

**Aus dem Institut und Sektion für Entzündungsmedizin  
der Universität zu Lübeck**

**Direktor: Prof. Dr. Dr. med. Diamant **Thaçi****

**Verbesserung der Wundheilung von Brandwunden durch  
Wachstumshormone in Hinblick auf eine Anwendung im oralen  
Bereich**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde

-Aus der Sektion Medizin-  
der  
Universität zu Lübeck

vorgelegt von  
**Roland Röcker**  
aus Bietigheim-Bissingen

Lübeck 2018

**1. Berichterstatter:** Prof. Dr. Dr. med. Diamant Thaçi

**2. Berichterstatter:** Prof. Dr. med. Frank Siemers

**Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2019**

**zum Druck genehmigt. Lübeck, den 03.07.2019**

**- Promotionskommission der Sektion Medizin -**

# Inhaltsverzeichnis

Deckblätter	I - IV
1 Einleitung	1
1.1 Einführung	1
1.1.1 Funktion der Haut	1
1.1.2 Aufbau der Haut	1
1.1.3 Die Verbrennungswunde	2
1.1.4 Die Wundheilung	4
1.1.5 Gentherapie	6
1.1.6 KGF	8
1.1.7 Zielsetzung	9
2 Material und Methoden	10
2.1 Tiere und Tierhaltung	10
2.2 Verbrühungsmodell	11
2.3 Experimentelle Gruppen und liposomale Applikation KGF-Konstrukt	11
2.4 Transfektion	12
2.5 Makroskopische Untersuchungen	13
2.5.1 Reepithelisierung	13
2.6 Immunhistochemie	14
2.6.1 Expression von Wachstumsfaktoren und Kollagenen	14
2.6.2 Proliferation	15
2.6.3 Apoptose	16
2.7 Ethik und Statistik	17
3 Ergebnisse	18
3.1 Transfektion	18
3.1.1 Transfektionseffizienz	18
3.1.2 KGF- und IGF- I Expression	19
3.2 Reepithelisierung	21

3.3	Proliferation und Apoptose	22
3.4	Wachstumsfaktoren KGF, IGF-I, IGFBP-3, PDGF, bFGF und TGF- $\beta$	25
3.4.1	KGF	25
3.4.2	IGF-I	26
3.4.3	IGFBP-3	28
3.4.4	bFGF	29
3.4.5	TGF- $\beta$	29
3.4.6	PDGF	30
3.5	Kollagen I, III und IV	31
4	Diskussion	34
5	Zusammenfassung	38
6	Literaturverzeichnis	39
7	Abkürzungsverzeichnis	45
8	Abbildungsverzeichnis	46
9	Lebenslauf	47
10	Erklärung	48
11	Teilpublikationen	49

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung

### 1.1.1 Funktion der Haut

Mit einer Gesamtfläche von durchschnittlich 1,8 Quadratmetern und einem Gewicht von etwa sechs Kilogramm bei einem Erwachsenen ist die Haut das größte Organ des Menschen. Sie schützt als äußerste Barriere vor mechanischen Verletzungen, Infektionen, Wasser- und Wärmeverlust und chemischen Noxen. Verletzungen der Haut können zu schweren Einschränkungen oder sogar zum Tod führen [1]. Dabei reichen recht niedrige Temperaturen von um 60 ° Celsius, um schwergradige Verletzungen auszulösen und das insbesondere aufgrund der bei Kindern und älteren Menschen im Vergleich zur im mittleren Lebensalter deutlich dünneren Dermisdichte. Dies ist insbesondere wichtig, um zu verstehen, warum Kontaktverletzungen (z.B. Verbühungen, „verschütteter Kaffee im Pflegeheim, das zu heisse Kindergetränk) ausreichen, im Vergleich höhergradige thermische Verletzungen zu generieren.

### 1.1.2 Aufbau der Haut

Die Haut besteht aus drei Hauptschichten: der Epidermis (Oberhaut), der Dermis (Lederhaut) und der Subcutis (Unterhaut) [2].

Die Epidermis ist ein mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel, welches zum größten Teil aus Keratinozyten und dazwischen eingebetteten Melanozyten (Melanin-produzierende Zellen), Langerhanszellen (immunkompetente Zellen) und anderen Zellen (z. B. Vater-Paccinische-Tastkörperchen) besteht. Sie ist in vier Schichten gegliedert: Hornschicht (*Stratum corneum*), Körnerschicht (*Stratum granulosum*), Stachelzellschicht (*Stratum spinosum*) und Basalschicht (*Stratum basale*). Die Hornschicht besteht aus verhornten, abgestorbenen Zellen. Die Körnerzellschicht, die Stachelzellschicht und die Basalschicht bestehen aus lebenden Zellen, die für ständigen Nachschub an die oberen Hautschichten sorgen, wo sie dann abgestoßen werden. Die Transitzeit eines sich differenzierenden Keratinozyten von der Basalschicht bis zur Abstoßung von der Hornschicht beträgt beim Menschen etwa vier Wochen. Dies stellt eines der Hauptprobleme in der

Brandverletztenmedizin dar, da bei ausgedehnten Verletzungen sogenannte „Keratinozytensheets-Züchtungen“ eben diese Zeit benötigen, Zeit, die der Schwerbrandverletzte meist nicht hat und die man mit suboptimalen Deckungen (azellularisierte Fremdhaut etc.) umgehen muss. Zwischen der Epidermis und der Dermis sorgt die Basalmembran für eine strukturelle Verankerung der beiden und erlaubt einen Flüssigkeits- und Stoffaustausch zwischen den Schichten.

Die Dermis repräsentiert eine elastische Hautschicht, die einen hohen Anteil locker verwobenes Bindegewebe enthält. Hier befinden sich neben Fibroblasten noch verschiedene andere Zellen, u.a. Makrophagen, Mastzellen, Plasmazellen, Granulozyten und Monozyten. Die Dermis ist ebenfalls in Schichten unterteilt, in die Zapfenschicht (*Stratum papillare*) und die Netzschicht (*Stratum reticulare*). Die Zapfenschicht ist reich an Zellen und feinen Kollagenfibrillen. Die Papillen dieser Schicht sind von einem Kapillarnetz durchzogen, das die angrenzende gefäßfreie Epidermis mit Nährstoffen versorgt und deren metabolische Abfallprodukte abtransportiert. Die zellarme Netzschicht enthält miteinander verflochtene Kollagenfaserbündel und ebenfalls vernetzte elastische Fasern, die von Fibroblasten als extrazelluläre Matrix synthetisiert und sezerniert werden.

Das subkutane Gewebe liegt unter der Dermis und besteht aus Fettgewebe und Bindegewebe. Es enthält Blutgefäße, wobei das Fettgewebe nur schlecht vaskularisiert ist. Das subkutane Gewebe dient als Aufprallschutz, zur Wärmeisolierung und als Energiespeicher. Die Dermis und die Subcutis sind die hauptsächliche Stützstruktur der Haut. Außerdem sind hier die Schweißdrüsen, Talgdrüsen und Haarfollikel, Nerven und andere Sinneszellen lokalisiert.

### **1.1.3 Die Verbrennungswunde**

Zu Verbrennungswunden kommt es durch Einfluss thermischer Energie auf Zellen der Haut. Das Ausmaß des Schadens ist abhängig von der Temperatur und der Einwirkzeit dieser Energie. Übersteigt die einwirkende Temperatur 44 C, können die Zellschäden nicht mehr repariert werden und es kommt zur Nekrose im Sinne des akzidentellen Zelltodes [3].

Verbrennungswunden werden je nach Schweregrad in Verbrennungen ersten bis vierten Grades unterteilt:

Bei einer *Verbrennung ersten Grades* handelt es sich um eine oberflächliche

Epithelschädigung ohne Zelltod, die sich klinisch als schmerzende Rötung und Schwellung bemerkbar macht.

*Verbrennungen zweiten Grades* erscheinen als schmerzhafte Rötungen mit Blasenbildung und werden weiter in oberflächliche („2a“) und tiefe („2b“) Verletzungen unterteilt. Bei der oberflächlichen Verbrennung zweiten Grades sind die Epidermis und oberflächliche Anteile der Dermis geschädigt. Die Heilung erfolgt innerhalb von zwei Wochen ohne Narbenbildung durch Einwanderung und Proliferation von Keratinozyten, die in den Hautanhangsgebilden tieferer dermaler Anteile überlebt haben [4]. Bei tiefen Verbrennungen zweiten Grades ist die Dermis bis in die Netzschicht zerstört. Nur in tiefen Anteilen der Hautanhangsgebilde, in Haarfollikeln und Drüsen, haben epitheliale Zellen überlebt, von denen aus eine Reepithelisierung initiiert werden kann. Die Wundheilung benötigt deutlich länger als zwei Wochen, es kommt zum Wundverschluss durch Wundkontraktion und Bildung von Granulationsgewebe und schließlich zu ausgeprägter Narbenbildung [4].

Bei einer *Verbrennung dritten Grades* ist die gesamte Haut zerstört, inklusive der Hautnerven. Aus diesem Grunde schmerzt diese Verbrennungswunde nicht, unabhängig von injizierten Analgetika. Eine vollständige Wiederherstellung der Haut ist nicht mehr möglich, es kommt zu ausgeprägter Narbenbildung.

Eine *Verbrennung vierten Grades* (in manchen Lehrbüchern als „Verkohlung“ bezeichnet) beinhaltet zusätzlich zur Zerstörung der Haut die Zerstörung tieferer Schichten mit Unterhautfettgewebe, eventuell Muskeln, Sehnen, Knochen und Gelenken [5]. Die separate Auflistung eines vierten Verbrennungsgrades ist heute nicht mehr üblich.

In Deutschland erleiden jährlich etwa 370 Patienten eine tödliche Verbrennung [6]. Dabei handelt es sich insbesondere um Kinder oder ältere Menschen, die sich verbrühen, oder Erwachsene, die einen Arbeitsunfall erlitten haben. Etwa ein Fünftel der Patienten überlebt die Verbrennung nicht [6]. Die Behandlung dieser Schwerstkranken ist eine besondere Herausforderung an den Mediziner. Die therapeutischen Optionen sind hier limitiert und der Langzeiterfolg unbefriedigend. Daher ist die Etablierung optimierter und innovativer Therapiekonzepte einzufordern, um den Verbrennungsoptionen eine höhere Überlebenschance zu ermöglichen.

Ein Verbrennungstrauma ist eine besonders schwere Form des Traumas und wird von einer hypermetabolischen Kaskade begleitet, die durch folgende Parameter charakterisiert ist: Erhöhtes Herzzeitvolumen, erhöhter Sauerstoffverbrauch, ein beeinträchtigt Immunsystem und stark gesteigerter Protein- und Fettabbau [7]. Die Verbrennungswunde unterstützt und triggert diesen Hypermetabolismus, indem sie pro-inflammatorische Zytokine und Mediatoren synthetisiert und sezerniert [8-10]. In der Literatur wird dieses Phänomen auch als „Verbrennungskrankheit“ bezeichnet. Es ist also von äußerster Wichtigkeit, zu verstehen, dass es sich bei dem Verbrennungstrauma um eine generalisierte Erkrankung handelt, die den Gesamtkörper betrifft, aber auch den Verbrennungschirurgen lokal zur Intervention benötigt.

In mehreren experimentellen und klinischen Studien ist nachgewiesen worden, dass aus diesen Gründen die Wundheilung den kritischen Punkt für das Überleben und die Erholung bei Verbrennungs- oder Traumapatienten darstellt [11-13]. („Zwiebelschalentheorie“ der Verbrennungswunde).

Anabole Substanzen, wie z.B. Wachstumshormone oder *Insulin-like growth factor-1* (IGF-I) vermindern die hypermetabolische Antwort und verbessern die Wundheilung [8, 13-15].

#### **1.1.4 Die Wundheilung**

Die Wundheilung der Haut ist ein dynamischer Prozess, an dem Blutzellen, parenchymale Zellen, die extrazelluläre Matrix sowie Wachstumsfaktoren beteiligt sind [1, 16].

**Die wichtigsten Ziele bei der Wundbehandlung sind ein schneller Wundverschluss und eine funktionell und ästhetisch befriedigende Narbe [1, 14].**

Der erste Schritt der Wundheilung ist durch die Rekrutierung von Entzündungszellen geprägt. Schon 24 bis 48 Stunden nach der Verletzung treten neutrophile Granulozyten in der Wunde auf. Sie werden durch chemotaktische Signale von Wachstumsfaktoren wie *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), IGF-1, *Epidermal Growth Factor* (EGF) und *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) sowie Abbauprodukten von Matrixkomponenten in die Wunde geleitet und aktiviert.

Dort produzieren sie pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukine (meist 1 und 6), das high-mobility-group-box Protein -1 (HMGB-1), oder Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), die Fibroblasten und Epithelzellen aktivieren. Nach wenigen Tagen werden die Granulozyten durch Monozyten und daraus hervorgehende Gewebsmakrophagen ersetzt. Als letztes folgen die Lymphozyten, deren Menge an Tag 6 nach der Verwundung ihren Höhepunkt erreicht [1, 3, 4].

Die Migration der epidermalen Zellen beginnt einen Tag nach der Verletzung vom Wundrand aus. Sie schieben sich als sogenannte Epithelzungen zwischen Dermis und Koagulationszone vorwärts. Dafür ändern die Keratinozyten deutlich ihren Phänotyp. Der normalerweise feste Kontakt zwischen den Keratinozyten und der Basalmembran geht verloren, die Keratinozyten flachen ab und bilden Fortsätze, sogenannte Lamellipodien, mit deren Hilfe sie aktiv lateral auf die Wundmatrix zuwandern. Die Migration und Proliferation der Keratinozyten wird durch Wachstumsfaktoren aus Thrombozyten, Makrophagen, Keratinozyten und Fibroblasten, z. B. EGF, TGF- $\beta$  und *Keratinocyte Growth Factor* (KGF), angeregt. Sobald die Wundfläche vollständig reepithelisiert ist, läuft die normale Differenzierung der Epidermis wieder an. Parallel zur fortschreitenden Reepithelisierung wird auch die Basalmembran wiederhergestellt. Drei bis vier Tage nach der Verletzung beginnen die Fibroblasten unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren zu proliferieren und eine neue Kollagenmatrix zu synthetisieren. Schließlich wachsen Kapillarsprosse, gefördert von den Wachstumsfaktoren *Basic Fibroblast Growth Factor*(bFGF) und *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) in die neu gebildete Epidermis ein [1, 4, 14, 17].

Wenn die Schädigung bis in die Netzschicht reicht (bei Verbrennungswunden also ab Grad 2b), verläuft die Heilung weniger komplex und es kommt zur Narbenbildung: Das neu gebildete Kollagen ist nicht mehr komplex verflochten, sondern besteht aus einfachen, dichten Parallelbündeln, die erst im Laufe der Zeit, meist Wochen bis Monate, geordnet und parallelisiert werden. Außerdem werden keine Hautanhangsgebilde gebildet und die Hautfunktion ist eingeschränkt [3, 14, 17]. Ausgeheilte Verbrennungswunden stellen also neben teils fürchterlichen Entstellungen für den Patienten auch eine lebenslange Minderqualität der regenerierten Haut dar, die durch intensive Pflege abgefangen werden muss, um

Sekundärschäden wie Hauteinrisse, (chronische ) Wunden etc. zu vermeiden (Infektionsgefahr!)

### **1.1.5 Gentherapie**

Die Etablierung von innovativen Behandlungsstrategien zur Optimierung der dermalen Zellstruktur und Wundheilung stellen einen wichtigen Forschungsschwerpunkt, mit dem Ziel das Überleben sowie die Lebensqualität von Patienten mit akuten Wunden zu verbessern. Dies beinhaltet nicht nur Verbrennungsoffer, sondern Traumapatienten im Allgemeinen, Patienten mit chronischen Wunden, Patienten mit einer venösen Insuffizienz, Diabetes mellitus, Bluthochdruck oder Autoimmunerkrankungen.

Anabole Substanzen wie beispielsweise Wachstumshormone vermindern die hypermetabolische Antwort und verbessern gleichzeitig die Wundheilung (REF). Für IGF-I wurde gezeigt, dass eine Gabe des Proteins zwar positive Effekte auf die hypermetabolische Katabolie und die Wundheilung ausübt [8, 11], dass allerdings diverse Nebenwirkungen wie Hypoglykämie, Ödembildung, Abgeschlagenheit, Kopfschmerzen oder sogar Störungen des Elektrolythaushalts mit Herzstillstand die therapeutische Anwendung limitieren [18]. Diese Nebenwirkungen wurden wahrscheinlich durch supraphysiologische Dosen von freiem IGF-I, die allerdings notwendig für einen biologischen Effekt sind, ausgelöst.

In Studien der Arbeitsgruppe Jeschke wurde gezeigt, dass die nonvirale liposomale Gentherapie einen neuen, effektiven Ansatz darzustellen vermag, um Wachstumsfaktoren spezifisch an die Zielzellen zu liefern und so Nebenwirkungen zu vermeiden. So kann die Wundheilung beschleunigt und die posttraumatische Katabolie verringert werden. Die optimale Genkombination und Applikationsweise ist allerdings noch nicht bestimmt worden [19-21].

Der Gentransfer ist bislang in klinischen Studien für die Behandlung von einigen pathophysiologischen Erkrankungen wie Karzinomen, Infektionen oder Leukämien zur Anwendung gekommen [22]. Der Erfolg der Gentherapie hängt jedoch von der Auswahl des Vektors für den Gentransfer ab [22-24]. Bis heute wurden bevorzugt virale Vektoren als Genvektoren benutzt, weil sie sehr spezifische

Transfektionsmöglichkeiten aufweisen [22-24]. Derartige Vektoren haben allerdings die Eigenschaften, vireninfectionsähnliche pathologische Reaktionen auszulösen, z.B. immunologische Reaktionen, mutagene oder karzinogene Effekte. Der klinisch-therapeutische Einsatz viraler Vektoren ist damit potentiell gefährlich [22]. Vor allem ein Einsatz von Viren in Patienten mit einem geschwächten Immunsystem, wie dies bei Verbrennungspatienten der Fall ist, wäre kontraindiziert. Als Alternative ist ein Gentransfer mit „nackter DNA“ denkbar, also die Verwendung einer DNA ohne Zusatz von Hilfsmitteln, welche die Transfektion unterstützen. Nackte DNA enthält keine viralen Komponenten, allerdings wird bei systemischer Applikation die nackte DNA äußerst schnell degradiert [25]. Als weiterer Nachteil ist zu werten, dass nackte DNA keine hohen Transfektionsraten erreicht, da sie relativ groß ist und die negative Ladung der nackten DNA einen Zelleintritt behindert.

Liposomen stellen als Transfektionssystem ein attraktives Modell dar, da sie keine viralen Komponenten aufweisen, sehr stabil sind und die Fähigkeit haben, mit der Zellmembran zu interagieren [25]. Verschiedene methodische Verbesserungen haben die Transfektionsraten, die mit Liposomen erreichbar sind, in die mit adenoviralen Konstrukten erzielten Bereiche angehoben. Dazu gehören vor allem der Einbau von Cholesterin, die Hinzufügung kationischer Eigenschaften zur Standard-Liposomenstruktur sowie die Verwendung des Cytomegalovirus-(CMV)-Promotors in der cDNA [25, 26]. Kationische Liposomen haben zudem die nützliche Eigenschaft, bei der Behandlung von Trauma einen endogenen antiinflammatorischen Effekt auszulösen: Kationische Cholesterin-Liposomen inhibieren die systemische Synthese von Stickstoffmonoxid (NO), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und vermindern somit die hypermetabolische Katabolie [27-30].

In experimentellen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die wöchentliche subkutane Injektion von kationischen Cholesterin-Liposomen mit der für das IGF-I-Gen kodierenden cDNA unter Kontrolle des CMV-Promotors effektiv und sicher ist. Die dermale IGF-I- Proteinkonzentration wurde erhöht, die dermale Zellerholung und Stabilisierung wurde verbessert und die Wundheilung beschleunigt [31-33]. Die Mechanismen dieser Effekte sind inzwischen definiert und bestimmt worden [33]. Indem das in Säugetieren nicht vorhandene Lac-Z-Gen für  $\beta$ -Galactosidase als Marker-Gen benutzt und zusätzlich in Liposomen inkorporiert wurde, konnten nach

einer subkutanen Injektion von Liposomen-transfizierte Myofibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen in der Entzündungsregion nachgewiesen werden [33]. Diese Zellen weisen hohe Proliferationsraten auf. Dies ist in Übereinstimmung mit Studien von Felgner und Kollegen, die zeigten, dass, um Genexpression zu erzielen, DNA-Plasmide in die Zellen eindringen und in den Zellkern diffundieren müssen („*cellular trafficking*“) [23-25]. Es existieren mehrere mögliche Zelleintrittsmechanismen, allerdings ist die Endozytose der wahrscheinlichste Mechanismus für die Transfektion durch Liposomen [29, 34, 35]. Nach der Endozytose wird dann die aus den Liposomen ausgeschleuste cDNA vom Zellkern aufgenommen [28]. Die Kernmembran stellt eine Barriere für die DNA dar. Da die Kernmembran während der Zellteilung aufgelöst ist, erfolgt die Transfektion in sich schnell teilenden Zellen effizienter [24]. Die cDNA wird dann im Kern in mRNA transkribiert, zum rauen endoplasmatischen Retikulum transportiert und dort in Proteine translatiert.

In weiteren Studien konnte nachgewiesen werden, dass bei subkutaner Injektion die Expression des transfizierten Gens spezifisch auf die Haut beschränkt bleibt [33]. Bei Ratten, die den IGF-I-cDNA-Komplex subkutan injiziert bekommen hatten, wurde keinerlei Anhalt für eine Transfektion oder eine Erhöhung der IGF-I-Expression im Blut, der Leber, Milz oder Niere gefunden [31-33].

### **1.1.6 KGF**

Der Wachstumsfaktor *Keratinocyte Growth Factor*(KGF) ist ein 26-28 kDa großes Glykoprotein, das von Rubin *et al.* [36] als ein von M426-Lungenfibroblasten produziertes epitheliales Mitogen entdeckt wurde.

Die spätere Klonierung und Sequenzierung ergab, dass es zur Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (*Fibroblast Growth Factors*, FGF) gehört, so dass ihm zunächst der Name FGF-7 zugeordnet wurde [37]. KGF wird vor allem von verschiedenen mesenchymalen Zelltypen produziert, wie Fibroblasten, Endothelzellen und Glattmuskelzellen der Gefäßwand [36, 38, 39]. In Zellen epithelialen Ursprungs ist dagegen nie eine Expression von KGF gefunden worden. Die Expression eines KGF-Rezeptors (FGFR2-IIIb) in der Epidermis legt daher eine vor allem parakrine Wirkungsweise nahe [40]. KGF stimuliert in der Tat Parakrin die Proliferation und Differenzierung von Epithelzellen. Zu den von KGF in *In-vitro*-

Experimenten hochregulierten Genen, die eine Rolle bei der Wundheilung spielen, gehören unter anderem VEGF, das die Kapillarsprossung fördert, und TGF- $\beta$ , das die Produktion von Molekülen der extrazellulären Matrix fördert. Ebenfalls verstärkt exprimiert als Reaktion auf KGF wird die Matrix-Metalloprotease Stromelysin-2, die von migrierenden Keratinozyten exprimiert wird und wahrscheinlich für die Migration der Keratinozyten in die Wunde wichtig ist [41].

Nach Hautverletzungen wird die normalerweise schwache Expression von KGF stark induziert [42]. Eine Zugabe von KGF zu Wunden stimuliert dort die Proliferation von Keratinozyten, erhöht die Motilität epidermaler Zellen und hat keine schädlichen Wirkungen auf die Expression differenzierungsspezifischer Keratine in humanen primären Keratinozyten [4, 43]. Bei transgenen Mäusen, die eine dominant-negative Version des KGF-Rezeptors in der Basalzellschicht der Epidermis und den Keratinozyten der äußeren Haarwurzelscheide exprimieren (KGF-knockouts), war die Reepithelisierung stark verlangsamt [44]. Dass bei transgenen KGF-Knockout-Mäusen deutliche histologische Anomalitäten waren, aber keine Wundheilungsstörungen beobachtet wurden, wird mit der Übernahme der KGF-Funktion vom stark homologen Protein FGF-10 erklärt, das an den gleichen Rezeptor bindet [41].

In einem Schweinemodell für die epidermale Wundheilung stimulierte KGF die Reepithelisierung und verstärkte die Einlagerung von Kollagenfasern in der oberen Dermis [45]. Da eine erhöhte Ablagerung von Kollagenfasern in der Wunde mit dem Risiko einer hypertrophen Narbenbildung verbunden ist, war die Quantifizierung und Identifizierung der Kollagenfasertypen von Interesse, deren Bildung von KGF induziert wird. Außerdem war die Interaktion von KGF mit anderen Wachstumsfaktoren und mit der extrazellulären Matrix sowie mesenchymalen Zellen *in vivo* noch nicht geklärt. Die vorliegende Arbeit sollte diese Interaktionen nach Verabreichung von KGF-cDNA näher untersuchen und zu einem verbesserten Verständnis der indirekten Effekte von KGF auf die Wundheilung führen.

### **1.1.7 Zielsetzung**

Die Behandlung von Verbrennungsoptionen stellt eine besondere Herausforderung an den Mediziner. Angestrebt ist die möglichst vollständige Wiederherstellung der Integrität der Haut. Dies bedeutet neben einem raschen Wundverschluss und einer

optimalen Wundheilung die rasche Re-Epithelisierung des verletzten Hautareals. Der Keratinozytenwachstumsfaktor KGF vermag über einen direkten Wirkmechanismus das Wachstum geschädigter Keratinozyten positiv zu beeinflussen. Verschiedene Studien legen nahe, dass eine Blockade des KGF-Rezeptors eine Suppression der Keratinozytenproliferation mit verminderter Re-Epithelisierung induziert [44] und umgekehrt die Addition exogenen KGF eine vermehrte Re-Epithelisierung auslöst [45, 46].

**Der therapeutische Einsatz von KGF könnte somit eine innovative Option zur Behandlung von Verbrennungswunden darstellen.**

Die vorliegende Arbeit sollte einen Beitrag zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten leisten, um zu helfen, Verbrennungspatienten das Überleben und eine bestmögliche Rehabilitation zu sichern.

Als mögliche therapeutische Interventionsmöglichkeit sollte der Einfluss von KGF auf die Wundheilung *in vivo* untersucht werden. Im Einzelnen wurde am Rattenmodell evaluiert:

- 1) Der Effekt einer Verabreichung von KGF-cDNA auf die Wundheilung nach einer Verbrennungsverletzung.**
- 2) Die molekularen Wechselwirkungen der KGF-cDNA mit anderen Wachstumsfaktoren und Zytokinen.**
- 3) Die molekularen Wirkungen der KGF-cDNA auf das Kollagenspektrum in der Wundregion.**

Um diese Fragen zu beantworten, wurde Ratten mit einer definierte Verbrennungsverletzung KGF-cDNA injiziert und der Erfolg dieser Therapie nach vier Wochen makroskopisch, histologisch und immunhistochemisch untersucht.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Tiere und Tierhaltung**

n = 22 ausgewachsene männliche Sprague-Dawley-Ratten (350-375g) wurden in einem klimatisierten Raum mit einem 12-h-Licht-Dunkel-Zyklus gehalten. Die Ratten wurden 7 Tage an ihre Umgebung gewöhnt, bevor die verblindete Studie begann. Alle Tiere erhielten während der gesamten Studie die gleiche Menge

Flüssignahrung (Fresubin, Fresenius Medical Care, Bad Homburg) und Wasser *ad libitum*. Die gesamte im Labor durchgeführte Studie wurde unter der Leitung von Jeschke und Schubert am Universitätsklinikum Regensburg durchgeführt. Sämtliche Experimente wurden vom Regierungsbezirk Oberpfalz genehmigt (AZ: 621-2531.1.-37/99).

## **2.2 Verbrühungsmodell**

Jede Ratte erhielt eine Verbrühung 3. Grades über 30% der Körperoberfläche (30% VKOF) unter Vollnarkose (Pentobarbital 50 mg/kg Körpergewicht) und Analgesie (Buprenorphin 1 mg/kg Körpergewicht) gemäß eines modifizierten Protokolls, das sich an das in [47] beschriebene Protokoll anlehnte. Die Ratten wurden anästhesiert, rasiert, in eine Schablone platziert und erhielten dann eine Verbrühung entsprechend 30% VKOF (10s Kontakt des Rückens mit 99°C heißem Wasser). Nach Setzen der Verbrühung erfolgte sofort ein Volumenersatz durch intraperitoneale Injektion von Ringerlösung (50 ml/kg Körpergewicht). Die Tiere wurden gemäß den Tierschutzbestimmungen behandelt und mit Schmerzmedikation, Spezialnahrung und Flüssigkeitssubstitution entsprechend der Behandlung von menschlichen Brandopfern versorgt.

## **2.3 Experimentelle Gruppen und liposomale Applikation des KGF-Konstrukts**

Die thermisch geschädigten Ratten wurden zufällig auf zwei Gruppen aufgeteilt, die die folgenden wöchentlichen subkutanen Injektionen erhielten:

**Gruppe A:** Liposomen (10 µl Liposomen in 180 µl physiologischer Kochsalzlösung) mit 0,22 µg des Lac-Z-cDNA-Konstrukts für das Reporter-gen  $\beta$ -Galaktosidase, Vehikel, n = 11 oder

**Gruppe B:** Liposomen (10 µl Liposomen in 180 µl physiologischer Kochsalzlösung) mit 2,2 µg eines KGF-cDNA-Konstrukts plus 0,22 µg des Lac-Z-cDNA-Konstrukts für das Reporter-gen  $\beta$ -Galaktosidase, n = 11.

Vorangehende Experimente hatten ergeben, dass Tiere, die Liposomen mit dem Lac-Z-Gen erhielten, eine bessere Kontrolle darstellten als Tiere, die nur Kochsalzlösung erhielten, da sie eine schnellere Wundheilung und eine

verstärkte Akute-Phase-Reaktion zeigten [48]. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Studie der Kontrollgruppe Liposomen mit Lac-Z verabreicht. Bei dem Ratten-KGF-cDNA-Konstrukt handelte es sich um ein Plasmid mit der KGF-cDNA unter Kontrolle eines CMV-Promotors (Cytomegalovirus), das an der *Recombinant DNA Core Facility* des *UTMB Sealy Center for Molecular Science* (Galveston, TX, USA) hergestellt worden war. Zur Herstellung der Liposomen wurden DMRIE (1,2-Dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxyethylammoniumbromid) und Cholesterin in membrangefiltertem Wasser (Life Technologies Inc., Rockville, USA) im Verhältnis 1:1 (Molverhältnis) gemischt. Dieses Reagenz interagiert spontan mit der KGF-cDNA und formt so einen Lipid-cDNA-Komplex. Die cDNA-Dosis von 2,2 µg war in einer Dosisfindungsstudie ermittelt worden [32].

Sofort nach der thermischen Verletzung erhielt jede Ratte an zwei gegenüberliegenden Stellen am Wundrand Injektionen mit insgesamt 0,2 ml der Lipoplexe subkutan in gesunde, unverbrannte Haut. Die Injektionen erfolgten am Wundrand, da dort die größte zelluläre und metabolische Aktivität beobachtet wird und so viele Zellen wie möglich transfiziert werden sollten.

Nach Erholung und Aufwachen der Tiere wurden diese dann in ihre Käfige zurückgebracht. Die Tiere wurden selbstverständlich, um größtmögliche Vergleichbarkeit zu erzielen, direkt nach dem Aufwachen mit einer nach der Baxter-Formel berechneten i.p. Gabe von Ringerlösung i.p. volumenrestituiert.

Die Injektionen wurden wöchentlich über vier Wochen wiederholt, jeweils mit frischen, kurz vor der Injektion hergestellten Liposomen. 5 Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere durch Dekapitation getötet. Proben der Rückenhaut wurden entnommen und entweder in 4% Paraformaldehyd/ 1% Glutaraldehyd fixiert oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -73°C bis zur Analyse gelagert.

## **2.4 Transfektion**

Die Transfektion wurde an Hautproben untersucht, die 33 Tage nach der Verbrennung und 5 Tage nach der letzten Injektion entnommen worden waren. Das Vorhandensein des  $\beta$ -Galaktosidase-Proteins wurde durch histochemische Färbung mit halogeniertem Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid (Life Technologies, Gaithersburgh, USA) nachgewiesen. Die geraden, etwa 4 mm breiten

Hautbiopsien reichten von der Mitte der Brandwunde bis deutlich in die umgebende normale Haut hinein. Die Biopsien wurden über Nacht in 4%igem Paraformaldehyd mit einer HEPES-gepufferter Hanks-Lösung mit einem pH-Wert von 7,6 bei 4°C fixiert. Nach ausführlichem Waschen in Puffer und PBS wurden die Biopsien über Nacht in 0,1%iger Bluo-Gal-Substratlösung, pH 7,6 bei 37°C inkubiert. Nach ausgiebigem Waschen wurden die Hautbiopsien in Paraffin eingelegt, 4µm dicke Schichten geschnitten und eine HE- oder Eosin Färbung durchgeführt.

## 2.5 Makroskopische Untersuchungen

### 2.5.1 Reepithelisierung

Die Reepithelisierung wurde durch **Planimetrie und Histologie** bestimmt. Die Wundfläche wurde sofort nach der Verbrennungsverletzung bestimmt. Dies geschah durch Aufzeichnen der Wunde auf durchsichtige Folien und anschließende planimetrische Auswertung mit einem speziellen Programm, das für diese Studie entwickelt wurde (Entwicklung und Design: Systat Software Inc., San Jose, USA; und der Versuchsleiter PD Dr. med. Marc G Jeschke, Uni Regensburg).

Bei Versuchsende wurde der Wundschorf durch vorsichtiges Ziehen entfernt. Dabei wurde Sorge getragen, dass der heilende Wundrand nicht beschädigt wurde. Nach Entfernen des Schorfs wurden die Tiere auf eine gewöhnliche Oberfläche gelegt, und die Wundfläche wurde erneut auf Klarsichtfolie aufgemalt. Dazu wurden die gut sichtbare Grenze zwischen reepithelisierter und unverbrannter Haut sowie die Vorderkante des neuen Epithels abgepaust. So konnte das Neoepithelium leicht definiert und identifiziert werden. Es folgte eine erneute planimetrische Auswertung.

Die Fläche mit neuem Epithel wurde in Prozent Reepithelisierung der ursprünglichen Wundfläche ausgedrückt und wurde gemäß der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Reepithelisierung} = [(o - i)/b] \times 100$$

wobei *o* die äußere Fläche 4 oder 5 Wochen nach der Verbrennung ist, *i* die innere Fläche 33 Tage nach der Verbrennung und *b* die ursprüngliche Wundfläche direkt nach der Verbrennung.

Außerdem wurden Biopsien zur histologischen Bestimmung der Reepithelisierung genommen.

## 2.6 Immunhistochemie

### 2.6.1 Expression von Wachstumsfaktoren und Kollagenen

Die Menge von Wachstumsfaktoren in Dermis und Epidermis wurde mit peroxidasegekoppelter Immunhistochemie ermittelt. Die zum Nachweis von *Insulin-like Growth Factor I* (IGF-I), *Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3* (IGFBP-3), KGF, *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), bFGF und *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) verwendeten Antikörper (inklusive Verdünnungen und Zweitantikörper) sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Die Paraffinproben wurden 4  $\mu\text{m}$  dick geschnitten, in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und in PBS überführt. Dann wurden sie für 30 Minuten bei 37°C in Protease K (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden endogene Peroxidasen durch 15-minütige Inkubation mit Methanol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> blockiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Proben für 20 min mit Blockierungsserum inkubiert. Es folgten ein weiterer Waschschrift und anschließend die Inkubation mit dem Erstantikörper bei 4°C über Nacht. Nach einem Waschschrift wurden die Proben für 1h bei 37 C mit dem biotinylierten Zweitantikörper inkubiert. Dann wurden die Proben gewaschen und für 1h bei 37 C mit peroxidasegekoppeltem Streptavidin (1:300, DAKO P0397, Dako, Glostrup, Dänemark) inkubiert. Die Schnitte wurden gründlich gewaschen und zur Farbentwicklung mit Diaminobenzidin inkubiert. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe und 100% Xylol dehydriert und anschließend abgedeckt. Alle Schnitte wurden jeweils in einem Durchgang gefärbt, um Unterschiede durch den Färbevorgang zu vermeiden.

Die Menge an Wachstumsfaktoren wurde in normaler Haut, am Wundrand und im Wundgrund bestimmt, und zwar anhand der positiven Zellen pro Gesichtsfeld. Die positiven Zellen wurden in jedem Schnitt verblindet an drei verschiedenen Stellen (normale Haut, Wundrand, Wundgrund) gezählt.

Der Nachweis von Kollagen I, III und IV erfolgte nach einem ähnlichen Protokoll mit den in Tabelle 1 aufgeführten Antikörpern. In jedem Schnitt wurde verblindet an drei verschiedenen Stellen (normale Haut, Wundrand, Wundgrund) die Intensität der Färbung gegen Kollagen I, III und IV auf einer Skala von 1 (schwach) bis 4 (stark) beurteilt.

Tabelle 1: Liste der für die Immunhistochemie verwendeten Erst- und Zweitantikörper. Verwendete Konzentrationen in Klammern.

Zielprotein	Antikörper	Zweitantikörper
1) KGF	Ziege-Anti-KGF (1:20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)	Biotinylierter Kaninchen-Anti-Ziege-Antikörper (1:400, DAKO E-0466)
2) IGF-I	Kaninchen-Anti IGF-I (1:10, Peprotech, Tebu, Deutschland)	Biotinylierter Schweine-Anti-Kaninchen-Antikörper (1:300, DAKO E-0431)
3) IGFBP3	Ziege-Anti-IGFBP3 (1:10, Santa Cruz Biotechnology)	Biotinylierter Kaninchen-Anti-Ziege-Antikörper (1:400, DAKO E-0466)
4) PDGF	Kaninchen-Anti-PDGF (1:30, Oncogene Research Products, Boston, USA, #PC21)	Biotinylierter Schweine-Anti-Kaninchen-Antikörper (1:300, DAKO E-0431)
5) bFGF	Kaninchen-Anti-bFGF (1:50, Oncogene Research Products, Boston, USA, #PC15)	Biotinylierter Schweine-Anti-Kaninchen-Antikörper (1:300, DAKO E-0431)
6) TGF- $\beta$	Ziege-Anti-TGF $\beta$ (1:10, Santa Cruz Biotechnology)	Biotinylierter Kaninchen-Anti-Ziege-Antikörper (1:400, DAKO E-0466)
7) Kollagen I	Anti-collagen type I (1:50, Oncogene Research Products, Cambridge, MA, USA)	Biotinylierter Schweine-Anti-Kaninchen-Antikörper (1:200, DAKO E-0431)
8) Kollagen III	Anti-collagen type III (1:50, Oncogene Research Products)	Biotinylierter Schweine-Anti-Kaninchen-Antikörper (1:200, DAKO E-0431)
9) Kollagen IV	Anti-collagen type IV (1:50, Oncogene Research Products)	Biotinylierter Schweine-Anti-Kaninchen-Antikörper (1:200, DAKO E-0431)
10) Ki67	Maus-Anti-Ki67 (1:100, BD PharMingen, USA)	HRP-Antikörpercocktail (Universal DAB Detection Kit, Ventana Med. Systems, USA)

## 2.6.2 Proliferation

Die Proliferation der Hautzellen wurde mit Antikörpern gegen das Protein Ki67 (Tabelle 1) abgeschätzt. Die Paraffinproben wurden 4  $\mu$ m dick geschnitten, auf Superfrost-Plus-Träger montiert, für 20 Minuten bei 72°C erhitzt, entparaffiniert und rehydriert. Dann wurden sie für 30 Minuten in der Mikrowelle bei 240 Watt in Citratpuffer mit pH 7,3 inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden endogene Peroxidasen durch 15-minütige Inkubation mit Methanol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> blockiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurde der Ki67-Antikörper hinzugefügt. Die Proben wurden in einer

Ventana-Maschine (Ventana Medical Systems, USA) bei 37°C gefärbt. Mit dem *Basic DAB Detection Kit* von Ventana wurde dann der Erstantikörper nachgewiesen. Ein dunkelbrauner Kernniederschlag wurde als positive Reaktion gewertet.

Alle Hautzellen in der epithelialen Zunge und der Basalzellschicht wurden gezählt. Die Proliferation wurde als Anzahl der positiv gefärbten Zellen pro 100 gezählte Zellen angegeben.

### **2.6.3 Apoptose**

Zum Apoptosenachweis diente die „*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling*“- (TUNEL)-Methode (Apoptag, Oncogene, Baltimore, USA). Mit Hilfe der TUNEL-Methode lassen sich apoptoseinduzierte DNA-Strangbrüche nachweisen. Mit Digoxigenin vormarkierte Nukleotide werden mit Hilfe der terminalen Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) an das 3'-OH-Ende der DNA angehängt. Ein mit einer Peroxidasekonjugierter Anti-Digoxigenin-Antikörper wird zugegeben und bindet an die Digoxigenin-Nukleotide. Nach Zugabe des Chromogen/Substrat-Reaktionsansatzes DAB (Diaminobenzidin) setzt die Peroxidase das DAB zu einem unlöslichen braunen Farbstoff um und macht so die apoptotischen Kerne durch eine braune Färbung sichtbar.

Die Schnitte wurden wie in 2.6.1 beschrieben entparaffiniert, rehydriert und gewaschen. Um die Hintergrundkontamination zu reduzieren, wurden die Schnitte mit Proteinase K vorbehandelt. Dann wurden die Schnitte mit frisch zubereiteter TdT bei 37°C für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Anti-Digoxigenin-Peroxidase-Konjugat bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Schließlich wurde zur Farbentwicklung DAB hinzugegeben und dann mit Mayers Hämatoxylin gegengefärbt.

Für die Zählung wurden alle Epithelzellen untersucht. Die Apoptoserate wurde als Zahl der apoptotischen Zellen pro 100 Epithelzellen ausgedrückt.

## **2.7 Ethik und Statistik**

Die Studien wurden von der Tierschutzkommission der Regierungsbehörde Oberpfalz geprüft und genehmigt (AZ: 621-2531.1.-37/99). Die Tiere wurden zweimal täglich von Mitgliedern der Forschergruppe besucht, um sicherzustellen, dass sie keine Schmerzen hatten oder anderweitig litten. Die Tiere wurden gemäß den Tierschutzbestimmungen behandelt und mit Schmerzmedikation, Spezialnahrung und Flüssigkeitssubstitution entsprechend der Behandlung von menschlichen Brandopfern versorgt.

Statistische Vergleiche wurden mit Students t-Test durchgeführt. Die Daten werden dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SD (Standardabweichung). Ab p-Werten von kleiner als 0,05 wurden Unterschiede als statistisch signifikant angesehen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Transfektion

Die Gentherapie könnte eine innovative Behandlungsoption von Verbrennungsopfern darstellen. Die hier durchgeführte Studie basiert auf der Vorstellung, dass das Einbringen von definiertem genetischem Material in die Zielzellen oder das Zielgewebe eines Patienten die vor Ort Synthese eines therapeutisch aktiven Proteins (KGF) ermöglicht, welches effizient im Wundmilieu seine Wirkung entfalten könnte.

#### 3.1.1 Transfektionseffizienz

Um den Effekt einer Verabreichung von KGF-cDNA auf die Wundheilung nach einer Verbrennungsverletzung zu untersuchen, wurde zunächst die Transfektionseffizienz immunhistochemisch überprüft. Die Transfektionseffizienz wurde dabei an Hautproben untersucht, die 33 Tage nach der Verbrennung und 5 Tage nach der letzten Injektion mit KGF-cDNA entnommen worden waren. Die blaue Färbung vieler Hautzellen nach Inkubation der Schnitte mit dem halogenierten Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid Bluo-Gal (Life Technologies, Inc.) war ein Zeichen für das Vorhandensein von  $\beta$ -Galaktosidase und damit für eine erfolgreiche Transfektion (Abb. 1).

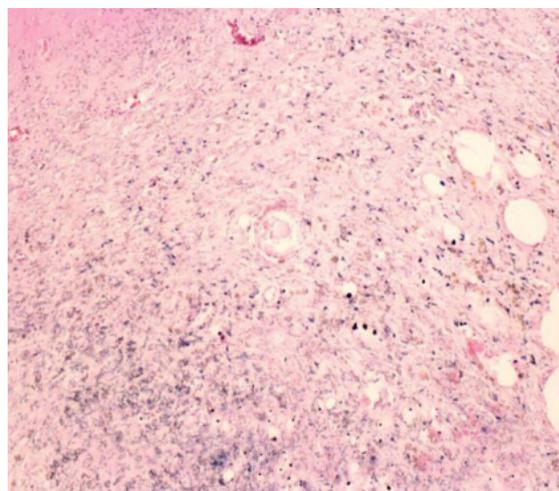


Abb. 1: Immunhistochemie. Anfärbung der Hautproben mit  $\beta$ -Galaktosidase. Blaue Hautzellen bedeuten eine positive  $\beta$ -Galaktosidase-Reaktion und damit eine erfolgreiche Transfektion (20x Vergrößerung).

### 3.1.2 KGF-und IGF-I-Expression

Um nachfolgend zu evaluieren, ob eine Transfektion mit KGF-cDNA tatsächlich zu einer Veränderung der KGF-Synthese beiträgt, wurde in weiteren Versuchen KGF-Protein in transfizierten versus nicht transfizierten Tieren immunhistochemisch analysiert. In Ratten, die mit Liposomen plus KGF-cDNA behandelt worden waren, konnten viele Zellen als KGF-positiv identifiziert werden, während in den Kontrollen nur wenige Zellen eine positive Reaktion mit dem KGF-Antikörper zeigten (Abb. 2).

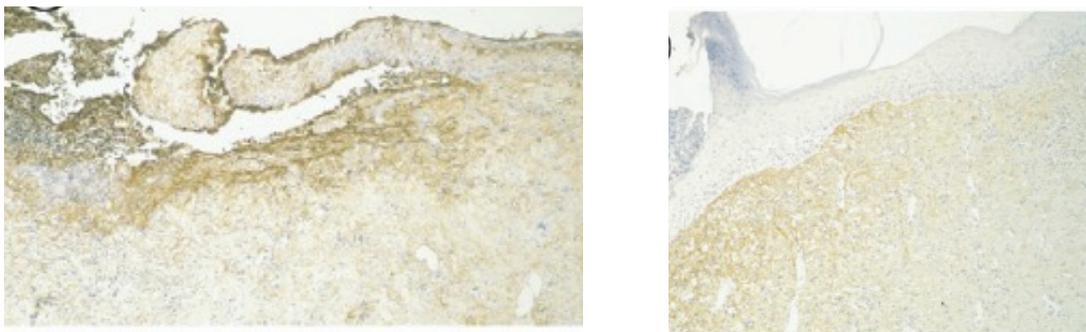


Abb. 2: Immunhistochemie. Repräsentative Schnitte der immunhistochemischen Färbung mit Antikörpern gegen KGF in der Haut. In Ratten, die mit Liposomen plus KGF behandelt worden waren (linke Abbildung), konnten viele Zellen als positiv identifiziert werden (braune Färbung), während in den Kontrollen (rechte Abbildung) nur wenige Zellen eine positive Reaktion gegenüber dem KGF-Antikörper zeigten (20x Vergrößerung).

Die erfolgreiche Transfektion führte also zu einer deutlich vermehrten Expression von KGF. Abbildung 3 demonstriert darüber hinaus die unterschiedliche Anfärbeeffizienz gegen den IGF-I-Antikörper in transfizierten versus nicht-transfizierten (Kontrollen) Tieren. Auch hier waren in den transfizierten Tieren mehr positive Färbereaktionen nachweisbar, verglichen zum Kontrollgewebe (Transfektion mit Liposomen ohne KGF-cDNA).

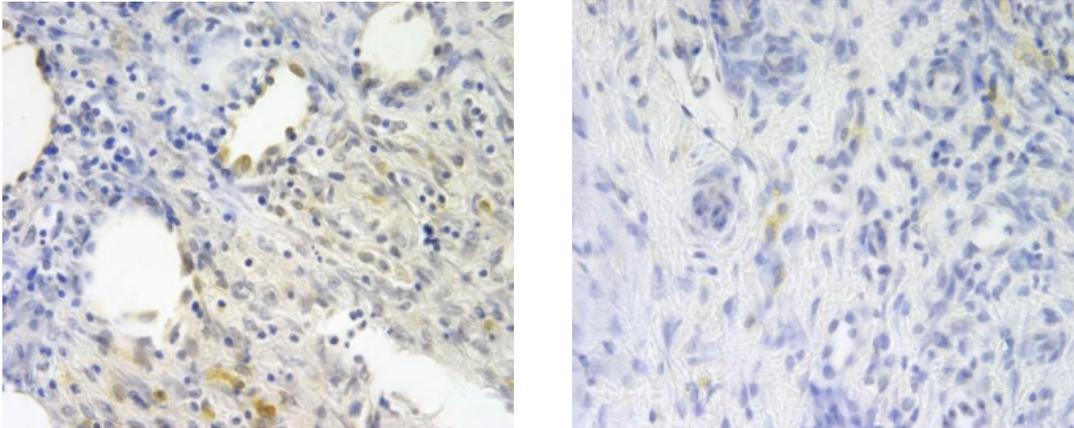


Abb. 3: Immunhistochemische Anfärbung der Hautproben mit gegen IGF-I gerichteten Antikörpern (Braunfärbung). Linke Abbildung: IGF-I spezifische Anfärbung in mit KGF-cDNA transfizierten Tieren. Rechte Abbildung: IGF-I spezifische Anfärbung in Kontrolltieren. Es zeigen sich signifikant mehr positive Zellen in Tieren nach KGF-cDNA-Transfektion (400x Vergrößerung).

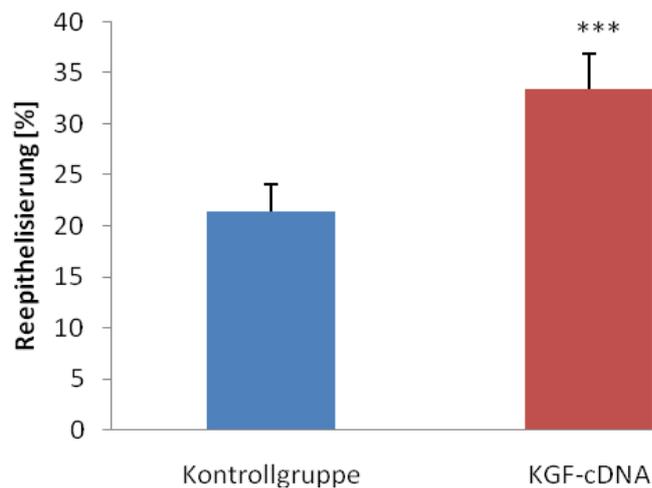


Abb. 4: Reepithelisierungsfläche in % der ursprünglichen Verbrennungsfläche 33 Tage nach der Verwundung nach Liposomen- oder KGF-cDNA-Liposomengabe. N = 8 pro Gruppe, Fehlerbalken: SD. \*\*\* Signifikanter Unterschied,  $p < 0,001$  (Students t-Test).

### 3.2 Reepithelisierung

Die Bedeutung einer Zunahme der KGF-Synthese für die Wundheilung war Gegenstand anschließender Experimente. Für die Versuche wurden hierbei pro Gruppe 8 Tiere eingesetzt. In der Tat war die Wundheilung bei den mit KGF-cDNA behandelten Ratten signifikant verbessert (Abb. 4). Die Reepithelisierung 33 Tage nach der Verwundung betrug bei den behandelten Tieren  $34 \pm 3\%$ , bei den Kontrolltieren lediglich  $21 \pm 3\%$  der ursprünglichen Verbrennungsfläche ( $p < 0,001$ ).

Die Vermessung der Länge des Neoepitheliums in HE-gefärbten histologischen Schnitten führte zu ähnlichen Ergebnissen. Ratten, die mit der KGF-cDNA behandelt worden waren, zeigten eine deutlich stärkere lineare Reepithelisierung von  $390 \pm 60 \mu\text{m}$  gegenüber  $150 \pm 80 \mu\text{m}$  bei den Kontrolltieren ( $p < 0,001$ , Abb. 5).

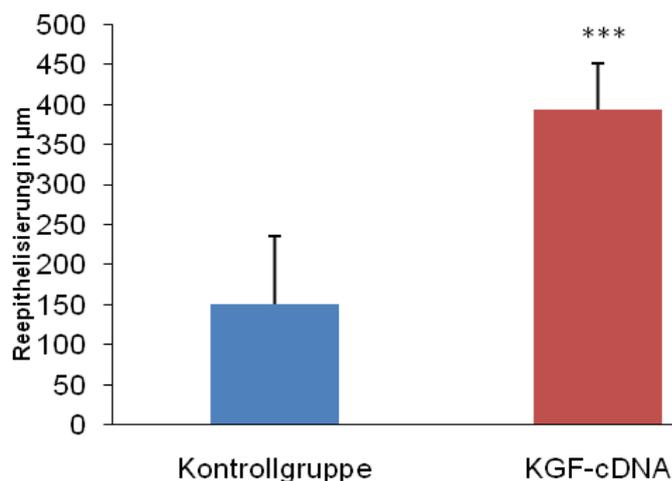


Abb. 5: Lineare Reepithelisierung 33 Tage nach der Verwundung nach Liposomen- oder KGF-cDNA-Liposomengabe.  $n = 8$  pro Gruppe, Fehlerbalken: SD. \*\*\* Signifikanter Unterschied,  $p < 0,001$ .

Abbildung 6 demonstriert repräsentativ das Ausmaß der Reepithelisierung in mit KGF-cDNA behandelten Ratten (linke Abbildung) versus unbehandelten Tieren (Liposomengabe, rechte Abbildung).

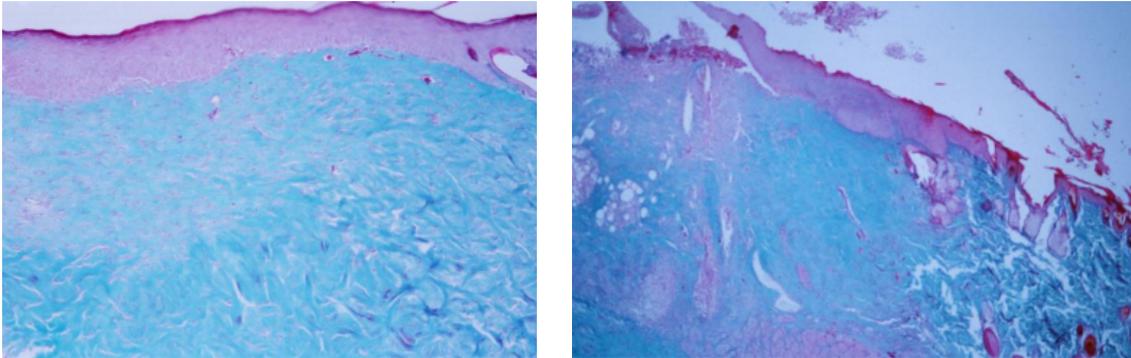


Abb. 6: Photographische Darstellung der Reepithelisierung nach KGF-cDNA-Liposomengabe (linke Abbildung) versus der Kontrollgruppe (Liposomengabe).

### **3.3 Proliferation und Apoptose**

Auf der Suche nach einem möglichen Grund für die beschleunigte Reepithelisierung der behandelten Ratten wurden Proliferation und Zelltod der Epithelzellen untersucht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe nahm die Zellproliferation, analysiert mittels Ki67-Färbung, in der mit KGF-cDNA behandelten Gruppe signifikant auf fast das Zweifache zu (Abb. 7+8). Die Apoptose hingegen war in der behandelten Gruppe deutlich abgeschwächt (Abb. 9+10).

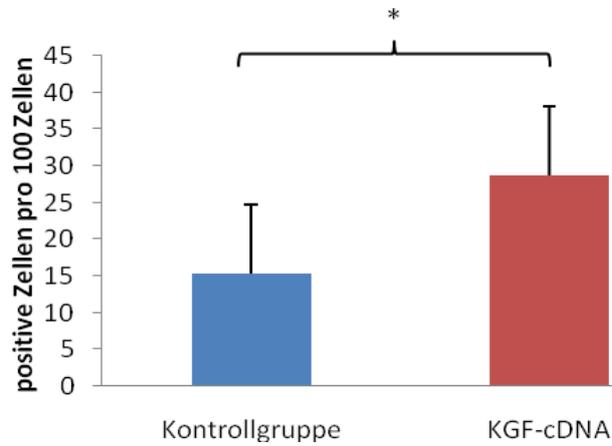


Abb. 7: Proliferation in der Basalzellschicht und epithelialer Zunge, immunhistochemischer Nachweis von Ki67. n = 8 pro Gruppe, Fehlerbalken: SD. \*: p < 0,05.

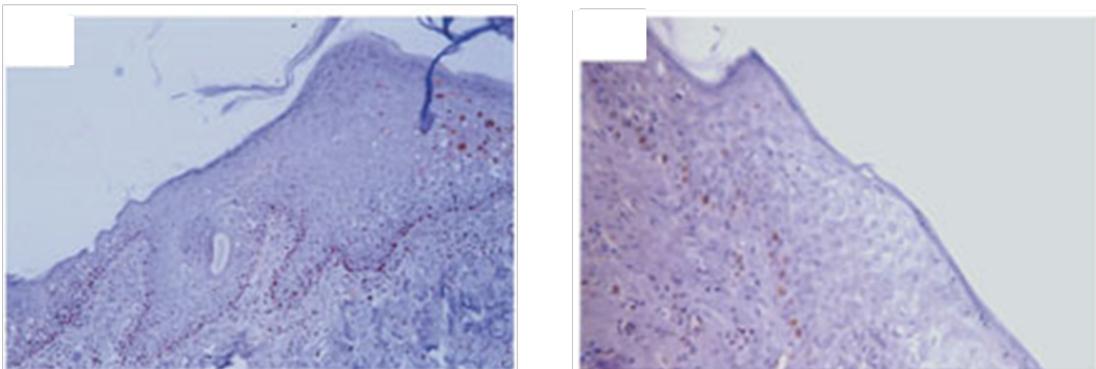


Abb. 8 Immunohistochemische Färbung gegen den Zell-Proliferationsmarker Ki67. Linke Abbildung: Ratten exprimieren nach Gabe von KGF cDNA höhere KGF-Proteinspiegel, die in einer höheren proliferativen Aktivität der basalen Hautzellen resultieren (Braunfärbung, Vergrößerung x100). Rechte Abbildung: Ki67-Färbung in den Kontrolltieren mit nur wenigen Ki67 positiven Zellen (Vergrößerung x200).

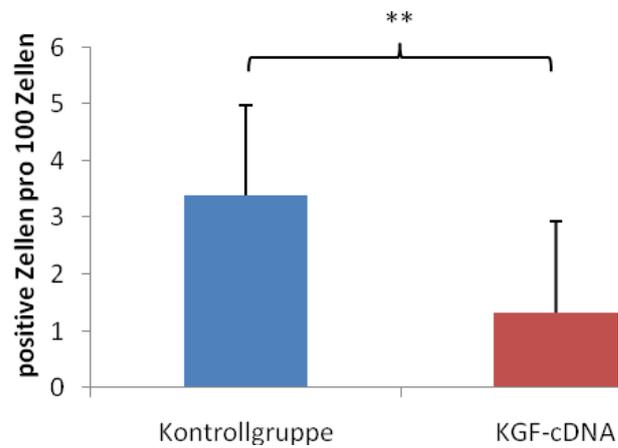


Abb. 9: Apoptose in Epithelzellen, Nachweis mit TUNEL-Verfahren. n = 9 pro Gruppe, Fehlerbalken: SD. \*\*: p < 0,01

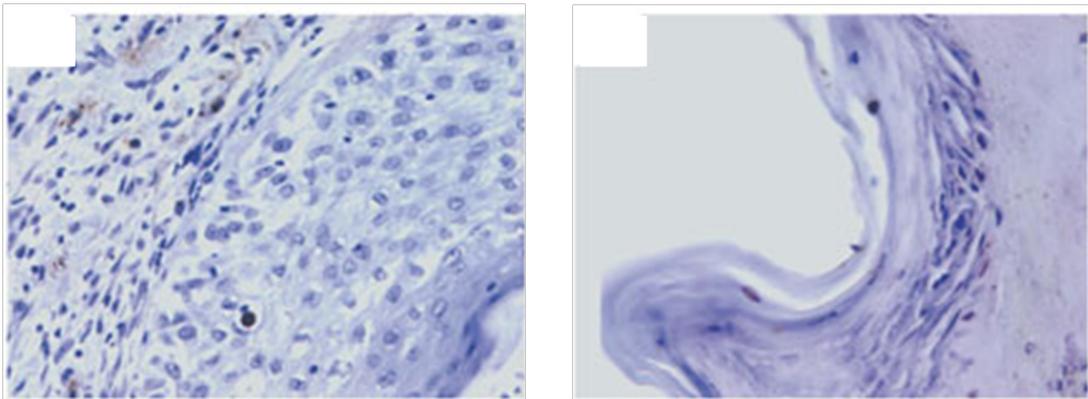


Abb. 10: Immunhistochemischer Nachweis apoptotischer Vorgänge (TUNEL-Färbung). Linke Abbildung: Repräsentativer Ausschnitt eines mit KGF cDNA behandelten Tieres. Eine Zelle mit nachgewiesener Apoptose (Braunfärbung, Vergrößerung x630). Rechte Abbildung: Apoptose-Färbung in den Kontrolltieren (drei positive Zellen, Vergrößerung x630).

### 3.4 Wachstumsfaktoren KGF, IGF-I, IGFBP-3, PDGF, bFGF und TGF- $\beta$

Wachstumsfaktoren stellen wesentliche Triggerfaktoren für Zellwachstum und Überleben. Um Informationen über den Zusammenhang zwischen dem KGF-Gentransfer und dem verbesserten Überleben der Epithelzellen während der Wundheilung zu erhalten, wurden histologische Schnitte der Wunden auf ihren Gehalt an verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen untersucht.

#### 3.4.1 KGF

Die immunhistochemische Bestimmung der Expression des KGF-Proteins in der Haut ergab, dass Ratten, die das KGF-cDNA-Konstrukt erhalten hatten, eine signifikant höhere KGF-Expression in der Haut aufwiesen als Ratten, die Kontrollliposomen erhalten hatten (Abb. 11+12). Die Zahl der KGF-positiven Zellen war bei den mit KGF-cDNA behandelten Tieren am Wundrand und im Wundgrund höher als bei den Kontrolltieren ( $p < 0,001$ ). Bei behandelten und unbehandelten Tieren war die KGF-Menge in Bereichen mit unverletzter Haut am niedrigsten und stieg am Wundrand und im Wundgrund signifikant an ( $p < 0,0001$ ). Bei den behandelten Tieren waren die meisten KGF-positiven Zellen am Wundrand zu finden ( $p < 0,001$  Wundrand vs. Wunde).

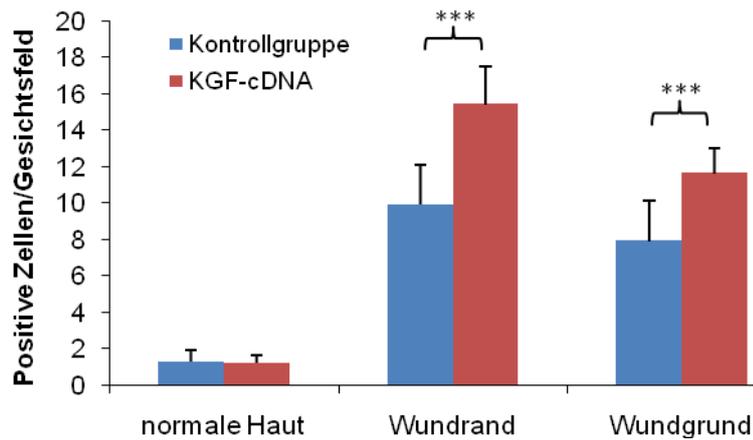


Abb. 11: Quantifizierung der Anzahl KGF-angefärbter Zellen (positive Zellen/Gesichtsfeld). Die Anfärbung erfolgte immunhistochemisch mittels KGF-spezifischer Antikörper.  $n = 8$  pro Gruppe, Fehlerbalken: SD. \*\*\*:  $p < 0,001$

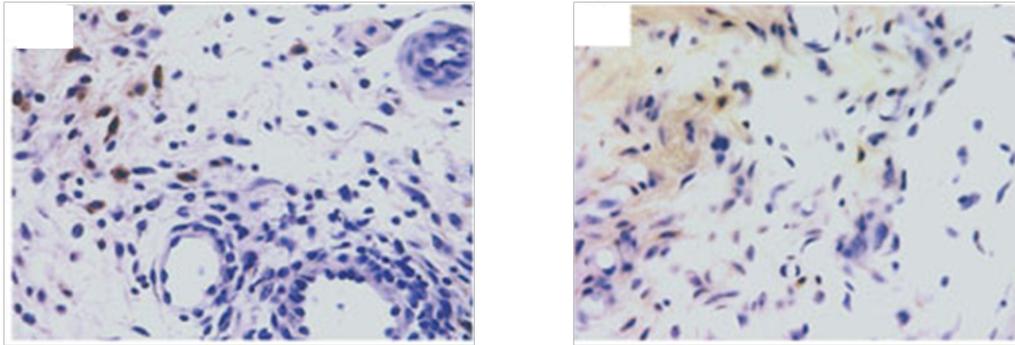


Abb. 12: Immunohistochemischer Nachweis der KGF-Expression mittels KGF-spezifischer Antikörper. Linke Abbildung: KGF-spezifische Anfärbung (Braunfärbung) verschiedener Zelltypen wie Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen in mit KGF cDNA behandelten Tieren (Vergrößerung x400). Rechte Abbildung: Geringere Anfärberate in Kontrolltieren (Vergrößerung x400).

### 3.4.2 IGF-I

In unverletzter Haut waren nur sehr wenige IGF-I-positive Zellen zu sehen, während im Wundgrund sowohl bei behandelten als auch bei unbehandelten Tieren signifikant mehr IGF-I-positive Zellen gezählt wurden. Bei mit KGF-cDNA behandelten Tieren waren im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant mehr IGF-I-positive Zellen pro Gesichtsfeld im Wundgrund zu finden (Abb. 13+14).

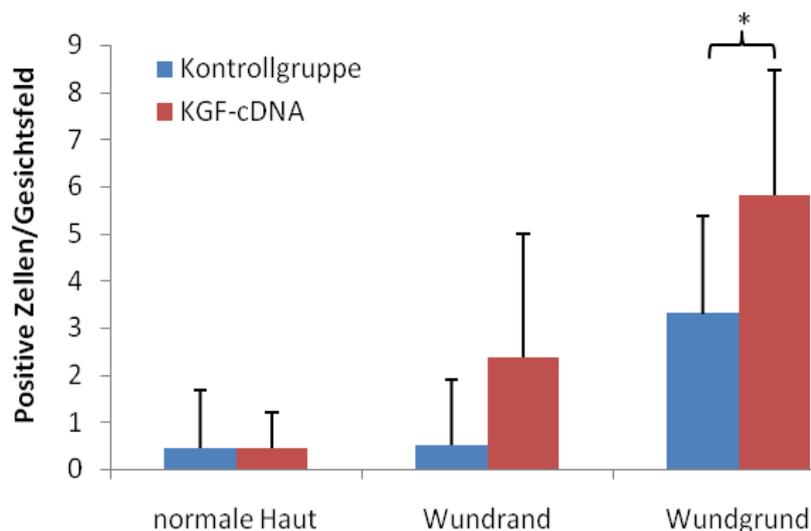


Abb. 13: IGF-I, immunhistochemischer Nachweis unter Verwendung IGF-I spezifischer Antikörper. n = 8 pro Gruppe, Fehlerbalken: SD. \*: p < 0,05.

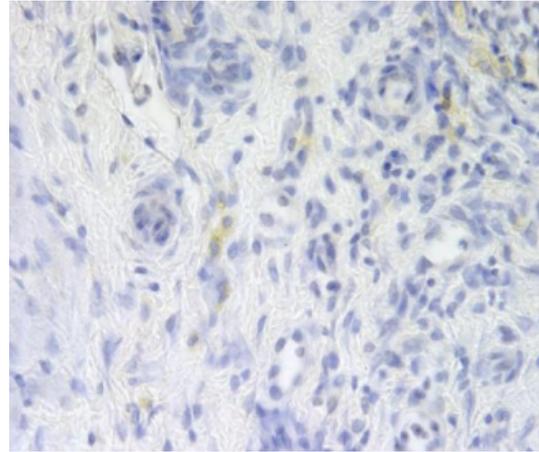
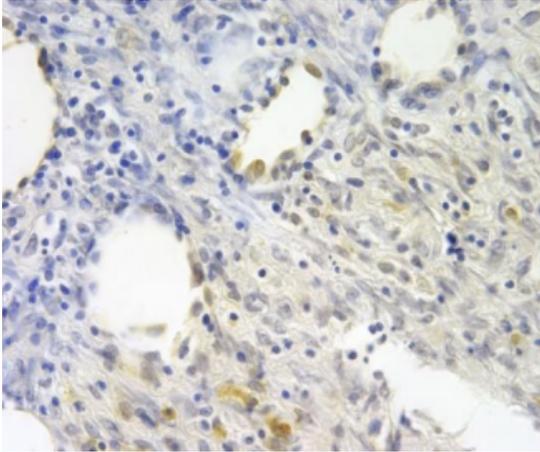


Abb. 14: Repräsentative Photographie von Gewebeproben nach immunhistochemischer Anfärbung gegen IGF-I (Braunfärbung). Linke Abbildung: Mit KGF cDNA behandelte Tiere, rechte Abbildung: Kontrolltiere (Behandlung mit Liposomen). Vergrößerung jeweils x400.

### 3.4.3 IGFBP-3

Aufgrund der in transfizierten Tieren beobachteten erhöhten IGF-I-Spiegel wurde postuliert, dass möglicherweise auch der IGF-Rezeptor eine ähnliche Modulation erfahren hatte. Die nachfolgenden Abbildungen verdeutlichen, dass sich IGFBP-3 ähnlich wie IGF-I verhielt. In normaler Haut war die IGFBP-3-Expression nur sehr gering nachweisbar, während sie am Wundrand und im Wundgrund signifikant höher war. Bei mit KGF-cDNA behandelten Tieren waren im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant mehr IGFBP-3-positive Zellen pro Gesichtsfeld im Wundgrund zu finden (Abb. 15+16).

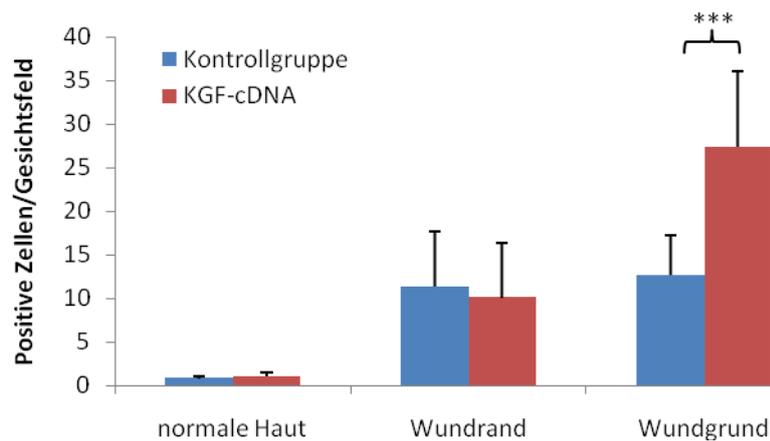


Abb. 15: IGFBP-3, immunhistochemischer Nachweisunter Verwendung IGFBP-3 spezifischer Antikörper. n = 10 pro Gruppe, Fehlerbalken: SD. \*\*\*: p < 0,001.

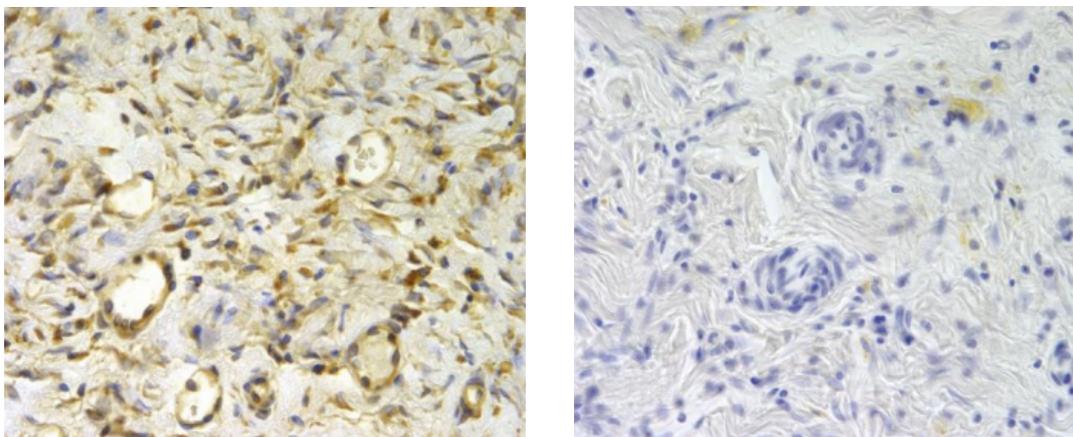


Abb. 16: Repräsentative Photographie von Gewebeproben nach immunhistochemischer Anfärbung gegen IGFBP-3 (Braunfärbung). Linke Abbildung: Mit KGF cDNA behandelte Tiere, rechte Abbildung: Kontrolltiere (Behandlung mit Liposomen). Vergrößerung jeweils x400.

### 3.4.4 bFGF

Zellen positiv für bFGF waren signifikant vermehrt am Wundrand von mit liposomaler KGF-cDNA behandelten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren zu finden ( $2,2 \pm 0,6$  positive Zellen pro Gesichtsfeld vs.  $1,1 \pm 0,9$  positive Zellen pro Gesichtsfeld). Die Behandlung mit KGF-cDNA erhöhte also auch die Expression des Wachstumsfaktors bFGF am Wundrand (Abb. 17).

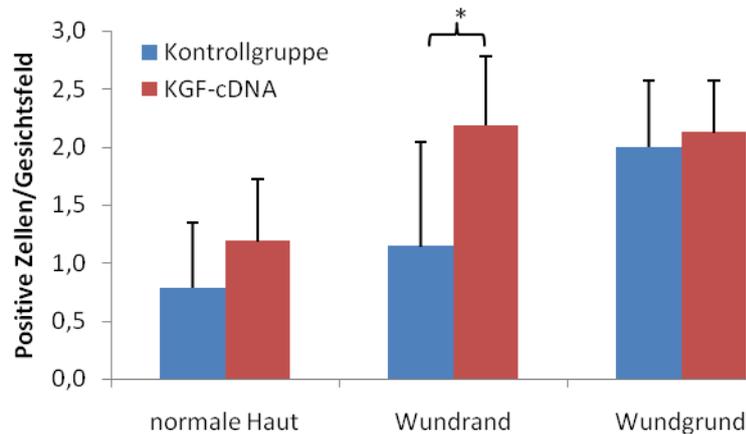


Abb. 17: Immunhistochemischer Nachweis bFGF-positiver Zellen (positive Zellen/Gesichtsfeld) in KGF cDNA behandelten Tieren versus Kontrollen (Behandlung mit Liposomen). n = 7 pro Gruppe, Fehlerbalken: SD. \*: p < 0,05.

### 3.4.5 TGF- $\beta$

Auf die Zahl der TGF- $\beta$ -positiven Zellen hatte die KGF-cDNA-Behandlung keinen statistisch signifikanten Einfluss. Im Wundgrund schienen die behandelten Tiere weniger TGF- $\beta$ -positive Zellen zu besitzen als die unbehandelten Tiere, der Unterschied erreichte aber keine statistische Signifikanz (p = 0,13 behandelt vs. Kontrollgruppe, Abb. 18).

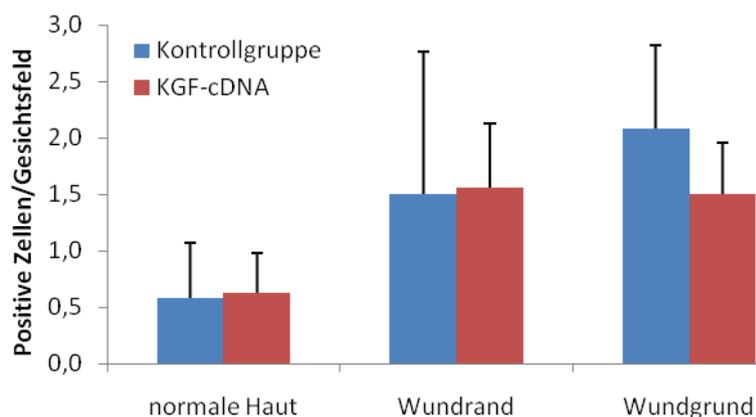


Abb. 18: Immunhistochemischer Nachweis TGF- $\beta$ -positiver Zellen (positive Zellen/Gesichtsfeld) in KGF cDNA behandelter Tiere versus Kontrollen (Behandlung mit Liposomen). n = 7 pro Gruppe, Fehlerbalken: SD.

### 3.4.6 PDGF

Die Expression von PDGF war in Behandlungs- und Kontrollgruppe nicht unterschiedlich, weder in unverletzter Haut noch am Wundrand oder im Wundgrund (Abb. 19).

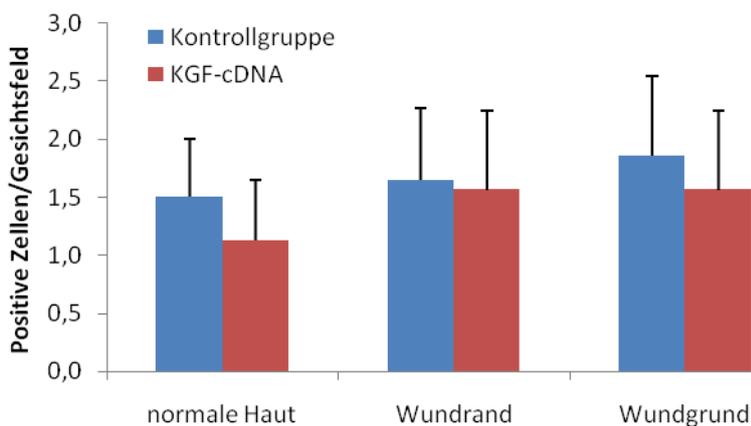
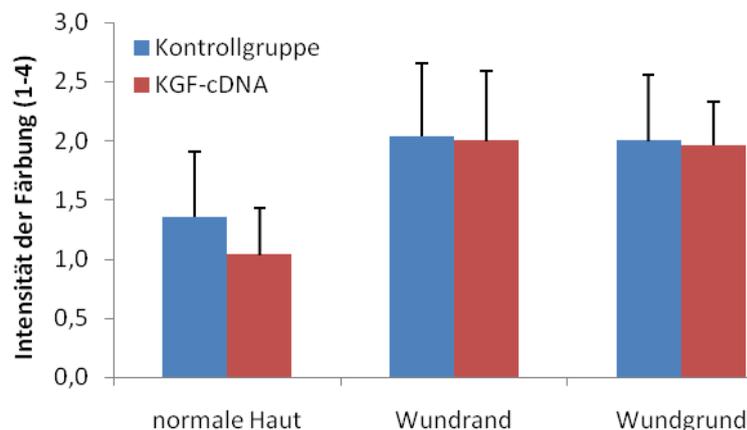


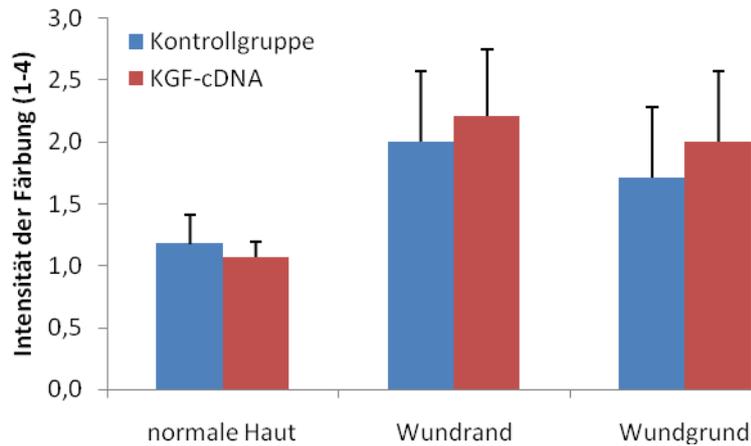
Abb. 19: Immunhistochemischer Nachweis PDGF-positiver Zellen (positive Zellen/Gesichtsfeld) in KGF cDNA behandelter Tiere versus Kontrollen (Behandlung mit Liposomen). n = 7 pro Gruppe, Fehlerbalken: SD.

### 3.5 Kollagen I, III und IV

Um weitere Informationen über den Heilungsverlauf der Wunden zu erhalten, wurde der Gehalt an drei wichtigen Kollagen-Typen in den Wunden bestimmt. Tatsächlich repräsentieren Kollagene die wichtigste strukturgebende Komponente der Extrazellulärmatrix, die sich zu reißfesten Fasern zusammenlagern kann. Gleichzeitig übermitteln Kollagene im Rahmen der Reepithelisierung hier insbesondere Kollagen IV, migratorische Signale an angeheftete Keratinozyten. Die Versuchsdaten verdeutlichen, dass die Menge an Kollagen I (Abb. 20) und III (Abb. 21) in den mit KGF-cDNA behandelten Ratten und den Kontrolltieren nicht signifikant verschieden war, weder in unverletzter Haut noch am Wundrand oder im Wundgrund.

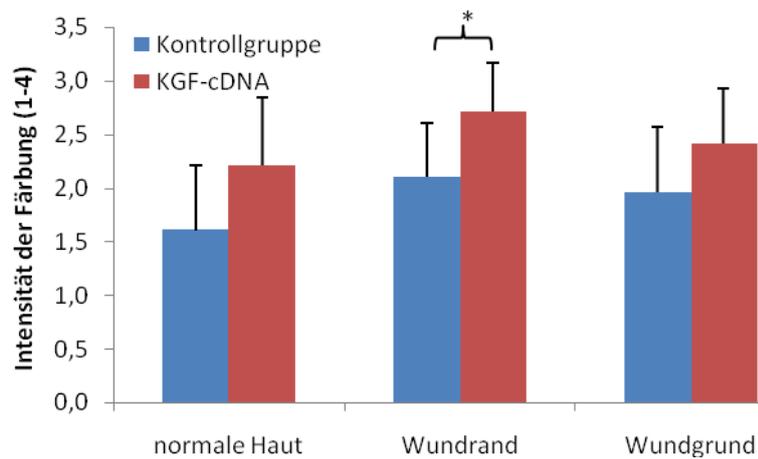


**Abb. 20:** Immunhistochemischer Nachweis Kollagen I-positiver Zellen (positive Zellen/Gesichtsfeld) in KGF cDNA behandelte Tiere versus Kontrollen (Behandlung mit Liposomen). n = 7 pro Gruppe, Fehlerbalken: SD.

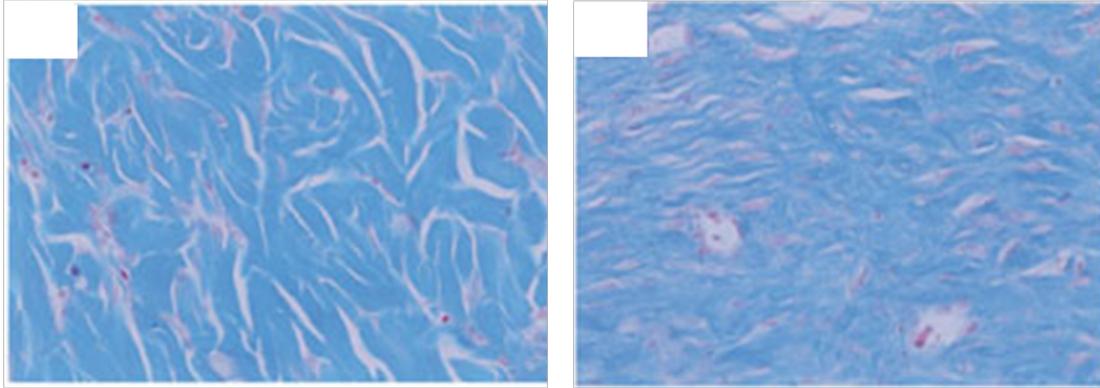


**Abb. 21:** Immunhistochemischer Nachweis Kollagen III-positiver Zellen (positive Zellen/Gesichtsfeld) in KGF cDNA behandelte Tiere versus Kontrollen (Behandlung mit Liposomen). n = 7 pro Gruppe, Fehlerbalken: SD.

Kollagen IV war dagegen in der mit KGF-cDNA behandelten Gruppe am Wundrand signifikant erhöht ( $P < 0,05$ , Abb. 22, siehe auch Abb. 23).



**Abb. 22:** Immunhistochemischer Nachweis Kollagen IV-positiver Zellen (positive Zellen/Gesichtsfeld) in KGF cDNA behandelte Tiere versus Kontrollen (Behandlung mit Liposomen). n = 7 pro Gruppe, Fehlerbalken: SD. \*:  $p < 0,05$ .



**Abb. 23:** Repräsentative Photographie von Gewebeproben nach immunhistochemischer Anfärbung der Kollagenfasern. Linke Abbildung: Mit KGF cDNA behandelte Tiere, rechte Abbildung: Kontrolltiere (Behandlung mit Liposomen). In mit KGF cDNA behandelten Tieren lässt sich Kollagen intensiv anfärben. Die Struktur ist gekräuselt, gerundet. In den Kontrolltieren ist die Anfärbung schwächer. Die Struktur ist linear ausgerichtet. Vergrößerung jeweils x200.

Zusammenfassend dokumentieren die Daten, dass sich im Rattenmodell eine Transfektion mit KGF-cDNA erfolgreich durchführen lässt. Die Genmodifikation bewirkte nicht nur eine verstärkte KGF, sondern auch eine gesteigerte IGF-I-Proteinsynthese. Auch der Wachstumsfaktor bFGF konnte verstärkt in den transfizierten Tieren nachgewiesen werden. Eine daraus resultierende Zunahme der proliferativen Aktivität epithelialer Zellen, gekoppelt mit einer erhöhten Kollagen IV-Synthese, führte letztendlich zu einer verbesserten Wundheilung in Tieren mit induzierter thermischen Verletzung.

## 4 Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse konnten nun an der Universität zu Lübeck folgend ausgewertet werden.

Die möglichst schnelle Wiederherstellung eines intakten Epithels sowie der Dermis nach einer Verletzung, besonders einer Brandverletzung, ist von größter therapeutischer Bedeutung, um Mortalität und Morbidität zu reduzieren und eine rasche Heilung anzustreben [17]. Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um die Anwendbarkeit eines nonviralen Gentransfers von KGF-cDNA zur Verbesserung der Heilung von Verbrennungswunden zu untersuchen. Als Modell wurde eine Verbrühung dritten Grades bei der Ratte gewählt.

Die Konzentration auf KGF-cDNA basierte auf der nachgewiesenen positiven Wirkung von KGF auf die Reepithelisierung von Wunden im Tiermodell [45]. Durch Gabe des KGF in Form eines cDNA-Gentransfers sollte zum einen die grundsätzliche Machbarkeit des KGF-Gentransfers in dieser Form gezeigt werden und zum anderen die bei Gabe des KGF-Proteins zu erwartenden Nebenwirkungen durch die bei dieser Methode notwendigen supraphysiologischen Dosen (s. 1.1.5) vermieden werden. Durch Verwendung eines nonviralen Systems zum Gentransfer wurden viele der mit viralen Transfektionssystemen assoziierten Risiken und Nachteile (s. 1.1.5) vermieden.

Es konnte gezeigt werden, dass der liposomale KGF-cDNA-Gentransfer im hier verwendeten Rattenmodell zu einer Erhöhung der KGF-Proteinmenge führt (siehe Abb. 2). Dies deutet darauf hin, dass A) das transferierte Gen erkannt und in den zellulären Transkriptions- und Translationsprozess integriert und B) die physiologische Wirkung des KGF-Gens imitiert wurde.

In der Tat führte der KGF-Gentransfer zu einer deutlichen Beschleunigung der Reepithelisierung der Wunde (siehe Abb. 4-6). Ein Grund für die verstärkte Reepithelisierung war in der Stimulation der Keratinozyten zu sehen, die sich zum einen in einer deutlich erhöhten Proliferationsrate (siehe Abb. 7 + 8) und zum anderen in einer deutlich verminderten Apoptose äußerte (siehe Abb. 9 + 10).

Auf der Suche nach einer Erklärung für die verbesserte Wundheilung aufgrund der KGF-Therapie wurde in nachfolgenden Experimenten die Interaktion zwischen

KGF und anderen, für die Wundheilung relevanten epithelialen und mesenchymalen Wachstumsfaktoren, untersucht.

Die Mengen von synthetisiertem IGF-I (siehe Abb. 13 + 14) und seinem Rezeptor IGFBP-3 (siehe Abb. 15 + 16) waren im Wundgrund erhöht, während die Menge an freigesetztem bFGF am Wundrand der Behandlungsgruppe anstieg (siehe Abb. 17). IGF-I beschleunigt die Wundheilung von akuten und chronischen Wunden [18, 31, 50]. Es hat mitogene Effekte auf Keratinozyten. Folglich kann die nachgewiesene erhöhte IGF-I-Konzentration ursächlich für die erhöhte Proliferationsrate der Keratinozyten verantwortlich zeichnen. Weitere Mechanismen sind zu diskutieren. So stimuliert IGF-I auch Fibroblasten, induziert die Kollagensynthese und verbessert die Zellerholung und Stabilität nach einer Verletzung. Alle diese Faktoren beschleunigen und verbessern die Wundheilung und die Wundmatrix [17, 18, 33]. Allerdings stimuliert IGF-I nicht die Migration von epithelialen Zellen.

Kritisch anzumerken bleibt, dass eine verstärkte IGF-I-Synthese [51] und/oder verstärkte Signalaktivität IGF-relevanter Wachstumsrezeptoren zu einer überschießenden Induktion des Zellwachstums im Sinne einer Hyperplasie bis hin zur Tumorgenese führen kann [52].

Interessanterweise scheint der IGFBP-3 Serumspiegel negativ mit der Progression des malignen Melanoms assoziiert zu sein [53], so dass hier kompensatorische Mechanismen spekulativ in Betracht zu ziehen sind. Inwieweit ein Ungleichgewicht zwischen IGF-I und IGFBP-3 Synthese in der Tat zu einer epithelialen-mesenchymalen Transition führt, muss Gegenstand nachfolgender Langzeitstudien bleiben.

Die erhöhte Expression des IGF-Rezeptors IGFBP-3 könnte parakrin durch die erhöhte IGF-Konzentration hervorgerufen worden sein, ähnlich, wie es bei einer Gentherapie mit IGF-I-cDNA beobachtet wurde [54].

Frühere Studien haben gezeigt, dass IGF-I über die Stimulation von Makrophagen und Endothelzellen die bFGF-Bildung erhöht, was die erhöhten bFGF-Werte in der Behandlungsgruppe erklären könnte [18, 32, 50, 54]. Erhöhte bFGF-Werte führen zu einer verstärkten Angiogenese und Fibroblastenproliferation [40].

Die durch die KGF-cDNA ausgelöste erhöhte Expression von IGF-I und IGF-BP-3 trägt möglicherweise durch eine positive Rückkopplung zu einer verstärkten KGF-Produktion der Fibroblasten bei. Eine zusätzliche Assoziation mit einer Erhöhung von bFGF durch Stimulation von Makrophagen am Wundrand ist denkbar. Durch die Freisetzungskaskade werden die Reepithelisierung, die Angiogenese und die Proliferation von Fibroblasten angeregt, was zu einer allgemeinen Beschleunigung der Wundheilungsvorgänge beiträgt.

Die ebenfalls in dieser Studie untersuchten Zytokine PDGF und TGF- $\beta$  waren weder in unverletzter Haut noch am Wundrand oder im Wundgrund signifikant angestiegen. PDGF ist ein wirksamer mitogener, chemotaktischer und angiogener Faktor. Er ist einer der ersten Wachstumsfaktoren, die in der akuten Wunde freigesetzt werden und wird von Thrombozyten im Blutgerinnsel gebildet [19]. PDGF ist weit an der Spitze der auf eine Gewebsverletzung folgenden Signal- und Reaktionskaskade lokalisiert [43], was eine Erklärung für den fehlenden Einfluss der cDNA des erst auf einer späteren Ebene eingreifenden KGF auf PDGF sein könnte. PDGF stimuliert über seine starke chemotaktische Wirkung die Migration von Monozyten und T-Zellen in der frühen Entzündungsphase nach einer akuten Verletzung. Dass die Behandlung mit KGF-cDNA nicht zu einem Anstieg der PDGF-Werte führte, ist von Vorteil, da die Wundheilung durch eine PDGF-induzierte stärkere Entzündung behindert würde. TGF- $\beta$  stimuliert die Synthese von Kollagen I, II, III und VII [55, 56]. Auch die nicht erhöhte TGF- $\beta$ -Menge ist daher für die geordnete Wundheilung insofern von Vorteil, als eine verstärkte Narbenbildung vermieden wird.

Die Expression von Kollagen I und III zeigte keine Unterschiede zwischen der Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe (siehe Abb. 20 + 21). Interessanterweise war aber Kollagen IV in dieser Studie in der mit KGF-cDNA behandelten Gruppe erhöht, am Wundrand statistisch signifikant (siehe Abb. 22). Kollagen IV ist ein wichtiger Bestandteil aller Basalmembranen. Wenn Keratinozyten auf Kollagengelen ohne Fibroblasten kultiviert werden, bilden sie keine erkennbare Basalmembran; in Gegenwart von Fibroblasten wird dagegen eine dermal-epidermale Verbindung ähnlich wie in der Haut aufgebaut [42]. Ein Teil der Fibroblasten in der Region um die sich bildende Basalmembran synthetisiert ebenso wie basal liegende Keratinozyten Kollagen IV und Kollagen

VII. Dieser Zusammenhang ist als Hinweis darauf zu werten, dass die Synthese der Grenzschicht zwischen Dermis und Epidermis von Komponenten aus beiden Zelltypen abhängt. Die hier vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass KGF direkt zumindest basale Keratinozyten, vielleicht auch beide, Keratinozyten als auch Fibroblasten, zur erhöhten Synthese von Kollagen IV stimuliert. Es ist allerdings auch möglich, dass die schnellere Reepithelisierung in der Behandlungsgruppe der Grund für die erhöhten Kollagen-IV-Werte ist. Eine umfassende immunhistochemische Analyse von normalem und erkranktem Gewebe hat ergeben, dass eine Hauptfunktion von Kollagen IV die Stabilisierung der Basalmembran ist und dass es das „Rückgrat“ der Basalmembran bildet und somit ihr mechanische Stabilität verleiht [19]. Die durch Gabe der KGF-cDNA erhöhten Werte von Kollagen IV am Wundrand könnten entsprechend zu einer erhöhten Reißfestigkeit der Wunde führen. Die unveränderten Mengen von Kollagen I und III und die erhöhte Kollagen-IV-Menge sind Zeichen für eine verbesserte Bildung der Basalmembran ohne pathologische Narbenbildung in dieser Wundheilungsphase.

Insgesamt lässt sich aus der hier vorgelegten Studie ableiten, dass mittels KGF-cDNA eine beschleunigte Reepithelisierung, die Förderung der Basalmembransynthese und die gleichzeitige Vermeidung übermäßiger Narbenbildung nach schweren Verbrennungsschäden initiiert werden kann. Einschränkend ist jedoch hinzuzufügen, dass die hier getroffenen Aussagen auf einem Rattenmodell mit zugefügten Verbrennungen dritten Grades beruhen. Weitere Studien sind notwendig, um die Möglichkeit der Gabe von KGF-cDNA in der Therapie von Brandwunden zu evaluieren.

Neben der therapeutisch induzierten verstärkten Wundheilung bei Verbrennungen ist ein weiteres Einsatzgebiet der KGF-cDNA Transfektion zu diskutieren. Im Bereich der Zahn-, Mund und Kieferchirurgie wird der Einsatz von thrombozytenreichem Plasma (PRP) als Unterstützung für eine verbesserte Wundheilung und Knochenneubildung aus Augmentaten diskutiert [57]. Dennoch ist ein solcher Einsatz umstritten, da Wundheilungsstörungen oftmals eine chirurgische Wundrevision erfordern. Daraus ergibt sich deduktiv folgende Hypothese: Kann eine KGF-cDNA getränkte Membran einen chirurgisch bedingten Schleimhautdefekt zu einer accellerierten und reizloseren Abheilung führen?

Als Membran könnte zum Beispiel eine porcine Kollagenmembran mit einer natürlichen Bilayer-Struktur fungieren (Geistlich Biomaterials Vertriebsgesellschaft mbH). Zur Verifizierung der hier aufgestellten Hypothese sind jedoch detaillierte Studien notwendig.

## **5 Zusammenfassung**

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob eine Behandlung von Verbrennungswunden mit der in Liposomen verabreichten cDNA des Wachstumsfaktors *Keratinocyte Growth Factor* (KGF) positive Effekte auf die Wundheilung ausübt. Zu diesem Zweck wurden Ratten nach Setzen einer akuten Verbrühungswunde dritten Grades in zwei Gruppen aufgeteilt, die wöchentliche Injektionen von entweder Liposomen mit dem Lac-Z-Gen oder Liposomen mit KGF-cDNA und dem Lac-Z-Gen erhielten. Mit histologischen und immunhistochemischen Methoden wurden Zellproliferation und Apoptose, die Expression von Wachstumsfaktoren und Kollagenen sowie die dermale und epidermale Struktur untersucht.

Die Injektion liposomaler KGF-cDNA-Komplexe führte zu einer deutlichen Beschleunigung der Reepithelisierung. Außerdem wurde gezeigt, dass KGF mit anderen Wachstumsfaktoren interagiert, die wesentlich für die Regeneration von Dermis und Epidermis verantwortlich zeichnen. KGF führte zu einer Erhöhung der Konzentrationen von IGF-I, IGFBP-3 und bFGF. Außerdem wurde eine verstärkte Synthese von Kollagen IV beobachtet. Dieser Anstieg könnte zusammen mit dem erhöhten Proliferations/Apoptose-Verhältnis die Erklärung für die verstärkte Reepithelisierung durch KGF während der Wundheilung sein. Die Behandlung mit KGF-cDNA führte nicht zu verstärkter Narbenbildung oder Entzündung, was durch die unveränderten Konzentrationen von TGF- $\beta$ , PDGF und Kollagen I und III in der Wunde gezeigt wurde.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Behandlung mit KGF-cDNA die Wundheilung über direkte und indirekte Effekte verbessert, ohne dass es zu pathologischer Narbenbildung kommt. Weitere Studien sind jedoch notwendig, um die Bedeutung für die klinische Anwendung im Detail herauszuarbeiten.

## 6 Literaturverzeichnis

1. **Auböck, J.** Biologie der Wundheilung. [Hrsg.] T Wild und J Auböck. Manual der Wundheilung: Chirurgisch-dermatologischer Leitfaden der modernen Wundbehandlung. Wien: Springer, 2007, S. 1-10.
2. **Moll I.** Dermatologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York; 2005.
3. **Herndon, D.** Total Burn Care. W.B. Saunders, 4th edition, 2012.
4. **Werner S, Smola H, Liao X, Longaker MT, Krieg T, Hofschneider PH, Williams LT.** The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. Science. 1994; 266: 819-22.
5. **DGV, Deutsche Gesellschaft für Verbrennungsmedizin.** Leitlinien für Chemisch/Thermische Verletzungen. Deutsche Gesellschaft für Verbrennungsmedizin DGV. [Online] [Zitat vom: 18. 11 2008.] [http://www.verbrennungsmedizin.de/leitlinien\\_2.htm](http://www.verbrennungsmedizin.de/leitlinien_2.htm).
6. **Statistisches Bundesamt und DGV, Deutsche Gesellschaft für Verbrennungsmedizin.** Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Verbrennungsmedizin zur Rehabilitation Brandverletzter. [Online] [Zitat vom: 18. 11 2008.] [http://www.verbrennungsmedizin.de/leitlinien\\_3.htm](http://www.verbrennungsmedizin.de/leitlinien_3.htm).
7. **Pierre E, Herndon DN, Barrow RE.** Growth hormone therapy in the treatment of burns. [Hrsg.] M.H. Torosian. Growth hormone in critical illness: research and clinical studies. Texas: R.G. Landes Co., 1996, S. 105-116.
8. **Meyer NA, Barrow RE, Herndon DN.** Combined insulin-like growth factor-1 and growth hormone improves weight loss and wound healing in burned rats. J Trauma. 1996; 41: 1008-12.
9. **Herndon DN, Barrow RE, Rutan RL, Rutan TC, Desai MH, Abston S.** A comparison of conservative versus early excision. Therapies in severely burned patients. Ann Surg. 1989 May;209(5):547-53.
10. **Rodriguez JL, Miller CG, Garner WL, Till GO, Guerrero P, Moore NP, CorridoreM, Normolle DP, Smith DJ, Remick DG.** Correlation of the local and systemic cytokine response with clinical outcome following thermal injury. J Trauma. 1993; 34: 684-95.

11. **Zaizen Y, Ford EG, Costin G, Atkinson JB.** The effect of perioperative exogenous growth hormone on wound bursting strength in normal and malnourished rats. *J Pediatr Surg.* 1990; 25: 70-4.
12. **Gore DC, Honeycutt D, Jahoor F, Wolfe RR, Herndon DN.** Effect of exogenous growth hormone on whole-body and isolated-limb protein kinetics in burned patients. *Arch Surg.* 1991; 126: 38-43.
13. **Herndon DN, Barrow RE, Kunkel KR, Broemeling L, Rutan RL.** Effects of recombinant human growth hormone on donor-site healing in severely burned children. *Ann Surg.* 1990; 212: 424-31.
14. **Martin P.** Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 1997; 276: 75-81.
15. **Steenfos HH.** Growth factors and wound healing. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1994; 28: 95-105.
16. **Kanzler MH, Gorsulowsky DC, Swanson NA.** Basic mechanisms in the healing cutaneous wound. *J Dermatol Surg Oncol.* 1986;12:1156-64.
17. **Singer AJ, Clark RA.** Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999;341:738-46.
18. **Bondy CA, Underwood LE, Clemmons DR, Guler HP, Bach MA, Skarulis M.** Clinical uses of insulin-like growth factor I. *Ann Intern Med.* 1994;120:593-601.
19. **Branski LK, Masters OE, Herndon DN, Mittermayr R, Redl H, Traber DL, Cox RA, Kita K, Jeschke MG.** Pre-clinical evaluation of liposomal gene transfer to improve dermal and epidermal regeneration. *Gene Ther.* 2010;17:770-8.
20. **Jeschke MG, Herndon DN.** The combination of IGF-I and KGF cDNA improves dermal and epidermal regeneration by increased VEGF expression and neovascularization. *Gene Ther.* 2007;14:1235-42.
21. **Branski LK, Pereira CT, Herndon DN, Jeschke MG.** Gene therapy in wound healing: present status and future directions. *Gene Ther.* 2007;14:1-10.
22. **Friedmann T.** Overcoming the obstacles to gene therapy. *Sci Am.* 1997;276:96-101.

23. **Felgner PL.** Nonviral strategies for gene therapy. *Sci Am.* 1997; 276: 102-6.
24. **Felgner PL, Tsai YJ, Sukhu L, Wheeler CJ, Manthorpe M, Marshall J, Cheng SH.** Improved cationic lipid formulations for in vivo gene therapy. *Ann N Y Acad Sci.* 1995; 772: 126-39.
25. **Felgner PL.** Improvements in cationic liposomes for in vivo gene transfer. *Hum Gene Ther.* 1996; 7: 1791-3.
26. **Wheeler CJ, Felgner PL, Tsai YJ, Marshall J, Sukhu L, Doh SG, Hartikka J, Nietupski J, Manthorpe M, Nichols M, Plewe M, Liang X, Norman J, Smith A, Cheng SH.** A novel cationic lipid greatly enhances plasmid DNA delivery and expression in mouse lung. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93: 11454-9.
27. **Filion MC, Phillips NC.** Anti-inflammatory activity of cationic lipids. *Br J Pharmacol.* 1997; 122: 551-7.
28. **Jeschke MG, Barrow RE, Perez-Polo JR, Herndon DN.** Attenuation of the acute-phase response in thermally injured rats by cholesterol-containing cationic liposomes used as a delivery system for gene therapy. *Arch Surg.* 1999; 134: 1098-102.
29. **Noguchi A, Furuno T, Kawaura C, Nakanishi M.** Membrane fusion plays an important role in gene transfection mediated by cationic liposomes. *FEBS Lett.* 1998; 433: 169-73.
30. **Caplen NJ, Alton EW, Middleton PG, Dorin JR, Stevenson BJ, Gao X, Durham SR, Jeffery PK, Hodson ME, Coutelle C, et al.** Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nat Med.* 1995; 1: 39-46.
31. **Jeschke MG, Barrow RE, Hawkins HK, Yang K, Hayes RL, Lichtenbelt BJ, Perez-Polo JR, Herndon DN.** IGF-I gene transfer in thermally injured rats. *Gene Ther.* 1999; 6: 1015-20.
32. **Jeschke MG, Barrow RE, Hawkins HK, Chrysopoulo MT, Perez-Polo JR, Herndon DN.** Effect of multiple gene transfers of insulinlike growth factor I complementary DNA gene constructs in rats after thermal injury. *Arch Surg.* 1999; 134: 1137-41.

33. **Jeschke MG, Barrow RE, Hawkins HK, Tao Z, Perez-Polo JR, Herndon DN.** Biodistribution and feasibility of non-viral IGF-I gene transfers in thermally injured skin. *Lab Invest.* 2000; 80: 151-8.
34. **Lasic, D.D.** Liposomes in gene delivery. *Liposomes in Gene Delivery.* New York: CRC Press, 1997, S. 189-197.
35. **Miller CR, Bondurant B, McLean SD, McGovern KA, O'Brien DF.** Liposome-cell interactions in vitro: effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes. *Biochemistry.* 1998; 37: 12875-83.
36. **Rubin JS, Osada H, Finch PW, Taylor WG, Rudikoff S, Aaronson SA.** Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86: 802-6.
37. **Finch PW, Rubin JS, Miki T, Ron D, Aaronson SA.** Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science.* 1989; 245: 752-5.
38. **Smola H, Thiekötter G, Fusenig NE.** Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal-dermal cell interaction. *J Cell Biol.* 1993; 122: 417-29.
39. **Winkles JA, Alberts GF, Chedid M, Taylor WG, DeMartino S, Rubin JS.** Differential expression of the keratinocyte growth factor (KGF) and KGF receptor genes in human vascular smooth muscle cells and arteries. *J Cell Physiol.* 1997; 173: 380-6.
40. **Werner S.** Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998; 9: 153-65.
41. **Beer HD, Gassmann MG, Munz B, Steiling H, Engelhardt F, Bleuel K, Werner S.** Expression and function of keratinocyte growth factor and activin in skin morphogenesis and cutaneous wound repair. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2000; 5: 34-9.
42. **Werner S, Peters KG, Longaker MT, Fuller-Pace F, Banda MJ, Williams LT.** Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89: 6896-900.

43. **Marinkovich MP, Keene DR, Rimberg CS, Burgeson RE.** Cellular origin of the dermal-epidermal basement membrane. *Dev Dyn.* 1993; 197: 255-67.
44. **Werner S, Smola H, Liao X, Longaker MT, Krieg T, Hofschneider PH, Williams LT.** The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science.* 1994; 266: 819-22.
45. **Staiano-Coico L, Krueger JG, Rubin JS, D'limi S, Vallat VP, Valentino L, Fahey T 3rd, Hawes A, Kingston G, Madden MR, et al.** Human keratinocyte growth factor effects in a porcine model of epidermal wound healing. *J Exp Med.* 1993; 178: 865-78.
46. **Jimenez PA, Rampy MA.** Keratinocyte growth factor-2 accelerates wound healing in incisional wounds. *J Surg Res.* 1999; 81:238-42.
47. **Herndon DN, Wilmore DW, Mason AD Jr.** Development and analysis of a small animal model simulating the human postburn hypermetabolic response. *J Surg Res.* 1978; 25: 394-403.
48. **Jeschke MG, Herndon DN, Baer W, Barrow RE, Jauch KW.** Possibilities of non-viral gene transfer to improve cutaneous wound healing. *Curr Gene Ther.* 2001;1:267-78.
49. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals,** Eighth Edition. National Academies Press, Washington 2011.
50. **Humbel RE.** Insulin-like growth factors I and II. *Eur J Biochem.* 1990; 190: 445-62.
51. **Le Coz V, Zhu C, Devocelle A, Vazquez A, Boucheix C, Azzi S, Gallerne C, Eid P, Lecourt S, Giron-Michel J.** IGF-1 contributes to the expansion of melanoma-initiating cells through an epithelial-mesenchymal transition process. *Oncotarget.* 2016, im Druck.
52. **Wang J, Sinnberg T, Niessner H, Dölker R, Sauer B, Kempf WE, Meier F, Leslie N, Schittek B.** PTEN regulates IGF-1R-mediated therapy resistance in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015; 28: 572-89.
53. **Panasiti V, Naspi A, Devirgiliis V, Curzio M, Roberti V, Curzio G, Gobbi S, Calvieri S, Londei P.** Correlation between insulin-like growth factor binding

- protein-3 serum level and melanoma progression. *J Am Acad Dermatol.* 2011; 64: 865-72.
54. **Jeschke MG, Schubert T, Klein D.** Exogenous liposomal IGF-I cDNA gene transfer leads to endogenous cellular and physiological responses in an acute wound. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004; 286: R958-66.
55. **Penttinen RP, Kobayashi S, Bornstein P.** Transforming growth factor beta increases mRNA for matrix proteins both in the presence and in the absence of changes in mRNA stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85: 1105-8.
56. **Ryynänen J, Sollberg S, Olsen DR, Uitto J.** Transforming growth factor-beta up-regulates type VII collagen gene expression in normal and transformed epidermal keratinocytes in culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 180: 673-80.
57. **Florian Bauer** [www.edoc.ub.uni-muenchen.de/2897/1/Bauer\\_Florian.pdf](http://www.edoc.ub.uni-muenchen.de/2897/1/Bauer_Florian.pdf)

## 7 Abkürzungsverzeichnis

bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
cDNA	<i>copy-DNA</i>
CMV	Cytomegalovirus
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMRIE	1,2-Dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxyethylammoniumbromid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> )
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
IGF-I	<i>Insulin-like Growth Factor I</i>
KGF	<i>Keratinocyte Growth Factor</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate-buffered saline</i> )
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i>
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i> )
TdT	terminale Desoxynukleotidyl-Transferase
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>
TNF $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor <math>\alpha</math></i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VKOF	verbrannte Körperoberfläche

## 8 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Immunhistochemie. Anfärbung der Hautproben mit  $\beta$ -Galaktosidase S. 18
- Abb. 2: Immunhistochemie. Repräsentative Schnitte mit immunhistochemischer Färbung mit Antikörpern gegen KGF S. 19
- Abb. 3: Immunhistochemische Anfärbung der Hautproben mit gegen IGF-I gerichteten Antikörpern S. 19
- Abb. 4: Reepithelisierungsfläche in % der ursprünglichen Verbrennungsfläche S. 19
- Abb. 5: Lineare Reepithelisierung S. 21
- Abb. 6: Photographische Darstellung der Reepithelisierung nach KGF-cDNA-Liposomengabe S. 22
- Abb. 7: Proliferation in der Basalzellschicht und epithelialer Zunge S. 23
- Abb. 8 Immunhistochemische Färbung gegen den Zell-Proliferationsmarker Ki67 S. 24
- Abb. 9: Apoptose in Epithelzellen, Nachweis mit TUNEL-Verfahren S. 24
- Abb. 10: Immunhistochemischer Nachweis apoptotischer Vorgänge (TUNEL-Färbung) S. 24
- Abb. 11: Quantifizierung der Anzahl KGF-angefärbter Zellen S. 25
- Abb. 12: Immunhistochemischer Nachweis der KGF-Expression S. 26
- Abb. 13: IGF-I, immunhistochemischer Nachweis unter Verwendung IGF-I spezifischer Antikörper S. 27
- Abb. 14: Repräsentative Photographie von Gewebeproben nach immunhistochemischer Anfärbung gegen IGF-I S. 27
- Abb. 15: IGFBP-3, immunhistochemischer Nachweis unter Verwendung IGFBP-3 spezifischer Antikörper S. 28
- Abb. 16: Repräsentative Photographie von Gewebeproben nach immunhistochemischer Anfärbung gegen IGFBP-3 S. 28
- Abb. 17: Immunhistochemischer Nachweis bFGF-positiver Zellen S. 29
- Abb. 18: Immunhistochemischer Nachweis TGF- $\beta$ -positiver Zellen S. 30
- Abb. 19: Immunhistochemischer Nachweis PDGF-positiver Zellen S. 30
- Abb. 20: Immunhistochemischer Nachweis Kollagen I-positiver Zellen S. 31
- Abb. 21: Immunhistochemischer Nachweis Kollagen III-positiver Zellen S. 31
- Abb. 22: Immunhistochemischer Nachweis Kollagen IV-positiver Zellen S. 32
- Abb. 23: Repräsentative Photographie von Gewebeproben nach immunhistochemischer Anfärbung der Kollagenfasern S. 32

## **9 Lebenslauf von Roland Röcker**

**06.12.1969:** Geburt in Bietigheim-Bissingen in Baden-Württemberg

**Vater:** Dipl.- Bauingenieur Hans Röcker **Mutter:** Ida Röcker geb. Körner

**12.05.1989:** Abitur am Schlossgymnasium Künzelsau

**01.06.1989:** Grundwehrdienst in Tauberbischofsheim

**1990 SS** : Studium der Zahnmedizin an der Freien Universität Berlin

**06.03.1991:** Naturwissenschaftliche Vorprüfung

**06.12.1993:** Zahnärztliche Vorprüfung

**07.01.1994:** Stipendium SS 94 - WS 95 in Chile

**02.10.1998:** Zahnärztliche Prüfung an der Freie Universität Berlin

**02.10.1998:** Erhalt der zahnärztlichen Approbation

**01.02.1999 bis 30.04.2001:** Assistentenzeit bei Dr. Jünger in Lam

**28.06.1999:** Ernennung zum Stabsarzt d.R. der Bundeswehr

**01.05.2001:** Gründung Gemeinschaftspraxis mit Herrn Dr. Jünger in Lam

**15.10.2004:** Heirat mit Susanne Röcker geb. Kowalzik

**31.12.2004:** Auflösung der Gemeinschaftspraxis

**01.01.2005:** Niederlassung in eigener Kassenpraxis in Tübingen

**15.07.2005:** Geburt meines Sohnes Patrice Wilhelm

**05.05.2008:** Beorderung zum Oberstabsarzt d.R.

**30.06.2009:** Praxisabgabe in Tübingen an Dr. Bernhard Kolb

**01.07.2009:** Niederlassung in eigener Kassenpraxis in Wolfsburg

**01.09.2009:** Gutachter für den Medizinischen Dienst der Krankenkassen für das Land Niedersachsen und Land Bremen.

**01.07.2017** Kassengutachter der Kassenzahnärztlicher Vereinigung Niedersachsen.

Wolfsburg, den 07.11.2018 \_\_\_\_\_

## **10 Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

---

**Roland Röcker**

## **11 Teilpublikationen**

Pereira CT, Herndon DN, Rocker R, Jeschke MG. Liposomal gene transfer of keratinocyte growth factor improves wound healing by altering growth factor and collagen expression. *J Surg Res.* 2007 139(2): 22-228.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben. Insbesondere gilt mein Dank:

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. med. Diamant Thaçi

Frau Dr. Schlüter für die betreuende Unterstützung beim Verfassen der Arbeit in Lübeck.

Herrn PD Dr. med. Marc G. Jeschke für die Überlassung des hochinteressanten Themas und die fachliche Unterstützung bei der Durchführung der Experimente in Regensburg.

Herrn Prof. Dr. med. Thomas Schubert für fachliche Unterstützung in Regensburg.

Frau Carolin Guhr für die Einführung in die verwendeten Methoden in Regensburg.

Mein besonderer Dank gilt meiner geliebten und hochgeschätzten Frau Susanne, die immer ein offenes Ohr für mich hatte und mich stets unterstützte.