015. "Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin." *Matrix Biol.* 0, S. 224-31.
- Vij, M., Alam, S., Gupta, N., Gotherwal, V., Gautam, H., Ansari, K. M., Santhiya, D., Natarajan, V. und Ganguli, M., 2017. "Non-invasive Oil-Based Method to Increase Topical Delivery of Nucleic Acids to Skin." *Mol Ther.* doi: 10.1016/j.ymthe.2017.03.009.
- Wagenseil, J.E., Ciliberto, C. H., Knutsen, R. H., Levy, M. A., Kovacs, A. und Mecham, R. P., 2010. "The importance of elastin to aortic development in mice." *the American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 299, S. 257-64.
- Wagenseil, J., Nerurkar, N., Knutsen, R., Okamoto, R., Li, D. und Mecham, R., 2005. "Effects of elastin haploinsufficiency on the mechanical behavior of mouse arteries.." *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289(3), S. 1209-17.
- Warner, J.R., 1999. "The economics of ribosome biosynthesis in yeast." *Trends Biochem Sci.* 24(11), S. 437-40.
- Xie, H., Lucchesi, L., Zheng, B., Ladich, E., Pineda, T., Merten, R., Gregory, C., Rutten, M. und Gregory, K., 2017. "Treatment of Burn and Surgical Wounds With Recombinant Human Tropoelastin Produces New Elastin Fibers in Scars." *J Burn Care Res.*; doi: 10.1097/BCR.0000000000000507.

- Zhang, Y., Brown, K., Siebenaler, K., Determan, A., Dohmeier, D. und Hansen, K., 2012a. "Development of lidocaine-coated microneedle product for rapid, safe, and prolonged local analgesic action." *Pharm Res.* 29(1), S. 170-77.
- Zhang, P., Huang, A., Ferruzzi, J., Mecham, R. P., Starcher, B. C., Tellides, G., Humphrey, J. D., Giordano, F. J., niklason, L. E. und Sessa, W. C., 2012b. "Inhibition of microRNA-29 enhances elastin levels in cells haploinsufficient for elastin and in bioengineered vessels." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32(2), S. 756-59.
- Zhang, M., Pierce, R. A., Wachi, H., Mecham, R. P. und Parks, W. C., 1999. "An open reading frame element mediates posttranscriptional regulation of tropoelastin and responsiveness to transforming growth factor beta1." *Mol. Cell. Biol.* 19, S. 7314-26.
- Zhao, R., Bruning, E., Rossetti, D., Starcher, B., Seiberg, M. und lotsova-Stone, V., 2009. "Extracts from Glycine max (soybean) induce elastin synthesis and inhibit elastase activity." *Exp Dermatol.* 18(10), S. 883-86.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im klinischen Forschungslabor Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie Tübingen durchgeführt. Frau PD Dr. Meltem Avci-Adali hat die Studie konzipiert, meine Arbeit betreut und zu einigen Vorschlägen zur Variation der Methode beigetragen.

Herr Professor Dr. Hans Peter Wendel hat zum Grundkonzept der Studie beigetragen und war einer der beiden Betreuer der Arbeit. Er hat mir den Arbeitsplatz zur Verfügung gestellt, mich in den Tier-OP eingewiesen und mir die Verwendung von Schweineohren ermöglicht.

Die Luciferase Versuche wurden von mir mit Unterstützung durch Frau Sonia Golombek durchgeführt. Die Methode zur Generierung der mRNA wurde nach ihr adaptiert.

Das Fastin-Elastin-Assay wurde nach Einarbeitung von Ludmilla Hann von mir durchgeführt.

Alle Hautpräparationen, die Elastin Versuche sowie die statistischen Auswertungen wurden von mir eigenhändig durchgeführt.

Ich versichere hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig verfasst habe und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen Verwendung fanden.

Tübingen, den 15.03.18

Martin Pilz

8 Veröffentlichungen

Teile der Methoden und Daten aus der vorliegenden Dissertationsschrift wurden in den folgenden Publikationen verwendet:

Sonia Golombek, Martin Pilz, Heidrun Steinle, Efrat Kochba, Yotam Levin, Dominique Lunter, Christian Schlensak, Hans Peter Wendel, Meltem Avci-Adali “Efficient and rapid production of exogenous proteins in skin by intradermal delivery of synthetic mRNA using hollow microneedles”, *Molecular Therapy - Nucleic Acids* (11), 2018, Seiten 382-92

Mario Lescan, Regine Perl, Sonia Golombek, Martin Pilz, Ludmilla Hann, Andreas Behring, Timea Keller, Andrea Nolte-Karayel, Franziska Gruhn, Efrat Kochba, Yotam Levin, Christian Schlensak, Hans Peter Wendel, Meltem Avci-Adali “De novo synthesis of elastin by exogenous delivery of synthetic modified messenger RNA into skin and elastin deficient cells”, *Molecular Therapy - Nucleic Acids* (11), 2018, Seiten 475-84

9 Danksagung

Ich danke Professor Hans Peter Wendel, dass er mich in seinem Forschungsbereich an diesem spannenden, zukunftsweisenden und für mich sehr lehrreichen Thema hat arbeiten lassen. Ich danke ihm auch herzlich für seine Unterstützung sowie für sein Entgegenkommen, welches ich wegen meines zeitweiligen Studiums in Ulm erfahren durfte.

Ich danke PD Dr. Meltem Avci-Adali für ihre fachliche Unterstützung, die Geduld bei meiner Einarbeitung in die Methodik, ihre zahlreichen Hilfestellungen und Anregungen sowie ihre vielfältigen Tipps und Kontakte. Ich bin sehr froh, dass ich auf ihre vielfältigen Vorarbeiten habe aufbauen können. Ich bin mir sicher, dass ohne die so exzellent etablierten Transfektions- und Nachweismethoden im Labor meine Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Sonia Golombek gebührt ein großes Dankeschön für ihre Einführung in die Welt des Laborlebens, das Beantworten meiner zahlreichen Fragen sowie ihre vielfältige und wichtige Hilfe beim praktischen Arbeiten.

Herrn Professor R. Daniels möchte ich danken, für seinen Hinweis auf die Franz-Zellen und sein freundliches Bereitstellen des Dermatoms für meine Zwecke.

Ich danke auch Frau Dr. Dominique Lunter, Ilias El Aita und Irina Eck für die Einführung in das Arbeiten mit dem Dermatome sowie ihre Zeit bei meinen häufigen Besuchen.

Ich bedanke mich bei Bernd Neumann für seine Hilfe und Beantwortung meiner Fragen während meiner Besuche im Tier-OP und im Labor sowie Tim Greiner und Angelika Gräßle für das Ermöglichen der Hautpräparationen nach der Tier-OP.

Vielen Dank für die Tipps zum praktischen Arbeiten im Labor geht an: Tatjana Michel, Ludmilla Hann, Martha Salinas, Timea Keller, Andreas Behring, Heidrun Steinle, Louisa Kaufmann, Nadja Perle.

Danke an das gesamte Team des THG-Labors für die gute Zeit und die vielen guten Kuchen.

Ich bedanke mich bei meiner Familie, Professor Dr. Peter Pilz, Dr. Regina Keil-Pilz, Raphael, Johanna und Alina Münchow für ihre tolle Unterstützung auf meinem bisherigen Lebensweg.

Vielen Dank Alina, Regina und Peter für eure Zeit beim Korrekturlesen.