

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

**siRNA vermittelte Immunantwort in Vollblut, PBMC's und
Endothelzellen**

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

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

vorgelegt von

Brüggling, Ani Asenova

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. A. Nolte-Karayel

2. Berichterstatter: Professor Dr. D. Rath

Tag der Disputation: 19.07.2023

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>IV</u>
<u>Abbildungsverzeichnis</u>	<u>VIII</u>
<u>Tabellenverzeichnis.....</u>	<u>X</u>
<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	<u>XI</u>
<u>1 Einleitung</u>	<u>1</u>
1.1 Atherosklerose	1
1.1.1 Therapie	3
1.2 siRNAs	4
1.3 Transfektion.....	7
1.3.1 Virus-vermittelte Transfektion (biologisches Verfahren).....	7
1.3.2 Elektroporation oder Mikroinjektion (physikalische Verfahren)	7
1.3.3 Calcium-Phosphat-Präzipitation (chemisches Verfahren) und Liposomen	7
1.4 Endothelzellen	9
1.5 PBMC's und Immunsystem	10
1.6 Entzündungsmediatoren	11
1.7 Hämokompatibilität und das Komplementsystem	14
1.8 Ziel der Arbeit	16
<u>2 Material und Methoden.....</u>	<u>17</u>
2.1 Geräte.....	17
2.2 Verbrauchsmaterial	19
2.3 Kits	21
2.4 siRNAs	22
2.5 Lipide.....	23

2.6 Primer	24
2.7 Zelllinien	27
2.8 Chemikalien und Reagenzien	28
2.8.1 Erythrozyten-Lysepuffer.....	29
2.9 Software	30
2.10 Blutgewinnung und Hämokompatibilität	30
2.10.1 Herstellung einer heparinisierten Lösung.....	30
2.10.2 Blutzellzahlen nach Inkubation mit siRNA.....	31
2.10.3 Vorbereitung Aliquotgewinnung für die ELISA-Testdurchführung	32
2.10.4 Blutzellzahlen nach Inkubation mit Lipiden	32
2.10.5 Verarbeitung der Lipide vor Inkubation mit Vollblut	33
2.10.6 ELISA	34
2.10.7 Enzymimmunoassay ELISA beta-Thromboglobulin β -TG	35
2.10.8 Enzymimmunoassay ELISA C3a	36
2.10.9 Enzymimmunoassay ELISA Sc5b-9	36
2.10.10 Enzymimmunoassay ELISA PMN-Elastase	37
2.10.11 Enzymimmunoassay ELISA Thrombin/Antithrombin III-Komplex-TAT	38
2.11 Inkubation und Transfektion von PBMCs mit unterschiedlichen siRNAs und siRNA-Konzentrationen aus menschlichem Vollblut	39
2.11.1 Isolierung von PBMCs aus frischem menschlichem Vollblut	39
2.11.2 Inkubation und Ansetzen des Blutes.....	39
2.11.3 Isolierung der PBMC`s aus menschlichem Vollblut.....	39
2.11.4 Inkubation der PBMCs mit siRNA.	40
2.11.5 Fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie (engl. Fluorescence-activated cell sorting = FACS).....	41
2.11.6 FACS-Messung siRNA	41
2.11.7 Transfektion der PBMCs mit siRNA.....	42
2.12 Untersuchung der Endothellzellen nach Kontakt mit verschiedene siRNAs in verschiedene siRNA Konzentrationen	43

2.12.1 Endothelzellen.....	43
2.12.2 Transfektion von Endothelzellen mit verschiedene siRNA-Konzentrationen	44
2.13 Isolierung von RNA	45
2.14 RNA-Konzentrationsmessung.....	45
2.15 Komplementär DNA (engl. Complementary DNA = cDNA) Synthese	45
2.16 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	46
2.17 Statistische Auswertung.....	47
<u>3 Ergebnisse</u>	<u>48</u>
3.1 Hämokompatibilitätstest.....	48
3.1.1 Blutzellzahlen nach Inkubation mit siRNA.....	48
3.1.2 Blutzellzahlen nach Inkubation mit Lipiden	50
3.2 Untersuchung der Marker für die Hämokompatibilität.....	52
3.2.1 Untersuchung der Marker für Hämokompatibilität nach Kontakt mit verschiedenen siRNAs	52
3.2.2 Untersuchung der Marker für die Hämokompatibilität nach Kontakt mit verschiedenen Lipiden.....	54
3.3 Inkubation und Transfektion von PBMCs mit unterschiedlichen siRNAs und siRNA-Konzentrationen aus menschlichem Vollblut	57
3.3.1 Inkubation von PBMC´s mit unterschiedlichen siRNA-Konzentrationen aus menschlichen Vollblut	57
3.3.2 Transfektion von PBMC`s mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen	62
3.3.3 Transfektion von Endothelzellen mit verschiedene siRNA-Konzentrationen	66
<u>4 Diskussion</u>	<u>70</u>
4.1 Hämokompatibilität der siRNA und Lipiden.....	72
4.2 Genexpression sowohl nach Inkubation als auch nach Transfektion von PBMC`s mit unterschiedlichen siRNA-Konzentrationen und Genexpression nach Transfektion der Endothelzellen mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen	75
4.3 Ausblick	79

<u>5 Zusammenfassung.....</u>	<u>80</u>
<u>6 Literaturverzeichnis.....</u>	<u>81</u>
<u>Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....</u>	<u>87</u>
<u>Danksagung.....</u>	<u>88</u>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Untersuchung der Blutzellzahlen nach Inkubation in Vollblut mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen.	49
Abbildung 2: Untersuchung der Blutzellzahlen nach Inkubation in Vollblut mit verschiedenen Lipid-Konzentrationen.	51
Abbildung 3: Proteinexpression von Faktoren des Komplementsystems SC5B/9 und c3a nach Inkubation in Vollblut mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen.....	52
Abbildung 4: Proteinexpression des Thrombozytenaktivierungsmarkers β -TG und TAT nach Inkubation in Vollblut mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen.....	53
Abbildung 5: Proteinexpression des Granulozytenaktivierungsmarkers PMN-Elastase (A) nach Inkubation in Vollblut mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen	54
Abbildung 6: Proteinexpression von Faktoren des Komplementsystems SC5B/9 und C3a nach Inkubation in Vollblut mit verschiedenen Lipid-Konzentrationen	55
Abbildung 7: Proteinexpression des Thrombozytenaktivierungsmarkers β -TG und TAT nach Inkubation in Vollblut mit verschiedenen Lipid-Konzentrationen.	56
Abbildung 8: Proteinexpression des Granulozytenaktivierungsmarkers PMN-Elastase (A) nach Inkubation in Vollblut mit verschiedenen Lipid-Konzentrationen..	57
Abbildung 9: Genexpression der Entzündungsmarker B7-2, CXCL-7, CXCL-8 und CXCL-10 nach Inkubation von PBMCs mit verschiedenen siRNA-Konzentration. ...	58
Abbildung 10: Genexpression der Entzündungsmarker $INF\alpha$, $INF\beta$, $INF\gamma$ und IL-12 nach Inkubation von PBMCs mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen.	59
Abbildung 11: Genexpression der Entzündungsmarker IL-1 β , IL-2, IL-6 und IL-8 nach Inkubation von PBMCs mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen.	60
Abbildung 12: Genexpression der Entzündungsmarker OAS, STAT, $TNF\alpha$ nach Inkubation von PBMCs mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen.....	61
Abbildung 13: Genexpression der Entzündungsmarker B7-2, CXCL-7, CXCL-8 und CXCL-10 nach Transfektion von PBMCs mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen.	62
Abbildung 14: Genexpression der Entzündungsmarker $INF\alpha$, $INF\beta$, $INF\gamma$ und IL-12 nach Transfektion von PBMCs mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen und -Modifikationen.	63
Abbildung 15: Genexpression der Entzündungsmarker IL-1 β , IL-2, IL-6 und IL-8 nach Transfektion von PBMCs mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen.....	64
Abbildung 16: Genexpression der Entzündungsmarker OAS, STAT und $TNF\alpha$ nach Transfektion von PBMCs mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen.....	65

Abbildung 17: Genexpression der Entzündungsmarker B7-2, CXCL-7, CXCL-8 und CXCL-10 nach Transfektion von Endothelzellen mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen. 66

Abbildung 18: Genexpression der Entzündungsmarker INF α , INF β , INF γ und IL-12 nach Transfektion von Endothelzellen mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen.. 67

Abbildung 19: Genexpression der Entzündungsmarker IL-1 β , IL-2, IL-6 und IL-8 nach Transfektion von Endothelzellen mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen. 68

Abbildung 20: Genexpression der Entzündungsmarker OAS, STAT und TNF α nach Transfektion von Endothelzellen mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen..... 69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte	17
Tabelle 2: Verwendetes Verbrauchsmaterial	19
Tabelle 3: Verwendete Kits	21
Tabelle 4: Verwendete siRNAs	22
Tabelle 5: Verwendete Lipide	23
Tabelle 6: Verwendete Primer	24
Tabelle 7: Verwendete Zelllinien	27
Tabelle 8: Medien	27
Tabelle 9: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	28
Tabelle 10: Verwendete Software	30
Tabelle 11: Darstellung der verschiedenen siRNA für die Testung der Hämokompatibilität	31
Tabelle 12: Darstellung der verschiedenen Lipide für die Testung der Hämokompatibilität	33
Tabelle 13: Darstellung der verschiedenen siRNA für die Testung der Hämokompatibilität nach 2 Stunden und nach 4 Stunden Inkubation	40
Tabelle 14: Darstellung der Konzentrationen der siRNA und Interferin für die Testung der Transfektion	41
Tabelle 15: Darstellung der verschiedenen siRNA und Interferin für die Testung der Hämokompatibilität der PBMC`s nach 2 Stunden Transfektion	42
Tabelle 16: Darstellung der verschiedenen siRNA und Interferin für die Testung der Hämokompatibilität der PBMC`s nach 2 Stunden Transfektion	44

Abkürzungsverzeichnis

2-5A	2'-5' gebundenes Oligoadenosin
Ago2	Argonaute 2
AHP	akute hepatische Porphyrie
APP	Akutphasenprotein
B7-2	CD86
BES	bioresorbierbare Gefäßgerüste
BMS	engl. bare-metal-stent
bzw.	beziehungsweise
CAMs	engl. cell adhesion molecules, dt. Zelladhäsionsmoleküle
cDNA	engl. Complementary DNA, dt. Komplementär DNA
CTAD	Tri-Natrium-Citrat
CXCL-10	C-X-C-Motiv-Chemokin 10
CXCL-7	C-X-C-Motiv-Chemokin 7, engl. platelet basic protein
CXCL-8	C-X-C-Motiv-Chemokin 8
DES	engl. drug-eluting-stent, dt. medikamentenfreisetzender Stent
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPE	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
DOTAP	Dioleoyloxypropyl-N, N, N-trimethylammonium, Methylsulfate
DSPE	Distearoylphosphatidylethanolamin
DSPE-PEG	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin Polyethylenglykol
EC	Europäische Kommission
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	engl. enzyme-linked Immunosorbent Assay, dt. antikörper- basiertes enzymatisches Immunnachweisverfahren
Engl.	Englisch
FACS	engl. fluorescence-activated cell sorting, dt. fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie
FDA	engl. United States Food and Drug Administration
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HBV	Hepatitis-B-Virus

HCV	Hepatitis-C-Virus
HIF1 α	Hipoxie-induzierter Faktor 1 α
HIF2 α	Hipoxie-induzierter Faktor 2 α
HVECs	engl. Human veneus endothelial cells, dt. humane venöse Endothelzellen
ICAM-1	intrazelluläres Adhäsionsmolekül (Immunglobulin-Superge-Familie)
IE	Internationale Einheit
IFN α	Interferon α
IFN β	Interferon β
IL-12	Interleukin 12
IL1b	Interleukin-1 β
IL-2	Interleukin 2
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
INF γ	Interferon γ
LDL	Low Density Lipoprotein (dt. Lipoprotein niedriger Dichte)
LET	liposomale Einkapselungstechnologie
LFA-1	engl. leucocyte function associated molecule, dt. leukozytenfunktionsassoziierte Antigene
MAB	monoklonale Antikörper
MPS	mononukleäres Phagozytensystem
mRNA	engl. messenger RNA, dt. Boten-RNA
n=	Anzahl der Probanden / Versuchsdurchläufe
NIH	neointimale Hyperplasie
NSCLC	nicht-kleinzelliger Lungenkarzinom
OAS	2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase
PBMCs	engl. periferal blood mononuclear cells, dt. mononukleare Zellen peripheren Blutes
PCR	engl. polymerase chain reaction. dt. Polymerase-Kettenreaktion
PLGA	Poly-(D,L.lactide-co-glycolide acid)
PMN-Elastase	neutrophile Elastase
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
PTGS	posttranskriptionaler Gen-Silencing-Mechanismus

qRT-PCR	engl. realtime quantitative PCR, dt. quantitative Echtzeit PCR
RISC	engl. RNA-induced silencing complex
RNA	engl. ribonucleic acid, dt. Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	engl. revolutions per minute, dt. Umdrehungen pro Minute
sICAM-1	freie Form von ICAM-1
siRNA	engl. small interfering RNA, dt. kleine eingreifende RNA
sog.	sogenannt
STAT-1	Signalwandler und Aktivator der Transkription 1
STAT-3	Signalwandler und Aktivator der Transkription 3
TAT	Thrombin/Antithrombin III-Komplex
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor α , Tumornekrosefaktor α
VCAM-1	engl. vascular cell adhesion molecul-1, dt. vaskuläres Adhäsionsmolekül
Well	dt. Vertiefung
z.B.	zum Beispiel
α	Alpha
β	Beta
β -TG	β -Thromboglobulin
γ	Gamma

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind eine der Haupttodesursachen weltweit und Atherosklerose ist eine der Hauptursachen ischämischer Herzerkrankungen (1). Der Ursprung des Wortes Atherosklerose findet seine Abstammung in den griechischen Wörtern "Sklerose", was eine Verhärtung bedeutet und „athere“ was Brei (Lipidansammlung) bedeutet (2). Die Wand von Venen und Arterien ist aus drei Schichten aufgebaut. Tunika externa ist die äußere Schicht und besteht hauptsächlich aus lockerem Bindegewebe und lockeren elastischen Fasern. In dieser Schicht sind auch die Blutgefäße und Nerven verankert. Die zweite innere Schicht ist die Tunica media. Je nachdem, wo sich das Blutgefäß befindet, besteht diese Schicht aus ringförmig nacheinander angeordneten Muskelzellen, elastischen Fasern und Kollagenfasern. Die Tunica Intima ist die auskleidende Schicht des Innengefäßes und besteht aus einem einschichtigen Plattenepithel, das sogenannte Endothel. Die herznahen Arterien sind Arterien vom elastischen Typ (2). Atherosklerose ist eine fortschreitende Erkrankung, die sich durch Ansammlung von extrazellulärer Matrix und Lipiden charakterisiert, was wiederum zur Verhärtung des Gefäßlumens führt und letztendlich zur endothelialen Dysfunktion (3, 4). Außerdem ist sie durch eine Proliferation von glatten Muskelzellen, Infiltration von Makrophagen, Akkumulation von Bindegewebskomponenten und Thrombusbildung gekennzeichnet. Risikofaktoren, die die Entwicklung einer Atherosklerose begünstigen sind Diabetes melitus, Rauchen, Bluthochdruck, sowie Hyperlipidämische Zustände. Eine familiäre Prädisposition spielt ebenfalls eine wichtige Rolle. Hypercysteinämie hat einen sehr begünstigenden Einfluss auf die Atherosklerose. Dies beschreibt eine erhöhte Konzentration der schwefelhaltigen Aminosäure Homocystein, die eine Atherogenese fördert, indem es Endothelschäden verursacht (5).

Wenn sich die Erkrankung im Herzen entwickelt, führt dies zu einem Myokardinfarkt aufgrund der begleitenden Stenose der Koronararterien. Ruptur atherosklerotischer Plaques oder Stenose im Gehirn führt zu vorübergehenden ischämischen Anfällen oder Schlaganfall. Betrifft die Stenose die Nierenäste kann das zu allgemeiner Hypertonie und Nierenfunktionsstörungen führen. An anderen arteriellen Ästen der Extremitäten kann Atherosklerose zu einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit führen (6, 7). Eine Anpassung des Lebensstils, wie zum Beispiel Gewichtsreduktion, Raucherentwöhnung, Stressreduktion, Sportaktivität, oder Gabe zusätzlicher blutdrucksenkender Medikamente sind ausreichend, um eine Manifestation und das Fortschreiten der Erkrankung zu verlangsamen oder sogar zu stoppen.

Die Atherosklerose gliedert sich in mehrere Stadien, wobei bei dem ersten Stadium die normale Gefäßwand als Referenz dient. In der zweiten Phase sind Akkumulationen von Makrophagen und Fett unter dem Endothel sichtbar. Dieses Stadium ist vollständig reversibel und nur ein kleiner Anteil entwickelt sich weiter zum atherosklerotischen Ansammlung. Das dritte Stadium wird als früheres arteriosklerotisches Ansammlung angesehen. Dabei ist eine zentrale Nekrose mit

Atherombrei und eine Deckplatte aus zellfreiem und gefäßfreiem Bindegewebe festzustellen. Als viertes Stadium wird das späte, komplexe, arteriosklerotische Beet bezeichnet. Dabei durchläuft das arteriosklerotische Beet ein und denselben Zyklus mehrmals. Es entsteht eine Deckenruptur gefolgt von Thrombosen. Nach der Organisation der Thrombosen folgt die entzündliche Instabilisierung des Beetes und eine erneute Deckenplattenruptur. Die Verkalkungen sind radiologisch sichtbar und treten bereits ab den frühen arteriosklerotischen Beeten auf (5). Die atherosklerotischen Plaques entstehen aufgrund eines chronisch entzündlichen Geschehens der Gefäßwand, was auch histologisch nachweisbar ist. Dies ist charakterisiert durch lokale, pathologische Veränderungen, meistens durch Lipid- (Athero-) und unscharfer Kollagenfaserhäufung (Sklerose) (5). Die sklerotische Plaque enthält aktivierte Makrophagen, vaskuläre Endothelzellen, Lipide und glatte Muskelzellen. Das verursacht eine Verdickung der inneren Intimaschicht der Arterien und fördert die Aufnahme von Lipiden und Makrophagen (7, 8). Die arterielle Wand ist verengt und der normale laminare Blutstrom gestört, was zu einer Erhöhung des Scherstress auf die Endothelzellen führt. Das aktivierte Endothel vermittelt über die Expression von Adhäsionsmolekülen zunächst die Adhäsion von Thrombozyten und rollenden Leukozyten und die Permeabilität für Macromoleküle erhöht (5).

Das begünstigt die Oxidation der LDL-Partikel und die Bildung atherogener Moleküle wie das Adhäsionsmolekül ICAM-1 (intrazelluläres Adhäsionsmolekül) und VCAM-1 (vaskuläres Adhäsionsmolekül), sowie E-Selektin. Die Infiltration der zirkulierenden Monozyten erfolgt durch die Adhäsionsmoleküle E-Selektin und P-Selektin. Die Anheftung an der Endotheloberfläche wird durch die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 vermittelt (3, 9). Es folgen eine Reihe von inflammatorischen Prozessen die letztendlich zur Plaquebildung und gesteigerter immunologischer Aktivität führen(3).

Das intrazelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) ist ein Zelloberflächenglykoprotein. Dieses wurde als erstes durch einen monoklonalen Antikörper (MAB) definiert, der die Leukozytenaggregation hemmt, wenn diese durch Phorbol ester stimuliert wird (10). ICAM-1 befindet sich auf der Oberfläche vieler hämatopoetischer und nicht hämatopoetischer Zellen und dient als adhäsiver Ligand für Integrin, das mit Leukozytenfunktion assoziierte Molekül-1 fungiert. In vielen Studien wurde gezeigt, dass die ICAM-1 / Leukozytenfunktionsassoziierte Molekül-1 Wechselwirkung bei vielen immunvermittelten Zelladhäsionsreaktionen von Bedeutung ist (11). ICAM-1 ist auf der Endothelzelloberfläche vorhanden und seine Expression wird durch proinflammatorische Zytokine erhöht. Die Expression von ICAM-1 ist in atherosklerotischem Gewebe erhöht. Zusätzlich wurde das ICAM-1 im Fortschreiten von Autoimmunkrankheiten einbezogen. Deshalb wird das ICAM-1 nicht nur als Leukozyten-Adhäsionsmolekül gesehen, sondern auch in Verbindung mit Entzündungsreaktionen innerhalb der Blutgefäßwand. Die Endothelzellaktivierung ist erhöht und somit ist auch die Bildung atherosklerotischen Plaques verstärkt. Die freie Form von ICAM-1 (sICAM-1) wurde im Plasma gefunden. Diese ist gesteigert im Serum von Patienten mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Autoimmunkrankheiten, Krebs und Erkrankungen des zentralen Nervensystems. ICAM-1 spielt sowohl bei der angeborenen als auch bei der adaptiven Immunantwort eine wichtige Rolle. Vor allem ist es an der transendothelialen Migration von Leukozyten beteiligt und ermöglicht dadurch eine schnelle Einwanderung von Lymphozyten in das Gefäßendothel (12).

Das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül (V-CAM) ist das spezifische Zelladhäsionsmolekül für zirkulierende Monozyten und Leukozyten (13). Selektine sind oberflächliche Glykoproteine und sorgen für Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen, wenn es sich um eine Gewebsverletzung und eine Entzündung handelt. Das Gefäßendothel exprimiert dann E-Selektin (14). Auch bei diabetischen Gefäßschäden wie bei einer Angiopathie ist die Beteiligung der Selektine zu sehen. Ein dauerhaft erhöhter Glukosespiegel bringt die Endothelzellen zu einem oxidativen Stress, was wiederum zur Expressierung von E-Selektin und zur Infiltration von Monozyten führt (15).

1.1.1 Therapie

Wird eine Herzerterie durch Plaqueakkumulation blockiert oder verengt, wird die Implantation von einem oder mehreren Stents notwendig. Dieses Verfahren nennt sich perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA). Ziel ist die verengte Arterie wieder zu öffnen. Dabei wird ein Katheter bis zur verengten Stelle geführt und mittels einem installierten gefalteten Ballon aufgedehnt. Sowohl bei der Dehnung als auch bei der Stentapplikation kann es zur Verletzung an der Arterieninnenwand kommen, welche das Thromboserisiko erhöht. Die Stents sind röhrenförmige Implantate, die der Arterie unter anderem eine mechanische Festigkeit verleihen und sie weiterhin gedehnt halten sollen. Es gibt zwei Gruppen von Stents, selbstexpandierende und ballonexpandierbare Stents. Beide gehören zur 1. Generation von Stents, sog. Bare-Metal-Stents (BMS). Die Gerüste dieser Stents bestehen aus Edelstahl, oder Cobalt-Chrom-Legierungen. Die ballonexpandierbaren Stents bestehen aus Nickel-Titan-Legierungen. Während des Einbringens treten oft intravaskuläre Verletzungen auf, die zu einer In-Stent-Restenose (ISR) führen. Einer der häufigsten Ursachen der Arterienblockade im Laufe der Zeit ist die ISR, was später zu einem Stentversagen führen kann. Eine andere Gruppe neuartiger Stents sind die sog. medikamentenfreisetzenden Stents (DES). Letztere sind verantwortlich für die Freisetzung von Arzneimitteln an der Stentoberfläche. Das Risiko einer unerwünschten, biologischen Reaktion wird gesteuert durch eine zeitlich geordnete Arzneimittelfreisetzung. Diese Arzneimittel dürfen nicht toxisch sein, sollen stabil bleiben und möglichst gleichbleibend abgegeben werden. Laut Borhani 2018 nimmt die Intimadicke in den ersten 4 Wochen signifikant zu. Zusätzlich wird die Stentoberfläche vom umliegenden Gewebe bedeckt, dennoch besteht das Risiko einer nicht vollständigen Endothelialisierung. Dies ist die eigentliche Ursache der Thrombose und der Restenose (16). Studien belegen, dass nach einer Koronarangioplastie mit DES die Inzidenz einer späten Stenthrombose über das erste Jahr deutlich häufiger ist als mit BMS. Dabei ist es bekannt, dass eine verzögerte Heilung, eine Entzündung und eine endotheliale Dysfunktion aufgrund der verwendeten Zytostaltika auf der Stentoberfläche zu Grunde liegen. Das Thromboserisiko ist ebenfalls um ein Vielfaches erhöht und auch verlängert (17). Deshalb müssen die Patienten mindestens ein Jahr lang nach einer Stentapplikation Medikamente einnehmen, die die Blutgerinnung hemmen.

Ein innovativer, therapeutischer Ansatz die Entzündung nach einer Stentapplikation, bzw. Restenose zu minimieren ist es small interfering RNA (siRNA) beschichtete Stentoberflächen zu verwenden. Durch Ihre Eigenschaft können unerwünschte Immunreaktionen und weitere Komplikationen reduziert werden.

1.2 siRNAs

Small interfering RNA (siRNA) hat sich als leistungsstarkes Werkzeug für die zielspezifische Genstummenschaltung über RNA-Interferenzen (RNAi) erwiesen (18). RNA-Interferenz ist ein posttranskriptionaler Gen-Silencing-Mechanismus (PTGS), der in Pflanzen, einigen Wirbellosen und Säugetierzellen vorkommt. Die Verwendung der RNAi-Technologie für die funktionelle Genomanalyse wurde durch systematisches RNAi basiertes genetisches Screening in *C. elegans* und *Drosophila* entdeckt. Baulcombe und Hamilton fanden heraus, dass die Zellen die Proteinproduktion durch einen neuartigen Mechanismus steuern können, durch den kleine doppelsträngige RNA-Moleküle an spezifische mRNA-Sequenzen binden und die Proteinexpression des jeweiligen Gens blockieren (19).

siRNAs sind in der Lage, Zielmessenger RNAs (mRNA) in einem sequenzspezifischen Verfahren "stillzulegen". Der RNAi-Mechanismus wird zunächst durch das Enzym Dicer ausgelöst, welches doppelsträngige RNAs (dsRNAs) in kürzere doppelsträngige siRNAs von 21-25 Nucleotide spaltet. Der siRNA-Passagierstrang wird dann abgewickelt und der siRNA-Leitstrang wird in den RNA-induzierten Silencing (RISC)-Komplex geladen. Das führt zur Spaltung von Ziel-mRNAs durch Argonaute 2 (Ago2), wenn die Sequenz des Leitstrangs mit einer mRNA-komplementären Sequenz gepaart wird. Deshalb kann eine genau angepasste Sequenzauswahl und Synthese bestimmter siRNAs eine sehr zielgerichtete Wirkung auf die Therapie haben, denn fast alle Gene sind dadurch herunter regulierbar (20). Das Hindernis, um das komplette medizinische Potential von RNAi zu nutzen, ist die Schwierigkeit, diese Effektor Moleküle, wie kleine interferierende RNAs (siRNA) in vivo abzugeben. Durch die Enzyme im Serum und Gewebe sind die siRNAs extrazellulär schnell abbaubar. Damit die Zellen erreicht werden, muss die siRNA die Diffusion durch die Plasmamembran durchdringen welches als alleinstehendes negatives Molekül sehr schwer ist. Damit das möglich ist müssen sie noch von RISC mit höherer Effizienz erkannt werden und in diese eingebaut werden. Chemische Modifikationen können die Stabilität und Aufnahme von nackten siRNAs verbessern. Wichtig dabei ist, dass die siRNAs direkt modifiziert werden können, ohne Ihre Fähigkeit zu beeinträchtigen (21).

Es sind mehrere Anwendungen von siRNA bekannt. Eine davon ist die Unterdrückung der Expression von Adhäsionsmolekülen in menschlichen, pulmonalen, mikrovaskulären Endothelzellen. Dabei wurden menschliche Zellen mit einer spezifischen siRNA transfiziert, dann wurde die Expression von Adhäsionsmolekülen durch FACS-Analyse und auf Zellularebene die Reduktion von intrazellulärem mRNA bestimmt. Auch die Einlagerung von Neutrophilen wurde untersucht. Die Ergebnisse sind sehr vielversprechend, da die Adhäsionsmoleküle signifikant verringert sind, ebenso wie die anhaftenden Neutrophile (22). Der Träger der Transfektion ist ebenfalls

wichtig. In dieser Studie wurde eine PLGA-Träger-vermittelte Transfektion untersucht. Diese bestätigte zusätzlich den Abbau der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (23).

Es sind mittlerweile mehrere siRNA-basierte Therapeutika im Einsatz gegen altersbasierte Makuladegeneration, Typ-2 Diabetes, Krebs und HIV Infektionen (24). Ein sicheres Verabreichungssystem für die Zielzellen bleibt weiterhin eine Herausforderung (25).

Im Jahr 2018 wurde Patisiran (ONPATTRO®) als erstes RNA-basiertes Medikament zugelassen. Seine Verabreichung ist dank Lipid-Nanopartikel Technologie als kurze Nukleinsäure (d.h. siRNA) möglich. Das ionisierbare Aminolipid spielt eine zweifache Rolle im Arzneimittelabgabeprozess. Zunächst wird die siRNA eingekapselt und nach der Endozytose im Zytoplasma der Zielzelle entpackt (26). Mit dem Ausbruch der Coronavirus-Krankheit 2019 (COVID-19) wurde mit Hilfe von Lipid-Nanopartikeln und Nukleinsäure, in diesem Fall mRNA, die Entwicklung von zwei SARS-CoV-2-mRNA-Impfstoffen, nämlich Tozinameran (Comirnaty oder Pfizer-BioNTech COVID-19-Impfstoff) und Elasmomeran (Spikevax oder COVID-19-Impfstoff Moderna) ermöglicht (25, 27, 28). Dies machte den Einsatz der mRNA revolutionär. Ein ebenso zugelassenes, angewendetes, siRNA-Medikament seit 2019 ist GIVLAARI™ (Givosiran, ALN-AS1) zur Behandlung der akuten hepatischen Porphyrie (AHP) (29-31).

Ein Medikament aus derselben Gruppe der siRNA ist Leqvio® (Inclisiran). Seit Februar 2021 ist dieses auch in Deutschland verfügbar. Es wird für die Behandlung von Hypercholesterinämie, sowie einer gemischten Dyslipidämie bei Erwachsenen angewendet. Dabei wird die Expression der LDL-C-Rezeptoren, die sich auf der Oberfläche der Leberzellen befinden erhöht, um mehr LDL-C in den Zellen aufzunehmen (32).

Eine weitere Anwendung der siRNA findet durch das Medikament Lumasiran statt, welches zur Behandlung von Hyperoxalurie Typ 1 eingesetzt wird. Es handelt sich hierbei um eine seltene genetische Erkrankung die unbehandelt zu Nierensteinen, Nephrokalzinose oder Nierenversagen führen kann. Mit der Verabreichung von Lumasiran reduziert sich die hepatische Oxalsäureproduktion, indem die Glykoatoxidase gehemmt wird (33).

Die proliferationsabhängigen Proteine und Faktoren in Tumorzellen, wie z.B. im nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) können mittels siRNA reduziert werden. Dies wurde in einer Studie unserer Arbeitsgruppe untersucht. Dabei wurde der Knockdown und die Zellproliferation von vier NSCLC-Zelllinien nach Transfektion mit siRNA gegen Hypoxie-induziertem Faktor 1 α und 2 α (HIF1 α und HIF2 α) sowie Signalwandler und Aktivator der Transkription 3 (STAT-3) untersucht. Die Zellproliferation wurde nach Transfektion in allen Zelllinien reduziert. Allerdings sollen die siRNAs an die verschiedenen Tumortypen angepasst werden, um weniger Nebenwirkungen zu verursachen (34).

Durch ein neuartiges Stentverfahren „Gen-Silencing-Stents“, welches eine spezifische siRNA eluieren soll, wird die Gefäßwandregeneration durch Silencing verbessert, indem der Weg zur Hyperplasie der Intima unterbunden wird (35). Durch die Verwendung von DNA-Mikroarrays konnte festgestellt werden, dass die siRNA

vermittelte Genstumschaltung eine genaue Sequenzspezifität für die Ziel-mRNA aufweist (36). Die Leukozyten-Endothel-Wechselwirkung wird durch die Expression von Adhäsionsmolekülrezeptoren auf die venösen Endothelzellen nach einer Stentinseration beeinflusst. Das führt zu einer transendothelialen Migration und einer neointimalen Hyperplasie (NIH). Deshalb spielt die Hemmung dieser Expression eine bedeutende Rolle. Die Adhäsionsmoleküle sind eine Gruppe von Glykoproteinen und Kohlenhydrate, die auf der Oberfläche vieler Zellarten, unter anderem auch venöser Endothelzellen, exprimiert werden (37). Die ersten Schritte der Zelladhäsion werden durch Selektine (P-, E- und L-Selektin) reguliert. Die stabile Adhäsion und transmurale Migration wird überwiegend durch Integrine (LFA-1) und Mitglieder der Immunglobulin-Supergen-Familie (ICAM-1) reguliert. Dazu spielen bestimmte Zytokine und Chemokine ebenfalls eine Rolle. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass durch Blockierung der Leukozyten-Endothel-Wechselwirkung mit antiadhäsiven Substanzen, die Organabstoßung und das zelluläre, entzündliche Infiltrat verringert wurde (38).

1.3 Transfektion

Als Transfektion wird das Einbringen von Fremd-DNA oder -RNA in der eukaryontischen Zelle bezeichnet. Dadurch kann die Expression von zieleigenen Genen gesteigert oder stillgelegt werden. Damit die siRNAs an einem relevanten Ort wirksam sein können, müssen diese nicht nur in dem Serum überleben, sondern auch Ihre Zielzellen in spezifischen Geweben erreichen. Damit die Zellen erreicht werden, muss die siRNA die Diffusion durch die Plasmamembran durchdringen welches als alleinstehendes negatives Molekül sehr schwer ist. Es sind mehrere Methoden zur Transfektion bekannt.

1.3.1 Virus-vermittelte Transfektion (biologisches Verfahren)

Die Virus-vermittelte Transfektion wird auch Transduktion genannt. Dieses Verfahren ist hocheffizient und durch die virale Natur ist die Integration in das Wirtsgenom leicht. Dieses wird mittels Retro-, Adeno- oder Lentivirus durchgeführt. Die Hauptnachteile dieser Transfektion sind die hohe Immunogenität und Zytotoxizität (38).

1.3.2 Elektroporation oder Mikroinjektion (physikalische Verfahren)

Die Elektroporation gehört zu den physikalischen Transfektion Methoden. Dabei wird die Zellmembran für kurze Zeit einem elektrischen Impuls ausgesetzt. Das stört die Zellmembran vorübergehend, wodurch Nukleinsäure in die Zelle gelangen kann. Diese Methode ist schnell und kann in kurzer Zeit eine große Anzahl von Zellen erreichen, sobald die optimalen Elektroporationsbedingungen erreicht sind(38). Bei der Mikroinjektion wird die Nukleinsäure direkt in das Zytoplasma oder den Zellkern injiziert. Dies erfordert hohe Geschicklichkeit, hohen Arbeitsaufwand und führt häufig zum Zelltod (38, 39).

1.3.3 Calcium-Phosphat-Präzipitation (chemisches Verfahren) und Liposomen

Eins der bekanntesten Verfahren zu Transfektion der siRNA in das Zytoplasma der Zellen wurde von Donze und Picard untersucht. Dabei wird die DNA zu einem Gemisch aus Calciumchlorid und Natriumphosphat gegeben. Die dabei ausfallenden Kristalle von Calciumphosphat binden an die zu übertragende DNA. Durch Endozytose werden die Kristalle in den Zellen aufgenommen (40). Dieses Verfahren hat große Vorzüge durch relativ geringe Zytotoxizität und geringere Mutagenese. Zu den chemischen Verfahren gehören zum einen die Transfektion mit kationischen Polymeren, zum anderen die Lipofektion auf Basis von kationischen Lipiden, welche als eine der effizientesten Methoden dafür bekannt ist.

Liposomen bestehen aus einer Phospholipid-Doppelschicht, die im Inneren einen wässrigen Inhalt umkreisen (21). Aufgrund ihrer Größe und ihres hydrophoben und hydrophilen Charakters sind Liposomen vielversprechende Systeme für die Arzneimittelabgabe. Zusätzlich besitzen sie eine hohe Biokompatibilität, biologische Abbaubarkeit und geringe Toxizität (41). Diese können grob in zwei Arten klassifiziert werden. Die Klassifizierung erfolgt nach Größe der Lamellarität. Unilamellare Vesikel mit einer Lipid-Doppelschicht haben einen Durchmesser von 50-250nm. Typisch ist der große, wässrige Kern. Diese werden zur Einkapselung wasserlöslicher Stoffe verwendet. Anders sind die multilamellaren Vesikel, die aus mehreren konzentrischen Lipid-Doppelschichten in Ähnlichkeit einer Zwiebelschale angeordnet sind. Diese haben einen Durchmesser von 1-5µm. Dieser hohe Lipidgehalt ermöglicht das passive Einschleusen lipidlöslicher Arzneimittel (42)

Die liposomale Einkapselungstechnologie (LET) ist die neueste Abgabetechnik, die erforscht wird. Sie wird auch verwendet, um verschiedene Arzneimitel in verschiedene Körperorgane zu übertragen. Dabei wird submikroskopischer Schaum gebildet. Dieser wird als „Liposomen“ bezeichnet und kapselt zahlreiche Materialien ein. Diese „Liposomen“ bilden eine Barriere, um ihren Inhalt von verschiedenen Enzymen im Mund und Magen, alkalischen Lösungen, Gallensalzen und Darmflora zu schützen (41).

Die Abgabe eingekapselter Antikrebsmittel wird gründlich erforscht und zur Behandlung von metastasierendem Brustkrebs, oder AIDS-bedingtem Kaposi-Sarkom zugelassen und angewendet. Inzwischen werden fast alle Krebsmedikamente mithilfe verschiedener Technologien in Liposomen eingekapselt (42)

Das Laden von siRNA-Fragmenten in Liposomen-Vesikel ist eine gute Strategie für deren Abgabe an die Zielzellen. Liposomen ermöglichen eine effiziente Internalisierung ihrer siRNA-Ladung durch Membranfusion mit der Wirtszelle. Gavrillov und Saltzman haben festgestellt, dass neutrale Lipide ungiftig sind, und dass diese keine Immunantwort hervorrufen (21).

Obwohl die Liposomen wie Biomembranen sind, werden sie als Fremdkörper erkannt und nach Plasmakontakt mit Plasmaproteinen dem mononukleären Phagozytensystem (MPS) präsentiert. Deshalb werden Liposomen aus dem Blut entfernt (41).

Anstelle der Verwendung neutraler Lipid-Moleküle können der neutralen Lipidformulierung kationische Lipide zugesetzt werden. Die kationische Ladung kann elektrostatisch mit siRNA komplexieren, um ein widerstandsfähiges Gebilde zu erreichen. Die neutralen Lipide in diesem Komplex erleichtern die Fusion mit der Membran der Wirtszelle (19). Diese modifizierte Oberfläche wird durch Verwendung mehrerer Moleküle wie Glykolipide oder Sialinsäure entwickelt. Ein weiterer bedeutender Schritt ist der Einfluss des synthetischen Polymers PEG (Polyethylenglykol) in der Liposomenzusammensetzung. Das Vorhandensein von PEG auf der Oberfläche des liposomalen Trägers verlängert die Durchblutungshalbwertszeit der Liposomen. Gleichzeitig wird die Aufnahmefähigkeit des mononukleären Phagozytensystems (Stealth-Liposomen) verringert. Dies wird durch das Vorhandensein des Polymers über ein vernetztes Lipid DSPE (Distearoylphosphatidylethanolamin) erzielt (43, 44).

Neutrale Liposomen zeigen jedoch eine geringe Transfektionseffizienz. Kationische Lipide wie DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methylsulfate) und DOPE (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin) können mit siRNA elektrostatische Komplexe ausbilden, um ein wirksames Liposom zu erzeugen, da die positiv geladenen Liposomen einen verbesserten Zelleintritt und einen erhöhten Schutz gegen Serumenzyme bieten (21). Die transfizierte siRNA kann somit Ihre Zielzellen, die Endothelzellen, erreichen. DOPE ist ein sogenanntes Helferlipid, das die endoplasmatische Membran destabilisiert und dadurch der Lipoplex im Cytosol landet (45).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit 3 unterschiedlichen Liposomenkomplexen gearbeitet, die durch Endozytose mit der Membran der Zelle fusionieren. Diese wurden in drei verschiedenen Konzentrationen getestet, um auch die Biokompatibilität zu überprüfen.

-Dioleoyloxypropyl-N,N,N-trimethylammonium, Methylsulfate (DOTAP)

-1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE)

-1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin Polyethylenglykol (DSPE-PEG)

1.4 Endothelzellen

Die Endothelzellen sitzen im Tunica Intima und kleiden in einer Monoschicht die innere Wand von Arterien, Venen und Kapillaren (46). Somit stehen sie in einem engen Kontakt mit den Blutzellen (47). Eine der wichtigsten Funktionen der Endothelzellen ist die Verbindung zwischen dem Herz-Kreislauf-System und dem Immunsystem. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese, Blutstillung und Regulierung des Gefäßtonus. Dank einer Reihe von Rezeptoren reagieren sie auf entzündliche Stimulation und steuern somit die Kontrolle von Immunzellen im Körper (48).

So führen entzündliche Krankheitszustände zur einer lokalen Zytokin- und Chemokinproduktion, was wiederum die Rekrutierung von Leukozyten-Subtypen bewirken kann, um den Entzündungsreiz zu eliminieren und eine Geweberegeneration zu induzieren. Hier spielt auch die Calcium-Signalübertragung eine wichtige Rolle, um die Leukozytendiapedese zu erleichtern. Die Erhöhung des freien Calciums im Blut induziert auch die ICAM-1-Expression. Bei Auftreten einer systemischen Entzündung löst die Aktivierung der Endothelzellen eine starke angeborene Immunantwort aus, um den Erreger zu eliminieren. Weiterhin kommt es unter bestimmten Bedingungen auch zur Aktivierung der adaptiven Immunität, was zur Rekrutierung von antigenspezifischen Lymphozyten beiträgt. Diese wichtigen Funktionen von Endothelzellen zeigen, dass sowohl eine Überaktivierung, aber auch ein Verlust von Endothelzellen während einer Sepsis zu einem Multiorganversagen führen kann (49). Das Endothel ist direkt an peripheren Gefäßerkrankungen, Herzerkrankungen, Schlaganfall, Nierenversagen, Tumorwachstum, Metastasierung, Venenthrombose, Atherosklerose und schweren viralen Infektionskrankheiten beteiligt (50). Somit ist das aufrecht erhalten deren Funktion eine der wichtigsten Parameter, um vor Erkrankungen des Gesamtorganismus zu schützen.

1.5 PBMC's und Immunsystem

Die wichtigste Aufgabe des Immunsystems ist den Organismus vor Umwelteinflüssen und pathogenen Mikroorganismen zu schützen und sich selbst weiter zu entwickeln (51). Toxische oder Allergene Substanzen werden durch das Immunsystem ziemlich schnell erkannt und eliminiert. Eine entscheidende Bedeutung spielt dabei das Erkennen von eigenen und fremden Organismen. Der Wirt verwendet sowohl angeborene als auch adaptive Mechanismen, um pathogene Mikroben zu erkennen und zu eliminieren. Das angeborene Immunsystem umfasst alle Aspekte der Immunabwehrmechanismen des Wirts wie physikalische Barrieren wie Epithelzellschichten, die enge Zell-Zell-Kontakte aufweisen. Die angeborene Reaktion umfasst auch Proteine, die bei der Aktivierung aus Zellen freigesetzt werden, einschließlich Zytokine, die die entzündliche Funktion regulieren und andere Zellen, Chemokine, die entzündliche Leukozyten anziehen. Das adaptive Immunsystem zeigt eine große Spezifität für seine Zielantigene. Adaptive Reaktionen sind auf antigenspezifischen Rezeptoren angewiesen. Diese werden auf den Oberflächen von T- und B-Lymphozyten exprimiert (52).

Das Immunsystem besteht aus verschiedenen Zellen, die sich im Allgemeinen aus einer Stammzelle entwickelt. Dazu gehören auch die Thrombozyten und die roten Blutzellen, die allerdings wenig zur Immunantwort beitragen. Diese entwickeln sich aus ein und derselben, omnipotenten Stammzelle. Die Leukozyten entstehen ebenfalls aus den omnipotenten Stammzellen und werden im Knochenmark des Erwachsenen bereitgestellt. Es unterscheidet sich eine myeloide und lymphoide Entwicklung. Auf dem ersten Weg entstehen die Granulozyten, die Monozyten, die roten Blutkörperchen und die Thrombozyten. Auf lymphoidem Weg, die sogenannte Lymphopoese, entstehen die Zellen, die Träger der spezifischen Immunantwort sind, die B- und T-Lymphozyten, sowie NK-Zellen die zur Antigenerkennung bestimmt sind (53).

Die Immunreaktion startet durch die Antigen-Präsentation. Dabei werden Fremdsbstanz, auch Allergene genannt, an die Antigen-präsentierenden Zellen an die CD4+-T-Helferzellen vorgezeigt. Zu den Antigen-präsentierenden Zellen gehören die Makrophagen, dendritische Zellen, aktivierte B-Zellen sowie aktivierte Endothelzellen. Damit die Kaskade los geht und die Immunreaktion in Gang gesetzt wird muss sowohl der T-Zell Rezeptor als auch die Antigen-präsentierenden Zellen aktiviert werden. Danach aktivieren sich die Zellen des adaptiven Immunsystem. Sobald diese Zellen aktiviert sind, exprimieren diese die kostimulatorischen Moleküle. Das können z.B. B7-1 oder B7-2 sein, die das CD28-Molekül der T-Zelle somit vollständig aktivieren. Als nächstes erfolgt die Zellteilung der Mutterzelle zu mehreren Tochterzellen, die identisch sind und als Antigene dienen. Gegen das gleiche Gen entstehen auch Helfer Regulatorzellen, die gegen das gleiche Antigen gerichtet sind. Es bilden sich funktionelle Untertypen die z.B. Interferon γ sezernieren und Macrophagen aktivieren. Andere, die Interferon-4 und -5 produzieren sind bei der Abwehr gegen Parasiten wichtig sind, und aber auch bei allergischen Reaktionen vom Soforttyp beteiligt. Nach dem die akute Infektion beseitigt ist verbleiben die langlebigen

T- und B-Gedächtniszellen, die dann bei einem erneuten Antigenkontakt sofort für eine rasche und spezifische Immunantwort sorgen (54).

Genau diese Zellen sind wichtig, da sie unter anderem in global PBMC's zusammengefasst sind.

Zu den PBMC's zählen Lymphozyten (B- und T-Zellen), dendritischen Zellen, Macrophagen und NK-Zellen (55). Ein weit verbreitetes Standardprotokoll in Laboratorien für klinische Immunologie ist die Herstellung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC's) aus Vollblut (56). Um allergische Reaktionen zu verstehen ist es notwendig das menschliche Immunsystem zu untersuchen. Die Verwendung von PBMC's ermöglicht die zellvermittelte Immunität im allgemeinen zu bewerten und eine Aussage über antigenspezifische Stimulation und eine frühere Exposition gegenüber einer Vielzahl von Allergenen oder Antigenen festzustellen. Gleichzeitig können wir die Reaktion auf eine Immuntherapie überwachen (57). Die Zelldichte der verschiedenen Blutkomponenten im Blut weist Unterschiede auf, was genutzt wird um die PBMC's zu isolieren. Das verdünnte Vollblut wird mehrmals gewaschen und die PBMC's über Dichtegradientenzentrifugation gewonnen (58). Dazu besitzen die PBMC's einen runden Zellkern. Diese werden aus dem peripheren Blut isoliert. Die Zellfraktion, die roten Blutkörperchen und die Granulozyten, die wiederum in Neutrophile, Basophile und Eosinophile getrennt werden, wird durch Dichtegradientenzentrifugation aus dem Vollblut entfernt. Dabei bilden die PBMC's die Fraktion niedriger Dichte, also die obere Fraktion. Die roten Blutkörperchen und die polymorph kernigen Leukozyten (PMNs) weisen eine höhere Dichte auf und bleiben deshalb in der unteren Fraktion gebunden (59).

1.6 Entzündungsmediatoren

Das Wissen über Entzündungsaufzeichnungen stammt aus dem ersten Jahrhundert nach Christus mit ursprünglichen Merkmalen wie Rubor, Tumor, Calor und Dolor. Zudem haben wissenschaftliche Untersuchungen gezeigt, dass auch chemische Komponenten, Zellen und Entzündungsprozesse daran beteiligt sind. Die anfängliche Abwehr des Körpers als Reaktion auf eine Infektion, Traumata oder Entzündung ist mittels Akutphasenreaktion (APR). Die APR beschreibt eine Reihe von Reaktionen, unter anderem eine erhöhte Lebersynthese positiver Akutphasenproteine (APPs), die eine erhöhte Konzentration aufweisen. Sobald die Entzündung vorbei ist, normalisiert sich auch der Serumspiegel diese Proteine. Die Entzündung kann hauptsächlich in zwei Arten unterteilt werden, in eine akute oder eine chronische Entzündung. Wenn die Entzündung in weniger als 48 Stunden abklingt, handelt es sich um eine akute Entzündung wie z.B. einen Abszess. Dauert die Entzündung jedoch länger als 48 Stunden, oder sogar über mehrere Wochen, bzw. Monate an, wird diese als chronische Entzündung bezeichnet (60).

Eine Entzündung ist ein hochwirksamer Bestandteil der angeborenen Anfangsreaktion des Körpers auf eine Verletzung. Es ist eine wichtige Funktion, die zur Reparatur von Gewebe und zur Wiederherstellung der Funktion führt. Die Entzündungsreaktion kann in vaskuläre und zelluläre Reaktionen unterteilt werden. Zu Beginn des Prozesses sind

lokale Vasodilatation, Blut-, und Flüssigkeitsextravasation, Rötung, Schwellung und Hitze die Anzeichen einer Entzündung. Diese akute Phase dauert etwa 24 bis 48 Stunden. Bei einer Gefäßverletzung zum Beispiel aggregieren als erstes die Thrombozyten, was die Freisetzung vieler Mediatoren als Folge hat. Somit ist die Blutstillung die erste wichtige Hauptfunktion der Blutplättchen. Eine sekundäre wichtige Funktion ist die Heilungskaskade durch Freisetzung der Chemoattraktoren und Wachstumsfaktoren zu initiieren. Gleichzeitig bietet das Blutgerinnsel ein Matrixgerüst für die Rekrutierung von Zellen wie Leukozyten einschließlich Neutrophilen und Macrophagen, die den verletzten Bereich bei Reinigung und Entfernung beschädigter Gewebetrümmer und Fremdpartikel erreichen (61).

Zytokine sind Polypeptide, die von verschiedenen Zelltypen sezerniert werden und über Bindung an spezifische Rezeptoren an Ihren Zielzellen eine Änderung der Genexpression hervorrufen, wodurch diese eine Differenzierung, Proliferation und Migration, oder sogar Apoptose veranlassen. Je nach biologischer Funktion lassen sie sich unterteilen in Wachstumsfaktoren, Interleukine, Interferone und Chemokine (62). Zytokine sind molekulare Botenstoffe der angeborenen und adaptiven Immunität. Diese Botenstoffe ermöglichen die parakrine und autokrine Kommunikation über kurze Strecken (63). Die Zytokine sind zusammengefasst in Interleukine (IL), Chemokine, Interferone (INF), Tumornekrosefaktoren (TNF), transformierende Wachstumsfaktoren und Hämatoopoetine (Erythropoetin). IL-1b wirkt entzündungsfördernd (64). IL-1 aktiviert T-Lymphozyten, indem die Produktion von IL-2 und die Expression von IL-2-Rezeptoren gesteigert werden. Zudem wird die Endothelzelladhäsion von Leukozyten durch Hochregulation von ICAM und E-Selektin gesteigert (65). IL-6 wird als proinflammatorisches Zytokin angesehen, welches durch Lipopolysaccharide zusammen mit TNF- α und IL-1 induziert wird. Zudem wird IL-6 als Marker für die systemische Aktivierung von proinflammatorischen Zytokinen verwendet (66). Interleukin-8 (IL-8) ist ein CXC-Chemokin und wird von einer Vielzahl von Zellen gebildet. Das Vorkommen des Chemokins wurde sowohl bei Neutrophilen beschrieben als auch bei normalen physiologischen Prozessen wie z.B. bei der Wundheilung. IL-8 findet sich auch bei atypischen Prozessen wie bei der Metastasierung von Krebszellen wieder (67). IL-12 stammt von Monozyten, Makrophagen, B-Zellen, dendritischen Zellen, Neutrophilen (PMNs) und Mastzellen ab. IL-12 aktiviert und induziert die Proliferation und Zytokinproduktion von natürlichen Killerzellen (NK). Es wird auch seine genregulatorische Rolle bei allergischen Entzündungen diskutiert. TNF kann von mononuklearen Phagozyten (TNF α), oder von Lymphozyten abstammen. Zusätzlich kann TNF α von Neutrophilen, NK-Zellen, Endothelzellen und aktivierten Lymphozyten produziert werden. TNF hat eine wechselartige Beziehung zu Endothelzellen, um Adhäsionsmoleküle zu induzieren, wie das intrazelluläre Adhäsionsmolekül (ICAM-1) und E-Selektin. Dadurch wird der Austritt von Granulozyten am Entzündungsort ermöglicht (65).

Die folgenden Entzündungsmarkern wurde in dieser Arbeit untersucht:

- Interleukin-1 β IL1 β
- Interleukin-2 IL-2
- Interleukin-6 IL-6
- Interleukin-8 IL-8
- Interleukin-12 (IL-12)
- Interferon α (IFN α)
- Interferon β (IFN β)
- Interferon γ (INF γ)
- Tumornekrosefaktor α (TNF α)
- C-X-C-Motiv-Chemokin 7 Platelet basic protein (CXCL-7)
- C-X-C-Motiv-Chemokin 8 CXCL-8)
- C-X-C-Motiv-Chemokin 10 (CXCL-10)
- CD86 (B7-2)
- 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase (OAS)
- Signalwandler und Aktivator der Transkription 1 (STAT-1)

Es ist wichtig, dass sowohl die verwendete siRNA als auch der Vektor zum Einbringen der siRNAs und der Transfektionsmechanismus selbst keine Entzündung bzw. die Ausschüttung von Entzündungsmarkern hervorrufen.

Beispielsweise bindet virale dsRNA an den Toll-like Rezeptoren (TLRs) an.

Toll-like-Rezeptoren (TLRs) gehören zu den angeborenen Immunerkennungsrezeptoren, die mit mikrobiellen Krankheitserregern assoziiert sind und antimikrobielle Immunantworten induzieren. Dadurch wird die Interferonantwort (INF α , und INF β) und Interleukinantwort (IL-6 und IL-12) induziert (68), (69). INF α hat eine virostatistische Wirkung und wird auch therapeutisch genutzt wie z.B. nach einer Infektion mit Hepatitis-B-Virus (HBV) und Hepatitis-C-Virus (HCV). Durch INF α kann das Virus bei 25% der Patienten dauerhaft eliminiert werden (70). Zugleich ist es auch ein Abwehrmechanismus der menschlichen Zellen. Dadurch werden bestimmte Viren gebremst und gleichzeitig werden Abwehrmechanismen in Gang gesetzt. Die Wirkung von Interferon ist auch neoplastisch, weshalb es auch in der Krebsmedizin eingesetzt wird.

1.7 Hämokompatibilität und das Komplementsystem

Ein Biomaterial und aktive Wirkstoffe in Kombination, welche Kontakt mit Blut haben, müssen Hämokompatibilität aufweisen, damit eine Anwendbarkeit in vivo möglich ist. Es sind umfangreiche In-vitro-Analysen gemäß ISO 10993-4 vor klinischen Anwendungen erforderlich. Vor und nach der Inkubation des Biomaterials mit frischem menschlichem Blut werden Hämolyse, Zellzahlen und die Aktivierung von Blutplättchen, Leukozyten, Gerinnungs- und Komplementsystem analysiert. Darüber hinaus wird die Oberfläche von Biomaterialien hinsichtlich der Anlagerung von Blutzellen, der Adsorption von Proteinen und der Erzeugung von Thromben und Fibrinnetzwerken bewertet (71).

Die Hämokompatibilität wurde untersucht, indem die verschiedenen siRNAs und Lipide in unterschiedlicher Konzentration mit Vollblut in Kontakt gebracht wurden. Dabei wurde frisches Vollblut aus 6 Probanden für 1 Stunde inkubiert und die Zellzahl sowohl vor der Inkubation als auch danach gemessen. Anschließend wurden die Marker der Hämokompatibilität mittels eines antikörperbasierten Nachweisverfahrens ELISA untersucht.

Marker der Thrombozytenaktivierung ist β -TG. Dieser wird aus der α -Granula der Thrombozyten ausgeschüttet, sobald es zu einer Aktivierung kommt, was wiederum chemotaktisch auf die Fibroblasten wirkt. Dadurch werden die entstandenen Gewebeschäden repariert.

Wenn eine Gerinnung stattfindet, wird Prothrombin in Thrombin umgesetzt. Dieses löst eine verstärkte Gerinnung aus, welche wiederum durch Athrombin III gehemmt wird. Dabei wird ein inaktiver Proteinase-Inhibitor Komplex (TAT) ausgebildet, welcher als Nachweis thrombotischer Reaktionen dient.

Durch die Proteinase PMN-Elastase wird der Entzündungszustand im Körper und der Aktivität der Granulozyten gemessen. Als primäre Blockade einer Entzündungsreaktion spielen die neutrophilen Granulozyten eine entscheidende Rolle. Dabei werden sie selbst von verschiedenen Mediatoren wie Zytokine aus der Blutbahn angelockt und zur Entfernung körperfremder Substanzen stimuliert. Sie besitzen verschiedene Proteasen, um diese Stoffe zu verdauen. Einer dieser Proteasen ist die PMN-Elastase. Diese befindet sich auf der Granula der polymorphkernigen Granulozyten. Während der Verdauungsprozesse werden diese auch extrazellulär sezerniert. Diese werden durch den α -1 Proteinase-Inhibitor reguliert. Bei einer deutlichen Entzündung wird dieser Komplex, der sich dabei bildet, mittels ELISA quantitativ nachgewiesen.

Der Komplementfaktor C3 ist ein Protein und dient ebenfalls dem humoralen Immunsystem. Menschen die z.B. ein Defizit an diesem Komplementfaktor aufweisen haben eine gesteigerte Affinität zu bakteriellen Infektionen. Eine gesteigerte Produktion hingegen ist durch Bindung an Lipopolysacchariden feststellbar.

SC5b-9 ist ein Produkt aus der Zusammensetzung der Komplementfaktoren C5 und C9. Dieses entsteht nach der Aktivierung des Komplementsystems entweder auf dem klassischen Weg oder dem alternativen Weg.

Das Komplementsystem hat eine entscheidende Rolle für die Abwehr von Infektionen. Ein Mangel an Komplementkomponenten führt sowohl zu erhöhter Auffälligkeit für Infektionen als auch zur Prädisposition für Autoimmunkrankheiten. Eine Dysfunktion in diesem System, eine Hoch-, Herunter- oder Fehlregulierung kann eine Vielzahl von Auswirkungen haben. Jede dieser Fehlfunktionen kann sowohl eine Störung der normalen Abwehrmechanismen, als auch eine veränderte Entzündungsreaktion hervorrufen (72). Das Komplementsystem besteht aus 21 Serumproteinen und 8 Rezeptoren und kann in verschiedenen Zelltypen gefunden werden. Die Hauptfunktion besteht in einer Aktivierung, die eine Kaskade von Ereignissen mit sich bringt, was zur Zell-Lyse führt. Es gibt zwei Wege für die Aktivierung, einen klassischen und einen alternativen Weg. Diese beiden Mechanismen trennen sich nach der Aktivierung der dritten Komponente (C3) oder als Ergebnis einer Wechselwirkung zwischen den terminalen Komponenten (C5, C6, C7, C8 und C9). Dabei stellt sich eine Verbindung zwischen dem Komplementsystem, dem fibrinolytischen, dem blutgerinnenden und dem Kinninsystem her (73). Das Aktivieren des Komplementsystem führt zum Auflösen der Zelle, Andockung von Entzündungszellen und Opsonisierung. Dabei werden die Proteine nach Kontakt mit der Oberfläche von Krankheitserregern nacheinander gespalten, was zu einer verstärkten Kaskade führt. Dadurch werden die Krankheitserreger mit Signalen markiert, die die Phagozytose erleichtern und gleichzeitig die Aktivierung der adaptiven Immunantwort auslösen (74).

1.8 Ziel der Arbeit

Der myokardiale Herzinfarkt ist eine lebensbedrohliche Erkrankung, die unbehandelt zum Tode führt. Diese wird durch die Atherosklerose hervorgerufen. Therapeutische Ansätze mittels PTCA und Stentapplikationen führen oft zu Komplikationen und Restenose. Die therapeutische Anwendung von siRNAs ist ein innovativer und vielversprechender Ansatz, um diese Risiken zu minimieren. Dafür muss die verwendete siRNA biokompatibel sein und darf keine toxische oder entzündungsfördernde Wirkung auf die Zelle aufweisen. Ebenso wichtig ist das Einbringen der siRNA in die Zielzelle. Deshalb wurde der therapeutische Einsatz von Lipiden zur Bildung von Liposomen ebenfalls auf Hämokompatibilität untersucht.

In dieser Arbeit soll vor allem die Hämokompatibilität der einzelnen siRNAs untersucht werden. Es werden insgesamt 3 verschiedene siRNAs in verschiedenen Konzentrationen untersucht.

Gleichzeitig wurde die Hämokompatibilität von 3 unterschiedlichen Lipiden untersucht. Alle Untersuchungen wurden unter denselben Bedingungen vorgenommen und nach dem etablierten Protokoll des klinischen Forschungslabors für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie der Universitätsklinik Tübingen durchgeführt.

In weiteren Versuchen wurde eine frühe Immunantwort durch Inkubation und Transfektion sowohl von PBMC`s, als auch von Endothelzellen untersucht. Durch das Verfolgen des Verhaltens von unterschiedlichen Entzündungsmediatoren kann eine frühe Immunantwort abgelesen und somit eine Unverträglichkeit ausgeschlossen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Absaugpumpe	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland
Autoklav	Syntec DX-23, Wettenberg, Deutschland
AXON Blutzellmessgerät mit Drucker (Epson LX-300+)	EPSON Deutschland GmbH, Meerbusch, Deutschland
Bio Photometer Plus für RNA Messung	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Brutschrank	Heraeus Begasungsbrutschrank, Langenselbold, Deutschland
FACScan®	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
FACScan® - PC Programm CellQuestPro Version 4	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Gefrierschrank -80°C	Thermo Fischer Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Inkubator 1000 (Blutinkubation)	Heidolph Instruments Labortechnik Hersteller elektronischer Geräte, Schwabach, Bayern, Deutschland
Inverses Mikroskop Axiovert 135	Zeiss, Jena
Kühlschrank	Liebherr Premium, Kirchdorf, Deutschland
Eppendorf Xplorer® plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
ELISA Mikrotitrierplatten-Photometer MR7000 mit Drucker	Dyna Tech, Rückerdorf, Deutschland
Heizblock Thermomixer compact	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Mastercycler® Gradient	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland

Photometer	Mithras von Berthold Technologies Firmen, Bad Wildbad, Deutschland
qRT-PCR Cycler	iCycler iQ5 von Bio- Rad Laboratores GmbH, München, Deutschland
Schüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments Labortechnik Hersteller elektronischer Geräte, Schwabach, Bayern, Deutschland
Sterilwerkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl- Genkingen, Deutschland
Thermomixer	Thermomixer compact von Eppendorf AG, München, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Votex	Bio Votex VI von PEQLAB Mixer Uzusio VTX- 3000L von Laboratory und Medical Suplies
Vortex-2 Genie	Scientific industries, Bohemia, New York, USA
Wasserbad GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwendel, Deutschxhland
Wasserbad E 10	Dinkelberg analytics GmbH, Gablingen, Deutschland
Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Cryofuge 5500i	Heraeus Instrument GmbH, Osterode, Deutschland
Zentrifuge Rotanta 460 R	Hettich Lab Technology, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Varifuge 3.2 RS	Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland

2.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Verwendetes Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
0,2 ml DNA Lowbind Tube	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
0,5 ml DNA Lowbind Tube	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
1,5 ml DNA Lowbind Tube	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Save Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Save Lock Tubes 2,0 ml	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Protein LowBind Tubes 5.0 mL	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
1,5 ml BD Falcon	Corning Incorporated, San Jose, USA
2 ml BD Falcon	Corning Incorporated, NY, USA
5 mL Falcon Pippetten	Corning Incorporated, NY, USA
15 ml BD Falcon	Corning Incorporated, NY, USA
50 ml BD Falcon	BD, Biosciences, Heidelberg
15 ml FACS-Röhrchen PP steril	BD Bioscience, San Jose, USA
UVette 220-1600nm, RNase-, DNA-, Protein-frei	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
12 Well Platte	Corning Incorporated, NY, USA
Multipet Pipette 10µl	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Multipet Pipette 100µl	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Multipet Pipette 1000µl	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Microseal 'B' Adhesive Seals for PCR Plates	Bio- Rad Laboratories Inc., Hercules CA, USA
Low- Profile 96-Well SkirtedPCR Plates	Bio- Rad Laboratories Inc., Hercules CA, USA

UVette 220-1600 nm(RNase-, DANN-, Protein-frei)	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen Dualfilter (PCR clean, steril) 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Protein LoBind Tube 2.0 mL	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Safety-Multifly®-Set pyrogenfrei 20 G	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® 1,2 ml, (1,6mg EDTA/ml Blut)	SarstedtAG, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® 1,4 ml,9NC, (0,14 ml Tri-Natriumcitrat-Lösung 0,106 mol/l)	SarstedtAG, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® 2,7 ml	SarstedtAG, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® 9 ml	SarstedtAG, Nümbrecht, Deutschland
CTAD Blood Collecton Tubes	BD Beliver Industrial Estate, Plymouth, UK
Reaktionsgefäßständer zum Einfrieren, Nalgene™	Thermo Fisher Scientific GmbH
Zellkulturflasche 75 cm ²	Coming Inc., New York, USA

2.3 Kits

Die Anwendung der aufgelisteten Kits erfolgte laut Hersteller Angaben.

Tabelle 3: Verwendete Kits

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Aurum™ Total RNA Mini Kit	mRNA-Isolierung	Bio- Rad Laboratories INc., Hercules CA, USA
iScript cDNA Synthesis Kit	cDNA-Synthese	Bio- Rad Laboratories INc., Hercules CA, USA
iQ™ Custom SYBR Green Supermix	RT- PCR	Bio- Rad Laboratories INc., Hercules CA, USA
Enzymimmunoassay (ELISA) Thrombin/Antithrombin III-Komplex (TAT)	Quantitative Bestimmung von humanem TAT (Marker der Gerinnungsaktivierung) in Citratplasma.	Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Deutschland
Enzymimmunoassay (ELISA) PMN-Elastase	Quantitative Bestimmung von humaner PMN-Elastase (Marker für Granulozytenaktivierung) in Citratplasma.	Demeditec diagnostics GmbH, Kiel, Deutschland
Enzymimmunoassay β -Thromboglobulin (ELISA)	Immunoenzymatische Bestimmung des β -Thromboglobulins (β -TG) (Marker für Thrombozytenaktivierung) mittels ELISA-Methode im humanen Plasma.	DIAGNOSTICA STAGO S.A.S, Asnieres sur Siene, France
Enzymimmunoassay SC5b-9-Komplementfaktor (ELISA)	Quantitativen Bestimmung von humanem SC5b-9 (Komplementfaktor) in EDTA-Plasma	Quidel Corporation, San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten

Enzymimmunoassay C3a (ELISA)	Quantitativen Bestimmung von humanen C3a-Fragmenten in EDTA-Plasma.	Quidel Corporation, San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten
------------------------------	---	--

2.4 siRNAs

Die Inkubation und Transfektion der Blutzellen und Endothelzellen erfolgte mit folgenden siRNAs:

Tabelle 4: Verwendete siRNAs

siRNA	Sequenz	Hersteller
E- Selektin	Vorwärts 5'-GCCCAGAGCCTTCAGTGTACC-3' Reverse 5'-GGAAATGGCTGCACCTCACAG-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
SCR	Es ist nicht veröffentlicht, doch der Hersteller garantiert mittels spezieller Untersuchung mit Micro-Arrays, dass es gibt keine Homologie zum menschlichen Transkriptom	Qiagen, Hilden, Deutschland
ICAM	Vorwärts 5'-CTTGAGGGCACCTACCTCTGTC-3' Reverse 5'-CGGCTGCTACCACAGTGATG-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland

2.5 Lipide

Die Inkubation und Transfektion des Bluts erfolgte mit folgenden Lipiden:

Tabelle 5: Verwendete Lipide

Lipide	Sequenz	Hersteller
1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE); Mw 744,034 g/mol	Reagenz zur Lipomen-vermittelten Transfektion eukariontischer Zellen	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methyl- sulfate (DOTAP); Mw 698,542 g/mol	Reagenz zur Lipomen-vermittelten Transfektion eukariontischer Zellen	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
DSPE-PEG2000 Mw 2790,486 g/mol	Reagenz zur Lipomen-vermittelten Transfektion eukariontischer Zellen	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA

2.6 Primer

Tabelle 6: Verwendete Primer

Primer	Sequenz	Hersteller
IL-1 β	Sense 5'-CCCACAGACCTTCCAGGAGA-3' Antisense 5'-CGGAGCGTGCAGTTCAGTG-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
IL-2	Sence 5'-GAATCCCAAACCTCACCAGGATGCTC-3' Antisence 5'-TAGCACTTCCTCCAGAGGTTTGAGT-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
IL-6	Sense 5'-CACACAGACAGCCACTCACCTC-3' Antisense 5'-CTGCCAGTGCCTCTTTGCTG-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
IL-8	Sense 5'-GACTTCCAAGCTGGCCGTG-3' Antisense 5'-CTCCTTGGCAAACCTGCACC-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
IL-12	Sense 5'-CAACATGCTCCAGAAGGCCAGACA-3' Antisense 5'-TGGTAACAGGCCTCCACTGTGC-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland

IFN α	Sense 5'-ACTCATACACCAGGTACGC-3' Antisense 5'-TGGTCATAGTTATAGCAGGGGTG-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
IFN β	Sense 5'-TACCTGAAGGCCAAGGAGTACAG-3' Antisense 5'-CGGAGGTAACCTGTAAGTCTGTTAA-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
IFN γ	Sense 5'-TCTCTCGGAAACGATGAAATA-3' Antisense 5'-ACTCTCCTCTTTCCAATTCTT-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
CXCL-7	Sense 5'-CCAATTCTCATGTGGAAGCC-3' Antisense 5'-AGTATTAATCCCAACTGGCTG-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
CXCL- 8	Sense 5'-ACCTCTCATGCTGAAGCTCAC-3' Antisense 5'-ATGGAAACTGAATCTGGCTGAG-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
CXCL- 10	Sense 5'-AAGTGGCATTCAAGGAGTACC-3' Antisense 5'-ACGTGGACAAAATTGGCTTGC-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland

OAS	<p>Sense</p> <p>5'-GGAGACAGCTGGAAGCCTGTC-3'</p> <p>Antisense</p> <p>5'-CTGGAAGACCCCTCCCAGATAG-3'</p>	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
TNF α	<p>Sense</p> <p>5'-CCGTCTCCTACCAGACCAAGG-3'</p> <p>Antisense</p> <p>5'-AGGTGTATTTCTGTTCCAATTCCTC-3'</p>	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
STAT1	<p>Sense</p> <p>5'-TGGAAGCGGAGACAGCAGAGAG-3'</p> <p>Antisense</p> <p>5'-AGGTGTATTTCTGTTCCAATTCCTC-3'</p>	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
GAPDH	<p>Sense</p> <p>5'TCAACAGCGACACCCACTCC-3'</p> <p>Antisense</p> <p>5'TGAGGTCCACCACCACCCTGTTG-3'</p>	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland

2.7 Zelllinien

Tabelle 7: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Hersteller	Basalmedium
HVEC	Zellen von freiwilligen Spendern. Abfälle bei Herz OPs Überschüssige Venenreststücke dieser Operation wurden dem Klinischen Forschungslabor übergeben. Die Patienten stimmten der Gewebespende zu, ebenso liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Tübingen vor. (Votum Nr. 416/2003)	Zellkulturmedium

Es wurden Endothelzellen von 3 verschiedenen Spendern untersucht.

Tabelle 8: Medien

Bezeichnung	Hersteller
Basalmedium/Transfektionsmedium	VascuLife™ EnGS Medium Complete Kit LL-0002 4-8°C (VascuLife Basal Medium, VascuLife EnGS
Zellkulturmedium	VascuLife™ EnGS Medium Complete Kit LL-0002 von Lifeline Inhaltstoffe: 500 ml VascuLife™ EnGS Medium Mit Ergänzungskitt: Endothelialen Wachstumsfactor(EnGS-Endkonzentration 0,2%,epidermalem Wachstumsfactor (EGF- Endkonzentration 5ng/ml), Ascorbinsäure (Endkonzentration 50mg/ml), L-Glutamin (Endkonzentration 10mM/l),Heparinsulfat (Endkonzentration 0,75 Units/ml, FBS (Endkonzentration 2%) Gentamicin (Endkonzentration 0,1 mg/ml) Amphotericin B (Endkonzentration 10ng/ml) Medium wurde frisch und im Kühlschrank bei 4 °C gelagert

2.8 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 9: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
2 Mercaptoethanol	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ampuwa	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., Deutschland
Amphotericin B	Promo Cell, Heidelberg, Deutschland
CASYTon®	Roche Inovatis AG, Bielefeld, Deutschland
DEPC-treated water	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Dulbecco´s PBS ohne Calcium, ohne Magnesium	Life Technologies Limited 3 Fountain Drive, Parsley, UK
Ethanol absolut	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Erythrozyten- Lysepuffer	Selbst hergestellt nach Protokoll
Ethanol absolut	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Gentamycin	PromoCell, Steinheim, Deutschland
Interferin	PEQLAB, Erlangen, Deutschland
Nuclease-Free Water	Qiagen, Hilden, Deutschland
Heparin-Natrium 25.000 I.E.	Ratiopharm GmbH, Graf-Arco-Straße 3 89079 Ulm, Deutschland
NaCl 0,9 – Isotonische Kochsalzlösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., Deutschland
RNase ZaP	Ambion, The RNA Company, Lithuania
SYBR®Green	Bio- Rad Laboratories INc., Hercules CA, USA
TNF α	BD, Biosciences, Heidelberg, Deutschland

VascuLife™ EnGS Basalmedium	Lifeline Cell Technology, Walkers-ville, USA
TNS (0,05% Trypsin Inhibitor, 0,1% BSA)	Promo Cell, Heidelberg, Deutschland

2.8.1 Erythrozyten-Lysepuffer

8,29 g Ammoniumchlorid (NH₄Cl)

1,00 g Kaliumhydrogencarbonat (KHCO₃)

0,037 g EDTA - Dinatriumsalz – Dihydrat (Na₂-EDTA-2H₂O)

in 1 L demineralisiertem Wasser (Ampuwa) lösen

0,5 M EDTA-Stocklösung

M (EDTA) = 292,24 g/ mol

0,5 M (EDTA) = 146,12 g

Menge für 50ml \cong 7,3 g

7,3 g EDTA werden in 50 ml PBS gelöst

pH wird zwischen 7,0 – 8,0 mit Natriumhydroxid-Plättchen eingestellt.

Für 2 mM EDTA-Lösung:

4ml der 0,5M EDTA-Stocklösung in 1 L PBS lösen

2.9 Software

Tabelle 10: Verwendete Software

Bezeichnung	Hersteller
qRT-PCR-CFX Manager 3.1	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Statistik GraphPad 5.01	GraphPad Software, La Jolla, USA

2.10 Blutgewinnung und Hämokompatibilität

Blutgewinnung

Für die Blutgewinnung vorliegender Versuche wurden anonymisierte freiwillige Probanden ausgewählt, die laut Ihren Angaben gesund gewesen sind. Gefragt wurde unter anderem, ob eine Blutgerinnungsstörung bekannt sei und ob sie Blutgerinnungshemmende Medikamente wie Xarelto, ASS (Acetylsalicylsäure), Marcumar oder Ähnliches in den letzten 10 Tagen zu sich genommen haben. Dies würde die Blutgerinnung beeinflussen und die Ergebnisse verfälschen. Deshalb galt die Einnahme solcher Medikamente als Ausschluss vom Versuch. Nach Ihrem Einverständnis erfolgte die Blutabnahme nach Richtlinien des Labors.

Dieses Verfahren galt sowohl für die Hämokompatibilitätsuntersuchung als auch für die Blutgewinnung für die Isolierung der PBMCs.

2.10.1 Herstellung einer heparinisierten Lösung

Unter der Werkbank unter aseptischen Bedingungen wurde in einem sterilen Polypropylenbecher eine 10 ml Kochsalzlösung mit 20 µl Heparin präpariert. Nach mehrmaliger Durchmischung erfolgte das Aufteilen in neutrale, sterile Monovetten (9ml). In jede Monovette wurde 900 µl Heparin Lösung gegeben. Die so hergestellte Lösung konnte gebrauchsfertig bis zur Blutentnahme, welche ca. 10 min danach erfolgte, im Kühlschrank bei 5°C aufbewahrt werden.

Hämokompatibilität

2.10.2 Blutzellzahlen nach Inkubation mit siRNA

Von jedem Probanden wurden nach Desinfektion und Stauchung der Armvene 50 ml Blut mittels sterilem Einmalsystem (Butterfly) abgenommen. Das Blut wurde in der 9 ml Neutralmonovette durchmischt (6 Stk.). Somit entstand eine Heparinkonzentration von 1 IE/ml Vollblut. Zusätzlich erfolgte die Messung der Zellzahl (Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten und Hämatokrit) zur 0 Stunde mittels einer 1,2 ml EDTA-Monovette. Der ermittelte Wert wurde in eine Excel- Tabelle übertragen.

Insgesamt wurden 3 verschiedene siRNAs verwendet, die immer in zwei verschiedenen Konzentrationen genommen wurden, wie folgt in der Tabelle 11 beschrieben.

Tabelle 11: Darstellung der verschiedenen siRNA für die Testung der Hämokompatibilität

Verschiedene siRNA und Kontrollen	Vollblutkonzentration In ml	Konzentration der siRNA in μ l
0 h Kontrolle ohne siRNA	6 ml	--
1 h Kontrolle ohne siRNA	6 ml	--
E-Selektin siRNA 1:100	6 ml	60 μ l
E-Selektin siRNA 1:1000	6 ml	6 μ l
SCR siRNA 1:100	6 ml	60 μ l
SCR siRNA 1:1000	6 ml	6 μ l
ICAM siRNA 1:100	6 ml	60 μ l
ICAM siRNA 1:1000	6 ml	6 μ l

Die so hergestellten Lösungen mit den dazugegebenen siRNAs wurden für eine Stunde bei 37°C auf dem Schüttler auf Stufe 5 (leichtes Schwenken) inkubiert. Danach erfolgte eine erneute Messung mittels eines EDTA-Röhrchens in dem Blutzellmessgerät und einer erneuten Aufzeichnung der Werte. Dieser Versuch wurde bei 6 Probanden durchgeführt.

Um das Blutplasma zu gewinnen, folgte die Aliquotsgewinnung und Aufhebung des Blutplasmas für weitere Versuche, die Elisa Durchführung.

2.10.3 Vorbereitung Aliquotgewinnung für die ELISA-Testdurchführung

Die Zentrifuge wurde gestartet und vorgekühlt auf 4° C. 2,7 ml Blut wurde zunächst in einem Trinatriumcitrat (CTAD)-Röhrchen gut durchmischt und für 15 min auf Eis gelagert. 1,2 ml Blut wurde in Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Röhrchen abpipetiert, gut durchmischt und ebenfalls für 15 min auf Eis gelegt. 1,4 ml Blut wurde in Citrat-Röhrchen abpipetiert und gut durchmischt. Die Röhrchen wurden bei Raumtemperatur für 18 min bei 1800 Umdrehungen zentrifugiert. CTAD- und EDTA-Röhrchen wurden für 20 min bei 2500 Umdrehungen vorgekühlt bei 4°C zentrifugiert. Danach erfolgte die Aliquotsgewinnung welche in Eppendorfgefäße überführt und mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde.

Die mittlere Fraktion Plasmaüberstand wurde aus dem CTAD-Röhrchen abgenommen und in sterile 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße übertragen. So gewonnene Aliquots wurden wieder bei 4°C für 20 min bei 2500 Umdrehungen zentrifugiert. Danach wurden 300 µl der mittleren Fraktion des Plasmas abgenommen und in einem 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß schockgefroren. Aus den Citrat- und EDTA-Proben wurden etwa 200 µl in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß aliquotiert.

Die Plasmaproben wurden in flüssigen Stickstoff getaucht, EDTA-Proben wurden bei -80°C eingefroren und die CTAD- und Citrat-Aliquots bei -20°C.

Um die Hämokompatibilität der Lipide zu testen, wurde analog zu Inkubation mit siRNA gearbeitet.

2.10.4 Blutzellzahlen nach Inkubation mit Lipiden

Analog zu **2.10.2** wurden Probanden ausgewählt, die an dem Versuch teilnehmen durften, die keine Antikoagulantien in den letzten 10 Tagen eingenommen haben. Es wurde zunächst eine Heparin Lösung hergestellt siehe **2.10.1**.

Ebenfalls wie in dem Versuch **2.10.2** wurde Blut aus der Armvene entnommen und direkt verarbeitet. Zunächst wurde das Blut in dem speziell dafür vorgesehene Falcon-Röhrchen für EDTA, Citrat und CTAD überführt und die Blutzellzahl sofort gemessen. Des Weiteren folgte die Inkubation mittels verschiedener Lipide, die bereits am Vorabend vorbereitet wurden.

2.10.5 Verarbeitung der Lipide vor Inkubation mit Vollblut

Lipide werden in Chloroform-Lösung gehalten und müssen bevor sie mit Blut in Kontakt treten, frei von Chloroform sein. Dafür wurden sie in ein spezielles Gefäß überführt und frei in der Luft unter der Chemikalienwerkbank gelassen. Das Chloroform konnte somit verflüchtigen.

Analog wie in Versuch **2.10.2** wurde die entsprechende Konzentration Lipid mit heparinisiertem Blut in ein Falconröhrchen gegeben. Nach mehrmaligem Durchmischen erfolgte die Inkubation für 1 Stunde auf dem Schüttler auf Stufe 5. Insgesamt wurden 3 verschiedene Lipide verwendet, die immer in zwei verschiedenen Konzentrationen genommen wurden.

Dioleoyloxypropyl-N,N,N-trimethylammonium, Methylsulfate (DOTAP)

1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE)

1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin Polyethylenglykol (DSPE-PEG)

Tabelle 12: Darstellung der verschiedenen Lipide für die Testung der Hämokompatibilität

verschiedene Lipide und Kontrollen	Vollblutkonzentration in ml	Konzentration der Lipide in μ l
0 h Kontrolle ohne Lipid	6 ml	--
1h Kontrolle ohne Lipid	6 ml	--
DOTAP 1:100	6 ml	60 μ l
DOTAP 1:1000	6 ml	6 μ l
DOPE 1:100	6 ml	60 μ l
DOPE 1:1000	6 ml	6 μ l
DSPE-PEG 1:100	6 ml	60 μ l
DSPE_PEG 1:1000	6 ml	6 μ l

Nach einer Stunde Inkubation erfolgten die erneuten Messungen und das Notieren der Blutzellzahlen. Anschließend wurden die Proben zur Aliquotsgewinnung, wie in der Protokollanleitung beschrieben, für die ELISA-Testdurchführung vorbereitet, zentrifugiert und die Aliquots in verschlossenen Eppendorfgläsern analog in Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung bis zur Proteinmessung fand entsprechend der Angaben bei -20°C , bzw. -80°C statt.

Untersuchung der Marker für Hämokompatibilität

2.10.6 ELISA

Die „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) ist ein sehr gutes, qualitativ reproduzierbares und sensitiv diagnostisches Verfahren. Es ist ein Testverfahren zum Nachweis von Proteinen, Antikörpern oder Antigenen. Es wird die Eigenschaft von Antikörpern genutzt, die an spezifische Antigene anbinden. An den Antikörper ist ein Enzym gebunden. Dieses Enzym katalysiert die Reaktion eines Substrates in ein Produkt, das wiederum meist als Fluoreszenz, Farbumschlag oder Chemolumineszenz messbar ist. Dadurch ist das Antigen, welches vom Antikörper gebunden wurde, nachgewiesen. Danach erfolgte die Messung durch ein Photometer.

Die gewonnenen Aliquots vom Versuch **2.10.2** und Versuch **2.10.4** wurden bis zum Tag der Expressionsmessung entsprechend bei -20°C , bzw. -80°C aufbewahrt.

Es wurden folgende Parameter getestet:

Beta-Thromboglobulin, C3a, SC5b-9, TAT und PMN-Elastase

Jeder ELISA-Test wurde nach Protokoll beiliegend in jeder ELISA durchgeführt. Die Anwendung der Test-Kits erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Werte wurden analysiert und in einer Excel Tabelle notiert. Später erfolgte die Auswertung mittels Graph-Pad-Statistik-Programm.

2.10.7 Enzymimmunoassay ELISA beta-Thromboglobulin β -TG

Es wird CTAD-Plasma benötigt. Die Aliquots wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Verdünnung des Plasmas erfolgte mit 1:21.

Alle Reagenzien wurden auf Raumtemperatur gebracht und 30 min stehen gelassen.

Alle vorbereitenden Maßnahmen wurden nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Es folgte das Ansetzen der zu testenden Proben und die Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde. Danach wurde alles abgesaugt und 5 Mal mit 300 μ l Waschlösung gewaschen. Anschließend wurden 200 μ l Konjugat dazu gegeben und erneut für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte erneut das Absaugen und 5 Mal waschen mit 300 μ l Waschlösung. Danach erfolgte die Inkubation mit 200 μ l des Substrates Tetramethylbenzidin (TMB). Nach 5 min erfolgte die Stoppreaktion durch Zugabe von 50 μ l Stopplösung (Schwefelsäure). Anschließend wurden die Proben ausgewertet und die Extinktionen bei 450 nm mittels Photometer gemessen. Als Leerwert wurde der Phosphatpuffer gemessen. Der Messbereich befand sich bei 250 IU/ml β -TG-Proben, wobei die Proben, die über diesem Messwert lagen, erneut zur Messung mit einer Probenverdünnung von 1:105 getestet und gewertet wurden. Die Proben wurden in IU/ml abgelesen.

2.10.8 Enzymimmunoassay ELISA C3a

Es wurden EDTA-Plasmaproben benötigt aus **2.10.2**. Diese wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und auf Eis gestellt. Die Verdünnung des Plasmas erfolgte mit 1:200.

Alle Reagenzien wurden auf Raumtemperatur gebracht und 30 min stehen gelassen.

Alle vorbereitenden Maßnahmen wurden nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Es folgte das Ansetzen der zu testenden Proben und 100 µl wurden in die Vertiefungen der 96-Well Platte pipettiert. Die Vertiefungen wurden mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen das C3a gebrauchsfertig dargestellt. Nach 60 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte abgesaugt und 4 Mal mit 300 µl Waschpuffer gewaschen, ausgeklopft und anschließend wurden 100 µl Konjugat hinzugefügt. Dieses enthält Peroxidase-gekoppelte Antikörper gegen humanes C3a. Die Inkubation dauerte 60 min, was in dieser Zeit zur Ausbildung eines Sandwich-Komplexes führte. Danach wurde alles wieder abgesaugt und die Proben wurden 4 Mal nacheinander gewaschen. 100 µl chromogener Substanz TMB wurde dazu pipettiert. Die Proben wurden für 15 min im Dunkeln gelassen. Danach erfolgte die Stoppreaktion in jeder Vertiefung mittels 100 µl Schwefelsäure. Anschließend wurden die Proben ausgewertet und die Extinktionen bei 450 nm mittels Photometer gemessen. Als Leerwert wurde der Phosphatpuffer gemessen. Dieser ist direkt proportional mit der Konzentration der C3a. Die Proben wurden in ng/ml abgelesen. Folglich wurde das Ergebnis mit entsprechender Verdünnung multipliziert (Konzentration mal 200).

2.10.9 Enzymimmunoassay ELISA Sc5b-9

C3a entsteht durch Aktivierung des Komplementsystems. Es wurden EDTA-Plasmaproben benötigt. Diese wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und dann auf Eis gestellt. Die Verdünnung des Plasmas erfolgte 1:10.

Alle Reagenzien wurden auf Raumtemperatur gebracht und 30 min stehen gelassen.

Alle vorbereitenden Maßnahmen wurden nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Zuerst erfolgte das Auswaschen mit 300 µl Waschlösung und die Inkubation für 2 min. Danach wurde die Platte ausgekippt und ausgeklopft. Dies ist ein wichtiger Rehydrierungsschritt. Es folgte das Ansetzen der zu testenden Proben und 100 µl wurden in die Vertiefungen der 96-Well Platte pipettiert. Die Vertiefungen wurden mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen den C9-Ring von SC5b-9 gebrauchsfertig dargestellt. Nach 60 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte abgesaugt und 4 Mal mit 300 µl Waschpuffer gewaschen und für 1 min stehen gelassen. Anschließend wurde 50 µl Konjugatlösung, welche Meerrettichperoxidase-gekoppelte Antikörper gegen humanes SC5b-9 enthält, zugegeben. Diese wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte erneutes insgesamt viermaliges absaugen und waschen, wobei bei jedem Waschgang die Proben mit der

Waschlösung für 1 min stehen gelassen wurden. 100 µl chromogene Substratlösung TMB wurde in die Vertiefungen der 96-Well Platte gegeben und für 15 min im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte die Stoppreaktion mittels 100 µl Schwefelsäure.

Anschließend wurden die Proben innerhalb von 30 min ausgewertet und die Extinktionen bei 450 nm mittels Photometer gemessen. Als Leerwert wurde der Phosphatpuffer gemessen. Dieser ist direkt proportional mit der Konzentration des SC5b-9. Die Konzentration der Proben wurde in ng/ml abgelesen. Folglich wurde das Ergebnis mit entsprechender Verdünnung multipliziert (Konzentration mal 10).

2.10.10 Enzymimmunoassay ELISA PMN-Elastase

PMN-Elastase ist ein Marker für Granulozytenaktivierung im Citratplasma. Es wurden hierzu Citrat-Plasmaproben benötigt. Diese wurde im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Verdünnung des Plasmas erfolgte 1:100.

Alle Reagenzien wurden auf Raumtemperatur gebracht und 30 min stehen gelassen.

Alle vorbereitenden Maßnahmen wurden nach Protokoll gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Als erstes erfolgte das Ansetzen der zu testenden Proben und 100 µl wurden in den Vertiefungen der 96-Well Platte pipettiert. Die Vertiefungen sind gebrauchsfertig mit einer Beschichtung aus polyklonalen Antikörper gegen PMN-Elastase präpariert. Nach 60 min Inkubation bei Raumtemperatur und einem Schüttelthermostat mit 350-400 rpm wurde die Platte abgesaugt und 4 Mal mit 300 µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde 150 µl Konjugatlösung, welche Peroxidase-gekoppelte Antikörper gegen humanes α 1-Proteinase-Inhibitor enthält, welches wiederum für 60 min bei Raumtemperatur und Schüttelthermostat bei 350-400 rpm inkubiert wurde. Es erfolgte erneutes viermaliges absaugen und waschen. 200 µl chromogene Substratlösung TMB wurde in die Vertiefungen der 96-Well Platte gegeben und für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte die Stoppreaktion mittels 50 µl Schwefelsäure.

Anschließend wurden die Proben ausgewertet und die Extinktionen bei 450 nm und Referenzlänge von 630 nm mittels Photometer gemessen. Als Leerwert wurde der Phosphatpuffer gemessen. Dieser ist direkt proportional mit der Konzentration der PMN-Elastase. Die Konzentration der Proben wurde in ng/ml abgelesen. Folglich wurde das Ergebnis mit entsprechender Verdünnung multipliziert (Konzentration mal 10).

2.10.11 Enzymimmunoassay ELISA Thrombin/Antithrombin III-Komplex-TAT

TAT ist ein Marker für Gerinnungsaktivierung im Citratplasma. Es wurden Citrat-Plasmaproben benötigt. Diese wurde im Wasserbad bei 37°C aufgetaut.

Alle Reagenzien wurden auf Raumtemperatur gebracht und 30 min stehen gelassen.

Alle vorbereitenden Maßnahmen wurden nach Protokoll gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Als erstes erfolgte das Ansetzen der zu testenden Proben und je 50 µl wurden in die Vertiefungen der 96-Well Platte pipettiert. Die Vertiefungen sind gebrauchsfertig mit einer Beschichtung aus polyklonalen Antikörper gegen Thrombin präpariert. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur und einem Shakerinkubator wurde die Platte abgesaugt und 3 Mal mit 300 µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde 100 µl Konjugatlösung, welche Peroxidasegekoppelte Antikörper gegen humanes Antithrombin III enthielt, was wiederum für 15 min bei 37°C inkubiert wurde. Es erfolgte erneutes absaugen und dreimaliges waschen. 100 µl chromogene Substratlösung TMB wurde in den Vertiefungen der 96-Well Platte gegeben und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte die Stoppreaktion mittels 100 µl Schwefelsäure.

Anschließend wurden die Proben ausgewertet und die Extinktionen bei 490 nm mittels Photometer gemessen. Als Leerwert wurde der Phosphatpuffer gemessen. Dieser ist direkt proportional mit der Konzentration der TAT im Plasma. Die Konzentration der Proben wurde in µg/l abgelesen. Folglich wurde das Ergebnis mit entsprechender Verdünnung multipliziert (Konzentration mal 51).

2.11 Inkubation und Transfektion von PBMCs mit unterschiedlichen siRNAs und siRNA-Konzentrationen aus menschlichem Vollblut

2.11.1 Isolierung von PBMCs aus frischem menschlichem Vollblut

Die Isolierung und Verarbeitung des Blutes erfolgte nach genauen Angaben und Protokoll des THG-Labors. Als erstes erfolgte die Inkubation und das Ansetzen des Blutes. Später folgte die Isolierung der PBMC`s. Danach kam es zur Isolierung der RNA und die Umschreibung in cDNA.

2.11.2 Inkubation und Ansetzen des Blutes

Das Blut wurde zunächst in 6 ml Monovetten wie in Abschnitt Blutgewinnung und Herstellung einer Heparinlösung beschrieben, vorbereitet. Nach der Entnahme des Blutes, wurden 5 ml des frischen Blutes in ein 50 ml Falconröhrchen pipettiert, d.h. insgesamt 30 ml. Es folgte die (aus dem Engl. Periferal blood mononuclear cells) - PBMCs Isolierung.

Für die Proben wurden 15 sterile Falconröhrchen (je 15 ml) benötigt. Alle Proben wurden anschließend auf dem Schüttler bei 37°C auf Stufe 5 für jeweils zwei Stunden und vier Stunden zur Inkubation gelassen.

2.11.3 Isolierung der PBMC`s aus menschlichem Vollblut

Alle Versuche erfolgten unter aseptischen Bedingungen. Zu der gewünschten Blutmenge wurde 25 ml (1:5) Erythrozyten-Lyse-Puffer gegeben. Es folgte 15 min Inkubation auf dem Eis und danach 10 min Zentrifugation bei 400 Umdrehungen bei 4°C. Der Überstand nach dem Lyse-Verfahren wurde abgesaugt. Das gewonnene Pellet wurde noch mal in 10 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert. Es folgte eine erneute, 5-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurde wieder 10 min lang bei 4°C und 400 Umdrehungen/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Das Pellet wurde in 10 ml PBS ohne Calcium und Magnesium plus 2 mM EDTA suspendiert. Davon wurden 100 µl für die Zellzählung am Blutzellmessgerät in ein Eppendorfgefäß überführt. Die gewünschte Zellzahl wurde zu Beginn der Versuche auf 2 Mio. Zellen festgelegt. Diese wurden in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und bei 4°C und 400 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgesaugt. Die Zellen wurden sofort weiterverwendet zur Inkubation mit der zu untersuchenden siRNA.

2.11.4 Inkubation der PBMCs mit siRNA.

Das gewonnene Pellet wurde erneut in 10 ml reinem PBS ohne Ca und Mg mit EDTA resuspendiert. In jede Probe wurden entweder 1 µl oder 10 µl siRNA gegeben. Es werden wieder 3 unterschiedliche siRNA getestet - E-Selektin siRNA, ICAM siRNA und SCR siRNA. Es wurde wie folgt inkubiert (siehe Tabelle 3).

Tabelle 13: Darstellung der verschiedenen siRNA für die Testung der Hämokompatibilität nach 2 Stunden und nach 4 Stunden Inkubation

verschiedene siRNA und Kontrollen	Konzentration der siRNA in µl
0 h Kontrolle ohne siRNA	--
2 h Kontrolle ohne siRNA	--
2 h E-Selektin siRNA 1:100	10 µl
2 h E-Selektin siRNA 1:1000	1 µl
2 h SCR siRNA 1:100	10 µl
2 h SCR siRNA 1:1000	1 µl
2 h ICAM siRNA 1:100	10 µl
2 h ICAM siRNA 1:1000	1 µl
4 h Kontrolle ohne siRNA	--
4 h E-Selektin siRNA 1:100	10 µl
4 h E-Selektin siRNA 1:1000	1 µl
4 h SCR siRNA 1:100	10 µl
4 h SCR siRNA 1:1000	1 µl
4 h ICAM siRNA 1:100	10 µl
4 h ICAM siRNA 1:1000	1 µl

Die so vorbereiteten Proben wurden auf dem Schüttler für jeweils, zwei oder vier Stunden auf Stufe 5 unter leichtem Schütteln inkubiert. Die 0 h Kontrollprobe wurde sofort vorbereitet zu Isolierung von RNA. Die anderen Proben wurden erst nach zwei Stunden bzw. nach vier Stunden Inkubation gemessen.

2.11.5 Fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie (engl. Fluorescence-activated cell sorting = FACS)

Durch die Durchflusszytometrie ist eine Charakterisierung von Zellen möglich. Die Zellen passieren zunächst eine Messöffnung. Dadurch kommt es zu einer Widerstandsänderung der Zelle, die proportional zu Ihrem Volumen ist.

2.11.6 FACS-Messung siRNA

Nach Isolierung der PBMC`s aus menschlichem Vollblut wurden diese, mittels einer fluoreszierenden siRNA und Interferin transfiziert. Nach zwei Stunden fand eine Messung mittels FACS-Scans statt, um zu ermitteln mit welcher Konzentration die siRNA am besten aufgenommen wurde. Tabelle 14 zeigt die Konzentration der verwendeten siRNAs und die Menge des Transfektionsmittels Interferin an.

Tabelle 14: Darstellung der Konzentrationen der siRNA und Interferin für die Testung der Transfektion

siRNA Konzentration	Menge siRNA in μl	Interferin in μl	PBS mit EDTA in μl
1 nM	0.032	2,34	636
10 nM	0,32	2,34	636
25 nM	0,8	2,34	636
50 nM	1,6	3,5	635
100 nM	3,2	3,5	633,4
150 nM	4,8	3,5	632

Die Konzentration 25 nM und 100 nM wurden anschließend mit funktionaler siRNA weitergeführt. siehe folgenden Abschnitt.

2.11.7 Transfektion der PBMCs mit siRNA.

Das gewonnene Pellet wurde erneut in 10 ml reinem PBS ohne Calcium und Magnesium mit EDTA resuspendiert. Es werden wieder 3 unterschiedliche siRNA in zwei verschiedene Konzentrationen getestet - E-Selektin siRNA, ICAM siRNA und SCR siRNA. Es wurde wie folgt inkubiert (siehe Tabelle 14).

Tabelle 15: Darstellung der verschiedenen siRNA und Interferin für die Testung der Hämokompatibilität der PBMC`s nach 2 Stunden Transfektion

verschiedene siRNA und Kontrollen	Konzentration der siRNA in μl	Konzentration Interferin in μl	PBS mit EDTA in μl
0 h Kontrolle ohne siRNA	--		
2 h Kontrolle ohne siRNA	--		
2 h Interferin 25 nM	--	2,34 μl	636 μl
2 h Interferin 100 nM	--	3,5 μl	633,4 μl
E-Selektin 25 nM	0,8 μl	2,34 μl	636 μl
E-Selektin 100 nM	3,2 μl	3,5 μl	633,4 μl
SCR siRNA 25 nM	0,8 μl	2,34 μl	636 μl
SCR siRNA 100 nM	3,2 μl	3,5 μl	633,4 μl
ICAM siRNA 25 nM	0,8 μl	2,34 μl	636 μl
ICAM siRNA 100 nM	3,2 μl	3,5 μl	633,4 μl

Die Transfektions-angegebene Menge siRNA wurde in Basalmedium (PBS mit 2 mM EDTA) gelöst. Danach wurde Interferin dazugegeben. Es wurde 20 min inkubiert zur Bildung von Transfektionskomplexen. Diese Komplexe wurden zu dem gewonnenen Pellet pipetiert. Es folgten zwei Stunden Inkubation bei 37°C. Die 0 h Probe wurde sofort vorbereitet zu Isolierung von RNA.

2.12 Untersuchung der Endothelzellen nach Kontakt mit verschiedene siRNAs in verschiedene siRNA Konzentrationen

2.12.1 Endothelzellen

In der vorliegenden Arbeit wurden humane, venöse Endothelzellen (engl. Human venous endothelial cells = HVECs) von freiwilligen Spendern aus Abfällen von Herz-OPs verwendet - Überschüssige Venenreststücke dieser Operationen wurden dem Klinischen Forschungslabor übergeben. Die Patienten stimmten der Gewebespende zu, ebenso liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Tübingen vor. (Votum Nr. 416/2003).

Unter aseptischen Bedingungen und Protokollangaben erfolgte zunächst die Vorbereitung für das Auftauen der Endothelzellen. Zunächst wurden 12 ml Medium in ein Falconröhrchen mit allen aufgetauten Zellen hinzugegeben. Die Zellen wurden für 5 min bei 300 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überschuss wurde abgesaugt. Es wurde 1800 µl Basalmedium hinzugegeben. In 18-Well Platten mit Deckel wurden in jede Öffnung 500 µl Wachstums-Endothelzellmedium hinzugefügt. Pro Well wurden 100 µl Zellsuspension verteilt. Die so angesetzten Zellen wurden für mehrere Tage im Inkubationsschrank belassen. Unter aseptischen Bedingungen erfolgte ein tägliches Auswechseln des Mediums, bis zum Erreichen der gewünschten Zellzahl. Zunächst mussten die Zellen gelöst werden damit sie weiterverarbeitet werden können. Dazu wurde das Nährmedium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 6 ml PBS gewaschen. Das PBS wurde wieder abgesaugt. Danach erfolgte die Zugabe von 6 ml Trypsin und 6 ml TNS. Diese 12 ml wurden in einem 15 ml Falconröhrchen überführt. Es folgte die Zentrifugation bei 300 Umdrehungen für 5 min. Der Überstand wurde abgesaugt. Das Zellpellet wurde mit 1 ml Zellkultivierungmedium resuspendiert.

Für die Zellzahlbestimmung wird CASY® verwendet. Die Messung erfolgt nach einem besonderen Verfahren, bei dem eine Zelle bei Ihrem Durchtritt durch eine Messpore mittels elektrischen Stroms erfasst wird. Wenn die Zellen eine intakte Zellmembran besitzen, können diese den elektrischen Strom unterbrechen während Zellen, die eine beschädigte Membran haben, den Strom nicht unterbrechen. Das Größe der Zelle wird dabei ebenfalls bestimmt, eine tote Zelle weist dabei ein viel geringere Größe auf. Durch diese Funktion wird die Viabilität bestimmt.

Die gewünschte Zellzahl von HVEC wurden mit 5 ml CASYton® und mit 20 µl Zellsuspension vermischt und anschließend mit Programm 5 des CASY® gemessen. Die Messung erfolgte nach Herstellerangaben und mit Hilfe des technischen Laborhandbuchs.

2.12.2 Transfektion von Endothelzellen mit verschiedene siRNA-Konzentrationen

Es werden wieder 3 unterschiedliche siRNA in zwei verschiedenen Konzentrationen getestet - E-Selektin siRNA, ICAM siRNA und SCR siRNA. Es wurde wie folgt inkubiert (siehe Tabelle 15).

Tabelle 16: Darstellung der verschiedenen siRNA und Interferin für die Testung der Hämkompatibilität der PBMC`s nach 2 Stunden Transfektion

verschiedene siRNA und Kontrollen	Konzentration der siRNA in μl	Konzentration Interferin in μl	Basalmedium in μl
0 h Kontrolle ohne siRNA	--	--	636 μl
2 h Kontrolle ohne siRNA	--		636 μl
2 h Interferin 25 nM	--	2,34 μl	636 μl
2 h Interferin 100 nM	--	3,5 μl	633,4 μl
E-Selektin 25 nM	0,8 μl	2,34 μl	636 μl
E-Selektin 100 nM	3,2 μl	3,5 μl	633,4 μl
SCR siRNA 25 nM	0,8 μl	2,34 μl	636 μl
SCR siRNA 100 nM	3,2 μl	3,5 μl	633,4 μl
ICAM siRNA 25 nM	0,8 μl	2,34 μl	636 μl
ICAM siRNA 100 nM	3,2 μl	3,5 μl	633,4 μl

Die Kontrollen wurden während der zweistündigen Inkubation nur mit Basalmedium inkubiert. Die angegebene Menge siRNA wurde in Transfektionsmedium gelöst. Danach wurde Interferin dazugegeben. Es folgte 20 min Inkubation zur Bildung von Transfektionskomplexen. Das Medium der angezüchteten Zellen wurde abgesaugt. Die Zellen wurden mit 500 μl bis 1 ml mit PBS gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt. In einer 12-Well Platte wurden 300 μl Transfektionskomplex in jedes Well gegeben. Es folgten zwei Stunden Inkubation bei 37°C. Die 0 h Probe wurde sofort vorbereitet zu Isolierung von RNA.

2.13 Isolierung von RNA

Mit Hilfe des Atrium Total RNA Mini Kit wurde nach Herstellungsangaben das Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert. Zunächst wurde das gewonnene Pellet in 1 ml PBS gewaschen. Danach erfolgte die 5 min Zentrifugation bei 400 Umdrehungen und 4°C. Der Überstand wurde abgesaugt. Als nächstes wurde das Pellet mit 30 ml Lyse Puffer lysiert. Nach mehrmaligem Durchmischen mittels Vortex wurde 350 µl 70 % Ethanol dazugegeben und erneut durchmischt. Das Lysat wurde in Säulchen überführt mit anschließender Zentrifugation bei 1200 Umdrehungen für 30 Sekunden. Das Filtrat wurde abgeworfen. Nun erfolgte die Zugabe von 80 µl DNA-se I, welches zuvor angesetzt wurde (80 µl DNA-se I besteht aus 5 µl DNA-se und 75 µl Dilution Solution). Es erfolgte 15 min Inkubation bei Raumtemperatur. Es erfolgten mehrere Waschdurchgänge, zunächst mit 700 µl High Stringency, danach mit 700 µl Low Stringency Waschlösung. Es wurde zwischendurch jedes Mal zentrifugiert bei 1200 Umdrehungen und der Durchlauf wurde verworfen. Die Säule wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und 60 µl Elution Solution dazu gegeben, welche auf 70°C erwärmt war. Entsprechend wurde für 1 min inkubiert und anschließend bei 12000 Umdrehungen für 2 min zentrifugiert. Die Säulchen wurden verworfen. Die Proben wurden nachfolgend auf Eis gelegt und zur weiteren Verarbeitung vorbereitet. Die RNA wurde direkt weiterverarbeitet, und der Rest für maximal zwei Tage bei -20°C, oder maximal 3 Monate bei -80°C gelagert. Es folgte die RNA-Konzentrationsmessung.

2.14 RNA-Konzentrationsmessung

Mittels eines Photometers wurde die RNA-Konzentration gemessen. Zunächst wurde 5 µl RNA-Lösung mit 45 µl DEPG-Wasser vermischt. Die so entstandenen 50 µl wurden in Eppendorf-Küvetten im Photometer gemessen und das Ergebnis notiert. Vor der RNA-Messung fand die Kontrollmessung nur mit DEPG-Wasser statt.

2.15 Komplementär DNA (engl. Complementary DNA = cDNA) Synthese

Um ein Gen auf seine Transkription prüfen können ist es notwendig die Menge an spezifischer RNA zu ermitteln. Die Bestimmung ist mittels quantitativer Echtzeit PCR (qRT-PCR) möglich, die zusätzlich eine Quantifizierung der ermittelten DNA ermöglicht. Weil wir nur RNA zu Verfügung haben, muss diese zunächst mittels einer Enzym-Reverse Transkriptase umgeschrieben werden in cDNA (komplementäre DNA). Die cDNA-Synthese wird mit Hilfe des Reaktionskits der Firma Biorad gewonnen. Für die Verwendung wurden 1 µl Skript-Reverse Transkriptase (RT) mit 4 µl i-Skript Reaction Mix, Nucleasefreies Wasser und RNA-Template zusammengemischt. Wie viel genau benötigt wurde für die RNA Template Menge

wurde nach gemessener Konzentration abpipettiert. Für die cDNA-Synthese wurden 200 ng RNA umgeschrieben. Dabei wurden 200 ng RNA in 15 µl Wasser aufgelöst. Die cDNA-Synthese wurde nach Reaktionsprotokoll des Herstellers durchgeführt.

Im Mastercycler wurde zunächst 5 min bei 25°C, dann 30 min bei 42°C und anschließend 5 min bei 85°C inkubiert. Die so gewonnene cDNA konnte dann mittels Realtime PCR quantitativ ausgewertet werden.

2.16 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die Quantitative Real-Time PCR ist eine Methode die Nucleinsäuren vervielfältigt, was auf der eigentlichen Polymerase-Kettenreaktion basiert (PCR) und zusätzlich die quantitative Ermittlung der gewonnenen DNA gestattet. Diese Quantifizierung wird mittels Fluoreszenz-Messungen in unserem Labor durch SYBR® Green durchgeführt, die während eines Echtzeit PCR-Zyklus aufgezeichnet werden. Während der qRT-PCR lagert sich SYBR® an den Doppelsträngen der DNA ab, wodurch eine Zunahme der Fluoreszenz entsteht. Nach jedem PCR-Zyklus wird das Fluoreszenzsignal gemessen, wobei das gebildete Amplifikat eine proportionale Fluoreszenzzunahme vermittelt. Diese Zunahme der Fluoreszenz korreliert mit der Zunahme der Ziel-DNA, wodurch eine Quantifizierung durch die Fluoreszenzzunahme erfolgen kann. Hier wird nicht die Menge eines PCR-Produkts nach einer entsprechenden Anzahl von Zyklen bestimmt, sondern der Zeitpunkt ermittelt, an dem eine Amplifikation eines PCR-Produkts erstmalig detektiert wird.

Als erstes wird der DNA-Doppelstrang unter einer erhöhten Temperatur von 95°C denaturiert und in zwei Einzelstränge gespalten. Danach erfolgt eine Senkung der Temperatur. Es erfolgt die Hybridisierung der sequenzspezifischen Primer, die wiederum an der DNA komplementäre Einzelstränge binden. Ab da werden mittels einer Polymerase die Einzelstränge verlängert, wodurch ein weiterer DNA-Doppelstrang entsteht. Als nächster Schritt folgt die Erwärmung auf 72°C. Bei dieser Temperatur wird eine Taq-Polymerase aus einem hitzestabilen Mikroorganismus verwendet (*Thermus aquaticus*) welcher während der Denaturierungszyklen stabil bleibt. Der Kurvenverlauf, der entsteht wird in zwei unterteilt. In der exponentiellen Phase wird die Menge der DNA in jedem Zyklus verdoppelt. Wenn die PCR-Zusätze weniger werden, verlangsamt sich auch die Amplifikation und ein Plateau wird erreicht. Zu Quantifizierung wird zusätzlich SYBR®-Green als fluoreszierender Farbstoff verwendet, welcher sich nach jedem durchlaufenen Zyklus an der gebildeten doppelsträngigen DNA anlagert. Dadurch kann das Licht vom Farbstoff ermittelt und gemessen werden. Diese Messungen sind proportional zur Menge der amplifizierten DNA. Die Auswertung erfolgt mittels CFX-Manager der Firma BioRad.

Alle Primer wurden bei -20°C aufbewahrt und kurz vorher hergestellt mit bereits gewonnener cDNA. Ein Primermix wurde hergestellt wie folgt:

800 µl Nuclease freiem Wasser mit 15 µl sense und 15 µl antisense des Primers wurden vermischt.

2 µl cDNA wurden mit 48 µl Nuclease freiem Wasser vermischt - entspricht verdünnter cDNA

108 µl Primermix wurden mit 324 µl SYBRGreen vermischt. So entstand ein Hauptmix.

36 µl Hauptmix mit 18 µl verdünnter cDNA wurden vermischt für ein Triplet pro Gen.

Der entstandene Mix wurde mit jeweils 15 µl in 3-Well der 96-Well Platte der qRT-PCR gegeben. Zum Schluss erfolgte die Zentrifugierung und im BioRad-PCR-Cycler wurde die qRT-PCR durchgeführt.

Die Ergebnisse wurden ausgewertet mittels CFX-Manager der Firma BioRad.

Als Housekeeping-Gen wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Diese kommt bei jeder Säugerzelle vor und wird unabhängig von verschiedenen Einflüssen gleich exprimiert. Dadurch können wir wie in behandelten Zellen als auch in unbehandelten Zellen davon ausgehen, dass es gleich exprimiert wird und kann deshalb als Vergleich genommen werden. Die unbehandelten Zellen, in unserem Fall die Kontrollprobe, wurde auf 1 gesetzt und die untersuchten Gene ins Verhältnis gesetzt.

2.17 Statistische Auswertung

Für alle Versuche dieser Arbeit wurde eine Teilstatistik erstellt, wodurch zunächst die Werte auf Ausreißer getestet wurden. Dies wurde mit einem Outliertest (Grubbs) mit Signifikanzlevel von 0,05 und 0,01 durchgeführt. Danach wurden die Werte auf Gleichverteilung überprüft. In Folge wurde bei gleich verteilten Werten eine ANOVA Statistik durchgeführt. Bei einer nicht Gleichverteilung wurde eine Kruskal-Walis Statistik mit einem Post-Test „Compare all pairs of columns“ durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Hämokompatibilitätstest

Viele unerwünschte Materialeigenschaften oder Produkte können mit Hilfe von in vivo Blutverträglichkeitstest in einem frühen Stadium ihrer Entwicklung erkannt und verhindert werden. Das ist wichtig damit das Produkt keinen Schaden am Patienten hervorruft. Das Labor der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie orientiert sich bei seinen Untersuchungen der Hämokompatibilität an der ISO 10993-4. Dabei werden charakteristische Marker des hämostatischen Systems analysiert wie:

- Trombozytenaktivierung
- Leukozytenaktivierung
- Kontaktphasensystem
- Endstrecke der Gerinnungskaskade
- Komplementsystem

3.1.1 Blutzellzahlen nach Inkubation mit siRNA

Für alle Untersuchungen, die sich auf die Hämokompatibilität beziehen wurden Probanden ausgewählt, die gesund gewesen sind und keine antikoagulierenden Medikamente genommen haben. Das frische Vollblut wurde mit siRNA in verschiedener Konzentration (60 µl für die Proben 1:100 und 6 µl für die Proben 1:1000) oder Lipiden für eine Stunde inkubiert, anschließend wurden die Proben im Blutzellmessgerät gemessen.

Nach einer Stunde Inkubation ohne Zugabe von siRNA sinken bereits alle Blutzellzahlen (Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten), sowie der Hämatokrit. Die Leukozytenzahl (Abb.1A) zeigt eine signifikante Verringerung in der 1 h Kontrolle verglichen mit der 0 h Kontrolle. Des Weiteren bleibt die Erythrozytenzahl nach Inkubation mit E-Selektin siRNA gleich, wobei die 1 h Kontrolle signifikant verringert ist (Abb. 1B). Es gibt keine signifikanten Veränderungen des Hämatokrits nach Zugabe von siRNAs (Abb.1C). Die Trombozytenzellzahl ist in den siRNA behandelten Proben als auch in der 1 h Kontrolle verringert. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Anwesenheit der siRNAs keinen signifikanten Einfluss auf die hier bestimmten Parameter hat.

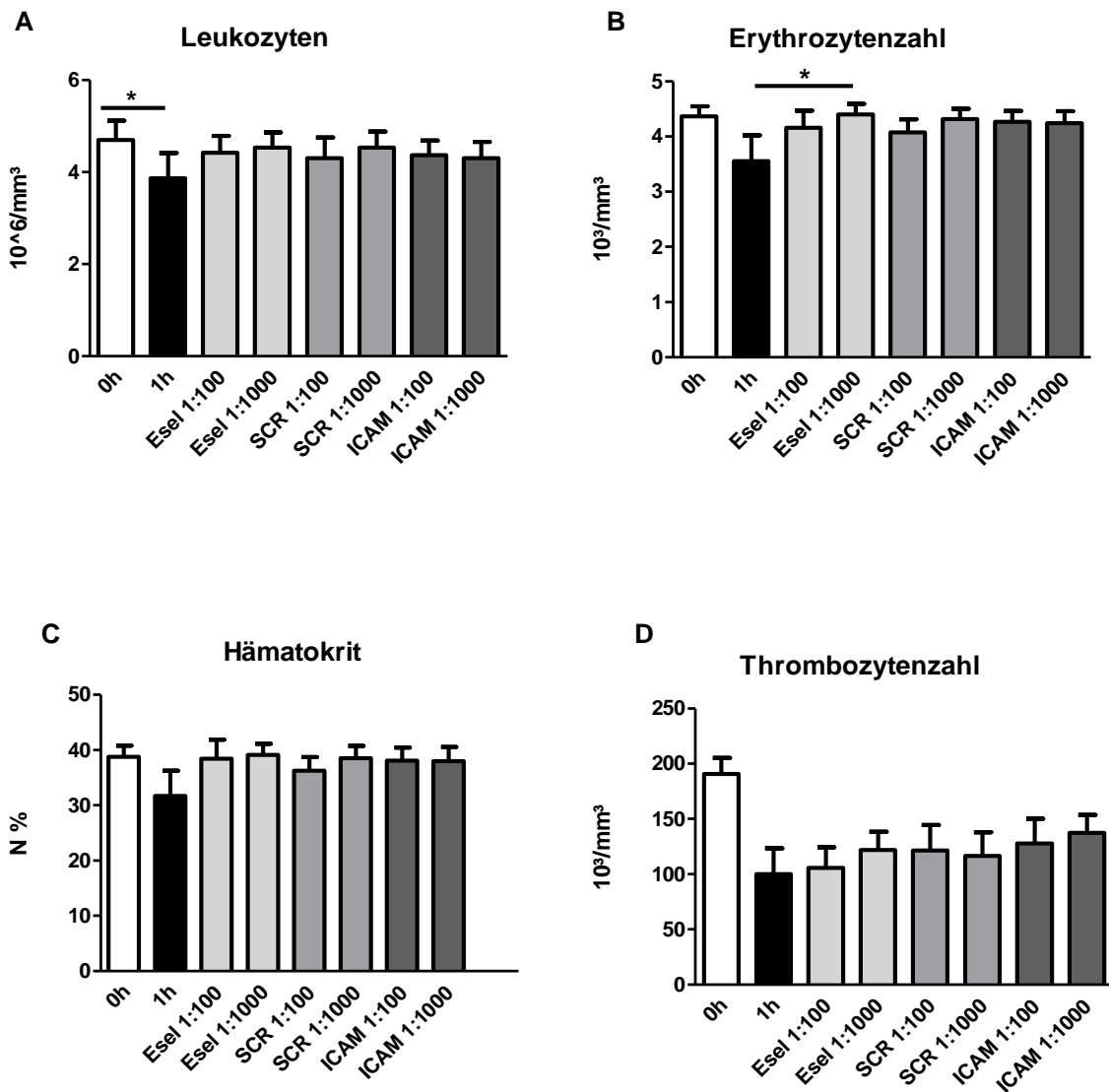


Abbildung 1: Untersuchung der Blutzellzahlen nach Inkubation in Vollblut mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen.

Die X-Achse zeigt die verschiedenen Proben, die Y-Achse zeigt die Zellzahl bzw. Hämatokrit. A: Leukozyten; B: Erythrozyten; C: Hämatokrit; D: Thrombozytenzahl. n=6, Mittelwert ± SEM, (* = p < 0,05).

3.1.2 Blutzellzahlen nach Inkubation mit Lipiden

Ebenfalls wie bei der Untersuchung der siRNA wurden Probanden ausgewählt, die gesund gewesen sind und keine antikoagulierenden Medikamente genommen haben. Das frische Vollblut wurde mit Lipiden in verschiedener Konzentration (100 µl für die Proben 1:100 und 10 µl für die Proben 1:1000) und Modifikation für eine Stunde inkubiert, anschließend wurden die Proben im Blutzellmessgerät gemessen.

Nach eine Stunde Inkubation ohne Lipide sinkt die Blutzellzahl nur gering (Abb.2A) bzw. bleibt gleich (Abb.2B) und (Abb. 2C). Nach einer Stunde Inkubation ohne Lipide zeigt sich eine signifikante Verringerung der Thrombozytenzahl (Abb. 2D) zwischen der 0 h und 1 h Kontrollen.

Die Zugabe von DOPE 1:100 bzw. DSPE-PEG 1:100 führt wiederum zu einer signifikanten Erhöhung der Thrombozytenzahl im Vergleich zur 1 h Kontrolle (Abb. 2D). Die Lipide DOPE und DSPE-PEG scheinen den negativen Effekt der einstündigen Blutinkubation zu eliminieren. Dies gelingt allerdings nur in der konzentrierten 1:100 Anwendung und nicht bei 1:1000. DOTAP zeigt keinen Einfluss auf die Thrombozytenzahl, sondern in hoher Konzentration 1:100 sogar eine verringerte Zellzahl im Vergleich zur 1 h Kontrolle.

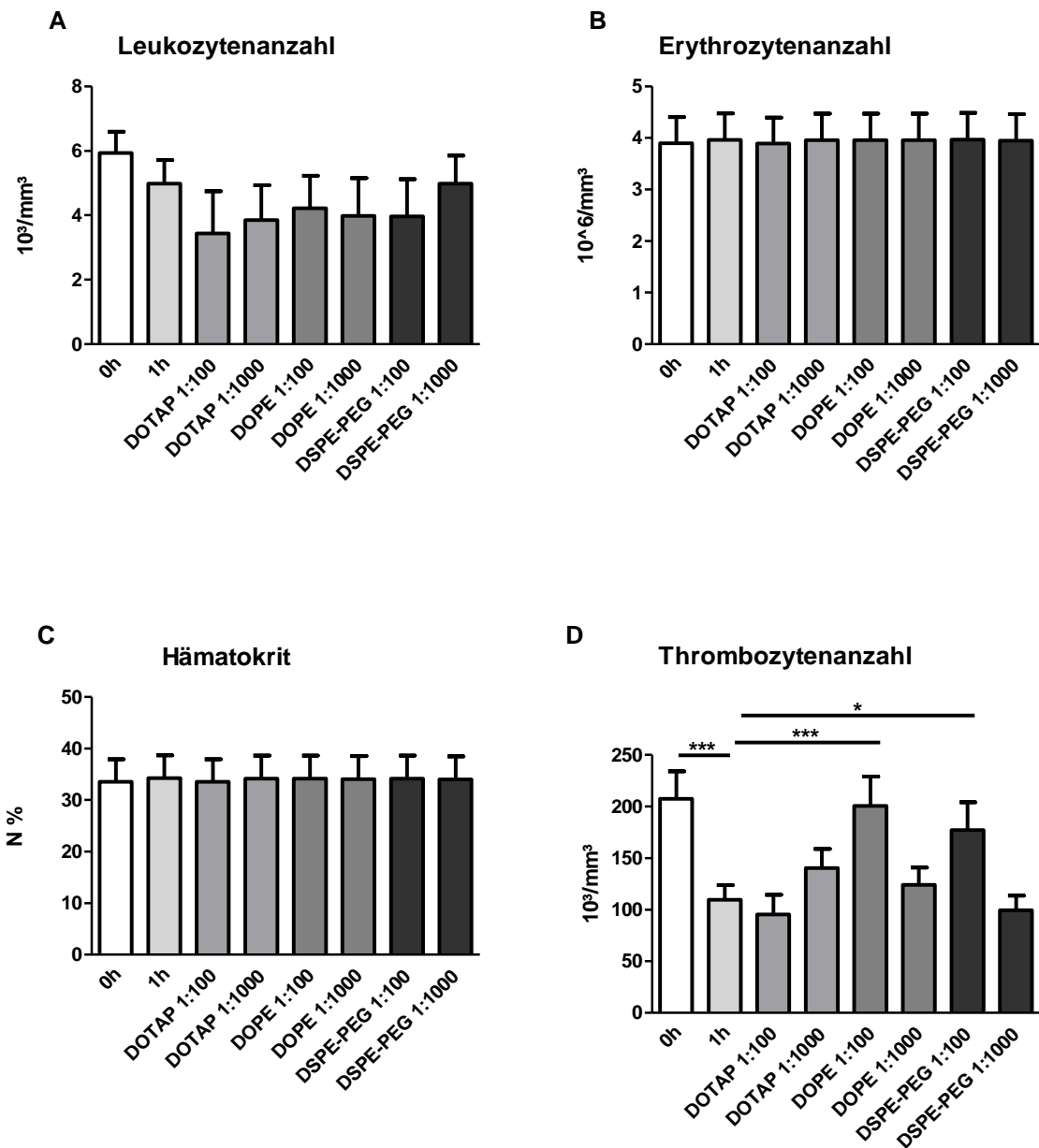


Abbildung 2: Untersuchung der Blutzellzahlen nach Inkubation in Vollblut mit verschiedenen Lipid-Konzentrationen.

Die X-Achse zeigt die verschiedenen Proben, die Y-Achse zeigt die Zellzahl bzw. Hämatokrit. A) Leukozyten B) Erythrozyten C) Hämatokrit D) Thrombozytenzahl. n=6, Mittelwert \pm SEM, (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

3.2 Untersuchung der Marker für die Hämokompatibilität

3.2.1 Untersuchung der Marker für Hämokompatibilität nach Kontakt mit verschiedenen siRNAs

Nachdem das Blut für 1 h mit verschiedenen siRNAs inkubiert, fand entweder sofort oder nach einer Aufbewahrung bei -20°C die Messung der Proteinexpression statt.

Abb. 3 zeigt die Aktivierung des Komplementsystems bereits nach 1h Inkubation ohne Zugabe von siRNA. Nach Zugabe von siRNA ist die Konzentration der beiden Komplementfaktoren sogar etwas niedriger im Vergleich zur 1 h Kontrolle. Vor allem bei der Untersuchung der Proteinexpression des C3a kann man erkennen, dass die hohe Konzentration von E-Selektin siRNA und ICAM-1 siRNA zu einer geringeren Aktivierung des C3a führt wie die 1 h Kontrolle.

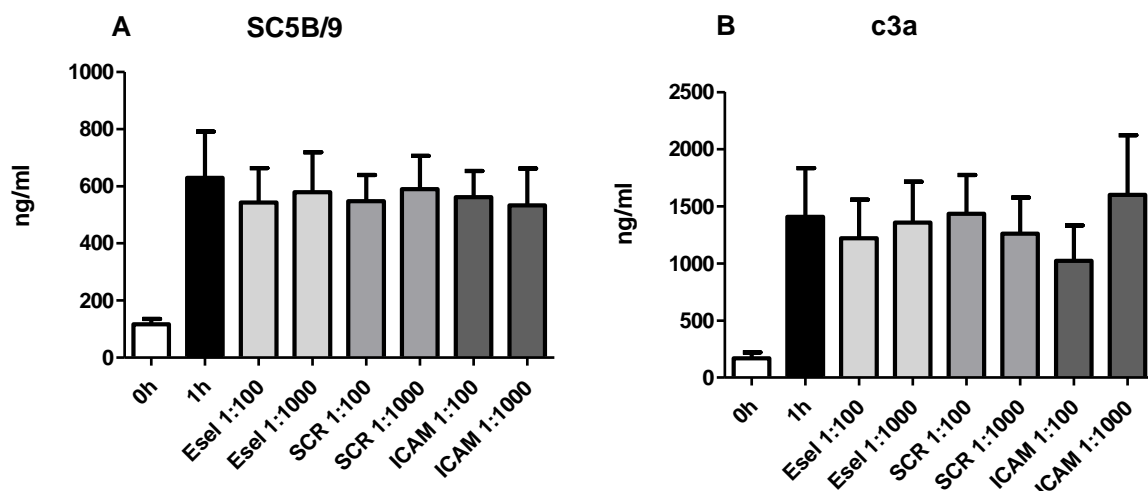


Abbildung 3: Proteinexpression von Faktoren des Komplementsystems SC5B/9 und c3a nach Inkubation in Vollblut mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen

Die X-Achse zeigt die verschiedenen Proben, die Y-Achse die Konzentrationen.

A: SC5B/9: B: C3a. n=6, Mittelwert \pm SEM, (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

Erhöhte Werte des beta-Thromboglobulin (Abb. 4A) lassen auf eine Thrombozytenaktivierung schließen. Schon nach einer Stunde Inkubation ohne Zugabe von siRNA ist ein signifikanter Anstieg der beta-Thromboglobulin Konzentration zu sehen (0 h Kontrolle zur 1 h Kontrolle, Abb. 4A). Nach Inkubation mit siRNA ist die Konzentration des beta-Thromboglobulin im Vergleich zur 1 h Kontrolle etwas verringert, was auf weniger Thrombozytenaktivierung schließen lässt.

Erhöhte Werte sind auch beim Thrombin-Antithrombin-Komplex (Abb.4B) bereits nach der 1 h Kontrolle bei Inkubation ohne siRNA erkennbar. Allgemein steigt die Konzentration der Gerinnungsmarker nach Inkubation mit siRNA außer bei der E-Selektin 1:100 Probe. Dies lässt sich wohl auf einen ähnlichen Effekt wie bei C3a zurückführen.

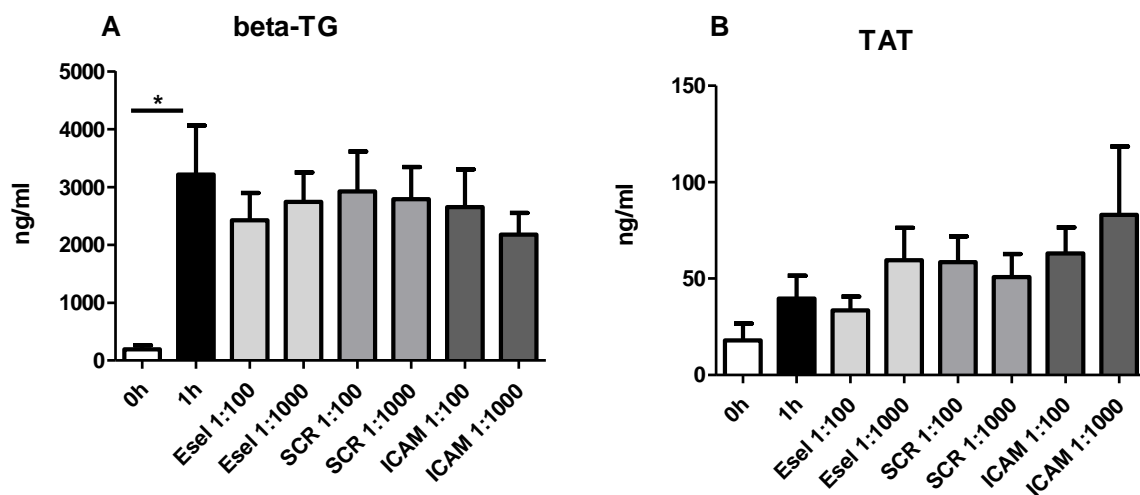


Abbildung 4: Proteinexpression des Thrombozytenaktivierungsmarkers β -TG und TAT nach Inkubation in Vollblut mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen.

Die X-Achse zeigt die verschiedenen Proben, die Y-Achse die Konzentrationen. Beta-Thromboglobulin (A) und Gerinnungsmarkers TAT (B) n=6, Mittelwert \pm SEM, (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

Auch bei der PMN-Elastase (Abb.5A) ist die Konzentration bei der 1h Kontrolle ohne Zugabe von siRNA deutlich angestiegen. Die inkubierte siRNA verhält sich in etwa gleich zur 1 h Kontrolle. Auch hier ist eine Verringerung der PMN-Elastase Expression durch E-Selektin siRNA 1:100 im Vergleich zur 1 h Kontrolle erkennbar.

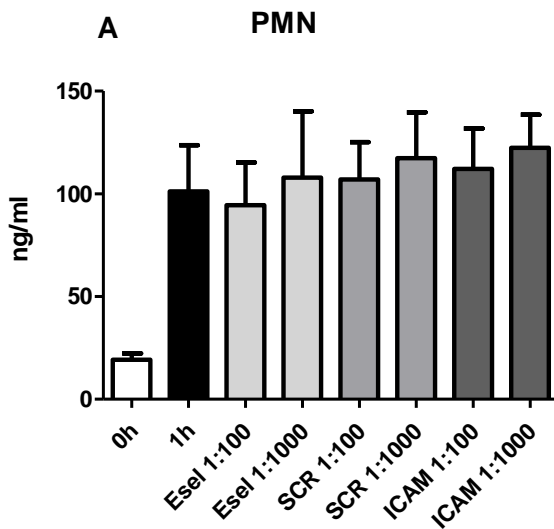


Abbildung 5: Proteinexpression des Granulozytenaktivierungsmarkers PMN-Elastase (A) nach Inkubation in Vollblut mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen

Die X-Achse zeigt die verschiedenen Proben, die Y-Achse die Konzentrationen. n=6, Mittelwert \pm SEM, (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

Zusammenfassend lässt sich folgende Aussage treffen, nämlich, dass bereits nach einer Stunde Inkubation ohne siRNA die Proteinexpression aller untersuchten Marker ansteigt. Jedoch ist eine erkennbare Verringerung dieser Aktivierung in allen E-Selektin siRNA 1:100 Ansätzen sichtbar. Die ICAM-1 siRNA 1:100 zeigt dieses positive Verhalten bei C3a und die 1:1000 Verdünnung bei Beta-Thromboglobulin. Die unspezifische SCR siRNA zeigt tendenziell die höchsten Werte an.

3.2.2 Untersuchung der Marker für die Hämokompatibilität nach Kontakt mit verschiedenen Lipiden

Nachdem das Blut für 1 h mit verschiedenen Lipid-oder-siRNA Konzentrationen inkubiert gewesen sind und die Zellzahl gemessen wurde erfolgte zeitnah die Messung der Proteinexpression.

Abb. 6 zeigt die Aktivierung des Komplementsystems bereits nach 1 h Inkubation ohne Zugabe von Lipiden. Nach Zugabe von Lipiden steigt die Konzentration der beiden Komplementfaktoren deutlich weiter an. Zwischen der 1 h Kontrolle und DSPE-PEG 1:100 zeigt sich eine deutliche signifikante Erhöhung des SC5b/9 (Abb. 6A). Ebenfalls ein signifikanter Anstieg ist zwischen 1 h und DOPE 1:100, sowie 1 h und DSPE-PEG 1:100 beim Komplementfaktor C3a (Abb. 6B) zu sehen.

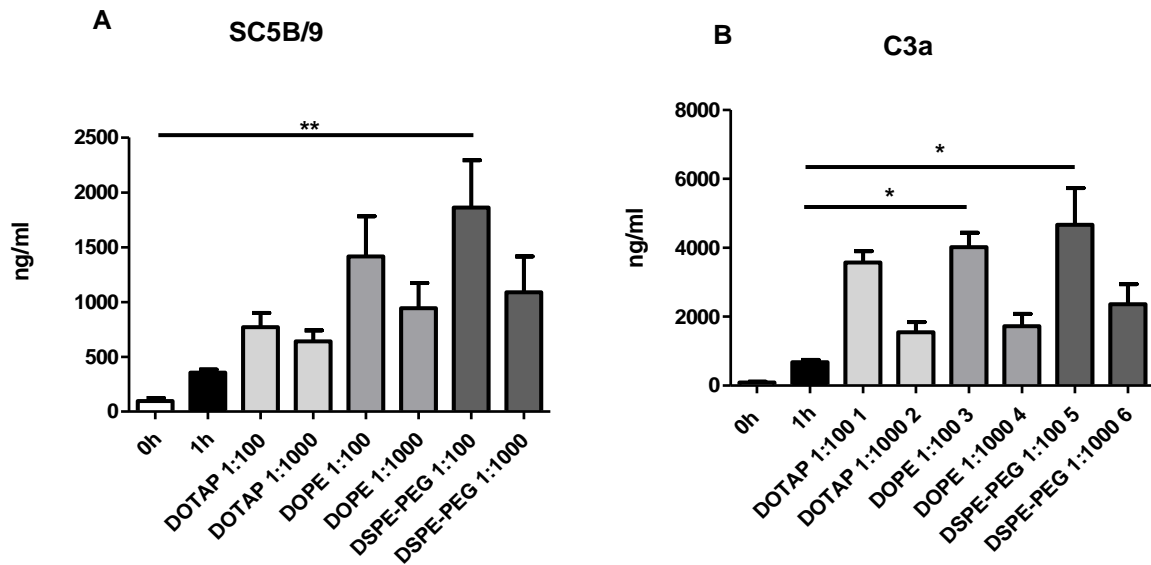


Abbildung 6: Proteinexpression von Faktoren des Komplementsystems SC5B/9 und C3a nach Inkubation in Vollblut mit verschiedenen Lipid-Konzentrationen

Die X-Achse zeigt die verschiedenen Proben, die Y-Achse die Konzentrationen. A:SC5B/9; B:C3a. n=6, Mittelwert \pm SEM*, (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

Abb. 7A zeigt eine signifikante beta-Thromboglobulin Erhöhung bereits nach 1h Inkubation ohne Zugabe von Lipiden (0 h zur 1 h Kontrolle). Die Zugabe von Lipiden lässt die Proteinexpression unverändert. In Abb. 7B hingegen ist ein deutlicher Unterschied zu sehen. Eine signifikante Reaktion ist nur zwischen der 1h Kontrolle und DOTAP 1:100. Dies steht im Einklang mit der Thrombozytenzellzahl die in dem DOTAP 1:100 Ansatz am niedrigsten war.

Des Weiteren weist nur die Probe DOTAP 1:1000 (Abb. 7B) erhöhte Proteinexpression auf. Die anderen Lipidproben bleiben fast unverändert zur 0h Kontrolle.

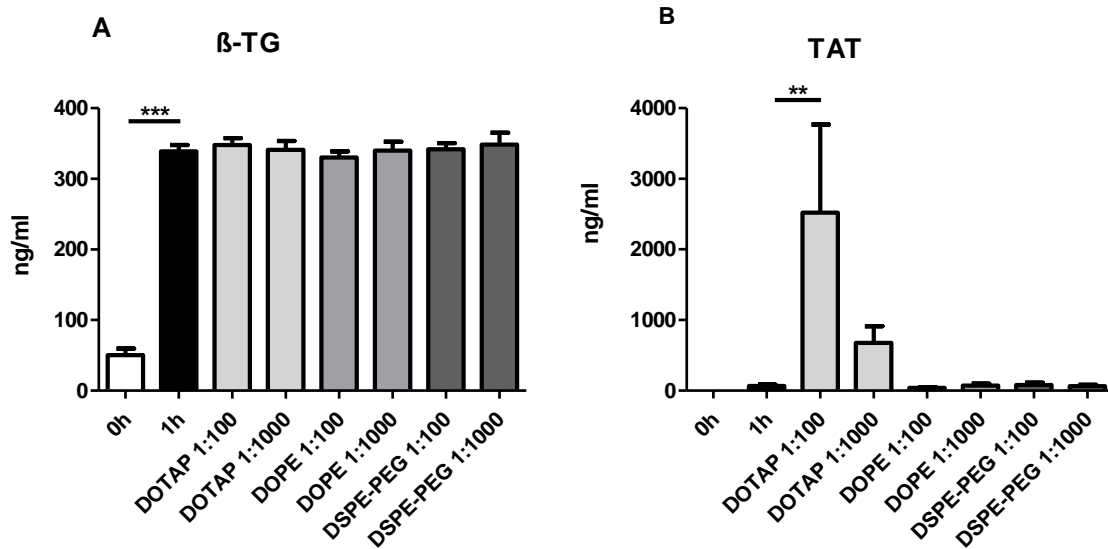


Abbildung 7: Proteinexpression des Thrombozytenaktivierungsmarkers β -TG und TAT nach Inkubation in Vollblut mit verschiedenen Lipid-Konzentrationen.

Die X-Achse zeigt die verschiedenen Proben, die Y-Achse die Konzentrationen. beta-Thromboglobulin (A) und Gerinnungsmarkers TAT (B) n=6, Mittelwert + SEM*, (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Die Expression von PMN Elastase zeigt eine signifikante Erhöhung zwischen der 0 h und 1 h Kontrolle (Abb. 8A). Die weiteren Proben zeigen einen minimalen Unterschied zur 1 h Kontrolle in der Proteinexpression (Abb. 8A). Die gering konzentrierten Lipide (1:1000) scheinen einen geringeren Einfluss auf die PMN-Elastase auszuüben als die 1:100 Verdünnung.

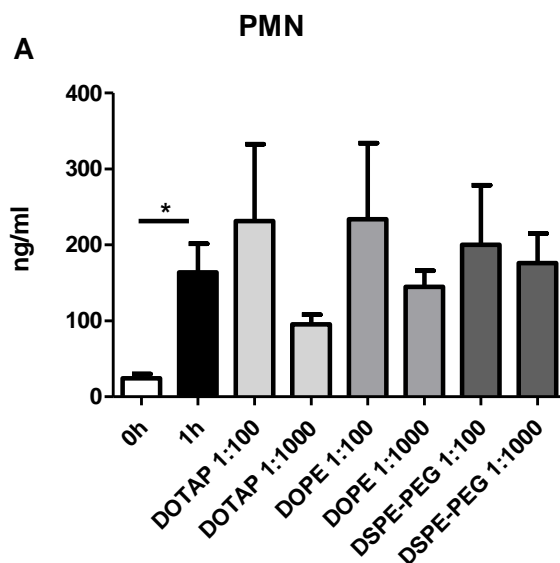


Abbildung 8: Proteinexpression des Granulozytenaktivierungsmarkers PMN-Elastase (A) nach Inkubation in Vollblut mit verschiedenen Lipid-Konzentrationen.

Die X-Achse zeigt die verschiedenen Proben, die Y-Achse die Konzentrationen. Die X-Achse zeigt die verschiedenen Proben, die Y-Achse die Konzentrationen. n=6, Mittelwert \pm SEM*, (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

3.3 Inkubation und Transfektion von PBMCs mit unterschiedlichen siRNAs und siRNA-Konzentrationen aus menschlichem Vollblut

Die PBMCs (mononukleare Zellen des peripheren Blutes) sind Zellen mit einem runden Zellkern. Darunter zählen zum Beispiel Lymphozyten und Monozyten. Vor allem bei Bekämpfung von Infektionen spielen diese Zellen eine entscheidende Rolle.

3.3.1 Inkubation von PBMC's mit unterschiedlichen siRNA-Konzentrationen aus menschlichen Vollblut

Für die folgenden Versuche wurde frisches Vollblut zur Untersuchung genommen. Anschließend wurden die PBMC's isoliert und 1 ml der gewünschten Zellzahl wurde mit 10 μ l siRNA für die 1:100 Proben, oder 1 μ l siRNA für die 1:1000 Proben inkubiert. Es folgte die mRNA-Isolierung und anschließend die cDNA-Synthese. Die Aufbewahrung fand bei -20°C oder -80°C bis zur Messung der Proteinexpression statt.

In Abb. 9A ist die Genexpression von B7-2 dargestellt. Die 1 h Kontrolle ist zur 0h Kontrolle ohne Zugabe von siRNA leicht erhöht. Fast doppelt erhöht ist die

Proteinexpression bei den Proben 2 h SCR siRNA 1:1000 und 4 h ICAM siRNA 1:1000 (Abb. 9A).

Im Vergleich zur 1 h Genexpression von CXCL-7 sind die Proben 2 h E-Selektin siRNA 1:100 und 2 h E-Selektin siRNA 1:1000 am meisten erhöht (Abb. 9B).

In Abb. 9C ist die Proteinexpression von CXCL-8 dargestellt. Erhöhte Werte lassen sich bei der 2 h SCR siRNA 1:1000 und 4 h E-Selektin siRNA 1:100 sehen (Abb. 9C).

Die Genexpression von CXCL-10 ist bereits bei der 4 h Kontrolle ohne Zugabe von siRNA deutlich erhöht (Abb. 9D). Außerdem weist die 4 h Probe höhere Proteinexpressionen auf als die 2 h Proben (Abb. 9D).

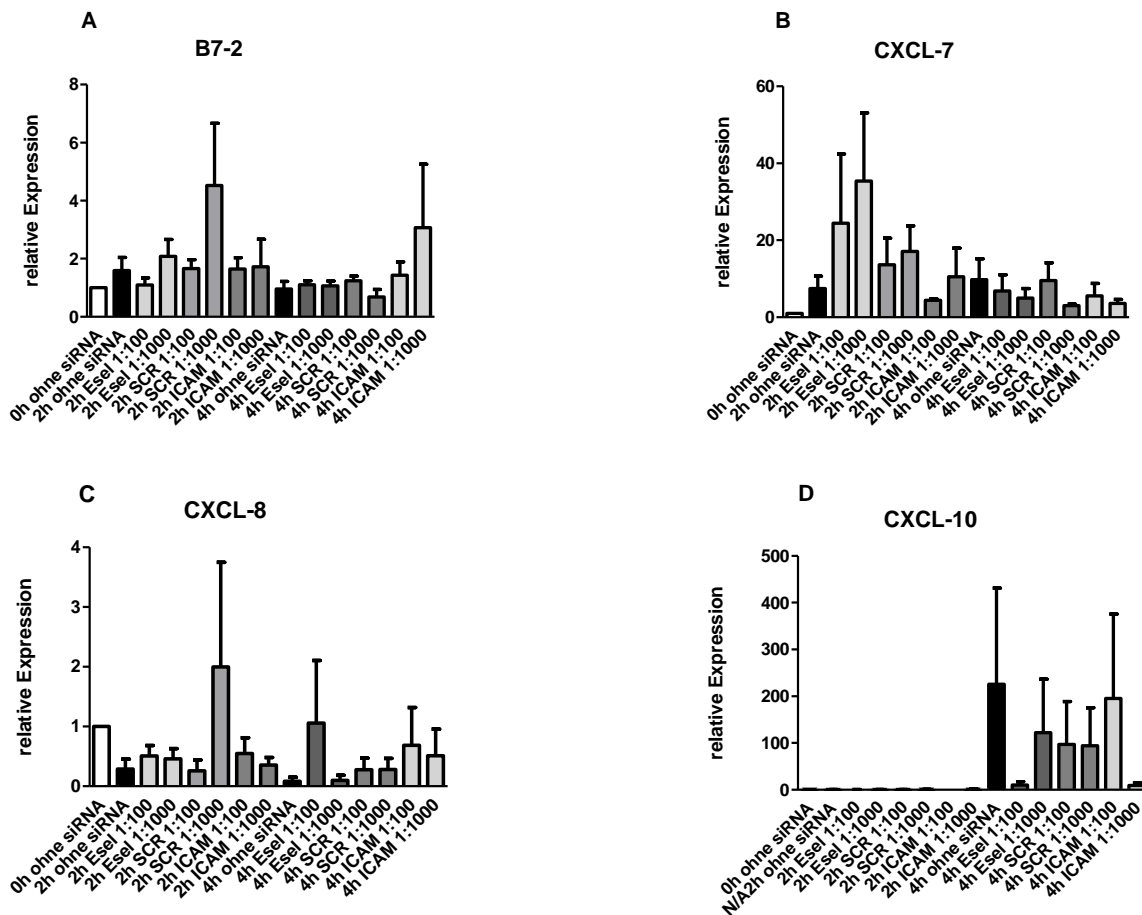


Abbildung 9: Genexpression der Entzündungsmarker B7-2, CXCL-7, CXCL-8 und CXCL-10 nach Inkubation von PBMCs mit verschiedenen siRNA-Konzentration.

Die X-Achse zeigt die verschiedenen Proben, die Y-Achse die relative Genexpression. A: B7-2 Genexpression, B: CXCL-7 Genexpression, C: CXCL-8 Genexpression, D: CXCL-10 Genexpression. n=6, Mittelwert \pm SEM, (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

Alle Proben weisen eine geringe IFN α Expression auf (Abb. 10A). Die IFN α Expression in der Probe 4 h ICAM siRNA 1:1000 liegt 500-fach höher als in der Kontrolle und ist damit, signifikant gegenüber fast allen anderen Proben, erhöht (Abb. 10A). Die IFN β -Expression ist in der 4 h ICAM siRNA 1:100 ebenfalls am höchsten und liegt etwa 50-fach höher als die unbehandelte Kontrolle (Abb. 10B). Die IFN γ -Expression ist in der 2 h SCR siRNA 1:1000 am höchsten und ist hier um mehr als 30-fach erhöht (Abb. 10C). Die IL-12 Expression ist ebenfalls bei der 2 h SCR siRNA 1:1000 am höchsten, jedoch ist die siRNA Menge hier nur doppelt so hoch wie in der Kontrolle. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Proben 2 h SCR siRNA 1:100 und 4 h ICAM siRNA 1:1000 den größten Einfluss auf die Expression der hier untersuchten Genexpression haben.

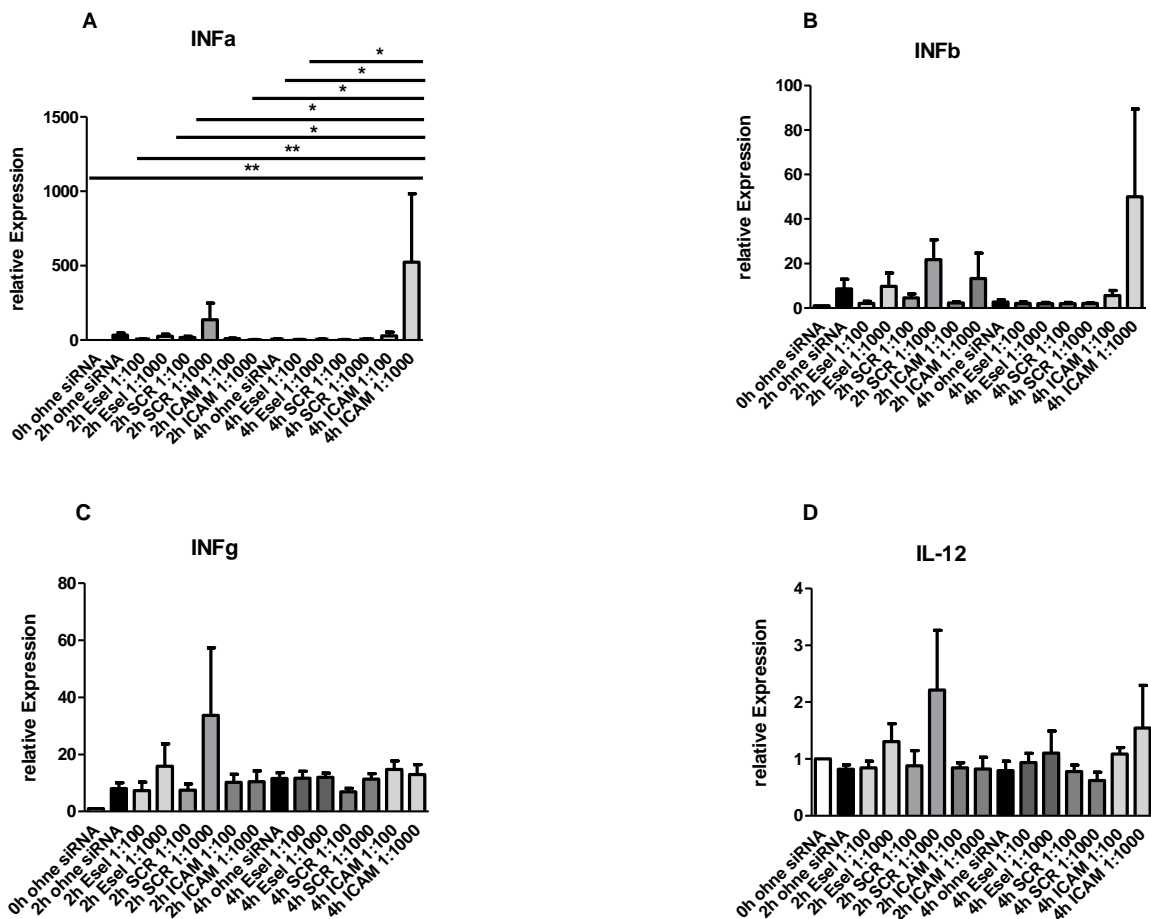


Abbildung 10: Genexpression der Entzündungsmarker IFN α , IFN β , IFN γ und IL-12 nach Inkubation von PBMCs mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen.

Die X-Achse zeigt die verschiedenen Proben, die Y-Achse die relative Genexpression. A: IFN α Genexpression, B: IFN β Genexpression, C: IFN γ Genexpression, D: IL-12 Genexpression. n=6, Mittelwert \pm SEM, (* = p < 0,05; ** = p < 0,01).

Die Genexpression von IL-1 β (Abb. 11A) ist nach 2 h ohne siRNA im Vergleich zur 0 h ohne siRNA (Abb. 11A) etwas erhöht. Die 2 h SCR siRNA 1:1000 (Abb. 11A) ist dagegen deutlich erhöht.

Die Relative Expression von IL-2 (Abb. 11B), IL-6 (Abb. 11C) und IL8 (Abb. 11D) ist nach 4 h ohne siRNA am höchsten und die Behandlung mit siRNA zeigt keine signifikante Steigerung. Die IL-8 Expression ist abermals durch die 2 h SCR siRNA 1:1000 am meisten erhöht worden.

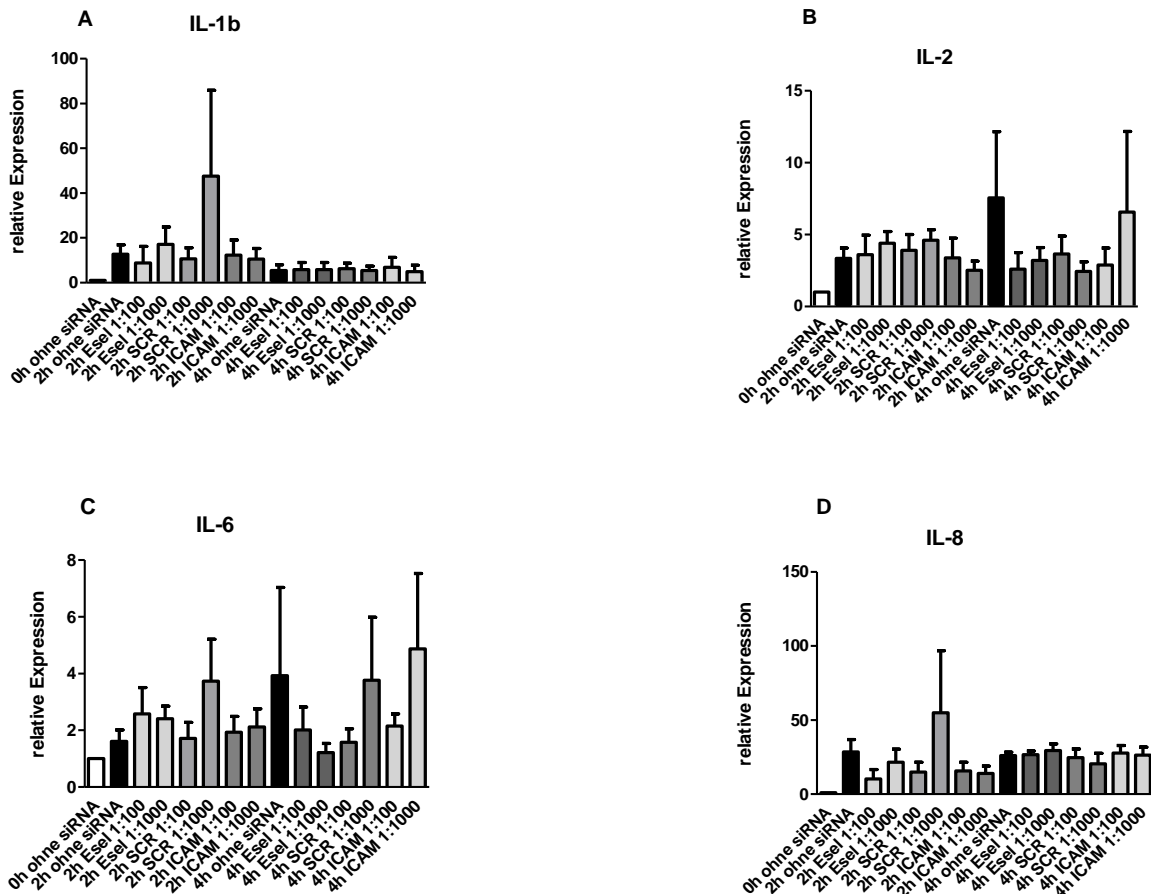


Abbildung 11: Genexpression der Entzündungsmarker IL-1 β , IL-2, IL-6 und IL-8 nach Inkubation von PBMCs mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen.

Die X-Achse zeigt die verschiedenen Proben, die Y-Achse die relative Genexpression. A: IL-1 β Genexpression, B: IL-2 Genexpression, C: IL-6 Genexpression, D: IL-8 Genexpression. n=6, Mittelwert \pm SEM, (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

Im Vergleich zur 0 h Kontrolle ohne Zugabe von siRNA ist die Genexpression von OAS (Abb. 12A) in allen folgenden Proben erniedrigt. Nur die 2 h SCR siRNA 1:1000 (Abb. 12A) zeigt erneut eine Hochregulation eines Interferonantwort-assoziierten Gens.

Die Genexpression von STAT ist bei 2 h SCR siRNA 1:1000 und bei 2 h ICAM siRNA 1:100 (Abb. 12B) im Vergleich zur 0h Kontrolle ohne Zugabe von siRNA leicht erhöht. Die TNF α -Expression scheint sich über den Behandlungszeitraum zu verringern (Abb. 12C). Auffälliger Weise ist die TNF α -Expression nach Behandlung mit SCR 1:1000 nach 2 Stunden in diesem Fall eine der niedrigsten im Vergleich zu den anderen Proben. Dies steht zunächst im Widerspruch zu den anderen Ergebnissen, wo die SCR 1:1000 oftmals die höchste Expression induziert.

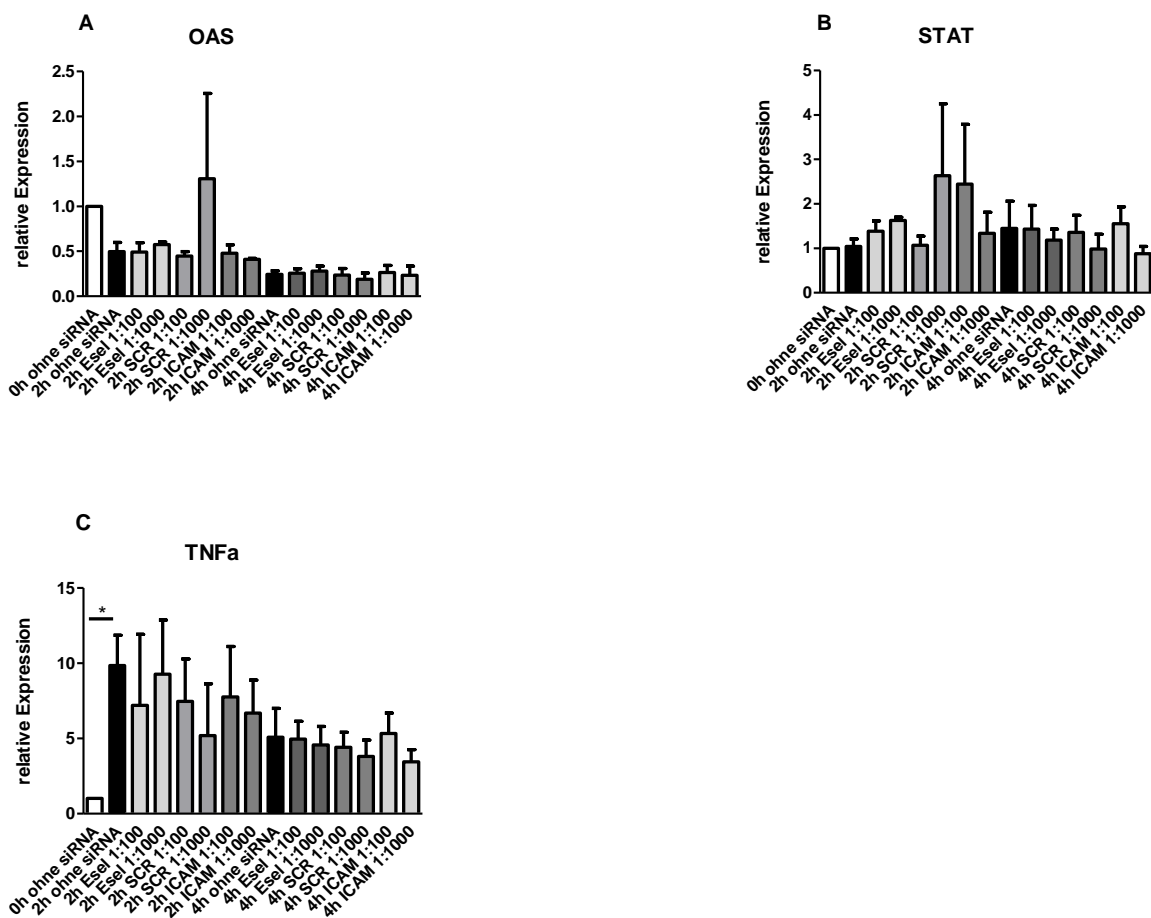


Abbildung 12: Genexpression der Entzündungsmarker OAS, STAT, TNF α nach Inkubation von PBMCs mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen.

Die X-Achse zeigt die verschiedenen Proben, die Y-Achse die relative Genexpression. A: OAS-Genexpression, B: STAT-Genexpression, C: TNF α Genexpression. n=6, Mittelwert \pm SEM, (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

3.3.2 Transfektion von PBMC's mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen

Für diesen Versuch wurden isolierte PBMC's aus menschlichem Vollblut mit siRNA in verschiedenen Konzentrationen (25 nM-entsprechend 0,8 µl siRNA und 100 nM-entsprechend 3,2 µl siRNA) hinzugefügt. Nach siRNA-Transfektion und folgender Inkubation von 2h, wurden die mRNAs isoliert und die relative Genexpression von verschiedenen Markern verfolgt.

Die Genexpression von B7-2 (Abb. 13A) ist im Vergleich zu beiden Kontrollen (Abb. 13A) nur bei SCR siRNA 25 (Abb. 13A) etwas erhöht. Dies Ergebnis zeichnete sich auch bei alleiniger Inkubation der SCR siRNA ohne Transfektion ab, siehe Abb. 9A. Die weiteren Proben haben in Abb. 13A eine kaum veränderte Genexpression. Die Genexpression von CXCL-7 wird durch alle transfizierten siRNAs erhöht (Abb. 13B).

Beim CXCL-8 (Abb. 13C) ist eine erhöhte Genexpression bei der Probe E-Selektin siRNA 100 nM zu sehen (Abb. 13C). Leicht verringert ist die Genexpression von CXCL-10 nach Transfektion mit 25 nM E-Selektin siRNA und ICAM-1 siRNA (Abb. 13D).

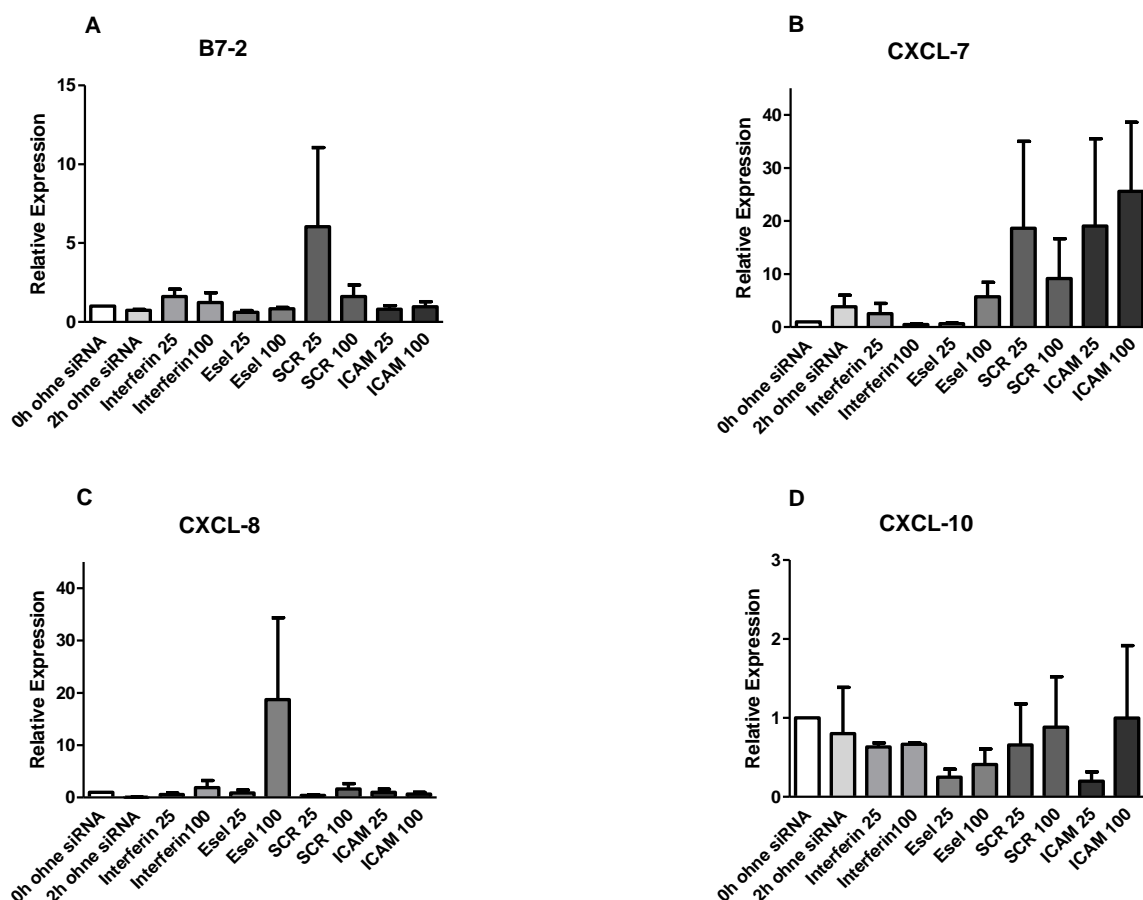


Abbildung 13: Genexpression der Entzündungsmarker B7-2, CXCL-7, CXCL-8 und CXCL-10 nach Transfektion von PBMCs mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen.

Die X-Achse zeigt die verschiedenen Proben, die Y-Achse die relative Genexpression. A: B7-2 Genexpression, B: CXCL-7 Genexpression, C: CXCL-8 Genexpression, D: CXCL-10 Genexpression. N=3, Mittelwert \pm SEM, (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

Erhöhte Konzentration von $\text{INF}\alpha$ (Abb. 14A) ist in allen Proben außer in der 2 h Kontrolle ohne Zugabe von siRNA, Interferin 100 und ICAM 25 siRNA im Vergleich zur 0h Kontrolle zu sehen. Die Genexpression von $\text{INF}\beta$ ist im Vergleich zur 2 h Kontrolle ohne Zugabe von siRNA in allen Ansätzen erhöht (Abb. 14B). Eine fast 50-fache Konzentrationserhöhung von $\text{INF}\gamma$ ist nach ICAM 100 siRNA Transfektion (Abb. 14C) zu beobachten. Fast unverändert ist die Genexpression von IL-12 (Abb. 14D).

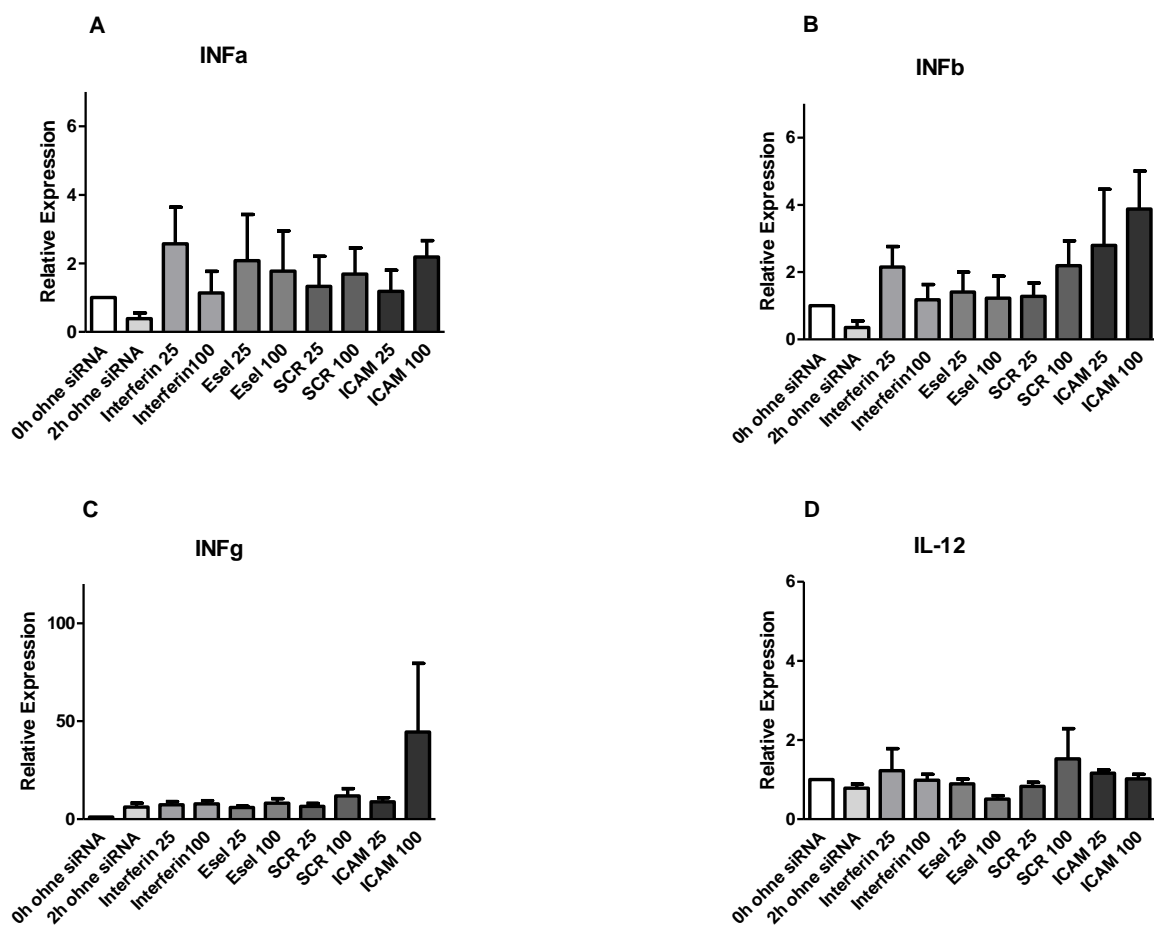


Abbildung 14: Genexpression der Entzündungsmarker $\text{INF}\alpha$, $\text{INF}\beta$, $\text{INF}\gamma$ und IL-12 nach Transfektion von PBMCs mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen und -Modifikationen.

Die X-Achse zeigt die verschiedenen Proben, die Y-Achse die relative Genexpression. A: $\text{INF}\alpha$ Genexpression, B: $\text{INF}\beta$ Genexpression, C: $\text{INF}\gamma$ Genexpression, D: IL-12 Genexpression. N=3, Mittelwert \pm SEM, (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

Nach einer Stunde Inkubation erhöht sich die relative Genexpression bei allen Proben des IL-1 β , IL-2, IL-6 und IL-8 (Abb. 15 A-D). Der IL-1 β zeigt abermals (siehe auch Abbildung 11A) eine signifikante Erhöhung in der SCR 25 siRNA verglichen mit der 0h Kontrolle (Abb. 15A). Es sind keine signifikanten Erhöhungen der IL-2 Expression nach Zugabe von siRNA (Abb. 15B) erkennbar. Des Weiteren erhöht sich die Konzentration der relativen Genexpression in allen Proben der IL-6 (Abb. 15C). Ein signifikanter Unterschied ist von ICAM 25 siRNA zur 0h Kontrolle ohne Zugabe von siRNA zu sehen (Abb. 15C). Ebenso ist ein signifikanter Anstieg der relativen Genexpression zur ICAM 100 siRNA verglichen mit 0h Kontrolle zu erkennen (Abb. 15D).

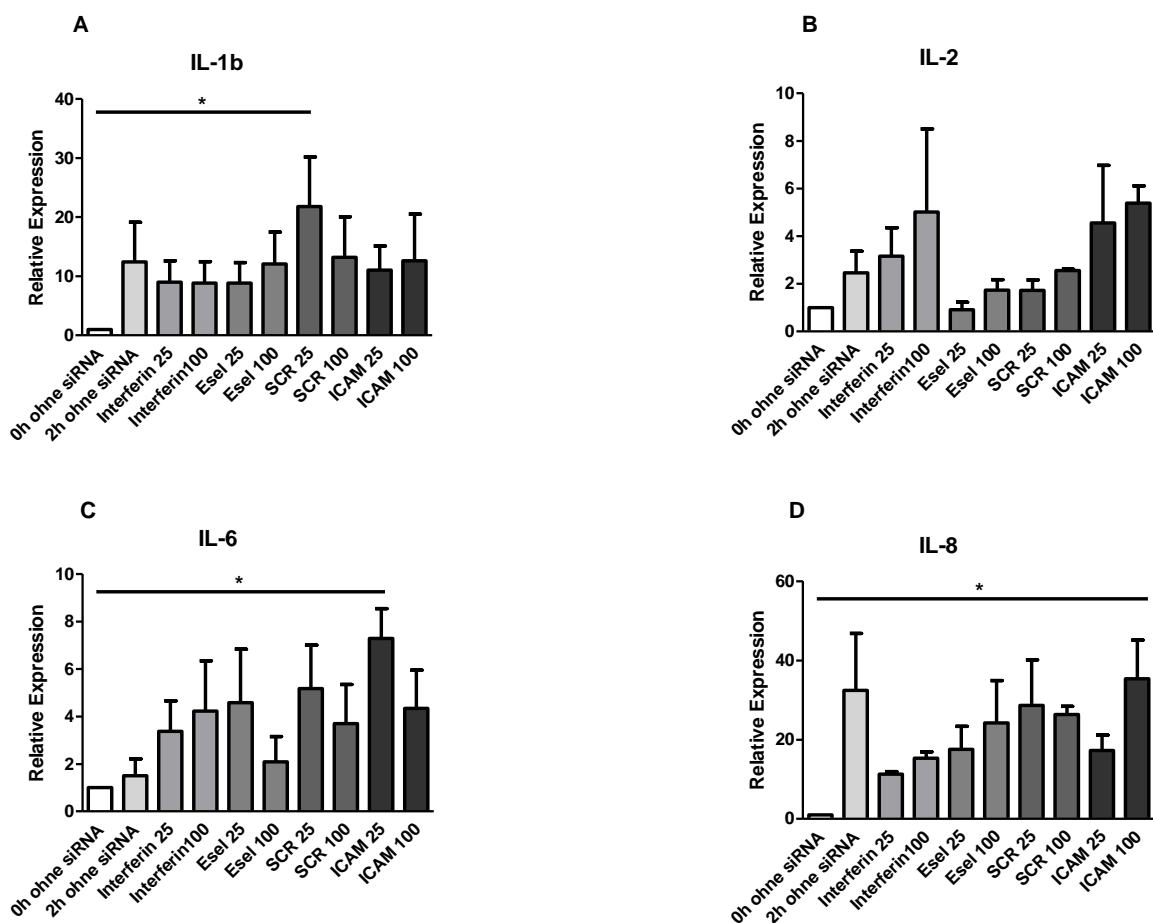


Abbildung 15: Genexpression der Entzündungsmarker IL-1 β , IL-2, IL-6 und IL-8 nach Transfektion von PBMCs mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen.

Die X-Achse zeigt die verschiedenen Proben, die Y-Achse die relative Genexpression. A: IL-1 β Genexpression, B: IL-2 Genexpression, C: IL-6 Genexpression, D: IL-8 Genexpression. N=3, Mittelwert \pm SEM, (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

Die relative Genexpression ist bei OAS etwas verringert im Vergleich zur 0h Kontrolle, doch fast unverändert im Vergleich zur 2h Inkubation ohne Zugabe von siRNA (Abb. 16A). Die ICAM 25 siRNA und ICAM 100 siRNA haben fast doppelt so hohe Genexpression im Vergleich zur 0h Kontrolle (Abb. 16B) bei der Auswertung der STAT-Expression. Die TNF α -Expression ist bereits nach 2 h Inkubation ohne siRNA Transfektion deutlich erhöht es erfolgt kein signifikant höher Anstieg nach siRNA Transfektion.

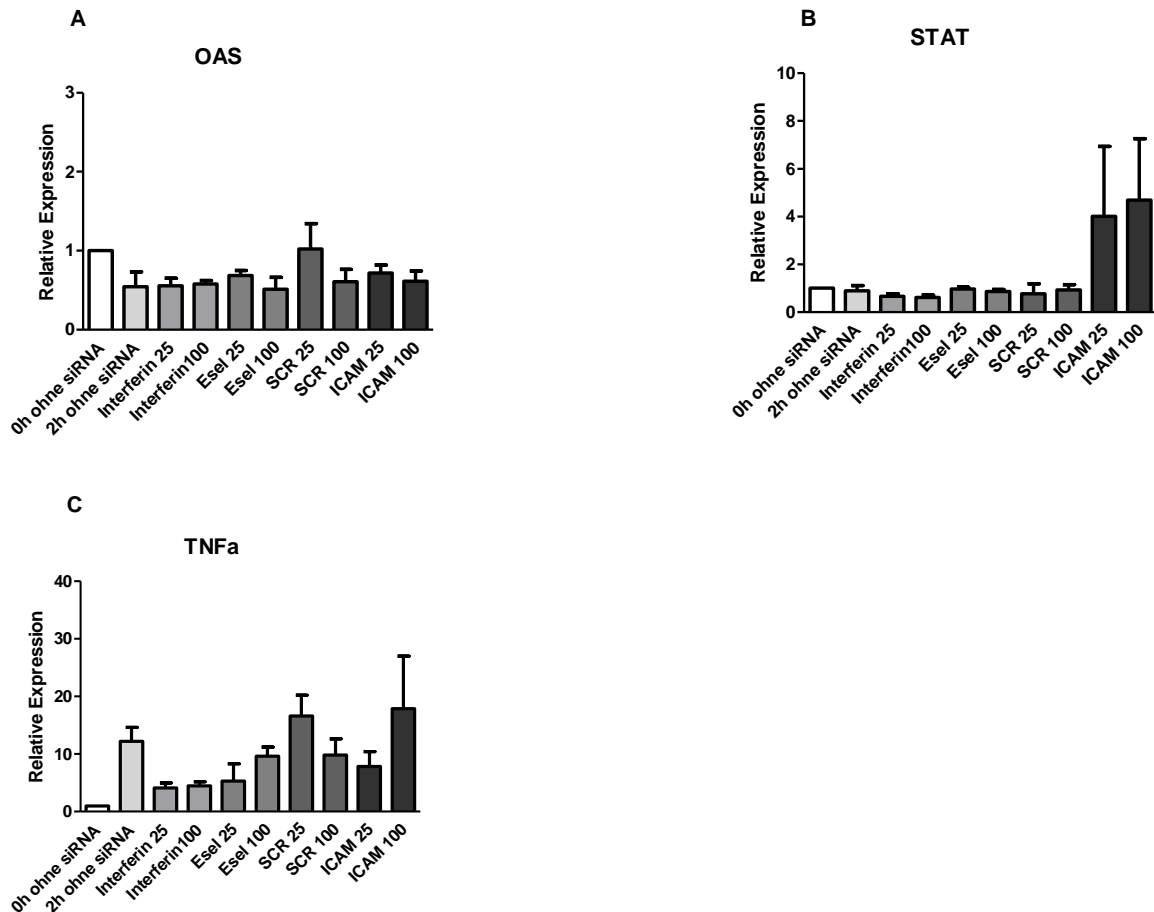


Abbildung 16: Genexpression der Entzündungsmarker OAS, STAT und TNF α nach Transfektion von PBMCs mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen.

Die X-Achse zeigt die verschiedenen Proben, die Y-Achse die relative Genexpression. A: OAS-Genexpression, B: STAT-Genexpression, C: TNF α Genexpression. N=3, Mittelwert \pm SEM, (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

3.3.3 Transfektion von Endothelzellen mit verschiedene siRNA-Konzentrationen

Für diesen Versuch wurden Endothelzellen verwendet, die zunächst angezchtet wurden. Nach Inkubation und Vermehrung wurde die entsprechende Zellzahl mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen (25 nM siRNA und 100 nM siRNA) inkubiert. Zur Untersuchung der Genexpression wurden die mRNA isoliert und die relative Genexpression verschiedener Marker verfolgt.

Die Genexpression des Membranproteins B7-2, der Chemokine CXCL-7, CXCL-8 und CXCL-10 ist im Vergleich zur 0h Kontrolle in den siRNA Ansätzen mit SCR-siRNA und ICAM siRNA leicht erhöht, weist allerdings keine statisch signifikanten Unterschiede auf (Abb. 17A-D). Die CXCL-1, CXCL-8 und CXCL-10 Expression weist keine nennenswerten Unterschiede zwischen der Kontrolle und den siRNA transfizierten Proben auf.

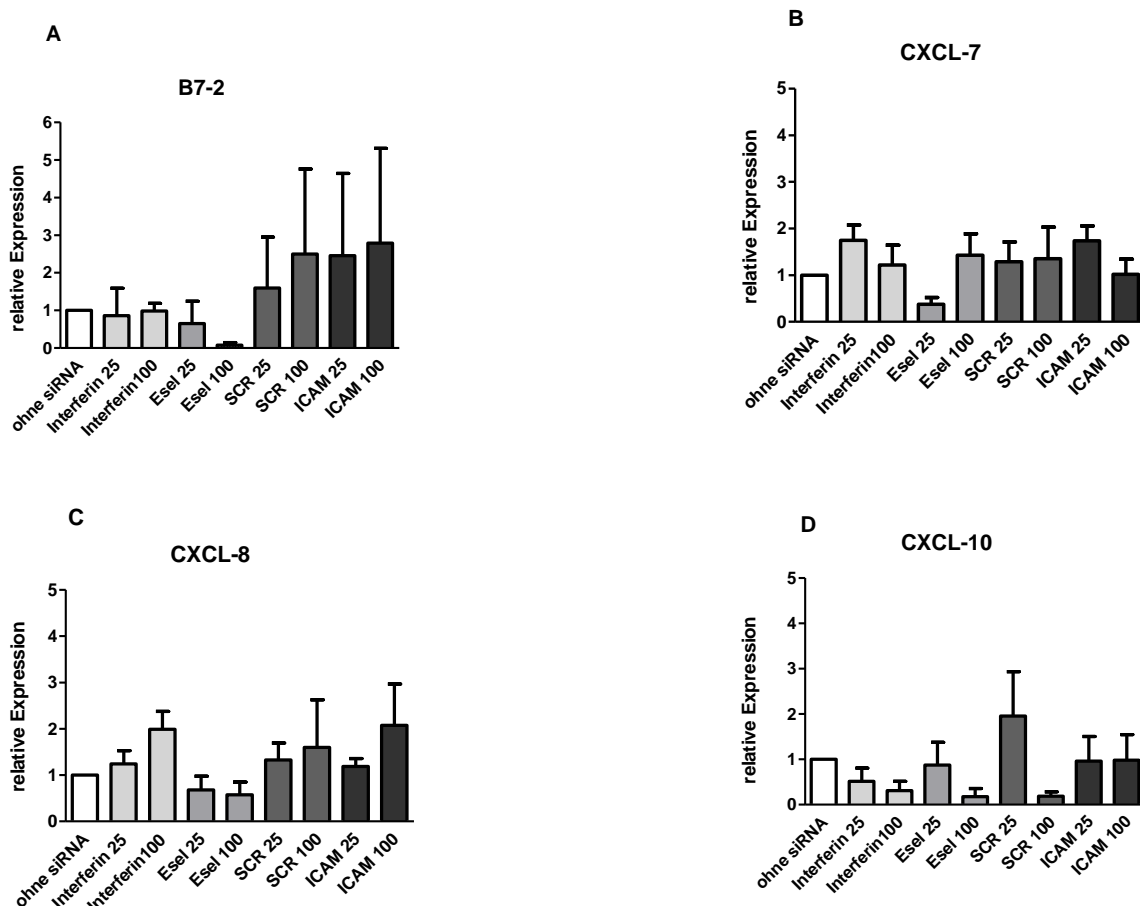


Abbildung 17: Genexpression der Entzündungsmarker B7-2, CXCL-7, CXCL-8 und CXCL-10 nach Transfektion von Endothelzellen mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen.

Die X-Achse zeigt die verschiedenen Proben, die Y-Achse die relative Genexpression. A: B7-2 Genexpression, B: CXCL-7 Genexpression, C: CXCL-8 Genexpression, D: CXCL-10 Genexpression. N=3, Mittelwert \pm SEM, (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

Sowohl bei $\text{INF}\alpha$ als auch bei $\text{INF}\beta$, $\text{INF}\gamma$ und IL-12 lässt sich kaum eine Veränderung der relativen Genexpression feststellen (Abb. 18A–D).

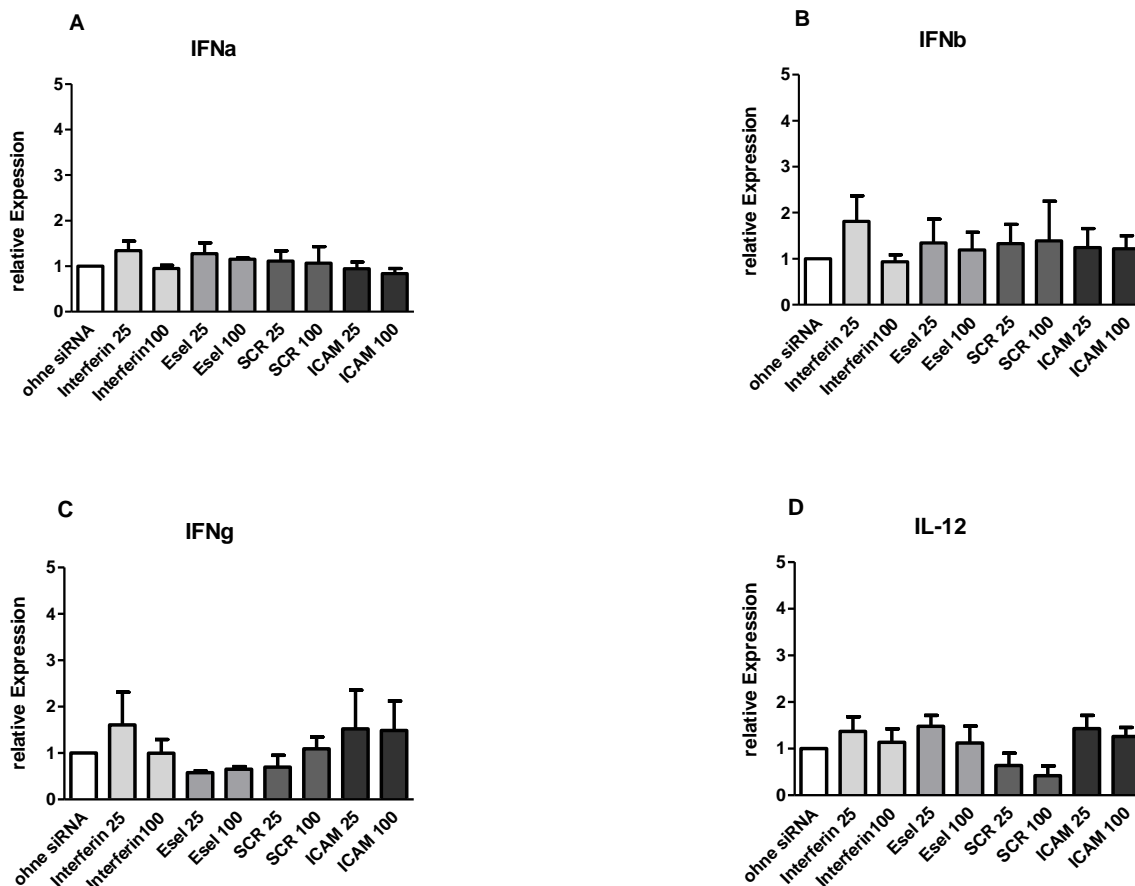


Abbildung 18: Genexpression der Entzündungsmarker $\text{INF}\alpha$, $\text{INF}\beta$, $\text{INF}\gamma$ und IL-12 nach Transfektion von Endothelzellen mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen.

Die X-Achse zeigt die verschiedenen Proben, die Y-Achse die relative Genexpression. A: $\text{INF}\alpha$ Genexpression, B: $\text{INF}\beta$ Genexpression, C: $\text{INF}\gamma$ Genexpression, D: IL-12 Genexpression. N=3, Mittelwert \pm SEM, (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

Eine nicht veränderte Genexpression ist bei IL-1 β festzustellen (Abb. 19A). Deutlich hat sich die IL-2 Expression durch die Transfektion mit ICAM siRNA und 100 nM SCR siRNA erhöht, verglichen mit 0 h Kontrolle, dennoch ist kein signifikanter Unterschied festzustellen (Abb. 19B). Ebenfalls eine kaum veränderte Konzentration trotz siRNA Transfektion ist bei IL-6 und IL-8 festzustellen (Abb. 19C-D).

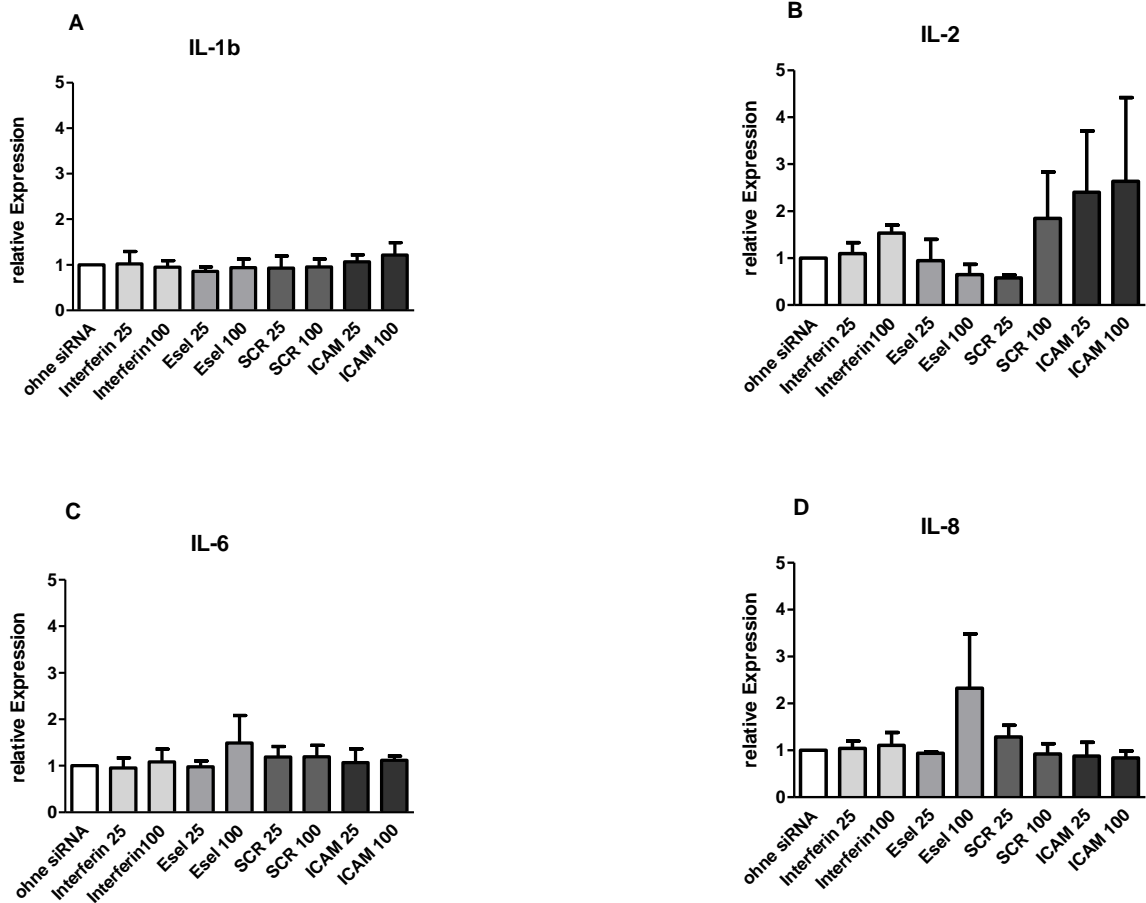


Abbildung 19: Genexpression der Entzündungsmarker IL-1 β , IL-2, IL-6 und IL-8 nach Transfektion von Endothelzellen mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen.

Die X-Achse zeigt die verschiedenen Proben, die Y-Achse die relative Genexpression. A: IL-1 β Genexpression, B: IL-2 Genexpression, C: IL-6 Genexpression, D: IL-8 Genexpression. N=3, Mittelwert \pm SEM, (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

Die relative Genexpression ist bei OAS fast gleich geblieben im Vergleich zur 0 h Kontrolle (Abb. 20A). Mit einer Ausnahme von SCR 25 siRNA ist die relative Genexpression kaum verändert im Vergleich zur 0h Kontrolle bei STAT (Abb. 20B). TNF α weist ebenfalls keine großen Unterschiede auf (Abb.20C).

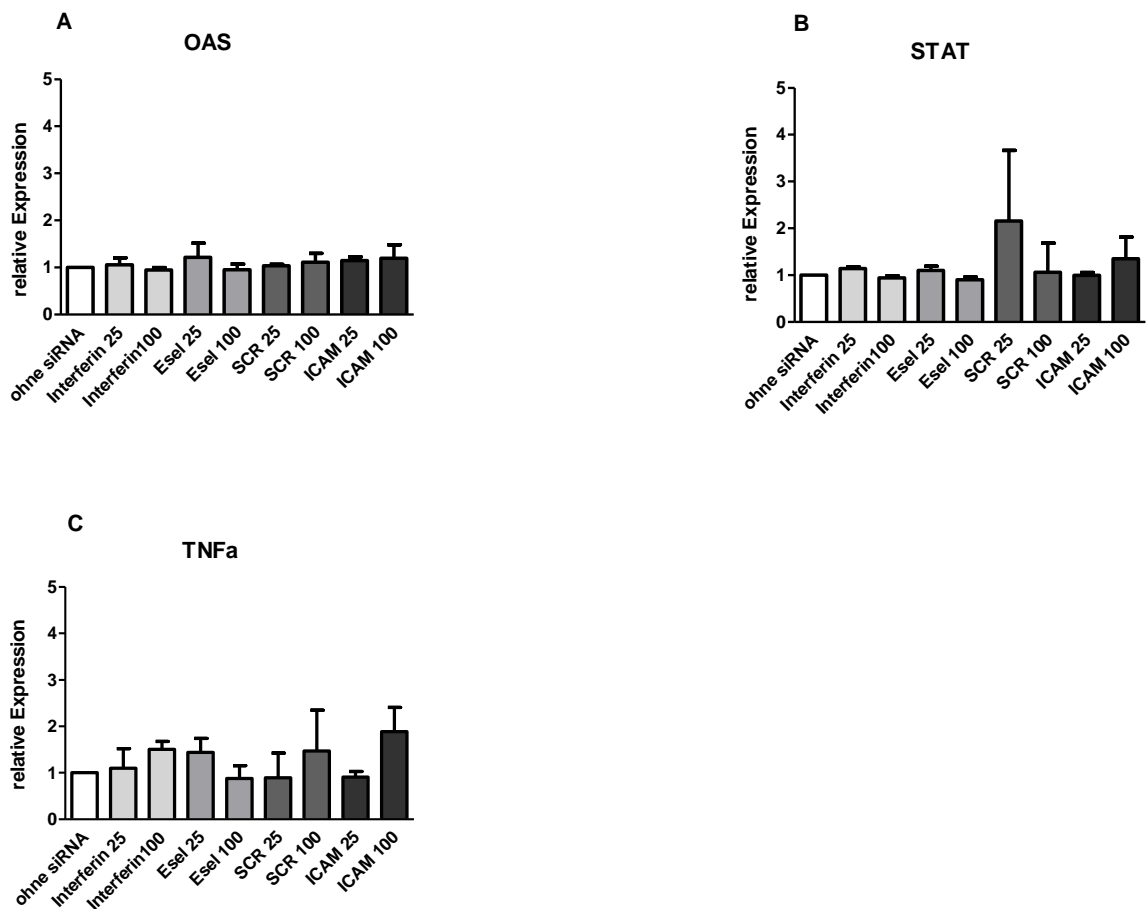


Abbildung 20: Genexpression der Entzündungsmarker OAS, STAT und TNF α nach Transfektion von Endothellzellen mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen.

Die X-Achse zeigt die verschiedenen Proben, die Y-Achse die relative Genexpression. A: OAS-Genexpression, B: STAT-Genexpression, C: TNF α Genexpression. N=3, Mittelwert \pm SEM, (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

4 Diskussion

Schon lange wird siRNA und Ihre Eigenschaft der Gen-Stummschaltung erforscht. Herzkreislauferkrankungen gehören zu den meisten Todeserkrankungen weltweit. Die therapeutische Anwendung, um myokardialen Infarkt zu behandeln sind Stents, die in einem Gefäß zur Wiederherstellung des Lumens in die Arterie eingebracht werden, um freie Blutzirkulation zu erreichen. Diese Stents sollen keine Entzündungen auf Dauer, bzw. eine Stent-Thrombose hervorrufen. Derzeit angewendete Stents sind die Medikamente-freisetzenden Stents (DES). Einer der am meisten angewendeten Stents ist der Xinsorb BRS (75). Durch die freisetzende Medikation, welche unter anderem Immunsuppressiva und antiproliferative Substanzen enthalten, wird gleichzeitig das Wachstum der Endothelzellen gehemmt. Dadurch wird der Genesungsprozess verlangsamt, weshalb die Patienten für mindestens ein Jahr nach einer DES-Applikation angewiesen sind zusätzlich antikoagulierende Medikamente einzunehmen bzw. eine doppelte Antikoagulation vorzunehmen. Bei Patienten, die von vorneherein einer Antikoagulantien-Therapie unterliegen und beispielweise durch Herzklappenersatz oder bei Vorhofflimmern auf eine Einnahme von Antikoagulantien angewiesen sind, sollte der Einsatz medikamentenbeschichteter Stents gut überlegt sein, da das Blutungsrisiko deutlich ansteigt. Dennoch ist eine erneute Stent-Thrombose oder andere Komplikation möglich.

Als neue Generation und Entwicklung von Gefäßimplantaten zur Behandlung von Atherosklerose haben sich die bioresorbierbaren Gefäßgerüste herausgebildet (76). So z.B. werden die poly-L-lactid-basierten Sirolimus-eluierenden, bioresorbierbaren Gefäßgerüste (BES) (MeRes-100) zur Behandlung von De-novo nativen Koronararterienläsionen in Indien getestet. In der ersten Studie wurden bei 108 Probanden mit De-novo-Koronararterienläsionen 116 Gerüste zum Einsatz gebracht. Die Koronarangiographie ergab nach 6 Monaten 0% binäre Stenosen (77). Bei einer zweijährigen Studie wurden die BES evaluiert und sowohl die klinischen als auch die bildgebenden Ergebnisse zeigten dabei eine gute Wirksamkeit bei Patienten mit De-novo-Koronararterienläsionen (78). In den randomisierten Einjahresdaten der ABSORB-II-Studie wurde gezeigt, dass die Everolimus-freisetzenden BES und die Everolimus-freisetzenden metallischen Stents vergleichbare Ergebnisse aufwiesen (79). Ziel der bioresorbierbaren Gerüste ist es, mit der Zeit das vollständige resorbieren der Stents und das Hinterlassen einer nahezu ursprünglichen Situation der Blutgefäße zu erreichen (80). Diese neuartige Technologie ist sehr interessant und vielversprechend, allerdings müssen Langzeitergebnisse der Studien dazu abgewartet werden. Grundsätzlich werden nach einer BES-Implantation zwei Prozesse beobachtet. Der erste Prozess wird „0-6 Monate“ genannt und ist gekennzeichnet durch eine Entzündung, eine Intima Hyperplasie und eine endotheliale Refunktionalisierung. Die zweite Phase - „nach 6 Monaten“ ist gekennzeichnet durch Gerüstabbau und positiven Gerüstumbau. Trotz der positiven Einflüsse und neuer Erkenntnisse gibt es weiterhin Einschränkungen und unerklärte Verschlechterungen

nach BES-Implantationen, deren weitere Erforschung abgewartet werden muss. Die Eigenschaften dieser Stents können durch verschiedene Medikamente oder pharmakologische Substanzen, die zusätzlich als Beschichtung aufgetragen sind, noch verbessert werden (76).

Die Wirkung von siRNA als mögliche Substanz, die zu einer Gen-Stummschaltung führt, ist sehr interessant und ermöglicht neuere Ausblicke in der Stent-Therapie. Die Funktion eines endogenen Gens kann unterbunden werden durch siRNA (81). Dies basiert auf einem einfachen Antisense-Mechanismus wobei die Hybridisierung von der eingebrachten siRNA und den endogenen Messenger-RNA-Transkripten abhängt (82). Dabei wird eine spezifische mRNA abgebaut und das Zielgen zum Schweigen gebracht. Das therapeutische Potenzial wurde auf mehreren Gebieten getestet. So setzt man großes Vertrauen darauf, auch die pathogenen Gene zum Schweigen zu bringen (83). Es gibt zwei Therapieansätze mit derzeit zwei zugelassenen Medikamenten auf siRNA Basis. Nach etwa 20 Jahren haben die United States Food and Drug Administration (FDA) und die Europäische Kommission (EC) im Jahr 2018 als erstes RNA-i basiertes Therapeutikum ONPATRO® (Patisiran, AL-TTR02) für die Behandlung von hereditärem amyloidogenem Transthyretin (hATTR) – Amyloidose mit Polyneuropathie bei Erwachsenen zugelassen (30, 31). Ein weiteres, zugelassenes, angewendetes Medikament seit 2019 ist das GIVLAARI™ (Givosiran, ALN-AS1) zur Behandlung der akuten hepatischen Porphyrie (AHP) (29-31). AHP ist eine Stoffwechselerkrankung, die die hepatische Häm-Biosynthese beeinträchtigt. Die Symptome stellen eine Porphyrie-Attacke dar und können lebensbedrohlich sein. Ein therapeutisches Ziel der dabei verwendeten siRNA ist die Normalisierung des ALAS1-Spiegels, der während einer Porphyrie-Attacke stark hoch reguliert ist. Dank Givosiran, das für Erwachsene und Jugendliche ab 12 Jahre zugelassen ist, wurde in einer klinischen Studie in allen drei Phasen die rasche und langanhaltende Reduktion von ALAS1-mRNA im Vergleich zu Placebo gezeigt (84).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Biokompatibilität sowohl von siRNAs als auch von unterschiedlichen Lipiden getestet. Ein Material welches biokompatibel ist, darf keine entzündliche Reaktionen hervorrufen, muss biologisch resorbierbar sein, die Blutverträglichkeit muss gewährleistet sein und es dürfen keine immunologischen Reaktionen folgen. Dies wurde zusätzlich anhand von inkubierten PBMCs sowie Transfektionen in Endothelzellen untersucht.

4.1 Hämokompatibilität der siRNA und Lipiden

Ein biokompatibler Werkstoff wird als solcher bezeichnet, wenn dieser im direkten Kontakt mit lebendem Gewebe keine negativen Einflüsse ausübt. Ebenso wenig darf der Stoffwechsel negativ beeinflusst werden. Das Labor der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie Tübingen orientiert sich bei seinen Untersuchungen der Hämokompatibilität an der ISO 10993-4. Es wurden charakteristische Marker des hämostatischen Systems analysiert wie:

- Trombozytenaktivierung
- Leukozytenaktivierung
- Kontaktphasensystem
- Endstrecke der Gerinnungskaskade
- Komplementsystem

Um die Auswirkungen der siRNA und der Lipide als Medizinprodukte zu testen, wurden diese mit menschlichem Vollblut für eine Stunde unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. Dabei wurde die Veränderung der Blutzellzahl zum Anfang und nach Inkubation gemessen. Eine Unverträglichkeit, müsste diese Zellzahl deutlich sinken lassen. Da dies nicht der Fall ist, ist eine gute Verträglichkeit nachzuvollziehen. Die Untersuchung von siRNA ergab sehr gute Ergebnisse. Allgemein sinken die Blutzellzahlen nach einer Stunde ohne siRNA. Ein signifikanter Unterschied nach einer Stunde Inkubation ergab nur die Leukozytenprobe ohne Zugabe von siRNA (Abb. 1A). Alle anderen Proben blieben fast unverändert und im Vergleich zur 1 h Kontrolle besser erhalten. Das zeigt die gute Verträglichkeit, bzw. der gute Einfluss der siRNA auf die Zellen.

Liposomen oder Lipide werden oft als Transfektionsreagenzien verwendet sowohl für die Versuche in vitro als auch in vivo. Dabei ist die Rolle der Lipide, die aus einer Phospholipiddoppelschicht bestehen, das Einkapseln von Nukleinsäuren. Dadurch wird die Vermittlung der therapeutischen siRNA durch Endozytose ermöglicht(85). Bei der Testung von unterschiedlichen Lipiden als Medizinprodukte zeigt sich bei den Leukozyten, Erythrozyten und Hämatokrit keine Veränderung der Blutzellzahl. Allerdings ist bei der Thrombozytenzellzahl eine signifikante Verringerung schon nach einer Stunde ohne Zugabe von Lipiden sichtbar. Die Zugabe von DOPE 1:100 bzw. DSPE-PEG 1:100 führt wiederum zu einer signifikanten Erhöhung der Thrombozytenzahl im Vergleich zur 1 h Kontrolle (Abb. 2D). Die Lipide DOPE und DSPE-PEG scheinen den negativen Effekt der einstündigen Blutinkubation zu eliminieren. Dies gelingt allerdings nur in der konzentrierten 1:100 Anwendung und nicht bei 1:1000. DOTAP zeigt keinen positiven Einfluss auf die Thrombozytenzahl, sondern in hoher Konzentration 1:100 sogar eine verringerte Zellzahl im Vergleich zur 1 h Kontrolle. Dadurch ist DOTAP ungeeignet für die Transfektion, da es schon bereits bei Inkubation signifikante Unterschiede zeigt und somit eine Unverträglichkeit aufweist.

Bei der Untersuchung auf verschiedene Marker der Hämokompatibilität zeigt sich vor allem der positive Effekt der siRNA nach Zugabe und einer Stunde Inkubation gegenüber der 1 h Kontrolle ohne siRNA. Ein signifikanter Unterschied ist zwischen der 0 h und 1 h Kontrolle ohne Zugabe von siRNA bei beta-TG zu sehen (Abb. 4A), was für die Thrombogenität spricht. Die verschiedenen siRNAs zeigen eine gute Wirkung auf den Marker der Hämokompatibilität beta-TG, da es keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollprobe gibt. Venöse Thrombosen treten bei hospitalisierten Patienten mit einer Häufigkeit von etwa 16-54% auf. Das Risiko ist zurückzuführen auf die vorliegende Erkrankung und ist besonders ausgeprägt bei Tumorerkrankungen, schwere Herzinsuffizienz, Myokardeninfarkt aber auch bei systemischen Erkrankungen wie Sepsis, als auch bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie Morbus Crohn, Colitis ulcerosa oder akutes Leberversagen (86). Der Marker der Thrombozytenaktivierung ist beta-TG. Dieser wird in den Blutplättchen gespeichert und nach Aktivierung in großen Mengen aus der Granula freigesetzt. Das wirkt auf die Fibroblasten chemotaktisch und die entstandenen Gewebeschäden werden repariert. Am wenigsten aktiviert ist dieses Geschehen bei den Proben E-Selektin siRNA in höherer Konzentration und ICAM siRNA in niedrigerer Konzentration (Abb. 4A). Dies zeigt die gute Wirkung von E-Selektin siRNA auf die Zellen. Das Intrazelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 spielt auch bei einer Entzündung der Atemwege und beim Tumorwachstum eine wichtige Rolle. Dieses wird vermehrt exprimiert (87). Gerade für die Transmigration von Leukozyten aus den Blutgefäßen ist ICAM-1 sehr wichtig. Seine Expression wird durch verschiedene proinflammatorische Zytokine erhöht. Die Autoimmunerkrankungen und deren Fortschreiten werden ebenfalls in Verbindung einer erhöhten Expression von ICAM-1 gebracht. ICAM-1 befindet sich nicht nur auf der Oberfläche der Endothelzellen, sondern auch auf den glatten Muskelzellen (12). E-Selektin ist ebenfalls ein Zelladhäsionsmolekül der Endothelzellen und wird bei deren Dysfunktion vermehrt exprimiert (88). Ebenfalls ist bei Brust-, Lungen- und Prostatakrebs in tumorassoziierten Blutgefäßen eine erhöhte Expression festzustellen (89-91).

Positives Geschehen ist auch zu beobachten bei C3a (Abb. 3B). Die Aktivierung des Komplementsystems ist bereits nach einer Stunde Inkubation ohne siRNA festzustellen. Nach Zugabe von siRNA ist die Konzentration der beiden Komplementfaktoren sogar etwas niedriger im Vergleich zur 1 h Kontrolle. Gerade in beiden höheren Konzentrationen wirken sowohl E-Selektin siRNA als auch ICAM siRNA etwas beruhigend (Abb. 3B). Da diese beiden siRNAs antiinflammatorisch wirken, könnte dies der Grund für das Auftreten dieses Effektes sein. E-Selektin ist ein Zelladhäsionsmolekül. Dieses wird von den Endothelzellen exprimiert und durch verschiedene Zytokine aktiviert. Da es sich um ein Selektin handelt, ist es besonders ausschlaggebend bei Entzündungsprozessen.

Eine geringere Expression im Vergleich zu einer Stunde Inkubation ohne siRNA ist auch bei SC5B/9 zu beobachten (Abb. 3A). Das Komplementsystem spielt eine entscheidende Rolle sowohl für das angeborene als auch für das adaptive Immunsystem, da es die Funktion von Antikörpern und Fresszellen verstärkt (92). Ein

Mangel an Komplementkomponenten ist mit einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen verbunden. Es ist festgestellt worden, dass auch die Autoimmunerkrankungen im Zuge dessen zunehmen. Zusätzlich erscheint es paradox, da sowohl ein Mangel als auch die Aktivierung des Komplementsystems zur Auslösung von Autoimmunkrankheiten beiträgt(93). Die Komplementaktivierung kann über drei Wege erfolgen; den klassischen, den alternativen und den Lektinweg. Alle diese Wege führen zum Schluss in einen gemeinsamen Endweg. Zunächst wird durch Ihre Aktivierung die Freisetzung einer Reihe biologisch aktiver Moleküle gesteuert (94).

Das Komplementsystem besteht aus etwa 20 Serumproteinen, welche im Serum in ihrer inaktiven Form vorliegen. Wird durch einen Reiz das System in Gang gebracht erfolgen wie in einer Kaskade nacheinander geschaltete Mechanismen. Es sind drei Ergebnisse bekannt die entweder die Lyse der Zielzelle vorprogrammieren, Entzündungszellen anlocken, oder die Zielzelle wird opsoniert. Auf dem klassischen Weg der Komplementaktivierung sind die Komplementfaktoren C1, C4, C2 und C3 beteiligt. C3 stellt das Endprodukt dar. Dabei spaltet sich C3 in kleinere C3a und größere C3b Fragmente. C3a wird als ein Anaphylotoxin bezeichnet. Dieses bewirkt, dass Histamin aus den Mastzellen zur Freisetzung kommt (95).

Bei der Untersuchung der Marker zur Hämokompatibilität von Lipiden zeigt sich die Aktivierung des Komplementsystems bereits nach 1 h Inkubation ohne Zugabe von Lipiden. Nach Zugabe von Lipiden steigt die Konzentration der beiden Komplementfaktoren SC5B/9 und C3a deutlich weiter an (Abb. 6A und 6B).

Die TAT-Expression (Abb. 7B) ist bei DOTAP sowohl in niedriger als auch in höherer Konzentration deutlich erhöht. Dies macht DOTAP ungeeignet für die Transfektion, da die Thrombozyten gegelottet sind. Allgemein ist zu beobachten, dass die Lipide in geringerer Konzentration weniger Proteinexpression hervorrufen und somit besser geeignet sind als in höherer Konzentration. Deren Einsatz erfordern weitere Untersuchungen.

Bereits eine Stunde nach Inkubation ist eine signifikante Erhöhung der Proteinexpression der Granulozytenaktivierungs-Marker PMN-Elastase (Abb. 8A) sichtbar. Dies scheint sich zu beruhigen durch die Zugabe von Lipiden in eher niedrigerer Konzentration.

Bei der Verwendung von siRNA als Therapeutikum, soll diese einkapsuliert in das Zellinnere gebracht werden. Wenn die Möglichkeit zur Abgabe nicht vorhanden ist und der Inhalt nicht in die Zielzelle gebracht werden kann, hat dies keinen Nutzen. Das große Hindernis für die siRNA-Therapie ist die Abgabe in vivo über eine gewisse Zeit (21, 96, 97). In der vorliegenden Arbeit konnten die Lipide als Transfektionspartner nicht überzeugen, was die Suche nach einer möglichen biokompatiblen Transfektionsreagenz weiter notwendig macht.

4.2 Genexpression sowohl nach Inkubation als auch nach Transfektion von PBMC`s mit unterschiedlichen siRNA-Konzentrationen und Genexpression nach Transfektion der Endothelzellen mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen

Die PBMCs sind einkernige Zellen des peripheren Blutes. Zu diesen zählen Lymphozyten und Monozyten, die eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung von Infektionen haben. PBMCs werden mittels verschiedener Prozesse gewonnen, die aufeinander folgen, mit anschließender Zentrifugation des Blutes. Durch Ihre Inkubation und Transfektion können erstmalige Reaktionen des Immunsystems beobachtet und Vorkenntnisse gewonnen werden.

Endothelzellen sind ein wesentlicher Verbindungsfaktor zwischen dem Gefäßsystem und dem Immunsystem. Sie nehmen an der Angiogenese und Hämostase teil (48). Die Endothelzellen kleiden die innere Schicht der Blutgefäße aus und kommen somit als erstes in Berührung mit Blut und medikamentösen Substanzen. Gleichzeitig erhalten sie den Blutgefäßtonus und sorgen für den Transport der Blutzellen bei der Aufrechterhaltung der physiologischen Prozesse einschließlich der angeborenen und adaptiven Immunantwort (98, 99). Das Endothel ist bei allen peripheren Gefäßerkrankungen, Herzerkrankungen, Atherosklerose, Diabetes, Schlaganfall, chronischem Nierenversagen, Tumorwachstum, Metastasierung, Venenthrombose und schweren viralen Infektionen beteiligt und eine Schädigung des Endothels hat gravierende Folgen (100). Deshalb ist es wichtig dieses als zentrale Komponente zu sehen und seine Entwicklung und Aufrechterhaltung zu gewährleisten.

Die relative Genexpression verschiedener Entzündungsmediatoren wurde in der vorliegenden Arbeit verfolgt und ausgewertet.

Das Oberflächenprotein B7-2 dient als Kostimulator zum Aktivieren von T-Zellen während einer Immunantwort (101). Das bedeutet, man braucht einen zweiten Rezeptor, um eine adaptive Immunantwort auszulösen. Die T-Zell- und B-Zell-Lymphozyten sind Träger der adaptiven Immunantwort. Durch Ihre Differenzierung kommt es zu einem Immungedächtnis, was bei erneutem Kontakt mit diesem Antigen zu einer raschen Immunantwort kommt. In Abb. 9A ist zu sehen, dass die Genexpression von B7-2 bei den Proben 2 h SCR siRNA 1:1000 und 4 h ICAM 1:1000 am höchsten ist. Dies ist ungewöhnlich, denn normalerweise wäre ein Anstieg der B7-2 eher bei den hohen Konzentrationen zu erwarten. Eventuell basiert diese Erkenntnis auf einem Messfehler. In den anderen Proben mit siRNA ist fast dieselbe Expression zu beobachten wie bei der 0 h Probe ohne siRNA, was den positiven Effekt visualisiert. Die Genexpression bei den transfizierten PBMC`s von B7-2 ist generell nicht erhöht, außer bei der SCR siRNA 25 (Abb. 13A), allerdings nicht signifikant. Leicht erhöht sind auch die Werte bei der Transfektion der Endothelzellen (Abb. 17A) aber nicht bei den Proben mit E-Selektin. Es sind keine signifikanten Werte abzulesen.

Bei der Chemokine CXCL-7, CXCL-8 und CXCL-10 sind die relativen Genexpressionen nicht signifikant erhöht (Abb. 9B, 9C, 9D), (Abb. 13B, 13B, 13C) und (Abb. 17B, 17C, 17D). CXCL-7 und CXCL-10 sind Proteine aus der Gruppe der Chemokine und sind beteiligt an der Immunantwort. Diese dienen als zelluläre Warnsignale. CXCL-8 oder IL-8 ist ein körpereigener Botenstoff und wird vor allem in Endothelzellen, Fibroblasten und Monozyten gebildet. CXCL-8 ist ein primäres Zytokin, das für die Wanderung von Neutrophilen an den Infektions- oder Schädigungsort zuständig ist. Dieser Prozess wird als Chemotaxis bezeichnet. Gerade die Expression von Zelladhäsionsmolekülen ist entscheidend um die rasche Affinität zu gewährleisten, damit sich die Neutrophilen am Endothel befestigen (102). Dazu sind allgemein keine signifikanten Werte ablesbar.

Die Sekretion von CXCL-10 hängt von $\text{INF}\gamma$ ab, was seinerseits durch die IL-12-Zytokinfamilie vermittelt wird. Unter dem Einfluss von $\text{INF}\gamma$ wird CXCL-10 von mehreren Zelltypen wie Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten und Thyrozyten sezerniert. In Geweben können bereits rekrutierte Lymphozyten für eine verstärkte $\text{INF}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ Produktion verantwortlich sein, die wiederum die Sekretion von CXCL-10 verstärken.

Gerade bei vielen Immunerkrankungen ist CXCL-10 verstärkt stimuliert. In vielen Studien ist es ein neuartiges therapeutisches Ziel, dies zu verhindern (103). Die Genexpression von $\text{INF}\gamma$ ist während der Inkubation der PBMCs nicht wirklich verändert (Abb. 10C). Die Genexpression wiederum bei der Transfektion der PBMCs ist in der niederdosierten ICAM siRNA Probe (Abb. 14C) um ca. 30% angestiegen. Bei der Transfektion der Endothelzellen hält sich die relative Expression sowohl bei $\text{INF}\alpha$, $\text{INF}\beta$, $\text{INF}\gamma$ und IL-12 fast konstant im Vergleich zur Probe ohne siRNA (Abb. 18A-D).

Interleukin-1 β (IL-1 β) ist ein Zytokin, das zur Gruppe der Entzündungsmediatoren zählt und es wird hauptsächlich von den Blutmonozyten produziert. Wenige Nanogramm sind ausreichend um einen Anstieg der neutrophilen Granulozyten, Thrombozyten, sowie akute Phasenproteine zu erwirken. Dabei steigt auch das IL-6 (104).

Interleukin-2 (IL-2) ist ein Peptidhormon. Dieses ist ein T-Zell-Wachstumsfaktor, der sowohl die Proliferation der T-Zellen als auch die Bindung von Effektor und Gedächtniszellen unterstützt. Auf dieser Grundlage besteht auch die therapeutische Anwendung von IL-2 um die Immunantwort bei Krebspatienten zu verstärken (105). Erhöhte Werte von IL-2 sind vor allem sowohl bei Inkubation als auch bei Transfektion der PBMCs, als auch bei der Transfektion der Endothelzellen vorhanden.

Interleukin-6 (IL-6) ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches die Entzündungsreaktion im Körper reguliert. Unter anderem ist es ein B-Zell-stimulierender Faktor. Vor allem wird es sofort und dauerhaft produziert als Reaktion auf Infektionen und Gewebeverletzungen. Die Expression von IL-6 wird durch transkriptionelle und posttranskriptionelle Mechanismen kontrolliert, allerdings wird eine pathologische Wirkung auf chronische Entzündungen und Autoimmunität beobachtet, sobald eine erhöhte dysregulierte Synthese festgestellt wird. Es existiert

bereits ein humanisierter Anti-IL-6-Rezeptor-Antikörper (Tocilizumab). Verschiedene klinische Studien haben die Wirksamkeit von Tocilizumab gezeigt, welches zugelassen wurde für die Behandlung von rheumatoider Arthritis, sowie juveniler idiopathischer Arthritis (106). Die neuesten Erkenntnisse stellen klar, dass eine gezielte therapeutische Strategie gegen das IL-6 ein breites Spektrum für Verhinderung vieler chronisch entzündlicher Erkrankungen darstellt (107). Erhöhte Werte der relativen Expression von IL-6 ist nach zweistündiger Inkubation am höchsten in der Probe SCR 1:1000 zu sehen (Abb. 11C). Nach vierstündiger Inkubation ist die relative Genexpression von SCR 1:1000 gleich wie bei der 4 h Probe ohne siRNA. Während der zweistündigen Transfektion von PBMCs ist ein signifikanter Unterschied der relativen Genexpression von IL-6 in der niedrigen ICAM-Probe erkennbar (Abb. 15C).

Interleukin-8 (IL-8) ist ein angiogenes CXC-Chemokin, das von einer Vielzahl von Zelltypen produziert wird. Obwohl IL-8 ursprünglich als Chemokin für Neutrophile beschrieben wurde, ist es als starker angiogener Faktor bekannt geworden, der an normalen physiologischen Prozessen wie der Wundheilung und anormalen Prozessen wie der Krebsmetastasierung beteiligt ist. IL-8 wird von zahlreichen soliden Tumortypen und assoziierten Entzündungszellen sekretiert, und es wurde gezeigt, dass es über parakrine und autokrine Wege eine starke angiogene Wirkung bei der Tumorentstehung ausübt und als solche eine gültige Möglichkeit für eine Intervention bei der Krebsmetastasierung darstellt (67). In vivo ruft IL-8 eine massive neutrophile Ansammlung an der Infektionsstelle hervor. IL-8 und andere verwandte Zytokine werden in mehreren Geweben nach Infektion, Entzündung, Ischämie, Trauma produziert und gelten als Hauptursache für die lokale Ansammlung von Neutrophilen (108). Eine Signifikanz von IL-8 ist bei der Probe ICAM in niedriger Konzentration während der Transfektion der PBMCs festzustellen (Abb. 15D).

Interleukin-12 (IL-12) ist bekannt als zentrales, entzündungsförderndes Typ-1-Zytokin das seit langem als potenzielle Immuntherapie bei der Krebsforschung eingesetzt wird. Frühere klinische Versuche die Mitte der 1990er Jahre durchgeführt wurden zeigten dosisbegrenzende Toxizität (109). Bei der Transfektion der PBMCs ist eine niedrigere Genexpression in der höheren Konzentration der Probe E-Selektin im Vergleich zur 0 h Kontrolle ohne siRNA zu sehen (Abb. 14D). Eine kaum veränderte Genexpression ist auch bei den Endothelzellen zu sehen (Abb. 18D). Eine leicht erhöhte Genexpression bei der Inkubation der PBMCs ist den Proben 2 h SCR 1:1000 und 4 h ICAM 1:1000 im Vergleich zur 0 h Kontrolle ohne siRNA sichtbar (Abb. 10D).

STAT sind Signalwandler- und Transkriptionsaktivator-Proteine, die Informationen von den Rezeptoren der Zellwand ins Zellinnere an den Zellkern transportieren und die Transkription bestimmter Proteine aktivieren. Diese stellen ein neues therapeutisches Ziel für die Behandlung von Krebs dar (110). Eine erhöhte Genexpression ohne signifikante Unterschiede ist sowohl bei der Inkubation als auch bei der Transfektion der PBMCs zu sehen (Abb. 12B, 16B).

Bei der OAS-Enzymfamilie handelt es sich um Proteine, die Interferon induzieren und den sekundären Botenstoff 2'-5' gebundenes Oligoadenosin (2-5A) als eine Reaktion

wie bei einer Virusinfektion synthetisieren. Danach folgt die Induktion des RNA-Zerfalls innerhalb der infizierten Zellen, wodurch eine weitere Virusreplikation verhindert wird. Somit wirkt OAS antiviral (111). OAS hat eine hohe mRNA- Expression bei Brustkrebspatienten und kann als neuartiger, prognostischer Biomarker bei Brustkrebspatienten verwendet werden. OAS ist an einer Vielzahl von Krankheiten beteiligt, unter anderem bei Infektionen, Autoimmunerkrankungen und Krebs (112). In der vorliegenden Arbeit zeigt sich keine erhöhte Genexpression während Inkubation und Transfektion sowohl bei PMBC's als auch bei der Transfektion von Endothelzellen.

Generell gelten Entzündungen als Ursache für ein erhöhtes Krebsrisiko. TNF α ist ein wichtiger entzündungsfördernder Mediator bei Krebsprogression und Metastasierung. Andererseits spielt er eine zentrale Rolle bei der Förderung des angeborenen und adaptiven Immunsystems (113). Sowohl bei der Transfektion als auch bei der Inkubation der PBMCs und Endothelzellen sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen (Abb.12D, 16D und 20D). Gerade bei chronisch immunvermittelnden Hauterkrankung wie z.B. Psoriasis spielt TNF α eine große Rolle beim Fortschreiten dieses Krankheitsbildes. Die Blockade von TNF α kann sehr vorteilhaft sein (114).

4.3 Ausblick

Wichtiger Therapieansatz für die angewendeten Stents ist der langfristige Erfolg und keine erneute Stenose. Ziel soll es sein, Stents zu entwickeln, die unabhängig von Material und Beschaffenheit, eine Beschichtung haben, die siRNA in gleichbleibender Dosis über einen bestimmten Zeitraum abgeben. Dieser Stent muss flexibel und ebenfalls biokompatibel sein. Die Beschichtung soll die Abgabe von siRNA ermöglichen, die die Expression von ICAM-1 und E-Selektin gering halten.

Bereits in einer vorläufigen in vitro Studie in unserer Arbeitsgruppe konnte die lokale Genstumschaltung und die Herunterregulierung von E-Selektin gezeigt werden (115). siRNA basierte Therapeutika weisen eine nützliche molekulare Spezifität auf (36). In anderen Studien wird die siRNA für die Genstumschaltung der Progression des Bauchspeicheldrüsenkrebses genutzt (116). Die Entwicklung von siRNA als Therapeutikum ist hoch potenziell und in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass das Tumorwachstum bei malignem pleuralem Mesotheliom gehemmt wurde und siRNA ein erfolgreiches Therapeutikum gegen Lungenkrebs ist (117). Dieser Fortschritt geht weiter, indem siRNA in der Lunge als Inhalationstherapeutikum, mittels eines miniaturisierbaren akustomikrofluidischen Vernebelungsgeräts angewendet wird. Dabei wurde die siRNA vernebelt und die erfolgreiche Gen-Stumschaltung vermessen (118). Entzündungsmediatoren sind wichtige Werkzeuge in der Betrachtung jeder einzelnen Erkrankung. Wenn Ihre Wirkung und erhöhte Expression gesteuert werden kann, dann können viele Auswirkungen zu weiteren negativen Folgen der Erkrankung, sowie eine gesteuerte und schnellere Genese, erfolgreich überstanden werden. Eine verlangsamte Atherogenese wird unter anderem an Risikofaktoren verknüpft, die mit Atherosklerose und Ihre Komplikationen eine Rolle spielen. IL-1b ist ein Zytokin das gleichermaßen von den Intimagefäßwandzellen und aber auch von den läsionalen Leukozyten produziert wird. Eine Beeinträchtigung der IL-1b können die kardiovaskulären Ergebnisse verbessern und eine personalisierte Therapieoption anzusteuern (119).

Mehrere Studien zeigen, dass Toll-like-Rezeptoren und das angeborene Immunsystem eine entscheidende Rolle für die Auslösung und Entwicklung von Herz-Kreislaufferkrankungen spielen. Eine gezielte Bekämpfung von TLRs und des angeborenen Immunsystems könnte ein neues therapeutisches Ziel für diese Erkrankung sein. Es gibt klinische Studien für TLR-Inhibitoren für entzündliche Erkrankungen wie Astma, Krebs und Autoimmunerkrankungen. Diese sind aber noch nicht langzeiterforscht und befinden sich noch im Anfangsstadium (120).

5 Zusammenfassung

Die vorliegenden Ergebnisse stellen die Basis für weitere Versuche zur Verminderung der Expression sowohl von ICAM siRNA als auch für E-Selektin siRNA in den Endothelzellen der Herzkranzgefäße, einer bestehenden Atherosklerose und vor allem während und nach einer Stentapplikation.

Die geringe Genexpression begünstigt die Einheilphase und vermindert die Restenose. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die ICAM siRNA und E-Selektin siRNA biokompatibel sind und keine toxischen, bzw. thrombogenen Auswirkungen auf das umliegende Gewebe zeigen. Sowohl in PBMCs als auch in Endothelzellen ist keine übermäßige Aktivierung des Immunsystems nachweisbar, was eine gute Biokompatibilität beweist.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die verwendeten siRNA hämo- und zytokompatibel sind. Bei Kontakt mit Vollblut sind günstige Ergebnisse entstanden, welche keine Aktivierung des Komplementsystems nach sich gezogen haben. Ebenfalls sind keine thrombogenen Reaktionen entstanden.

In der vorliegenden Arbeit sind auch unterschiedliche Lipide in drei verschiedenen Konzentrationen untersucht worden. Diese sind in den meisten Ergebnissen positiv aufgefallen, allerdings können diese nicht in vivo weiter verabreicht werden. Es werden weitere Untersuchungen diesbezüglich notwendig sein.

Die vorliegenden Ergebnisse stellen einen innovativen Einsatz der siRNA dar, die biokompatibel und nicht thrombogen sind und dabei das Immunsystem nicht aktivieren. Dies kann in Zusammenhang mit einer möglichen Beschichtung zum erfolgreichen Therapieeinsatz bei der Verwendung von Stents, zudem auch zur Verringerung unerwünschter Expression bestimmter Proteine verwendet werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Gonzalez L, Trigatti BL. Macrophage Apoptosis and Necrotic Core Development in Atherosclerosis: A Rapidly Advancing Field with Clinical Relevance to Imaging and Therapy. *Canadian Journal of Cardiology*. 2017;33(3):303-12.
2. Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, et al. *Duale Reihe: Georg Thieme Verlag*; 2007.
3. Kuhlmann I, Chin D, Rimbach G. Molekulare Mechanismen der Atherosklerose. In: Kuhlmann I, Chin D, Rimbach G, editors. *Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen und Atherosklerose*. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden; 2014. p. 3-14.
4. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407(6801):233-41.
5. Riede U-N, Riede F-N. Arterien. In: Riede U-N, Werner M, editors. *Allgemeine und Spezielle Pathologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2017. p. 279-91.
6. Wu MY, Li CJ, Hou MF, Chu PY. New Insights into the Role of Inflammation in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10).
7. Singh RB, Mengi SA, Xu YJ, Arneja AS, Dhalla NS. Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process. *Exp Clin Cardiol*. 2002;7(1):40-53.
8. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(7):508-19.
9. Nolte A, Secker S, Walker T, Greiner TO, Neumann B, Simon P, et al. 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)*. 2011;52(2):251-9.
10. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol*. 1986;137(1):245-54.
11. Piela-Smith TH, Broketa G, Hand A, Korn JH. Regulation of ICAM-1 expression and function in human dermal fibroblasts by IL-4. *The Journal of Immunology*. 1992;148(5):1375.
12. Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep*. 2009;61(1):22-32.
13. Nolte A, Secker S, Walker T, Greiner T, Neumann B, Simon P, et al. Veins are no arteries: even moderate arterial pressure induces significant adhesion molecule expression of vein grafts in an ex vivo circulation model. *The Journal of cardiovascular surgery*. 2011;52(2):251-9.
14. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *Faseb j*. 1995;9(10):866-73.
15. Morigi M, Angioletti S, Imberti B, Donadelli R, Micheletti G, Figliuzzi M, et al. Leukocyte-endothelial interaction is augmented by high glucose concentrations and hyperglycemia in a NF- κ B-dependent fashion. *J Clin Invest*. 1998;101(9):1905-15.
16. Borhani S, Hassanajili S, Ahmadi Tafti SH, Rabbani S. Cardiovascular stents: overview, evolution, and next generation. *Progress in Biomaterials*. 2018;7(3):175-205.
17. Rodriguez-Granillo A, Rubilar B, Rodriguez-Granillo G, Rodriguez AE. Advantages and disadvantages of biodegradable platforms in drug eluting stents. *World J Cardiol*. 2011;3(3):84-92.
18. Hong CA, Nam YS. Functional nanostructures for effective delivery of small interfering RNA therapeutics. *Theranostics*. 2014;4(12):1211-32.
19. Guo P, Coban O, Snead NM, Trebley J, Hoepflich S, Guo S, et al. Engineering RNA for targeted siRNA delivery and medical application. *Advanced drug delivery reviews*. 2010;62(6):650-66.
20. Mahmoodi Chalbatani G, Dana H, Gharagouzloo E, Grijalvo S, Eritja R, Logsdon CD, et al. Small interfering RNAs (siRNAs) in cancer therapy: a nano-based approach. *International journal of nanomedicine*. 2019;14:3111-28.
21. Gavrilov K, Saltzman WM. Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. *Yale J Biol Med*. 2012;85(2):187-200.

22. Walker T, Siegel J, Nolte A, Hartmann S, Kornberger A, Steger V, et al. Small interfering RNA efficiently suppresses adhesion molecule expression on pulmonary microvascular endothelium. *J Nucleic Acids*. 2011;2011:694789.
23. Koenig O, Zengerle D, Perle N, Hossfeld S, Neumann B, Behring A, et al. RNA-Eluting Surfaces for the Modulation of Gene Expression as A Novel Stent Concept. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2017;10(1).
24. Castanotto D, Rossi JJ. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature*. 2009;457(7228):426-33.
25. Suzuki Y, Ishihara H. Difference in the lipid nanoparticle technology employed in three approved siRNA (Patisiran) and mRNA (COVID-19 vaccine) drugs. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2021;41:100424.
26. Jayaraman M, Ansell SM, Mui BL, Tam YK, Chen J, Du X, et al. Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing in vivo. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2012;51(34):8529-33.
27. Hassett KJ, Benenato KE, Jacquinet E, Lee A, Woods A, Yuzhakov O, et al. Optimization of Lipid Nanoparticles for Intramuscular Administration of mRNA Vaccines. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019;15:1-11.
28. Sabnis S, Kumarasinghe ES, Salerno T, Mihai C, Ketova T, Senn JJ, et al. A Novel Amino Lipid Series for mRNA Delivery: Improved Endosomal Escape and Sustained Pharmacology and Safety in Non-human Primates. *Mol Ther*. 2018;26(6):1509-19.
29. Sardh E, Harper P, Balwani M, Stein P, Rees D, Bissell DM, et al. Phase 1 Trial of an RNA Interference Therapy for Acute Intermittent Porphyria. *N Engl J Med*. 2019;380(6):549-58.
30. Weng Y, Xiao H, Zhang J, Liang XJ, Huang Y. RNAi therapeutic and its innovative biotechnological evolution. *Biotechnol Adv*. 2019;37(5):801-25.
31. Hu B, Zhong L, Weng Y, Peng L, Huang Y, Zhao Y, et al. Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020;5(1):101.
32. Kosmas CE, Muñoz Estrella A, Sourlas A, Silverio D, Hilario E, Montan PD, et al. Inclisiran: A New Promising Agent in the Management of Hypercholesterolemia. *Diseases*. 2018;6(3).
33. Garrelfs SF, Frishberg Y, Hulton SA, Koren MJ, O'Riordan WD, Cochat P, et al. Lumasiran, an RNAi Therapeutic for Primary Hyperoxaluria Type 1. *N Engl J Med*. 2021;384(13):1216-26.
34. Makowiecki C, Nolte A, Sutaj B, Keller T, Avci-Adali M, Stoll H, et al. New basic approach to treat non-small cell lung cancer based on RNA-interference. *Thorac Cancer*. 2014;5(2):112-20.
35. Nolte A, Walker T, Schneider M, Kray O, Avci-Adali M, Ziemer G, et al. Small-interfering RNA-eluting surfaces as a novel concept for intravascular local gene silencing. *Mol Med*. 2011;17(11-12):1213-22.
36. Chi J-T, Chang HY, Wang NN, Chang DS, Dunphy N, Brown PO. Genomewide view of gene silencing by small interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(11):6343-6.
37. Walker T, Wendel HP, Tetzloff L, Raabe C, Heidenreich O, Simon P, et al. Inhibition of adhesion molecule expression on human venous endothelial cells by non-viral siRNA transfection. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2007;11(1):139-47.
38. Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010;397(8):3173-8.
39. Ikeda SR, Lovinger DM, McCool BA, Lewis DL. Heterologous expression of metabotropic glutamate receptors in adult rat sympathetic neurons: subtype-specific coupling to ion channels. *Neuron*. 1995;14(5):1029-38.
40. Donzé O, Picard D. RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic acids research*. 2002;30(10):e46-e.
41. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett*. 2013;8(1):102-.

42. Hofheinz RD, Gnad-Vogt SU, Beyer U, Hochhaus A. Liposomal encapsulated anti-cancer drugs. *Anticancer Drugs*. 2005;16(7):691-707.
43. Immordino ML, Dosio F, Cattel L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomedicine*. 2006;1(3):297-315.
44. Allen TM, Hansen C, Martin F, Redemann C, Yau-Young A. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1066(1):29-36.
45. Koenig O, Nothdurft D, Perle N, Neumann B, Behring A, Degenkolbe I, et al. An Atelocollagen Coating for Efficient Local Gene Silencing by Using Small Interfering RNA. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017;6:290-301.
46. Huck K. Angiologie. In: Arastéh K, Baenkler H-W, Bieber C, Brandt R, Chatterjee TT, Dill T, et al., editors. *Duale Reihe Innere Medizin*. 4., überarbeitete Auflage ed: Georg Thieme Verlag; 2018.
47. Krüger-Genge A, Blocki A, Franke R-P, Jung F. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(18):4411.
48. Sturtzel C. Endothelial Cells. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1003:71-91.
49. Pons S, Arnaud M, Loïselle M, Arrié E, Azoulay E, Zafrani L. Immune Consequences of Endothelial Cells' Activation and Dysfunction During Sepsis. *Crit Care Clin*. 2020;36(2):401-13.
50. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, et al. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci*. 2013;9(10):1057-69.
51. Schultz KT, Grieder F. Structure and function of the immune system. *Toxicol Pathol*. 1987;15(3):262-4.
52. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S3-S23.
53. H.E.Kaufmann S. *Basiswissen Immunologie*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2014.
54. Voll RE, Baenkler H-W. Immunologie. In: Arastéh K, Baenkler H-W, Bieber C, Brandt R, Chatterjee TT, Dill T, et al., editors. *Duale Reihe Innere Medizin*. 4., überarbeitete Auflage ed: Georg Thieme Verlag; 2018.
55. Khan S, Kaihara KA. Single-Cell RNA-Sequencing of Peripheral Blood Mononuclear Cells with ddSEQ. *Methods Mol Biol*. 2019;1979:155-76.
56. García-Piñeres AJ, Hildesheim A, Williams M, Trivett M, Strobl S, Pinto LA. DNase treatment following thawing of Cryopreserved PBMC is a procedure suitable for lymphocyte functional studies. *Journal of Immunological Methods*. 2006;313(1):209-13.
57. Raulf-Heimsoth M. T cell - primary culture from peripheral blood. *Methods Mol Med*. 2008;138:17-30.
58. Riedhammer C, Halbritter D, Weissert R. Peripheral Blood Mononuclear Cells: Isolation, Freezing, Thawing, and Culture. In: Weissert R, editor. *Multiple Sclerosis: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York; 2016. p. 53-61.
59. Kleiveland CR. Peripheral Blood Mononuclear Cells. In: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., editors. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 161-7.
60. Ansar W, Ghosh S. Inflammation and Inflammatory Diseases, Markers, and Mediators: Role of CRP in Some Inflammatory Diseases. *Biology of C Reactive Protein in Health and Disease*. 2016:67-107.
61. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*. 2007;25(1):9-18.
62. Heinrich PC, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Mediatoren. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, editors. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 407-10.
63. Conlon KC, Miljkovic MD, Waldmann TA. Cytokines in the Treatment of Cancer. *J Interferon Cytokine Res*. 2019;39(1):6-21.

64. Hoth M, Wischmeyer E. Immunsystem. In: Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings M, Grissmer S, et al., editors. *Duale Reihe Physiologie*. 2. Auflage ed: Thieme; 2012.
65. Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003;111(2, Supplement 2):S460-S75.
66. Opal SM, DePalo VA. Anti-Inflammatory Cytokines. *Chest*. 2000;117(4):1162-72.
67. Martin TA. Interleukin-8 and Angiogenesis. In: Snyder CR, Jiang WG, Matsumoto K, Nakamura T, editors. *Growth Factors and their Receptors in Cancer Metastasis*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2001. p. 51-65.
68. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001;413(6857):732-8.
69. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001;413(6857):732-8.
70. Schnitzler P, Dörries R. Zytokine als virostatische Therapeutika. In: Hof H, Schlüter D, Dörries R, editors. *Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie*. 7., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage ed: Georg Thieme Verlag KG; 2019.
71. Weber M, Steinle H, Golombek S, Hann L, Schlensak C, Wendel HP, et al. Blood-Contacting Biomaterials: In Vitro Evaluation of the Hemocompatibility. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2018;6:99-.
72. Conigliaro P, Triggianese P, Ballanti E, Perricone C, Perricone R, Chimenti MS. Complement, infection, and autoimmunity. *Current Opinion in Rheumatology*. 2019;31(5).
73. Taran LD. [The complement system]. *Biokhimiia*. 1993;58(5):780-7.
74. Viana IMdO, Roussel S, Defrène J, Lima EM, Barabé F, Bertrand N. Innate and adaptive immune responses toward nanomedicines. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2021;11(4):852-70.
75. Wu Y, Shen L, Yin J, Chen J, Qian J, Ge L, et al. Twelve-month angiographic and clinical outcomes of the XINSORB bioresorbable sirolimus-eluting scaffold and a metallic stent in patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol*. 2019;293:61-6.
76. Yin T, Du R, Wang Y, Huang J, Ge S, Huang Y, et al. Two-stage degradation and novel functional endothelium characteristics of a 3-D printed bioresorbable scaffold. *Bioact Mater* [Internet]. 2022 2022/04//; 10:[378-96 pp.]. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/34901554>
- <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.08.020>
- <https://europepmc.org/articles/PMC8636822>
- <https://europepmc.org/articles/PMC8636822?pdf=render>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8636822/pdf/main.pdf>.
77. Seth A, Onuma Y, Costa R, Chandra P, Bahl VK, Manjunath CN, et al. First-in-human evaluation of a novel poly-L-lactide based sirolimus-eluting bioresorbable vascular scaffold for the treatment of de novo native coronary artery lesions: MeRes-1 trial. *EuroIntervention*. 2017;13(4):415-23.
78. Abizaid A, Kedev S, Ali RBM, Santoso T, Cequier A, van Geuns RVG, et al. Imaging and 2-year clinical outcomes of thin strut sirolimus-eluting bioresorbable vascular scaffold: The MeRes-1 extend trial. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2021;98(6):1102-10.
79. Chevalier B, Onuma Y, van Boven AJ, Piek JJ, Sabaté M, Helqvist S, et al. 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*. 2016;12(9):1102-7.
80. Jinnouchi H, Torii S, Sakamoto A, Kolodgie FD, Virmani R, Finn AV. Fully bioresorbable vascular scaffolds: lessons learned and future directions. *Nature Reviews Cardiology*. 2019;16(5):286-304.

81. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-11.
82. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-11.
83. Nolte A, Ott K, Rohayem J, Walker T, Schlensak C, Wendel HP. Modification of small interfering RNAs to prevent off-target effects by the sense strand. *N Biotechnol*. 2013;30(2):159-65.
84. Sardh E, Harper P. RNAi therapy with givosiran significantly reduces attack rates in acute intermittent porphyria. *J Intern Med*. 2022;291(5):593-610.
85. Koenig O, Walker T, Perle N, Zech A, Neumann B, Schlensak C, et al. New aspects of gene-silencing for the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013;6(7):881-914.
86. Linnemann B, Lindhoff-Last E. Thrombogenität verschiedener Krankheitsbilder. In: Haas S, editor. *Prävention von Thrombosen und Embolien in der Inneren Medizin: Möglichkeiten und Vorzüge von niedermolekularen Heparinen*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2005. p. 59-67.
87. Jiang Z, Woda BA, Savas L, Fraire AE. Expression of ICAM-1, VCAM-1, and LFA-1 in adenocarcinoma of the lung with observations on the expression of these adhesion molecules in non-neoplastic lung tissue. *Mod Pathol*. 1998;11(12):1189-92.
88. Srivastava K, Chandra S, Narang R, Bhatia J, Saluja D. E-selectin gene in essential hypertension: a case-control study. *Eur J Clin Invest*. 2018;48(1).
89. Nguyen M, Corless CL, Kräling BM, Tran C, Atha T, Bischoff J, et al. Vascular expression of E-selectin is increased in estrogen-receptor-negative breast cancer: a role for tumor-cell-secreted interleukin-1 alpha. *Am J Pathol*. 1997;150(4):1307-14.
90. Müller AM, Weichert A, Müller KM. E-cadherin, E-selectin and vascular cell adhesion molecule: immunohistochemical markers for differentiation between mesothelioma and metastatic pulmonary adenocarcinoma? *Virchows Arch*. 2002;441(1):41-6.
91. Bhaskar V, Law DA, Ibsen E, Breinberg D, Cass KM, DuBridg RB, et al. E-selectin up-regulation allows for targeted drug delivery in prostate cancer. *Cancer Res*. 2003;63(19):6387-94.
92. Ling M, Murali M. Analysis of the Complement System in the Clinical Immunology Laboratory. *Clin Lab Med*. 2019;39(4):579-90.
93. Conigliaro P, Triggianese P, Ballanti E, Perricone C, Perricone R, Chimenti MS. Complement, infection, and autoimmunity. *Curr Opin Rheumatol*. 2019;31(5):532-41.
94. Defendi F, Thielens NM, Clavarino G, Cesbron JY, Dumestre-Pérard C. The Immunopathology of Complement Proteins and Innate Immunity in Autoimmune Disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2020;58(2):229-51.
95. Kaufmann SHE. Komplement. In: Kaufmann SHE, editor. *Basiswissen Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 39-45.
96. Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(2-3):75-86.
97. Behlke MA. Progress towards in vivo use of siRNAs. *Mol Ther*. 2006;13(4):644-70.
98. Uldry E, Faes S, Demartines N, Dormond O. Fine-Tuning Tumor Endothelial Cells to Selectively Kill Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18(7).
99. Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol*. 2003;196(3):430-43.
100. Wang J, Wang WN, Xu SB, Wu H, Dai B, Jian DD, et al. MicroRNA-214-3p: A link between autophagy and endothelial cell dysfunction in atherosclerosis. *Acta Physiol (Oxf)*. 2018;222(3).
101. Bhatia S, Edidin M, Almo SC, Nathanson SG. B7-1 and B7-2: Similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties. *Immunology Letters*. 2006;104(1):70-5.
102. Dixit N, Simon S. Chemokines, selectins and intracellular calcium flux: temporal and spatial cues for leukocyte arrest. *Frontiers in Immunology*. 2012;3.

103. Antonelli A, Ferrari SM, Giuggioli D, Ferrannini E, Ferri C, Fallahi P. Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2014;13(3):272-80.
104. Dinarello CA. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *Journal of Experimental Medicine.* 2005;201(9):1355-9.
105. Abbas AK, Trotta E, D RS, Marson A, Bluestone JA. Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. *Sci Immunol.* 2018;3(25).
106. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(10):a016295.
107. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Interleukin (IL-6) Immunotherapy. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10(8).
108. Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* 1992;307(1):97-101.
109. Nguyen KG, Vrabel MR, Mantooth SM, Hopkins JJ, Wagner ES, Gabaldon TA, et al. Localized Interleukin-12 for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2020;11:575597.
110. Gu Y, Mohammad IS, Liu Z. Overview of the STAT-3 signaling pathway in cancer and the development of specific inhibitors. *Oncol Lett.* 2020;19(4):2585-94.
111. Wang Y, Holleufer A, Gad HH, Hartmann R. Length dependent activation of OAS proteins by dsRNA. *Cytokine.* 2020;126:154867.
112. Zhang Y, Yu C. Prognostic characterization of OAS1/OAS2/OAS3/OASL in breast cancer. *BMC Cancer.* 2020;20(1):575.
113. Mercogliano MF, Bruni S, Mauro F, Elizalde PV, Schillaci R. Harnessing Tumor Necrosis Factor Alpha to Achieve Effective Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel).* 2021;13(3).
114. Subedi S, Gong Y, Chen Y, Shi Y. Infliximab and biosimilar infliximab in psoriasis: efficacy, loss of efficacy, and adverse events. *Drug Des Devel Ther.* 2019;13:2491-502.
115. Hossfeld S, Nolte A, Hartmann H, Recke M, Schaller M, Walker T, et al. Bioactive coronary stent coating based on layer-by-layer technology for siRNA release. *Acta Biomater.* 2013;9(5):6741-52.
116. Mirzaei S, Gholami MH, Ang HL, Hashemi F, Zarrabi A, Zabolian A, et al. Pre-Clinical and Clinical Applications of Small Interfering RNAs (siRNA) and Co-Delivery Systems for Pancreatic Cancer Therapy. *Cells.* 2021;10(12).
117. Lee HY, Mohammed KA, Kaye F, Sharma P, Moudgil BM, Clapp WL, et al. Targeted delivery of let-7a microRNA encapsulated ephrin-A1 conjugated liposomal nanoparticles inhibit tumor growth in lung cancer. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:4481-94.
118. Cortez-Jugo C, Masoumi S, Chan PPY, Friend J, Yeo L. Nebulization of siRNA for inhalation therapy based on a microfluidic surface acoustic wave platform. *Ultrason Sonochem.* 2022;88:106088.
119. Libby P. Interleukin-1 Beta as a Target for Atherosclerosis Therapy: Biological Basis of CANTOS and Beyond. *J Am Coll Cardiol.* 2017;70(18):2278-89.
120. Goulopoulou S, McCarthy CG, Webb RC. Toll-like Receptors in the Vascular System: Sensing the Dangers Within. *Pharmacol Rev.* 2016;68(1):142-67.

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde im klinischen Forschungslabor für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie der Universitätsklinik Tübingen unter Betreuung von Frau PD Dr. Andrea Nolte-Karayel durchgeführt.

Die Konzeption der Versuche erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. Andrea Nolte-Karayel.

Sämtliche Versuche wurden nach Anleitung durch Frau PD Dr. Andrea Nolte-Karayel und Labormitglieder wie z.B. Bernd Neumann, Julia Kurz von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung wurde nach Anleitung Frau PD Dr. Andrea Nolte-Karayel von mir selbst durchgeführt.

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

Remshalden, den 01.11.2022

Ani Brüggling

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Frau PD Dr. Andrea Nolte-Karayel für die hervorragende Betreuung und die Ermöglichung dieser Doktorarbeit bedanken. Sie ist zu jeder Zeit für mich da gewesen und hat mich bei all meinen Fragen immer unterstützt. Vielen Dank!

Ein großer Dank gilt dem gesamten Team des THG-Forschungslabors, das mich ebenfalls zu jeder Zeit mit seiner lieben Art und guten Antworten bei meinen Fragen unterstützt hat.

Meiner lieben Familie, vor allem meinem Ehemann und meinen Kindern gilt mein größter Dank, dass ihr jeden Tag für mich da gewesen seid und mir für mein Studium und meiner Promotion immer wieder Kraft gegeben habt.

Herzlichen Dank.