

Aus der
Universitätsklinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie Tübingen

**Verringerung pathogenetischer Prozesse
in der Gefäßwand durch eine siRNA freisetzende
Polymerbeschichtung**

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

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

vorgelegt von

Zengerle, Diane Silke

2019

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

Professor Dr. H.- P. Wendel

Privatdozent Dr. M. Schenk

Tag der Disputation:

21.01.2019

Gewidmet meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
<u>1 Einleitung</u>	<u>1</u>
1.1 Atherosklerose.....	1
1.1.1 PTCA.....	3
1.2 RNA-Interferenz (RNAi) und siRNAs	7
1.3 mRNA Transfektion und Wirkungen	9
1.4 Transfektionsmethoden.....	11
1.5 siRNA freisetzende Beschichtungen	12
1.6 Entzündungsmediatoren	16
1.7 Marker der Hämokompatibilität	18
1.8 Fragestellung	21
<u>2 Material und Methoden</u>	<u>22</u>
2.1 PLGAs	22
2.2 Zellkultur	22
2.2.1 Zelllinien.....	22
2.2.2 Zellkultivierung	23
2.2.2.1 Zellkulturmedium für EA.hy926	23
2.2.2.2 Zellkulturmedium für hVECs.....	23
2.2.2.3 Passagierung und Anzucht der Zellen.....	23
2.3 Chemikalien und Reagenzien.....	24

2.4	Geräte	30
2.5	Software	32
2.6	Verbrauchsmaterialien	32
2.7	Messverfahren	34
2.7.1	pH-Wertbestimmung	34
2.7.2	Zellzählssysteme	34
2.7.3	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	35
2.7.4	Fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie (engl. fluorescence-activated cell sorting = FACS)	36
2.7.5	RNA Isolierung und DNA-Synthese	38
2.7.6	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT- PCR).....	39
2.7.7	ELISA.....	41
2.8	Vorbereitung der Glasplättchen	42
2.9	Untersuchung des Einflusses der PLGA- Beschichtung auf den pH-Wert von Zellkulturmedium	42
2.9.1	Beschichtung der Glasplättchen mit PLGA.....	42
2.9.2	Inkubation des Zellkulturmediums	43
2.9.3	Messung des pH-Wertes	43
2.10	Untersuchung der Biokompatibilität der PLGA- Beschichtungen	44
2.10.1	Untersuchung des Einflusses von PLGA- Beschichtungen auf die Zellviabilität von EA.hy926 .	44
2.10.2	Untersuchung der Beschichtungen in Hinblick auf die inflammatorische Reaktion von hVECs	45
2.10.2.1	Komplexierung der siRNA mit Lipofectamine®2000	45

2.10.2.2	Beschichtung der Glasplättchen.....	45
2.10.2.3	Inkubation der Zellen.....	45
2.10.2.4	RNA-Extraktion der Zellen	46
2.10.2.5	dsRNA-Kontrollen	46
2.10.2.6	Messung der Expression von Entzündungsmediatoren mittels qRT-PCR....	46
2.10.3	Untersuchung der Hämokompatibilität von PLGA- Beschichtungen.....	47
2.10.3.1	Blutentnahme.....	47
2.10.3.2	Inkubation des Blutes.....	47
2.10.3.3	Messung von Markern der Hämokompatibilität mittels ELISA	48
2.11	Untersuchung der Transfektionseffizienz von PLGA- siRNA-Beschichtungen.....	52
2.11.1	Komplexierung der siRNA AF 488 mit Lipofectamine®2000.....	52
2.11.2	Beschichtung der Glasplättchen mit PLGA und siRNA AF 488.....	53
2.11.3	Anzucht der Zellen.....	53
2.11.4	Inkubation der Zellen mit der PLGA-Beschichtung...	53
2.11.5	Messung der Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometer	54
2.12	Untersuchung der Verringerung der ICAM-1 Expression von Endothelzellen nach Kontakt mit PLGA-siRNA-Beschichtung	54
2.13	Untersuchung der Langzeitfreisetzung von siRNA aus einer mehrschichtig aufgebauten PLGA-siRNA- Beschichtung	55
2.13.1	Beschichtung der Glasplättchen mit PLGA und siRNA AF 488.....	55

2.13.2	Untersuchung der Langzeitfreisetzung.....	56
2.14	Kotransfektion von eGFPmRNA und siSCR-AF 555-siRNA57	
2.14.1	Komplexierung der mRNA und siRNA mit Lipofectamine®2000.....	57
2.14.2	Beschichtung der Glasplättchen	57
2.14.3	Anzucht der Zellen.....	57
2.14.4	Inkubation der Zellen mit der PLGA-Beschichtung...	57
2.14.5	Messung der Transfektionseffizienz	57
2.15	Statistische Auswertung.....	58
3	<u>Ergebnisse</u>	59
3.1	Untersuchung des Einflusses der PLGA-Beschichtung auf den pH-Wert von Zellkulturmedium	59
3.2	Untersuchung der Biokompatibilität der PLGA-Beschichtungen.....	60
3.2.1	Untersuchung des Einflusses von PLGA-Beschichtungen auf die Zellviabilität von EA.hy926.	61
3.2.2	Untersuchung der Beschichtungen in Hinblick auf die inflammatorische Reaktion von hVECs	62
3.2.3	Untersuchung der Hämokompatibilität der PLGA-Beschichtungen.....	67
3.3	Untersuchung der Transfektionseffizienz von PLGA-siRNA-Beschichtungen.....	71
3.4	Untersuchung der Verringerung der ICAM-1 Expression von EA.hy926 und hVECs nach Kontakt mit PLGA-siRNA-Beschichtung.....	72

3.5	Untersuchung der Langzeitfreisetzung von siRNA aus einer Multilayerbeschichtung.....	75
3.6	Kotransfektion von eGFPmRNA und siSCR-AF 555-siRNA	76
<u>4</u>	<u>Diskussion</u>	<u>78</u>
4.1	Allgemeine Anforderungen an die Beschichtung	78
4.2	Biokompatibilität der Polymere	79
4.3	RNA-Freisetzung aus Polymerbeschichtung.....	81
4.4	Ausblick und Weiterentwicklung der Beschichtungen	84
<u>5</u>	<u>Zusammenfassung.....</u>	<u>86</u>
<u>6</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>87</u>
<u>7</u>	<u>Erklärung zum Eigenanteil</u>	<u>94</u>
<u>8</u>	<u>Veröffentlichungen.....</u>	<u>95</u>
	Danksagung	96
	Curriculum vitae	97

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung von Stents und ihrer Komplikationen ..	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Rezeptor vermittelten Transmigration von Leukozyten.....	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Proteinsynthese und des Eingriffspunktes der RNAi.	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung der natürlich vorkommenden RNAi	9
Abbildung 5: Mögliche Inflammation und Koagulation von Vollblut im Kontakt mit PLGA	19
Abbildung 6: Versuchsaufbau der Messung der pH-Wertveränderung	43
Abbildung 7: Versuchsaufbau der Messung der Zellviabilität.....	44
Abbildung 8: Versuchsaufbau der Untersuchung der inflammatorische Reaktion von hVECs.....	47
Abbildung 9: Schema der Multilayerbeschichtung	56
Abbildung 10: Versuchsaufbau Langzeitfreisetzung siSCR AF 488.....	56
Abbildung 11: Ergebnis der pH-Wertbestimmung.....	60
Abbildung 12: Ergebnis der Bestimmung der relativen Lebendzellzahl von EA.hy926	61
Abbildung 13: Ergebnis der Bestimmung der relativen Viabilität von EA.hy926.	62
Abbildung 14: Ergebnis der Untersuchung der inflammatorische Reaktion von hVECs (1/4)	64
Abbildung 15: Ergebnis der Untersuchung der inflammatorische Reaktion von hVECs (2/4)	65
Abbildung 16: Ergebnis der Untersuchung der inflammatorische Reaktion von hVECs (3/4)	66
Abbildung 17: Ergebnis der Untersuchung der inflammatorische Reaktion von hVECs (4/4)	67
Abbildung 18: Ergebnis der Untersuchung der Hämokompatibilität der PLGA-Beschichtungen mittels Zellzahlbestimmung	69
Abbildung 19: Ergebnis der Untersuchung der Marker der Hämokompatibilität der PLGA-Beschichtungen mittels ELISA.....	70

Abbildung 20: Ergebnis der Untersuchung der Transfektionseffizienz von fluoreszenzmarkierter siRNA aus PLGA-Beschichtungen in EA.hy926	72
Abbildung 21: Ergebnis der Untersuchung der Expression von ICAM-1 in EA.hy926 und hVECs	74
Abbildung 22: Ergebnis der Langzeitfreisetzung von f(siRNA) aus 3mg PLGA-Beschichtungen	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nachgewiesene Entzündungsmediatoren in hVECs nach Kontakt mit PLGA	17
Tabelle 2: Verwendete PLGAs	22
Tabelle 3: Verwendete Zelllinien	23
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	24
Tabelle 5: Verwendete RNAs	27
Tabelle 6: Verwendete Primer bei qRT-PCR.....	28
Tabelle 7: Verwendete ELISA-Kits zur Messung der Marker der Hämokompatibilität.....	29
Tabelle 8: Verwendete Geräte	30
Tabelle 9: Verwendete Software	32
Tabelle 10: verwendete Verbrauchsmaterialien.....	32
Tabelle 11: Mengenangabe der Reagenzien für siRNA Komplexierung	53
Tabelle 12: Ergebnis der Kotransfektion von siRNA und mRNA in EA.hy926..	77

Abkürzungsverzeichnis

ACS	engl. acute coronary syndrome = akutes Koronarsyndrom
B7-2	Synonym CD86
BMS	(engl. bare metal stent)
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
CAMs	engl. cell adhesion molecules, dt. Zelladhäsionsmoleküle
cDNA	engl. Complementary DNA, dt. Komplementär DNA
CTAD	Tri-Natrium-Citrat
CVDs	engl. cardiovascular diseases, dt. Herz-Kreislauf-erkrankungen
CXLL-10	C-X-C-Motiv-Chemokin 10
CXLL-7	C-X-C-Motiv-Chemokin 7
CXLL-8	C-X-C-Motiv-Chemokin 8
DAPT	engl. dual antiplatelet therapy, dt. duale Thrombozytenaggregationshemmung
DES	engl. drug-eluting stent, dt. medikamentenfreisetzender Stent
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. deoxyribonucleic acid, dt. Desoxyribonukleinsäure
DPBS ⁻	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, ohne Calcium oder Magnesium
dsRNA	engl. Double stranded RNA , dt. doppelsträngige RNA
dt.	deutsch
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	engl. enhanced green fluorescent protein, dt. modifiziertes grün fluoreszierendes Protein
ELISA	engl. enzyme-linked immunosorbent assay, dt. antikörperbasiertes enzymatisches Immunnachweisverfahren
EMA	engl. European Medicines Agency, dt. Europäische Arzneimittel-Agentur

engl.	englisch
engl. E-selectin	E-Selektin
engl. P-Selectin	P-Selektin
engl. Well	Vertiefung
FACS	engl. fluorescence-activated cell sorting , dt. fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie
FCS	engl. fetal calf serum, dt. fetales Kälberserum
FDA	engl. Food and Drug Administration, dt. Behörde für Lebens- und Arzneimittel
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ggf.	gegebenenfalls
hVECs	engl. human venous endothelial cells, dt. humane venöse Endothelzellen
ICAM-1	engl. intercellular adhesion molecule 1
IE	Internationale Einheit
IFN α	Interferon α
IFN β	Interferon β
IFN γ	Interferon γ
Il-12	Interleukin-12
Il-1 β	Interleukin-1 β
Il-2	Interleukin-2
Il-6	Interleukin-6
Il-8	Interleukin-8
ISR	In-Stent-Restenose
max.	maximal
mRNA	engl. messenger RNA, dt. Boten-RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	arithmetischer Mittelwert
n=	Anzahl der Versuchsdurchläufe
NP	Nanopartikel (siRNA-Lipofectamine®2000-Komplexe)
OAS	2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase

PCR	engl. polymerase chain reaction, dt. Polymerase-Kettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PGA	engl. Poly glycolic acid, dt. Polyglycolid, Synonym Polyhydroxyessigsäure
PLA	engl. Poly lactic acid, dt. Polylactide, Synonym Polymilchsäure
PLGA	Poly-(D,L-lactide-co-glycolide acid)
PLGA 1	PLGA mit PLA:PGA 75:25, mit Säueendgruppe
PLGA 2	PLGA mit PLA:PGA 85:15, mit Esterendgruppe
PLGA 3	PLGA mit PLA:PGA 75:25, mit Esterendgruppe
PMN-Elastase	neutrophilen, engl. polymorphonuclear = PMN -Elastase
PTCA	Perkutane Transluminare Coronaren Angioplastie
qRT-PCR	engl. real-time quantitative PCR, dt. quantitative Echtzeit-PCR
RISC	engl. RNA-induced silencing complex
RNA	engl. ribonucleic acid, dt. Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	engl. rounds per minute, dt. Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SD	engl. standard deviation, dt. Standardabweichung
siEsel	siRNA gegen den Rezeptor E-Selektin
siICAM	siRNA gegen den Rezeptor ICAM-1
siRNA	engl. small interfering RNA, dt. kleine eingreifende RNA
siSCR	siRNA ohne Homologie
sog.	sogenannt
SOP	Standard Operation Procedure, dt. Standardvorgehensweise
STAT-1	Signal Transducers and Activators of Transcription 1
TAT	Thrombin/Antithrombin III-Komplex
TMB	Tetramethylbenzidin

TNF α	Tumornekrosefaktor α
tRNA	Transport RNA
v. a.	vor allem
VCAM-1	engl. vascular cell adhesion molecul-1
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel
α	Alpha
β	Beta
β Actin	Zytoplasmatisches β -Aktin
β -TG	β -Thromboglobulin
γ	Gamma

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

Herz-Kreislaufkrankungen (engl. cardiovascular diseases = CVDs) betreffen nahezu jeden - ob als Patient, Angehöriger oder Arzt. Bei weiter steigender Prävalenz gilt sie bereits als häufigste Todesursache weltweit mit 17,5 Millionen Tote im Jahr 2012 und prognostizierten 22,2 Millionen Todesfälle bis zum Jahr 2030 [WHO, 2016]. Die Hauptursache der CVDs ist mit Abstand die Arteriosklerose, neben angeborenen Herzfehlern, Kardiomyopathien und rheumatischen Herzerkrankungen [WHO et al., 2011]. Arteriosklerose bezeichnet allgemein eine Gefäßverhärtung, deren wichtigste Form die Atherosklerose darstellt. Ihr liegt eine endotheliale Dysfunktion zu Grunde, welche bspw. durch eine arterielle Hypertonie ausgelöst wird. Dabei kann es zu einer Einlagerung von Lipoproteinen in die Gefäßwand kommen und somit einen entzündlichen Prozess auslösen, welcher zu einer Adhäsion und Einwanderung von Monozyten aus dem Blut führt. Die Aktivierung und Umwandlung in Makrophagen wird ebenfalls durch die Entzündung ausgelöst. Beim Abbau der Lipoproteine kommt es zu einer starken Oxidierung und Aggregation der Fette sowie zu einer Aufnahme in die Makrophagen. Bei erhöhtem Aufkommen dieses Vorgangs werden die Makrophagen zu Schaumzellen umgewandelt, da sie die Lipoproteine nicht mehr genügend abbauen können. Dies löst weitere Entzündungsvorgänge aus und eine Lipidplaque entsteht, in die glatte Muskelzellen einwandern, sodass eine fibrinöse Plaque entsteht. Diese kann jedoch mit der Zeit instabil werden und rupturieren. In Folge dessen kommt es zu einer Thrombusbildung und zu einem Gefäßverschluss [Böcker, 2012].

Eine Gefäßverengung führt in Beinarterien zur peripheren arteriellen Verschlusskrankheit mit belastungsabhängigen Schmerzen in den Beinen. Wohingegen eine Gefäßverlegung durch Plaqueruptur und Thrombusbildung in cerebralen Arterien einen ischämischen Insult auslösen kann.

Einleitung

Die Manifestation der Arteriosklerose in den Herzkranzarterien nennt sich Koronare Herzkrankheit (KHK) und entsteht durch eine Lumeneinengung sowie der dadurch verursachten Flussminderung durch ein Missverhältnis des Sauerstoffangebots zum –verbrauch. Am Ende steht die hervorgerufene Myokardischämie mit ihren Manifestationsformen. Hierzu zählen 1.) die stabile Angina pectoris, welche infolge einer reversiblen Myokardischämie einen Thoraxschmerz v. a. bei Belastung auslöst, 2.) das akute Koronarsyndrom (engl. acute coronary syndrome = ACS), welches durch eine irreversible Myokardischämie unter anderem einen akuten Herzinfarkt hervorruft, 3.) eine ischämische Herzmuskelschädigung, welche z. B. bei langanhaltender progredienter KHK eine Herzinsuffizienz hervorruft, 4.) Herzrhythmusstörungen, 5.) als Endstadium den plötzlichen Herztod. Als Erstmanifestation der KHK zeigt sich mit 10 % der plötzliche Herztod als infauster Endpunkt. In den anderen Fällen kommt es in 40 % zu pectanginösen Beschwerden und in 50 % zu einem ACS [Herold, 2017]. Dabei ist, wie auch bei den anderen Manifestationsformen, eine durchblutungsfördernde Therapie zur Aufrechterhaltung der Herztätigkeit indiziert. Bei leichteren Formen hilft eine Änderung des Lebensstils, v. a. mit Anpassung der Diät, Raucherentwöhnung, Gewichtsnormalisierung, Senkung des Blutdrucks, optimale Einstellung eines Diabetes mellitus und körperliches Training. Wenn es jedoch zu einem Verschluss oder einem drohenden Verschluss der Koronarien kommt, ist sowohl als kurzfristige Therapie als auch als diagnostisches und interventionelles Mittel der Wahl, die Koronarangiografie mit ggf. einer Revaskularisation indiziert. Hier steht die Perkutane Transluminale Coronare Angioplastie (PTCA) oder eine operative Koronarrevaskularisation mittels aortokoronarer Bypassversorgung zur Verfügung, welche jedoch ein deutliches OP-Risiko birgt und als Voraussetzung anastomosierbare periphere Koronararterien mit geringer Koronarsklerose hat. Jedoch ist die Haltbarkeit der venösen Autograftprothesen beschränkt, was wiederum zu Verschlüssen führen kann, welche durch Revisionen behoben werden müssen [Walker et al., 2005]. Als letzte Möglichkeit steht die Herztransplantation zur Verfügung, welche jedoch durch eine geringe Spenderorganzahl und ein erhebliches OP-Risiko limitiert ist.

1.1.1 PTCA

Die am häufigsten gewählte Methode der Revaskularisation ist die erstmals 1978 durchgeführte PTCA [Gruntzig, 1978], welche die Entfernung des Thrombus mittels Thrombektomie (erstmals 1986), die Aufdehnung der Gefäßverengung mittels Ballon und die Einbringung eines Stents (erstmals 1987) ermöglicht, welcher die bei der Ballondilatation entstandene dissezierten Intima an die Gefäßwand anlegt und somit das Gefäß offen hält. Durch die eingeführte PTCA konnte das Sterblichkeitsrisiko, v. a. der unter 85-Jährigen, erheblich gesenkt werden [Löwel, 2006]. Ohne Stentimplantation zeigte sich eine hohe Restenoserate. Komplikationen der Stentimplantation sind jedoch eine In-Stent-Restenose (ISR) und Stent-Thrombose [Byrne et al., 2015].

Ein Stent besteht aus einem Edelstahlgeflecht, welches auf einen Ballon aufgebracht und in kollabiertem Zustand in das Gefäß eingebracht, in der Stenose dilatiert und freigesetzt wird. Die konventionellen unbeschichteten Stents, sog. BMS (engl. bare metal stent), können zwar den Blutfluss wieder ermöglichen, haben jedoch durch ihre thrombogene Oberfläche ein hohes Risiko für frühe Stent-Thrombosen und durch Auslösung einer Fremdkörperreaktion ein hohes Risiko für späte ISR (vgl. Abbildung 1).

Mit Gold oder Platin beschichtete Stents sollten der frühen Stent-Thrombose entgegenwirken, zeigten jedoch ebenfalls keine ausreichende Reduktion der Komplikationen [Choi et al., 2001]. Durch industrielles maschinelles crimpen, statt händischem crimpen der Stents auf Ballons, geändertem Design der Stents, chemische Entgratung der scharfen Metallkanten oder Änderungen der Metallmenge und Stentherstellung, sollte die Entzündungsreaktion vermindert werden. Doch auch dies zeigte keine ausreichende Reduktion der Komplikationen [Machraoui, 2001].

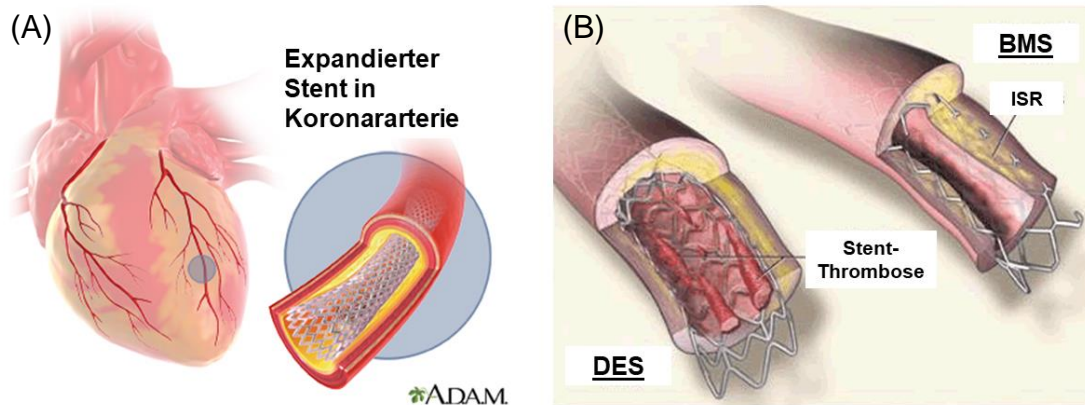


Abbildung 1: Schematische Darstellung von Stents und ihrer Komplikationen

(A) Schema eines expandierten Stents in einer Koronararterie (modifiziert nach [A.D.A.M., 2016]). (B) Schematischer Vergleich von medikamentenfreisetzendem Stent (engl. Drug eluting Stents = DES) und BMS mit ihren Komplikationen der ISR und der Stent-Thrombose (modifiziert nach [Sardi, 2006]).

Einer Stent-Thrombose wird medikamentös mit einer dualen Thrombozytenaggregationshemmung (engl. dual antiplatelet therapy = DAPT) mittels Aspirin und einem zusätzlichen Thrombozytenaggregationshemmer entgegengewirkt. In dieser Zeit sind das Blutungsrisiko und das Komplikationsrisiko stark erhöht [ESC, 2017]. In BMS zeigte sich eine ISR-Rate von 10-30 % durch Fremdkörperreaktion des Körpers bei fehlender Restauration des Gefäßes. Auch wenn sich die Therapie dieser Komplikationen mittels erneuter Ballondilatation und Applikation eines Stents im Stent verbessert hat [Siontis et al., 2015], so ist es doch wichtig, diese primär zu vermeiden.

Beim Applizieren eines Koronarstents kann es zu einer atherosklerotischen Plaqueruptur und einer Endothelverletzung kommen, welche eine Kaskade an Wundheilungsmechanismen in Gang setzt [Otsuka et al., 2012]. Neben der Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen, der Plättchenaggregation, der Freisetzung von Wachstumsfaktoren und der Neuorganisation der Extrazellulärmatrix, ist die Infiltration von inflammatorischen Zellen eine der ersten Reaktionen. Dies führt zu einer neointimalen Hyperplasie, welche das Gefäßlumen wieder einengen kann [Tahir et al., 2013]. Nach der Adhäsion von aktivierten Plättchen und Fibrin an der de-endothelialisierten Gefäßwand erfolgt eine Rekrutierung und Infiltration von Leukozyten durch das verletzte Endothel [Sluiter et al., 1993]. Das Endothel exprimiert hierzu vermehrt Zelladhäsionsmoleküle (engl.

Einleitung

cell adhesion molecules = CAMs), bspw. das für T-Lymphozyten spezifische Zelladhäsionsmolekül 1 (engl. intercellular adhesion molecule 1 = ICAM-1), das für Monozyten und Neutrophile spezifische P-Selektin, das für Monozyten und Granulozyten spezifische E-Selektin und das für Monozyten spezifische Zelladhäsionsmolekül VCAM-1 (engl. Vascular cell adhesion molecule-1) [Sluiter et al., 1993; Binnerts et al., 1994; Koedam et al., 1992; Koenig et al., 2017]. Selektine ermöglichen die Anheftung und Aktivierung von Immunzellen, während CAMs die Transmigration in das Gewebe bewirken (vgl. Abbildung 2) Zudem erfolgt eine Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen von der Media zur Neointima, wodurch die chronische Entzündung weiter unterhalten wird [Welt and Rogers, 2002; Ley et al., 2007].

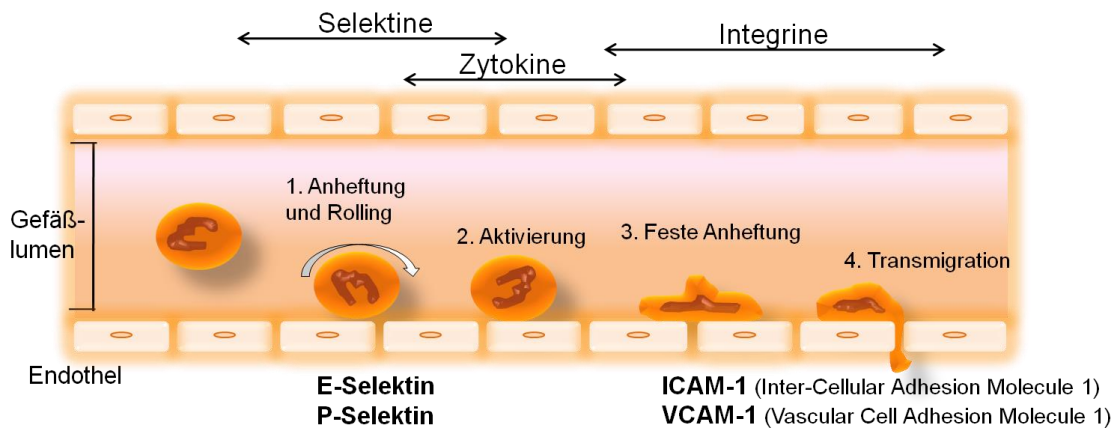


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Rezeptor vermittelten Transmigration von Leukozyten

Darstellung der Rezeptor vermittelten Anheftung und Migration von Leukozyten in entzündetes Gewebe von Gefäßen (nach [Nolte et al., 2011], modifiziert von Späth K.).

Die Entwicklung von BMS zu medikamentenfreisetzenden Stents (engl. drug eluting stents = DES) stellt den Durchbruch in der Reduzierung der ISR-Rate von 60-80 % dar [Otsuka et al., 2012]. Die erste Generation dieser Stents, wie der Sirolimus freisetzende Stent Cypher® seit 2003, [Serruys et al., 2006] oder der Paclitaxel freisetzende Stent Taxus®, setzen antiproliferative Medikamente frei. Durch die Freisetzung aus einer polymerhaltigen biodegradierbaren Oberfläche kann eine hohe lokale Konzentration bei niedrigen systemisch gemessenen Spiegeln erreicht werden [Hwang et al., 2001]. Das klassische Zytostatikum Paclitaxel und das Immunsuppressivum Sirolimus werden seit längerem in der Therapie von

Einleitung

bösartigen Tumoren oder nach Organtransplantation zur Hemmung der Zellproliferation eingesetzt, wobei diese Medikamente keine Selektion der gehemmten Zellen ermöglichen. Deshalb wird auch die Proliferation von Endothel gehemmt, weshalb bei diesen Stents bei länger freiliegender Stentoberfläche die DAPT laut Leitlinie für bis zu 30 Monate und somit im Vergleich zu den BMS wesentlich länger gegeben werden muss [ESC, 2017] um einer Stent-Thrombose vorzubeugen (vgl. Abbildung 1). Jedoch zeigt sich im Vergleich zu den BMS ein erhöhtes Risiko der Stent-Thrombose nach Absetzen der DAPT [Ma et al., 2018]. Ein positiver Aspekt ist die oben genannte Reduktion der ISR [Waugh and Wagstaff, 2004].

Zur weiteren Verbesserung wurden die Zweitgeneration-DES entwickelt. Dabei wird z. B. eine Cobalt-Chrom-Legierung verwendet (z.B. der Everolimus freisetzende DES Xience V®), welche dünnere Streben des Stentgeflechtes ermöglicht, um eine geringere Verwirbelung des Blutes und somit eine geringere Thrombogenität der Stents zu erreichen [Bangalore et al., 2018]. Zudem sollte eine schnellere Reendothelialisierung und eine geringere Intimahyperplasie erreicht werden. Vergleiche von Erst- und Zweitgeneration-DES zeigen jedoch nur eine geringe Verbesserung der Stent-Thrombose- und ISR-Rate sowohl klinisch [Ma et al., 2018] als auch histologisch [Stettler et al., 2018].

Mit den einliegenden metallenen Grundstrukturen der Stents bleibt ein Fremdkörper im Gefäß, welcher eine permanente Irritation, endotheliale Dysfunktion und Entzündungsreaktion hervorruft [Beijk and Piek, 2007]. Hier geht der Trend zu biologisch abbaubaren resorbierbaren Materialien [Chevalier et al., 2016] mit dem Vorteil der vollständigen Resorption der Gefäßstütze und Restauration des normalen Gefäßes, sodass etwaige notwendig werdende erneute Interventionen möglich sind. Ebenso entstehen keine Artefakte bei magnetresonanz- oder computertomografischen Untersuchungen. In einer vergleichenden Studie des everolimusfreisetzenden Stents Xience® und des bioresorbierbaren Koronarstents Absorb™ zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der primären Studienendpunkte, dem sog. „Zielläsion-Versagens“ (Myokardinfarkt, Herztod, Zielläsion-Revaskularisation), ISR oder Stent-Thrombose in den ersten Jahren. Jedoch zeigte sich eine Erhöhung der sehr späten Stent-Thrombosen

nach 32-36 Monaten. Die Autoren vermuten, dass hierfür eine intraluminale Lösung oder eine Diskontinuität des Stents bzw. die fehlende Endothelialisierung verantwortlich ist, da der Absorb™ nach 36-48 Monaten vollständig resorbiert ist [Chevalier et al., 2018]. Jedoch sei seit Studienbeginn auch klar geworden, dass die bioresorbierbaren Stents in kleinen Gefäßen höhere Komplikationsraten haben, sodass die richtige Auswahl der Stentgröße, Vorbereitung des Gefäßes und Nachdilatation des Stents wesentlich zu seiner Haltbarkeit und dem Therapieerfolg beiträgt, was zu Beginn der Studie noch nicht berücksichtigt worden sei [Kereiakes et al., 2017; Overbeck, 2017].

Neben der Weiterentwicklung des Grundgerüsts der Stents sind auch die freisetzenen Medikamente Gegenstand der Forschung. So erfolgen bereits tierexperimentelle Studien mit Antikörpern und Wachstumsfaktoren beschichteten Stents [Hu et al., 2017]. Demnach reichern mit Antikörper beschichtete Stents im Blut zirkulierende progenitor Zellen an, erreichen eine schnellere Endothelialisierung und ermöglichen so eine Verkürzung der DAPT. Im Vergleich zum bereits vorhandenen Paclitaxel freisetzenen DES zeigte sich jedoch in klinischen Studien eine höhere Komplikationsrate im ersten Jahr, bei geringerer Komplikationsrate im Jahr 2-5. Die Studien dauern aktuell noch an [Nakamura and Dean, 2018].

Eine weiterer möglicher therapeutischer Ansatz gegen die nach der Stentapplikation durch die Entzündungsreaktion hochregulierten Gene ist die RNA-Interferenz (RNAi). Kleine Ribonukleinsäuren (engl. ribonucleic acid = RNA), so genannte Small interfering RNAs (siRNAs) könnten auf Stents oder Ballonen aufgebracht werden und die Entzündungsreaktion und ihre Komplikationen reduzieren.

1.2 RNA-Interferenz (RNAi) und siRNAs

Ein Abwehrmechanismus der Zelle gegen doppelsträngige RNA (engl. double stranded RNA = dsRNA) ist die RNAi, die von Zellen für verschiedene Mechanismen verwendet wird. siRNA dient als Teil des pflanzlichen Abwehrsystems zur Virusabwehr [Haasnoot et al., 2007]. Eukaryoten kontrollieren mittels zelleigener microRNA (miRNA) unter anderem ihre Genexpression durch den Abbau von

Einleitung

Boten-RNA (engl. messenger RNA = mRNA) [Sontheimer and Carthew, 2005] (vgl. Abbildung 3).

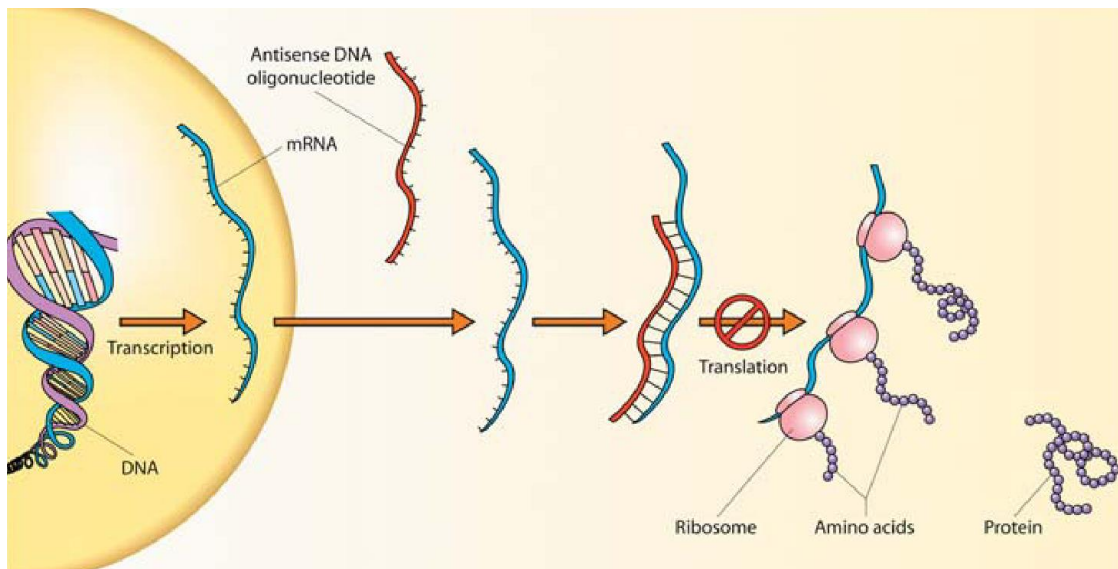


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Proteinsynthese und des Eingriffspunktes der RNAi. Darstellung der Proteinbiosynthese und der RNAi, bei der komplementärer Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid = DNA) oder RNA an spezifische mRNA bindet um ihre Translation und somit die Proteinsynthese zu verhindern [Robinson, 2004].

Seit der erstmaligen Anwendung der RNAi 1998 in dem Fadenwurm *C. elegans* [Fire et al., 1998], für den Andrew Fire und Craig C. Mello 2006 den Nobelpreis für Medizin erhielten, wird die Methode immer weiter erforscht und gezielt die Genexpression von Zellen, ohne Veränderung des Genoms, verändert.

Hierzu wird dsRNA in die Zelle eingebracht und durch einen Nuklease enthaltenen Proteinkomplex, dem so genannten Dicer, in kurze 20-23 Nukleotide lange RNA-Fragmente gespalten, den siRNAs. Diese siRNAs können gezielt synthetisch hergestellt und direkt in die Zellen eingebracht werden [Elbashir et al., 2001a; Elbashir et al., 2001b]. Sie werden entwunden, aufgespalten und lagern sich mit Proteinen zum RNA-induced silencing complex (RISC) zusammen, welcher die passende mRNA-Sequenz bindet und die mRNA in kleine Fragmente schneidet (vgl. Abbildung 4). Die so entstandenen kleinen RNA-Fragmente sind sehr instabil und werden abgebaut. Dies führt zu einer geringeren Menge oder kompletten Inaktivierung der Genexpression des Zielproteins.

Einleitung

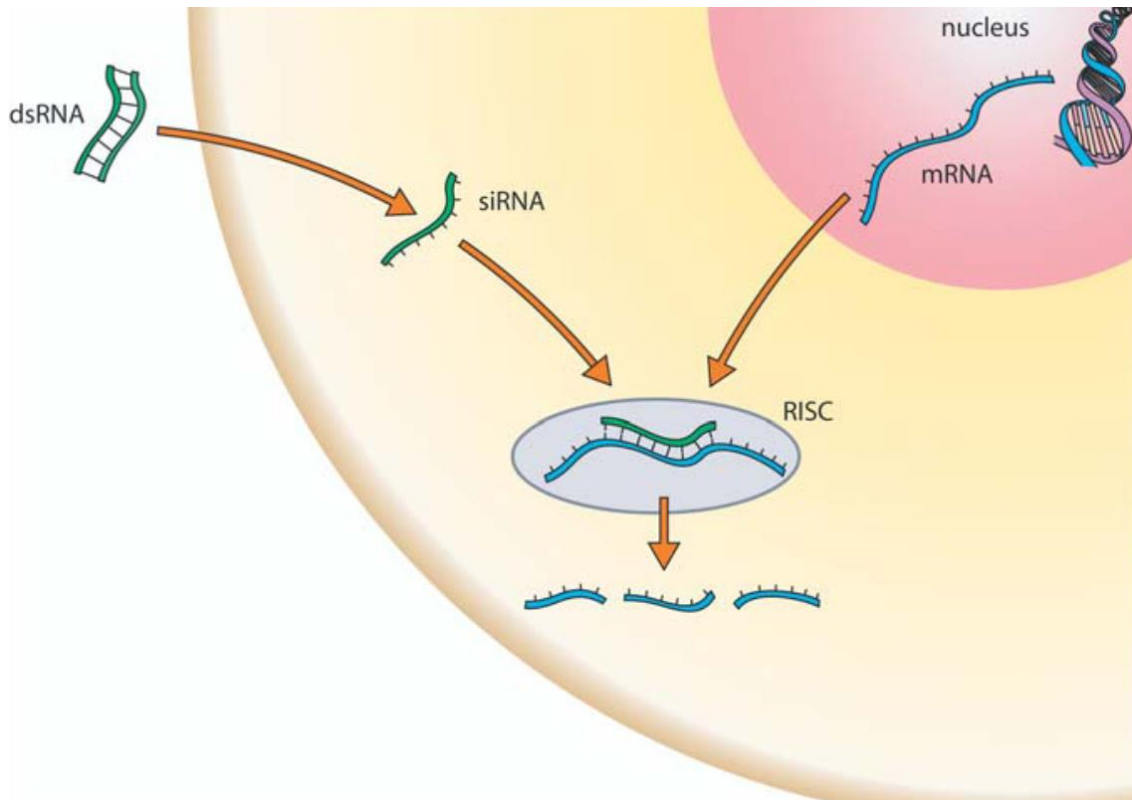


Abbildung 4: Schematische Darstellung der natürlich vorkommenden RNAi

Bei der natürlich vorkommenden RNAi wird dsRNA entwunden und zu siRNA gespalten, welche im RISC Komplex gebunden wird und einen Prozess auslöst welcher komplementäre mRNA abbaut [Robinson, 2004].

Um die Stabilität von siRNAs in vivo zu erhöhen, wurden bei den synthetisch hergestellten siRNAs Modifikationen vorgenommen [Dowler et al., 2006]. Trotzdem haben siRNAs im Serum eine kurze Halbwertszeit, da sie von Endo- und Exonukleasen schnell abgebaut werden. In dieser Arbeit wurden synthetisch hergestellte und modifizierte siRNAs gegen die Rezeptoren ICAM-1 (siICAM) und E-Selektin (siEsel) verwendet um die Leukodiapedese an zwei wesentlichen Punkten zu beeinflussen (vgl. Abbildung 2).

1.3 mRNA Transfektion und Wirkungen

Der wesentliche Grundbaustein von Zellen sind Proteine, welche eine spezifische Aminosäuresequenz aufweisen. Proteine steuern und regeln als Signalmoleküle wichtige Abläufe in einer Zelle wie bspw. enzymatische Kaskaden oder Entzündungsreaktionen. Welche Struktur und damit Funktion ein Protein aufweist, ist auf der Desoxiribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid = DNA) festgelegt.

Einleitung

Bei Bedarf kann die Zelle mittels Transkription von diesem genetischen Code eine komplementäre Kopie in Form einer mRNA erstellen. Diese besteht aus vier verschiedenen Nukleotiden, welche durch Phosphodiesterverbindungen verknüpft sind und einen Einzelstrang formen. Dieser Strang dient als Matrize für die Proteinbiosynthese während der Translation. Jede mRNA codiert jeweils ein spezifisches Protein. Die enthaltene Information wird in aufeinander folgenden Dreiergruppen, dem sog. Codon, abgelesen und eine passende tRNA (Transport RNA) gebunden, welche wiederum eine passende Aminosäure transportiert. Ribosomen verbinden die sich auf diesem Weg nebeneinander eingefundenen Aminosäuren, bis das benötigte Protein entstanden ist. Ist eine ausreichende Menge des Proteins durch die beschriebene Proteinbiosynthese entstanden, wird die mRNA durch zelleigene RNasen abgebaut [Heinrich P., 2014].

Insgesamt gesehen bergen mRNAs ein enormes therapeutisches Potential. Das erste Mal wurden synthetische mRNAs 1992 therapeutisch eingesetzt [Jirikowski et al., 1992]. Sie eröffnen die Möglichkeit, die Menge eines erwünschten Proteins in einer Zelle zu erhöhen um bspw. bestimmte Signalkaskaden in Gang zu setzen, gezielt spezifische Rezeptormengen zu erhöhen oder ihre Produktion zu unterbrechen. So werden sie bspw. in der Immuntherapie von bösartigen Tumoren erforscht [Weissman, 2015], in der regenerativen Medizin [Mandal and Rossi, 2013] oder bei Impfungen [Petsch et al., 2012] eingesetzt. Mittels Sequenzdatenbanken ist es möglich, über Vektoren-DNA die mRNA-Nukleotidabfolgen zu rekonstruieren. Ihr Einsatz wird begrenzt durch eine, im Vergleich zu DNA, geringeren Stabilität und einer unerwünschten Aktivierung des Immunsystems über die anti-virale Immunreaktion durch Ausschüttung von Interferonen [Warren et al., 2010]. Die Aktivierung der Immunantwort kann jedoch durch einen Austausch von modifizierten Nukleotiden reduziert werden [Kariko and Weissman, 2007]. Zudem erhöht sich dadurch die Transfizierbarkeit und die Stabilität [Avci-Adali et al., 2014]. Das Potential von mRNA in der Therapie von CVDs zeigte sich mittels einer CD39 mRNA- Beschichtung, welche durch eine Reduktion der

Thrombogenität und einer schnelleren Reendothelialisierung die Komplikationsrate nach Stentapplikation bei PTCA verringern konnte [Wendel et al., 2010; Abraham et al., 2015].

Die in der folgenden Arbeit verwendete mRNA codiert das modifizierte grün fluoreszierende Protein (engl. enhanced green fluorescent protein= eGFP), welches ursprünglich aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria* isoliert wurde. Da sich die Fluoreszenz autokatalytisch innerhalb der Polypeptidkette bildet und somit keine weiteren externen Enzyme zur Expressierung notwendig sind, eignet sie sich sehr gut zur Transfektion in viele verschiedenen Zelllinien. Hiernach lässt sich das eGFP in der Zelle durch optische Anregung gut nachweisen und eignet sich deshalb sehr gut für experimentelle Versuche.

1.4 Transfektionsmethoden

Transfektion ist das Einbringen von Fremd-DNA/RNA in eukaryotische Zellen. Die Übertragung von mRNA kann eine Expression von zellfremden Proteinen, siRNA eine Verringerung von zelleigenen Proteinen induzieren.

Die Herausforderung an eine Transfektionsmethode bzw. an ein Transfektionsmittel besteht darin, die negativ geladene RNA gegen enzymatischen und nicht enzymatischen Abbau zu schützen und eine zelluläre Aufnahme und Freisetzung in das Zytosol der Zellen durch die ebenfalls negativ geladenen lipiddoppelschichtigen Zellmembranen zu erreichen. Hierbei muss das Transfektionsmittel eine hohe Biokompatibilität bzw. eine geringere Zytotoxizität aufweisen, um negative Effekte auf die Zellen zu verhindern. Transfektionsmittel lassen sich in die drei Gruppen biologisch, chemisch und physikalisch einteilen.

Biologische Transfektionsmittel:

Die virusvermittelte Transfektion, auch genannt Transduktion, wird mittels Retro-, Adeno- oder Lentivirus-Systemen erzielt, indem die Fremd-DNA in das Genom eingebaut wird. Hierbei kann es jedoch zur Mutagenese und zu teilweise sehr starken Immunreaktionen, ausgelöst durch toxisch wirksame virale Vektoren, kommen [Gstraunthaler, 2013].

Chemische Transfektionsmittel:

Über eine Komplexbildung mit kationischen Liposomen, Calciumphosphat oder Diethylaminoethyl-Dextran (DEAE) –Transfektionsmitteln kann eine positive Nettoladung der RNA erreicht werden, welche mit der negativ geladenen Zellmembran interagieren und so in das Zellinnere gelangen kann [Gstraunthaler, 2013]. Dabei ist die Zytotoxizität geringer und es wird im Vergleich zur Transduktion keine Fremd-DNA in das Genom eingebaut [Kim and Eberwine, 2010]. Ein Beispiel für diese Transfektionsmethode ist das in dieser Arbeit verwendete Lipofectamine®2000. Es gehört zu den kationischen Lipiden, welche RNA mizellenartig in einen Komplex einschließen. Die entstandenen Liposomen werden anschließend durch Endozytose in die Zellen aufgenommen. Bei höheren RNA-Mengen ist eine höhere Dosierung notwendig, was mit einer höheren Zytotoxizität einhergeht. Jedoch bietet es eine hohe Transfektionseffizienz bei schwer zu transfizierenden Zellarten [Koenig et al., 2013].

Physikalische Transfektionsmethoden:

Die Transfektion von RNA kann auch mittels Elektroporation und Mikroinjektion erfolgen [Gstraunthaler, 2013]. Durch ein elektrisches Feld, Genkanonen oder Mikronadeln wird die Zellmembran für RNA durchlässig gemacht. Ein Vorteil dieser Methode ist es, dass diese ermöglicht einzelne Zellen gezielt zu transfizieren. Zudem sind sie Vektor-, Komplex-, Zellart- und Umgebungsunabhängig. Es bedarf jedoch sehr spezieller Geräte und einer großen Erfahrung, um eine effiziente Transfektion zu erreichen [Kim and Eberwine, 2010].

Ein weiterer Vorteil der physikalischen und chemischen Transfektion ist eine transiente Transfektion, sodass die gewünschte Wirkung der RNA, ob Verringerung oder Erhöhung der Expression von Proteinen, nur so lange wie erwünscht stattfindet, da die RNA nicht in das Genom der Zielzelle eingebaut wird.

1.5 siRNA freisetzende Beschichtungen

Die lokale Freisetzung von siRNA stellt eine große Herausforderung dar, da sie in Serum sehr schnell durch Endo- und Exonukleasen abgebaut wird [Dowler et

Einleitung

al., 2006]. In der Folge werden einige Biomaterialien genannt, die in der Lage sind, RNAs vor ihrem Abbau zu schützen, sie zu transfizieren und als Depot für die RNA-Freisetzung zu fungieren.

Polyethylenimin (PEI):

PEI ist ein stark verzweigtes Polymer-Molekül, welches durch seine positive Ladung negativ geladene RNA bindet und vor dem Abbau abschirmen kann [Boussif et al., 1995]. Der PEI-RNA-Komplex wird von der Zelle in ihr Endosom aufgenommen. Durch die hohe Pufferkapazität von PEI nimmt es Protonen auf, das Endosom platzt und die RNA wird im Zytosol freigesetzt [Behr, 1997]. Aufgrund seiner starken positiven Ladung hat es auch eine hohe Zytotoxizität. Durch Modifikationen kann diese negative Eigenschaft zwar verbessert werden, jedoch verringert sich dadurch die Transfektionseffizienz [Grayson et al., 2006]. Die Anwendung wird noch erprobt und verbessert [Koenig et al., 2013], wobei sich erste Erfolge bei der direkten Einspritzung von PEI-siRNA in Tumorgewebe zeigten, welches daraufhin zugrunde ging [Wang and Gartel, 2011].

Atelokollagen:

Atelokollagen ist ein natürlich vorkommendes Polymer mit geringer Immunogenität und guter Biokompatibilität, das ebenso in der therapeutischen Freisetzung von RNA, als auch bei Wundheilungspräparaten und Implantaten verwendet wird [Honma et al., 2001]. Der wechselnde Aggregatzustand, flüssig bei $< 10\text{ }^{\circ}\text{C}$, gelartig bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, ermöglicht eine breite Anwendung. So konnte gezeigt werden, dass eine direkte Einspritzung von Atelokollagen-siRNA-Komplexen in einen Tumor keine systemischen Nebenwirkungen bei guter Reduktion des Tumors aufwies [Mu et al., 2009].

Hyaluronsäure:

Hyaluronsäure ist ein Polysaccharid, welches natürlicherweise in Synovialflüssigkeit oder in Blut vorkommt [Laurent et al., 1996]. Es kann Wasser binden, somit verschiedene viskose Zustände annehmen, ist biokompatibel und biologisch abbaubar ohne eine Immunreaktion auszulösen. Deshalb wird es bspw. in der

Einleitung

Behandlung von Kniearthrose und für Gewebeprothesen eingesetzt [Tashiro et al., 2012]. Die Extraktion aus humanem Gewebe ist kostspielig und die Menge ist begrenzt. Die Entnahme aus tierischem Gewebe birgt die Gefahr einer viralen Kontamination, weshalb es heutzutage meist aus *Streptococcus zooepidemicus* gewonnen wird [O'Regan et al., 1994]. Meist wird es nicht allein in der Freisetzung von siRNA eingesetzt, sondern in der Kombination mit z. B. PEI, um dessen Zytotoxizität zu reduzieren [Park et al., 2010].

Chitosan:

Chitosan ist ein natürlich vorkommendes Polymer aus Krustentieren, Insekten und Pilzen [Merzendorfer, 2006; Kurita, 2006]. Wegen seiner stark positiven Ladung, seiner biologischen Abbaubarkeit und seiner Zytokompatibilität, wird es zur siRNA-Freisetzung eingesetzt [Katas and Alpar, 2006]. Hierfür werden Nanopartikel mit einem Durchmesser von 350 nm gebildet, welche sich besonders für die zelluläre Aufnahme eignen [Erbacher et al., 1998; Thorek and Tsourkas, 2008]. Für eine feste Beschichtung müssen diese Nanopartikel allerdings in einem andern Polymer, bspw. Poly-(D,L-lactide-co-glycolide acid) (PLGA), eingebettet werden [Kumari et al., 2010].

PLGA:

Die Immobilisierung und Freisetzung aus einem geeigneten Stentbeschichtungsmaterial stellt besondere Herausforderungen an dieses. Es muss biokompatibel sein um einer schnellen Reepithelialisierung nicht im Wege zu stehen. Es muss zyto- und hemokompatibel sein, da es zunächst direktem Kontakt mit Blut ausgesetzt ist. Zudem muss es die gebundenen RNA-Transfektionsmittel-Komplexe kontrolliert, effizient und langfristig freisetzen.

Eine der meistverwendeten Polymeren auf den diese Anforderungen zutreffen könnten ist das von FDA und EMA getestete und freigegebene Polymer PLGA. Es ist ein Kopolymer aus Polylactide (engl. poly lactic acid = PLA) und Polyglycolid (engl. poly glycolic acid = PGA) [Makadia and Siegel, 2011; Kumari et al., 2010]. Während der Hydrolyse wird es in seine Monomere aufgespalten und

dann zu Kohlenstoffdioxid und Wasser abgebaut. PLGA erzeugt wenige systemische Nebenwirkungen, da PLA und PGA natürlich im Körper vorkommen [Danhier et al., 2012; Makadia and Siegel, 2011; Kumari et al., 2010]. Ein mögliches Problem bei der Anwendung von PLGA könnte in der Entstehung von Säure während des Abbaus und der dadurch resultierenden Senkung des pH-Wertes sein [Fredenberg et al., 2011]. Der Abbau von PLGA wird durch die physikochemischen Eigenschaften des Polymers bestimmt, wie das Molekulargewicht, die Endgruppengestaltung (verestert oder unverestert) oder durch das Verhältnis von PLA und PGA, sodass es eine Spanne von wenigen Monaten bis Jahren gibt, in der es abgebaut wird [Vert et al., 1994; Samadi et al., 2013; Houchin and Topp, 2008]. Je höher der Anteil von PLA im PLGA ist, desto länger ist die Abbauphase. So zeigt sich bei einem Verhältnis 50:50 (PLA:PGA) der schnellste Abbau mit 1-2 Monaten, bei 75:25 (PLA:PGA) von 4-5 Monaten und bei 85:15 (PLA:PGA) von 5-6 Monaten [Zolnik and Burgess, 2008; Jenjob, 2015]. Eine veresterte Endgruppe bewirkt zudem eine Verringerung der Abbaugeschwindigkeit. In der Literatur werden verschiedene Mechanismen des Abbaus der PLGA-Polymere und somit der Freisetzung von etwaig eingebetteten Medikamenten oder Nanopartikeln beschrieben. Es können eine Diffusion durch das Polymer, eine physikalische Erosion, eine chemische Degeneration oder auch eine kombinierte Freisetzung durch alle drei beschriebenen Möglichkeiten auftreten [Koenig et al., 2017; Jain, 2000; Zhu and Braatz, 2015]. Ein Abbau *in vivo*, durch ggf. enzymatische Prozesse neben den bereits genannten Vorgängen, ist bislang noch nicht ausreichend erforscht [Cai et al., 2003; Zhou et al., 2010].

PLGA hat sich bereits als Polymer zur Medikamentenfreisetzung mittels dünner Beschichtungen oder Nanopartikeln bewährt. So haben bereits erhältliche DES wie der NEVO™ von Johnson & Johnson oder der Supralimus™ von Sahajanand Medical eine Sirolimus freisetzende PLGA-Beschichtung auf ihren Kobal-Chrom- oder Edelstahl-Stents, um die Rate der ISR zu senken [Klugherz et al., 2000], ohne eine höhere Entzündungsreaktion als BMS auszulösen [Peng et al., 2009]. Zudem konnte bereits eine erfolgreiche Transfektion von Plasmid-DNA aus PLGA-Nanopartikeln in Schweinearterien *in vivo* nachgewiesen werden

[Klugherz et al., 2000]. 2010 wurde an Haseniliakalarterien gezeigt, dass die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase mittels Plasmid-DNA aus PLGA-Beschichtungen erhöht, die ISR und die Einwanderung von glatten Muskelzellen reduziert werden kann [Brito et al., 2010].

1.6 Entzündungsmediatoren

Eine neue Beschichtung soll die Entzündungsreaktion der Endothelzellen auf den neu implantierten Stent herabsetzen und nicht selbst eine Entzündung auslösen. SiRNAs können von der Zelle als fremd erkannt werden und ihrerseits eine Interferonantwort auslösen [Bridge et al., 2003; Sledz et al., 2003], welche natürlicherweise zur Abwehr von Virusinfektionen dient. Immunzellen exprimieren Oberflächenrezeptoren, welche je nach spezifischem Rezeptor bakterielle Oberflächenstrukturen oder virale Komponenten sowie Nukleinsäurestrukturen erkennen können. Die bekanntesten Vertreter sind die Toll-like-Rezeptoren (TLR), welche nach extra- oder intrazellulär gerichtet sein können. Durch Bindung der fremden Aktivatoren kommt es zu einer Freisetzung von proinflammatorischen Interleukinen und Chemokinen [Heinrich P., 2014]. So bindet bspw. virale dsRNA an den TLR3, welcher über den NF- κ B Signalweg v. a. Interferone (IFN), z. B. IFN α und IFN β , sowie Interleukine (IL), z. B. IL-6 und IL-12, freisetzt [Alexopoulou et al., 2001].

Um die Aktivierung des Abwehrsystems der Zellen durch die entwickelte Beschichtung selbst einschätzen zu können, wurden Zytokine (Interleukine, Interferone, Chemokine, Tumornekrosefaktoren) sowie der Transkriptionsfaktor STAT-1 und die Adenylat-Synthetase OAS, welche von den Zytokinen angeregt werden, bestimmt (s. Tabelle 1).

Einleitung

Tabelle 1: Nachgewiesene Entzündungsmediatoren in hVECs nach Kontakt mit PLGA

Entzündungsmediator-Gruppe	Abkürzung	Synonyme
Zytokine	Il-1 β	Interleukin-1 β
	Il-2	Interleukin-2
	Il-6	Interleukin-6
	Il-12	Interleukin-12
	IFN α	Interferon α
	IFN β	Interferon β
	IFN γ	Interferon γ
	TNF α	Tumornekrosefaktor α
Chemokine	CXCL-7	C-X-C-Motiv-Chemokin 7, Platelet basic protein
	CXCL-8	C-X-C-Motiv-Chemokin 8, Interleukin-8
	CXCL-10	C-X-C-Motiv-Chemokin 10, interferon gamma-induced protein 10
	B7-2	CD86
Resistenzfaktor gegen Viren	OAS	2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase
Transkriptionsfaktor	STAT-1	Signal Transducers and Activators of Transcription 1

Zytokine dienen der Verständigung und Regulation zwischen den Zellen des humoralen Immunsystems des Körpers [Hoth and Wischmeyer, 2016].

Il-1 β und Il-6 erhöhen zusammen mit TNF α die lokale Entzündungsreaktion, aktivieren Akute-Phase-Proteine und stimulieren Leukozyten. Il-2 und Il-12 sind Wachstumsfaktoren für T-Helferzellen. IFN α , IFN β und INF γ werden durch Fremd-RNA in Zellen aktiviert und aktivieren die eigene Abwehr der Zelle durch die Stimulation von Transkriptionsfaktoren. Zudem stimulieren sie auch die Abwehr der Nachbarzellen. Solch ein Transkriptionsfaktor ist das hier bestimmte STAT-1, welches als antivirale Immunantwort Immunzellen in ihrem Zellwachstum und –proliferation anregt. Ebenso wird OAS aktiviert, welches einzelsträngige RNA abbaut und so die Virusreplikation und -ausbreitung verhindert. Chemokine dienen zur Anlockung und Bindung von Immunzellen. Chemokine aus der Gruppe der C-X-C-Motiv-Chemokine besitzen als Kennzeichen jeweils vier Cysteine, wobei sich zwischen den ersten Beiden eine beliebige Aminosäure X befindet. Das v. a. durch IFN γ angeregte CXCL-7, CXCL-10 und das auch IL-8 genannte CXCL-8, welches zusätzlich zur Bindung von v. a. von Leukozyten ein Angiogenesefaktor ist, wurden in dieser Arbeit bestimmt. Zusätzlich wurde aus der Gruppe der Chemokine das B 7-2 bestimmt, welches als Oberflächenmerkmal antigenpräsentierender Zellen die Aktivierung von T-Zellen auslöst [Heinrich P., 2014].

Als Kontrolle dient dsRNA von der auszugehen ist, dass Endothelzellen die oben genannten Abwehrmechanismen auslösen, da die Zellen eine Virusinfektion vermuten.

1.7 Marker der Hämokompatibilität

Eine neue Beschichtung sollte gegenüber Blutkomponenten möglichst inert reagieren [Krajewski et al., 2013] und im besten Fall den Heilungsvorgang begünstigen. Die Hämokompatibilität neuer Beschichtungen kann anhand folgender Marker, wie sie auch in der DIN EN ISO 10993-5:2009 beschrieben sind, untersucht werden (vgl. Abbildung 5).

Einleitung

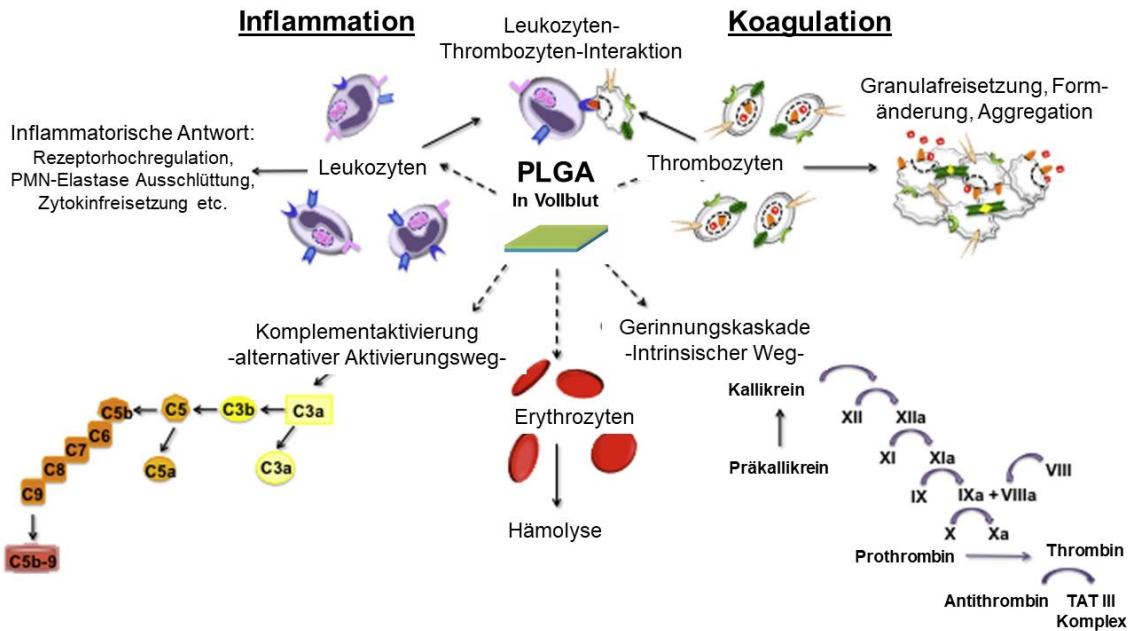


Abbildung 5: Mögliche Inflammation und Koagulation von Vollblut im Kontakt mit PLGA
Das Schema zeigt eine Übersicht der potentiellen reaktiven Effekten von Vollblut nach dem Kontakt mit PLGA-Beschichtungen (modifiziert nach [Krajewski et al., 2013]).

Zum einen werden die Zellzahlen von Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten mittels Zellzähler gemessen, um eine eventuelle Lyse der Zellen oder Gerinnung beim Kontakt mit den Beschichtungen nachzuweisen.

Zudem werden die unten genannten Reaktanten der Zellen und des Komplementsystems als Maß ihrer Aktivierung mittels eines antikörperbasierten enzymatischen Immunnachweisverfahrens (engl. enzyme-linked immunosorbent assay = ELISA) nachgewiesen.

Als Marker der Thrombozytenaktivierung dient das β -TG, welches als plättchen-spezifisches Protein bei Aktivierung der Thrombozyten in großen Mengen aus den α -Granula freigesetzt wird und chemotaktisch auf Fibroblasten wirkt, die ihrerseits eine wichtige Rolle bei der Reparatur von Gewebsschädigungen haben.

Die Proteinase PMN-Elastase dient als Marker der Aktivität der Granulozyten und somit der Entzündungsreaktion im Körper. PMN-Elastase wird bei Entzündungsprozessen von neutrophilen (engl. polymorphonuclear = PMN) Granulozyten zur

Einleitung

Beseitigung körperfremder Stoffe freigesetzt und im Plasma durch Komplexbildung mit α 1-Proteinase-Inhibitor inaktiviert. Dieser Komplex kann in einem spezifischen ELISA quantifiziert werden.

Als zentrales Ereignis der Gerinnungskaskade wird Prothrombin in aktives Thrombin umgewandelt. Dieses verstärkt wiederum die Gerinnung und wird durch Antithrombin III gehemmt. Hierbei wird der inaktive Proteinase-Inhibitor-Komplex Thrombin-Antithrombin (TAT) ausgebildet, welcher als Nachweis thrombotischer Ereignisse dient und mittels eines spezifischen ELISA quantifiziert werden kann.

Bei der Aktivierung der unspezifischen Immunabwehr zur Eliminierung von zellulären Antigenen entsteht, als Reaktion auf einen Antigen-Antikörper-Komplex, als Zwischenprodukt Anaphylatoxin C3a. Dieses ist jedoch sehr instabil, zerfällt schnell in das stabilere C3a-desArg und kann als Grad der Komplementaktivierung durch die klassische Aktivierung herangezogen werden. Das Komplementsystem kann unabhängig von Antikörpern durch die Bindung an bakterielle Lipopolysaccharide, so genannte Endotoxine, angeregt werden.

SC5b-9 entsteht aus der Assemblierung der Komplementfaktoren C5 bis C9 zum sog. lytischen Komplex und beschreibt somit die terminale Endstrecke des klassischen und alternativen Aktivierungsweges. Dem entspricht das C3a der klassischen antikörpervermittelten Aktivierung des Komplementsystems. Beide werden als Maß der Komplementaktivierung und des vorangegangenen Aktivierungsweges herangezogen.

1.8 Fragestellung

Bei der Behandlung der CVD mittels PTCA und Stentversorgung zum Offenhalten von Gefäßen kommt es nach wie vor häufig zu Komplikationen. Um diese zu behandeln und zu reduzieren, zeigt sich der Einsatz von siRNA und mRNA als vielversprechender therapeutischer, innovativer und spezifischer Ansatz. Die Freisetzung, und vor allem die langfristige Freisetzung mit einer effizienten Transfektion der RNA in die Zellen, stellt jedoch ein Problem dar. PLGA hat sich als medikamentenfreisetzende Beschichtung auf Stents bereits bewährt.

In dieser Arbeit sollen verschiedene PLGAs auf ihre Eignung als siRNA und mRNA freisetzende Stentbeschichtungen getestet und eine Beschichtung entwickelt werden, welche eine langfristige Freisetzung und Transfektion der RNAs ermöglicht.

Folgende Ziele stehen hierzu im Fokus der Forschungsarbeit:

- Vergleich der verschiedenen PLGAs im Hinblick auf ihre Eignung als RNA freisetzende Stentbeschichtung
- Überprüfung der Beeinflussung des pH-Wertes und somit des zellumgebenden Milieus während der Hydrolyse auf das Zellkulturmedium
- Untersuchung der Bio- und Hämostatibilität der Beschichtung: Zytotoxizität an Endothelzellen, Adsorption der zellulären Bestandteile an die Beschichtung und zelluläre Immunantwort auf die Beschichtung
- Entwicklung einer siRNA freisetzenden Beschichtung, die
 - eine gute Transfektionseffizienz von siRNA mit Lipofectamine®2000 mit Verringerung des Zielproteins, in dieser Arbeit ICAM-1, auf mRNA- und Proteinebene erreicht
 - langfristig siRNA freisetzt und transfiziert
 - eine Kotransfektion von mRNA und siRNA ermöglicht

Mit der Entwicklung einer Beschichtung, aus der langfristig siRNA zur Unterdrückung der Expression unerwünschter Proteine sowie mRNA zur Induktion heilender oder protektiver Proteine freigesetzt wird, möchte die vorliegende Forschungsarbeit insgesamt einen Beitrag zur personalisierten Therapie leisten.

2 Material und Methoden

2.1 PLGAs

Tabelle 2: Verwendete PLGAs

Bezeichnung in Dissertation	PLGA Synonym	Verhältnis PLA:PGA	Relative Molekülmasse	Endgruppe	Hersteller
PLGA 1	Resomer® RG 752 H	75:25	4,000- 15,000	Säure	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutsch- land
PLGA 2	-	85:15	50,000- 75,000	Ester	
PLGA 3	Resomer® RG 756 S	75:25	76,000- 115,000	Ester	

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden humane venöse Endothelzellen (engl. human venous endothelial cells = hVECs) aus überschüssigem Material von Venen aus der Bypasschirurgie verwendet. Die Endothelzellen wurden aus den Venen herausgelöst, gereinigt und angezchtet [Walker et al., 2005]. Da Primärzellen sehr schwierig zu kultivieren sind und ihre Verfügbarkeit limitiert ist, wurden auch immortalisierte Endothelzellen, EA.hy926, verwendet (s. Tabelle 3).

Diese Zellreihe entstand aus der Fusionierung von humanen umbilikal venösen Endothelzellen und der permanenten, etablierten Zelllinie A549. Diese stammen ursprünglich aus einem Lungenkarzinom, sind nahezu unbeschränkt wachstumsfähig und resistent in der Anzucht [Edgell et al., 1983].

Tabelle 3: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Hersteller
EA.hy926 (ATCC® CRL-2922™)	LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland
hVECs	Isolierte Zellen nach [Walker et al., 2005] durch Studenten des THG-Labors Universität Tübingen, Tübingen, Deutschland Verwendete Passagen: 4-7

2.2.2 Zellkultivierung

2.2.2.1 Zellkulturmedium für EA.hy926

Aus 500 ml des Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) high glucose Basalmediums wurde unter Hinzugabe von fetalem Kälberserum (engl. fetal calf serum = FCS) (Endkonzentration 10 %), Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration 1%) und L-Glutamin (Endkonzentration 1 %) das DMEM-Vollmedium für die EA.hy926 hergestellt.

2.2.2.2 Zellkulturmedium für hVECs

Das Vollmedium für die hVECs wurde aus 500 ml VascuLife™EnGS Basalmedium unter Hinzugabe des Ergänzungskits mit endothelialelem Wachstumsfaktor (EnGS) (Endkonzentration 0, 2 %), epidermalelem Wachstumsfaktor(EGF) (Endkonzentration 5 ng/ml), Ascorbinsäure (Endkonzentration 50 µg/mL), L-Glutamin (Endkonzentration 10 mM/l), Heparinsulfat (Endkonzentration 0.75 Units/mL) und FBS (Endkonzentration 2 %) hergestellt. Zusätzlich wurde Gentamicin (Endkonzentration 0,1 mg/ml) und Amphotericin B (Endkonzentration 10 ng/ml) zugesetzt.

Die Medien wurden regelmäßig hergestellt und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.2.2.3 Passagierung und Anzucht der Zellen

Die EA.hy926 wurden um sie zu Passagieren nach dem Absaugen des Mediums mit 6 ml Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, ohne Calcium und Magnesium (DPBS⁻) gewaschen und mit 6 ml 0,05 % Trypsin-EDTA bei 37°C 2 Minuten lang

Material und Methoden

abgelöst. Die Ablösereaktion wurde mit 6 ml DMEM-Vollmedium gestoppt. Hier- nach wurden die abgelösten Zellen entnommen, in ein 15 ml Falcon transferiert und 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet mit DMEM-Vollmedium vermischt um einen Teil der entstandenen Zell- suspension entweder wieder mit 25 ml DMEM-Vollmedium in eine Zellkulturfla- sche (150 cm²) auszusäen oder für Versuche zu benutzen. Für darauffolgende Versuche wurden 100.000 EA.hy926 pro Vertiefung einer 24-Well-Platte (engl. Well = Vertiefung) einen Tag vor Versuchsbeginn in 500 µl DMEM-Vollmedium angezüchtet. Für den Kotransfektionsversuch (s. 2.14) wurden 120.000 EA.hy926 pro Vertiefung einer 12-Well-Platte angezüchtet. Die Menge der benötigten Zell- suspension wurde unter Verwendung des Zellzählsystem Casy®, wie in 2.7.2 beschrieben, ermittelt. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂.

Mit den hVECs wurde gleich verfahren. Lediglich wurde hier 0,04 % Trypsin/EDTA zum Ablösen, 0,05 % / 0,1 % Trypsin-Inhibitor/BSA zum Stoppen der Ablösereaktion und ein 75 cm² große Zellkulturflasche zum wieder Anzüchten der Zellen verwendet. Für die Versuche wurden 120.000 hVECs pro Vertiefung einer 24-Well-Platte angezüchtet. Für die Experimente wurden Zellen aus den Passagen 4 - 7 verwendet.

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
2 Merctaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Stein- heim, Deutschland
Nuklease freies Wasser Ambion®DEPC Wasser	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Amphotericin B	PromoCell GmbH, Steinheim, Deutschland
Ampuwa	Fresenius Kabi GmbH, Bad Hom- burg, Deutschland

Material und Methoden

Aurum Total TNA Mini Kit	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, Vereinigte Staaten von Amerika
CASYton®	Roche Innovatis AG, Bielefeld, Deutschland
DMEM high glucose	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DPBS ⁻	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Ethanol absolut	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethylacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
FCS (fetales Kälberserum)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Gentamycin	PromoCell GmbH, Steinheim, Deutschland
Hellmanex	Hellma, Mülheim, Deutschland
Heparin-Natrium 25000 I.E.	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
iScript™ cDNA Synthesis Kit (Best.Nr. 1708891)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, Vereinigte Staaten von Amerika
Kalibratorflüssigkeit pH-Meter 10,01	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Vöhringen, Deutschland
Kalibratorflüssigkeit pH-Meter 4,01	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Vöhringen, Deutschland
Kalibratorflüssigkeit pH-Meter 7,01	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Vöhringen, Deutschland
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

Material und Methoden

Lipofectamine®2000	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
NaCl	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutsch- land
PE Mouse Anti-Human CD54	BD Bioscience, San Jose, Vereinigte Staaten von Amerika
Penicillin (10,000U/ml)/Streptomycin (10,000 µg/ml)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
RPMI-Zellkulturmedium 1640	PAA Laboratories, Pasching, Öster- reich
SYBR®Green	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, Vereinigte Staaten von Amerika
TNFα	BD Bioscience, San Jose, Vereinigte Staaten von Amerika
Trypsin/EDTA (0,04%/ 0,03%)	PromoCell GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypsin-EDTA (0,05%)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Trypsin-Inhibitor/BSA (0,05%/ 0,1%)	PromoCell GmbH, Steinheim, Deutschland
VascuLife™ EnGS Basalmedium	Lifeline Cell Technology, Walkers- ville, Vereinigte Staaten von Amerika

Material und Methoden

Tabelle 5: Verwendete RNAs

Bezeichnung	Name	Sequenz		Hersteller
		Sense	Antisense	
silCAM	ICAM-1 siRNA	5'-GCC UCA GCA CGU ACC UCU ATT- 3'	5'-UAG AGG UAC GUG CUG AAG CTT- 3'	Eurofins MWG Operon, Ebers- berg, Deutsch- land
siEsel-AF488	E-Selektin siRNA mit gekoppeltem Alexa Fluor 488	5'-UUG AGU GGU GCA UUC AAC CTT- 3'	5'-GGU UGA AUG CAC CAC UCA ATT- 3'	
siSCR	Scrambled siRNA	Die Sequenz wird von der Firma nicht heraus gegeben. Es wird jedoch versichert, dass es keine Homologie für bekannte Säugetiergene gibt.		Quiagen, Hilden, Deutschland
siSCR-AF488	Scrambled RNA mit gekoppeltem Alexa Fluor 488			
siSCR-AF555	Scrambled RNA mit gekoppeltem Alexa Fluor 555			
eGFPmRNA	Enhanced green fluorescent protein = Grün fluoreszieren- des Protein	Sequenz und Herstel- lung s. Avci-Adali et al. [Avci-Adali et al., 2014]		THG Labor Uni- versität Tübin- gen, Tübingen, Deutschland

Material und Methoden

Tabelle 6: Verwendete Primer bei qRT-PCR.

Hersteller: Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland. GAP-DH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

Bezeichnung	Sequenz	
	Sense	Antisense
B7-2	5'GAGGTACGGGGAGCTCGC AA3'	5'CCCATAGTGCTGTCACAAA TGCCT3'
β -Actin	5'GAGCACAGAGCCTCGCCTT T3'	5'TCATCATCCATGGTGAGCT GG3'
CXCL-7	5'CCAATTCTCATGTGGAAGC C3'	5'AGTATTAATCCCAACTGGC TG3'
CXCL-8	5'ACCTCTCATGCTGAAGCTC AC3'	5'ATGGAAACTGAATCTGGCT GAG3'
CXCL-10	5'AAGTGGCATTCAAGGAGTA CC3'	5'ACGTGGACAAAATTGGCTT GC3'
GAP-DH	5'TCAACAGCACACCCACTCC 3'	5'TGAGGTCCACCACCTGTTG 3'
ICAM-1	5'CTTGAGGGCACCTACCTCT GTC3'	5'CGGCTGCTACCACAGTGAT G3'
IFN α	5'ACTCATACACCAGGTCACG C3'	5'TGGTCATAGTTATAGCAGG GGTG3'
IFN β	5'TACCTGAAGGCCAAGGAGT ACAG3'	5'CGGAGGTAACCTGTAAGTC TGTTAA3'
IFN γ	5'TCTCTCGGAAACGATGAAA TA3'	5'ACTCTCCTCTTTCCAATTCT T3'
II-1 β	5'CCCACAGACCTTCCAGGAG A3'	5'CGGAGCGTGTCAGTTCAGTG 3'
II-2	5'GAATCCCAAACCTCACCAGG ATGCTC3'	5'TAGCACTTCCTCCAGAGGT TTGAGT3'
II-6	5'CACACAGACAGCCACTCAC CTC3'	5'CTGCCAGTGCCTCTTTGCT G3'

Material und Methoden

II-8	5'GACTTCCAAGCTGGCCGTG 3'	5'CTCCTTGGCAAACTGCAC C3'
II-12	5'CAACATGCTCCAGAAGGCC AGACA3'	5'TGGTAACAGGCCTCCACTG TGC3'
OAS	5'GGAGACAGCTGGAAGCCT GTC3'	5'TGACCCAGGGCATCAAAGG 3'
STAT-1	5'TGGAAGCGGAGACAGCAG AG3'	5'AGGTGTATTTCTGTTCCAAT TCCTC3'
TNF α	5'CCGTCTCCTACCAGACCAA GG3'	5'CTGGAAGACCCCTCCCAGA TAG3'

Tabelle 7: Verwendete ELISA-Kits zur Messung der Marker der Hämokompatibilität

Marker der Hämokompatibilität	Name Kit	Hersteller
β -Thromboglobulin	Asserochrom® beta-TG	Roche Diagnostics, Asnieres, Frankreich
PMN-Elastase	Milenia PMN-Elastase	Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Deutschland
Thrombin-Antithrombin	Enzygnost® TAT micro	Simens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Deutschland
C3a	Quidel C3a Plus EIA Kit	Quidel Corporation, San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
SC5b9	Quidel SC5b-9 Plus EIA Kit	

2.4 Geräte

Tabelle 8: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank Heraeus® 6000	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
CASY® Cellcounter	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
CFX Connect™ Real-Time PCR De- tection System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, Vereinigte Staaten von Amerika
Dampfsterilisator: sxstec dx-23	systec GmbH, Linden, Deutschland
ELISA Mikrotiterplatten-Photometer MR 7000 mit Drucker	DynaTech, Rückersdorf, Deutschland
Exsikkator	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karls- ruhe, Deutschland
FACScan®	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
FACScan®: PC Programm CellQuestPro Version 4	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Feinwaage XP Delta Range	Mettler-Toledo, Albstadt, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Gefrierschrank -80°C	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Heizblock Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg, Deutsch- land
Inkubator 1000 für Blutinkubation	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schabach, Deutschland
Kühlschrank Liebherr Premium	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Laminar-Flow-Sicherheitswerkbank BDK Klasse 2 (Sterilwerkbank)	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl, Deutschland
Mastercycler® Gradiend	Eppendorf AG, Hamburg, Deutsch- land

Material und Methoden

Mixer UZUSIO VTX-3000L (Vortexer)	LMS Corp., Tokio, Japan
PCR-Platten Zentrifuge PerfectSpin P	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
pH-Meter S220 SevenCompact™	Mettler-Toledo AG, Schwerzenbach, Schweiz
Photometer LB940 Mithras	Berthold Technologies GmbH & CO. KG, Bad Wildbad, Deutschland
RNA-Messung BioPhotometer Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Schüttler Polymax 1040 z.B. für Blutinkubation	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schabach, Deutschland
Tischautoklav Systemc DX-23	Systemc GmbH, Linden, Deutschland
Tischzentrifuge Centrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ultraschallbad: Bandelin RK 100H Sonorex	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc., New York, Vereinigte Staaten von Amerika
Wasserbad GFL 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Zellzähler ABX-Micros 60 mit Epson-Drucker 327	Axon Lab AG, Polling, Österreich
Zentrifuge für Monovetten Rotata 460R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Zellkultur: Varifuge 3.2 RS	Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland

2.5 Software

Tabelle 9: Verwendete Software

	Software	Version	Firma
Abbildungen	Illustrator	CS5	Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Irland
FACS Auswertung	CellQuestPro		BD Bioscience, San Jose, Vereinigte Staaten von Amerika
Mithras Driver	Mithras	1.05	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland
Mithras Auswertung	MikroWin	4.41	Siemens AG, München, Deutschland
qRT-PCR Auswertung	CFX-Manager	3.1	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, Vereinigte Staaten von Amerika
Statistik	GraphPad	5.01	GraphPad Software, La Jolla, Vereinigte Staaten von Amerika

2.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10: verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
0,2 ml Eppendorf Tube® safe-lock PCR clean DNA lowBind	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
0,5 ml Eppendorf Tube® safe-lock PCR clean DNA lowBind	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
1,5 ml Eppendorf Tube® safe-lock PCR clean DNA lowBind	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
12-Well-Platte	Corning Inc., New York, Vereinigte Staaten von Amerika

Material und Methoden

2 ml Eppendorf Tube® safe-lock PCR clean DNA lowBind	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
24-Well-Platte	Corning Inc., New York, Vereinigte Staaten von Amerika
96-Well-PCR-Platte, Twin.tec PCR Plate 96	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
BD Vacutainer® (CTAD) 2,7 ml	BD Company, Plymouth, Vereinigtes Königreich
FACS-Röhrchen PP steril, 15 ml	BD Bioscience, San Jose, Vereinigte Staaten von Amerika
Falcon 15 ml	BD Bioscience, San Jose, Vereinigte Staaten von Amerika
Glasplättchen (Maße: 10 x 10 x 1 mm)	Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, Deutschland
Messküvette für Photometer UVette®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Multipet Pipette 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Multipet Pipette 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Multipet Pipette 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Nunc™ Thermanox™ Deckgläser (Durchmesser 13mm)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Pipette 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen Dualfilter 10 µl (PCR clean, steril)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen Dualfilter 100 µl (PCR clean, steril)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen Dualfilter 1000 µl (PCR clean, steril)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Material und Methoden

Reaktionsgefäßständer zum Einfrieren, Nalgene™	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
S-Monovette® 1,2 ml (1,6 mg EDTA/ml Blut)	Sarstedt AG & Co, Numbrecht, Deutschland
S-Monovette® 1,4 ml 9NC (0,14 ml Tri-Natriumcitrat-Lösung 0,106 mol/l)	Sarstedt AG & Co, Numbrecht, Deutschland
S-Monovette® 9 ml ohne Herstellerpräparierung	Sarstedt AG & Co, Numbrecht, Deutschland
Zellkulturflasche 150 cm ²	Corning Inc., New York, Vereinigte Staaten von Amerika
Zellkulturflasche 75 cm ²	Corning Inc., New York, Vereinigte Staaten von Amerika

2.7 Messverfahren

2.7.1 pH-Wertbestimmung

Die pH-Wertbestimmung erfolgt mittels pH-Meter, das aus einer Glaselektrode besteht. Diese misst elektrochemisch die Spannung zwischen einer Glasmembran mit elektrischem Potential, das proportional zur H⁺-Ionen-Konzentration in der Probenlösung ist, und einer Bezugselektrode, welche durch ein Diaphragma in Verbindung mit der Probenlösung steht. Die erzeugte Spannung ist nahezu linear und proportional zum pH-Wert der Probenlösung.

Die Kalibrierung mittels Kalibratorflüssigkeiten (pH-Werten: 10,01 / 7,01 / 4,01) und Messung der Proben erfolgte laut technischem Handbuch.

2.7.2 Zellzählsysteme

Die Zellzahlbestimmung erfolgt bei Zellsuspensionen mittels dem Zellzählsystem CASY®. Die Messung erfolgt hier durch das so genannte „Electrical Current Exclusion“-Verfahren. Hierbei wird eine Zelle beim Durchtritt durch eine Messpore elektrisch erfasst, wobei viable Zellen mit intakter Zellmembran den

Strom unterbrechen und Zellen mit beschädigter Zellmembran dies nicht können. Gleichzeitig wird das Volumen der Zellen bestimmt, welche bei toten Zellen dem Volumen des Zellkerns entspricht. Hierdurch kann eine Differenzierung in viable und nicht viable Zellen sowie eine gleichzeitige Zellzählung pro Volumen Flüssigkeit erfolgen.

Die Zellzählung von Blutbestandteilen erfolgt mittels des Zellzählers ABX-Micros 60, welcher mit Impedanzänderung und Photometrie arbeitet und somit die einzelnen Zellreihen quantifizieren kann.

Casy:

Zur Bestimmung der Zellzahl der EA.hy926 wurden 50 µl Zellsuspension mit 5 ml CASYton® vermischt und anschließend im Programm 2 des CASY® gemessen. Zur Bestimmung der Zellzahl der hVEC wurden 20 µl Zellsuspension mit 5 ml CASYton® vermischt und anschließend im Programm 5 des CASY® gemessen. Die Messung erfolgte wie im technischen Handbuch des Herstellers beschrieben

Für die Lebendzellzahlbestimmung wurde das Medium der Zellen aus den Vertiefungen der 24-Well-Platten abgesaugt, diese mit 500 µl DPBS⁻ gewaschen, mit 500 µl 0,05%igem Trypsin 2 Minuten bei 37°C abgelöst und die Ablösungsreaktion mit 500 µl DMEM-Vollmedium abgestoppt. Die Bestimmung der Zellzahl der lebenden Zellen erfolgte mittels CASY® wie in 2.7.2 beschrieben.

ABX-Micros 60:

Die Quantifizierung der Blutzellen erfolgte aus 10 µl EDTA-Vollblut. Hierzu wurde eine S-Monovette® 1,2 ml (1,6 mg EDTA/ml Blut) in die Messstation eingelegt. Die Messung erfolgte wie im technischen Handbuch des Herstellers beschrieben. Die Ergebnisse wurden von dem zum Zellzähler gehörenden Drucker direkt ausgegeben.

2.7.3 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)

Der MTT-Test zeigt die metabolische Aktivität von lebenden Zellen. Hierzu wird das gelbe Tetrazoliumsalz MTT auf vitale Zellen gegeben. Diese wandeln es

NADH-abhängig im endoplasmatischen Retikulum in das wasserunlösliche dunkelblaue Formazan um. Durch die Zugabe des Alkohols Dimethylsulfoxid (DMSO) werden die Zellen lysiert und der Farbstoff freigesetzt. Dieser kann photometrisch quantifiziert werden und steht im direkten proportionalen Verhältnis zu der Menge an metabolisch aktiven Zellen.

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde das Medium der EA.hy926 abgesaugt, die Zellen mit 500 μl DPBS⁻ gewaschen und anschließend mit 30 μl MTT-Lösung (5mg MTT / 1 ml DPBS⁻) und 300 μl RPMI-Zellkulturmedium (ohne Phenolrot mit 5 mM L-Glutamin) 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Hiernach wurden die Reagenzien entfernt, 200 μl DMSO zur Zellyse hinzugefügt und die Well-Platte leicht geschwenkt. Danach wurden pro Vertiefung jeweils 100 μl in eine Vertiefung einer 96-Well-Platte überführt und die Absorption mittels Photometer bei 540 nm bestimmt. Die photometrische Messung erfolgte laut Handbuch des Photometers Mithras und dem Programm MikroWin mit einem 540 nm Messfilter und einer Messzeit von einer Sekunde.

2.7.4 Fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie (engl. fluorescence-activated cell sorting = FACS)

Die fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie ermöglicht eine Quantifizierung und Charakterisierung von Zellen. Hierzu passieren Zellen nacheinander eine Messöffnung wodurch es zu einer Widerstandsänderung kommt, die proportional zum Volumen der Zelle ist. Anschließend werden die Zellen durch einen Argonlaserstrahl mit einer bestimmten Anregungswellenlänge geführt. Hierbei werden zuvor an definierte Antigene gebundene fluoreszenzmarkierte Antikörper angeregt, ihr charakteristisches Licht auszustrahlen. Dieses wird durch einen Photodetektor gemessen, ist proportional zur Menge der gebundenen Antikörper und somit proportional zu der Menge an Zielproteinen in den Zellen. Generell können bei der Durchflusszytometrie Zellen nach ihrer Charakterisierung sortiert und separat aufgeteilt werden. In unserem Fall erfolgt lediglich eine quantitative Bestimmung einer definierten Zellpopulation. Als Antigen fungiert der Oberflächenrezeptor ICAM-1 und durch die Zellen nach Transfektion der mRNA

Material und Methoden

produziertes autofluoreszentes Protein eGFP. Auch konnte durch die unterschiedlichen charakteristischen Emissionsspektren von eGFP und dem an siRNA gekoppelten fluoreszenten Farbstoff Alexa Fluor 555 eine gleichzeitige quantitative Bestimmung in den gleichen Zellpopulationen ermittelt werden.

Aktivierung mit TNF α :

Um die Genexpression von ICAM-1 zu stimulieren erfolgte 12 Stunden vor der FACS-Messung eine Aktivierung der Zellen mit TNF α . Für die Aktivierung der Zellen wurden 5 ng TNF α / ml Medium verwendet.

Das Medium der Zellen wurde abgesaugt und 400 μ l frisches DMEM-Vollmedium auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden 2,5 ng TNF α in je 100 μ l DMEM-Vollmedium auf die zu aktivierenden Zellen gegeben. Die nicht zu aktivierenden Zellen erhielten ausschließlich 500 μ l DMEM-Vollmedium.

Antikörperfärbung:

Die Antikörperfärbung des Oberflächenrezeptors ICAM-1 der Zellen erfolgte mittels einem aus Mäusen gewonnenen CD54-PE anti-humanen Antikörper. 1,67 μ l des Antikörpers wurden mit 498,33 μ l 0,5 % FCS in DPBS⁻ gemischt. Die Handhabung und weitere Verwendung mit dem Antikörper erfolgte unter abgedunkelten Bedingungen. Das Medium der Versuchszellen wurde abgesaugt, die Zellen mit 500 μ l 0,5 % FCS in DPBS⁻ gewaschen und anschließend mit 500 μ l der zuvor hergestellten Antikörperlösung bedeckt, für 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert und anschließend wie oben beschrieben für die Messung im FACS-Gerät abgelöst. Die Kontrollzellen wurden mit 500 μ l 0,5 % FCS in DPBS⁻ inkubiert.

FACS-Messung:

Die zuvor angezüchteten und je nach Versuch behandelten EA.hy926 wurden nach dem Absaugen des Mediums mit 500 ml DPBS⁻ gewaschen und mit 250 μ l 0,05% Trypsin-EDTA bei 37°C 2 Minuten lang abgelöst. Die Ablösereaktion wurde mit 250 μ l DMEM-Vollmedium gestoppt. Mit den hVECs wurde gleich verfahren. Lediglich wurde hier 0,04% Trypsin/EDTA zum Ablösen, 0,05%/ 0,1%

Trypsin-Inhibitor/BSA zum Stoppen der Ablösereaktion verwendet. Die abgelösten Zellen wurden je Well in ein FACS-Röhrchen transferiert und 5 Minuten bei 300 x g in der Varifuge 3.2 RS zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, so dass das Zellpellet am Röhrchenboden verblieb. Anschließend wurde 150 µl FACS-Lösung, bestehend aus 2,5%igem Paraformaldehyd in DPBS⁻, hinzugegeben und die Zellen mittels vortexen vermischt. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte mit 10.000 Zellen/ Messung im FACScan® und die Auswertung erfolgte mittels der Software BD CellQuest™ Pro.

Für die durchflusszytometrische Messung wurden zunächst unbehandelte Kontrollzellen verwendet um das Gerät auf die Ausgangswerte wie Zellgröße, Granularität und Fluoreszenz zu kalibrieren. Anschließend erfolgte die Messung der Versuchszellen und die Fluoreszenzmessung der 10.000 Zellen wurde als geometrisches Mittel angegeben. Je stärker ein Protein wie ICAM-1 auf der Zelloberfläche der Zellen gebildet wurde, desto mehr fluoreszenz-gekoppelter Antikörper kann an ICAM-1 binden und desto höher liegt das geometrische Mittel.

2.7.5 RNA Isolierung und DNA-Synthese

Die RNA-Isolierung erfolgte mittels des Aurum Total RNA Mini Kit nach den Angaben des Herstellers. Die Zellen wurden lysiert, auf Säulen aufgebracht, die RNA dort in mehreren Schritten aufgereinigt, gewaschen und anschließend eluiert. Die RNA wurde entweder direkt weiter verarbeitet oder für max. 2d bei -20°C oder max. 3 Monate bei -80°C gelagert.

Die Synthese der Komplementär DNA (enlg. Complementary DNA = cDNA) erfolgte aus der zuvor extrahierten RNA nach einer Verdünnung mittels des iScript™ cDNA Synthesis Kit nach den Angaben des Herstellers.

Um jeweils die gleiche RNA-Menge in cDNA umschreiben zu können wurde zunächst die Konzentration der RNA photometrisch bestimmt. Hierzu wurde eine Küvette mit 50 µl nukleasefreiem Wasser als Leerprobe befüllt und im Photometer als Referenz eingesetzt. Anschließend wurden jeweils 5 µl RNA-Lösung und 45 µl nukleasefreiem Wasser in eine Küvette gegeben und im Photometer bei

A260F40 gemessen. Das Ergebnis gibt die RNA Konzentration an. Im Folgenden wurden 200µg RNA in 15 µl nukleasefreiem Wasser in cDNA umgeschrieben. Zur cDNA-Umschreibung wurden 0,5 ml safe-lock PCR clean DNA lowBind Eppendorf Tube® in einen gekühlten Reaktionsgefäßständer gestellt und hierin die benötigte Menge RNA-Lösung mit dem nukleasefreiem Wasser aus dem iScript™ cDNA Synthesis Kit vermischt. Anschließend wurden 5 µl eines Gemisches aus 1 µl Reverser Transkriptase und 4 µl Puffer, welche auch aus dem Kit stammen, hinzu gegeben und anschließend jede Probe kurz gevortext. Anschließend erfolgte die Umschreibung der RNA in cDNA im Mastercycler mit einer 5-minütigen Bindungsphase bei 25°C, der 20-minütigen Transkriptionsphase bei 46°C, einer Inaktivierungsphase für eine Minute bei 95°C und dem Herunterkühlen auf 4°C bis die fertige cDNA entnommen wurde.

2.7.6 quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Eine der revolutionärsten Erfindungen in der Biochemie ist die 1983 eingeführte Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction = PCR) zur Vervielfältigung von DNA in vitro. Die PCR hilft beispielsweise bei der Aufklärung von Verbrechen anhand kleinster Rückstände von DNA-haltigem Material.

Die Bildung der mRNA zur Produktion von Abwehrproteinen, z.B. Rezeptoren oder Abwehrstoffen, kann durch Quantifizierung der ursprünglichen RNA-Menge nachgewiesen werden. Da hierzu die RNA in DNA transkribiert wird, kann mittels PCR auch eine Aussage über die Höhe der Reaktion und dementsprechend der Zellantwort auf äußere Reize getroffen werden.

Die PCR besteht aus sich wiederholenden Zyklen von Denaturierung-Hybridisierung und Elongation der DNA, um deren Vervielfältigung zu erreichen.

Hierzu wird zunächst der DNA-Doppelstrang durch eine erhöhte Temperatur von 95 °C denaturiert und in seine Einzelstränge aufgespalten. Anschließend wird die Reaktionstemperatur auf 50 °C gesenkt, damit die Hybridisierung der sequenzspezifischen Primer erfolgen kann. Diese binden an die komplementären DNA-Abschnitte auf den Einzelsträngen. Durch eine Polymerase werden die zu den Einzelsträngen komplementären Nukleotide ab dem Primer verlängert, sodass

ein weiterer DNA-Doppelstrang entsteht. Somit erfolgt eine exponentielle Vervielfältigung der DNA. Das Reaktionsgemisch wird auf 72 °C erwärmt, da eine Taq-Polymerase aus einem hitzestabilen Mikroorganismus, dem *Thermus aquaticus*, verwendet wird, welche während dem Denaturierungszyklen stabil bleibt. Der gesamte Mechanismus findet innerhalb eines Thermocyclers statt, der die Reaktionsgefäße schnell den benötigten Temperaturen anpassen kann. Zudem werden Puffer verwendet, damit ein optimaler pH-Wert für die Polymerase erhalten bleibt. Dem Reaktionsansatz wird auch Magnesium hinzugefügt, das die Polymerase zur Verlängerung der DNA benötigt.

In dieser Arbeit wurde zusätzlich eine Quantifizierungsmethode verwendet, in der sich bei der qRT-PCR SYBR Green als fluoreszenter Farbstoff nach jedem durchlaufenen Zyklus mit der gebildeten doppelsträngigen DNA interkaliert hat und durch Licht angeregt wurde. Das vom Farbstoff nun emittierte Licht kann vom qRT-PCR Gerät gemessen werden und ist direkt proportional zur Menge an amplifizierter DNA. Sobald das emittierte Licht eine definierte Schwelle übersteigt, werden die bis dahin nötigen Zykluswiederholungen gespeichert und angezeigt. Die Auswertung erfolgte mittels CFX-Manager der Firma BioRad. Die Zyklen der house-keeping-Gene einer jeden Probe werden in Relation der Zyklenanzahl der zu testenden Genen gesetzt. Eine unbehandelte Kontrollprobe wird anschließend auf 1 normalisiert und die Expression der zu untersuchenden Gene in das Verhältnis gesetzt. Hierdurch erhält man die zu einer Kontrolle relative Genexpression, die um ein x-faches erhöht oder erniedrigt sein kann.

In unserem Fall wurde die aus den Zellen gewonnene RNA zuvor mittels der Methode der Reversen Transkription in eine komplementäre DNA umgeschrieben. Hierbei wird mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase ein komplementärer DNA-Strang zur ursprünglichen RNA hybridisiert. Anschließend wird der RNA-Strang abgebaut und die DNA zum Doppelstrang ergänzt.

Als house-keeping-Gene wurden bei der qRT-PCR das Enzym der Glycolyse GAPDH und das zytoplasmatische Strukturprotein β -Actin verwendet. House-keeping-Gene sind Gene, welche in jeder Zelle innerhalb eines Organismus mit

nur sehr geringer Schwankung exprimiert werden. Deshalb geht man davon aus, dass sie sowohl in behandelten als auch in unbehandelten Zellen gleich exprimiert werden und als vergleichbare Größe herangezogen werden können.

Bei der Untersuchung der Expression von ICAM-1 wurde auch hierfür ein Primer verwendet, so wie bei der Untersuchung der Immunreaktion für die spezifischen Primer der zu untersuchenden Gene s. Tabelle 6.

Die Primer wurden bei -20°C aufbewahrt und ein Primermix aus 800 μl nukleasefreiem Wasser, 15 μl sens und 15 μl antisense des Primers hergestellt. Die 2 μl cDNA (aus 2.7.5) wurden mit 48 μl nukleasefreiem Wasser verdünnt. 108 μl Primermix wurden mit 324 μl SYBRGreen zum Hauptmix gemischt. Es wurde eine neue Mischung für jeweils ein Triplet pro Gen aus 36 μl Hauptmix und 18 μl verdünnter cDNA erstellt und dieser mit jeweils 15 μl in 3 Wells der 95-Well-PCR-Platte gegeben. Anschließend wurde die PCR-Platte zentrifugiert und im BioRad-PCR-Cycler die qRT-PCR durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte mittels CFX-Manager der Firma BioRad nach dem oben beschriebenen Prinzip.

2.7.7 ELISA

ELISA ist ein enzymatisches Immunadsorptionsverfahren, welches in drei Phasen abläuft und zur quantitativen Bestimmung von Proteinen dient. Ein auf einer Mikrotiterplatte beschichteter monoklonaler Erstantikörper bindet spezifisch an das in der Probe vorhandene und zu untersuchende Protein. Nach einem Waschschrift aller ungebundenen Komponenten wird ein Enzym konjugierter Zweitantikörper, auch Detektionsantikörper genannt, hinzugegeben, der an ein anderes Epitop als der Erstantikörper des zu untersuchenden Proteins bindet. Ungebundene Antikörper werden in einem weiteren Waschschrift entfernt. In der dritten Phase wird ein chromogenes Enzymsubstrat hinzugefügt. Das zuvor gebundene Enzym reagiert mit dem Farbsubstrat und eine neue Färbung der Lösung entsteht. Diese Reaktion wird nach einer festgelegten Zeit mit einer Stopplösung beendet. Die Farbintensität ist proportional zur Proteinkonzentration in der Probe und wird mittels Photometer bestimmt. Zur Berechnung der Konzentration in den

unbekannten Proben wird eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen mitgetestet.

Die verwendeten Test-Kits, s. Tabelle 7, sind für jeden nachzuweisenden Reaktanten der Zellen und des Komplementsystems spezifisch und enthalten die jeweilig spezifischen Antikörper sowie notwendigen Reagenzien. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben, wie in 2.10.3.3 beschrieben.

2.8 Vorbereitung der Glasplättchen

Als Trägermaterialien für die PLGA-Beschichtungen dienten Glasplättchen bzw. Deckgläschen.

Für die Versuche der pH-Veränderung, Zellviabilität, Hämokompatibilität und Ko-transfektion wurden Nunc™ Thermanox™ Deckgläser mit einem Durchmesser von 13 mm verwendet. Die unsterilen Gläser wurden hochkant aufgestellt und mit einer 70%igen Ethanollösung eingesprüht und getrocknet.

Für die restlichen Versuche wurde für die bessere Übertragbarkeit der Glasplättchen auf neue Zellen quadratische Glasplättchen mit den Maßen 10 x 10 x 1 mm verwendet. Sie wurden in einer 2%igen Hellmanexlösung mittels Ultraschallbad gereinigt, anschließend mit dem demineralisierten Wasser Ampuwa gespült und getrocknet. Hiernach erfolgte eine Dampfsterilisation für 20 Minuten bei 121 °C. Die Vorbereitung, Beschichtung und Weiterverarbeitung der Plättchen erfolgte stets unter sterilen Bedingungen.

2.9 Untersuchung des Einflusses der PLGA-Beschichtung auf den pH-Wert von Zellkulturmedium

2.9.1 Beschichtung der Glasplättchen mit PLGA

Zur Messung der pH-Wertänderung bei der Hydrolyse der PLGA-Beschichtungen wurden Nunc™ Thermanox™ Deckgläser wie in 2.8 beschrieben vorbereitet. PLGA 1, PLGA 2 und PLGA 3 (vgl. 2.1) wurden für jeden Versuch täglich frisch in Ethylacetat aufgelöst. 100 µl PLGA-Lösung (0,5 µg / µl PLGA in Ethylacetat)

wurden auf ein Deckglas pipettiert und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur (RT) getrocknet. Dies erfolgte jeweils in Duplikaten je PLGA.

2.9.2 Inkubation des Zellkulturmediums

Am nächsten Tag wurde in die äußeren Vertiefungen einer 24-Well-Platte jeweils 1 ml DPBS⁻ als Verdunstungsschutz gefüllt. In die innen liegenden Vertiefungen wurden die am Vortag angefertigten Deckgläser mit der Beschichtung nach oben eingelegt. Zusätzlich dienten zwei unbeschichtete Deckgläser als Kontrollen. Jedes Deckglas wurde mit 2 ml DMEM-Vollmedium bedeckt. Die 24-Well-Platten wurden bei 37°C inkubiert. Vgl. hierzu auch Abbildung 6.

2.9.3 Messung des pH-Wertes

Um den Ausgangswert der zu erwartenden pH-Wertänderung festzustellen wurde am selben Tag der pH-Wert des verwendeten DMEM-Vollmediums mittels pH-Meter gemessen.

Die 24-Well-Platte wurde nach einer Woche aus dem Inkubator entnommen. Es erfolgten jeweils zwei Messungen aus dem Überstand aus einer Vertiefung mittels pH-Meter in oben beschriebener Weise.

Es wurden Wellplatten in oben beschriebener Weise für Messungen nach ein, zwei, drei und vier Wochen Inkubation hergestellt und der pH-Wert bestimmt.

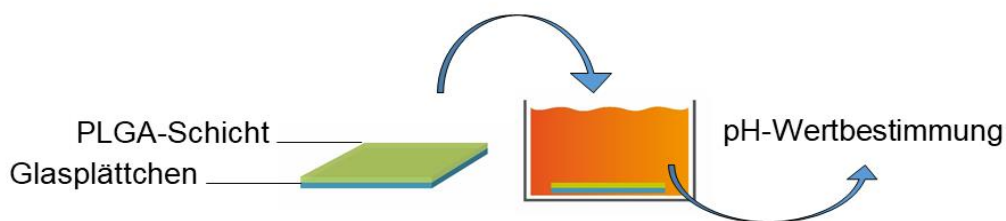


Abbildung 6: Versuchsaufbau der Messung der pH-Wertveränderung

Die Abbildung zeigt den Versuchsaufbau der Messung der pH Wertveränderung. Das mit 50 µg PLGA 1, PLGA 2 oder PLGA 3 beschichtete Glasplättchen wurde mit DMEM-Vollmedium inkubiert. Nach der Inkubationszeit von einer, zwei, drei oder vier Wochen wurde der Überstand entnommen und hieraus der pH-Wert bestimmt.

2.10 Untersuchung der Biokompatibilität der PLGA-Beschichtungen

2.10.1 Untersuchung des Einflusses von PLGA-Beschichtungen auf die Zellviabilität von EA.hy926

Da es nicht möglich war die Zellen mikroskopisch auf den Beschichtungen zu untersuchen und ihre Morphologie zu bestimmen, wurden die Überstände der Beschichtungen verwendet, um einen Eindruck von der Biokompatibilität der Beschichtung zu gewinnen.

Der im Folgenden beschriebene Versuchsaufbau (vgl. auch Abbildung 7) wurde für Inkubationszeiten von einer, zwei, drei und vier Wochen durchgeführt.

Der Versuchsaufbau war wie folgt: es wurden die Beschichtungen auf Glasplättchen hergestellt, wie in 2.9 beschrieben und mit DMEM-Vollmedium für die entsprechende Zeit inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Glasplättchen ohne Beschichtung. Der Überstand aus den Vertiefungen wurde abgenommen und 100.000 EA.hy926, wie in 2.2.2.3 beschrieben, angezchtet und 48 Stunden bei 37°C mit dem PLGA konditioniertem Medium inkubiert.

Anschließend wurde die Lebendzellzahl mittels Casy, wie in 2.7.2, und die Zellviabilität mittels MTT-Test, wie in 2.7.3 beschrieben, bestimmt. Die Ergebnisse geben Rückschlüsse auf die Zellverträglichkeit der PLGA-Beschichtung.

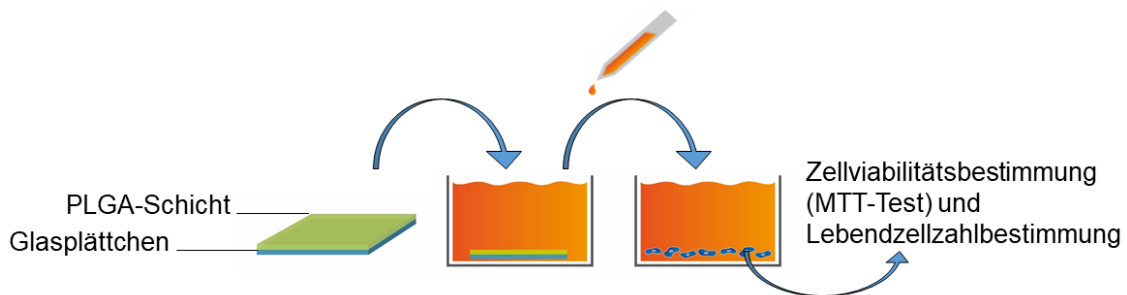


Abbildung 7: Versuchsaufbau der Messung der Zellviabilität

Die Abbildung zeigt den Versuchsaufbau der Messung der Zellviabilität von EA.hy926, welche mit DMEM-Vollmedium angezchtet wurden und welches wiederum zuvor mit 50 µg PLGA 1, PLGA 2 oder PLGA 3 beschichteten Glasplättchen konditioniert wurde. Die Inkubationszeit betrug in unabhängigen Experimenten eine, zwei, drei oder vier Wochen.

2.10.2 Untersuchung der Beschichtungen in Hinblick auf die inflammatorische Reaktion von hVECs

Dieser Versuch wurde in unabhängigen Versuchsdurchgängen an 4 hVEC-Zelllinien durchgeführt.

2.10.2.1 Komplexierung der siRNA mit Lipofectamine®2000

Für die Transfektion von siRNA in Zellen ist eine zuvor erfolgte Komplexierung der siRNA mit dem hier verwendeten Transfektionsmittel Lipofectamine®2000 nötig. Hierzu wurden im Verhältnis 3 µg siCAM bzw. siSCR mit 1,98 µl Lipofectamine®2000 und 36,77 µl DMEM-Vollmedium vermischt und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Zudem wurde eine Kontrolle ohne siRNA aus 1,98 µl Lipofectamine®2000 und 48,02 µl DMEM-Vollmedium hergestellt und ebenfalls 30 Minuten bei RT inkubiert.

2.10.2.2 Beschichtung der Glasplättchen

Quadratische Glasplättchen wurde wie in 2.8 beschrieben vorbereitet. PLGA 1, PLGA 2 und PLGA 3 (vgl. 2.1) wurden für jeden Versuch täglich frisch in Ethylacetat aufgelöst. 50 µl PLGA-Lösung (1 µg / µl PLGA in Ethylacetat) wurde jeweils mit den Ansätzen aus 2.10.2.1 vermischt und anschließend zusammen auf ein Glasplättchen pipettiert. Als Kontrollen wurde jeweils 50 µg PLGA 1, PLGA 2 und PLGA 3 ohne Zusätze aufgebracht. Alle beschichteten Glasplättchen wurden anschließend über Nacht bei RT getrocknet. Dies erfolgte jeweils in Duplikaten je Beschichtungsart.

2.10.2.3 Inkubation der Zellen

120.000 hVECs/Well wurden einen Tag zuvor wie in 2.2.2.3 beschrieben in den Vertiefungen einer 24-Well-Platte angezchtet und 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Nach der Trocknung der Beschichtungen auf den Glasplättchen wurde das Medium der Zellen gewechselt und vorsichtig mit der beschichteten Seite der Glasplättchen auf die Zellen gelegt (vgl. Abbildung 8). Als Kontrolle dienten je PLGA 2 Wells ohne beschichtete Plättchen. Dieser so genannte Umkehrversuch (= engl. Reverse-Assay) wurde erstmalig von Wintermantel et al. beschrieben und

bereits bei mehreren Tests zur Untersuchung der Verträglichkeit von Schichtsystemen in unserem Labor durchgeführt [Wintermantel, 2002]. Die Verwendung dieser Methode wurde vom Labor eingeführt, als man bemerkte, dass Zellen auf manchen Schichtsystemen nicht anwachsen oder wie in diesem Fall eine mikroskopische Untersuchung der Zellen aufgrund der großen Schichtdicke nicht möglich ist. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Ähnlichkeit zur echten klinischen Anwendung, denn bei dieser befinden sich die Endothelzellen bereits im Blutgefäß und der Stent wird mitsamt seiner Beschichtung in das Endothel gedrückt. Am folgenden Tag wurde ein erneuter Mediumswechsel durchgeführt.

2.10.2.4 RNA-Extraktion der Zellen

Nach 48 stündiger Konditionierung der hVECs erfolgte die RNA-Isolierung und cDNA-Synthese wie in 2.7.5 beschrieben.

2.10.2.5 dsRNA-Kontrollen

Als Positivkontrolle zu den oben genannten Beschichtungen diente dsRNA, diese wurde durch eine Transfektion ohne Beschichtung appliziert. Hierzu wurde 1 µg dsRNA mit 0,99 µl Lipofectamine®2000 und 300 µl DMEM-Vollmedium bzw. 5 µg dsRNA mit 3,3 µl Lipofectamine®2000 und 300 µl DMEM-Vollmedium vermischt, für 20 Minuten bei RT inkubiert und anschließend auf die einen Tag zuvor angezüchteten hVECs (s.o.) gegeben und zusammen im Brutschrank bei 37°C für 1 Stunde inkubiert. Hierauf wurde ein Mediumswechsel mit hVEC-Zellkulturmedium durchgeführt und die Zellen weitere 12 Stunden im Brutschrank inkubiert. Als Negativkontrolle dienten hVEC ohne RNA Konditionierung. Diese Vorgehensweise erfolgte jeweils in Duplikaten. Nach der Inkubationszeit erfolgte die RNA-Isolierung und cDNA-Synthese wie in 2.7.5 beschrieben.

2.10.2.6 Messung der Expression von Entzündungsmediatoren mittels qRT-PCR

Die Expression von Entzündungsmediatoren, welche in 1.6 beschrieben sind, wurden mittels qRT-PCR, wie in 2.7.6 beschrieben, bestimmt.

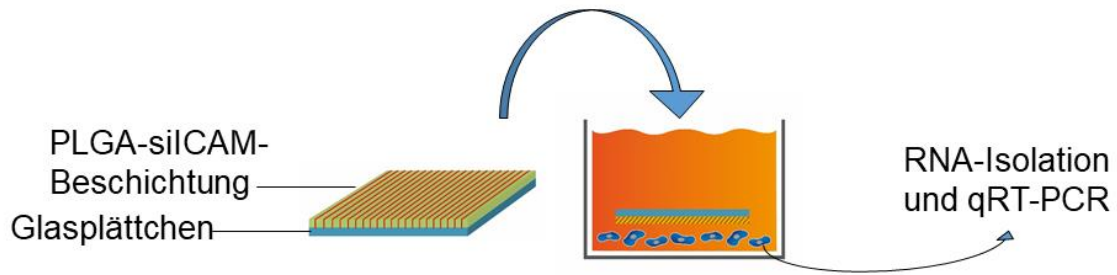


Abbildung 8: Versuchsaufbau der Untersuchung der inflammatorische Reaktion von hVECs
Die Abbildung zeigt den Versuchsaufbau der Messung der Expression von Entzündungsmediatoren von hVECs welche mit 3 µg silCAM bzw. siSCR enthaltenden 50 µg PLGA 1-3 Beschichtungen mittels Reverse-Assay 48 Stunden inkubiert wurden. Hiernach erfolgte die RNA-Isolation, cDNA-Umschreibung und anschließend eine qRT-PCR der Gene von Entzündungsmediatoren.

2.10.3 Untersuchung der Hämokompatibilität von PLGA-Beschichtungen

Dieser Versuch wurde in unabhängigen Versuchsdurchgängen an 6 Blutproben durchgeführt.

2.10.3.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte in Monovetten® ohne Herstellerpräparierung. Vor der Blutentnahme wurde in die Monovetten® 0,9 ml einer 0,2%igen Heparinlösung ($\cong 1$ IE) eingefüllt. Die Blutentnahme erfolgte nach Einverständnis der Probanden und unter größtmöglicher Sorgfalt nach den Richtlinien des Labors. Die Genehmigung ist in der „Untersuchung der Hämokompatibilität von RNA-funktionalisierten Polymeren“ mit der Ethiknummer 442/2013BO2 mitinbegriffen.

2.10.3.2 Inkubation des Blutes

Es wurde jeweils ein Glasplättchen, welches wie in 2.9.1 beschrieben tags zuvor mit PLGA 1, PLGA 2 oder PLGA 3 beschichtet wurde, in die Vertiefung einer 12-Well-Platte gelegt und mit 3 ml Blut bedeckt. Die Proben wurden eine Stunde lang unter leichtem schwenken bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Dies erfolgte je PLGA in Duplikaten.

Nach der Inkubation wurde das Blut je PLGA zusammengemischt und das Blut in mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Tri-Natrium-Citrat (CTAD) und Citrat vorpräparierten Röhrchen gefüllt. Aus den EDTA-Röhrchen wurde direkt die Zellzahl von Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, Lymphozyten, Monozyten und

Granulozyten mittels Zellzähler ermittelt und bis zur weiteren Verwendung zusammen mit den CTAD-Röhrchen auf Eis gelagert. Hiernach wurden die EDTA- und CTAD-Röhrchen bei 2500 rpm für 20 Minuten bei 4°C in der Zentrifuge zentrifugiert. Die Citrat-Röhrchen wurden direkt nach dem Befüllen bei 1800 rpm für 18 Minuten bei RT zentrifugiert.

Aus den Citrat- und EDTA- Röhrchen wurde 200 µl Plasmaüberstand abgenommen, in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und in Stickstoff schockgefroren. Aus den CTAD-Röhrchen wurde die mittlere Fraktion des Plasmaüberstandes abgenommen, in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und weitere 20 Minuten bei 2500 rpm und 4°C in der Zentrifuge zentrifugiert. Hiernach wurden 600 µl der mittleren Fraktion des Plasmas abgenommen, in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und in Stickstoff schockgefroren. Die gefrorenen EDTA-Proben wurden bei -80°C, die CTAD- und Citrat-Proben bei -20°C aufbewahrt.

2.10.3.3 Messung von Markern der Hämokompatibilität mittels ELISA

Die Proteinexpression wurde mittels eines jeweils spezifischen ELISA gemessen. Das Prinzip des ELISA wird in 2.7.7 beschrieben. Die zu testenden Proteine sind in 1.7 näher beschrieben. Die Anwendung der Test-Kits, s. Tabelle 7, erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

β-TG:

Von den zu testenden Proben wurden 200 µl in die Vertiefungen der 96-Well-Platte mit einer Beschichtung aus Kaninchen-Antikörper gegen humanes β-TG gegeben. Als Proben dienen Phosphatpuffer und die Standardreihe des Herstellers als Vergleichsreihe und das auszuwertende CTAD-Plasma aus 2.10.3.2, welches 1:21 mit Phosphatpuffer verdünnt wurde. Nach 60 Minuten wurden die Proben abgesaugt, die Platte je Vertiefung 5 mal mit 300 µl Waschlösung gewaschen und anschließend mit 200µl Konjugatlösung, welche peroxidase-gekoppeltes Kaninchen-Antikörper gegen humanes β-TG enthält, für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben wiederum gewaschen und mit 200 µl des Substrates Tetramethylbenzidin (TMB) pro Vertiefung für 5 Minuten inkubiert und danach die Reaktion mit 50 µl Schwefelsäure abgestoppt. Die Extinktionen

wurden im Mikrotiterplatten-Photometer bei 450nm gegen den Phosphatpuffer als Leerwert abgelesen und korrelieren mit der Konzentration an β -TG im Plasma. Der Messbereich beträgt 5 bis 250 IU/ml β -TG-Proben, die über der maximalen Grenze liegen wurden mit einer Probenverdünnung von 1:105 erneut getestet. Die Eichkurve des β -TG-ELISAs ist als doppellogarithmische Spline-Kurve im Mikrotiterplatten-Photometer programmiert. Die Konzentrationen wurden direkt in IU/ml abgelesen. Bei den nachträglich verdünnten Proben waren die ermittelten Konzentrationswerte mit 5 zu multiplizieren.

PMN-Elastase:

Die Menge an PMN-Elastase aus den Citratplasmaproben wurde nach einer Verdünnung von 1:100 mit Standardprobenverdünnungspuffer getestet. Von den zu testenden Proben wurden 100 μ l in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte mit einer Beschichtung aus einem polyklonalen Antikörper gegen PMN-Elastase gegeben. Als Proben dienten Phosphatpuffer und die Standardreihe des Herstellers als Vergleichsreihe, sowie das auszuwertende Citrat-Plasma aus 2.10.3.2. Nach 60 Minuten auf einem Schüttelthermostat bei RT wurden die Proben abgesaugt, die Platte je Vertiefung 4 mal mit 300 μ l Waschlösung gewaschen und anschließend mit 150 μ l Konjugatlösung, welche peroxidase-gekoppelte Antikörper gegen humanen α 1-Proteinase-Inhibitor enthält, für 60 Minuten inkubiert. In dieser Zeit bildete sich ein Sandwich-Komplex aus. Anschließend wurden die Proben wiederum gewaschen und mit 200 μ l des Substrates TMB pro Vertiefung für 20 Minuten inkubiert und danach die Reaktion mit 50 μ l Schwefelsäure abgestoppt. Die Extinktionen wurden im Mikrotiterplatten-Photometer bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm gegen den Phosphatpuffer als Leerwert abgelesen und ist direkt proportional mit der Konzentration an PMN-Elastase im Plasma. Die Eichkurve der PMN-Elastase-ELISAs ist als geglättete Spline-Funktion mit lin-log-Koordinaten im Mikrotiterplatten-Photometer programmiert. Die gemessenen Extinktionen wurden automatisch anhand der Eichkurve in ng / ml-Konzentrationen ausgedruckt.

TAT:

Der TAT-Komplex wurde aus den Citratplasmaproben getestet. Von den zu testenden Proben wurden 50 µl in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte mit einer Beschichtung aus einem polyklonalen Antikörper gegen Thrombin gegeben. Als Proben dienen Phosphatpuffer und die Standardreihe des Herstellers als Vergleichsreihe, sowie das auszuwertende Citrat-Plasma aus 2.10.3.2. Nach 15 Minuten auf einem Varishaker/Inkubator bei 37°C wurden die Proben abgesaugt, die Platte je Vertiefung 3 mal mit 300 µl Waschlösung gewaschen und anschließend mit 100 µl Konjugatlösung, welche peroxidase-gekoppelte Antikörper gegen humanes Antithrombin III enthielt, für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit bildete sich ein Sandwich-Komplex aus. Anschließend wurden die Proben wiederum gewaschen und mit 100 µl des chromogenen Substrates TMB pro Vertiefung für 30 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert und danach die Reaktion mit 100 µl Schwefelsäure abgestoppt. Die Extinktionen wurden im Mikrotiterplatten-Photometer bei 490 nm gegen den Phosphatpuffer als Leerwert abgelesen und ist direkt proportional mit der Konzentration an TAT im Plasma.

Bei Ergebnissen die außerhalb der Eichgeraden liegen, wurde eine Verdünnung von zunächst 1:51 und bei weiterhin erhöhten Werten über dem höchsten Standard von 60 µg/l mit 1:101 gemacht und die Proben nochmals getestet. Die Eichkurve des TAT-ELISAs ist als doppel-logarithmische Bezugskurve in das Mikrotiterplatten-Photometer programmiert, die Extinktionen der Proben wurden direkt abgelesen und die Konzentrationen in µg/l angezeigt. Bei den zusätzlich verdünnten Proben sind die Werte mit 51 bzw. bei weiterer Verdünnung mit 101 zu multiplizieren.

C3a:

Das C3a-desArg wurde aus den EDTA-Plasmaproben aus 2.10.3.2 nach einer Verdünnung von 1:201 mit Standardprobenverdünnungspuffer bestimmt. Von den zu testenden Proben wurden 100 µl in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte mit einer Beschichtung aus einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen das C3a-desArg gegeben. Als Proben dienen Phosphatpuffer, die Standardreihe des Herstellers als Vergleichsreihe und das auszuwertende EDTA-Plasma. Nach

Material und Methoden

eine Inkubationszeit von 60 Minuten bei RT wurden die Proben abgesaugt, die Platte je Vertiefung 4 mal mit 300 µl Waschlösung gewaschen und anschließend mit 100 µl Konjugatlösung, welche peroxidase-gekoppelte Antikörper gegen humanes C3a-desArg enthält, für 60 Minuten bei RT inkubiert. In dieser Zeit bildet sich ein Sandwich-Komplex aus. Anschließend wurden die Proben wiederum gewaschen und mit 100 µl des chromogenen Substrates TMB pro Vertiefung für 15 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert und danach die Reaktion mit 100 µl Schwefelsäure abgestoppt. Die Extinktionen der Proben wurden im Mikrotiterplatten-Photometer bei 450 nm gegen den Phosphatpuffer als Leerwert abgelesen und sind direkt proportional mit der Konzentration an C3a-desArg und somit C3a im Plasma. Die Eichkurve ist im Mikrotiterplatten-Photometer als lineare Spline Bezugskurve einprogrammiert. Das Ergebnis der Extinktion der C3a-desArg Konzentration wurde in ng/ml angegeben. Dieses Ergebnis muss mit der Verdünnung bei 1:201 entsprechend mit 201 multipliziert werden.

SC5b-9:

Der im Folgenden beschriebene ELISA weist die Konzentration an SC5b-9 im EDTA-Plasma der Proben aus 2.10.3.2 nach, welches als Grad der Komplementaktivierung herangezogen wird. Es werden EDTA-Plasmaproben nach einer Verdünnung von 1:10 mit Standardprobenverdünnungspuffer getestet. Nachdem die Well-Platte mit 300 µl Waschlösung je Vertiefung 2 Minuten bei RT rehydriert wurde, werden von den zu testenden Proben je 100 µl in die Vertiefungen der 96-Well-Platte mit einer Beschichtung aus einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen den C9-Ring von SC5b-9 gegeben. Als Proben dienen Phosphatpuffer, die Standardreihe des Herstellers als Vergleichsreihe und das auszuwertende EDTA-Plasma. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei RT werden die Proben abgesaugt, die Platte je Vertiefung 5 mal mit 300 µl Waschlösung gewaschen und anschließend mit 100 µl Konjugatlösung, welche Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörper gegen humanes SC5b-9 enthält, für 30 Minuten bei RT inkubiert. In dieser Zeit bildet sich ein Sandwich-Komplex aus. Anschließend werden die Proben wiederum gewaschen und mit 100 µl des chromogenen Sub-

strates TMB pro Vertiefung für 15 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert und danach die Reaktion mit 100 µl Schwefelsäure abgestoppt. Die Extinktionen werden im Mikrotiterplatten-Photometer bei 450 nm gegen den Phosphatpuffer als Leerwert abgelesen und ist direkt proportional mit der Konzentration an SC5b-9 im Plasma.

Die Eichkurve der Extinktion des SC5b-9-ELISAS ist als lineare Bezugskurve in das Konzentrationen Mikrotiterplatten-Photometer programmiert, die Extinktionen der Proben werden direkt abgelesen und die Konzentrationen in ng/ml angezeigt. Da zu Beginn eine Verdünnung von 1:10 erfolgte, müssen die Werte mit 10 multipliziert werden.

Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad, unter Verwendung des arithmetischen Mittelwerts (MW) mit Standardabweichung und Darstellung erfolgte mittels Balkendiagramm.

2.11 Untersuchung der Transfektionseffizienz von PLGA-siRNA-Beschichtungen

Mit diesem Versuch sollten zwei Dinge untersucht werden. Zum einen sollte die geeignetste siRNA-Menge, welche zu einer sehr guten Transfektionseffizienz führt gesucht werden, und zum anderen sollten die PLGAs hinsichtlich ihrer Eignung zur effektiven Freisetzung und Transfektion der siRNA in EA.hy926 untersucht werden.

2.11.1 Komplexierung der siRNA AF 488 mit Lipofectamine®2000

Für die Transfektion von siRNA in Zellen ist eine zuvor erfolgte Komplexierung der siRNA mit dem hier verwendeten Transfektionsmittel Lipofectamine®2000 nötig. Hierzu wurden siRNA AF 488, Lipofectamine®2000 und DMEM-Vollmedium im Verhältnis wie in Tabelle 11 beschrieben vermischt und für 30 Minuten bei RT inkubiert.

Tabelle 11: Mengenangabe der Reagenzien für siRNA Komplexierung

siRNA Menge in μg	Lipofectamine Menge in μl	siRNA Menge in μl	DMEM-Vollmedium in μl
1	0,99	3,75	45,26
3	1,98	11,25	36,77
6	3,96	22,5	23,54

2.11.2 Beschichtung der Glasplättchen mit PLGA und siRNA AF 488

Vor der Beschichtung wurden die quadratischen Glasplättchen wie in 2.8 beschrieben vorbereitet.

Für die PLGA-Lösung mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Ethylacetat wurde PLGA mit Ethylacetat vermischt und auf einem Schüttler bei 50 rpm und RT für 30 Minuten aufgelöst.

Anschließend wurden 50 μl der PLGA-Lösung mit 50 μl der jeweiligen siRNA-Lösung gevortext, auf ein Glasplättchen aufpipettiert und anschließend trocknen gelassen.

Als Kontrollen wurden Glasplättchen mit 50 μg PLGA beschichtet.

Es wurden Glasplättchen als Triplett für jede Kombination von PLGA 1, PLGA 2 und PLGA 3 mit jeder siRNA-Konzentration (1, 3 und 6 μg) hergestellt.

2.11.3 Anzucht der Zellen

100.000 EA.hy926 pro Vertiefung einer 24-Well-Platte wurden wie in 2.2.2.3 beschrieben angezüchtet und über Nacht bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

2.11.4 Inkubation der Zellen mit der PLGA-Beschichtung

Am folgenden Tag wurde bei den angezüchteten EA.hy926 ein Mediumswechsel durchgeführt und die beschichteten Glasplättchen mit der Beschichtungsseite zu den Zellen auf die Zellen gelegt. Hiernach erfolgte die Inkubation der Zellen mit der PLGA-Beschichtung unter Zellkulturbedingungen für 24 Stunden.

2.11.5 Messung der Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometer

Die durchflusszytomerische Messung erfolgte mit 10.000 Zellen / Messung im FACScan® wie in 2.7.4 beschrieben.

2.12 Untersuchung der Verringerung der ICAM-1 Expression von Endothelzellen nach Kontakt mit PLGA-siRNA-Beschichtung

Die Untersuchung der verringerten ICAM-1 Expression in Endothelzellen erfolgte sowohl in EA.hy926 und hVECs auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie und auf mRNA Ebene mittels qRT-PCR.

Hierfür erfolgte die Komplexierung der siRNAs siICAM und siSCR wie in 2.10.2.1 und die Beschichtung der Nunc™ Thermanox™ Deckgläser mit einem Durchmesser von 13 mm wie in 2.10.2.2 beschrieben. 100.000 EA.hy926 bzw. 120.000 hVECs pro Vertiefung einer 24-Well-Platte wurden wie in 2.2.2.3 beschrieben angezchtet und über Nacht bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

Am folgenden Tag wurde bei den angezchteten EA.hy926 ein Mediumswechsel durchgeführt und die beschichteten Glasplättchen mit der Beschichtungsseite zu den Zellen auf die Zellen gelegt. Hiernach erfolgte die Inkubation der Zellen mit der PLGA-Beschichtung unter Zellkulturbedingungen für 24 Stunden.

Anschließend erfolgte die Aktivierung mittels TNF α , für den Proteinnachweis die Antikörperfärbung mittels dem CD54-PE Antikörper und die durchflusszytometrische Messung wie in 2.7.4, bzw. RNA-Isolierung und cDNA-Synthese wie in 2.7.5 sowie die quantitative Bestimmung der mRNA Expression von ICAM-1 mittels qRT-PCR wie in 2.7.6 beschrieben.

2.13 Untersuchung der Langzeitfreisetzung von siRNA aus einer mehrschichtig aufgebauten PLGA-siRNA-Beschichtung

2.13.1 Beschichtung der Glasplättchen mit PLGA und siRNA AF 488

Um siRNA über längere Zeit frei zusetzen, wurde ein mehrschichtiger Aufbau einer PLGA- siSCR-AF488-Beschichtung, im Folgenden Multilayerbeschichtung genannt, entwickelt. Diese bestand aus 5 PLGA- und 4 siRNA-Schichten.

Vor der Beschichtung wurden die quadratischen Glasplättchen wie in 2.8 beschrieben vorbereitet.

Für die PLGA-Schichten wurde eine PLGA-Stammlösung hergestellt, indem 3 mg PLGA pro 70 µl Ethylacetat über 30 Minuten auf einem Schüttler bei 50 rpm und RT aufgelöst wurden. Danach wurden aus der Stammlösung zwei Lösungen mit Konzentrationen von 0,5 mg in 70 µl und 1 mg in 70 µl unter Zugabe von Ethylacetat hergestellt.

Um einen „Burst-Release“, also eine zu Beginn schnelle Freisetzung, zu verhindern, wurde für die oberste fünfte PLGA-Schicht mehr Material als für die restlichen Schichten verwendet. So wurden für die oberste fünfte PLGA-Schicht 1 mg PLGA in 70 µl Ethylacetat gelöst, auf ein Glasplättchen aufgebracht und für eine Stunde bei RT unter der Sterilwerkbank trocknen gelassen. Für die PLGA-Schichten eins bis vier waren es 0,5 mg PLGA in 70 µl, welche für je 30 Minuten bei RT unter der Sterilwerkbank trocknen gelassen wurden.

Zwischen den PLGA-Schichten wurden 25 µl siRNA-Lipofectamine-Komplexe aufgebracht und eine Stunde bei RT unter der Sterilwerkbank trocknen gelassen (Vgl. auch Abbildung 9). Zur siRNA-Komplexbildung wurden im Verhältnis 3 µg siSCR AF 488, 1,98 µl Lipofectamine®2000 und 11,77 µl DMEM-Vollmedium vermischt und 30 Minuten bei RT unter der Sterilwerkbank im Dunkeln inkubiert.

Nachdem die Schichten getrocknet waren wurden die beschichteten Glasplättchen über Nacht in einem Exsikkator bei bestehendem Unterdruck aufbewahrt. Hier sollte ein ausreichendes Ausdampfen des Ethylacetats gewährleistet werden, um die Zellen am nächsten Tag nicht negativ zu beeinflussen.

Als Kontrollen wurden Glasplättchen mit 3 mg PLGA ohne siRNA beschichtet.

Die beschichteten Glasplättchen wurden als Tripletts für jedes PLGA (PLGA 1, PLGA 2 und PLGA 3) angefertigt.

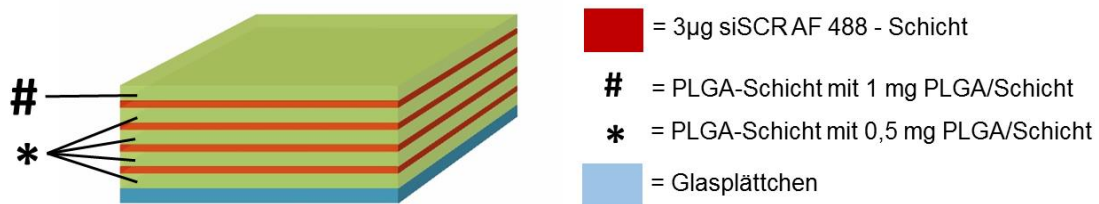


Abbildung 9: Schema der Multilayerbeschichtung

Die Abbildung zeigt den Schichtaufbau der beschichteten Glasplättchen für die Langzeitfreisetzung von fluoreszenzmarkierter siRNA.

2.13.2 Untersuchung der Langzeitfreisetzung

Die Anzucht der EA.hy926 und Konditionierung mit den Multilayerbeschichtungen erfolgte wie in 2.11 beschrieben. Nach 24-stündiger Inkubation in den ersten 10 Tagen und 48-stündiger Inkubation mit einem Mediumswechsel nach 24 Stunden wurden die Glasplättchen auf frische Zellen, welche wiederum tags zuvor angezüchtet wurden und bei denen ein Mediumswechsel durchgeführt worden war, übertragen (vgl. auch Abbildung 9).

Die konditionierten Zellen wurden wie in 2.2.2.3 beschrieben abgelöst und durchflusszytometrisch die Transfektionseffizienz bestimmt.

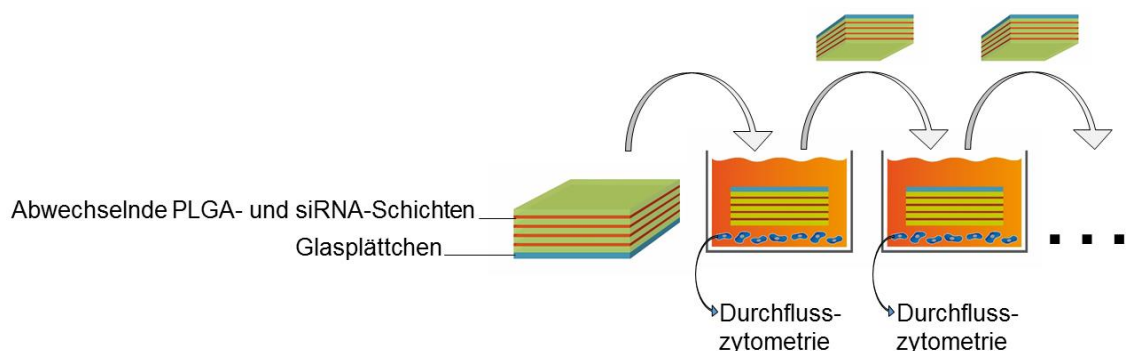


Abbildung 10: Versuchsaufbau Langzeitfreisetzung siSCRAF 488

Für die Langzeitfreisetzung und Transfektion der fluoreszenzmarkierten siRNA wurden Glasplättchen, welche mit einer Multilayerbeschichtung beschichtet wurden, mit der beschichteten Seite auf EA.hy926 gelegt und 24 Stunden inkubiert. Hiernach wurden die Glasplättchen auf neue EA.hy926 übertragen und die alten Zellen im Durchflusszytometer untersucht. Dies erfolgte für 20 Durchgänge.

2.14 Kotransfektion von eGFPmRNA und siSCR-AF 555-siRNA

2.14.1 Komplexierung der mRNA und siRNA mit Lipofectamine®2000

Ein Transfektionsansatz aus 10 µg eGFPmRNA, 3 µl siSCR-AF 555-siRNA, 2 µl Lipofectamine®2000 und 36,8 µl DMEM-Vollmedium wurde vermischt und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Ebenso erfolgten Ansätze für reine eGFPmRNA, reine siSCR-AF 555-siRNA und Kontrollansätze mit reinem Lipofectamine®2000.

2.14.2 Beschichtung der Glasplättchen

Nunc™ Thermanox™ Deckgläser mit einem Durchmesser von 13 mm wurden wie in 2.8 beschrieben vorbereitet. 50 µl einer 1 µg/µl PLGA 1 Ethylacetatlösung wurde mit 50 µl Transfektionsansatz vermischt, auf die Deckgläschen aufgetragen und über Nacht getrocknet. Als Kontrolle wurde 100 µl einer 0,5 µg/µl PLGA 1 Ethylacetatlösung aufgebracht und getrocknet.

2.14.3 Anzucht der Zellen

130 000 EA.hy926 wurden pro Vertiefung einer 12-Wellplatte mit 1000 µl DMEM-Vollmedium angezüchtet und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.14.4 Inkubation der Zellen mit der PLGA-Beschichtung

Am zweiten Tag erfolgte ein Mediumswechsel und das Auflegen der am Tag zuvor beschichteten Deckgläser mit der beschichteten Seite auf die Zellen. Anschließend erfolgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37°C für 48 Stunden. Als zusätzliche Kontrolle dienten Deckgläser ohne Beschichtung und Zellen ohne aufgelegtem Deckglas.

2.14.5 Messung der Transfektionseffizienz

Nach der Inkubation erfolgte die Aktivierung mit TNFα, Antikörperfärbung und durchflusszytometrische Messung mit 10.000 Zellen / Messung wie in 2.7.4 beschrieben.

2.15 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung aller in dieser Arbeit beschriebener Versuche erfolgte mittels Testung auf Normalverteilung, eines Ausreiser-tests mit einer Signifikanz von 0,05, sowie der Vergleich der Daten mittels ANOVA oder Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur zur Eliminierung einer Alphafehler-Kumulierung mittels dem Statistikprogramm GraphPad Prism 5.0.

3 Ergebnisse

Mit dem Ziel der Entwicklung eines Beschichtungsverfahrens von Stents zur Suppression von Immun- und Abstoßungsreaktion wurde in der vorliegenden Arbeit ein auf PLGA basierendes Beschichtungsverfahren etabliert. Hier galt es sowohl das Beschichtungsmaterial in der grundsätzlichen Eignung für den Einsatz im Körper als auch erste in diesem Material integrierte bioaktive Wirkstoffe einzubringen, die sich zur Modulation der Zellantwort einsetzen lassen.

3.1 Untersuchung des Einflusses der PLGA-Beschichtung auf den pH-Wert von Zellkulturmedium

Bei der Hydrolyse von PLGA wird dieses in seine Bestandteile D,L-Lactat und Glycolsäure gespalten. Um die Auswirkungen auf Zellen einschätzen zu können, wurde die durch die Hydrolyse der Resomere® induzierte pH-Änderung des DMEM-Vollmediums geprüft.

Dazu wurden in einem doppelten Ansatz Glasplättchen mit PLGA beschichtet. Die beschichteten Glasträger wurden hiernach in DMEM-Vollmedium bei 37°C, 5% Kohlenstoffdioxid inkubiert. Der pH-Wert wurde in unabhängigen Experimenten nach einer Woche, zwei, drei und vier Wochen, wie in 2.7.1 beschrieben, gemessen.

Wie Abbildung 11 zeigt, sind zwischen der ersten und vierten Woche der Inkubation, unabhängig von der PLGA-Isoform, keine signifikanten pH-Wertänderungen im Vergleich zur Kontrolle ohne PLGA-Beschichtung nachweisbar. Jedoch zeigte sich eine geringere pH-Wert Verringerung bei PLGA 1 für die zweite, dritte und vierte Woche und für PLGA 2 für die zweite und vierte Woche im Vergleich zu PLGA 3 und zur Kontrolle. (vgl. [Koenig et al., 2017])

Ergebnisse

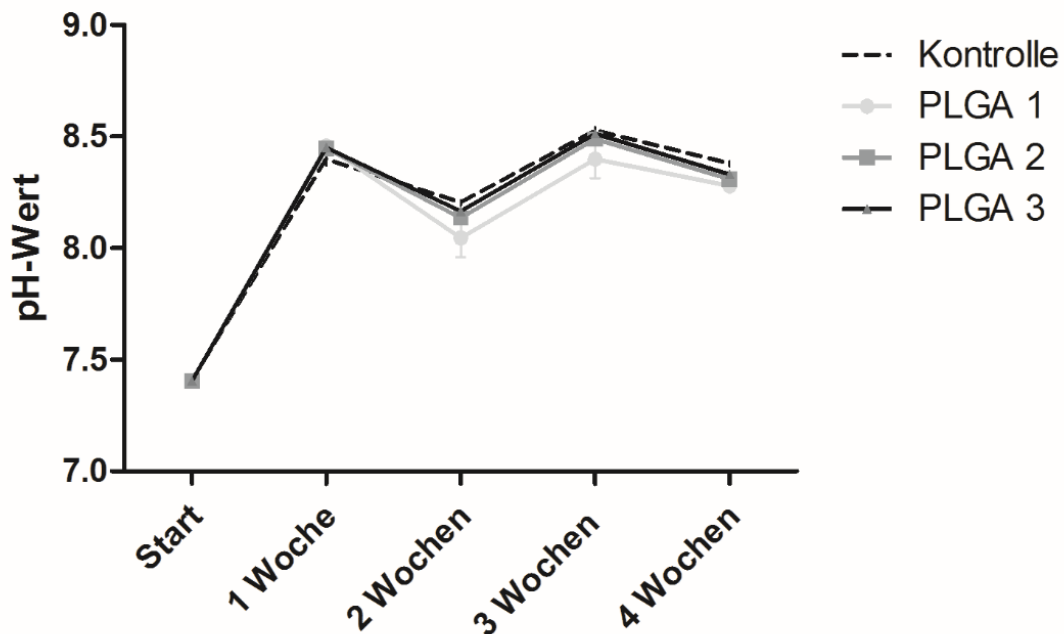


Abbildung 11: Ergebnis der pH-Wertbestimmung

Die Abbildung zeigt die pH-Wertveränderung von DMEM-Vollmedium, welches eine Woche, zwei, drei oder vier Wochen mit Glasplättchen inkubiert wurde. Die Glasplättchen wurden tags zuvor mit PLGA 1, PLGA 2 oder PLGA 3 beschichtet. Zur pH-Wert-Bestimmung wurde der Überstand abgenommen und hieraus jeweils zwei Messungen durchgeführt. Unbeschichtete Glasplättchen dienten als Kontrolle. n=2, +- Standardabweichung (engl. standard deviation = SD), nach [Koenig et al., 2017].

3.2 Untersuchung der Biokompatibilität der PLGA-Beschichtungen

Eine für weitere Versuche wichtige Eigenschaft der PLGA-Beschichtung ist deren Zellverträglichkeit im Einflussbereich der Beschichtung. Hierfür wurden, wie in 2.10 beschrieben, die Zellviabilität von EA.hy926 und die Immunantwort von hVECs nach indirektem und direktem PLGA-Kontakt untersucht. Hinsichtlich einer Erweiterung der PLGA-Beschichtungen um siRNA und Lipofectamine wurden diese Komponenten in die Untersuchung der Immunantwort mit aufgenommen. Für eine mögliche in vivo Anwendung der Beschichtungen ist zudem eine gute Hämokompatibilität unabdingbar. Diese Teilaspekte der Biokompatibilität wurden untersucht und die Ergebnisse werden im Folgenden gezeigt.

3.2.1 Untersuchung des Einflusses von PLGA-Beschichtungen auf die Zellviabilität von EA.hy926

Der Einfluss der PLGA-Hydrolyseprodukte wurde nach 48 Stunden Kultivierung der EA.hy926 bestimmt. Das DMEM-Vollmedium war zuvor eine Woche, zwei, drei oder vier Wochen mit PLGA beschichteten Glasplättchen (wie in 2.10.1 beschrieben) inkubiert worden. Die Lebendzellzahlbestimmung wurde mittels Casy (s. Abbildung 12) und die Viabilität mit dem MTT-Assay (s. Abbildung 13) gemessen. Es zeigten sich über die gesamte Beobachtungszeit von bis zu vier Wochen in beiden Messmethoden keine signifikanten Unterschiede der Zellzahl bzw. Viabilität der EA.hy926 im Vergleich zu den Kontrollzellen (vgl. [Koenig et al., 2017]).

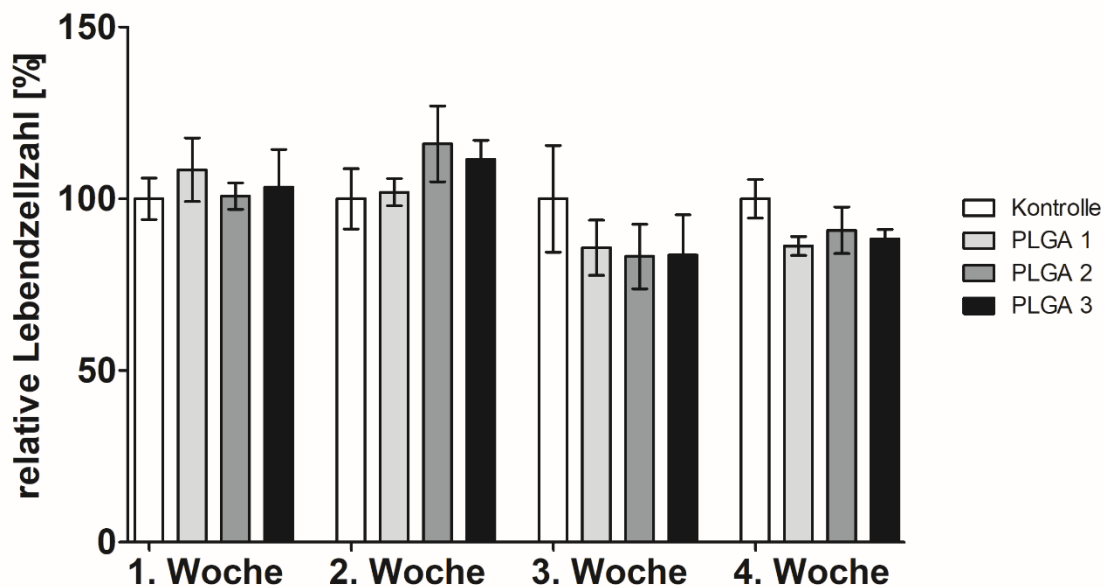


Abbildung 12: Ergebnis der Bestimmung der relativen Lebendzellzahl von EA.hy926

Hierfür wurden 100.000 Zellen mit DMEM-Vollmedium kultiviert, welches zuvor eine Woche, zwei, drei oder 4 Wochen mit PLGA 1, PLGA 2 oder PLGA 3 beschichteten Glasplättchen inkubiert worden war. Nach 48 Stunden wurde die Zellzahl mittels CASY® bestimmt. Als Kontrolle diente Medium, welches mit Glasplättchen ohne Beschichtung inkubiert wurde. Die Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt und jeder Balken zeigt den MW \pm eine SD, n=1, nach [Koenig et al., 2017].

Ergebnisse

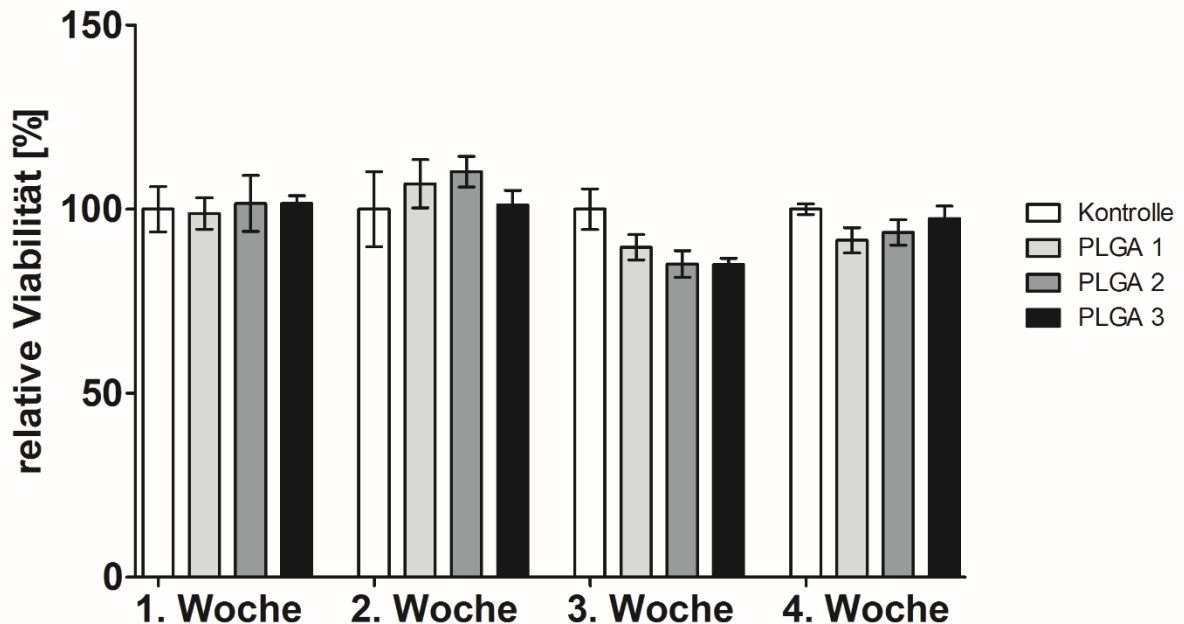


Abbildung 13: Ergebnis der Bestimmung der relativen Viabilität von EA.hy926.

Hierfür wurden 100.000 Zellen mit DMEM-Vollmedium kultiviert, welches zuvor eine Woche, zwei, drei oder 4 Wochen mit PLGA 1, PLGA 2 oder PLGA 3 beschichteten Glasplättchen inkubiert worden war. Nach 48 Stunden wurde als Maß der Viabilität der Zellen ein MTT-Assay durchgeführt. Als Kontrolle diente Medium, welches mit Glasplättchen ohne Beschichtung inkubiert wurde. Die Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt und jeder Balken zeigt den MW \pm eine SD, n=1, nach [Koenig et al., 2017].

3.2.2 Untersuchung der Beschichtungen in Hinblick auf die inflammatorische Reaktion von hVECs

Um eine unerwünschte Auslösung von Immunreaktionen auf die künftigen Beschichtungen auszuschließen, wurde die Immunreaktion von hVEC auf die PLGA-siRNA-Beschichtungen nach 48-stündigem Kontakt der Zellen mit den Beschichtungen aus PLGA 1-3, Lipofectamine®2000, siCAM bzw. siSCR oder nach Transfektion mit dsRNA und Lipofectamine®2000 bestimmt. Hierfür wurden nach Isolation der RNA aus den Zellen mRNA von exprimierten Immunmarkern mittels qRT-PCR bestimmt (s. Abbildung 14, Abbildung 15, Abbildung 16 und Abbildung 17). Diese waren B7-2, CXCL-7, CXCL-8, CXCL-10, IFN α , IFN β , IFN γ , Il-1 β , Il-2, Il-6, Il-8, Il-12, OAS, STAT-1 und TNF α . Die dsRNA erhöhte die Expression der Immunmarker CXCL-8, CXCL-10, OAS und STAT-1 stärker als die Beschichtungen mit PLGA und Zusätzen. Im Detail gesehen zeigte sich bei alle drei PLGAs in Kombination mit Lipofectamine®2000, ob mit oder ohne siRNA eine ähnliche Erhöhung der mRNA. Lediglich die PLGA 1-3 ohne Zusätze zeigen

Ergebnisse

sogar eine Reduzierung der Expression (s. (D), (E), (G), (I), (M) und (N)) oder nur eine geringe Erhöhung der Expression gegenüber der Kontrolle (s. (A)-(O) und vgl. [Koenig et al., 2017]). Tendenziell verursacht PLGA 1 gegenüber PLGA 2 und 3 auch mit Zusätzen eine geringere Expression der mRNA (s. (A), (B), (G), (H), (J), (K), (L) und (N)).

Ergebnisse

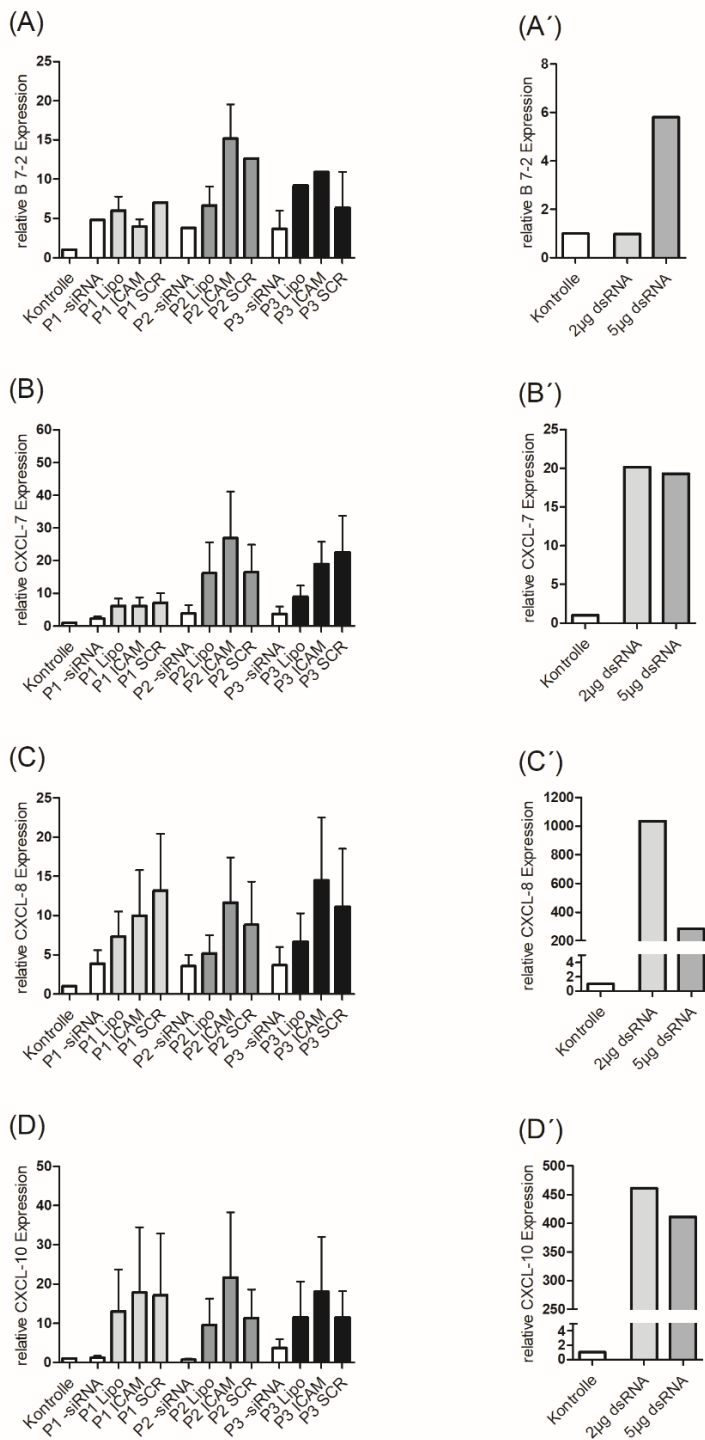


Abbildung 14: Ergebnis der Untersuchung der inflammatorische Reaktion von hVECs (1/4)

Die Abbildung zeigt die relative Expression von B 7-2, CXCL-7, CXCL-8 und CXCL10 von hVECs nach 48-stündiger Inkubation mit PLGA 1 (= P1), PLGA 2 (= P2) oder PLGA 3 (= P3) allein oder mit Lipofectamine®2000 (=Lipo) allein oder mit siICAM (=ICAM) oder siSCR (=SCR), s. (A)-(D). (A')-(D') zeigt die relative Expression von B 7-2, CXCL-7, CXCL-8 und CXCL10 von hVECs nach Transfektion mit dsRNA (2 und 5 µg). Die Kontrolle mit unbehandelten Zellen wurde auf eins gesetzt und jeder Balken zeigt den MW ± eine SD, n=4, bei dsRNA n=1, nach [Koenig et al., 2017].

Ergebnisse

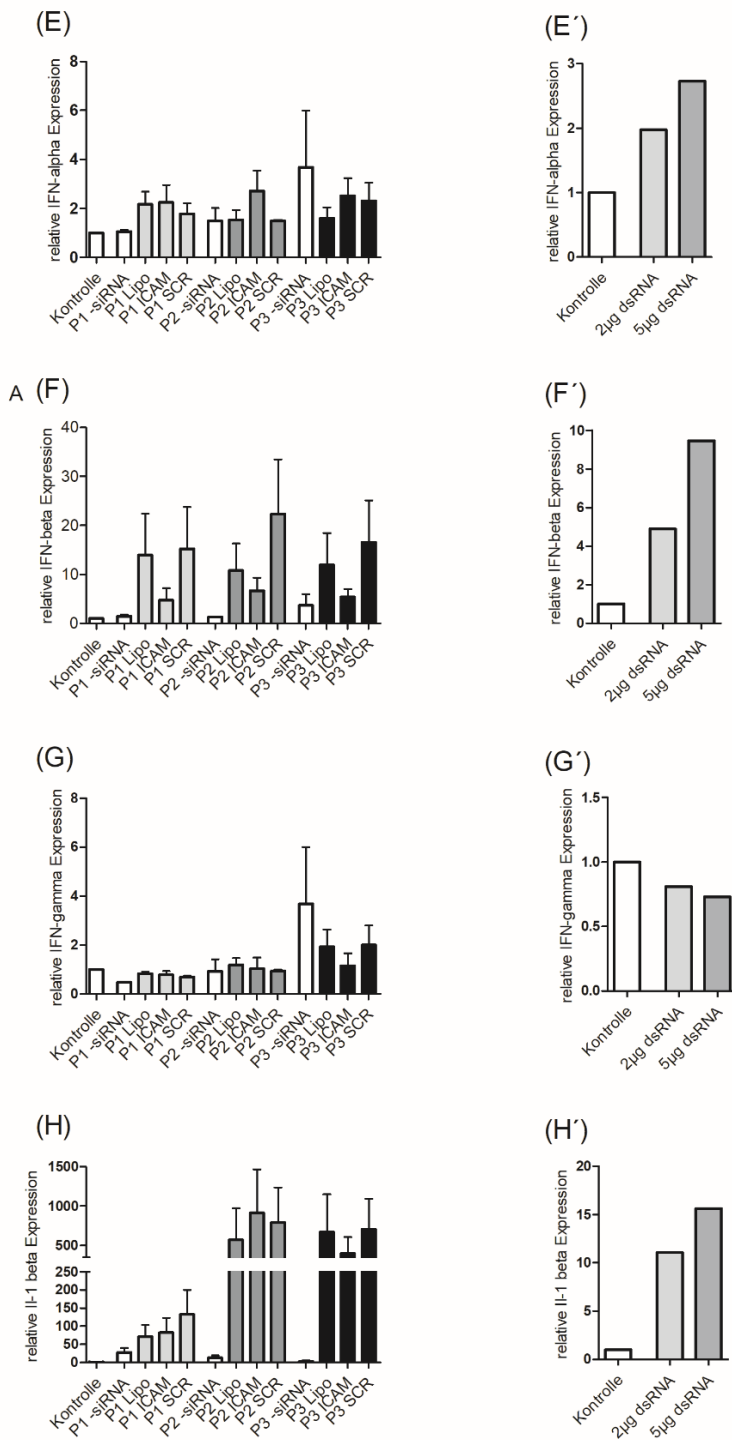


Abbildung 15: Ergebnis der Untersuchung der inflammatorische Reaktion von hVECs (2/4)

Die Abbildung zeigt die relative Expression von IFN-alpha, IFN-beta, IFN-gamma und IL-1 beta von hVECs nach 48-stündiger Inkubation mit PLGA 1 (= P1), PLGA 2 (= P2) oder PLGA 3 (= P3) alleinig oder mit Lipofectamine®2000 (=Lipo) alleinig oder mit siICAM (=ICAM) oder siSCR (=SCR), s. (A)-(D). (A')-(D') zeigt die relative Expression von IFN-alpha, IFN-beta, IFN-gamma und IL-1 beta von hVECs nach Transfektion mit dsRNA (2 und 5 µg). Die Kontrolle mit unbehandelten Zellen wurde auf eins gesetzt und jeder Balken zeigt den MW ± eine SD, n=4, bei dsRNA n=1.

Ergebnisse

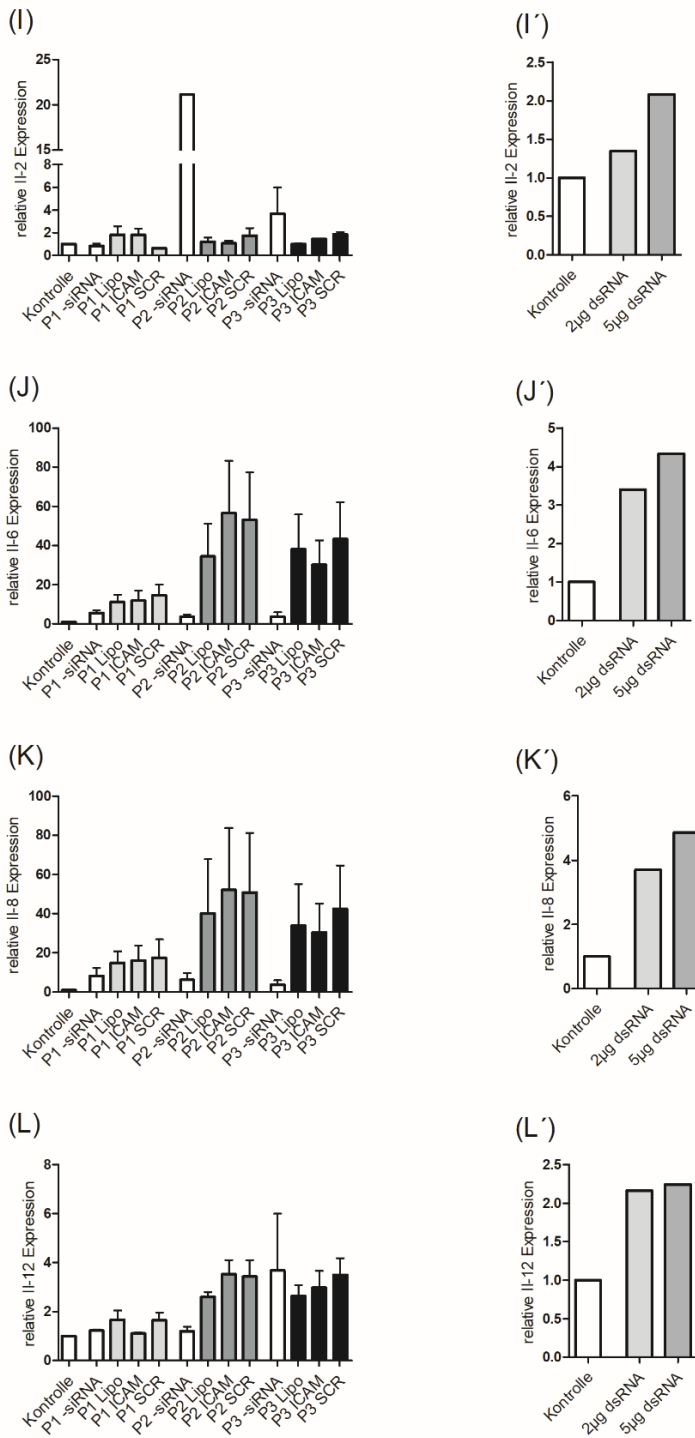


Abbildung 16: Ergebnis der Untersuchung der inflammatorische Reaktion von hVECs (3/4)

Die Abbildung zeigt die relative Expression von IL-2, IL-6, IL-8 und IL-12 von hVECs nach 48-stündiger Inkubation mit PLGA 1 (= P1), PLGA 2 (= P2) oder PLGA 3 (= P3) allein oder mit Lipofectamine®2000 (=Lipo) allein oder mit siICAM (=ICAM) oder siSCR (=SCR), s. (A)-(D). (A')-(D') zeigt die relative Expression von IL-2, IL-6, IL-8 und IL-12 beta von hVECs nach Transfektion mit dsRNA (2 und 5 µg). Die Kontrolle mit unbehandelten Zellen wurde auf eins gesetzt und jeder Balken zeigt den MW ± eine SD, n=4, bei dsRNA n=1.

Ergebnisse

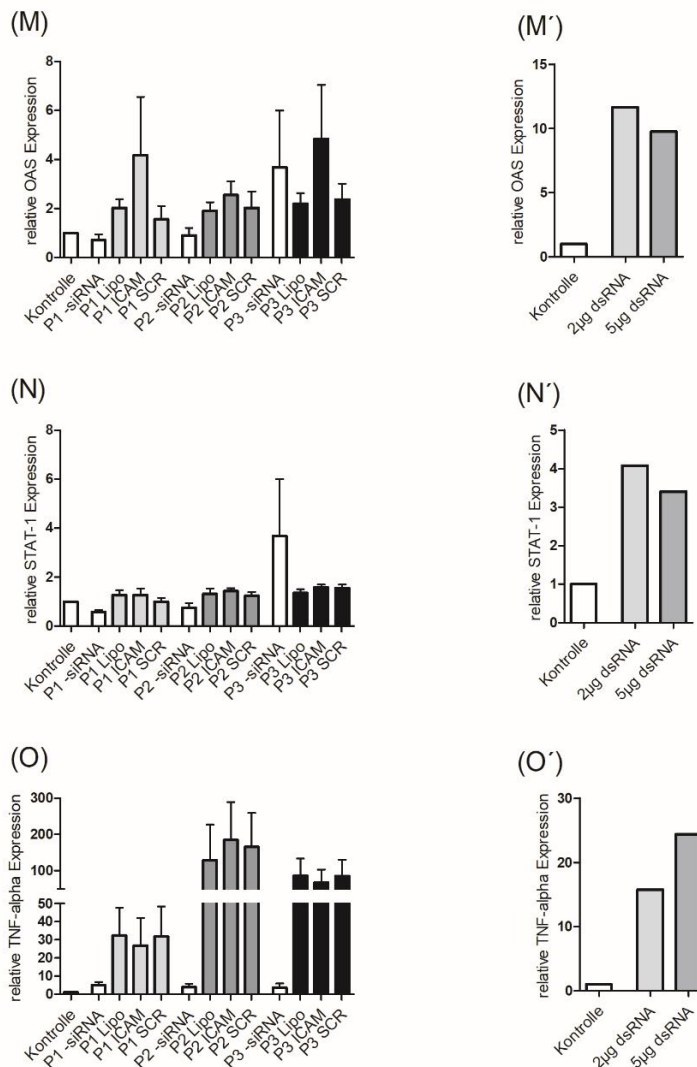


Abbildung 17: Ergebnis der Untersuchung der inflammatorische Reaktion von hVECs (4/4)

Die Abbildung zeigt die relative Expression von OAS, STAT-1 und TNF-alpha von hVECs nach 48 stündiger Inkubation mit PLGA 1 (= P1), PLGA 2 (= P2) oder PLGA 3 (= P3) alleinig oder mit Lipofectamine®2000 (=Lipo) alleinig oder mit siCAM (=ICAM) oder siSCR (=SCR), s. (A)-(D). (A')-(D') zeigt die relative Expression von OAS, STAT-1 und TNF-alpha beta von hVECs nach Transfektion mit dsRNA (2 und 5 µg). Die Kontrolle mit unbehandelten Zellen wurde auf eins gesetzt und jeder Balken zeigt den MW ± eine SD, n=4, bei dsRNA n=1, nach [Koenig et al., 2017].

3.2.3 Untersuchung der Hämokompatibilität der PLGA-Beschichtungen

Eine neue Beschichtung sollte gegenüber Blutkomponenten möglichst inert reagieren. Um dies zu testen wurde zum einen die Zellzahl von Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten und zum anderen die Ausschüttung von Akute-Phase-Proteinen, wie B-Thromboglobulin,

Ergebnisse

PMN-Elastase, Thrombin-Antithrombin-Komplex, C3a und SC5b9, vor und nach Kontakt mit den PLGA 1-, PLGA 2- und PLGA 3-Beschichtungen gemessen.

Die Hämokompatibilität der anderen teilweise benutzen Komponenten der Beschichtung wurden in dieser Arbeit nicht, jedoch von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe untersucht.

Die Untersuchung der Adsorption von Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten mittels Zellzahlbestimmung vor und nach der Inkubation mit PLGA 1, PLGA 2 oder PLGA 3 beschichteten Glasplättchen zeigte keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle ohne PLGA. Das mit PLGA inkubierte Blut zeigte sogar Zellzahlen, die sich im Bereich der 0 Stunden-Kontrolle bewegen. Eine Reduktion der Zellzahlen tritt bei Leukozyten (A), Thrombozyten (C), Lymphozyten (D) und Monozyten (E) nach einer Stunde Inkubation ausschließlich in der Kontrolle auf, bei den PLGA Beschichtungen zeigt sich diese Reduktion nicht (s. Abbildung 18).

Zur Abschätzung der Hämokompatibilität der PLGAs wurden Reaktanten der Blutzellen und des Komplementsystems als Maß ihrer Aktivierung mittels ELISA untersucht (vgl. auch 1.7).

Bei allen untersuchten Markern konnte eine signifikante Erhöhung zwischen den Kontrollproben ohne Inkubation und allen Proben nach einstündiger Inkubation gezeigt werden (s. Abbildung 19). Jedoch zeigte sich kein signifikanter Unterschied innerhalb der einstündig inkubierten Blutproben, zwischen den PLGA-Beschichtungen und der Kontrolle, die aus einem unbeschichteten Glasplättchen bestand. Zu erwähnen ist eine leichte Erhöhung der TAT-Komplexe (C) der Beschichtungen und somit vermutlich eine leichte, jedoch nicht signifikante, Aktivierung der Gerinnungskaskade (s. Abbildung 19).

Ergebnisse

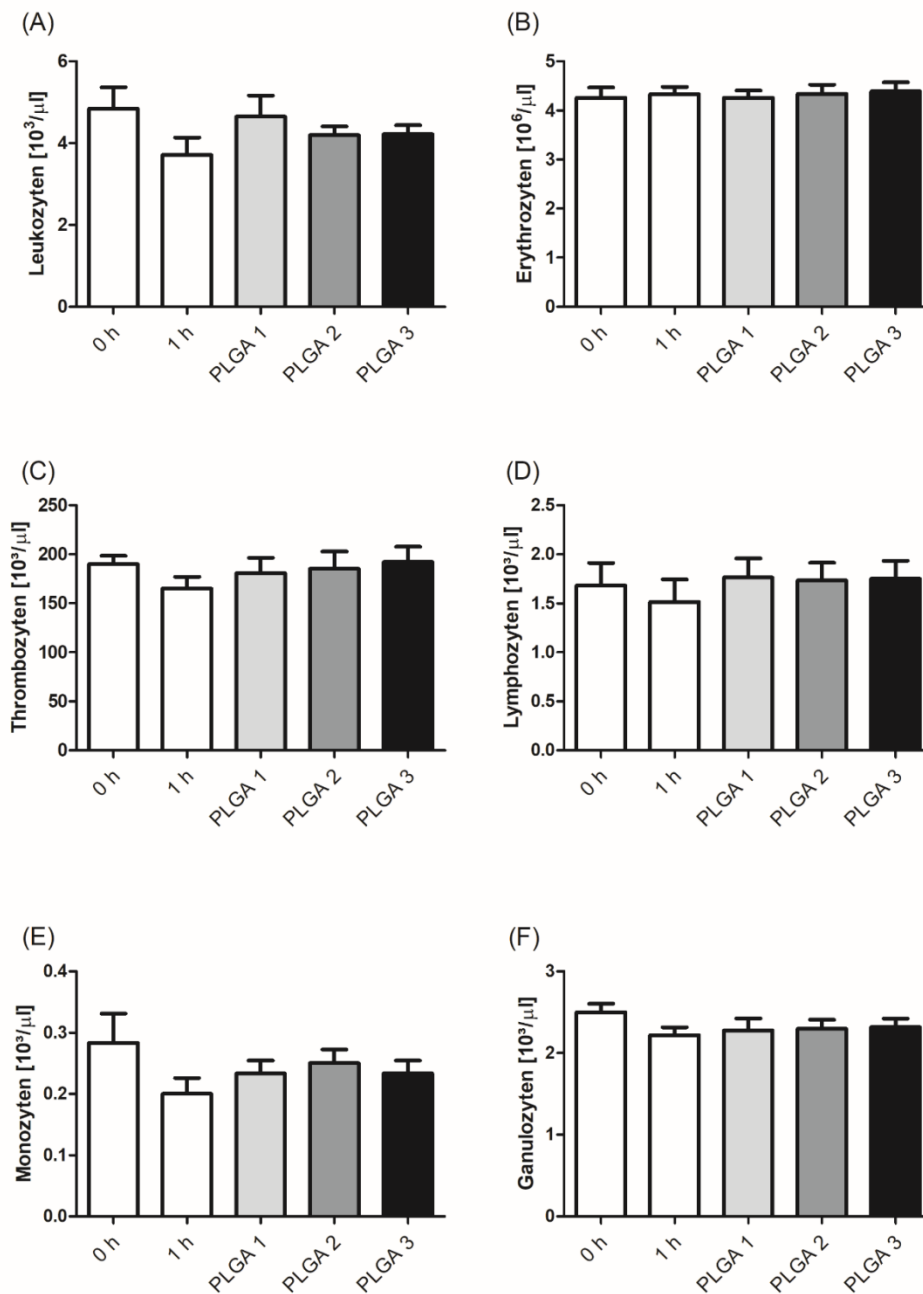


Abbildung 18: Ergebnis der Untersuchung der Hämkompatibilität der PLGA-Beschichtungen mittels Zellzahlbestimmung

Die Abbildung zeigt die Hämkompatibilität der mit 50 μg PLGA 1, PLGA 2 oder PLGA 3 beschichteten Glasplättchen. Hierfür wurden die beschichteten Glasplättchen 1 Stunde lang bei 37°C unter leichtem rütteln mit Frischblut inkubiert. Als Kontrolle diente Blut ohne Inkubation bzw. Inkubation auf unbeschichtetem Glasplättchen. Die Untersuchung der (A) Leukozyten- [$10^3/\mu\text{l}$], (B) Erythrozyten- [$10^6/\mu\text{l}$], (C) Thrombozyten- [$10^3/\mu\text{l}$], (D) Lymphozyten- [$10^3/\mu\text{l}$], (E) Monozyten- [$10^3/\mu\text{l}$] und (F) Granulozytenzahl [$10^3/\mu\text{l}$] erfolgte mittels Zellzähler. Rückschlüsse auf die Hämkompatibilität der PLGA-Beschichtungen lassen sich aus den Unterschieden der Beschichtungen zu den Kontrollen nach einer Stunde ziehen. Jeder Balken zeigt den MW \pm eine SD, n=6., nach [Koenig et al., 2017].

Ergebnisse

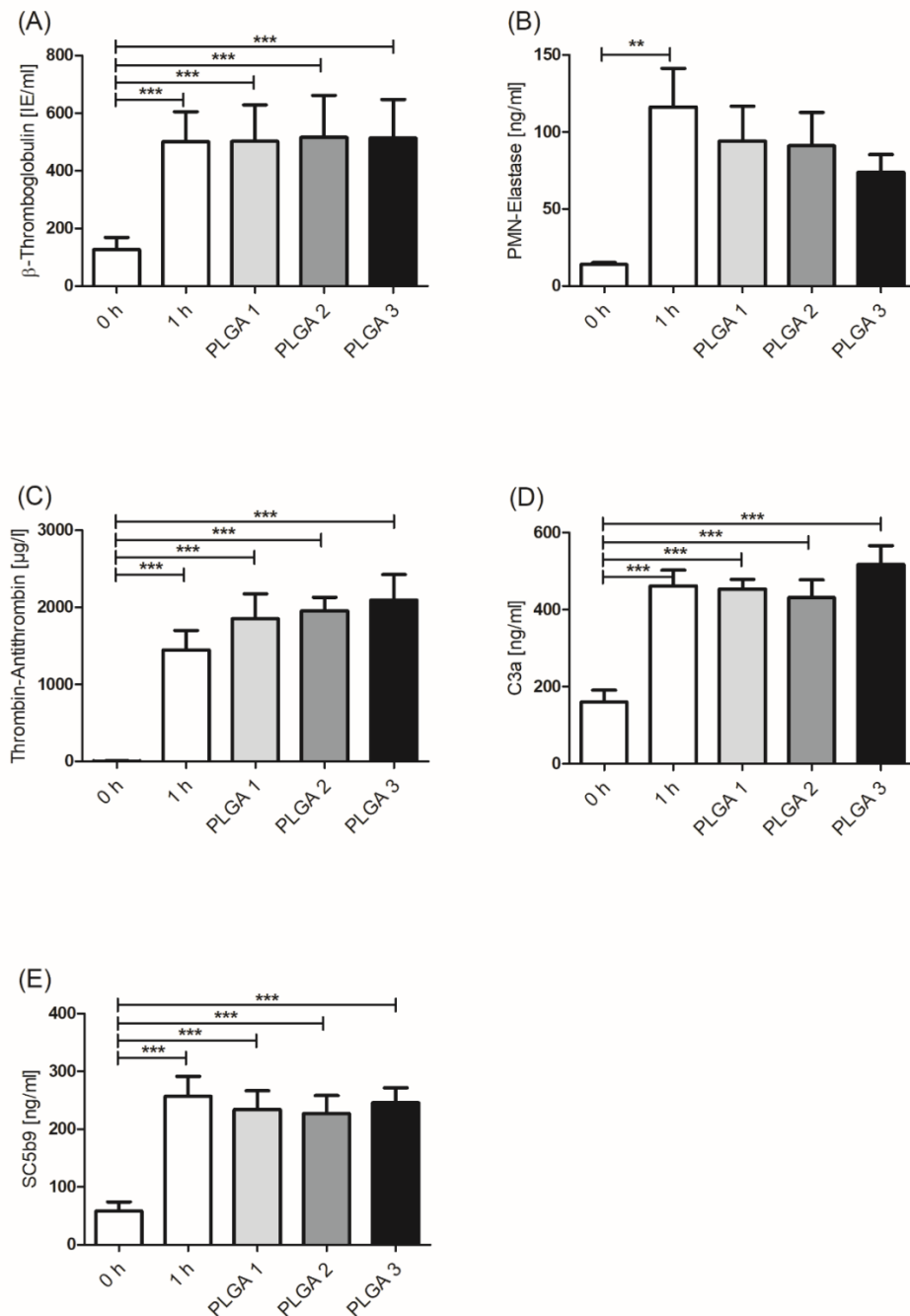


Abbildung 19: Ergebnis der Untersuchung der Marker der Hämokompatibilität der PLGA-Beschichtungen mittels ELISA

Die Abbildung zeigt die Hämokompatibilität der mit 50 µg PLGA 1, PLGA 2 oder PLGA 3 beschichteten Glasplättchen. Diese wurden 1 Stunde lang bei 37°C unter leichtem rütteln mit Frischblut inkubiert. Als Kontrolle diente Blut ohne Inkubation. Die Untersuchung der Immunantwort der Blutzellen erfolgte durch die Messung der (A) β -Thromboglobulin- [IE/ml], (B) PMN-Elastase- [ng/ml], (C) Thrombin-Antithrombin-Komplex- [µg/l], (D) C3a- [ng/ml] und (E) SC5b9-Menge [ng/ml] durch etablierte ELISAs. Rückschlüsse auf die Hämokompatibilität der PLGA-Beschichtungen lassen sich aus den Unterschieden der Beschichtungen zu den Kontrollen nach einer Stunde ziehen. Jeder Balken zeigt den MW \pm eine SD, n=6, signifikante Änderungen wurden nach einem Unterschreiten des Signifikanzniveaus von $p^* \leq 0,01$ mit zwei Sternen und bei $p^* \leq 0,001$ mit drei Sternen gekennzeichnet, nach [Koenig et al., 2017].

3.3 Untersuchung der Transfektionseffizienz von PLGA-siRNA-Beschichtungen

Die zentrale Aufgabe der neu entwickelten Beschichtung soll die Freisetzung von intakten, transfektionsfähigen siRNA-Komplexen sein, welche in Zellen eine gezielte Reduktion von unerwünschten Proteinen erreichen können.

Um zu überprüfen, welche Konzentrationen an siRNA nötig sind um eine gute Transfektionseffizienz zu erreichen, wurde in die PLGA-Beschichtung verschiedene Mengen (1 µg, 3 µg und 6 µg) siEsel-AF488 gemischt. Durch die Fluoreszenz der siRNA konnte mittels Durchflusszytometer die Anzahl an transfizierten EA.hy926 im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen bestimmt werden. Die Kontrollen wurden hierzu unterhalb einer bestimmten Grenze bezüglich ihrer Fluoreszenz gelegt. Bei einem Anstieg der Fluoreszenz in den behandelten Zellen werden diese als %-gated, d. h. oberhalb der Grenze der Kontrollzellen gewertet. Um eine Aussage über die zur Transfektion nötigen siRNA Konzentration treffen zu können, wurden die verschiedenen PLGAs je nach siRNA Konzentration gruppiert und mittels „two-way ANOVA“ verglichen.

Zudem wurden die drei PLGAs (PLGA 1, PLGA 2 oder PLGA 3) verwendet um anschließend vergleichen zu können, ob Unterschiede in der Transfektionseffizienz bestehen und welches PLGA die größte Transfektionseffizienz vermittelt. Es zeigte sich eine Zunahme der Transfektionseffizienz mit höherer siRNA Konzentration. So ergab 1 µg siRNA eine signifikante Erhöhung der Transfektionseffizienz gegenüber der Kontrolle und 3 µg siRNA nochmals gegenüber 1 µg siRNA. Eine weitere signifikante Steigerung konnte mit 6 µg siRNA nicht erreicht werden.

Die PLGAs untereinander zeigten deutliche Unterschiede in der effizienten Freisetzung und Transfektion der siRNA-Komplexe in die EA.hy926. So zeigte PLGA 3 mit max. 92 % eine geringere Transfektionseffizienz als PLGA 2 mit max. 96 % und mit PLGA 1 mit 95 %. Gerade bei geringeren siRNA-Mengen zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen PLGAs. Bei 1 µg siRNA zeigten PLGA 1 und PLGA 2 signifikant höhere Transfektionseffizienzen als PLGA 3, welches mit 53 % transfizierter EA.hy926 den niedrigsten Wert erreichte. Bei 3 µg siRNA erreichte PLGA 1 mit 95 % eine signifikant höhere Transfektionseffizienz

Ergebnisse

als PLGA 2 mit 89 % und PLGA 3 mit 77 % (s. Abbildung 20 und vgl. [Koenig et al., 2017]).

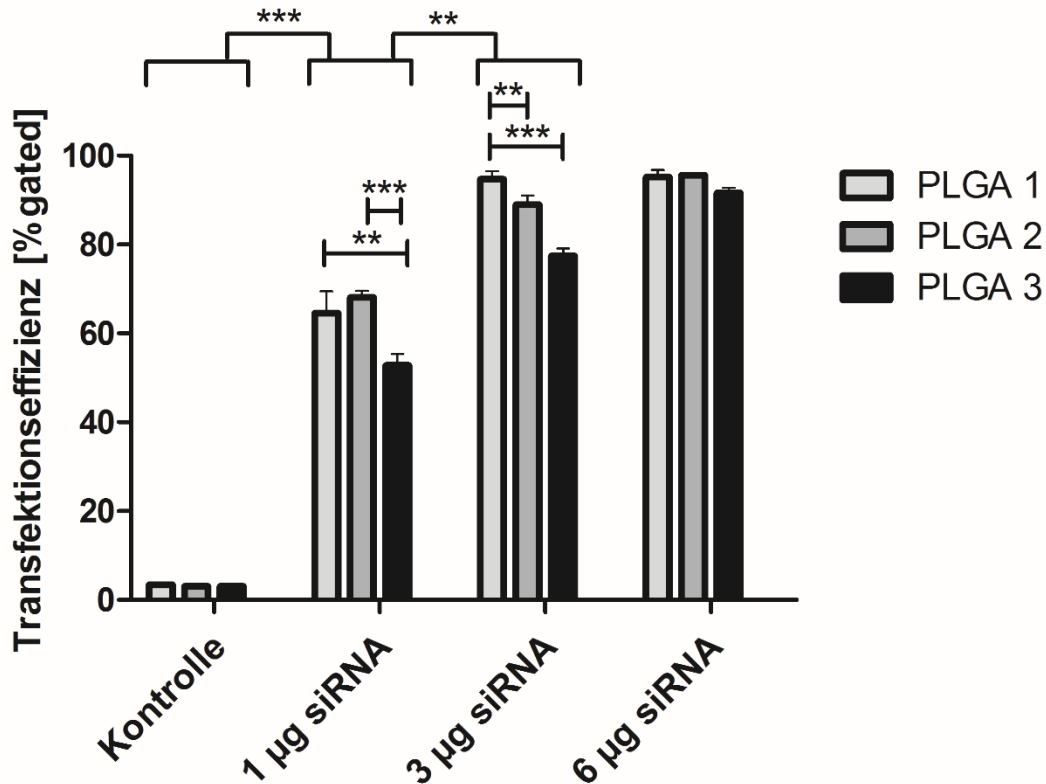


Abbildung 20: Ergebnis der Untersuchung der Transfektionseffizienz von fluoreszenzmarkierter siRNA aus PLGA-Beschichtungen in EA.hy926

Verschiedene siRNA-Mengen wurden in PLGA 1, PLGA 2 oder PLGA 3 komplexiert und die Transfektionseffizienz in EA.hy926 mittels Durchflusszytometer bestimmt, nachdem die Zellen 24 Stunden mit den Beschichtungen inkubiert wurden. Als Kontrolle dienen reine PLGA-Beschichtungen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels „two-way ANOVA“. Jeder Balken zeigt den MW \pm eine SD, n=3, signifikante Änderungen wurden nach einem Unterschreiten des Signifikanzniveaus von $p^* \leq 0,01$ mit zwei Sternen und bei $p^* \leq 0,001$ mit drei Sternen gekennzeichnet, nach [Koenig et al., 2017].

3.4 Untersuchung der Verringerung der ICAM-1 Expression von EA.hy926 und hVECs nach Kontakt mit PLGA-siRNA-Beschichtung

Die Reduktion der Expression von ICAM-1 wurde in EA.hy926 und hVECs nach 48-stündiger Inkubation mit PLGA 1-3 und 3µg siICAM oder siSCR Beschichtungen auf Proteinebene mittels FACS und auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR gemessen (vgl. 2.12).

Ergebnisse

Alle drei PLGAs zeigen eine signifikante Reduzierung der ICAM-1 Expression in EA.hy926 auf Proteinebene im Vergleich zur Kontrolle nach der Aktivierung mit TNF α (s. Abbildung 21). Die meiste Verringerung mit 36 % wurde von PLGA 1 mit siICAM erreicht, ähnliche Ergebnisse erbrachten PLGA 2 und 3. Auch konnte von PLGA 1 mit siICAM ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur siSCR und zur Kontrolle nach TNF α Aktivierung gezeigt werden. Letzteres zeigte sich auch bei PLGA 2 mit siICAM.

Auch auf mRNA-Ebene zeigt sich in EA.hy926 je PLGA mit siICAM im Vergleich zu siSCR eine signifikante Reduzierung der ICAM-1-Expression. Diese beträgt bei PLGA 1 22 %, bei PLGA 3 10 % und bei PLGA 2 5 %.

PLGA allein oder mit siSCR erzielte nach Aktivierung mit TNF α keine Reduzierung der ICAM-1-Expression.

In hVECs zeigen sich ähnliche Tendenzen der Reduzierung der ICAM-1-Expression von PGLA 1-3 mit siICAM, jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden (s. Abbildung 21, vgl. [Koenig et al., 2017]).

Ergebnisse

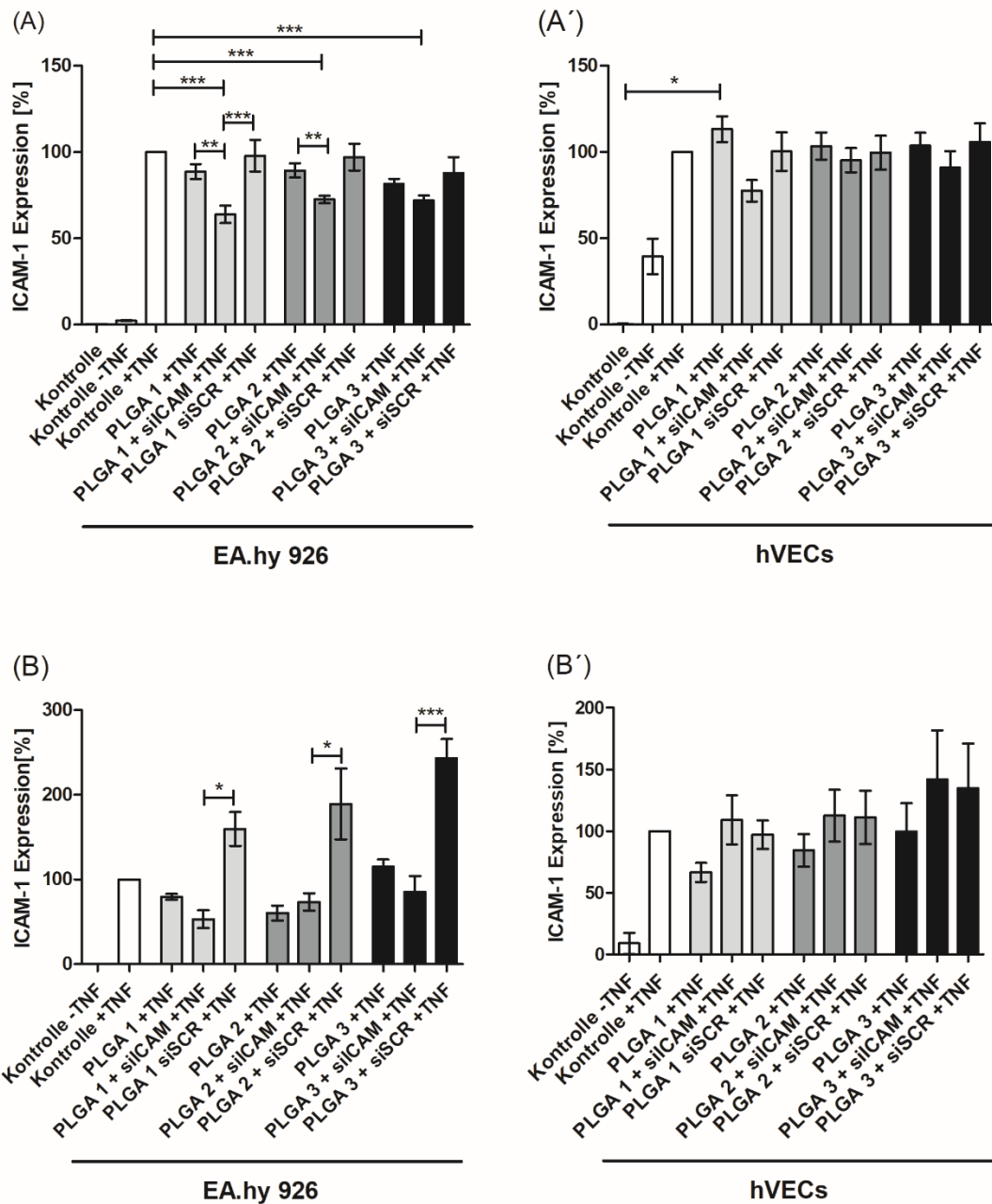


Abbildung 21: Ergebnis der Untersuchung der Expression von ICAM-1 in EA.hy926 und hVECs. Die Abbildung zeigt die Expression von ICAM-1 von EA.hy926 (A und B) und hVECs (A' und B') nach Kontakt mit PLGA-siRNA Beschichtungen, gemessen mittels Durchflusszytometer (A und A') und qRT-PCR (B und B'). Die Beschichtungen bestanden aus PLGA 1, PLGA 2 oder PLGA 3 allein oder mit siICAM oder siSCR mit Lipofectamine®2000. Die Zellen wurden jeweils einen Tag zuvor angezchtet, und mit den Beschichtungen 48 Stunden inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Kontakt zu den Beschichtungen. Die ICAM-1 Expression wurde in Relation gesetzt zur Kontrolle mit Aktivierung mit TNF α , welche auf 100 % gesetzt wurde. Jeder Balken zeigt den MW \pm eine SD, signifikante Änderungen wurden nach einem Unterschreiten des Signifikanzniveaus von $p^* \leq 0,1$ mit einem Stern, bei $p^* \leq 0,01$ mit zwei Sternen und bei $p^* \leq 0,001$ mit drei Sternen gekennzeichnet, nach [Koenig et al., 2017].

3.5 Untersuchung der Langzeitfreisetzung von siRNA aus einer Multilayerbeschichtung

Für eine mögliche klinische Anwendung der Beschichtung ist eine Freisetzung der siRNA über mehrere Wochen wünschenswert. Um dies zu ermöglichen wurde eine Multilayerbeschichtung entwickelt, welche das Ziel hat durch die Hydrolyse der einzelnen Schichten nacheinander eine langsame Freisetzung der siRNA zu gewährleisten. Durch die dickere Deckschicht soll eine zu starke anfängliche Freisetzung vermindert werden.

Auf ein Glasplättchen wurden 4 Schichten mit 0,5 mg PLGA, eine Deckschicht mit 1 mg PLGA und Zwischenschichten mit 3 µg einer fluoreszenzmarkierten siSCR hergestellt. Diese wurden die ersten 10 Tage täglich und die folgenden 10 Tage alle zwei Tage auf neue Zellen gelegt. Die inkubierten Zellen wurden anschließend durchflusszytometrisch untersucht und die Transfektionseffizienz bestimmt. Als Kontrolle dienten reine PLGA-Beschichtungen ohne siRNA, welche eine stabile Basislinie bis zum Tag 18 bilden.

Während der ersten zwei Tage wurde eine sehr hohe Transfektionseffizienz von mindestens 80 % an Tag eins und 85 % an Tag zwei erreicht (s. Abbildung 22). Die höchste Transfektionseffizienz erreichte PLGA 1 mit 96 %. Von Tag drei bis zum sechsten Tag nahm die Transfektionseffizienz kontinuierlich ab und erreichte bei 1-2 % eine stabile Transfektionseffizienz, welche sich bis zum Untersuchungsende anhielt. Von Tag sieben bis neun zeigte PLGA 1 eine höhere Transfektionseffizienz als PLGA 2 und 3, welche jedoch nicht signifikant war. PLGA 2 und 3 zeigte einen kontinuierlichen Anstieg der Transfektionseffizienz von Tag 3 bis Tag 18 (vgl. [Koenig et al., 2017]).

Ein Nachteil der Multilayerbeschichtung zeigte sich in der teilweise geringen Stabilität der Beschichtungen auf den Glasträgern. Instabile Beschichtungen wurden aus der Auswertung nach Ablösung von den Glasplättchen aus der Auswertung heraus genommen. Insgesamt gesehen zeigten sich PLGA 2 und 3 am beständigsten.

Ergebnisse

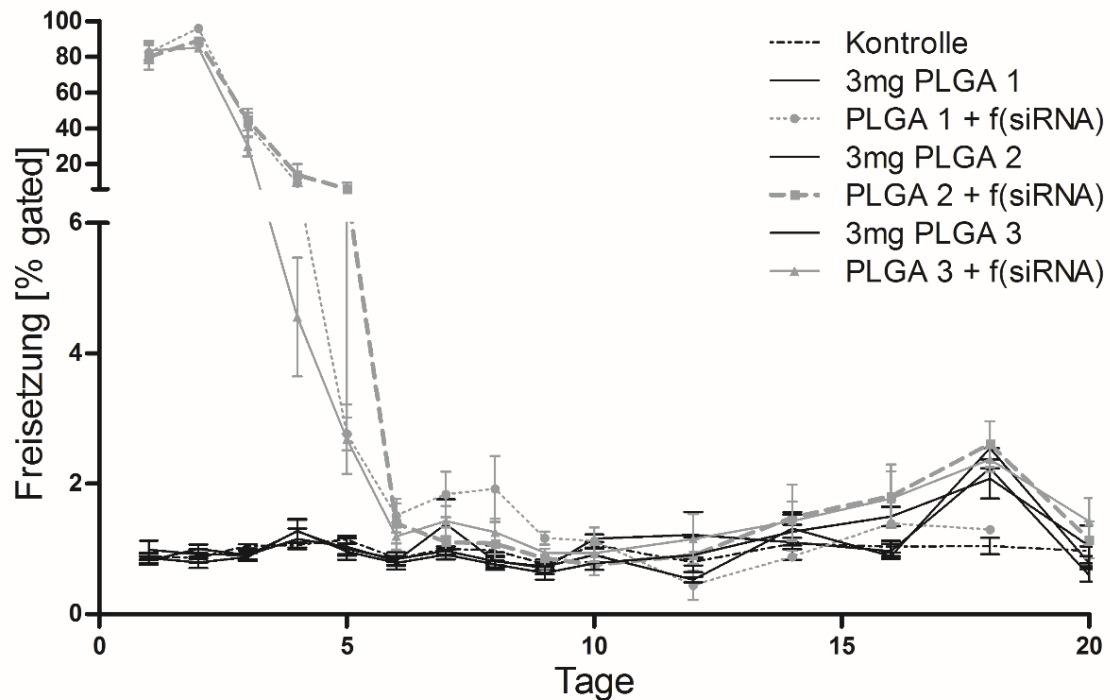


Abbildung 22: Ergebnis der Langzeitfreisetzung von f(siRNA) aus 3mg PLGA-Beschichtungen
Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung von EA.hy926, welche 24 Stunden mit 9-schichtig beschichteten Glasplättchen (abwechselnde Schichten von 0,5 mg PLGA und 3µg siRNA-Lösung mit einer 1 mg PLGA-Deckschicht) inkubiert wurden. Als Kontrolle dienten 3 mg PLGA-Beschichtungen ohne siRNA. Pro PLGA wurden Triplets erstellt. Die Beschichtung erfolgte mit PLGA 1, PLGA 2 oder PLGA 3. Die ersten 10 Tage erfolgte ein täglicher Transfer der beschichteten Glasplättchen auf neue Zellen. Ab Tag 11 erfolgte der Transfer alle zwei Tage. f(siRNA) = fluoreszenzmarkierte siRNA. Die statistische Analyse erfolgte unter Anwendung eines Ausreiser-tests ($\alpha=0,05$) und einem Test für Normalverteilung vor ANOVA. Jeder Balken zeigt den MW \pm eine SD, n=4, nach [Koenig et al., 2017].

3.6 Kotransfektion von eGFPmRNA und siSCR-AF 555-siRNA

Die therapeutische Regulation von Genen besteht nicht nur aus der Reduzierung der unerwünschten Proteine, sondern auch der Produktion von heilungsförderlichen Proteinen. Dies kann mittels mRNA, die in der Zelle zu einer Produktion des erwünschten Proteins führt, durchgeführt werden. Um zu zeigen, dass die entwickelte PLGA-Beschichtung beide Wege funktionsfähig freisetzen und transfizieren kann, wurde in eine Beschichtung aus PLGA 1, welches in den Voruntersuchungen die höchste Transfektionseffizienz zeigte, Komplexe aus siSCR-AF555 und eGFP-mRNA gemeinsam und einzeln inkludiert und die Expression von eGFP und die Transfektion von siSCR-AF555 druchflusszytometrisch bestimmt. Hierbei zeigten sich 11 % der transfizierten Zellen auf beides

Ergebnisse

positiv (s. Tabelle 12 und vgl. [Koenig et al., 2017]). Auch zeigten sich 7,9 % der Zellen positiv für eGFP und 6,25 % der Zellen positiv auf AF 555 bei der gemeinsamen Transfektion von eGFP-mRNA und siSCR-AF555. Als Kontrolle wurden Zellen mit jeweils nur einer RNA-Form in der Beschichtung transfiziert. Bei der siRNA-Beschichtung zeigten 26 % der Zellen positiv für AF 555, bei der mRNA-Beschichtung zeigten sich 11 % positiv für eGFP.

Tabelle 12: Ergebnis der Kotransfektion von siRNA und mRNA in EA.hy926

Transfektionseffizienz in % von einzeln und kombiniert transfizierten Zellen mit eGFP-mRNA (mRNA) und siSCR-AF555 (siRNA). Lipo = Lipofectamine®2000, Kontrolle: Zellen ohne Beschichtung und Lipo, - : ohne, + : mit, nach [Koenig et al., 2017].

Positive Zellen [%]	Kontrolle	PLGA 1 - mRNA - siRNA - Lipo	PLGA 1 -mRNA -siRNA +Lipo	PLGA 1 -mRNA +siRNA +Lipo	PLGA 1 +mRNA -siRNA +Lipo	PLGA 1 +mRNA +siRNA +Lipo
siRNA positiv	0,03	0,05	0,08	26,03	0,01	6,25
mRNA positiv	0,94	2,19	2,86	0,26	10,91	7,90
siRNA & mRNA positiv	1,02	1,72	3,18	4,33	2,84	11,01

4 Diskussion

4.1 Allgemeine Anforderungen an die Beschichtung

Das Einbringen von Stents mittels PTCA ist eine häufig angewandte Therapie um in atherosklerotisch verengten Gefäßen den Blutfluss wieder zu ermöglichen und längerfristig zu erhalten [Löwel, 2006]. Trotz der Weiterentwicklung von BMS zu DES bringt diese Methode unter reduzierten IRS eine erhöhte Rate an In-Stent-Thrombose mit sich. Um dieses Risiko zusätzlich zu minimieren und die Komplikationsrate weiter zu reduzieren, ist die Weiterentwicklung der Stents wichtig. Ein entscheidender Ansatz hierzu ist die Entwicklung biologisch abbaubarer Materialien, in welche pharmakologisch wirksame Moleküle eingearbeitet werden, die über einen längeren Zeitraum freigesetzt werden und am Endothel ihre Wirkung entfalten. Zudem werden Stents zunehmend aus biologisch resorbierbarem Material anstelle von metallenen Grundstrukturen hergestellt [Chevalier et al., 2016]. Hierbei ist der Vorteil, dass durch die vollständige Resorption der Gefäßstütze die Restauration des normalen Gefäßes angestrebt wird. Obwohl diese Technologie aktuell Rückschläge hinnehmen musste, ist es trotzdem eine vielversprechende und zukunftsfähige Methode [Chevalier et al., 2018].

An solch ein medikamentenfreisetzendes Material wird eine Vielzahl von Anforderungen gestellt. Es muss biologisch resorbierbar sein ohne toxische Abbaustoffe freizusetzen und die Stabilität der eingebrachten Medikamente sowie ihre kontrollierte Freisetzung müssen gewährleistet sein. Das Material muss bioresorbierbar und blutverträglich sein, ohne unerwünschte immunologische Reaktionen hervorzurufen. Daher wurde in dieser Arbeit PLGA als biokompatibles und biologisch abbaubares Material benutzt, welches sich als von der FDA und EMA zugelassenes Polymer in der Medizintechnik bewiesen hat [Choi et al., 2014]. Im Vergleich zu BMS wurde gezeigt, dass es gleich wenige negative Auswirkungen auf Arterien hat, blutkompatibel ist und gute mechanische Eigenschaften besitzt [Peng et al., 2009]. Doch welches PLGA eignet sich am besten? Die in dieser Arbeit verwendeten PLGAs unterscheiden sich hinsichtlich ihres Verhältnisses

von Lactide: Glycolide, dem Molekulargewicht und einer veresterten oder unveresterten Säureendgruppe.

4.2 Biokompatibilität der Polymere

In der vorliegenden Arbeit wurde die Biokompatibilität der Polymere mittels der pH-Wertänderung von PLGA-konditioniertem DMEM-Vollmedium und der Messung der Viabilität von Zellen, welche zuvor mit diesem Medium angezchtet wurden, jeweils über vier Wochen getestet. Von Beginn der Untersuchung zur ersten Woche zeigte sich ein starker pH-Wert-Anstieg (vgl. Abbildung 11). Es ist bekannt, dass zuvor im Kühlschrank aufbewahrtes DMEM-Vollmedium in Wärme alkalischer wird. Das Medium konnte die Erniedrigung des pH-Wertes abpuffern, welche durch die Hydrolyse der Polymere verursacht wurde. Die Erniedrigung des pH-Wertes in Woche zwei und drei von PLGA 1 erklärt sich entsprechend der Literatur [Samadi et al., 2013; Houchin and Topp, 2008] durch eine schnellere Hydrolyse des Polymers im Vergleich zu PLGA 2 und 3, da es ein geringeres Molekulargewicht und keine Endgruppenveresterung wie die anderen PLGAs besitzt und somit schneller abgebaut werden kann.

Die Zellviabilität von EA.hy926 zeigte sich mit PLGA-konditioniertem DMEM-Vollmedium in den ersten zwei Wochen nicht beeinträchtigt, sodass davon auszugehen ist, dass die Zellen von der Veränderung des pH-Wertes von 7,4 auf 8,4 unbeeinflusst blieben (vgl. Abbildung 11 bis Abbildung 13). Auch im weiteren Verlauf der Wochen drei und vier zeigte sich keine Reduktion der Zellviabilität. Dies bedeutet, dass PLGA keine Zytotoxizität aufweist. Denn erst bei einer Reduktion der Zellzahl über 30 % wäre es nach DIN EN ISO 10993-5:2009, der in-vitro-Zytotoxizitätsprüfung, als ein zytotoxisches Medizinprodukt zu klassifizieren.

Eine neue Beschichtung der implantierten Stents soll die Entzündungsreaktion der Endothelzellen auf die Stentapplikation herabsetzen und nicht selbst eine Entzündung auslösen. Um zu zeigen, dass die Polymere inert reagieren, wurde die mRNA definierter Entzündungsmediatoren von hVECs nach dem Kontakt mit

Diskussion

den PLGA-Beschichtungen mittels qRT-PCR getestet. Es zeigte sich in der Kombination der PLGAs mit Lipofectamine®2000 als Transfektionsmittel in An- und Abwesenheit von siRNA eine ähnliche Erhöhung der zellulären Abwehr wie dsRNA, welche als Vergleich eine Virusinfektion simulierte. Lediglich PLGA 1-3 ohne Zusätze zeigte teils eine Reduzierung der Expression und scheint somit einen protektiven bzw. beruhigenden Effekt auf die Zellen zu haben. Vor allem Chemokine wurden im Vergleich zur dsRNA deutlich weniger aktiviert. Am ehesten scheint die Anwesenheit von Lipofectamine®2000 die Reaktion der Zellen zu beeinflussen, so dass die hinzugefügte siRNA nur noch eine geringe Erhöhung der Reaktion oder sogar teils eine Abschwächung zeigt (vgl. Abbildung 14 bis Abbildung 17). Dieser starke Einfluss von Lipofectamine®2000 konnte bereits in anderen Versuchsreihen gezeigt werden [Nolte et al., 2009].

Um die PLGA-Beschichtungen in Zukunft auch als Medizinprodukt im Kontakt mit Blut anwenden zu können, wurde die Hämokompatibilität der Polymere getestet. Die Proben des mit PLGA konditionierten Blutes zeigten, im Vergleich zur Kontrolle nach einer Stunde, keine Reduktion der Zellzahl der Thrombozyten, Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten (vgl. Abbildung 18).

Würden Blutzellen mit dem PLGA interagieren und sich an die Beschichtung heften, dann wäre die Zellzahl reduziert. Da dies nicht der Fall war, gehen wir von keiner nachteiligen Adsorption der Blutzellen an der Polymerbeschichtung aus. Die Hämokompatibilität wurde zudem mittels der Parameter β -TG, TAT, PMN-Elastase und der Marker des Komplementsystems C3a und SC5b9 getestet. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle nach einer Stunde. Somit zeigten sich die Polymerbeschichtungen weder thrombogener noch komplementaktivierender als Glasplättchen alleine und erwiesen sich somit als geeignet für den späteren Einsatz als Implantatbeschichtung im Kontakt mit Blut, um direkt das Risiko der Thrombenbildung nach PTCA zu reduzieren. Es ist zu beachten, dass die weiteren Bestandteile der Beschichtung wie Transfektionsmittel und siRNA hier nicht getestet wurden. Dies sollte noch vor einem Einsatz in vivo erfolgen.

4.3 RNA-Freisetzung aus Polymerbeschichtung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde eine Beschichtung, in der Komplexe aus siRNA und Lipofectamine®2000 in dünne PLGA-Beschichtungen eingebettet sind, entwickelt. Die therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten von RNAi ergeben sich durch die bereits in mehreren Studien gezeigten positiven Auswirkungen der Reduktion von CAMs wie ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin bei der Prävention und Bekämpfung von inflammatorischen Prozessen bei Herz-Kreislaufkrankungen, da hierbei die Einwanderung von Leukozyten in die arterielle Gefäßwand verhindert werden kann [San Juan et al., 2009; Qu et al., 2009; Pluvinet et al., 2004; Wang et al., 2013; Walker et al., 2005; Walker et al., 2007]. Basierend auf dieser Erkenntnis transfizierten wir erfolgreich EA.hy926 mit fluoreszenzmarkierter siRNA, welches aus PLGA-Beschichtungen freigesetzt wurde. Mit 3 µg siRNA pro Schicht erreichten wir eine Transfektionseffizienz von 95 %, welche auch durch eine Erhöhung der siRNA Menge auf 6 µg pro Schicht nicht mehr signifikant zu steigern war. Hieraus schließen wir, dass die Zellen bei 3 µg siRNA gesättigt waren. Es zeigte sich, dass lediglich mit PLGA 1 diese hohe Transfektionseffizienz erreicht werden konnte. Wir gehen davon aus, dass dies an der schnelleren Hydrolyse des PLGAs und damit an einer schnelleren Freisetzung der siRNA liegt. Jedoch ist bei einem DES die Freisetzung der siRNA über einen längeren Zeitraum wichtig. Durch die Entwicklung einer Multilayerbeschichtung konnten wir eine Freisetzung von Nanopartikeln (NP) aus siRNA und Lipofectamine®2000 in EA.hy926 über 20 Tage nachweisen. Die Idee für einen mehrschichtigen Aufbau der Beschichtung basierte zum einen darauf, dass die Freisetzung der NP gebremst wird, da diese durch mehrere Schichten hindurch gelangen müssen und zum anderen wird in Zukunft eine Immobilisierung von ggf. verschiedenen siRNAs und/oder mRNAs in verschiedenen Schichten möglich sein.

In den ersten zwei Tagen zeigte sich eine sehr hohe Aufnahme an NP in die Zellen, welche am ehesten durch Diffusion der wasserlöslichen NP entsteht. Im Weiteren nahm die Freisetzung an NP zunehmend ab, was dafür spricht, dass ein langsamer Abbau der PLGA-Beschichtung begann (vgl. Abbildung 22). Des Weiteren konnte eine kontinuierliche Aufnahme an siRNA über insgesamt 20

Diskussion

Tage nachgewiesen werden. Dies beweist, dass eine Freisetzung der NP aus der Multilayerbeschichtung gewährleistet ist. Der Aufbau des Experiments, mit der Übertragung der PLGA-beschichteten Glasplättchen auf neue EA.hy926 in den ersten 10 Tagen täglich und anschließend jeden zweiten Tag, zeigt das am schlechtesten mögliche Szenario in vivo für eine Anwendung dieser Technik. Eine längere Inkubationsdauer auf den gleichen Zellen war in unserem Ansatz leider nicht möglich, da das Auflegen der Glasplättchen über einen längeren Zeitraum als 48 Stunden zu zytotoxischen Effekten führte. Diese traten auch in den Kontrollen auf und lagen vermutlich daran, dass einerseits die Glasplättchen schwer auf den Zellen liegen und dies die Zellen massiv beeinflusst. Andererseits führt das Aufliegen der Glasplättchen zu einer Unterversorgung an wichtigen Nährstoffen. Da in vivo die Versorgung der Zellen aus mehreren Richtungen stattfindet und keine flächige Auflage der Stents vorliegt sollte die Versorgung der Endothelzellen unter dem Stent gesichert sein. Hier würde man davon ausgehen, dass sich die Zellen lediglich direkt nach der Stentapplikation und nicht täglich oder jeden zweiten Tag erneuern. In diesem Fall wäre von einer höheren Transfektiondauer und –effizienz im Vergleich zu unseren Experimenten auszugehen.

In der Literatur werden verschiedene Mechanismen des Abbaus der PLGA-Polymere und somit der Freisetzung der NPs beschrieben. 1. Diffusion durch das Polymer, 2. Erosion (physikalisch) und Degeneration (chemisch) des Polymers oder 3. eine Kombination von Diffusion, Erosion und Degeneration [Koenig et al., 2017; Jain, 2000; Zhu and Braatz, 2015]. Ein Abbau in vivo durch ggf. enzymatische Prozesse, neben den bereits genannten Vorgängen, ist bislang noch nicht ausreichend geklärt [Cai et al., 2003; Zhou et al., 2010]. In unserem Fall nehmen wir an, dass die siRNA NP mittels Diffusion (in den ersten zwei Tagen) durch das Polymer und anschließend durch Degeneration (Hydrolyse) und Erosion des Polymers freigesetzt werden.

Wie bereits angesprochen, eröffnet sich mit der Freisetzung von mRNA aus PLGA-Beschichtungen und insbesondere im Zuge der kombinierten Freisetzung von mRNA und siRNA die Möglichkeit, die Proteinexpression in EA.hy926, und

zukünftig auch in Endothelzellen *in vivo*, in zwei verschiedene Richtungen zu beeinflussen. 1. die Verringerung der Expression mittels der Transfektion von siRNA und 2. die Proteinexpression mittels mRNA-Transfektion. Für dieses Konzept haben wir erstmalig die einzelne und gemeinsame Freisetzung aus PLGA-Schichten und Transfektion in EA.hy926 von eGFP-mRNA und siRNA AF 555 gezeigt (vgl. Tabelle 12).

In Zusammenarbeit mit einer weiteren Arbeitsgruppe unseres Labors konnte zudem die Freisetzung, die Transfektion und der Nachweis der Funktionalität von CD39-mRNA in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) gezeigt werden. Hierfür wurde die CD39-mRNA in der in dieser Arbeit entwickelten PLGA-Beschichtung immobilisiert und aus ihr wiederum freigesetzt [Abraham et al., 2015]. Hiermit konnte die Plättchenaktivierung und somit das Risiko für Stentthrombosen nachweislich gesenkt werden.

Der Erfolg bzw. die Wirksamkeit der aus dem PLGA freigesetzten und transfizierten siRNAs wurde durch die Reduktion des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in EA.hy926 und hVECs gezeigt. Die höchste Reduktion wurde mit der Kombination von siRNA und PLGA 1 erreicht. Hier scheint die schnellere Abbaubarkeit des PLGA die siRNA rascher freizusetzen und in der Folge eine signifikante Reduktion in immortalisierten Zellen und tendenziell auch in primären Zellen zu erreichen (vgl. Abbildung 21). Eine etwas geringere Reduktion zeigte sich auch bei PLGA 2 und 3 mittels FACS. Aus diesen Ergebnissen folgerten wir, dass PLGA 1 das am besten geeignete Polymer für die Kotransfektion ist. Dies bestätigte sich auch bei der Untersuchung der mRNA Konzentration von ICAM-1 mittels qRT-PCR, wobei sich bei PLGA 1 die geringste Menge mRNA mit 53 % gegenüber der Kontrolle zeigte.

Unsere Daten der ICAM-1 Expression in EA.hy926 und hVECs entsprechen den Literaturangaben, wonach ein effizienter Gentransfer in primären Zelllinien schwieriger ist und sich daraus weniger klare Daten ergeben als bei immortalisierten Zelllinien [Gresch and Altrogge, 2012; Hamm et al., 2002]. Wir nehmen an, dass zu wenige NP in die Zellen eingedrungen sind oder die unerwünschten

Effekte des Lipofectamine®2000 für die geringere Reduktion in primären Endothelzellen verantwortlich sind. Mit einem anderen Transfektionsreagenz, einer höheren Konzentration des Transfektionsreagenzes oder einer höheren siRNA-Menge könnte möglicherweise eine bessere Transfektion der siRNA sowie eine stärkere Reduktion der mRNA und somit der Proteinexpression in hVEC erreicht werden [Nolte et al., 2009]. Auch ein unterschiedliches Transfektionsreagenz für mRNA und siRNA ist mit der entwickelten Multilayerbeschichtung möglich, da die verschiedenen RNA-Komplexe in verschiedene Schichten eingebettet werden können. Die Transfektion von mehreren siRNAs gleichzeitig zeigte sich bereits bei Walker et al [Walker et al., 2009], hier im Speziellen siRNA gegen E-selektin, ICAM und VCAM, als vorteilhaft, was mit der Multilayerbeschichtung gut zu verwirklichen wäre. Auch eine Freisetzung der siRNAs oder mRNAs zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Applikation, kann mit dieser Beschichtung erreicht werden.

4.4 Ausblick und Weiterentwicklung der Beschichtungen

In Zukunft muss die Stabilität der Beschichtungen auf Metall anstatt auf Glas als Material der Wahl von Stentstreben getestet werden, um die Einsatzmöglichkeit auf Koronarstents zu untersuchen. Zudem muss ein geeignetes Verfahren zur Aufbringung der entwickelten Beschichtung auf Stents gefunden werden. Hierbei können gängige Verfahren wie das Aufsprühen des Polymers oder Eintauchen des Stents in das Beschichtungsmaterial getestet werden, um eine gleichmäßige Oberflächenstruktur mit einer stabilen Haftung und Flexibilität während und nach der Expansion des Stents zu erreichen.

Zudem könnte eine Mischung aus verschiedenen Polymeren diese Eigenschaften verbessern. Z.B. könnte als Grundierung PLGA 2 oder 3 verwendet werden, welche sich als besonders stabil auf den getesteten Glasplättchen, jedoch mit einer geringeren Transfektionseffizienz der siRNA-Komplexe in Zellen zeigten.

Hierbei ist zu beachten, dass nicht nur die Beschichtung selbst, sondern auch die Struktur der Stents relevant ist. Es hat sich gezeigt, dass es zu weniger Verwirbelungen kommt, je dünner die Streben sind und der Stent dadurch weniger Thrombogenität besitzt [Bangalore et al., 2018].

Im Anschluss an die Optimierung der Auftragungsmethode der PLGA-Beschichtung besteht die Möglichkeit, die neuen Stents in vitro, bspw. mittels speziellen Perfusionskammern, so genannten Chandler-loop, in einem Versuchsaufbau zu testen, welcher den natürlichen Blutfluss in einem Gefäß ex-vivo simuliert [Krajewski et al., 2013]. Zudem könnte dies in vivo im Tierversuch, bspw. in porcinen Gefäßen, getestet werden. Hierbei ist die Implantierbarkeit, die Freisetzung und Transfektion der siRNA-Komplexe, sowie die Wirksamkeit mittels des Nachweises der Reduzierung von Proteinen kurz- und langfristig zu zeigen. Überdies muss das Ausbleiben von Irritationen, Sensibilisierungen, systemischen Nebenwirkungen, Infektionsprozessen, Teratogenität und mutagenen oder kanzerogenen Reaktionen sowie die bereits kurzfristig getestete Zytotoxizität und Hämokompatibilität nach DIN EN ISO 10993-5:2009 langfristig und dauerhaft gezeigt werden, bevor das neue Medizinprodukt in humanen Probanden eingesetzt werden darf.

Denkbar ist auch die Ausweitung des Anwendungsgebiets von Stents. Bei venösen Bypässen hat sich gezeigt, dass die Reduzierung von ICAM-1 die Haltbarkeit der venösen Autograftprothesen erhöht [Walker et al., 2005]. In der Behandlung von Karzinomen werden siRNAs immer wichtiger um eine Reduktion der Tumormasse zu erzielen, z.B. bei Prostata- [Pietschke et al., 2013] und Larynxkarzinomen [Ye et al., 2018]. Hier eröffnen sich weitere Anwendungsmöglichkeiten für siRNA freisetzende Materialien, z.B. zur Beschichtung eines Urethralstents in die Prostataloge oder zur postoperativen Einbringung von PLGA-Plättchen im Operationsgebiet, um das Lokalrezidivrisiko zu erniedrigen. Wichtig ist dabei die Auswahl der passenden siRNAs. Zudem ist darauf zu achten, ob es sich um eine palliative Situation handelt, in der das Offenhalten von Lumen wichtig ist und somit z.B. ein Metallgeflecht als Träger geeigneter erscheint als in einer kurativen Situation, in der die Beschichtung auf einem komplett resorbierbaren Material von Vorteil wäre, um längerfristig keinen Fremdkörper im Körper zu belassen.

5 Zusammenfassung

Der Einsatz von siRNA und mRNA ist ein vielversprechender Ansatz zur Verringerung häufiger Komplikationen bei der PTCA und Stentversorgung zur Behandlung von Herzkreislauferkrankungen. Bislang konnte jedoch keine effiziente lokale oder langfristige Freisetzung der RNAs erreicht werden. PLGA hat sich als Beschichtung bei DES bewährt und wurde deshalb im Rahmen dieser Doktorarbeit für die Untersuchungen verwendet.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die untersuchten PLGAs, welche sich in ihrem PLA:PGA-Verhältnis (PLGA 1 = PLA:PGA 75:25, mit Säureendgruppe; PLGA 2 = PLA:PGA 85:15, mit Esterendgruppe bzw. PLGA 3 = PLA:PGA 75:25, mit Esterendgruppe) unterscheiden, hämo- und zytokompatibel sind, da sie die Zellviabilität von EA.hy926 nicht beeinträchtigen, in Kontakt mit Blut weder thrombogen noch komplementaktivierend sind und den pH-Wert des Zellkulturmediums nicht stark beeinflussen. Untersuchungen der inflammatorischen Reaktion von hVEC auf reine PLGA-Beschichtungen zeigten teils einen protektiven Effekt auf die Zellen. Aus PLGA-Beschichtungen mit eingebetteten Lipofectamine®2000-siRNA-Komplexen konnte eine außerordentlich hohe Transfektionseffizienz von bis zu 95 % mit fluoreszenzmarkierter siRNA erreicht werden. Hier zeigte sich ein Vorteil des PLGA 1 im Vergleich zu PLGA 2 und 3. Auch konnte eine gleichzeitige Freisetzung und Transfektion von siRNA und mRNA sowie eine Langzeitfreisetzung von siRNA aus Multilayerbeschichtungen über 20 Tage erreicht werden. Darüber hinaus konnte eine signifikante Verringerung der ICAM-1-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nach transfizierter siICAM in EA.hy926 und eine sichtbare jedoch nicht signifikante Verringerung in hVEC gezeigt werden.

Mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen kann die Eignung von PLGA, insbesondere PLGA 1, als vielversprechende Stentbeschichtung bestätigt werden. Die Anwendung einer PLGA-Beschichtung mit siRNA zur Unterdrückung der Expression unerwünschter Proteine sowie mit mRNA zur Induktion heilender oder protektiver Proteine ist ein innovativer und personalisierter Therapieansatz, der aufgrund seiner spezifischen und langanhaltenden Wirkungsweise als richtungsweisend für zukünftige Therapien angesehen werden kann.

6 Literaturverzeichnis

- A.D.A.M. 2016. *Wire mesh stent in heart vessel (coronary artery)* [Online]. <https://medlineplus.gov/ency/article/007473.htm>. [Accessed].
- ABRAHAM, M. K., NOLTE, A., REUS, R., BEHRING, A., ZENGERLE, D., AVCI-ADALI, M., HOHMANN, J. D., PETER, K., SCHLENSAK, C., WENDEL, H. P. & 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, e0138375.
- ALEXOPOULOU, L., HOLT, A. C., MEDZHITOV, R. & FLAVELL, R. A. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413, 732-8.
- AVCI-ADALI, M., BEHRING, A., KELLER, T., KRAJEWSKI, S., SCHLENSAK, C. & WENDEL, H. P. 2014. Optimized conditions for successful transfection of human endothelial cells with in vitro synthesized and modified mRNA for induction of protein expression. *J Biol Eng*, 8, 8.
- BANGALORE, S., TOKLU, B., PATEL, N., FEIT, F. & STONE, G. W. 2018. Newer Generation Ultra-Thin Strut Drug-Eluting Stents versus Older Second-Generation Thicker Strut Drug-Eluting Stents for Coronary Artery Disease: A Meta-Analysis of Randomized Trials. *Circulation*.
- BEHR, J. P. 1997. The Proton Sponge: a Trick to Enter Cells the Viruses Did Not Exploit. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 51, 3.
- BEIJK, M. A. & PIEK, J. J. 2007. XIENCE V everolimus-eluting coronary stent system: a novel second generation drug-eluting stent. *Expert Rev Med Devices*, 4, 11-21.
- BINNERTS, M. E., VANKOOYK, Y., SIMMONS, D. L. & FIGDOR, C. G. 1994. Distinct Binding of T-Lymphocytes to Icam-1, Icam-2 or Icam-3 Upon Activation of Lfa-1. *European Journal of Immunology*, 24, 2155-2160.
- BÖCKER, W. D., H.; HEITZ, P.; MONCH, H.; HÖFER, G.; KREIPE, H. 2012. *Pathologie*, Elsevier.
- BOUSSIF, O., LEZOUALC'H, F., ZANTA, M. A., MERGNY, M. D., SCHERMAN, D., DEMENEIX, B. & BEHR, J. P. 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 7297-301.
- BRIDGE, A. J., PEBERNARD, S., DUCRAUX, A., NICOULAZ, A. L. & IGGO, R. 2003. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet*, 34, 263-4.
- BRITO, L. A., CHANDRASEKHAR, S., LITTLE, S. R. & AMIJI, M. M. 2010. Non-viral eNOS gene delivery and transfection with stents for the treatment of restenosis. *Biomed Eng Online*, 9, 56.
- BYRNE, R. A., JONER, M. & KASTRATI, A. 2015. Stent thrombosis and restenosis: what have we learned and where are we going? The Andreas Gruntzig Lecture ESC 2014. *Eur Heart J*, 36, 3320-31.
- CAI, Q., SHI, G., BEI, J. & WANG, S. 2003. Enzymatic degradation behavior and mechanism of poly(lactide-co-glycolide) foams by trypsin. *Biomaterials*, 24, 629-38.
- CHEVALIER, B., CEQUIER, A., DUDEK, D., HAUDE, M., CARRIE, D., SABATE, M., WINDECKER, S., REITH, S., DE SOUSA ALMEIDA, M., CAMPO, G., INIGUEZ, A., ONUMA, Y. & SERRUYS, P. W. 2018. Four-year follow-up of the randomised comparison between an everolimus-eluting bioresorbable scaffold and an everolimus-eluting metallic stent for the treatment of coronary artery stenosis (ABSORB II Trial). *EuroIntervention*, 13, 1561-1564.

- CHEVALIER, B., ONUMA, Y., VAN BOVEN, A. J., PIEK, J. J., SABATE, M., HELQVIST, S., BAUMBACH, A., SMITS, P. C., KUMAR, R., WASUNGU, L. & SERRUYS, P. W. 2016. Randomised comparison of a bioresorbable everolimus-eluting scaffold with a metallic everolimus-eluting stent for ischaemic heart disease caused by de novo native coronary artery lesions: the 2-year clinical outcomes of the ABSORB II trial. *EuroIntervention*, 12, 1102-1107.
- CHOI, D., JANG, Y., LEE, B. K., CHOI, S. H., BYUN, K. H., SHIM, W. H. & CHO, S. Y. 2001. Stenting with intravenous abciximab infusion for the treatment of left main coronary artery thrombosis during coronary angioplasty. *J Invasive Cardiol*, 13, 107-10.
- CHOI, J., JANG, B. N., PARK, B. J., JOUNG, Y. K. & HAN, D. K. 2014. Effect of solvent on drug release and a spray-coated matrix of a sirolimus-eluting stent coated with poly(lactic-co-glycolic acid). *Langmuir*, 30, 10098-106.
- DANHIER, F., ANSORENA, E., SILVA, J. M., COCO, R., LE BRETON, A. & PREAT, V. 2012. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release*, 161, 505-22.
- DOWLER, T., BERGERON, D., TEDESCHI, A. L., PAQUET, L., FERRARI, N. & DAMHA, M. J. 2006. Improvements in siRNA properties mediated by 2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinonucleic acid (FANA). *Nucleic Acids Res*, 34, 1669-75.
- EDGEELL, C. J., MCDONALD, C. C. & GRAHAM, J. B. 1983. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 3734-7.
- ELBASHIR, S. M., HARBORTH, J., LENDECKEL, W., YALCIN, A., WEBER, K. & TUSCHL, T. 2001a. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411, 494-8.
- ELBASHIR, S. M., LENDECKEL, W. & TUSCHL, T. 2001b. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 15, 188-200.
- ERBACHER, P., ZOU, S., BETTINGER, T., STEFFAN, A. M. & REMY, J. S. 1998. Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability. *Pharm Res*, 15, 1332-9.
- ESC, E. S. O. C., DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR KARDIOLOGIE-HERZ- UND KREISLAUFFORSCHUNG E.V. 2017. *Duale Antitrombozytäre therapie (DAPT) bei Koronarer Herzkrankheit*, Düsseldorf, Börm Bruckmeier Verlag GmbH.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E. & MELLO, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-11.
- FREDENBERG, S., WAHLGREN, M., RESLOW, M. & AXELSSON, A. 2011. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems--a review. *Int J Pharm*, 415, 34-52.
- GRAYSON, A. C., DOODY, A. M. & PUTNAM, D. 2006. Biophysical and structural characterization of polyethylenimine-mediated siRNA delivery in vitro. *Pharm Res*, 23, 1868-76.
- GRESCH, O. & ALTROGGE, L. 2012. Transfection of difficult-to-transfect primary mammalian cells. *Methods Mol Biol*, 801, 65-74.
- GRUNTZIG, A. 1978. Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis. *Lancet*, 1, 263.
- GSTRAUNTHALER, G. L., T. 2013. *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*, Berlin, Springer Spektrum.
- HAASNOOT, J., WESTERHOUT, E. M. & BERKHOUT, B. 2007. RNA interference against viruses: strike and counterstrike. *Nature Biotechnology*, 25, 1435-1443.
- HAMM, A., KROTT, N., BREIBACH, I., BLINDT, R. & BOSSERHOFF, A. K. 2002. Efficient transfection method for primary cells. *Tissue Eng*, 8, 235-45.
- HEINRICH P., M. M., GRAEVE L. 2014. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, Deutschland, Springer, Berlin, Heidelberg.

- HEROLD, G. 2017. *Herold Innere Medizin 2018*, Elsevier.
- HONMA, K., OCHIYA, T., NAGAHARA, S., SANNO, A., YAMAMOTO, H., HIRAI, K., ASO, Y. & TERADA, M. 2001. Atelocollagen-based gene transfer in cells allows high-throughput screening of gene functions. *Biochem Biophys Res Commun*, 289, 1075-81.
- HOTH, M. & WISCHMEYER, E. 2016. Emigration und Phagozytose. In: BEHRENDTS, J., BISCHOFBERGER, J., DEUTZMANN, R., EHMKE, H., FRINGS, S., GRISSMER, S., HOTH, M., KURTZ, A., LEIPZIGER, J., MÜLLER, F., PEDAIN, C., RETTIG, J., WAGNER, C. & WISCHMEYER, E. (eds.) *Duale Reihe Physiologie*. 3., vollständig überarbeitete Auflage ed.: Georg Thieme Verlag.
- HOUCHIN, M. L. & TOPP, E. M. 2008. Chemical degradation of peptides and proteins in PLGA: a review of reactions and mechanisms. *J Pharm Sci*, 97, 2395-404.
- HU, T., LIN, S., DU, R., FU, M., RAO, Q., YIN, T., HUANG, Y. & WANG, G. 2017. Design, preparation and performance of a novel drug-eluting stent with multiple layer coatings. *Biomater Sci*, 5, 1845-1857.
- HWANG, C. W., WU, D. & EDELMAN, E. R. 2001. Physiological transport forces govern drug distribution for stent-based delivery. *Circulation*, 104, 600-5.
- JAIN, R. A. 2000. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, 21, 2475-90.
- JENJOB, R. T., P.; NA, K.; YANG, S. 2015. Recent trend in applications of polymer materials to stents. *Gastrointestinal Intervention* 4, 83-88.
- JIRIKOWSKI, G. F., SANNA, P. P., MACIEJEWSKI-LENOIR, D. & BLOOM, F. E. 1992. Reversal of diabetes insipidus in Brattleboro rats: intrahypothalamic injection of vasopressin mRNA. *Science*, 255, 996-8.
- KARIKO, K. & WEISSMAN, D. 2007. Naturally occurring nucleoside modifications suppress the immunostimulatory activity of RNA: implication for therapeutic RNA development. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 10, 523-32.
- KATAS, H. & ALPAR, H. O. 2006. Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *J Control Release*, 115, 216-25.
- KEREIAKES, D. J., ELLIS, S. G., METZGER, C., CAPUTO, R. P., RIZIK, D. G., TEIRSTEIN, P. S., LITT, M. R., KINI, A., KABOUR, A., MARX, S. O., POPMA, J. J., MCGREEVY, R., ZHANG, Z., SIMONTON, C., STONE, G. W. & INVESTIGATORS, A. I. 2017. 3-Year Clinical Outcomes With Everolimus-Eluting Bioresorbable Coronary Scaffolds: The ABSORB III Trial. *J Am Coll Cardiol*, 70, 2852-2862.
- KIM, T. K. & EBERWINE, J. H. 2010. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem*, 397, 3173-8.
- KLUGHERZ, B. D., JONES, P. L., CUI, X., CHEN, W., MENEVEAU, N. F., DEFELICE, S., CONNOLLY, J., WILENSKY, R. L. & LEVY, R. J. 2000. Gene delivery from a DNA controlled-release stent in porcine coronary arteries. *Nat Biotechnol*, 18, 1181-4.
- KOEDAM, J. A., CRAMER, E. M., BRIEND, E., FURIE, B., FURIE, B. C. & WAGNER, D. D. 1992. P-Selectin, a Granule Membrane-Protein of Platelets and Endothelial-Cells, Follows the Regulated Secretory Pathway in Att-20 Cells. *Journal of Cell Biology*, 116, 617-625.
- KOENIG, O., WALKER, T., PERLE, N., ZECH, A., NEUMANN, B., SCHLENSAK, C., WENDEL, H. P. & NOLTE, A. 2013. New aspects of gene-silencing for the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmaceuticals (Basel)*, 6, 881-914.
- KOENIG, O., ZENGERLE, D., PERLE, N., HOSSFELD, S., NEUMANN, B., BEHRING, A., AVCI-ADALI, M., WALKER, T., SCHLENSAK, C., WENDEL, H. P. & NOLTE, A. 2017. RNA-Eluting Surfaces for the Modulation of Gene Expression as A Novel Stent Concept. *Pharmaceuticals (Basel)*, 10.

- KRAJEWSKI, S., PRUCEK, R., PANACEK, A., AVCI-ADALI, M., NOLTE, A., STRAUB, A., ZBORIL, R., WENDEL, H. P. & KVITEK, L. 2013. Hemocompatibility evaluation of different silver nanoparticle concentrations employing a modified Chandler-loop in vitro assay on human blood. *Acta Biomater*, 9, 7460-8.
- KUMARI, A., YADAV, S. K. & YADAV, S. C. 2010. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 75, 1-18.
- KURITA, K. 2006. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Mar Biotechnol (NY)*, 8, 203-26.
- LAURENT, T. C., LAURENT, U. B. & FRASER, J. R. 1996. The structure and function of hyaluronan: An overview. *Immunol Cell Biol*, 74, A1-7.
- LEY, K., LAUDANNA, C., CYBULSKY, M. I. & NOURSHARGH, S. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7, 678-89.
- LÖWEL, D. M. H. 2006. Gesundheitsberichterstattung des Bundes – Heft 33 Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt. *Gesundheitsberichterstattung des Bundes*.
- MA, Y. L., TANG, X. F., YAO, Y., XU, N., SONG, Y., JIANG, P., XU, J. J., WANG, H. H., JIANG, L., LIU, R., ZHAO, X. Y., CHEN, J., GAO, Z., QIAO, S. B., YANG, Y. J., GAO, R. L., XU, B. & YUAN, J. Q. 2018. Comparison of Efficacy and Safety between First- and Second-Generation Drug-Eluting Stents in Patients with Acute Coronary Syndrome. *Chin Med J (Engl)*, 131, 1397-1405.
- MACHRAOUI, A. G., P.; FISCHER, A. 2001. *Koronarstenting*, Darmstadt, Deutschland, Steinkopff Verlag.
- MAKADIA, H. K. & SIEGEL, S. J. 2011. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)*, 3, 1377-1397.
- MANDAL, P. K. & ROSSI, D. J. 2013. Reprogramming human fibroblasts to pluripotency using modified mRNA. *Nat Protoc*, 8, 568-82.
- MERZENDORFER, H. 2006. Insect chitin synthases: a review. *J Comp Physiol B*, 176, 1-15.
- MU, P., NAGAHARA, S., MAKITA, N., TARUMI, Y., KADOMATSU, K. & TAKEI, Y. 2009. Systemic delivery of siRNA specific to tumor mediated by atelocollagen: combined therapy using siRNA targeting Bcl-xL and cisplatin against prostate cancer. *Int J Cancer*, 125, 2978-90.
- NAKAMURA, K. & DEAN, L. S. 2018. Long-term clinical observations for a biofunctionalized stent: Yet to deliver their theoretical benefits. *Catheter Cardiovasc Interv*, 91, 1219-1220.
- NOLTE, A., RAABE, C., WALKER, T., SIMON, P., ZIEMER, G. & WENDEL, H. P. 2009. Optimized basic conditions are essential for successful siRNA transfection into primary endothelial cells. *Oligonucleotides*, 19, 141-50.
- NOLTE, A., SECKER, S., WALKER, T., GREINER, T. O., NEUMANN, B., SIMON, P., ZIEMER, G. & WENDEL, H. P. 2011. Veins are no arteries: even moderate arterial pressure induces significant adhesion molecule expression of vein grafts in an ex vivo circulation model. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 52, 251-9.
- O'REGAN, M., MARTINI, I., CRESCENZI, F., DE LUCA, C. & LANSING, M. 1994. Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis. *Int J Biol Macromol*, 16, 283-6.
- OTSUKA, F., FINN, A. V., YAZDANI, S. K., NAKANO, M., KOLODGIE, F. D. & VIRMANI, R. 2012. The importance of the endothelium in atherothrombosis and coronary stenting. *Nat Rev Cardiol*, 9, 439-53.
- OVERBECK, P. 2017. *ABSORB-III-Studie: Bioresorbierbarer Stent auf holprigem Weg* [Online]. kardiologie.org. Available: <https://www.kardiologie.org/ischaemische->

- herzerkrankungen-koronare-herzkrankheit--khk/absorb-iii-studie-bioresorbierbarer-stent-auf-holprigem-weg/12158300 [Accessed].
- PARK, K., LEE, M. Y., KIM, K. S. & HAHN, S. K. 2010. Target specific tumor treatment by VEGF siRNA complexed with reducible polyethyleneimine-hyaluronic acid conjugate. *Biomaterials*, 31, 5258-65.
- PENG, H. Y., CHEN, M., ZHENG, B., WANG, X. G. & HUO, Y. 2009. Long-term effects of novel biodegradable, polymer-coated, sirolimus-eluting stents on neointimal formation in a porcine coronary model. *Int Heart J*, 50, 811-22.
- PETSCH, B., SCHNEE, M., VOGEL, A. B., LANGE, E., HOFFMANN, B., VOSS, D., SCHLAKE, T., THESS, A., KALLEN, K. J., STITZ, L. & KRAMPS, T. 2012. Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. *Nat Biotechnol*, 30, 1210-6.
- PIETSCHKE, K., WALKER, T., KRAJEWSKI, S., KURZ, J., AUFDERKLAMM, S., SCHWENTNER, C., SCHLENSAK, C., STENZL, A., WENDEL, H. P. & NOLTE, A. 2013. The Chance of Small Interfering RNAs as Eligible Candidates for a Personalized Treatment of Prostate Cancer. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 14, 1145-1154.
- PLUVINET, R., PETRIZ, J., TORRAS, J., HERRERO-FRESNEDA, I., CRUZADO, J. M., GRINYO, J. M. & ARAN, J. M. 2004. RNAi-mediated silencing of CD40 prevents leukocyte adhesion on CD154-activated endothelial cells. *Blood*, 104, 3642-6.
- QU, Y., SHI, X., ZHANG, H., SUN, W., HAN, S., YU, C. & LI, J. 2009. VCAM-1 siRNA reduces neointimal formation after surgical mechanical injury of the rat carotid artery. *J Vasc Surg*, 50, 1452-8.
- ROBINSON, R. 2004. RNAi therapeutics: how likely, how soon? *PLoS Biol*, 2, E28.
- SAMADI, N., ABBADESSA, A., DI STEFANO, A., VAN NOSTRUM, C. F., VERMONDEN, T., RAHIMIAN, S., TEUNISSEN, E. A., VAN STEENBERGEN, M. J., AMIDI, M. & HENNINK, W. E. 2013. The effect of lauryl capping group on protein release and degradation of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) particles. *J Control Release*, 172, 436-43.
- SAN JUAN, A., BALA, M., HLAWATY, H., PORTES, P., VRANCKX, R., FELDMAN, L. J. & LETOURNEUR, D. 2009. Development of a functionalized polymer for stent coating in the arterial delivery of small interfering RNA. *Biomacromolecules*, 10, 3074-80.
- SARDI. 2006. *Bare-Metal Stent vs. Drug-Eluting Stent* [Online]. <http://www.pages.drexel.edu/~sr335/Background.html>. [Accessed].
- SERRUYS, P. W., KUTRYK, M. J. & ONG, A. T. 2006. Coronary-artery stents. *N Engl J Med*, 354, 483-95.
- SIONTIS, G. C., STEFANINI, G. G., MAVRIDIS, D., SIONTIS, K. C., ALFONSO, F., PEREZ-VIZCAYNO, M. J., BYRNE, R. A., KASTRATI, A., MEIER, B., SALANTI, G., JUNI, P. & WINDECKER, S. 2015. Percutaneous coronary interventional strategies for treatment of in-stent restenosis: a network meta-analysis. *Lancet*, 386, 655-64.
- SLEDZ, C. A., HOLKO, M., DE VEER, M. J., SILVERMAN, R. H. & WILLIAMS, B. R. 2003. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol*, 5, 834-9.
- SLUITER, W., PIETERSMA, A., LAMERS, J. M. & KOSTER, J. F. 1993. Leukocyte adhesion molecules on the vascular endothelium: their role in the pathogenesis of cardiovascular disease and the mechanisms underlying their expression. *J Cardiovasc Pharmacol*, 22 Suppl 4, S37-44.
- SONTHEIMER, E. J. & CARTHEW, R. W. 2005. Silence from within: endogenous siRNAs and miRNAs. *Cell*, 122, 9-12.
- STETTLER, R., DIJKSTRA, J., RABER, L., TORII, R., ZHANG, Y. J., KARANASOS, A., LUI, S., CRAKE, T., HAMSHERE, S., GARCIA-GARCIA, H. M.,

- TENEKECIOGLU, E., OZKOR, M., WINDECKER, S., SERRUYS, P. W., REGAR, E., MATHUR, A. & BOURANTAS, C. V. 2018. Neointima and neoatherosclerotic characteristics in bare metal and first- and second-generation drug-eluting stents in patients admitted with cardiovascular events attributed to stent failure: an optical coherence tomography study. *EuroIntervention*, 13, e1831-e1840.
- TAHIR, H., BONA-CASAS, C. & HOEKSTRA, A. G. 2013. Modelling the effect of a functional endothelium on the development of in-stent restenosis. *PLoS One*, 8, e66138.
- TASHIRO, T., SEINO, S., SATO, T., MATSUOKA, R., MASUDA, Y. & FUKUI, N. 2012. Oral administration of polymer hyaluronic acid alleviates symptoms of knee osteoarthritis: a double-blind, placebo-controlled study over a 12-month period. *ScientificWorldJournal*, 2012, 167928.
- THOREK, D. L. & TSOURKAS, A. 2008. Size, charge and concentration dependent uptake of iron oxide particles by non-phagocytic cells. *Biomaterials*, 29, 3583-90.
- VERT, M., MAUDUIT, J. & LI, S. M. 1994. Biodegradation of Pla/Ga Polymers - Increasing Complexity. *Biomaterials*, 15, 1209-1213.
- WALKER, T., WENDEL, H. P., RAABE, C., WIECHNIK, P., SPRANGER, L., HEIDENREICH, O., SCHEULE, A. M., NORDHEIM, A. & ZIEMER, G. 2009. Graft protection in bypass surgery: siRNA-mediated silencing of adhesion molecules. *Oligonucleotides*, 19, 15-21.
- WALKER, T., WENDEL, H. P., TETZLOFF, L., HEIDENREICH, O. & ZIEMER, G. 2005. Suppression of ICAM-1 in human venous endothelial cells by small interfering RNAs. *Eur J Cardiothorac Surg*, 28, 816-20.
- WALKER, T., WENDEL, H. P., TETZLOFF, L., RAABE, C., HEIDENREICH, O., SIMON, P., SCHEULE, A. M. & ZIEMER, G. 2007. Inhibition of adhesion molecule expression on human venous endothelial cells by non-viral siRNA transfection. *J Cell Mol Med*, 11, 139-47.
- WANG, B., QIAN, H., YANG, H., XU, L., XU, W. & YAN, J. 2013. Regression of atherosclerosis plaques in apolipoprotein E^{-/-} mice after lentivirus-mediated RNA interference of CD40. *Int J Cardiol*, 163, 34-9.
- WANG, M. & GARTEL, A. L. 2011. The suppression of FOXM1 and its targets in breast cancer xenograft tumors by siRNA. *Oncotarget*, 2, 1218-26.
- WARREN, L., MANOS, P. D., AHFELDT, T., LOH, Y. H., LI, H., LAU, F., EBINA, W., MANDAL, P. K., SMITH, Z. D., MEISSNER, A., DALEY, G. Q., BRACK, A. S., COLLINS, J. J., COWAN, C., SCHLAEGER, T. M. & ROSSI, D. J. 2010. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 7, 618-30.
- WAUGH, J. & WAGSTAFF, A. J. 2004. The paclitaxel (TAXUS)-eluting stent: a review of its use in the management of de novo coronary artery lesions. *Am J Cardiovasc Drugs*, 4, 257-68.
- WEISSMAN, D. 2015. mRNA transcript therapy. *Expert Rev Vaccines*, 14, 265-81.
- WELT, F. G. P. & ROGERS, C. 2002. Inflammation and restenosis in the stent era. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 22, 1769-1776.
- WENDEL, H. P., AVCI-ADALI, M. & ZIEMER, G. 2010. Endothelial progenitor cell capture stents--hype or hope? *Int J Cardiol*, 145, 115-7; author reply 117-8.
- WHO 2016. *Hearts: technical package for cardiovascular disease management in primary health care.*, Geneva, Switzerland World Health Organization.
- WHO, C. W. M. B. A. A., T. ARMSTRONG, D. BETTCHER, T. BOERMA, F. BRANCA, J. C.Y. HO, C. MATHERS., R. MARTINEZ, V. P., G. ROGLIC, L. RILEY, E. D'ESPAIGNET, G. STEVENS, K.TAUBERT AND G. XUEREB. OTHERS WHO PROVIDED ASSISTANCE IN VARIOUS WAYS IN THE COMPILATION OF THIS DOCUMENT INCLUDE A. AYINLA, X. B., F. BESSON, & L. BHATTI, A. E.,

Literaturverzeichnis

- N. CHRISTENSON, F. LUBEGA, P. NORDET, M. OSEKRE-AMEY AND J. TAREL. 2011. *Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control.*, Geneva, Switzerland, World Health Organization.
- WINTERMANTEL, E. 2002. *Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- YE, D., ZHOU, C., WANG, S., DENG, H. & SHEN, Z. 2018. Tumor suppression effect of targeting periostin with siRNA in a nude mouse model of human laryngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Lab Anal*, e22622.
- ZHOU, X., CAI, Q., YAN, N., DENG, X. & YANG, X. 2010. In vitro hydrolytic and enzymatic degradation of nestlike-patterned electrospun poly(D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds. *J Biomed Mater Res A*, 95, 755-65.
- ZHU, X. & BRAATZ, R. D. 2015. A mechanistic model for drug release in PLGA biodegradable stent coatings coupled with polymer degradation and erosion. *J Biomed Mater Res A*, 103, 2269-79.
- ZOLNIK, B. S. & BURGESS, D. J. 2008. Evaluation of in vivo-in vitro release of dexamethasone from PLGA microspheres. *J Control Release*, 127, 137-45.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im klinischen Forschungslabor der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Hans Peter Wendel durchgeführt.

Die Konzeption der Versuche erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Andrea Nolte-Karayel, Leiterin der Arbeitsgruppe Bioaktive Implantate.

Sämtliche Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Dr. Andrea Nolte-Karayel und Labormitglieder wie z. B. Andreas Behring, Bernd Neumann, Olivia König und Julia Kurz) von mir eigenständig durchgeführt. Die Langzeitfreisetzung wurde mit der Unterstützung von Olivia König und Nadja Perle durchgeführt.

Die statistische Auswertung wurde, nach Anleitung durch Dr. Andrea Nolte-Karayel, von mir durchgeführt.

Die Veröffentlichung wurde mit der Unterstützung von Dr. Andrea Nolte-Karayel, von Olivia König und mir verfasst. Die Durchführung der in der Veröffentlichung beschriebenen Versuche erfolgte, mit der Unterstützung wie oben beschrieben, durch mich. Der Versuch des „Nachweises des spezifischen mRNA-Abbaus durch 5'-RLM-RACE-PCR“ wurde von Susanne Hossfeld und Olivia König durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Weingarten, den

(D. Zengerle)

8 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Olivia Koenig †, Diane Zengerle †, Nadja Perle, Susanne Hossfeld, Bernd Neumann, Andreas Behring, Meltem Avci-Adali, Tobias Walker, Christian Schlensak, Hans Peter Wendel , Andrea Nolte († These authors contributed equally to this work) – “RNA-Eluting Surfaces for the Modulation of Gene Expression as A Novel Stent Concept” – Pharmaceuticals (Basel) – 2017 - doi: 10.3390/ph10010023

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Hans Peter Wendel und bei Frau Dr. Andrea Nolte-Karayel für die tolle Betreuung und die Ermöglichung dieser Doktorarbeit bedanken.

Wichtig für diese Arbeit war auch das Stipendium des IZKF Promotionskollegs, welches mich finanziell unterstützt hat und mir die Möglichkeit geboten hat, zusammen mit anderen Promovierenden, mich in Fortbildungen weiterzubilden und mein Projekt in vielen Gesprächen weiterzuentwickeln.

Ein weiterer Dank gilt dem gesamten Team des THG Forschungslabors, das zu jeder Zeit mit Rat und Tat meine Arbeit unterstützt hat.

Zum Schluss gilt mein größter Dank meiner wunderbaren Familie. Meinen Eltern, Geschwistern und insbesondere meinem Verlobten. Alle haben mich während des gesamten Studiums und während der Promotion immer und zu jeder Zeit unterstützt und mir Mut gemacht.

Danke.

Curriculum vitae

Name: Diane Silke Zengerle
Geb.-Datum: 10.08.1990
Geb.-Ort: Schwäbisch Gmünd
Staatsangehörigkeit: deutsch

Beruf:
seit 10/2017 Ärztin in Weiterbildung zur Fachärztin für Innere
Medizin, Klinikum Friedrichshafen GmbH
08.06.2017 Approbation

Hochschulausbildung:
seit 8/2013 medizinische Doktorarbeit am Universitätsklinikum
Tübingen im klinisches Forschungslabor der Thorax-,
Herz- und Gefäßchirurgie
2010-2017 Studium der Humanmedizin, Eberhard Karls Universi-
tät Tübingen

Abschlüsse:
30.05.2017 3. Staatsexamen
14.04.2016 2. Staatsexamen
11.09.2012 1. Staatsexamen

Schulbildung:
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
2007-2010 Ernährungswissenschaftliche Gymnasium in Schwä-
bisch Gmünd
2001-2007 Realschule in Schwäbisch Gmünd
1997-2001 Grundschule in Schwäbisch Gmünd