

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

**Lokales Gen-Silencing durch siRNA-haltige Beschichtungen in  
Ea.hy926**

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

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

**vorgelegt von**

**Nothdurft, Dimitrios Martin**

**2023**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.P. Wendel

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Weiß

Tag der Disputation: 28.11.2023

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

## Abbildungsverzeichnis

## Tabellenverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Relevanz von kardiovaskulären Erkrankungen und die Epidemiologie der koronaren Herzkrankheit	1
1.2 Komplikationen der Koronaren Herzkrankheit	2
1.3 Pathophysiologie der Atherosklerose	3
1.3.1 Stadium I: Initiailläsion	3
1.3.2 Stadium II: Fettstreifen ( <i>fatty streaks</i> )	3
1.3.3 Stadium III: Lipidplaque	4
1.3.4 Stadium IV: Fibroatherom	4
1.3.5 Stadium V: Vulnerable Plaque und Plaquesfissur	4
1.3.6 Stadium VI: Fibröse, zellarme Plaque	5
1.4 Prävention und Therapie bei koronarer Herzkrankheit	6
1.5 Leukodiapedese	8
1.6 Pathophysiologie der Restenose	9
1.7 Transfektion	11
1.8 RNA-vermitteltes Gen-Silencing und RNA-Interferenz	12
1.9 Bedeutung von Atelokollagen	14
1.10 Ziel der Dissertation	15
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1 Materialien	17
2.1.1 Geräte	17
2.1.2 Verbrauchsmaterial	18
2.1.3 Medien und Lösungen	19
2.1.4 siRNA-Sequenzen und Primer	21
2.1.5 Zelllinie	23

2.2	Methoden	23
2.2.1	Atelokollagen-Verdünnung	23
2.2.2	Verwendete siRNAs	23
2.2.3	Vorbereitung der Glasplättchen	24
2.2.4	Herstellung der Atelokollagen/siRNA-Beschichtungen	24
2.2.5	Transfektion von EA.hy926 mittels siRNA-haltiger Atelokollagen-Beschichtungen	24
2.2.6	Freisetzung der Alexa-Fluor® 488-markierten E-Selektin-siRNA AF488	25
2.2.7	Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Transfektionseffizienz und des Knockdowns	26
2.2.8	Viabilitätstests: Messung der Zellzahl und inverse Mikroskopie	26
2.2.9	Hämokompatibilität	27
2.2.10	5'-RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA-Ends PCR (5'-RLM-RACE-PCR)	28
2.2.11	Statistik	29
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>30</b>
3.1	Zellviabilität von EA.hy926 auf unterschiedlich konzentrierten Atelokollagen-Schichten	30
3.2	Freisetzung von siRNA AF 488	32
3.3	Transfektionseffizienz nach Atelokollagen-vermittelter Transfektion von siRNA AF 488	34
3.4	Knockdown von ICAM-1 mittels siRNA-haltiger Atelokollagen-Beschichtungen	36
3.5	Langzeitversuch zum Knockdown von ICAM-1 auf siRNA-haltigen Atelokollagen-Beschichtungen	40
3.6	Nachweis des siRNA-vermittelten mRNA-Abbaus mittels 5'-RLM-RACE-PCR	42
3.7	Hämokompatibilität von siRNA-haltigen Atelokollagen-Beschichtungen	43
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>47</b>
4.1	Zellzahl und -viabilität von EA.hy926-Zellen auf Atelokollagen-Schichten	48
4.2	Transfektion und Knockdown auf Beschichtungen ohne Lipofectamine	49
4.3	Transfektion von Ea.hy926 mit Lipofectamine	50
4.4	Knockdown von ICAM-1 in Ea.hy926 nach Transfektion mit Lipofectamine, 5'-RLM-RACE-PCR	50

4.5	Langzeitfreisetzung von siRNA AF 488	51
4.6	Langzeitknockdown von ICAM–1 in Ea.hy926	52
4.7	Hämokompatibilität von siRNA-haltigen Atelokollagen-Beschichtungen	54
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>55</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>58</b>
<b>7.</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil</b>	<b>65</b>
<b>8.</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>68</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>69</b>

## Abkürzungsverzeichnis

μ

μg

*Mikrogramm*

μl

*Mikroliter*

---

### **A**

Abb.

*Abbildung*

ACE

*Angiotensin converting enzyme*

AF488

*Alexa Fluor 488*

Ago2

*Argonaute 2*

Ak

*Antikörper*

ANOVA

*Analysis of variance*

---

### **B**

BMS

*Bare-Metal-Stent*

---

### **C**

Ca

*Calcium*

cDNA

*Complementary desoxyribonucleic acid*

CD54

*Cluster of differentiation 54*

cm

*Zentimeter*

---

### **D**

DALY

*Disability-Adjusted Life Year*

DES

*Drug-Eluting Stent*

DMEM

*Dulbecco's modified eagle medium*

DNA

*Desoxyribonukleinsäure*

DOPE

*Dioleoylphosphatidylethanolamine*

DOTAP

*1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propan*

DOTMA

*N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid*

---

**E**

ELISA *Enzyme-linked immunosorbent assay*  
EZM *Extrazelluläre Matrix*

---

**F**

FBS *Fetal bovine serum*  
FACS *Fluorescence activated cell sorting*

---

**H**

HDL *High-Density Lipoprotein*  
HUVECs *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

---

**I**

ICAM *Intercellular Adhesion Molecule*  
ISO *International Organization for Standardization*

---

**K**

KHK *Koronare Herzkrankheit*

---

**L**

LDL *Low-Density Lipoprotein*  
LFA-1 *Lymphocyte function-associated antigen 1*

---

**M**

Mac-1 *Macrophage-1 antigen*  
Mg *Magnesium*  
miRNA *micro RNA*  
ml *Milliliter*  
mm *Millimeter*  
M-MLV RT *Moloney- Murine Leukemia Virus reverse Transkriptase*

mRNA *messenger RNA*

---

**N**

NaCl *Natriumchlorid*

---

**O**

oxLDL *oxidiertes Low-Density Lipoprotein*

---

**P**

PAF *Plättchenaktivierender Faktor*

p-bodies *processing bodies*

PBS *Phosphate buffered saline*

PCR *Polymerase Kettenreaktion*

PDGF *Platelet-derived growth factor*

PFA *Paraformaldehyd*

PMN-Elastase *Polymorphnukleäre Elastase*

PTCA *perkutante transluminale koronare Angioplastie*

---

**R**

RFU *Relative fluorescence unit*

RISC *RNA-induced-silencing complex*

RLM-RACE-PCR *RNA ligase mediated rapid  
amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction*

RNA *Ribonukleinsäure*

RNAi *RNA-Interferenz*

---

**S**

Scr *Scrambled RNA*

siRNA *small interfering RNA*

---

***T***

TGF- $\beta$

*Transforming growth factor  $\beta$*

TNF- $\alpha$

*Tumornekrosefaktor- $\alpha$*

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Anatomie der gesunden Arterienwand .....	5
<b>Abbildung 2:</b> Stadien der Atherosklerose .....	6
<b>Abbildung 3:</b> Ablauf der RNA-Interferenz .....	14
<b>Abbildung 4:</b> Messung der Zellzahl von Ea.hy926–Zellen mit dem CASY®-Zellzähler .....	31
<b>Abbildung 5:</b> Messung der Zellviabilität von EA.hy926 mit dem CASY®-Zellzähler .....	31
<b>Abbildung 6:</b> Mikroskopische Aufnahmen von Ea.hy926 auf verschiedenen konzentrierten Atelokollagen-Oberflächen.....	32
<b>Abbildung 7:</b> Freisetzungskinetik von siRNA AF 488 aus Atelokollagenbeschichtungen .....	34
<b>Abbildung 8:</b> Transfektionseffizienz nach Atelokollagen-vermittelter Transfektion der siRNA AF 488, mit und ohne Lipofectamine-Zusatz .....	36
<b>Abbildung 9:</b> Knockdown des ICAM–1-Proteins mit und ohne Lipofectamine .....	38
<b>Abbildung 10:</b> Langzeit-Knockdown des ICAM–1-Proteins .....	41
<b>Abbildung 11:</b> Sequenzanalyse des 5'RLM-RACE-PCR Amplifikats (innere PCR mit innerem Primer und RACE 1) nach Transfektion von EA.hy926 auf 0,032 % konzentrierten silCAM–1-haltigen Atelokollagenschichten. ....	42
<b>Abbildung 12:</b> Hämokompatibilitäts-Analyse von beschichteten Plättchen (0,032 % Atelokollagen/silCAM1).....	45

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Verwendete Geräte .....	17
<b>Tabelle 2:</b> Verbrauchsmaterialien .....	18
<b>Tabelle 3:</b> Medien und Lösungen.....	19
<b>Tabelle 4:</b> Zusammengesetzte Lösungen.....	21
<b>Tabelle 5:</b> Kits .....	21
<b>Tabelle 6:</b> Verwendete siRNAs .....	22
<b>Tabelle 7:</b> Primer der 5'–RLM-RACE PCR .....	22
<b>Tabelle 8:</b> Lipofectamine-Menge in Abhängigkeit der siRNA-Menge.....	24

# 1. Einleitung

## 1.1 Relevanz von kardiovaskulären Erkrankungen und die Epidemiologie der koronaren Herzkrankheit

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen seit jeher ein herausforderndes Thema für Medizin und Forschung dar. Mit circa 17,3 Millionen jährlichen Todesfällen, davon 4 Millionen in Europa, stellen sie global gesehen die häufigste Todesursache dar [1]. Innerhalb dieser Krankheitsgruppe ist die koronare Herzkrankheit (KHK) mit einem Anteil von etwa einem Drittel an allen kardiovaskulären Krankheiten sehr prominent [2]. Allein in den USA wurden 2010 17.6 Millionen Fälle von KHK verzeichnet [3]. Die Prävalenz und Inzidenz der KHK sind dabei stark von Alter und Geschlecht abhängig: Im Hinblick auf die Gesamtheit an koronaren Ereignissen ergibt sich mit steigendem Lebensalter für beide Geschlechter eine deutlich höhere Inzidenz der KHK. Der Vergleich der beiden Altersgruppen 35-64 und 65-94 zeigt beispielsweise eine Verdoppelung der Inzidenz für Männer, für Frauen sogar eine Verdreifachung [4]. Für den altersbedingten Anstieg ergibt sich zusätzlich ein Trend in Bezug auf das Geschlecht: So bleibt die Inzidenz koronarer Ereignisse für Frauen etwa 10 Jahre hinter der männlichen zurück [4]. Einige Endpunkte zeigen isoliert sogar eine höhere geschlechtsspezifische Abweichung von 20 Jahren, beispielsweise der Myokardinfarkt und der plötzliche Herztod [4]. Mit zunehmendem Lebensalter wird diese „gender gap“ jedoch zusehends geringer [4]. Insgesamt liegt das Lebenszeitrisiko für die Manifestation der KHK für 40-jährige Männer bei 49 %, für Frauen desselben Alters bei nur 32 %. Über die letzten Dekaden hinweg hat sich in den meisten Ländern Europas und den USA sowohl in Hinblick auf die Inzidenz als auch auf die Mortalität ein positiver Trend ergeben [3, 5-8]. Im Gegensatz dazu stehen die Daten aus Schwellen- und Entwicklungsländern wie China und Indien, in denen kardiovaskuläre Erkrankungen häufig in einem Aufwärtstrend begriffen sind [9, 10]. Die hohe Prävalenz und Inzidenz sind jedoch nicht die einzigen Gründe für die anhaltende Relevanz der kardiovaskulären Erkrankungen: Mit für das Jahr 2020 geschätzten 150 Millionen Disability-Adjusted Life Years (DALYs), also eingebüßten gesunden Lebensjahren, sind kardiovaskuläre Erkrankungen nämlich zusätzlich der führende somatische Grund für Produktivitätsverlust und verursachen so indirekt enormen wirtschaftlichen Schaden [11]. Der Anteil der KHK an diesen DALYs liegt dabei schätzungsweise bei 82 Millionen [11].

## **1.2 Komplikationen der Koronaren Herzkrankheit**

Der Begriff „koronare Herzkrankheit“ vereint eine Mehrzahl von Krankheitsentitäten, denen eine Einengung eines oder mehrerer Koronargefäße zugrunde liegt [12]. Die Symptomatik hängt dabei stark von dem Grad der Stenose, also der Einengung des Gefäßes und der damit verbundenen Reduktion des Sauerstoffangebots, ab [13]. Problematisch ist dabei, dass der größte Teil des Stenosierungsprozesses asymptomatisch verläuft: Denn erst ab einem Stenosegrad von 70 % des ursprünglichen Lumens treten unter Belastung anfallsartige, thorakale Schmerzen auf (sog. *Angina pectoris*) [14]. Das Risikoprofil verändert sich allerdings schon vor der Symptomatik: Im Vergleich zu Herzgesunden treten bei Patienten mit Koronarstenosen <70 % deutlich häufiger Myokardinfarkte auf [14]. Bleiben sowohl die Schmerzen als auch die auslösende Belastung über einen Zeitraum von mehreren Monaten konstant, spricht man von einer stabilen Angina Pectoris. Die instabile Angina Pectoris zeichnet sich durch zunehmende Beschwerden bei geringerer Belastung oder in Ruhe aus. Sie beruht meist auf einer Plaqueruptur, die zur Organisation eines wandadhärenten Thrombus führt. Dieser verengt das schon stenosierte Gefäßlumen und führt so zu einer Ischämie des Myokards und den damit verbundenen Schmerzen bei schon geringer Belastung [13]. Folgt auf die Plaqueruptur ein thrombotisch bedingter Gefäßverschluss mit einer andauernden, absoluten Ischämie eines Herzmuskelareals, spricht man von einem Myokardinfarkt [13]. Mit einer Inzidenz zwischen 200 und 300 pro 100.000 Einwohnern stellt der Myokardinfarkt eine der häufigsten Komplikationen der KHK dar [15]. In der Altersgruppe über 75 ist der Myokardinfarkt sogar die häufigste Erstmanifestation einer koronaren Herzkrankheit, noch vor der Angina Pectoris [4]. Zusätzlich zu den Komplikationen der akuten Ischämiezustände existieren auch Komplikationen bedingt durch strukturelle Veränderungen des Herzgewebes auf Basis einer KHK. Prominent sind in dieser Gruppe der sogenannte plötzliche Herzstillstand und -tod. Diesen Erkrankungen liegt ein schlagartiges Ausbleiben einer gerichteten Herzfunktion zugrunde [16]. Grund dafür ist meist eine schwerwiegende Herzrhythmusstörung, welche durch narbige Veränderungen des Myokards und der damit einhergehenden Störung der Reizleitung provoziert wird [17]. Der plötzliche Herzstillstand ist in über 70 % der Fälle mit der KHK assoziiert [18, 19]. Gleichzeitig ist der plötzliche Herztod mit einer Beteiligung zwischen 30 und 50 % die häufigste Todesursache unter KHK-Patienten [20, 21].

### **1.3 Pathophysiologie der Atherosklerose**

Ursächlich für die koronare Herzkrankheit und deren Endpunkte sind uni- oder multifokale Verdickungen in den koronaren Gefäßwänden, sogenannte atherosklerotische Plaques, welche das Gefäßlumen zu großen Teilen verlegen können und bei Ruptur häufig zu thrombotischen Komplikationen führen [22]. Die Bildung eines atherosklerotischen Plaques ist ein langwieriger Prozess, der mehrere Zwischenstufen durchschreitet [23]:

#### **1.3.1 Stadium I: Initialläsion**

Die Atherosklerose beginnt mit einer Endothelläsion in der Intima, der innersten Schicht der Gefäßwand (siehe Abb. 1). Eine pauschale Ursache für diese Läsionen ist bisher noch nicht identifiziert worden. Atherosklerotische Plaques entstehen gehäuft in Gefäßabschnitten, in denen turbulente Strömungen und somit höhere Scherkräfte herrschen. Dies führt zu einem lokal erhöhten Aufkommen intimaler Läsionen. Mit der Schädigung des Endothels gehen mehrere Veränderungen einher: Die Permeabilität des Endothels ist durch die aufgetretenen Kontinuitätsunterbrechungen erhöht, was eine Anreicherung der beiden kleinen Lipoproteine Low-Density Lipoprotein (LDL) und High-Density Lipoprotein (HDL) in der Intima, sowie in der Muskelschicht der Arterie, der Media (siehe Abb.1), ermöglicht. Maßgeblich für diese Anreicherung ist die Konzentration dieser beiden Lipoproteine im Blut: So begünstigt eine hohe LDL-Konzentration die Plaquebildung, während eine hohe HDL-Konzentration durch den Abtransport von Cholesterin aus den glatten Muskelzellen der Media dem atherosklerotischen Prozess entgegenwirkt. Die Leukozyten-Migration wird durch die Endothelschädigung ebenfalls erleichtert: So bilden die Endothelzellen im Bereich der Läsion vermehrt Adhäsionsmoleküle für Monozyten und Lymphozyten aus und erlauben über die Ausschüttung von Chemokinen die gerichtete Bewegung dieser Zellen anhand von Stoffgradienten (Chemotaxis) in Richtung der Media. Durch die vermehrte Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen wird weiterhin die Umwandlung von Monozyten zu aktiven Makrophagen begünstigt.

#### **1.3.2 Stadium II: Fettstreifen (*fatty streaks*)**

Subintimal abgelagertes LDL wird im weiteren Verlauf durch freie Radikale seitens der Makrophagen und Endothelzellen oxidiert. Das so entstandene oxidierte LDL (oxLDL) wird von den umliegenden Makrophagen mittels sogenannter Scavenger-

Rezeptoren aufgenommen und lysosomal abgebaut. Dieser Abbau funktioniert gut, solange die oxLDL-Konzentration in der Umgebung normal oder leicht erhöht ist. Bei hohen Konzentrationen von oxLDL wird die Kapazität des Abbaumechanismus' überschritten, überschüssiges oxLDL verestert und in den Abbauvakuolen der Makrophagen gespeichert. Daraus resultieren fetthaltige Makrophagen, die nach ihrer Morphologie *Schaumzellen* genannt werden. Intimale Ansammlungen von Schaumzellen in der atherosklerotischen Frühphase werden als sogenannte Fettstreifen, längliche gelbe Erhabenheiten auf der Innenseite der Arterie, sichtbar.

### **1.3.3 Stadium III: Lipidplaque**

Der kontinuierliche Abbau des oxLDL führt dazu, dass die Cholesterin-Konzentration in den Makrophagen deutlich ansteigt. Das erhöhte Angebot kann durch den enzymatischen Abbauprozess nicht kompensiert werden, weshalb die Cholesterinkonzentration weiter, bis über das Löslichkeitsprodukt, steigt. In der Folge kommt es zur Bildung von Cholesterin-Kristallen innerhalb der Makrophagen. Die erhöhte intrazelluläre Cholesterin-Konzentration sowie die Ausschüttung von apoptosefördernden Perforinen durch zytotoxische CD4<sup>+</sup>-Zellen führen zu einem erhöhten Makrophagen-Untergang. Die toten Makrophagen lassen dabei große Teile der gespeicherten Fette und Cholesterin-Kristalle in der Subintima zurück. Auf lange Sicht bildet sich so eine Lipidplaque (Atherom), welche bei Körpertemperatur flüssig und daher mechanisch instabil ist.

### **1.3.4 Stadium IV: Fibroatherom**

Die verbleibenden subintimalen Makrophagen aktivieren über die Ausschüttung von Endothelin-1 und Interleukin-1 die glatten Muskelzellen der Media. Diese reagieren mit Proliferation und erhöhter Kollagenbildung, die Fibrosierung der Plaque beginnt. Die ebenfalls stimulierten Endothelzellen locken über die Freisetzung von Plättchenaktivierendem Faktor (PAF) Thrombozyten an.

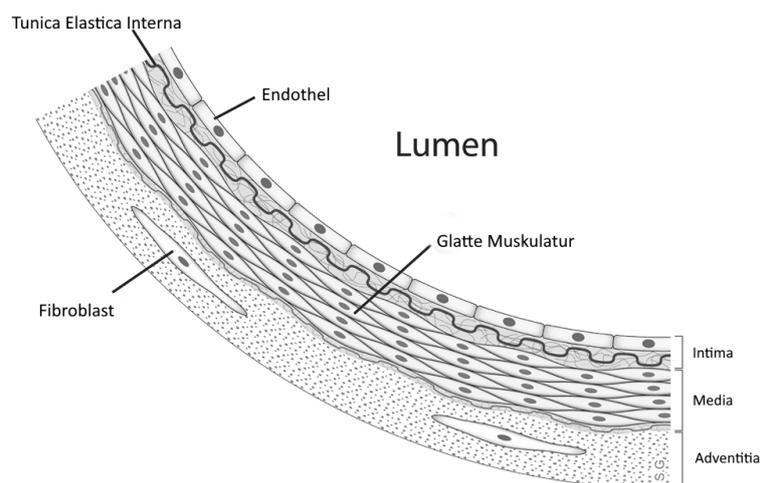
### **1.3.5 Stadium V: Vulnerable Plaque und Plauefissur**

Die entstandene Plaque wird nur noch durch eine dünne fibröse Kappe von der Blutbahn getrennt. Diese Kappe wird im Zuge des ständigen Plaque-Umbaus von Matrixmetalloproteasen, welche von den ortsständigen Makrophagen gebildet werden, aufgeweicht und dadurch anfällig für Scherkräfte. Eine Plaque dieser Form wird auch vulnerable Plaque genannt. Reißt die Kappe durch mechanische Einwirkung auf (sogenannte Plauefissur), so kommt das thrombogene

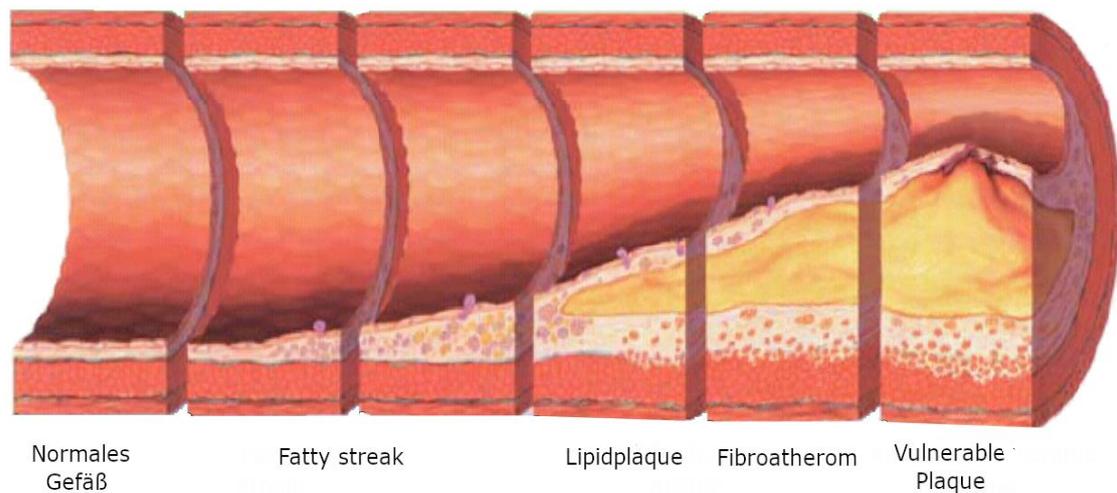
Plaquematerial in direkten Kontakt mit dem Blut und am Ort der Läsion bildet sich ein Thrombus. Je nachdem, ob prothrombotische oder fibrinolytische Faktoren die Überhand haben, kann dieser Thrombus entweder das gesamte Gefäß verschließen (okklusiver Thrombus) oder den Durchmesser des Gefäßes verringern, ohne jedoch den Blutstrom zu unterbrechen (non-okklusiver Thrombus). Des Weiteren können bei einer Plaquesfissur Teile der Plaque in die Blutbahn gespült werden und dort Gefäßanteile embolisieren.

### 1.3.6 Stadium VI: Fibröse, zellarme Plaque

Die Plaquesfissur mit nachfolgender Thrombus-Bildung zieht eine erneute Umorganisation der Plaque nach sich: Mediatoren, die im Verlauf der Thrombus-Organisation freigesetzt werden (z.B. Thrombin, TGF- $\beta$ ), regen die glatten Muskelzellen der Media zur Proliferation sowie zur Bildung von Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM) an. Die entstehende Plaque enthält im Gegensatz zum Fibroatherom außer Kollagen noch weitere Strukturproteine, bei geringerem Cholesterinanteil. Insgesamt ergibt sich dadurch eine deutlich stabilere Plaque, die kein großes Rupturrisiko mehr aufweist, das Gefäßlumen aber massiv einengen kann. Fibröse, zellarme Plaques sind häufig die Ursache einer stabilen koronaren Herzkrankheit.



**Abbildung 1: Anatomie der gesunden Arterienwand.** Die Arterienwand besteht aus den drei Schichten Tunica Intima, Tunica Media und Tunica Adventitia. Die an das Lumen grenzende Tunica Intima besteht aus der abschließenden Endothelschicht und elastischen Fasern. Auf die elastische Trennschicht folgen die glatten Muskelzellen, die den größten Teil der Tunica Media ausmachen. Die bindegewebige, fibroblastenreiche Tunica Adventitia stabilisiert das Gefäß und bildet den äußeren Abschluss. (Stijn A.I. Ghesquiere [www.applesnail.net](http://www.applesnail.net) - Eigenes Werk, lizenziert nach CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=579327>)



**Abbildung 2: Stadien der Atherosklerose.** Durch intimale Läsionen kommt es zu einer vermehrten Einlagerung von LDL in die Arterienwand. Dieses wird von Makrophagen oxidiert, phagozytiert und teilweise in Vakuolen überführt. Bei Überschreiten des Löslichkeitsproduktes in den Vakuolen der Makrophagen bilden sich Cholesterinkristalle, welche zum Zelluntergang und zur Bildung einer Lipidplaque führen. Im Verlauf kommt es durch Freisetzung von Zytokinen und thrombozytenvermittelte Mechanismen zu einem bindegewebigen Umbau der Plaque (Fibroatherom). Durch Matrixmetalloproteasen wird der fibröse Abschnitt über dem Lipidkern der Plaque zusehends aufgeweicht. Dies bringt eine erhöhte Anfälligkeit auf Scherkräfte mit sich (vulnerable Plaque). (Modifiziert nach "Stages of endothelial dysfunction in atherosclerosis", lizenziert nach CC BY-SA 3.0, [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Endo\\_dysfunction\\_Athero.PNG](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Endo_dysfunction_Athero.PNG))

#### 1.4 Prävention und Therapie bei koronarer Herzkrankheit

Vor der Therapie der koronaren Herzkrankheit steht zunächst einmal deren Prävention. Wie unter 1.3 geschildert, sind atherosklerotische Plaques ursächlich für die koronare Herzkrankheit. Die Kontrolle von Risikofaktoren, die die Plaquebildung begünstigen, ist also für die Primärprävention der KHK unabdingbar. Die Risikofaktoren für Plaquebildung sind gut beschrieben und untersucht. Als wichtigste beeinflussbare Faktoren gelten: Rauchen, Übergewicht, Bewegungsarmut, Hyperlipidämie, Bluthochdruck, Diabetes Mellitus sowie Fehlernährung [24-26]. Durch Lebensstiländerungen (z.B. Rauchstopp, Gewichtsverlust, regelmäßige Bewegung, mediterrane Ernährung) und medikamentöse Interventionen (vor Allem für Bluthochdruck, Cholesterin- und Blutzuckerspiegel), kann das Risiko der KHK deutlich reduziert werden [27-31]. Auch bei einer klinisch manifesten KHK ist durch Lebensstiländerungen ein deutlicher gesundheitlicher Benefit zu erzielen [32]. Weiterhin kann auch mit folgenden medikamentösen Maßnahmen eine positive Beeinflussung erreicht werden: Es werden vornehmlich Statine zur Senkung der LDL-Konzentration,  $\beta$ -Blocker, ACE-Hemmer und Angiotensin-II-Antagonisten zur

Einstellung des Blutdrucks, Metformin zur Blutzucker-Kontrolle bei komorbidem Diabetes mellitus Typ 2 und Acetylsalicylsäure zur Vermeidung thrombotischer Komplikationen empfohlen [33, 34]. Trotz dieser präventiven Therapiekonzepte schreitet die Krankheit bei vielen Patienten so weit fort, dass eine Intervention notwendig wird. Für diese Patienten kommen grundsätzlich zwei Verfahren infrage: Sie können eine Operation am offenen Herzen mit Einsatz eines arteriellen oder venösen Grafts wählen, einen sogenannten Koronararterien-Bypass, oder die minimalinvasive Aufdehnung eines stenosierten Gefäßes mit anschließender Stenteinlage, bekannt als perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA). Beide Verfahren haben heutzutage größtenteils getrennte Einsatzbereiche, die sich nur bei bestimmten Formen der stabilen KHK überschneiden [35]. Die PTCA hat sich über die letzten Jahrzehnte hinweg deutlich weiterentwickelt: Zu Beginn wurde der Fortschritt in der minimalinvasiven Kathetertechnik lediglich dazu genutzt, stenosierte Abschnitte im Bereich der Koronarien mittels Ballondilatation aufzudehnen. Der direkte Vergleich mit der koronararteriellen Bypass-Chirurgie zeigte bezüglich der Mortalität keinen Unterschied. Allerdings ergaben sich für die PTCA deutlich höhere Reinterventionsraten aufgrund von Restenosen im aufgedehnten Bereich [36, 37]. Das Verfahren wurde schnell um den Einsatz von unbeschichteten Metallstents, sog. Bare-Metal-Stents (BMS), erweitert, welche eine Restenose in dilatierten Bereichen verzögern sollten. Auch in der BMS-Ära zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Bypass-Chirurgie. Dies gilt insbesondere für die Endpunkte Myokardinfarkt und Apoplex. Gleichzeitig blieb die Reinterventionsrate in der BMS-Gruppe weiterhin deutlich höher [38]. Einen Meilenstein in der Entwicklung der PTCA stellte die Einführung sogenannter drug-eluting Stents (DES) dar. Dabei handelt es sich um BMS, die mit einem Polymer beschichtet sind, welches einen antiproliferativen Wirkstoff enthält. Dieser wird über einen längeren Zeitraum freigesetzt, mit dem Ziel, hyperproliferative Vorgänge im Bereich des Stents zu verhindern [39]. Anhand des verwendeten Wirkstoffs kann man DES in zwei Generationen unterteilen: Die erste Generation enthält Sirolimus und Paclitaxel, während die zweite Generation Everolimus und Zotarolimus verwendet [40]. Die erste DES-Generation zeigte im Vergleich zu BMS eine signifikant geringere Reinterventions-Rate bei insgesamt gleichbleibender Mortalität [41, 42]. Durch die Verwendung von DES der zweiten Generation verbesserten sich die Resultate in Bezug auf die Reinterventionsrate noch weiter [43-46]. Zusätzlich dazu wurde in

mehreren Studien ein Trend zu einer verringerten Inzidenz von Komplikationen (Myokardinfarkt und Stent-Thrombose) wahrgenommen, sowie eine geringere Mortalitätsrate [44-48]. Besonders eindrücklich ist die deutliche Reduktion im Auftreten von späten Stent-Thrombosen, die zusammen mit In-Stent-Restenosen eine der großen Herausforderungen für das Stent-Design darstellen [49, 50]. Trotz dieser bemerkenswerten Fortschritte zeigt sich in groß angelegten Meta-Analysen bei stabiler KHK weiterhin keine Überlegenheit der PTCA gegenüber der Bypass-Operation. Bei langfristiger Nachbeobachtung zeigt die Bypass-Operation ein günstigeres Risikoprofil hinsichtlich einiger Endpunkte [51-53]. Eine generelle Bevorzugung der PTCA bei Patientenkollektiven mit stabiler KHK ist daher noch nicht in greifbarer Nähe, der standardisierten Nutzung in Notfallsituationen zum Trotz [54]. Die Forschung an Stents, die Restenosen langfristig verhindern können, bleibt somit sinnvoll und notwendig. Einen theoretischen Ansatzpunkt in der Pathogenese der In-Stent-Restenose stellt die Leukodiapedese dar.

### **1.5 Leukodiapedese**

Hinter dem Begriff Leukodiapedese verbirgt sich ein komplexes mehrstufiges Geschehen auf molekularer Ebene, an dessen Ende die Migration eines Leukozyten durch die Endothelschicht steht. Prinzipiell wird durch eine Reihenschaltung von Rezeptor-Liganden-Systemen zunächst eine Verlangsamung und anschließend ein Andocken von Leukozyten an das Endothel eines lokalen inflammatorischen Herdes vermittelt.

Die Leukodiapedese beginnt mit einer lokalen Entzündungsreaktion, die mittels einer Vielzahl von Entzündungsmediatoren einen Einfluss auf Proteinbesetzung der Endothelzellen nimmt: Bei Kontakt mit proinflammatorischen Zytokinen werden aus endothelspezifischen Organellen, den sogenannten Weibel-Palade-Körperchen, präformierte P-Selektine freigesetzt, welche mit Liganden auf der Leukozytenoberfläche eine kurze Bindung eingehen. Die Leukozyten werden durch die kurze Refraktärzeit der Rezeptoren immer wieder verlangsamt und der Endothelschicht angenähert. Es kommt zu einem sogenannten Abrollen auf dem Endothel, wodurch reichlicher Kontakt zwischen der Leukozyten- und Endotheloberfläche hergestellt wird. Das aktivierte Endothel exprimiert eine Vielzahl von proinflammatorischen Substanzen und Chemokinen an seiner Oberfläche, die ebenfalls aktivierend auf Leukozyten wirken. Besonders hervorzuheben ist dabei die

Aktivierung der sogenannten Leukozytenintegrine. Dabei handelt es sich um eine Klasse von Adhäsionsrezeptoren, die erst nach Kontakt zu den proinflammatorischen Substanzen auf der Endotheloberfläche in die aktive, Liganden-bindende Konformation übergeht. Die meisten Leukozyten tragen  $\beta$ 2-Integrine auf ihrer Oberfläche. Diese binden die Adhäsionsmoleküle Intercellular Adhesion Molecule (ICAM) 1 und 2, welche auf der Endothelzelloberfläche exprimiert werden. Die Bindung an die ICAM-Moleküle ermöglicht das Andocken der Leukozyten an die Endothelzelle und damit einen Stillstand aus dem Abrollen. Zusätzlich werden die ICAM-Moleküle auch von Lymphocyte Function-Associated Antigen-1 (LFA-1) und Macrophage-1 Antigen (Mac-1), zwei weiteren Oberflächenproteinen aus der Gruppe der Integrine, gebunden. Die zeitweise Bindung dieser Moleküle erlaubt eine kriechende Bewegung der Leukozyten entlang der Endotheloberfläche in Richtung Interzellulärspalt. Dort erfolgt dann die eigentliche Diapedese: Der Leukozyt durchtritt am Übergang zwischen zwei Zellen amöboid die Endothelzellschicht. Bis hin zur Migration durch das Endothel sind alle Bindungsprozesse reversibel [55]. Die Blockade eines einzelnen Schrittes innerhalb dieses komplexen Geschehens könnte daher dazu führen, dass die Leukozytenmigration durch die Endothelschranke deutlich abnimmt. Dies wäre systemisch sicherlich fatal, birgt aber als lokale Maßnahme ein enormes Potential, da pathologische Entzündungsreaktionen die Ursache einer Vielzahl von Erkrankungen darstellen.

In den vorliegenden Versuchen wurde das endotheliale ICAM-1 als Zielmolekül für ein lokalisiertes Gen-Silencing bestimmt.

## **1.6 Pathophysiologie der Restenose**

Restenotische Areale mögen auf den ersten Blick atherosklerotischen Veränderungen ähneln. Die Pathophysiologie der beiden Erscheinungen ist jedoch sehr verschieden: Während atherosklerotische Plaques vornehmlich auf der Ablagerung von Lipiden und dem damit zusammenhängenden pathologischen Makrophagen-Verdau beruhen, fußt die Entwicklung von Restenosen auf lokalen Entzündungsreaktionen, die durch Endotheltraumata angeregt werden. Die Entwicklung der Restenose beginnt schon mit der Implantation des Stents: Die Ballondilatation fügt dem Gefäßabschnitt zahlreiche intimale Traumata zu und es kommt zu einer stellenweisen Endotheldenudation mit nachfolgender physiologischer

Entzündungsreaktion [56, 57]. Im Zuge dieser Entzündungsreaktion werden im Bereich der Tunica Intima Entzündungsmediatoren freigesetzt, welche die Expression von Leukodiapedese-vermittelnden Adhäsionsmolekülen, wie z.B. ICAM-1, auf der Oberfläche von Endothelzellen im Areal des Stents triggern [58]. Dies hat eine vermehrte Migration von Leukozyten in die Gefäßwand zur Folge, welche nun eine Entzündungsreaktion innerhalb der Tunica Intima medieren [56]. Die glatten Muskelzellen in der Tunica Media reagieren auf die erhöhte Konzentration an Entzündungsfaktoren mit einer Migration in den heilenden Bereich der Intima, genannt Neointima, und beginnen dort, stark zu proliferieren. Diese Proliferation ist maßgeblich für die Verengung des Gefäßlumens verantwortlich [59, 60]. Der Stent reizt das umliegende Endothel weiterhin und trägt somit dazu bei, dass die Entzündung anhält [57]. Die permanent hohen Konzentrationen an Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen erleichtern die Migration von Leukozyten weiterhin, die Entzündung kann nicht unterbunden werden und das Gefäß verengt sich zunehmend [61, 62]. Über einen längeren Zeitraum hinweg kommt es zu einem Umbau der neointimalen Struktur, wobei die Zelldichte abnimmt und deutlich mehr kollagenhaltige EZM gebildet wird [57, 63]. Die Restenose des Gefäßbereichs endet mit der Reendothelialisierung. Diese tritt auf lange Sicht auch von allein ein, allerdings ist die neointimale Hyperproliferation bis dahin schon so weit fortgeschritten, dass eine Intervention meist nicht vermeidbar ist. Eine frühe Reendothelialisierung könnte die entzündliche Kaskade, die in eine intimale Proliferation mündet, möglicherweise unterbrechen. Diese wäre durch ein gezieltes Gen-Silencing von ICAM-1 in der Theorie vermittelbar. Die Suppression des ICAM-1-Gens könnte durch die lokale Transfektion des Gefäßendothels im Stent-Bereich mit spezialisierten synthetischen RNA-Molekülen erreicht werden.

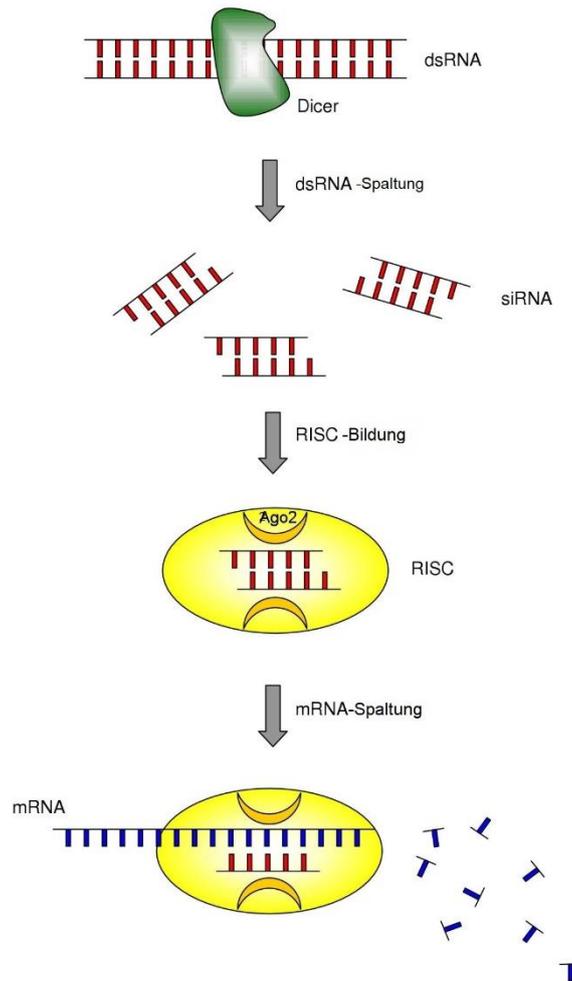
## 1.7 Transfektion

Unter dem Begriff Transfektion versteht man in der Zellbiologie das Einbringen von fremder DNA oder RNA in eukaryotische Zellen. Eine Transfektion kann transient, also vorübergehend, oder stabil erfolgen. Eine stabile Transfektion wird durch den Einbau einer fremden Nukleinsäure in das Wirtsgenom erreicht. Die transiente Transfektion ist hingegen durch den Abbau der fremden Nukleinsäure in der Wirtszelle zeitlich limitiert. Die Bindung an eine komplementäre, proteinkodierende messenger RNA (mRNA), kann deren Degradation herbeiführen und so die Translation in das codierte Protein unterbinden [64]. In Therapieverfahren und Versuchen, die small interfering RNA (siRNA) und microRNA (miRNA) verwenden, werden transiente Transfektionsverfahren genutzt, da die eingebrachten RNA-Moleküle selbst Effektor der Therapie sind und nicht für Effektorproteine codieren. SiRNA und miRNA unterscheiden sich in Bildung und Struktur, können aber beide zur Degradation von mRNA-Molekülen führen. Heutzutage stehen eine Fülle von Transfektionsmethoden physikalischer, chemischer und biologischer Natur zur Verfügung. Die Eignung dieser Verfahren für ein konkretes Experiment hängt von der Zelllinie, der zu transfizierenden Zellzahl sowie der verwendeten Nukleinsäure ab. In den vorliegenden Versuchen wurde die Lipofektion angewendet. Dabei bilden die zu transportierenden, negativ geladenen Nukleinsäuren Komplexe mit kationischen Liposomen oder Micellen. Diese können die Zellmembran über endozytotische Mechanismen überwinden und gelangen so ins Zytoplasma. Die Liposomen bestehen meist aus einem Gemisch von herkömmlichen Membranlipiden wie Cholesterol, Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin mit positiv geladenen Lipiden wie 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propan (DOTAP), N-[1-(2,3-Dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid (DOTMA) und Dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) [65]. Da mit der Endozytose ein natürlicher Transportmechanismus ausgenutzt wird, scheint die Lipofektion auf den ersten Blick wenig invasiv. Es wurde jedoch nachgewiesen, dass die verwendeten, positiv geladenen Lipide eine gewisse proinflammatorische und proapoptotische Wirkung vermitteln [66]. Die Menge an Lipiden muss daher stets an die Zelllinie angepasst werden, um unerwünschte Nebeneffekte zu verhindern.

## **1.8 RNA-vermitteltes Gen-Silencing und RNA-Interferenz**

In der medizinischen Forschung besteht seit jeher ein großes Interesse daran, Expressionsmuster verschiedener Proteine möglichst kontrolliert zu beeinflussen. Ein besonders eleganter Weg, die Synthese eines Zielproteins zu regulieren, ist das sogenannte Gen-Silencing. Darunter versteht man regulatorische Maßnahmen, die zwischen Transkription und Translation in die Proteinbiosynthese eingreifen. Man unterscheidet dabei transkriptionelles und post-transkriptionelles Gen-Silencing [67, 68]. In den etablierten Versuchen wurde ausschließlich posttranskriptionelles Gen-Silencing mittels RNA-Interferenz (RNAi) genutzt. Dabei wird die mRNA des Zielproteins durch siRNA komplementär gebunden. Der inerte Komplex aus den beiden RNA-Molekülen wird anschließend abgebaut und das Zielprotein nicht synthetisiert [69]. Der erste Beweis einer genetischen Interferenz durch RNA-Moleküle erfolgte 1998 durch Fire, Mello *et al.*. In ihren Versuchen an Fadenwürmern der Gattung *Caenorhabditis elegans* stellten sie fest, dass das Einbringen einer zur codierenden Sequenz komplementären, doppelsträngigen DNA zu einer signifikanten Verminderung der Genaktivität führte. Das Einbringen von einzelsträngiger RNA führte hingegen zu keinem gerichteten Effekt [70]. Nachfolgend stellte sich heraus, dass siRNA-Moleküle aus exogen eingeführten RNA-Molekülen, aber auch endogen gebildet werden und somit einen Einfluss auf die Genexpression nehmen können [71, 72]. Endogen gebildete siRNA wird nicht direkt als Doppelstrang mit 20-25 Basen synthetisiert, sondern aus einem doppelsträngigen RNA-Molekül isoliert, welches bedeutend länger ist. Besagtes Vorläufermolekül wird durch das Protein Dicer, welches Enzymen der RNase-III-Familie ähnelt, in 20-25 Basenpaare lange, doppelsträngige Fragmente geschnitten (Abb.3) [73]. Die Bindung an die Ziel-mRNA und die nachfolgende Spaltung des hybridisierten RNA-Moleküls wird durch den sogenannten „RNA-induced-silencing complex“ (RISC) vorgenommen [74]. Dieser besteht aus dem Antisense-Strang (auch Leitstrang) der siRNA, welcher von mehreren Enzymen gebunden wird [74]. Zusammen mit TAR-RNA binding protein (TRBP) und Argonaute 2 (Ago2), dem Schlüsselenzym des RISC, bildet Dicer den sogenannten RISC-loading complex (RLC), der die Bindung eines einzelsträngigen siRNA-Fragments an Ago2 katalysiert. Durch Bindung des siRNA-Leitstrangs an Ago2 wird der RISC aktiviert, die Suche nach der komplementären mRNA beginnt. Die Bindung der komplementären mRNA initiiert die Spaltung des Hybridmoleküls aus siRNA und mRNA [74]. Diese wird von Ago2,

welches strukturell der RNase H ähnelt, durchgeführt [74]. Einige Details des RNAi-Weges sind noch nicht vollständig geklärt, beispielsweise die Auftrennung des doppelsträngigen siRNA-Moleküls oder die mRNA-Suche. Der Ort des Silencings wurde mittlerweile jedoch identifiziert: Der Großteil der beschriebenen Prozesse findet in den sogenannten „processing bodies“ (p-bodies) statt. Dabei handelt es sich um mikroskopisch abgrenzbare Verdichtungen im Zytoplasma, in denen die gesamte Enzym-Maschinerie des RNA-Abbaus konzentriert wird [75]. Wie jedes andere RNA-Molekül hat auch die siRNA eine gewisse Halbwertszeit, die einen limitierenden Faktor für viele Therapiemodelle darstellt. Daher hat die Verlängerung besagter Halbwertszeit einen hohen Stellenwert für die RNAi. Eine Verlängerung kann einerseits durch Modifikation des RNA-Moleküls, z.B. am Phosphat-Rückgrat oder dem 3'-OH-Ende der RNA, aber auch durch den Einsatz einer Carriersubstanz erfolgen, die den Abbau der RNA durch Endo- und Exonucleasen verzögert und/oder die negativ-geladene RNA bindet [76-79]. Die Halbwertszeit einer nackten RNA, die etwa bei 15 Minuten liegt, kann so auf mehrere Stunden verlängert werden [76, 79].



**Abbildung 3: Ablauf der RNA-Interferenz.** Die doppelsträngige siRNA wird durch Dicer in kurze Fragmente geschnitten. Diese Fragmente werden durch Bindung an Argonaute 2 in den RNA-Induced Silencing Complex eingebunden, welcher nach Bindung der komplementären mRNA eine Spaltung des mRNA-Strangs herbeiführt. dsRNA : doppelsträngige siRNA; Ago2 : Argonaute 2; RISC : RNA-Induced Silencing Complex; siRNA: small-interfering RNA (Modifiziert nach Simone Mocellin and Maurizio Provenzano, RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology, Journal of Translational Medicine, Vol. 2, 2004, eigenes Werk. lizenziert nach CC BY-SA 2.0, [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mechanism\\_of\\_RNA\\_interference.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mechanism_of_RNA_interference.jpg)).

### 1.9 Bedeutung von Atelokollagen

Kollagen ist eines der am häufigsten vorkommenden Proteine im menschlichen Körper. Als eines der bedeutsamsten Strukturproteine kommt es in unterschiedlichen Formen nahezu ubiquitär vor, beispielsweise in Knochen- und Knorpelgewebe, in der Basalmembran und in der EZM [80]. Der Grundaufbau ist allen Kollagenen gemeinsam: Sie formen eine rechtsgängige Triple-Helix, die sich wiederum aus drei linksgängigen Kollagen- $\alpha$ -Ketten zusammensetzt [80]. Kollagen- $\alpha$ -Ketten bestehen zu großen Teilen aus der sich wiederholenden Peptidsequenz Glycin-X-Y,

speziesspezifische Abweichungen finden sich nur an den Enden des Moleküls, den sogenannten Telopeptiden [80]. Der weitaus größere Teil des Moleküls ist jedoch generisch und zeigt im Vergleich zwischen unterschiedlichen Säugetierarten keinen Unterschied im Aufbau [81]. Bei Atelokollagen handelt es sich um Rinder-Kollagen vom Typ I, welches durch enzymatischen Verdau mittels Proteasen seine Telopeptide verliert und somit noch weniger immunogen ist als das bereits verträgliche Vorläufermolekül [82, 83]. Bei dem Protease-Verdau kommt es weiterhin durch Lösen der Cross-Links zwischen den einzelnen Kollagenmolekülen zu einer Verflüssigung des Telopeptid-freien Kollagens, was sich für die Herstellung verschiedener Darreichungen als sehr nützlich erweist [84]: So kann das verflüssigte Kollagen beispielsweise in Watte- oder Schwammform gebracht werden, was für Zwecke der Blutstillung und der 3D-Zellkultivierung nützlich sein kann [84]. In geringeren Konzentrationen ist auch eine Zubereitung als Gel oder Film möglich. Besonderes Potential zeigt Atelokollagen als Trägersubstanz für Ribonukleinsäuren. In mehreren Studien konnte die Halbwertszeit zu transportierender RNA mithilfe einer Atelokollagen-Matrix maßgeblich verlängert werden [85-88]. Dies scheint der außerordentlichen Bindungsstruktur zwischen dem Phosphat-Rückgrat der RNA und Hydroxyl-Gruppen des Atelokollagenmoleküls geschuldet zu sein: Ein RNA-Molekül bindet vier Kollagenmoleküle über Wasserstoffbrückenbindungen, sichert sich so eine gewisse Sicherheit gegenüber Exo- und Endonukleasen und erleichtert gleichzeitig die Fibrillenbildung der Kollagenmoleküle [89]. Ein weiterer Nutzen des Atelokollagen ergab sich in Versuchen zu RNA-vermitteltem Gen-Silencing, in denen eine transfektionsfördernde Wirkung des Komplexes nachgewiesen werden konnte [90]. Insgesamt scheint Atelokollagen aufgrund seiner ausgezeichneten Verträglichkeit und der besonderen Bindungskapazitäten für RNA eine herausragende Trägersubstanz für die RNA-Interferenz *in vivo* darzustellen [90].

### **1.10 Ziel der Dissertation**

Das Ziel der vorliegenden Dissertation ist die Prävention der In-Stent-Restenose durch Optimierung der Stent-Beschichtung. Hierbei wurde eine experimentelle Stent-Beschichtung auf Atelokollagen-Basis *in vitro* getestet, die die Expression des Oberflächenproteins ICAM-1 (CD54) auf Endothelzellen reduziert und somit eine Migration von Leukozyten in die Intima verhindert. Das Augenmerk wurde dabei auf die Effizienz und die Dauer des ICAM-1-Knockdowns gelegt. Da es sich hierbei um Versuche handelt, die einem potentiellen Medizinprodukt vorausgehen, wurde

weiterhin die Verträglichkeit der Beschichtungen mit dem menschlichen Organismus getestet, insbesondere das Verhalten der Beschichtungen bei Kontakt mit menschlichem Blut.

Eine derartige Stent-Beschichtung könnte auf zellulärer Ebene theoretisch dazu beitragen, dass geschädigte Endothelzellschichten in Stent-Bereichen schneller als bisher abheilen können, sodass die pathologische Entzündungsreaktion, die der Restenose zugrunde liegt, unterbunden wird. Da die Restenose im Stentbereich momentan den limitierenden Faktor für die Langzeitprognose nach Stentimplantation darstellt, könnte so in Zukunft eine Ausweitung der PTCA-Indikation erreicht werden. So könnten viele invasive Operationen am offenen Herzen zugunsten der minimalinvasiven PTCA eingespart werden.

## 2. Material und Methoden

Alle beschriebenen Versuche wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe S1 mit entsprechender Ausstattung durchgeführt.

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

Die folgende Tabelle 1 enthält alle Geräte, die im Verlauf der experimentellen Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 1: Verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Standort</b>
<b>Sicherheitswerkbank Herasafe HS12</b>	Thermo Fischer Scientific	Langenselbold, Deutschland
<b>Sicherheitswerkbank Klasse 2</b>	BDK Luft-und Reinraumtechnik GmbH	Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
<b>Autoklav Systec DX-23</b>	Systec GmbH	Wettenberg, Deutschland
<b>Mikroskop Axiovert 135</b>	Carl Zeiss AG	Jena, Deutschland
<b>FACScan™ BD</b>	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
<b>Zentrifuge 5415 Eppendorf</b>	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
<b>Mithras LB 940 Mikroplattenleser</b>	Berthold Technologies GmbH & Co. KG	Bad Herrenalb, Deutschland
<b>Zentrifuge MiniSpin plus</b>	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
<b>qRT-PCR iCycler BIO RAD</b>	BIO RAD Laboratories GmbH	Hercules, Kalifornien, USA
<b>Absaugpumpe KNF-Lab</b>	KNF Neuberger GmbH	Freiburg, Deutschland
<b>Wasserbad GFL 1083</b>	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH	Burgwedel, Deutschland
<b>Zentrifuge Cryofuge 5500i</b>	Heraeus Instruments	Osterode,

	GmbH	Deutschland
<b>Bio Vortex V1</b>	PEQLAB Biotechnologie GmbH	Erlangen, Deutschland
<b>Brutschrank Heraeus 6000</b>	Thermo Fisher Scientific	Langenselbold, Deutschland
<b>Micros 60</b>	ABX Diagnostics	Montpellier, Frankreich
<b>CASY® Zellzähler</b>	Schärfe System GmbH	Reutlingen, Deutschland
<b>Zentrifuge Varifuge 3.2RS Sepatech</b>	Heraeus Instruments GmbH	Osterode, Deutschland
<b>Ultraschallbad Bandelin Sonorex</b>	Bandelin Electronic GmbH & Co. KG	Berlin, Deutschland
<b>FD 23 Wärmeschrank</b>	Binder GmbH	Tuttlingen, Deutschland

Alle verwendeten Materialien und Chemikalien mit Hersteller und zugehörigem Standort werden in den folgenden Kapiteln aufgelistet.

### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

In der folgenden Tabelle 2 werden Materialien aufgeführt, die für den Einmalgebrauch bestimmt sind.

**Tabelle 2:** Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Standort</b>
<b>1,5 ml DNA LoBind Tube</b>	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
<b>1,5 ml Protein LoBind Tube</b>	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
<b>2,0 ml DNA LoBind Tube</b>	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
<b>2,0 ml Protein LoBind Tube</b>	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
<b>Falcon® 50 ml Centrifuge Tube</b>	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
<b>1,5 ml Safe Lock Tubes</b>	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
<b>Zellkulturflasche 75 cm<sup>2</sup></b>	Corning Incorporated	New York, USA

<b>Zellkulturflasche 150 cm<sup>2</sup></b>	Corning Incorporated	New York, USA
<b>24–Well-Platte, transparent</b>	Corning Incorporated	New York, USA
<b>96–Well-Platte, schwarz</b>	Corning Incorporated	New York, USA
<b>5 ml Reagenzglas</b>	Corning Incorporated	New York, USA
<b>TipOne® Pipettenspitzen (steril) 10 µl, 100 µl, 1000 µl</b>	Starlab Group	Hamburg, Deutschland
<b>Pipettenspitzen(steril) 10 µl, 100 µl, 1000 µl</b>	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
<b>CASY® Cups</b>	Schärfe System GmbH	Reutlingen, Deutschland
<b>Pasteurpipetten (Glas)</b>	WU Wilhelm Ulbrich GdbR Laborglaswaren	Mainz, Deutschland
<b>Glasplättchen 10 mm x 10mm x 1mm</b>	Marienfeld GmbH	Lauda-Königshofen, Deutschland

### 2.1.3 Medien und Lösungen

Die Tabellen 3, 4 und 5 fassen alle innerhalb der Versuche verwendeten Medien, Chemikalien und Kits zusammen.

**Tabelle 3:** Medien und Lösungen

<b>Medium/Lösung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Standort</b>
<b>Ampuwa®</b>	Fresenius Kabi	Bad Homburg, Deutschland
<b>NaCl 0,9 %</b>	Fresenius Kabi	Bad Homburg, Deutschland
<b>Trypsin/EDTA (0,05 %)</b>	Gibco®, Thermo Fisher Scientific	Carlsbad, USA
<b>Phosphate buffered saline (PBS)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
<b>Dulbecco's PBS without Ca &amp;</b>	Gibco®,	Carlsbad, USA

<b>Mg</b>	Thermo Fisher Scientific	
<b>Dulbeccos' Modified Eagle Medium(DMEM) 4,5 g/l Glucose , ohne Pyruvat und L-Glutamin</b>	Gibco®, Thermo Fisher Scientific	Carlsbad, USA
<b>L-Glutamin (200mM)</b>	Gibco®, Thermo Fisher Scientific	Carlsbad, USA
<b>Penicillin/Streptomycin (Pen Strep)</b>	Gibco®, Thermo Fisher Scientific	Carlsbad, USA
<b>Fetal Bovine Serum (FBS)</b>	Gibco®, Thermo Fisher Scientific	Carlsbad, USA
<b>CASYton</b>	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, Deutschland
<b>Humaner rekombinanter Tumornekrosefaktor-<math>\alpha</math> (TNF- <math>\alpha</math>)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
<b>CD54 - Antikörper</b>	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
<b>Lipofectamine® 2000</b>	Thermo Fisher Scientific	Carlsbad, USA
<b>FACSFlow™</b>	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
<b>FACSRinse™</b>	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
<b>FACSClean™</b>	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
<b>Hellmanex (verwendet in 2 %-iger Lösung)</b>	Hellma	Mühlheim, Deutschland
<b>Atelokollagen (3mg/ml)</b>	Cosmo Bio Co. Ltd.	Tokyo, Japan
<b>Natriumacetat</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland

Tabelle 4: Zusammengesetzte Lösungen

<b>Lösung + Zusatz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Standort</b>
<b>DMEM 4,5g/l Glucose + FBS + L-Glutamin(200mM) + Penicillin/Streptomycin = Medium für Ea.hy926</b>	Gibco®, Thermo Fisher Scientific	Carlsbad, USA
<b>Dulbecco's PBS without Ca &amp; Mg + FBS = Waschpuffer</b>	Gibco®, Thermo Fisher Scientific	Carlsbad, USA
<b>Dulbecco's PBS ohne Ca &amp; Mg + 12,5 g/500ml PFA = FACS-Lösung (Fixation)</b>	Gibco®, Thermo Fisher Scientific Merck KGaA	Carlsbad, USA Darmstadt, Deutschland

Tabelle 5: Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Standort</b>
<b>ASSERA-CHROM® β-Thromboglobulin</b>	Diagnostica Stago	Asnieres, Frankreich
<b>Aurum™ Total RNA Mini</b>	Bio-Rad Laboratories Incorporated	Hercules, USA
<b>First Choice® RLM- RACE</b>	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific	Carlsbad, USA
<b>ELISA-Kit</b>	Osteomedical GmbH	Bünde, Deutschland
<b>iQ™ SYBR® Green Supermix</b>	Bio-Rad Laboratories Incorporated	Hercules, USA

#### 2.1.4 siRNA-Sequenzen und Primer

Die Tabellen 6 und 7 fassen die verwendeten RNAs und die Primer für die 5`-RNA-Ligase-medierte Amplifikation von complementary DNA (cDNA)-Enden via

polymeraser Kettenreaktionsamt ihrer Sequenz zusammen. Dieses Verfahren unter Verwendung der RNA-Ligase findet sich in der englischsprachigen Literatur als *RNA-Ligase mediated rapid amplification of cDNA ends via polymerase chain reaction* (RLM-RACE-PCR). Alle siRNAs, mit Ausnahme der nicht-codierenden Scrambled-RNA (SCR), stammen von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland). Die SCR wird von der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) vertrieben. Qiagen macht keine Angaben über die Sequenz von nicht-codierenden RNAs, versichert aber, dass keine Homologie zu Säuger-Genen besteht. Weiterhin wird die SCR über den Affymetrix GeneChip-Array und eine Fülle von zellbasierten Versuchen getestet, um einen minimalen Einfluss auf die Genexpression und den Phänotyp der Zellen zu garantieren. Die verwendeten Primer wurden ebenfalls von Eurofins MWG Operon hergestellt.

**Tabelle 6:** Verwendete siRNAs

siRNA-Bezeichnung	Sequenz
<b>Intracellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), human</b>	Sense-Strang: 5'-GCC UCA GCA CGU ACC-UCU ATT-3'  Antisense-Strang: 5'-UAG AGG UAC GUG CUG AAG CTT-3'
<b>E-Selektin, Alexa Fluor 488-markiert</b>	Sense-Strang: 5'-UUG AGU GGU GCA UUC AAC CTT-3'  Antisense-Strang: 5'-GGU UGA AUG CAC CAC UCA ATT-3'
<b>Scrambled RNA</b>	Sequenz von der Firma Qiagen nicht veröffentlicht

**Tabelle 7:** Primer der 5'-RNA ligase mediated rapid amplification of cDNA ends via polymerase chain reaction (5'-RLM RACE-PCR)

Primer-Bezeichnung	Sequenz
<b>ICAM-1 Erststrang</b>	5'-AGGTACCATGGCCCCAAATG-3'
<b>ICAM-1 RACE 1</b>	5'-ACTCTGTTTCAGTGTGGCACC-3'
<b>ICAM-1 RACE 2</b>	5'-TCTTCCTCGGCCTTCCCATA-3'
<b>ICAM-1 RACE 3</b>	5'-TGGCCCCAAATGCTGTTGTA-3'-

<b>RNA-Adapter (universell)</b>	5'-GCUGAUGGCGAUGAAUGAACACUGC GUUUGCUGGCUUUGAUGAAA-3'
<b>Äußerer Primer (universell)</b>	5'-GCTGATGGCGATGAATGAACACTG-3'
<b>Innerer Primer (universell)</b>	5'CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG-3'

### 2.1.5 Zelllinie

Die Zelllinie Ea.hy926 der Firma LGC Standards GmbH (Wesel, Deutschland) wurde in allen Versuchen verwendet. Dabei handelt es sich um eine immortalisierte Endothelzelllinie, die aus der Hybridisierung von Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene (Human Umbilical Vein Endothelial Cells [HUVECs] ) mit A549-Zellen hervorgeht, welche einem Adenokarzinom entstammen [91]. Ea.hy926-Zellen gleichen sowohl von der Morphologie als auch vom Proteom her makrovaskulären Endothelzellen und haben sich daher rasch als *in-vitro*-Modell für vaskuläre Forschung etabliert.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Atelokollagen-Verdünnung

Das in einer Konzentration von 3 mg/ml vorliegende Kollagen wurde unter sterilen Bedingungen durch Zugabe von 5 mM Natriumacetat (pH 5,5) auf nachfolgende Konzentrationen für die Versuche verdünnt: 0,064 %, 0,032 %, 0,016 % und 0,008 %.

### 2.2.2 Verwendete siRNAs

Wie in Tabelle 6 schon aufgezeigt, wurden insgesamt drei verschiedene RNAs verwendet. Die unmarkierte ICAM-1-siRNA wurde in allen Knockdown-Versuchen genutzt, während die Alexa Fluor 488-markierte siRNA gegen E-Selektin in den Versuchen zur Transfektionseffizienz eingesetzt wurde. Die SCR wurde in den Knockdown-Versuchen als Negativkontrolle verwendet. Sie besteht in der Summe aus den gleichen Basen wie die ICAM-1-siRNA, allerdings in zufälliger Reihenfolge. Dadurch kann nachgewiesen werden, dass die RNA-Interferenz nicht auf Nebeneffekten des Transfektionsvorganges mit einer RNA beruht, sondern an die Sequenz der siRNA gekoppelt ist.

### 2.2.3 Vorbereitung der Glasplättchen

Die Atelokollagen-Beschichtung wurde auf Glasplättchen angesetzt. Ein Plättchen hatte dabei die Maße 10 x 10 x 1mm. Die Reinigung der Plättchen erfolgte in einem Ultraschall-Bad mit 2 %-iger Hellmanex-Lösung und anschließendem Spülen mit ddH<sub>2</sub>O. Die nassen Plättchen wurden mit Druckluft getrocknet und für 4 Stunden in einem Heizofen (Binder, Deutschland) bei 200 °C sterilisiert, bevor sie für die Versuche herangezogen wurden.

### 2.2.4 Herstellung der Atelokollagen/siRNA-Beschichtungen

Die verschiedenen Atelokollagen-Konzentrationen (0,008 %, 0,016 %, 0,032 % und 0,064 %) wurden durch Verdünnen der Stammlösung mit Natriumacetat-Puffer hergestellt. Die siRNA (20 µM) wurde mit 0,15 M NaCl verdünnt. Je nach Versuch wurde das Transfektionsmittel Lipofectamine 2000 hinzugefügt. Die Lipofectamine-Menge wurde nach u.g. Schema (Tabelle 8) an die siRNA-Menge angepasst. Die beiden zubereiteten Lösungen (verdünntes Atelokollagen und verdünnte siRNA+/- Lipofectamine) wurden für 10 Minuten separat inkubiert und anschließend vermischt. Die resultierende Lösung wurde kurz mit dem Vortexmischer gemischt, zentrifugiert und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Komplexbildung zwischen Atelokollagen und siRNA zu begünstigen. Im Anschluss daran wurden die oben beschriebenen Glasplättchen mit jeweils 100 µl dieser Lösung bedeckt und unter sterilen Bedingungen luftgetrocknet. Für Kontrollbeschichtungen wurde derselbe Prozess durchlaufen, allerdings ohne siRNA- und Lipofectamine-Zugabe. Für die FACS-Kontrolle wurden unbeschichtete Plättchen verwendet.

**Tabelle 8:** Lipofectamine-Menge in Abhängigkeit der siRNA-Menge.

siRNA-Menge	Lipofectamine
1 µg	1 µl
2,5 µg	2 µl
5 µg	3 µl

### 2.2.5 Transfektion von EA.hy926 mittels siRNA-haltiger Atelokollagen-Beschichtungen

Die beschichteten Plättchen wurden unter sterilen Bedingungen in die Wells einer 24-Well Platte gelegt und mit jeweils 75.000 EA.hy926-Zellen in einem Volumen von 50 µl beimpft. Nach 30-minütiger Inkubation wurde jedem Well 1 ml Medium

zugegeben. Die Zellen wurden 48 Stunden in einem Brutschrank bei 37 °C kultiviert. Anschließend erfolgte die Auswertung zur Bestimmung der Transfektionseffizienz bzw. des ICAM-1 Knockdowns mittels Durchflusszytometrie. Für die Langzeitversuche musste aufgrund der längeren Kultivierungszeit von bis zu acht Tagen die initial ausgesäte Zellzahl abgeändert werden: Statt der sonst verwendeten 75.000 Ea.hy926 wurde die initiale Saat auf 30.000 Zellen für viertägige Kultivierung, 23.000 Zellen für sechstägige Kultivierung und 15.000 Zellen für achttägige Kultivierung reduziert. Um die Effizienz der Plättchen-vermittelten Transfektion bewerten zu können, wurde eine Vergleichsgruppe eingeführt, in der die Zellen mittels Zugabe der Transfektionskomplexe in das Medium transfiziert wurden. Dazu wurden die Zellen vierundzwanzig Stunden vor der Transfektion in 24-Well-Platten ausgesät und kultiviert. Die Transfektion erfolgte mit den Transfektionskomplexen bestehend aus Atelokollagen, siRNA und Lipofectamine, welche auch für die Plättchenbeschichtung verwendet wurden. Nach vier Stunden wurde das Medium dieser Wells samt Transfektionslösung verworfen und gegen frisches Vollmedium ausgetauscht. Bis zum Zeitpunkt der Datenerhebung mittels Durchflusszytometrie fand ein Mediumswechsel im Abstand von zwei Tagen statt.

### **2.2.6 Freisetzung der Alexa-Fluor® 488-markierten E-Selektin-siRNA AF488**

Der Freisetzungsversuch diente dazu, ein Freisetzungsprofil für verschiedene siRNA- und Atelokollagen-Konzentrationen zu erstellen. Dazu wurden Beschichtungen mit den Atelokollagen-Konzentrationen 0,008 % und 0,032 % mit unterschiedlichen siRNA-Mengen (1 µg, 2,5 µg, 5 µg) der fluoreszenzmarkierten E-Selektin-siRNA AF488 kombiniert. Die Beschichtungen wurden nach der oben beschriebenen Technik hergestellt und die getrockneten Plättchen in einer 24-Well-Platte platziert. Anschließend wurde jedem Well 1 ml phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline, [PBS]) zugegeben. Die 24-Well-Platte wurde dann in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Zu festgelegten Zeitpunkten wurden aus jedem Well drei Proben aus dem Überstand entnommen und in eine 96-Well-Platte übertragen. Die Fluoreszenz dieser Proben wurde mithilfe des Mikroplattenlesers (Mithras LB 920) bei einer Anregungswellenlänge  $\lambda_{ex} = 485$  nm und einer Emissionswellenlänge von  $\lambda_{em} = 535$  nm gemessen.

### **2.2.7 Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Transfektionseffizienz und des Knockdowns**

Sowohl die Transfektionseffizienz, als auch der Knockdown des ICAM-1-Proteins wurden über „Fluorescence Activated Cell Sorting“ (FACS) gemessen. Dafür wurden die Zellen zunächst mit 1ml PBS pro Well gewaschen und abgelöst. Danach wurden die Zellen der jeweiligen Wells separat in Reagenzgläsern mit 5 ml Füllvolumen mittels 2,5 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Die nachfolgende FACS-Analyse umfasste 5.000 Zellen pro Probe und wurde mit dem Gerät FACScan™ durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels der zugehörigen Software CellQuestPro (Becton Dickinson GmbH). Für die Messung des ICAM-1-Knockdowns wurden die Zellen in der 24-Well Platte für 14 Stunden mit 5 µl/ml Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) einem hochpotenten Entzündungsmediator, inkubiert, um die Expression von ICAM-1 auf der Zelloberfläche zu induzieren [92]. Um das ICAM-1 Protein auf der Zelloberfläche zu markieren, erfolgte eine Immunofluoreszenzfärbung. Diese wurde mit dem Maus-Antikörper, der gegen humanes CD54 gerichtet ist, durchgeführt. Dieser Antikörper wurde mit einem Volumen von 1,65 µl in 500 µl PBS (500 µl PBS pro Well) verdünnt. Nach 30-minütiger Antikörperinkubation unter Kultivierungsbedingungen wurden die Zellen wie oben beschrieben gewaschen, abgelöst und mit PFA in einzelnen Reagenzgläsern fixiert. Diese wurden in der Folge für die FACS-Analyse verwendet. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte anhand des geometrischen Mittels des Fluoreszenzniveaus. Dafür wurden jeweils 5.000 Zellen gemessen.

### **2.2.8 Viabilitätstests: Messung der Zellzahl und inverse Mikroskopie**

Die Verträglichkeit der Atelokollagen-Beschichtungen wurde mithilfe des CASY® - Zellzählers sowie mittels inverser Mikroskopie evaluiert. Es wurden Beschichtungen unterschiedlicher Atelokollagen-Konzentrationen (0,008 %; 0,016 %; 0,032 %; 0,064 %) ohne Zugabe von siRNA und Lipofectamine verwendet. Als Kontrolle dienten unbeschichtete Glasplättchen. Auf jedes Plättchen wurden 75.000 EA.hy926 ausgesät, welche für 48 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert wurden. Die Zellen wurden gewaschen, abgelöst und anschließend mit dem CASY®-Zellzähler gezählt, welcher anhand des elektrischen Widerstands tote von lebenden Zellen unterscheiden kann. Morphologie und Wachstumsmuster der EA.hy926 konnten über ein inverses Mikroskop des Typs Axiovert 135 der Firma Zeiss nach 24-stündiger Inkubation beurteilt werden. Die zugehörige Software wurde für Bilderfassung und -bearbeitung verwendet.

### **2.2.9 Hämokompatibilität**

Im Entwicklungsprozess von Medizinprodukten ist es mittlerweile verpflichtend, einen Nachweis über die Biokompatibilität des Produktes zu erbringen. Die Biokompatibilität wird dabei in die Unterpunkte Zytokompatibilität und Hämokompatibilität unterteilt. Die DIN EN ISO Normenreihe 10993-4 fordert in Hinblick auf die Hämokompatibilität mindestens je einen validen Test für die Unterkategorien Hämatologie, thrombotische Faktoren, Entzündungswerte und das Komplementsystem. Auf Grund dieser Vorgaben wurde die Kompatibilität der beschichteten Plättchen getestet. Da Glas und andere negativ geladene Oberflächen den intrinsischen Weg der Gerinnungskaskade beeinflussen, war es notwendig, beide Glasseiten des Plättchens zu beschichten. So konnten etwaige Verfälschungen hämostatische Faktoren betreffend weitestgehend vermieden werden. Es wurden verschiedene Beschichtungen mit 0,032 % Atelokollagen-Konzentration getestet, um den ungünstigsten Fall zu untersuchen: Die zugrundeliegende 0,032 % Beschichtung wurde a) ohne Zusätze verwendet, b) in Kombination mit Lipofectamine und c) mit Zusatz von Lipofectamine und 5 µg siICAM-1. Zusätzlich wurden unbeschichtete Plättchen getestet, deren 0-Stunden- und 1-Stunden-Wert als Kontrollwerte und Basislinie genutzt wurden. Der Versuchsablauf gestaltete sich wie folgt: Die verschiedenen Plättchen wurden bei 37 °C in Reagenzgläsern mit 14 ml Humanblut auf einem Wippschüttler inkubiert. Alle Tests wurden mit sechs Blutproben von sechs verschiedenen Spendern durchgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde zunächst ein kleines Blutbild mithilfe des hämatologischen Analysegeräts Micros 60 erstellt. Ermittelt wurden dabei die Erythrozytenzahl, die Leukozytenzahl und die Thrombozytenzahl. Zusätzlich dazu wurde noch eine Differenzierung der Leukozytenzahl in Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten vorgenommen, um im Falle einer Entzündungsreaktion Rückschlüsse ziehen zu können. Die Konzentration der Komplementfaktoren C3a und SC5b9 wurde über Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISAs) bestimmt. Dabei handelt es sich um ein Antikörper-gesteuertes Verfahren, bei dem die Zielsubstanz zunächst mit einem Antikörper markiert wird, welcher dann wiederum an den Fc-Teil des zweiten Antikörpers gebunden wird. Dieser zweite Antikörper verfügt über ein Enzym, welches das farblose Substrat, genannt Chromogen, in eine farbige Substanz umsetzt, deren Extinktion Rückschlüsse auf die Konzentration des markierten Ziels erlaubt. Um das Ausmaß

der Degranulation neutrophiler Granulozyten als Reaktion auf die Plättchen einschätzen zu können, wurde weiterhin ein Spiegel für die Polymorphnukleäre (PMN) –Elastase, eine Serin-Protease, die in den Granula der Neutrophilen vorkommt, über einen ELISA erhoben [93]. Die thrombogenen Eigenschaften der beschichteten Plättchen wurden anhand der Expression von  $\beta$ -Thromboglobulin, welches nach erfolgter Aktivierung der Blutplättchen in großen Mengen freigesetzt wird, beurteilt [94]. Die Expression von  $\beta$ -Thromboglobulin wurde mithilfe des ASSERA-CHROM®  $\beta$ -Thromboglobulin-Kits bestimmt. Zuletzt wurde die Hämolyseaktivität in den Blutproben über einen Hämoglobin-Farbstest (Roche, Mannheim, Deutschland, nicht mehr erhältlich) bestimmt. Dabei wird aufgetautes Citratblut für 3 Minuten bei Raumtemperatur mit einer Reaktionslösung inkubiert (0,6 mM Kaliumhexacyanoferrat III und 750 nM Kaliumcyanid). Freies Hämoglobin, welches im Zuge hämolytischer Prozesse freigesetzt wird, wird durch die Reaktionslösung in Cyanhämoglobin umgewandelt, dessen Extinktion bei 546 nm photometrisch ermittelt wird. Die Extinktion erlaubt nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz einen direkten Rückschluss auf die Konzentration des Cyanhämoglobins, welche der des freien Hämoglobins entspricht.

#### **2.2.10 5'-RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA-Ends PCR (5'-RLM-RACE-PCR)**

Experimente, die einen Knockdown über RNA-Interferenz erzielen wollen, stehen immer in der Pflicht zu beweisen, dass der eintretende Effekt nicht durch unbekannte Prozesse, sondern durch eine präzise komplementäre Bindung der siRNA an die mRNA des Zielproteins mit nachfolgender Spaltung des doppelsträngigen Komplexes erzielt wird [95]. Soutschek *et al.* etablierten 2004 die 5'RLM-RACE-PCR als wertvolle Methode, um die siRNA-vermittelte Spaltung von mRNA-Molekülen nachzuweisen [77]. Die Technik wurde schnell aufgegriffen: So verwendeten beispielsweise Davis *et al.* 2010 die 5'RLM-RACE-PCR, um in einer klinischen Phase-I-Studie den Erfolg der gewünschten siRNA-vermittelten Spaltung zu bestätigen [96]. Im Prinzip wird dabei ein mRNA-Spaltprodukt ab der siRNA-vermittelten Spaltungsstelle amplifiziert. Die Sequenz dieses mRNA-Spaltprodukts kann dann mit der erwarteten Spaltstelle abgeglichen werden. Der genauere Ablauf ist in Abbildung 1 dargestellt.

Nach bekanntem Prinzip wurden für diesen Versuch Glasplättchen beschichtet. Beschichtungen mit 0,032 % Atelokollagen unter Zusatz von Lipofectamine und 5 µg siICAM-1 wurden hergestellt, auf welche 75.000 EA.hy926 ausgesät wurden. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurden die Zellen über 14 Stunden mit TNF-α (5 ng/ml) stimuliert. Im Anschluss daran wurde die RNA dieser Zellen mithilfe des Aurum™ Total RNA Mini Kits isoliert und quantifiziert. Die RNA wurde dann mithilfe des 5'RACE-Adapters und einer T4-RNA-Ligase, die Teil des First Choice® RLM-RACE-Kits (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) sind, ligiert. Der RNA-Reisolation folgte dann eine reverse Transkription unter Verwendung von 200 ng ligierter Moloney-Murine-Leukemia-Virus reverser Transkriptase (M-MLV RT), mit dem Ziel der Synthese des cDNA-Erststrangs. Sowohl für die Synthese des Erststrangs als auch für die Innere und Äußere PCR, die der Erststrang-Synthese nachfolgen, waren Primer notwendig. Diese wurden über die beiden Programme „Primer 3“ und „Primer Premier 5“ (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, Kalifornien, USA) erstellt. Die Sequenzen dieser Primer sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die äußeren und inneren PCRs wurden mit dem IQ™SYBR®Green-Supermix als quantitative real-time PCR in dreifacher Ausführung durchgeführt. Das Reaktionsgemisch bestand aus 400 nm Vorwärts-Primer und Rückwärts-Primer mit 2 ng der Erststrang-cDNA in einem Gesamtvolumen von 15 µl.

### **2.2.11 Statistik**

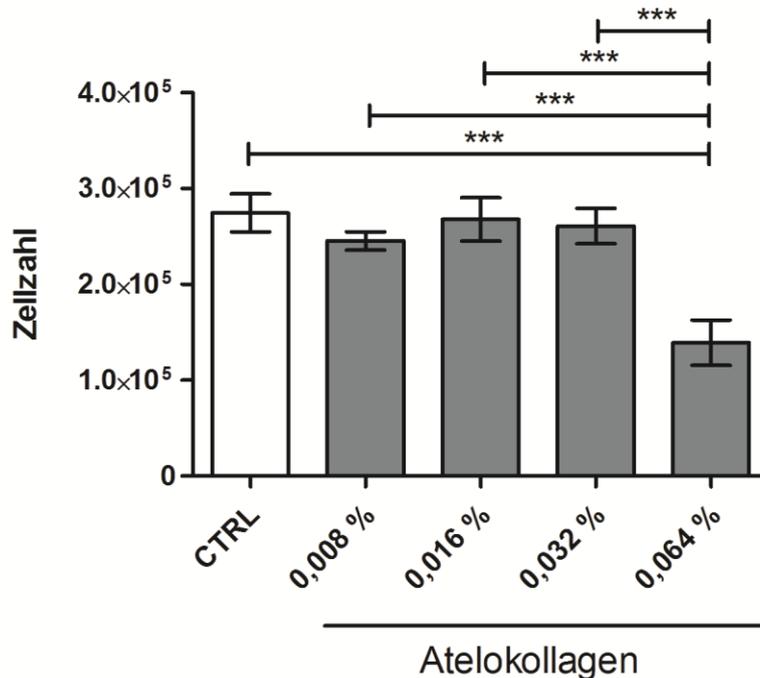
Alle Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Ausgenommen davon sind die Hämokompatibilitätstestung und der Hämolyse-Test, bei denen sechs verschiedene Blutproben von sechs unterschiedlichen Spendern verwendet wurden. Der Vergleich der unterschiedlichen Proben erfolgte über einfache Varianzanalysen (ANOVAs). Als Post-Test wurde die Bonferroni-Korrektur verwendet. Die o.g. Analysen und Korrekturen wurden in *Graph Pad Prism 6* durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

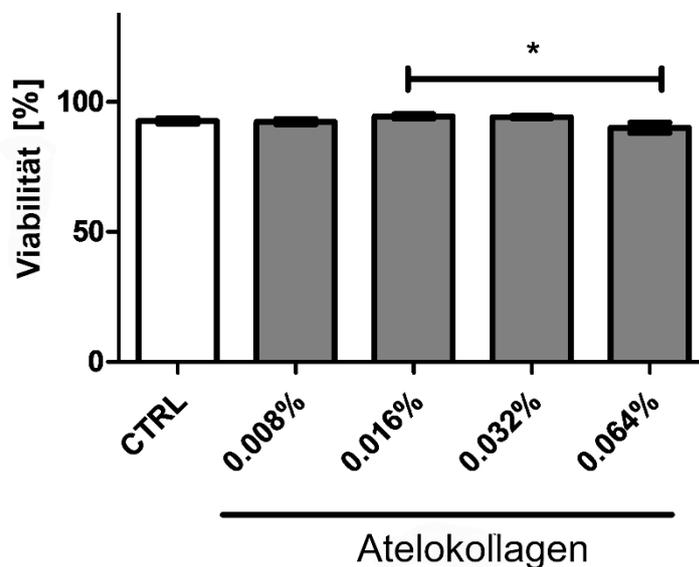
Die Unterpunkte 3.1 bis 3.7 führen die Ergebnisse der unter 2.2 vorgestellten Experimente auf.

#### 3.1 Zellviabilität von EA.hy926 auf unterschiedlich konzentrierten Atelokollagen-Schichten

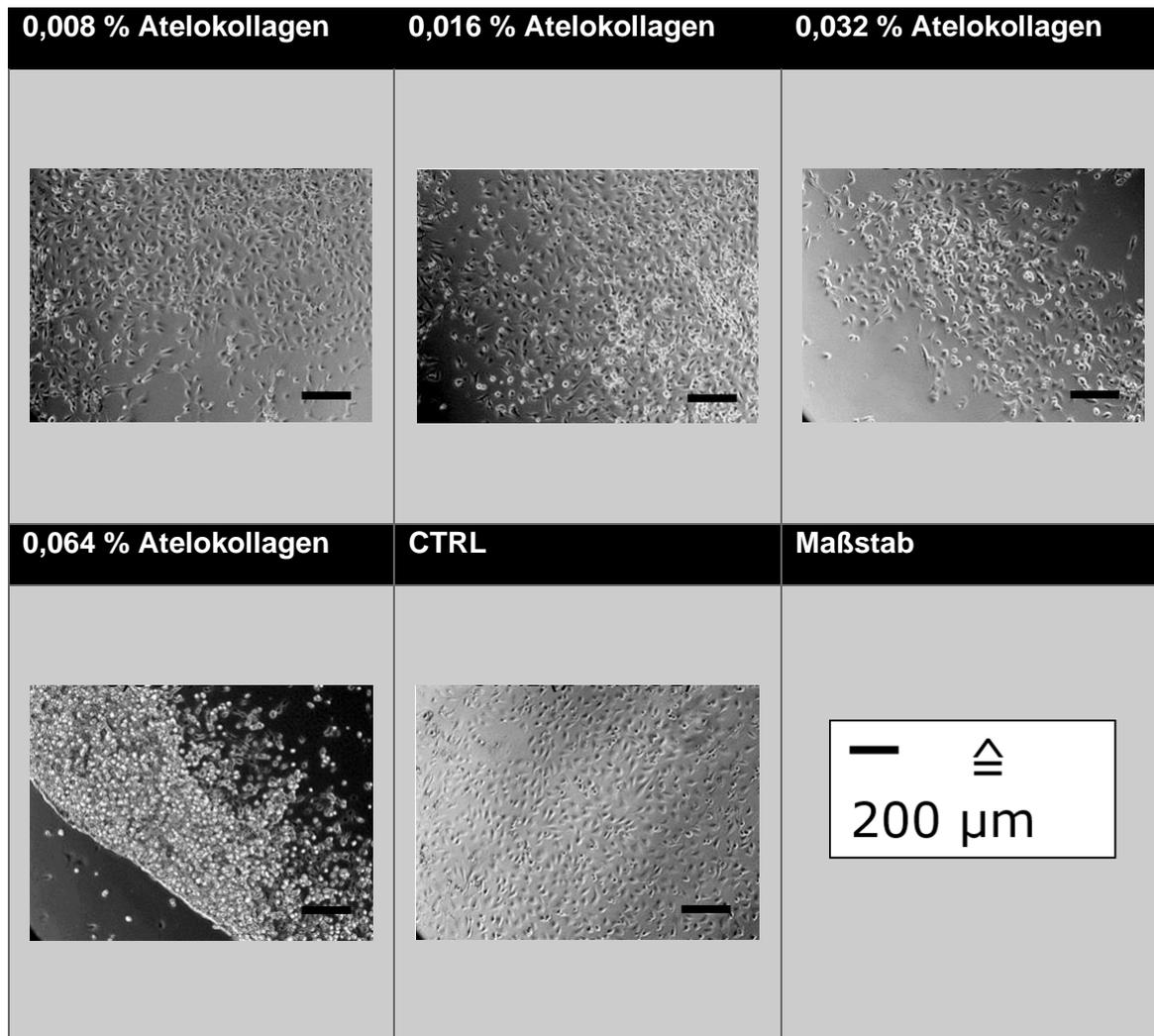
Für eine optimale Zellviabilität von EA.hy926-Zellen auf Atelokollagen-Schichten wurde anhand unterschiedlich konzentrierter Schichten (0,008 % - 0,064 %) das Zellverhalten getestet. Über das CASY®-Zählsystem wurden für alle Konzentrationen Zellzahl und Zellviabilität erfasst. Vergleicht man die Zellzahlen der unterschiedlich konzentrierten Atelokollagenbeschichtungen (Abb. 4), ergibt sich bei einer Konzentration von 0,064 % ein signifikanter Abfall der Zellzahl im Vergleich zu den niedrigeren Konzentrationen (Abb. 4). Im Bereich von 0,008 % - 0,032 % ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, sowohl zwischen den einzelnen Konzentrationen als auch auf die Kontrolle bezogen. Die Zellviabilität (Abb. 5) unterscheidet sich sowohl zwischen den einzelnen Konzentrationen, als auch in Bezug auf die atelokollagenfreien Kontrollen nur geringfügig. Es ist ein Abfall der prozentualen Viabilität bei einer Atelokollagen-Konzentration von 0,064 % zu erkennen, dieser ist allerdings nicht signifikant zu der Kontrollbeschichtung. Zusätzlich zu der Bestimmung von Zellzahl und -viabilität wurde das Zellwachstum nach 24 Stunden unter dem Hellfeldmikroskop betrachtet, um möglicherweise bestehende visuelle Korrelate zu den Messungen zu identifizieren. Die Kontrollaufnahme zeigte nach 24 Stunden einen dichten, gleichmäßigen Zellrasen (Abb.6). Mit Änderung der Atelokollagen-Konzentration veränderte sich die Verteilung der Zellen: Es sind mit steigender Konzentration vermehrt Lücken im Zellrasen zu finden. Um diese Lücken ist die Zelldichte jedoch im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Besonders auffällig ist die clusterartige Anordnung der Zellen bei einer Konzentration von 0,064 %. Die Zellen wachsen bei dieser Konzentration vermehrt aufeinander als nebeneinander und verteilen sich nicht gleichmäßig auf dem Plättchen. Weiterhin bilden die Zellen keine differenzierten Ausläufer, was bei jeder anderen Konzentration der Fall ist. In allen folgenden Versuchen wurden daher nur Atelokollagen-Beschichtungen der Konzentrationen 0,008 %, 0,016 % und 0,032 % verwendet.



**Abbildung 4:** Messung der Zellzahl von Ea.hy926–Zellen mit dem CASY®-Zellzähler. Es wurden 75.000 Zellen auf unterschiedlich konzentrierte Atelokollagen-Beschichtungen ausgesät, die auf Glasplättchen in einer 24–Well-Platte angesetzt wurden. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen abgelöst und die Zellzahl gemessen. Ein unbeschichtetes Glasplättchen diente als Kontrolle. Die einzelnen Balken repräsentieren den Mittelwert ± Standardabweichung bei n=3. CTRL: Kontrolle. \*\*\* Statistische Signifikanz mit p<0,001. Modifiziert nach Olivia Koenig, Dimitrios Nothdurft, et al., "An Atelocollagen Coating for Efficient Local Gene Silencing by Using Small Interfering RNA" Molecular Therapy—Nucleic Acids, vol. 6, Februar 2017, p.290-301



**Abbildung 5:** Messung der Zellviabilität von EA.hy926 mit dem CASY®-Zellzähler. Es wurden 75.000 Zellen auf unterschiedlich konzentrierte Atelokollagen-Beschichtungen ausgesät, die auf Glasplättchen in eine 24-Well-Platte gelegt wurden. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen abgelöst und die Viabilität der Zellen gemessen. Ein unbeschichtetes Glasplättchen diente dabei als Kontrolle. Die einzelnen Balken repräsentieren den Mittelwert±Standardabweichung für n=3. CTRL: Kontrolle. \*Statistische Signifikanz mit p<0,05 \*\*\*Statistische Signifikanz mit p<0,001. Modifiziert nach Olivia Koenig, Dimitrios Nothdurft, et al., „An Atelocollagen Coating for Efficient Local Gene Silencing by Using Small Interfering RNA" Molecular Therapy—Nucleic Acids, vol. 6, , Februar 2017, p.290-301

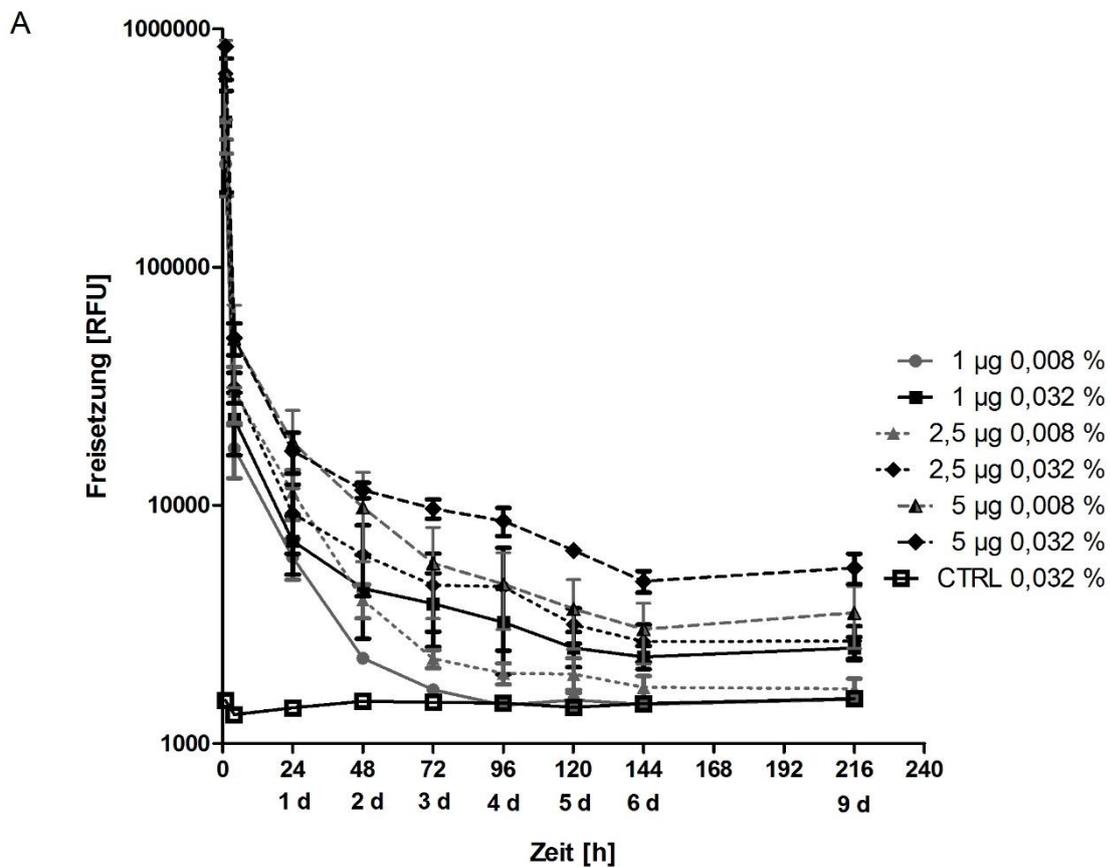


**Abbildung 6:** Mikroskopische Aufnahmen von Ea.hy926 auf verschiedenen konzentrierten Atelokollagen-Oberflächen (0,008 %, 0,016 %, 0,032 %, 0,064 %) nach 24 Stunden Inkubation. Zum Vergleich wurden Ea.hy926 auf unbeschichteten Plättchen kultiviert. Bei steigender Atelokollagen-Konzentration zeigt sich eine Ausdünnung des Zellrasens, die Zellen bilden seltener Ausläufer. Insbesondere bei 0,064 % Beschichtungen zeigte sich eine Cluster-Bildung aus übereinander wachsenden, abgerundeten Zellen. CTRL: Kontrolle. Modifiziert nach Olivia Koenig, Dimitrios Nothdurft, et al., „An Atelocollagen Coating for Efficient Local Gene Silencing by Using Small Interfering RNA“ Molecular Therapy—Nucleic Acids, vol. 6, , Februar 2017, p.290-301

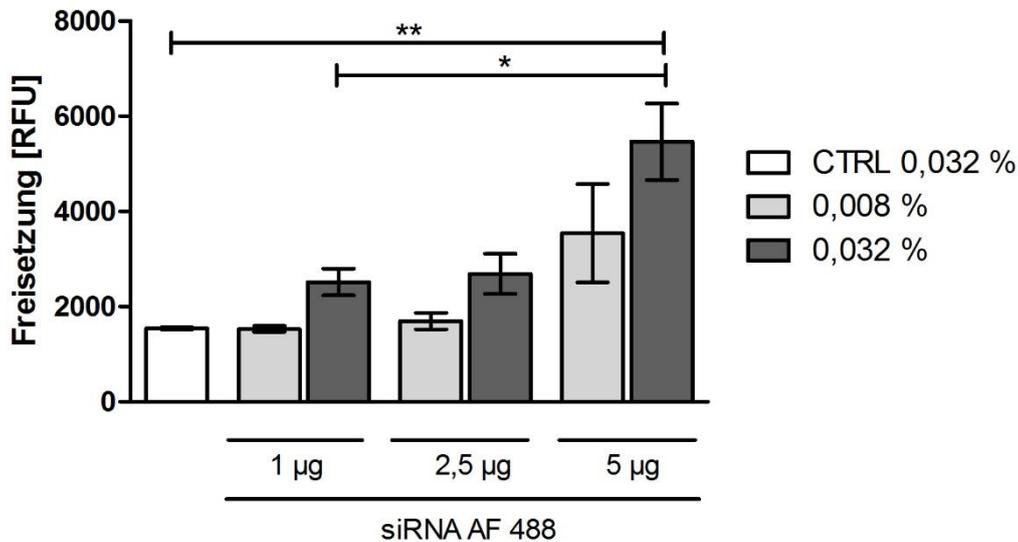
### 3.2 Freisetzung von siRNA AF 488

Die Freisetzung der siRNA AF 488 wurde über einen Zeitraum von 216 Stunden (entspricht 9 Tagen) verfolgt. Sie wurde anhand der Überstände einer 24-Well Platte evaluiert, indem die Fluoreszenzintensität der verschiedenen Proben bestimmt wurde. Die höchste Freisetzung wurde für alle Proben innerhalb der ersten vier Stunden registriert (Abb.7, A). Bis zum Zeitpunkt von 24 Stunden ergaben sich keine deutlichen Unterschiede im Verlauf der Kinetik aller Proben. Im weiteren Verlauf zeigte die 0,008 % Beschichtung eine schnellere Freisetzung als die 0,032 % Beschichtung. Die 0,008 % Atelokollagen-Beschichtungen mit 1 und 2,5 µg

fluoreszenter siRNA waren nach 9 Tagen beide auf Kontrollniveau, während bei den 0,032 % Beschichtungen mit der korrespondierenden siRNA-Menge noch eine Freisetzung zu verzeichnen war (Abb.7 A). Die höchste Freisetzung nach neun Tagen lag bei 5467 RFU und wurde auf Plättchen mit 0,032 % Atelokollagen und 5 µg siRNA erreicht, gefolgt von der 0,008 % Atelokollagen-Beschichtung mit 5 µg siRNA (Abb.7, B). Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Atelokollagen-Konzentrationen wurde nicht erzielt, auch wenn sichtbare Unterschiede entstanden waren.



B

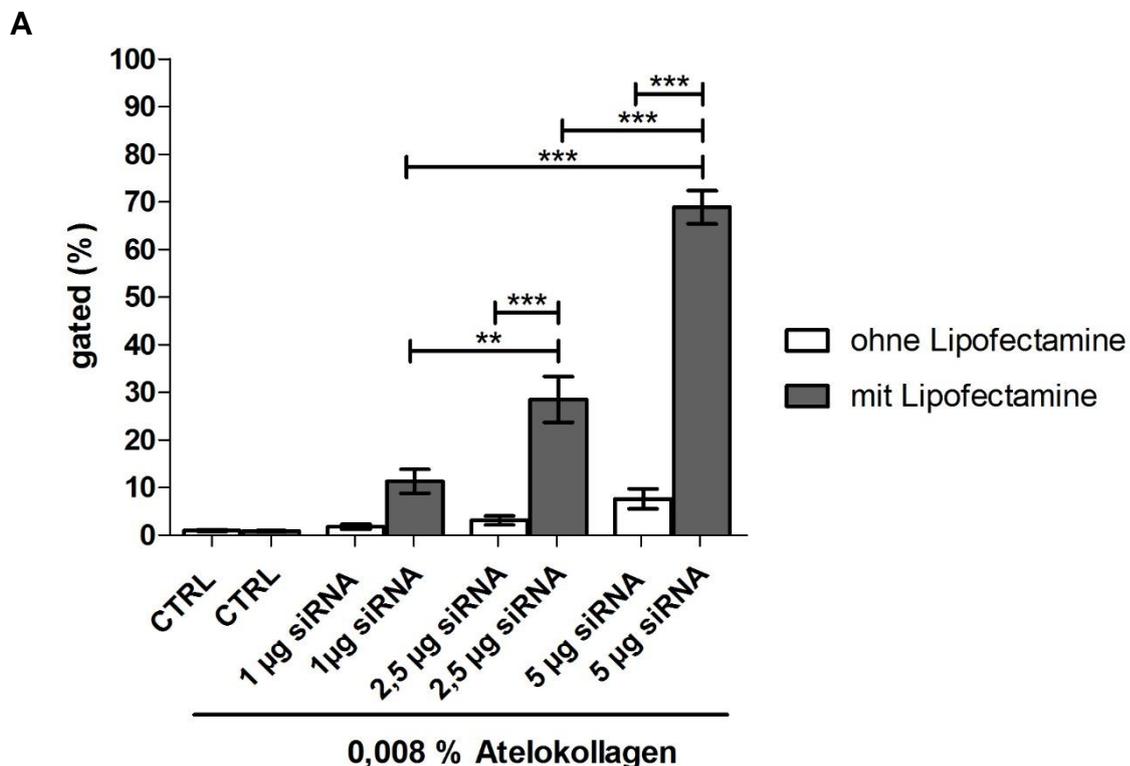


**Abbildung 7: A:** Freisetzungskinetik von siRNA AF 488 aus Atelokollagenbeschichtungen. Die Glasplättchen wurden mit Atelokollagenbeschichtungen der Konzentration 0,008 % oder 0,032 % und unterschiedlichen siRNA-Mengen (1 µg, 2,5 µg, 5 µg) bedeckt. Nach Trocknen der Schichten wurden die Plättchen in eine 24-Well-Platte übertragen und bei 37 °C mit PBS inkubiert. Aus den Wells wurden zu definierten Zeitpunkten Überstandsproben entnommen, die mit einem Fluoreszenz-Reader bei einer Anregungsstrahlung  $\lambda_{ex} = 485$  nm und einer Emissionswellenlänge von  $\lambda_{em} = 535$  nm gemessen wurden. Jeder Punkt repräsentiert dabei den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SEM) bei  $n=3$ . **B:** Die Werte von Tag neun wurden zur Anschaulichkeit in einem Balkendiagramm dargestellt. CTRL 0,032 %: Kontrollprobe auf Beschichtungen mit 0,032 % Atelokollagen, ohne siRNA-Zusatz; siRNA: small interfering RNA; RFU: Relative fluorescence Units. \* Statistische Signifikanz mit  $p < 0,05$ ; \*\* Statistische Signifikanz mit  $p < 0,01$ . Modifiziert nach Olivia Koenig, Dimitrios Nothdurft, et al., "An Atelocollagen Coating for Efficient Local Gene Silencing by Using Small Interfering RNA" *Molecular Therapy—Nucleic Acids*, vol. 6, , Februar 2017, p.290-301

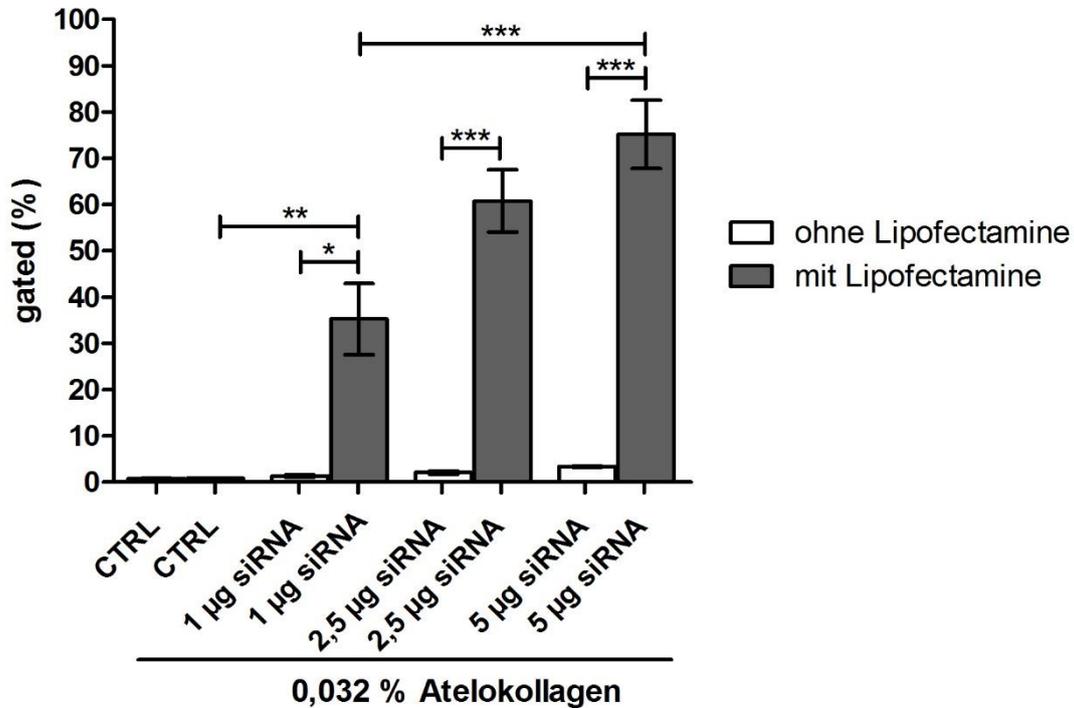
### 3.3 Transfektionseffizienz nach Atelokollagen-vermittelter Transfektion von siRNA AF 488

Die Transfektionseffizienz wurde zunächst ohne Lipofectamine getestet, um die Transfektionseigenschaften der Atelokollagenbeschichtungen zu bestimmen. Es wurden Beschichtungen der Konzentrationen 0,008 % und 0,032 % hergestellt, deren siRNA-Gehalt variierte (1 µg, 2,5 µg; 5 µg). Die nach 48-stündiger Inkubation gemessene Transfektionseffizienz zeigte sich gering (Abb. 8 A,B). Die höchste Rate an transfizierten Zellen mit 7,6 % war bei der niedrigeren Atelokollagen-Konzentration von 0,008 % mit 5 µg siRNA zu verzeichnen. Die korrespondierende 0,032% Beschichtung erzielte mit 3,4 % eine deutlich geringere Effizienz (Abb. 8 B). Insgesamt erwies sich Atelokollagen als alleiniges Transfektionsmittel für die etablierten Beschichtungen als unzureichend.

Eine Steigerung der Transfektionseffizienz konnte durch die Zugabe des Transfektionsmittels Lipofectamine erzielt werden. Im Besonderen fiel dabei die Steigerung der Effizienz für die 0,032% Beschichtungen auf: Vor Allem auf Beschichtungen mit niedrigerer siRNA-Menge (1 µg, 2,5 µg) zeigte sich im Vergleich zu den 0,008 % Atelokollagenbeschichtungen eine deutlich höhere Rate an transfizierten Zellen (Abb. 8 B). Auf den Beschichtungen mit 5 µg siRNA-Gehalt relativierte sich der Effekt. Der Differenzbetrag des prozentualen Tranfektionserfolgs zwischen den beiden unterschiedlich konzentrierten Atelokollagenbeschichtungen lag hier bei 6,3 % im Vergleich zu. 23,9 % (1 µg siRNA) und 32,3 % (2,5 µg siRNA) Die maximale Transfektionseffizienz wurde mit 75,2 % der gemessenen Zellen auf 0,032 % Beschichtungen mit 5 µg siRNA verzeichnet. Der Vergleichswert der 0,008% Beschichtung lag bei 68,9 %.



**B**



**Abbildung 8:** Transfektionseffizienz nach Atelokollagen-vermittelter Transfektion der siRNA AF 488, mit und ohne Lipofectamine-Zusatz. Y-Achse: Transfektionserfolg in Prozent siRNA-positiver Zellen in der FACS-Analyse („gated (%)“). **A:** 75.000 EA.hy926 wurden auf beschichtete Plättchen der Atelokollagen-Konzentration 0,008 % ausgesät. Nach 48 Stunden Inkubationszeit wurde der Transfektionserfolg mittels Durchflusszytometrie gemessen. **B:** 75.000 EA.hy926 wurden auf 0,032 % Atelokollagen-beschichteten Plättchen ausgesät. Der restliche Versuch verlief identisch zur Beschreibung unter A. Als Kontrolle dienten unbeschichtete Plättchen. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SEM) mit  $n=3$  oder  $n=6$  für die 0,032 % Atelokollagen-Beschichtungen mit Lipofectamine-Zusatz. CTRL: Kontrolle; siRNA: small interfering RNA. \* Statistische Signifikanz mit  $p<0,05$ ; \*\*Statistische Signifikanz mit  $p<0,01$ ; \*\*\* Statistische Signifikanz mit  $p<0,001$ . Modifiziert nach Olivia Koenig, Dimitrios Nothdurft, et al., "An Atelocollagen Coating for Efficient Local Gene Silencing by Using Small Interfering RNA" *Molecular Therapy—Nucleic Acids*, vol. 6, Februar 2017, p.290-301

### **3.4 Knockdown von ICAM-1 mittels siRNA-haltiger Atelokollagen-Beschichtungen**

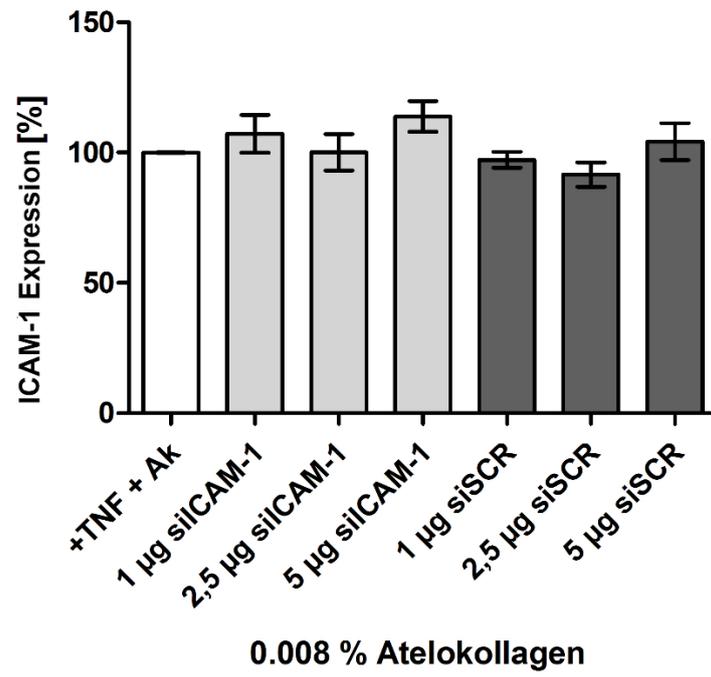
Der Knockdown von ICAM-1 in Endothelzellen ist das zentrale Ziel dieser Arbeit. Die vielen positiven Eigenschaften, die Atelokollagen als Trägerstoff und (gering potentes) Transfektionsmittel der Beschichtung in sich vereint, werden in diesem Versuch erstmals mit dem konkreten Endpunkt, nämlich der Reduktion von ICAM-1-Rezeptoren auf TNF- $\alpha$ -aktivierten Zellen, verbunden.

Zunächst wurde der ICAM–1-Knockdown ohne Lipofectamine getestet. Dazu wurden 0,008 % Atelokollagen-Beschichtungen mit unterschiedlichen siRNA-Mengen (1 µg; 2,5 µg, 5 µg) hergestellt und EA.hy926 darauf ausgesät. Für keine dieser drei siRNA-Mengen konnte ein signifikanter Knockdown des ICAM–1-Proteins beobachtet werden. Tatsächlich kam es auf siICAM–1-haltigen Beschichtungen sogar zu einer Steigerung der ICAM–1-Expression im Vergleich zur Kontrolle (+TNF +Ak). Lediglich auf der 2,5 µg siSCR-Beschichtung zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine moderate Verringerung der ICAM–1 Konzentration (Abb.9 A). Die restlichen SCR-Schichten führten zu Konzentrationen auf Kontrollniveau.

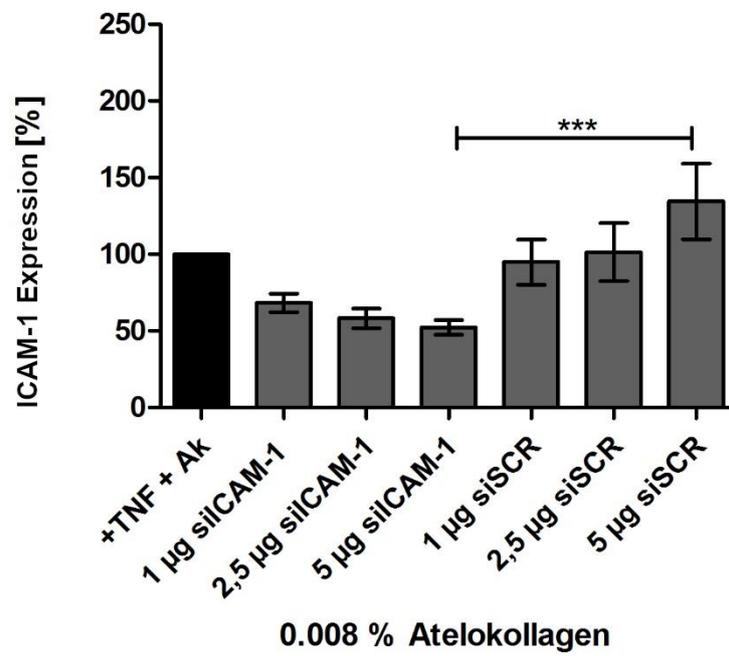
Um den Knockdown zu steigern, wurden die siRNA in den Atelokollagen-Beschichtungen wie auch in 3.2 mit Lipofectamine komplexiert. Auf diese Weise konnte für beide Atelokollagen-Konzentrationen ein Knockdown erzielt werden, welcher mit steigender siICAM–1 Menge entsprechend zunahm (Abb.9/B, C). Im Weiteren konnte für eine siRNA-Menge von 5 µg für beide Atelokollagen-Konzentrationen (0,008 % und 0,032 %) ein signifikanter Knockdown auf siICAM–1-haltigen Beschichtungen gegenüber den SCR-Beschichtungen beobachtet werden.

Der Vergleich des prozentualen Knockdowns bezüglich der Atelokollagen-Konzentration zeigt eine deutliche Differenz: Während auf 0,008 % Atelokollagen-Beschichtungen für 2,5 und 5 µg siRNA eine Reduktion der ICAM–1-Expression um 41,8 % und 47,9 % resultierte, ergaben sich für 0,032 % Atelokollagen-Beschichtungen 49,6 % und 60,4 %.

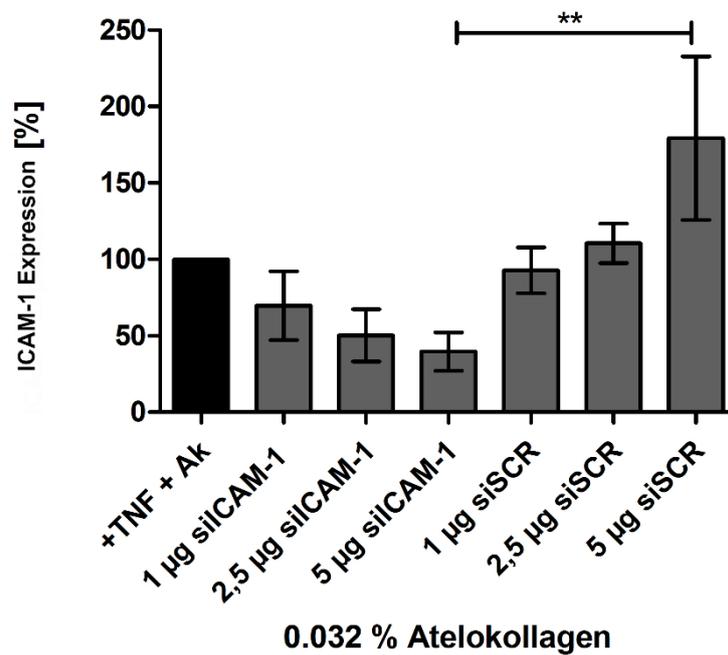
A



B



C



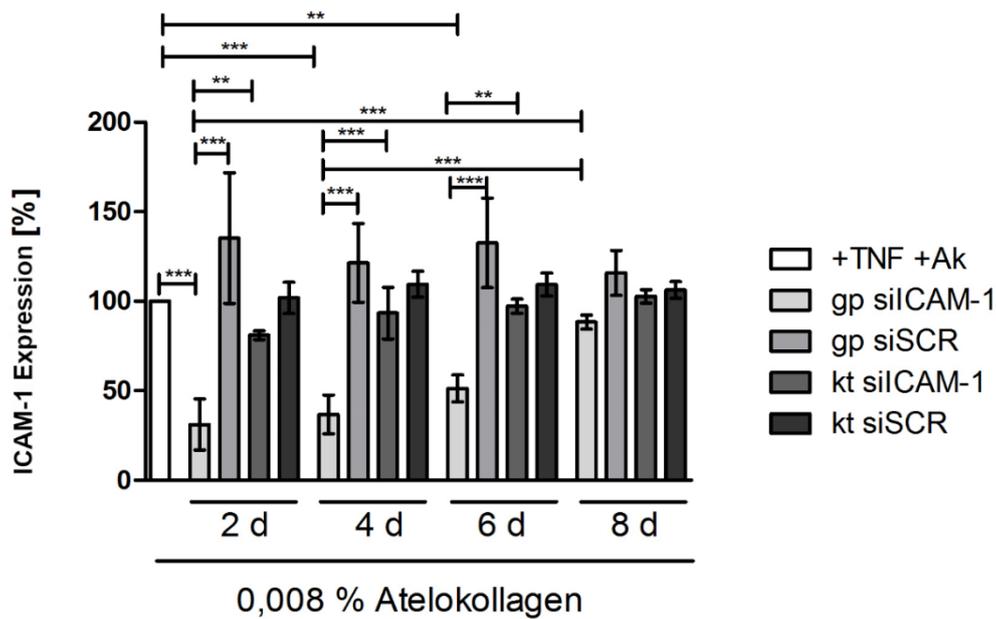
**Abbildung 9:** Knockdown des ICAM-1-Proteins mit und ohne Lipofectamine. Beschichtete Glasplättchen wurden mit jeweils 75000 Ea.hy926-Zellen besät und nach 48-stündiger Inkubation mit TNF- $\alpha$  aktiviert. Das ICAM-1 Protein wurde mittels CD 54 Antikörper auf den EA.hy926 markiert und durchflusszytometrisch bestimmt. **A:** 0,008 % Atelokollagen-Beschichtung ohne Lipofectamine und 1, 2,5, 5  $\mu$ g siICAM-1. **B:** 0,008 % Atelokollagen-Beschichtung mit Lipofectamine und 1, 2,5, 5  $\mu$ g siICAM-1. **C:** 0,032 % Atelokollagen-Beschichtung mit Lipofectamine und 1, 2,5, 5  $\mu$ g siICAM-1. Die Kontrolle (+TNF +Ak) wurde in allen Diagrammen auf 100 % genormt und die anderen Werte dazu in Relation gesetzt. Jeder Balken in B und C repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SEM) bei n=3. siSCR: Scrambled-RNA; siICAM-1: siRNA gegen ICAM-1; +TNF +Ak: Kontrollgruppe unter Zusatz von TNF- $\alpha$  und CD54-Antikörper. \*\* Statistische Signifikanz mit  $p < 0,01$ ; \*\*\* Statistische Signifikanz bei  $p < 0,001$ . Modifiziert nach Olivia Koenig, Dimitrios Nothdurft, et al., "An Atelocollagen Coating for Efficient Local Gene Silencing by Using Small Interfering RNA" *Molecular Therapy—Nucleic Acids*, vol. 6, , Februar 2017, p.290-301

### **3.5 Langzeitversuch zum Knockdown von ICAM-1 auf siRNA-haltigen Atelokollagen-Beschichtungen**

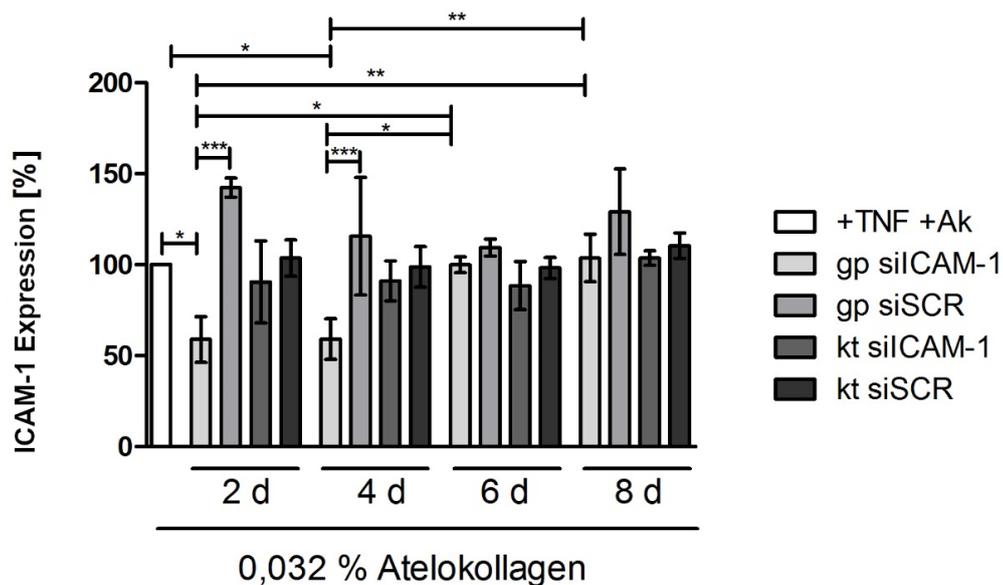
Um die Langzeit-Freisetzung und -Wirkung der etablierten Beschichtungen zu testen, wurden in diesem Versuch über 8 Tage hinweg die gleichen, beschichteten Plättchen besät. Die Zellen wurden dabei alle 2 Tage zur Bestimmung der ICAM-1-Expression abgelöst. Um einen Vergleich herstellen zu können, wurde eine weitere, konventionelle Transfektionsmethode eingeführt: Es wurden zunächst EA.hy926 in eine 24-Well -Platte ausgesät. Nach 24-stündiger Kultivierung wurde die Transfektionslösung mit der gleichen Atelokollagen/siICAM-Zusammensetzung wie in den Beschichtungen den Zellkulturen zugegeben.

Der höchste Knockdown konnte in diesem Versuch mit der 0,008 % Beschichtung erzielt werden: Nach 2 Tagen war die ICAM-1-Expression der Zellen auf der 0,008 % Atelokollagen-Beschichtung um 68,9 % niedriger als bei den Zellen der Kontrolle. Über 4 und 6 Tage ergaben sich Reduktionen um 63,3 % und 48,7 %. Am 8. Tag war weiterhin eine Reduktion um 11,6 % auszumachen (Abb.10/A). Die korrespondierenden 0,032 % Beschichtungen zeigten einen geringeren ICAM-1-Knockdown über den Zeitraum von 8 Tagen: So waren nach 2 und 4 Tagen deutlich niedrigere prozentuale Knockdown-Werte von 41,1 % und 41,0 % zu verzeichnen. Ab dem 6. Tag war kein Knockdown mehr zu beobachten (Abb.10/B). Für die konventionell transfizierten Zellen ergaben sich sowohl für das 0,008% als auch für das 0,032 % Transfektionsgemisch zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zur Kontrolle.

A



B

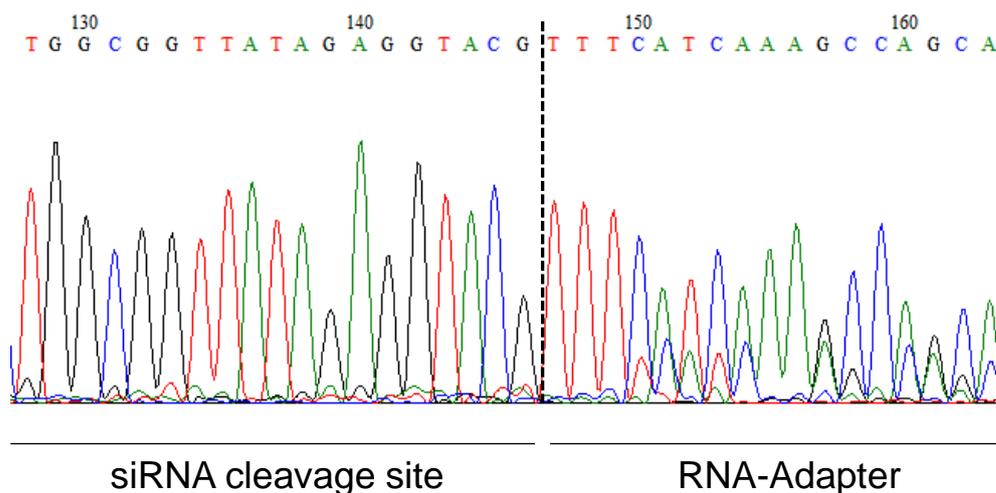


**Abbildung 10:** Langzeit-Knockdown des ICAM-1-Proteins. Glasplättchen wurden nach bekanntem Prinzip mit einem Atelokollagen- /siRNA-haltigen Transfektionsgemisch beschichtet und in eine 24-Well Platte übertragen (gp). Als Vergleichsmethode wurde eine konventionelle Transfektion (kt) durchgeführt, wobei die Transfektionslösung direkt in das Medium der einzelnen Wells einer 24-Well Platte gegeben wurde, in die am Tag zuvor EA.hy926 ausgesät worden waren. Zu festgelegten Zeitpunkten (2, 4, 6, 8 Tage) wurden die Zellen mit TNF $\alpha$  aktiviert und anschließend mit fluoreszenten Antikörpern gegen das ICAM-1-Protein markiert, deren Konzentration dann durchflusszytometrisch gemessen wurde. Die Kontrolle wurde auf 100 % genormt, alle weiteren Werte sind in Relation dazu zu sehen. **A:** Kultivierung auf Plättchen bzw. in Kultur mit 0,008 % Atelokollagen. **B:** Kultivierung auf Plättchen bzw. in Kultur mit 0,032 % Atelokollagen. gp :Glasplättchen; kt : konventionelle Zellkultur; d = days; siSCR: Scrambled-RNA; siCAM-1: siRNA gegen ICAM-1. TNF: Tumornekrosefaktor alpha; AK: Antikörper gegen ICAM-1. Jeder Balken entspricht dem Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SEM) für n=3. \* Statistische Signifikanz mit p<0,05; \*\* Statistische Signifikanz mit p<0,01; \*\*\* Statistische Signifikanz mit p<0,001. Modifiziert nach Olivia Koenig, Dimitrios Nothdurft, et al., „An Atelocollagen Coating for Efficient Local Gene Silencing by Using Small Interfering RNA“, Molecular Therapy—Nucleic Acids, vol. 6, , Februar 2017, p.290-301

### 3.6 Nachweis des siRNA-vermittelten mRNA-Abbaus mittels 5'-RLM-RACE-PCR

Versuche zur RNA-Interferenz können verifiziert werden, indem gezeigt wird, dass die Ziel-mRNA an der richtigen Stelle durch die im Versuch eingesetzte komplementäre siRNA geschnitten wird. So kann ausgeschlossen werden, dass andere Faktoren einen direkten oder indirekten Einfluss auf die mRNA eines Proteins und damit auf seine Expression genommen haben.

Die in Abb.11 dargestellte Schnittstelle der ICAM-1-mRNA bei Basenpaar 1818 deckt sich mit der erwarteten Schnittstelle. Die Kontrollgruppen (Atelokollagen mit/ohne TNF- $\alpha$ -Aktivierung, Atelokollagen und siSCR mit TNF- $\alpha$ -Aktivierung) zeigten keine spezifische Spaltung der ICAM-1-mRNA.

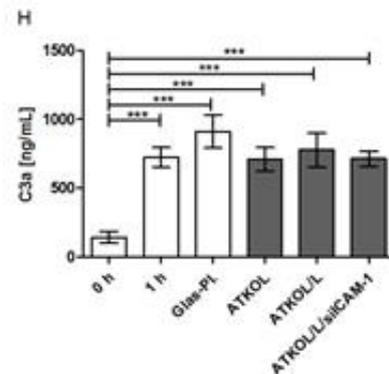
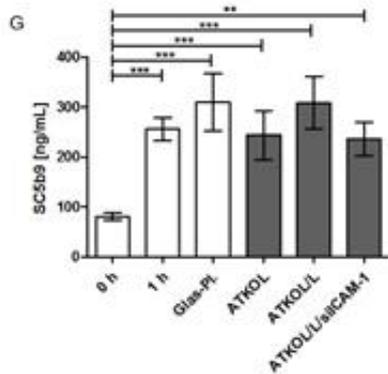
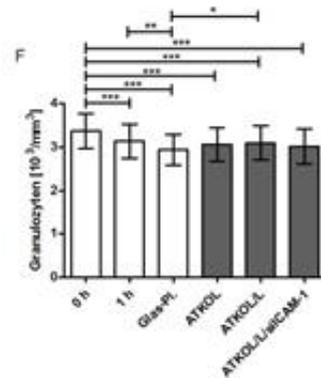
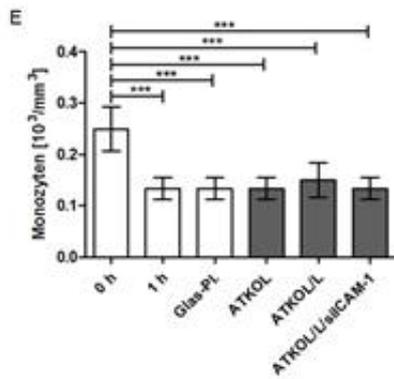
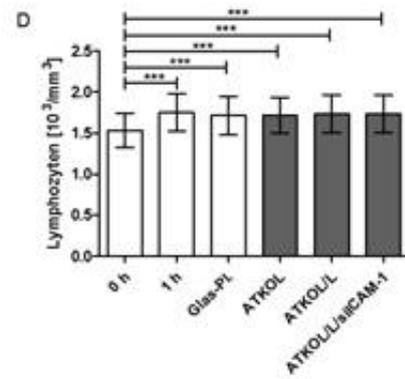
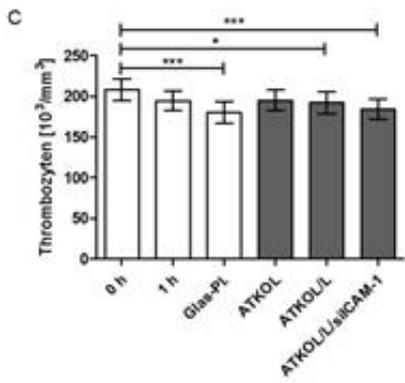
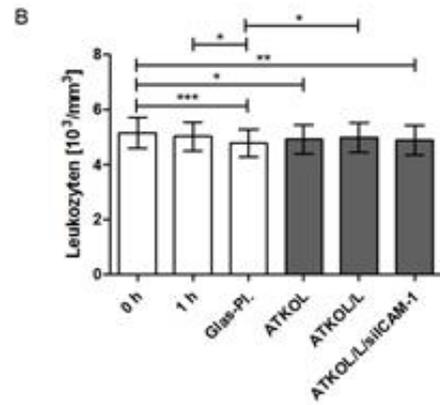
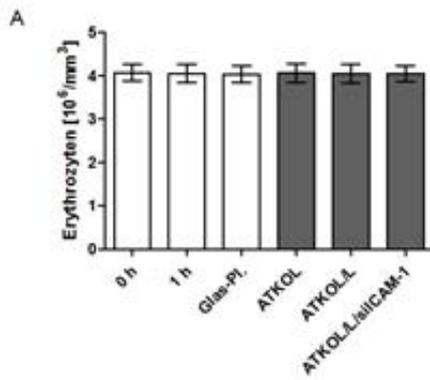


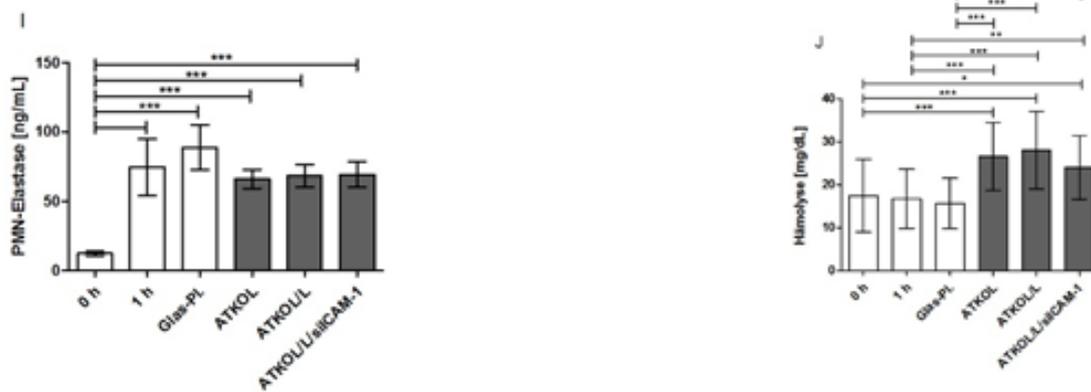
**Abbildung 11:** Sequenzanalyse des 5'RLM-RACE-PCR Amplifikats (innere PCR mit innerem Primer und RACE 1) nach Transfektion von EA.hy926 auf 0,032 % konzentrierten siICAM-1-haltigen Atelokollagenschichten. 75000 EA.hy926 wurden auf den beschichteten Plättchen inkubiert. Der Inkubationsphase folgte eine RNA-Isolation. Das resultierende Isolat wurde für die 5'RLM-RACE-PCR verwendet. Die Spaltungsstelle der ICAM-1-mRNA lag bei 1818 bp (128-146) mit der RNA-Adapter-Sequenz (147-163). siRNA: small interfering RNA. Modifiziert nach Olivia Koenig, Dimitrios Nothdurft, et al., „An Atelocollagen Coating for Efficient Local Gene Silencing by Using Small Interfering RNA" Molecular Therapy—Nucleic Acids, vol. 6, , Februar 2017, p.290-301

### **3.7 Hämokompatibilität von siRNA-haltigen Atelokollagen-Beschichtungen**

Die Hämokompatibilitäts-Analyse wurde konform zur ISO-Norm 10993-4 (*Auswahl von Prüfungen zur Wechselwirkung mit Blut*), deren Erfüllung für alle blutkontaktierenden Medizinprodukte Pflicht ist, durchgeführt. Als Testbeschichtung wurde die „worst-case“ Variante mit einer Atelokollagen-Konzentration von 0,032 % unter Zusatz von Lipofectamine und siCAM verwendet. Schon vor der Inkubation mit den Plättchen (0 h) wurde ein Differentialblutbild der Proben als Negativ-Kontrolle erfasst. Ein weiteres Differentialblutbild wurde nach Inkubation mit den Plättchen (1 h) erhoben. Die 1–Stundenprobe diente hierbei als Referenzwert. Neben der oben genannten siRNA-haltigen Beschichtung wurden zusätzlich eine reine Atelokollagen- und eine Atelokollagen/Lipofectamine-Beschichtung getestet, um im Nachhinein die Bestandteile der Beschichtung gesondert beurteilen zu können. Unbeschichtete Glasplättchen wurden zusätzlich als Positiv-Kontrolle eingesetzt. Die Erythrozyten-Anzahl zeigte unter allen Versuchsgruppen nur geringe Schwankungen (Abb.12 A). Für Lymphozyten zeigte sich ein signifikanter Anstieg (Abb.12 D), für die gesamte Leukozyten-Gruppe, Thrombozyten, Monozyten und Granulozyten hingegen ein Abfall der Zellzahl im Vergleich zur Nullstunden-Probe (Abb.12 B, C, E, F). Für Leukozyten und im Besonderen für die Granulozyten ergab sich für unbeschichtete Plättchen weiterhin ein signifikanter Abfall im Vergleich zur 1–Stunden-Probe und Atelokollagen/Lipofectamine-Beschichtung ohne siCAM-Zusatz. Zwischen den beschichteten Plättchen und der 1–Stunden-Probe konnte für keine Zellreihe ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Beschichtungen hielten sich hier auf Kontrollniveau (Abb.12 A-F). Zusätzlich zu der Erythrozytenzahl und dem Differentialblutbild wurden drei weitere Immunparameter erfasst: Einerseits die Polymorphnukleäre(PMN)-Elastase als Nachweis der Degranulation vornehmlich neutrophiler Granulozyten, der aktivierte Komplementfaktor C3a sowie der Komplex SC5b9, die beide die Aktivierung des Komplementsystems aufzeigen. Für keinen dieser Faktoren konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der 1–Stunden-Probe und den beschichteten Plättchen nachwiesen werden. Somit bleibt die Gesamtheit der beschichteten Plättchen auch in Bezug auf die erhobenen Immunparameter auf Kontrollniveau. Die Untersuchung der Hämolyse über den Gehalt an freiem Hämoglobin im Citratplasma zeigte für alle beschichteten Plättchen einen signifikant erhöhten Wert im Vergleich zu der 1–Stunden-Probe, während die unbeschichteten Plättchen in etwa auf Kontrollniveau blieben. Da alle gemessenen Hb-Konzentrationen

unterhalb des Grenzwertes von 40mg/100ml lagen, war nicht von einer Hämolyse auszugehen.





**Abbildung 12:** Hämokompatibilitäts-Analyse von beschichteten Plättchen (0,032 % Atelokollagen/siICAM-1). Beschichtete Plättchen wurden mit 37 °C warmem Blut auf einem Wippschüttler für 1 h inkubiert. Der Nullstunden-Wert wurde als Kontrolle genutzt, der 1–Stunden-Wert als Grundlinie. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde ein Differentialblutbild der Proben erstellt. Zusätzlich wurde die Konzentration von mehreren Immunparametern über ELISAs bestimmt. Die Hämolyse-Aktivität wurde nachträglich anhand der Menge an freiem Hämoglobin im Zitrat-Plasma evaluiert. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert ± Standardabweichung (SEM) bei n = 6. Glas-Pl.: Glasplättchen, ATKOL: Beschichtung mit Atelokollagen, ATKOL/L: Beschichtung mit Atelokollagen und Lipofectamine, ATKOL/L/siICAM-1: Beschichtung Atelokollagen, Lipofectamine und siRNA gegen ICAM-1; PMN-Elastase: Polymorphnukleäre Elastase; C3a: aktivierter Faktor C3; SC5b9: SC5b9-Komplex aus Faktor C5b9 und Protein S, terminaler Komplementkopmplex. \* Statistische Signifikanz mit  $p < 0,05$ ; \*\* Statistische Signifikanz mit  $p < 0,01$ ; \*\*\* Statistische Signifikanz mit  $p < 0,001$ . Modifiziert nach Olivia Koenig, Dimitrios Nothdurft, et al., „An Atelocollagen Coating for Efficient Local Gene Silencing by Using Small Interfering RNA“, Molecular Therapy—Nucleic Acids, vol. 6, , Februar 2017, p.290-301

## 4. Diskussion

Die KHK ist die epidemiologisch häufigste Untergruppe der kardiovaskulären Erkrankungen. Mit einem Anteil von einem Drittel an allen kardiovaskulären Erkrankungen und einem Fünftel an allen Toden Europas bleibt sie, trotz rückläufiger Trends in der westlichen Welt, eines der größten kardiologischen Probleme [3, 7, 97]. Grundsätzlich gibt es für die unterschiedlichen Krankheitsentitäten der KHK zwei invasive Behandlungsmöglichkeiten: Die PTCA und die koronararterielle Bypasschirurgie[98]. Die PTCA hat als minimalinvasives Verfahren mit verhältnismäßig niedrigem initialen Risikoprofil in den letzten Jahrzehnten deutlich an Bedeutung gewonnen. Vor Allem in der Notfallversorgung ist die PTCA vollständig etabliert [99]. In den letzten Jahren zeigt sich aber auch eine Zunahme an Bedeutung bei stabiler KHK: So empfehlen aktuelle Leitlinien je nach Ort der Stenose und Komorbiditäten mittlerweile auch eine PTCA als Alternative zur Bypasschirurgie[98]. Die Studienlage zeigt trotz Fortschritten im Bereich der Stentbeschichtungen und niedrigerem Risikoprofil der Intervention an sich keine Überlegenheit der PTCA[52, 53]. Dies liegt hauptsächlich daran, dass das Langzeitrisikoprofil der PTCA durch die häufig in gestenteten Bereichen auftretenden Restenosen ungünstiger ausfällt als bei arteriellen Grafts [38]. Auch in der DES-Ära ist es bisher nur gelungen, das Auftreten von Restenosen und Stent-Thrombosen zu verzögern, nicht jedoch zu verhindern [51, 100]. Durch den antiproliferativen Effekt der DES-Beschichtung wird neben der Restenose gleichzeitig auch der Heilungsprozess des geschädigten Endothels verlangsamt. In den vorliegenden Experimenten wurde versucht, über ein gezieltes, siRNA-vermitteltes „Silencing“ des ICAM-1-Gens in die pathologische Entzündungskaskade einzugreifen, die der Restenose zugrunde liegt. Auf diese Weise könnte der Mechanismus der Restenose ausgehebelt werden, ohne das Wachstum des Endothels zu beeinflussen. Die Wirksamkeit siRNA-vermittelter Silencing-Mechanismen wurde in zahlreichen Studien bestätigt, unter anderem für Zielproteine des atherosklerotischen Formenkreises [101-104]. Das Gen-Silencing erfolgte in den vorliegenden Experimenten über Beschichtungen auf Atelokollagen-Basis, auf denen Zellen der Ea.hy926-Linie ausgesät wurden. Mit Atelokollagen wurde ein Trägermolekül verwendet, das auch *in vivo* sehr gut verträglich ist und in der Medizin schon vielerlei Anwendungen kennt [84]. Zusätzlich dazu lässt sich die negativ geladene siRNA sehr gut in die positiv geladene Atelokollagen-Matrix einbetten, was sich günstig auf ihre Halbwertszeit auswirkt [85, 89]. Um die optimale

Atelokollagen-Konzentration für unsere Zwecke zu ermitteln, wurden zunächst Plättchen mit Konzentrationen zwischen 0,008 % und 0,064 % angefertigt und mit Ea.hy926 besiedelt. Mittels des CASY®-Zellzählers wurden anschließend die Zellzahl und die Viabilität der Zellen bestimmt. Zusätzlich wurden die einzelnen Plättchen mikroskopisch betrachtet. Es folgten Versuche zur Transfektionseffizienz und zum Knockdown des ICAM-1-Proteins bei unterschiedlichen siRNA-Mengen und Atelokollagenkonzentrationen, sowie Versuche zur Langzeitwirkung der Beschichtungen. Zuletzt wurde die Hämokompatibilität der unterschiedlichen Beschichtungen in Kontakt mit humanem Vollblut getestet.

#### **4.1 Zellzahl und -viabilität von EA.hy926-Zellen auf Atelokollagen-Schichten**

Die Zellzahlen auf Beschichtungen 0,008 %, 0,016 % und 0,032 % Atelokollagen-Konzentration zeigten sowohl untereinander als auch im Vergleich zu den unbeschichteten Kontrollplättchen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3). Auf Plättchen mit der 0,064 % Atelokollagen-Beschichtung war hingegen ein signifikanter Abfall der Zellzahl zu verzeichnen. Da es sich bei Atelokollagen um ein biokompatibles Molekül handelt, ist es sehr unwahrscheinlich, dass eine Konzentrationssteigerung von 0,032 % auf 0,064 % einen direkten zytotoxischen Einfluss auf die Zellen nimmt. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der Viabilitätstestung (Abb. 4): Auf Beschichtungen mit einer Atelokollagen-Konzentration von 0,064 % ist zwar durchaus ein Abfall der Viabilität zu verzeichnen; dieser ist in Bezug auf die Kontrolle jedoch nicht signifikant und steht somit in keinem Verhältnis zu dem massiven Abfall der Zellzahl. Es ist eher davon auszugehen, dass sich durch die erhöhte Atelokollagen-Konzentration die Struktur der Beschichtung, bzw. deren Härtegrad verändert und folglich das Zellwachstum und die Oberflächenadhäsion beeinflusst wird. Die Auswirkungen von unterschiedlich harten Oberflächen auf Zellwachstum und -adhäsion sind gut untersucht: So besteht mittlerweile der Konsens, dass Zellen auf harten Oberflächen eine bessere Migration und Proliferation zeigen als auf weichen Oberflächen [105-107]. Dazu passt auch das mikroskopische Bild der 0,064 % Beschichtung: Statt eines gleichmäßigen Zellrasens ergab sich ein haufenartiges Wachstum mit einer deutlichen Grenzschicht, über welche kein Zellwachstum stattfand. Neben der Zellverteilung auf dem Plättchen war auch die Morphologie der einzelnen Zelle verändert: Statt des für Ea.hy926 üblichen, flächigen Wachstums war das Gesamtbild vor Allem von kleinen, abgerundeten Zellen ohne Ausläufer geprägt. Die Ergebnisse decken sich mit den Versuchen von

*Nolte et al.*: Es wurde eine weiche, aus mehreren Lagen bestehende Beschichtung aus Hyaluronsäure und Chitosan mit einer härteren, sulfonierten Polystyren/Polyallylamin-Hydrochlorid-Beschichtung verglichen. Dabei wurde, wie in den vorliegenden Experimenten, der CASY®-Zellzähler zur Bestimmung der Viabilität verwendet. Die Viabilität der Zellen erwies sich auf der härteren Polystyren/PAH-Beschichtung als deutlich höher [108]. Außerdem zeigten die Zellen auf den korrespondierenden mikroskopischen Bildern der Hyaluronsäure/Chitosan-Beschichtung eine ähnliche Morphologie wie auf der hier diskutierten 0,064 % Atelokollagen-Beschichtung. Dies lässt vermuten, dass eine Erhöhung der Atelokollagen-Konzentration die Oberfläche der Beschichtung weicher werden lässt und damit die Bildung eines flächigen Rasens verhindert. Da Atelokollagen (wie auch das unbehandelte Kollagen) Wasser bindet, ist davon auszugehen, dass der Wassergehalt in der 0,064 % Beschichtung nach dem Trocknen höher ist als in den übrigen Beschichtungen, bzw. „dass die höher konzentrierte Atelokollagenschicht mehr aufquillt“ [109]. Der erhöhte Wasseranteil könnte die weichere Oberfläche und die damit einhergehenden Migrations- und Proliferationsstörungen erklären.

#### **4.2 Transfektion und Knockdown auf Beschichtungen ohne Lipofectamine**

Die transfektionsfördernde Wirkung von Atelokollagen wurde schon in mehreren Veröffentlichungen für unterschiedliche Darreichungsformen erprobt [90, 110-113]. Um die Wirkung noch einmal für die vorliegende Beschichtung zu testen, wurde für die ersten Transfektionsversuche kein weiteres Transfektionsmittel verwendet. Getestet wurden Beschichtungen mit 0,008 % und 0,032 % Atelokollagen und jeweils 1 µg, 2,5 µg oder 5 µg fluoreszenter siRNA. Die Transfektionsrate wurde mittels FACS bestimmt. Erstaunlicherweise ergab sich eine deutlich geringere Transfektionsrate als in der Referenzliteratur: Mit einer prozentualen Transfektionsrate von weniger als 10 % (Fig.7 A,B) lag die Effizienz der reinen Atelokollagenbeschichtung für beide Konzentrationen deutlich unter der von *Minakuchi et al.*, die Transfektionsraten zwischen 40 und 60 % erreichten [90]. Das Versuchsdesign gleicht sich dabei zu großen Teilen. Es ergeben sich lediglich Unterschiede in den Feinheiten der Zubereitung: So wurde in den vorliegenden Experimenten das Gemisch aus verdünntem Atelokollagen und der siRNA-Lösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, ohne weiter bewegt zu werden. *Minakuchi et al.* ließen das Gemisch bei einer Temperatur von 4 °C für 20 Minuten schwenken. Da Nukleinsäuren aufgrund ihres negativ geladenen Phosphat-

Rückgrats mit Atelokollagen komplexieren können, ist es durchaus möglich, dass das Bewegen der Probe einen Einfluss auf die Komplexierung und damit auf die Transfektionseffizienz hat [89]. Möglicherweise hängt die Diskrepanz in der Transfektionseffizienz auch mit den verwendeten Zelllinien zusammen: Während *Minakuchi et al.* die NEC8-Zelllinie verwendeten, welche von embryonalen Hodenkarzinom-Zellen abgeleitet sind, wurden in den vorliegenden Versuchen Ea.hy926-Zellen kultiviert, die einen Hybrid aus HUVECs und der A549-Zelllinie darstellen [90]. Neben der Transfektionseffizienz wurde auch der Knockdown von ICAM-1 ohne Verwendung eines weiteren Transfektionsmittels getestet. Dazu wurden Ea.hy926-Zellen auf siCAM-haltigen Beschichtungen ausgesät und anschließend für vierzehn Stunden mit TNF- $\alpha$  inkubiert. Nach einer antikörpervermittelten Färbung von ICAM-1 konnte dessen Konzentration auf den Zellen mittels FACS bestimmt werden. Erwartungsgemäß war kein Knockdown zu verzeichnen. Die Zellen auf siCAM-1-Beschichtungen wiesen sogar höhere ICAM-1-Werte auf als die Kontrollgruppe aus TNF- $\alpha$ -aktivierten Zellen (Abb.8 A). Erneut ergab sich keine Übereinstimmung mit der Referenzliteratur: *Mu et al.* erzielten mit einem ähnlichen Modell ohne ein zusätzliches Transfektionsmittel einen Knockdown von Bcl-xL [114].

#### **4.3 Transfektion von Ea.hy926 mit Lipofectamine**

Nach den unter 4.2 beschriebenen initialen Transfektionsversuchen, wurde der Transfektionsbeschichtung das Transfektionsmittel Lipofectamine zugegeben. Dies führte zu einer deutlichen Steigerung der Transfektionseffizienz (Abb. 7 A,B). Die Transfektionsrate war dabei auf 0,032 % Beschichtungen durchweg höher als auf 0,008 %. Diese Diskrepanz fiel vor allem für niedrige siRNA-Mengen (1  $\mu$ g; 2,5  $\mu$ g) auf und relativierte sich auf den Beschichtungen mit 5  $\mu$ g siRNA. Eine erhöhte Atelokollagen-Konzentration erwies sich nach Zugabe von Lipofectamine als ein transfektionssteigernder Faktor. Ein ähnlicher Trend ließ sich auch für die siRNA-Menge bestätigen: Für beide Atelokollagen-Konzentrationen ergab sich bei steigender siRNA-Menge eine höhere Transfektionseffizienz.

#### **4.4 Knockdown von ICAM-1 in Ea.hy926 nach Transfektion mit Lipofectamine, 5'-RLM-RACE-PCR**

Jeder experimentell erzielte Knockdown sollte auf die Spezifität der verwendeten siRNA verifiziert werden. Für siRNA-vermitteltes Gen-Silencing ist eine Beteiligung

der siRNA sehr sicher über die 5'RLM-RACE-PCR nachweisbar: Der Komplex aus siRNA und der komplementären mRNA wird durch Ago2 an einer spezifischen Stelle gespalten. Diese lässt sich durch die Amplifikation der Spaltprodukte im Nachhinein ermitteln. Die 5'RLM-RACE-PCR wies für die siCAM-1-haltigen Atelokollagen-Beschichtungen die erwartete Spaltstelle nach (Abb. 10). Für siSCR und die reinen Atelokollagen-Beschichtungen, die zum Vergleich ebenfalls getestet wurden, ließen sich keine spezifischen Spaltprodukte nachweisen. Somit ist bewiesen, dass der oben beschriebene Knockdown von ICAM-1 auf die verwendete siRNA siCAM-1 zurückzuführen ist.

#### **4.5 Langzeitfreisetzung von siRNA AF 488**

In der Theorie soll das Gen-Silencing des ICAM-1-Gens die Entzündungsreaktion, die auf das intimale Trauma bei der Stent-Einlage folgen kann, unterbinden [56, 57]. Dabei ist zeitlich gesehen die Heilungsphase des Gefäßendothels der limitierende Faktor. Eine wirkungsvolle Stent-Beschichtung sollte daher das Silencing des ICAM-1-Gens solange aufrechterhalten, bis die initiale Endotheldenudation ausreichend kompensiert ist. Da siRNA-vermitteltes Gen-Silencing stets transient ist, ist die Freisetzungskinetik der Beschichtungen ein entscheidender Faktor für die Langzeitwirkung. Die Freisetzung wurde in unseren Versuchen über die fluoreszente siRNA AF488 bestimmt: Deren Fluoreszenz wurde in den Überständen der einzelnen Proben zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen und galt somit als Maß für die freigesetzte siRNA. Die Messungen wurden insgesamt über 9 Tage durchgeführt.

Interessanterweise zeigten alle Beschichtungen unabhängig von der Atelokollagen-Konzentration und der siRNA-Menge initial einen „Burst-Release“, bei dem schon ein beträchtlicher Teil an siRNA freigesetzt wurde. Anschließend ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Beschichtungen: So war für 0,008 % Beschichtungen mit 1 µg und 2,5 µg nach 4 bzw. 6 Tagen keine weitere Abweichung von der Kontrolle nachzuweisen. Somit ist es unwahrscheinlich, dass mit diesen Kombinationen ein langfristiger Knockdown erreicht werden kann. Die korrespondierenden 0,032 % Beschichtungen zeigten hingegen auch nach 9 Tagen ein erhöhtes Fluoreszenzniveau. Dieser Trend ließ sich auch für eine siRNA-Menge von 5 µg nachweisen: Nach der initialen „Burst“-Phase blieb die Freisetzung aus der 0,032 % Beschichtung stets höher als diejenige aus der 0,008 % Beschichtung, sodass sich auch kumulativ eine höhere freigesetzte siRNA-Menge ergab. Trotz der

geringeren Freisetzung war nach 9 Tagen auch auf der 0,008 % Beschichtung noch eine Fluoreszenz messbar. Die Abweichung in der Freisetzungskinetik könnte durch die unterschiedliche Bindungskapazität der eingesetzten Atelokollagen-Mengen bedingt sein: Jedes RNA-Molekül geht mit den Hydroxylgruppen von 4 Atelokollagen-Molekülen Wasserstoffbrückenbindungen ein. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass in 0,032 % Atelokollagen-Beschichtungen ein höherer Anteil der zugegebenen siRNA-Moleküle gebunden werden kann als in 0,008 % Beschichtungen. Da nicht gebundene siRNA-Moleküle sich mit geringerem Kraftaufwand aus der Beschichtung lösen lassen, verbleiben rein statistisch gesehen mehr siRNA-Moleküle in 0,032 % Beschichtungen als in 0,008 %. Diese werden dann zu einem späteren Zeitpunkt freigesetzt und könnten somit die unterschiedliche Freisetzungskinetik der beiden Beschichtungen bedingen. Insgesamt decken sich diese Ergebnisse mit der Referenzliteratur: *Sano et al.* beobachteten ebenfalls eine schnellere Freisetzung in niedrig konzentrierten Atelokollagen-Beschichtungen [82, 115].

#### **4.6 Langzeitknockdown von ICAM-1 in Ea.hy926**

Um die Langzeitwirkung des ICAM-1-Knockdowns besser einschätzen zu können, wurde die ICAM-1-Konzentration auf Ea.hy926-Zellen nach 2, 4, 6 und 8 Tagen Kultivierung gemessen. Getreu den vorhergehenden Freisetzungsversuchen wurden sowohl die 0,008 % als auch die 0,032 % Atelokollagen-Beschichtung in Kombination mit 5 µg siICAM-1 weiterverwendet, also diejenigen Beschichtungen, die nach neun Tagen noch eine nachweisliche siRNA-Freisetzung zeigten. Neben den Negativkontrollen und den siSCR-Kontrollen, die auch schon im vorigen Knockdown-Versuch verwendet wurden, wurde zusätzlich eine Vergleichsgruppe mit einer alternativen Transfektionsmethode eingeführt: Statt der üblichen Atelokollagen-Beschichtung wurden in diesem Ansatz dieselben Transfektionskomplexe in flüssiger Form einer Zellsuspension zugegeben, die 24 Stunden vorher ausgesät wurde. Diese Vergleichsgruppe wurde eingeführt, um die Effizienz einer substratvermittelten Transfektion im Vergleich zu prüfen.

Die Gegenüberstellung der beiden Transfektionsmethoden zeigte eine eindeutige Überlegenheit der substratvermittelten Transfektion: Die Zellen, die auf 0,008 % Beschichtungen transfiziert wurden, zeigten im Vergleich zu den Zellen in Suspension bis nach einschließlich 6 Tagen eine signifikant geringere ICAM-1-

Menge. Auch nach 8 Tagen war noch ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen festzustellen: Während die Zellen, die in Suspension transfiziert worden waren, auf Kontrollniveau blieben, war auf den Zellen der 0,008 % Beschichtung ein ICAM-1-Knockdown von 11,6 % zu verzeichnen. Auf 0,032 % Beschichtungen konnten diese Ergebnisse nicht reproduziert werden: Zwar zeigten Zellen, die auf 0,032 % Beschichtungen transfiziert wurden, nach 2 und 4 Tagen einen höheren Knockdown als die Zellen, die in Suspension transfiziert wurden. Die Differenz war allerdings zu keinem Zeitpunkt signifikant. Ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ließ sich für 0,032 % Atelokollagen-Beschichtungen auch nur nach 2 und 4 Tagen Inkubation feststellen. Im weiteren Verlauf blieb die ICAM-1-Konzentration auf Kontrollniveau.

Zusammenfassend zeigt der Vergleich der beiden Transfektionsmethoden ein tendenziell effizienteres Gen-Silencing auf den Beschichtungen an. Dies gilt sowohl für den maximal erreichten Knockdown der ICAM-1-Expression als auch für die Dauer des Knockdowns..

Die 0,032 % Atelokollagen-Beschichtung konnte in den Langzeitversuchen erstaunlicherweise nicht überzeugen: Der direkte Vergleich mit der 0,008 % Beschichtung zeigte mit einer Differenz von 4 Tagen ein deutlich schlechteres Langzeitprofil des „ICAM-1-Silencings“ an. Dieses Ergebnis überrascht, weil alle durchgeführten Vorversuche, sowohl zur Transfektionseffizienz als auch zur Freisetzungskinetik, bisher eine Überlegenheit der 0,032 % Beschichtungen nahelegten. Mithilfe der theoretischen Hintergründe der einzelnen Bestandteile lässt sich jedoch zumindest ein Ansatz zur Klärung finden: Wie oben schon festgestellt, kommt es zwischen den negativ geladenen siRNA-Molekülen und den positiv geladenen Atelokollagen-Molekülen zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Eine Erhöhung der Atelokollagen-Konzentration könnte bewirken, dass mehr Bindungspartner der Atelokollagen-Moleküle zur Verfügung stehen. Das Hinzufügen des Transfektionsmittels auf Basis kationischer Lipide könnte die Konkurrenz um die negativen Ladungsträger erhöhen. Die kationischen Lipide sind ebenfalls bestrebt, eine Komplexierung mit der negativ geladenen siRNA einzugehen. Diese Konkurrenz könnte in ein Kräftegleichgewicht münden, sodass der tatsächlich gebundene siRNA-Anteil deutlich geringer ausfällt als veranschlagt. Entsprechend wäre auch der Anteil an freier, ungebundener siRNA höher. Dieser

könnte schneller freigesetzt werden und somit sowohl die erhöhte Transfektionseffizienz als auch die abweichende Freisetzungskinetik bedingen. Da die Bindung durch Atelokollagen und Lipofectamine sich positiv auf die Halbwertszeit der siRNA auswirkt, wäre somit auch geklärt, warum der Langzeit-Knockdown auf 0,032 % Beschichtungen viel schlechter ausfällt: Die erhöhte Menge an freier siRNA kann zwar initial als Folge des zuvor schon erwähnten „Burst-Release“ ein erfolgreiches Gen-Silencing vermitteln; die Halbwertszeit der freien siRNA ist allerdings zu gering, um auf den schnell wachsenden Ea.hy926-Zellen über mehrere Tage hinweg ein zufriedenstellendes transientes Gen-Silencing erreichen zu können. Die 0,008 % Beschichtung kann aufgrund der geringeren Atelokollagen-Konzentration und der damit einhergehenden, mutmaßlich geringeren Konkurrenz um siRNA-Moleküle eine effizientere Bindung herbeiführen. Der dadurch resultierende, langfristige Knockdown von ICAM-1 lässt den Schluss zu, dass eine Weiterführung der Versuche sowohl im experimentellen als auch im klinischen Umfeld mit 0,008 % Beschichtungen erfolgen sollte.

Ea.hy926-Zellen weisen im Vergleich zu humanen Endothelzellen *in vivo* eine deutlich höhere Teilungsrate auf. Dies ist sehr praktisch für das Versuchsdesign, erlaubt allerdings keine eindeutigen Rückschlüsse auf das Verhalten *in vivo*. Unter Berücksichtigung der Teilungsrate ist allerdings davon auszugehen, dass die siRNA durch häufigere Zellteilungen schneller verdünnt wird, was nach mehreren Zellgenerationen in ein geringeres Gen-Silencing münden kann [116]. Insofern würde man in *in-vivo*-Versuchen einen länger anhaltenden Knockdown-Effekt erwarten.

#### **4.7 Hämokompatibilität von siRNA-haltigen Atelokollagen-Beschichtungen**

Die Ergebnisse der Hämokompatibilitäts-Testungen bestätigen die geringe Immunogenität von Atelokollagen-Beschichtungen auch unter Zugabe von siRNA und Lipofectamine. Zwischen den Blutproben mit den inkubierten beschichteten Plättchen und dem inkubierten Kontrollblut ergaben sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede hinsichtlich der Zellzahl von Erythrozyten, Thrombozyten und Gesamtleukozyten (Abb. 11 A-C). Auch im Differentialblutbild war im Vergleich dieser beiden Gruppen keine signifikante Abweichung der Zellzahl von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten feststellbar (Abb. 11 D-F). Daraus lässt sich folgern, dass es zu keiner Akkumulation von Zellen auf den Atelokollagenbeschichtungen kam. Ein signifikanter Unterschied in der Zellzahl war für alle getesteten Zellarten,

sowohl für die Proben beschichteter als auch unbeschichteter Plättchen im Vergleich zu der Nullstundenprobe zu beobachten (Abb.11 B-F). Dies hängt vermutlich mit den Glasröhrchen zusammen, in denen die Blutproben inkubiert wurden. Kontakt mit Glas und anderen anionischen Oberflächen setzt den intrinsischen Weg der Gerinnungskaskade in Gang und führt zur Thrombozytenaktivierung [117]. Im Laufe der Koagulation werden außerdem eine Vielzahl von Entzündungsmediatoren freigesetzt, die einen Einfluss auf die Leukozytenzahl und -differenzierung nehmen können [118]. Neben dem Differenzialblutbild wurden auch die beiden Komplement-Faktoren C3a und SC5b9 sowie die neutrophilenspezifische PMN-Elastase erhoben (Abb.11 G,H,I). Der Vergleich der Einstundenproben zeigte hinsichtlich dieser drei Parameter keinen signifikanten Anstieg in den siRNA/Atelokollagen-Blutproben. Der Vergleich der Nullstunden- und Einstundenproben zeigt erneut eine deutlich signifikante Diskrepanz, welche aber mit großer Wahrscheinlichkeit auch bei diesen drei inflammatorischen Parametern auf die Inkubation in Glasröhrchen zurückzuführen ist. Insgesamt ist also nicht davon auszugehen, dass die etablierten siRNA-haltigen Atelokollagenbeschichtungen das Immunsystem übermäßig aktivieren.

Um ein etwaiges hämolytisches Geschehen durch die Beschichtung erfassen zu können, wurde zusätzlich das freie Hämoglobin gemessen (Abb.11, J). Für alle Beschichtungen ergab sich ein signifikanter Anstieg des freien Hämoglobins im Vergleich zur Einstunden-Kontrolle. Allerdings lagen alle gemessenen Werte unterhalb des durch den Test vorgegebenen Grenzwertes. Somit sind die erhöhten Konzentrationen an freiem Hämoglobin nicht als manifeste Hämolyse zu bewerten.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Das primäre Ziel der oben dargestellten Versuche war, eine effektive Beschichtung zu etablieren, über die ein lokales Gen-Silencing über mehrere Tage vermittelt werden kann. Im klinischen Zusammenhang soll diese Beschichtung als Prototyp für eine koronararterielle Stent-Beschichtung gesehen werden.

Zunächst ergaben sich auffällige Diskrepanzen die Transfektionseffizienz betreffend: So konnte der in der Literatur bestätigte transfektionsfördernde Effekt des Atelokollagenmoleküls in unseren Versuchen nur in einem deutlich geringeren Ausmaß nachgewiesen werden [83]. Über die Integration des biologischen

Transfektionsmittels Lipofectamine in die Beschichtungen konnten aber im weiteren Verlauf deutlich höhere Transfektionserfolge erzielt werden. Interessanterweise ergab sich auch ein deutlicher Unterschied zwischen den optimalen Atelokollagen-Mengen für Transfektion und Knockdown: Höhere Atelokollagen-Mengen erwiesen sich als förderlich für die Transfektionseffizienz, aber gleichzeitig auch als nachteilig für längerfristige Knockdown-Effekte. Die Versuche zur Freisetzungskinetik der siRNA zeigten für alle Beschichtungen einen schlagartigen „Burst-Release“. Dieser Burst-Release scheint mit dem erfolgreichen ICAM-1-Knockdown zu korrelieren, der nach 48 Stunden sowohl für niedrige als auch für hohe Atelokollagen-Konzentrationen nachweisbar war. Über 9 Tage hinweg zeigte sich eine länger anhaltende siRNA-Freisetzung auf Beschichtungen mit höherer Atelokollagenkonzentration. Dieser zunächst als positiv wahrgenommene Effekt erwies sich in den Knockdown-Versuchen als irrelevant: Auf Beschichtungen mit einer 0,008 % Atelokollagenkonzentration konnte ein zur Kontrolle signifikanter Knockdown 4 Tage länger aufrechterhalten werden als auf Beschichtungen mit 0,032 % Atelokollagenkonzentration. Eine über mehrere Tage anhaltende, geringere siRNA-Freisetzung nach anfänglichem „Burst-Release“ scheint das Gen-Silencing auf Ea.hy926 daher im Rahmen der hier untersuchten Zeiträume nicht positiv zu beeinflussen. Möglicherweise könnte eine Kombination aus beiden Atelokollagenbeschichtungen sowohl kurzfristig als auch langfristig eine Verbesserung des Knockdowns ermöglichen.

Neben der Effizienz des Gen-Silencings stand die Biokompatibilität der Beschichtung im Vordergrund. Dabei wurden sowohl die Viabilität der Zellen auf der Beschichtung (Zytotoxizitätstest), als auch die Hämokompatibilität mit menschlichem Blut getestet. Die Atelokollagen-Beschichtungen erwiesen sich zu Humanblut kompatibel, ohne signifikante Hämolyse oder einen Abfall der Erythrozyten-, Leukozyten und Thrombozytenzahl. Weiterhin zeigten sich auf Atelokollagenbeschichtungen niedrigerer Konzentration (0,008 % - 0,032 %) eine sehr gute Proliferation und Ausbreitung der Ea.hy926-Zellen. Die Beschichtungen sind daher vorerst als biokompatibel zu werten. Es sind jedoch nach DIN EN ISO 10993-1 weitere Tests erforderlich, um die Biokompatibilität zu bestätigen.

Die Gesamtheit der vorgestellten Ergebnisse zeigt, dass die etablierten Beschichtungen auf Atelokollagen-Basis ein effizientes Gen-Silencing vermitteln

können, ohne dabei einen Kompromiss in Sachen Verträglichkeit einzugehen. Hierbei sollte im nächsten Schritt eine *in vivo* Testung erfolgen. Interessant wäre hierbei herauszufinden, ob die Beschichtung im Blutstrom ihre Stabilität über mehrere Tage aufrechterhalten kann, und wie effizient die Freisetzungskinetik in einem fließenden Milieu ist. Außerdem sollte das Augenmerk im Besonderen auf mögliche systemische Komplikationen gelegt werden: Sollte das Gen-Silencing *in vivo* beispielsweise über den Blutstrom über den Stentbereich hinausgehen, könnte dies durch die fehlende Leukozytenmigration gravierende Auswirkungen auf die Immunabwehr der Patienten haben. Aufgrund der geringen Halbwertszeit von siRNA und auch aufgrund unserer Ergebnisse ist allerdings primär nicht von einer systemischen Ausbreitung des Gen-Silencings auszugehen. Sollte sich die Effizienz der etablierten Beschichtung auch *in vivo* bestätigen, könnten perspektivisch deutlich geringere Restenose-Raten in Stent-Arealen erreicht werden. Dies könnte die Langzeitprognose von Patienten nach Stent-Angioplastie erheblich verbessern.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Laslett, L.J., et al., *The Worldwide Environment of Cardiovascular Disease: Prevalence, Diagnosis, Therapy, and Policy Issues: A Report From the American College of Cardiology*. Journal of the American College of Cardiology, 2012. **60**(25, Supplement): p. S1-S49.
2. Lloyd-Jones, D.M., et al., *Lifetime risk of developing coronary heart disease*. Lancet, 1999. **353**(9147): p. 89-92.
3. Lloyd-Jones, D., et al., *Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association*. Circulation, 2010. **121**(7): p. 948-54.
4. Lerner, D.J. and W.B. Kannel, *Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population*. Am Heart J, 1986. **111**(2): p. 383-90.
5. Furman, M.I., et al., *Twenty-two year (1975 to 1997) trends in the incidence, in-hospital and long-term case fatality rates from initial Q-wave and non-Q-wave myocardial infarction: a multi-hospital, community-wide perspective*. J Am Coll Cardiol, 2001. **37**(6): p. 1571-80.
6. Ergin, A., et al., *Secular trends in cardiovascular disease mortality, incidence, and case fatality rates in adults in the United States*. Am J Med, 2004. **117**(4): p. 219-27.
7. Nichols, M., et al., *Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update*. European Heart Journal, 2014. **35**(42): p. 2950-2959.
8. Levi, F., et al., *Trends in mortality from cardiovascular and cerebrovascular diseases in Europe and other areas of the world*. Heart, 2002. **88**(2): p. 119-24.
9. Yusuf, S., et al., *Global burden of cardiovascular diseases: Part II: variations in cardiovascular disease by specific ethnic groups and geographic regions and prevention strategies*. Circulation, 2001. **104**(23): p. 2855-64.
10. Yusuf, S., et al., *Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization*. Circulation, 2001. **104**(22): p. 2746-53.
11. Vilahur, G., et al., *Perspectives: The burden of cardiovascular risk factors and coronary heart disease in Europe and worldwide*. European Heart Journal Supplements, 2014. **16**(suppl A): p. A7-A11.
12. Wong, N.D., *Epidemiological studies of CHD and the evolution of preventive cardiology*. Nat Rev Cardiol, 2014. **11**(5): p. 276-289.
13. Riede, W., Schäfer, *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Vol. 5. Auflage. 2004: Thieme.
14. Maddox, T.M., et al., *NOonobstructive coronary artery disease and risk of myocardial infarction*. JAMA, 2014. **312**(17): p. 1754-1763.
15. Yeh, R.W., et al., *Population Trends in the Incidence and Outcomes of Acute Myocardial Infarction*. New England Journal of Medicine, 2010. **362**(23): p. 2155-2165.
16. Deo, R. and C.M. Albert, *Epidemiology and Genetics of Sudden Cardiac Death*. Circulation, 2012. **125**(4): p. 620-637.

17. Bayes de Luna, A., P. Coumel, and J.F. Leclercq, *Ambulatory sudden cardiac death: mechanisms of production of fatal arrhythmia on the basis of data from 157 cases*. Am Heart J, 1989. **117**(1): p. 151-9.
18. Kannel, W.B. and H.E. Thomas, Jr., *Sudden coronary death: the Framingham Study*. Ann N Y Acad Sci, 1982. **382**: p. 3-21.
19. Byrne, R., et al., *Multiple source surveillance incidence and aetiology of out-of-hospital sudden cardiac death in a rural population in the West of Ireland*. Eur Heart J, 2008. **29**(11): p. 1418-23.
20. Kannel, W.B., et al., *Sudden coronary death in women*. Am Heart J, 1998. **136**(2): p. 205-12.
21. Gillum, R.F., *Sudden coronary death in the United States: 1980-1985*. Circulation, 1989. **79**(4): p. 756-65.
22. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. 2009: p. 248.
23. Virmani, R., et al., *Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(5): p. 1262-75.
24. Wilson, P.W., *Established risk factors and coronary artery disease: the Framingham Study*. Am J Hypertens, 1994. **7**(7 Pt 2): p. 7s-12s.
25. Winniford, M.D., et al., *Cigarette smoking-induced coronary vasoconstriction in atherosclerotic coronary artery disease and prevention by calcium antagonists and nitroglycerin*. Am J Cardiol, 1987. **59**(4): p. 203-7.
26. Lloyd-Jones, D.M., et al., *Defining and setting national goals for cardiovascular health promotion and disease reduction: the American Heart Association's strategic Impact Goal through 2020 and beyond*. Circulation, 2010. **121**(4): p. 586-613.
27. Akesson, A., et al., *Low-risk diet and lifestyle habits in the primary prevention of myocardial infarction in men: a population-based prospective cohort study*. J Am Coll Cardiol, 2014. **64**(13): p. 1299-306.
28. Chomistek, A.K., et al., *Healthy lifestyle in the primordial prevention of cardiovascular disease among young women*. J Am Coll Cardiol, 2015. **65**(1): p. 43-51.
29. Taylor, F., et al., *Statins for the primary prevention of cardiovascular disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2013. **1**: p. Cd004816.
30. *Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34)*. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Lancet, 1998. **352**(9131): p. 854-65.
31. Daly, C.A., et al., *The effect of perindopril on cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the EUROPA study: results from the PERSUADE substudy*. Eur Heart J, 2005. **26**(14): p. 1369-78.
32. Iestra, J.A., et al., *Effect size estimates of lifestyle and dietary changes on all-cause mortality in coronary artery disease patients: a systematic review*. Circulation, 2005. **112**(6): p. 924-34.
33. Marchioli, R., et al., *Meta-analysis, clinical trials, and transferability of research results into practice. The case of cholesterol-lowering interventions in the secondary prevention of coronary heart disease*. Arch Intern Med, 1996. **156**(11): p. 1158-72.
34. Smith, S.C., Jr., et al., *AHA/ACCF Secondary Prevention and Risk Reduction Therapy for Patients with Coronary and other Atherosclerotic Vascular Disease: 2011 update: a guideline from the American Heart Association and American College of Cardiology Foundation*. Circulation, 2011. **124**(22): p. 2458-73.

35. Fihn, S.D., et al., *2014 ACC/AHA/AATS/PCNA/SCAI/STS Focused Update of the Guideline for the Diagnosis and Management of Patients With Stable Ischemic Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, and the American Association for Thoracic Surgery, Preventive Cardiovascular Nurses Association, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons*. *Circulation*, 2014. **130**(19): p. 1749-1767.
36. Henderson, R.A., et al., *Long-term results of RITA-1 trial: clinical and cost comparisons of coronary angioplasty and coronary-artery bypass grafting. Randomised Intervention Treatment of Angina*. *Lancet*, 1998. **352**(9138): p. 1419-25.
37. Hamm, C.W., et al., *A randomized study of coronary angioplasty compared with bypass surgery in patients with symptomatic multivessel coronary disease. German Angioplasty Bypass Surgery Investigation (GABI)*. *N Engl J Med*, 1994. **331**(16): p. 1037-43.
38. Daemen, J., et al., *Long-term safety and efficacy of percutaneous coronary intervention with stenting and coronary artery bypass surgery for multivessel coronary artery disease: a meta-analysis with 5-year patient-level data from the ARTS, ERACI-II, MASS-II, and SoS trials*. *Circulation*, 2008. **118**(11): p. 1146-54.
39. Serruys, P.W., M.J.B. Kutryk, and A.T.L. Ong *Coronary-Artery Stents*. *New England Journal of Medicine*, 2006. **354**(5): p. 483-495.
40. Navarese, E.P., et al., *First-generation versus second-generation drug-eluting stents in current clinical practice: updated evidence from a comprehensive meta-analysis of randomised clinical trials comprising 31 379 patients*. *Open Heart*, 2014. **1**(1).
41. Stettler, C., et al., *Outcomes associated with drug-eluting and bare-metal stents: a collaborative network meta-analysis*. *Lancet*, 2007. **370**(9591): p. 937-48.
42. Bangalore, S., et al., *Short- and long-term outcomes with drug-eluting and bare-metal coronary stents: a mixed-treatment comparison analysis of 117 762 patient-years of follow-up from randomized trials*. *Circulation*, 2012. **125**(23): p. 2873-91.
43. Dangas, G.D., et al., *Meta-analysis of everolimus-eluting versus paclitaxel-eluting stents in coronary artery disease: final 3-year results of the SPIRIT clinical trials program (Clinical Evaluation of the Xience V Everolimus Eluting Coronary Stent System in the Treatment of Patients With De Novo Native Coronary Artery Lesions)*. *JACC Cardiovasc Interv*, 2013. **6**(9): p. 914-22.
44. Baber, U., et al., *Impact of the everolimus-eluting stent on stent thrombosis: a meta-analysis of 13 randomized trials*. *J Am Coll Cardiol*, 2011. **58**(15): p. 1569-77.
45. Stefanini, G.G., et al., *Biodegradable polymer drug-eluting stents reduce the risk of stent thrombosis at 4 years in patients undergoing percutaneous coronary intervention: a pooled analysis of individual patient data from the ISAR-TEST 3, ISAR-TEST 4, and LEADERS randomized trials*. *Eur Heart J*, 2012. **33**(10): p. 1214-22.
46. Stefanini, G.G., et al., *Safety and efficacy of drug-eluting stents in women: a patient-level pooled analysis of randomised trials*. *Lancet*, 2013. **382**(9908): p. 1879-88.

47. Stefanini, G.G., et al., *Long-term clinical outcomes of biodegradable polymer biolimus-eluting stents versus durable polymer sirolimus-eluting stents in patients with coronary artery disease (LEADERS): 4 year follow-up of a randomised non-inferiority trial*. Lancet, 2011. **378**(9807): p. 1940-8.
48. Bangalore, S., et al., *Bare metal stents, durable polymer drug eluting stents, and biodegradable polymer drug eluting stents for coronary artery disease: mixed treatment comparison meta-analysis*. Bmj, 2013. **347**: p. f6625.
49. Palmerini, T., et al., *Long-Term Safety of Drug-Eluting and Bare-Metal Stents: Evidence From a Comprehensive Network Meta-Analysis*. J Am Coll Cardiol, 2015. **65**(23): p. 2496-507.
50. Daemen, J., et al., *Early and late coronary stent thrombosis of sirolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents in routine clinical practice: data from a large two-institutional cohort study*. Lancet, 2007. **369**(9562): p. 667-78.
51. Park, S.J., et al., *Trial of everolimus-eluting stents or bypass surgery for coronary disease*. N Engl J Med, 2015. **372**(13): p. 1204-12.
52. Cao, C., et al., *Drug-eluting stents versus coronary artery bypass graft surgery in left main coronary artery disease: a meta-analysis of early outcomes from randomized and nonrandomized studies*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2013. **145**(3): p. 738-47.
53. Chieffo, A., et al., *Drug-eluting stent for left main coronary artery disease. The DELTA registry: a multicenter registry evaluating percutaneous coronary intervention versus coronary artery bypass grafting for left main treatment*. JACC Cardiovasc Interv, 2012. **5**(7): p. 718-27.
54. Windecker, S., et al., *2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization: The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) Developed with the special contribution of the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI)*. Eur Heart J, 2014. **35**(37): p. 2541-619.
55. Muller, W.A., *Getting Leukocytes to the Site of Inflammation*. Veterinary pathology, 2013. **50**(1): p. 7-22.
56. Kornowski, R., et al., *In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia*. J Am Coll Cardiol, 1998. **31**(1): p. 224-30.
57. Welt, F.G. and C. Rogers, *Inflammation and restenosis in the stent era*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(11): p. 1769-76.
58. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
59. Kearney, M., et al., *Histopathology of in-stent restenosis in patients with peripheral artery disease*. Circulation, 1997. **95**(8): p. 1998-2002.
60. Choi, E.T., et al., *Inhibition of neointimal hyperplasia by blocking alpha V beta 3 integrin with a small peptide antagonist GpenGRGDSPCA*. J Vasc Surg, 1994. **19**(1): p. 125-34.
61. Babapulle, M.N. and M.J. Eisenberg, *Coated stents for the prevention of restenosis: Part I*. Circulation, 2002. **106**(21): p. 2734-40.
62. Babapulle, M.N. and M.J. Eisenberg, *Coated stents for the prevention of restenosis: Part II*. Circulation, 2002. **106**(22): p. 2859-66.
63. Pasterkamp, G., D.P.V. de Kleijn, and C. Borst, *Arterial remodeling in atherosclerosis, restenosis and after alteration of blood flow: potential mechanisms and clinical implications*. Cardiovascular Research, 2000. **45**(4): p. 843-852.

64. Dana, H., et al., *Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA*. Int J Biomed Sci, 2017. **13**(2): p. 48-57.
65. McNeil, S.E., et al., *Lipoplexes formulation and optimisation: in vitro transfection studies reveal no correlation with in vivo vaccination studies*. Curr Drug Deliv, 2010. **7**(2): p. 175-87.
66. Lonez, C., M. Vandenbranden, and J.-M. Ruyschaert, *Cationic lipids activate intracellular signaling pathways*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2012. **64**(15): p. 1749-1758.
67. Filipowicz, W., et al., *Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs*. Curr Opin Struct Biol, 2005. **15**(3): p. 331-41.
68. Malecova, B. and K.V. Morris, *Transcriptional gene silencing through epigenetic changes mediated by non-coding RNAs*. Curr Opin Mol Ther, 2010. **12**(2): p. 214-22.
69. Dorsett, Y. and T. Tuschl, *siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(4): p. 318-329.
70. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
71. Tomari, Y. and P.D. Zamore, *Perspective: machines for RNAi*. Genes Dev, 2005. **19**(5): p. 517-29.
72. Graw, J., *Genetik*. Vol. 5. Auflage. 2015: Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg. 304-308.
73. Rossi, J.J., *Mammalian Dicer finds a partner*. EMBO reports, 2005. **6**(10): p. 927-929.
74. Kurreck, J., *RNA Interference: From Basic Research to Therapeutic Applications*. Angewandte Chemie International Edition, 2009. **48**(8): p. 1378-1398.
75. Rossi, J.J., *RNAi and the P-body connection*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(7): p. 643-644.
76. Dowler, T., et al., *Improvements in siRNA properties mediated by 2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinonucleic acid (FANA)*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(6): p. 1669-75.
77. Soutschek, J., et al., *Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 173-8.
78. Boussif, O., et al., *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7297-301.
79. Higuchi, Y., S. Kawakami, and M. Hashida, *Strategies for in vivo delivery of siRNAs: recent progress*. BioDrugs, 2010. **24**(3): p. 195-205.
80. Rassow, H., Netzker, Deutzmann, *Duale Reihe Biochemie*. 2012. **3. Auflage**.
81. Ricard-Blum, S., *The Collagen Family*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2011. **3**(1): p. a004978.
82. Sano, A., et al., *Atelocollagen for protein and gene delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 2003. **55**(12): p. 1651-77.
83. Minakuchi, Y., et al., *Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing in vitro and in vivo*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(13): p. e109.
84. Koken Co. Ltd. *About Kollagen*. 2005 [11.05.2016].
85. Ochiya, T., et al., *Biomaterials for gene delivery: atelocollagen-mediated controlled release of molecular medicines*. Curr Gene Ther, 2001. **1**(1): p. 31-52.

86. Honma, K., et al., *Atelocollagen-based gene transfer in cells allows high-throughput screening of gene functions*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **289**(5): p. 1075-81.
87. Hirai, K., et al., *Antisense oligodeoxynucleotide against HST-1/FGF-4 suppresses tumorigenicity of an orthotopic model for human germ cell tumor in nude mice*. *J Gene Med*, 2003. **5**(11): p. 951-7.
88. Hanai, K., et al., *Potential of atelocollagen-mediated systemic antisense therapeutics for inflammatory disease*. *Hum Gene Ther*, 2004. **15**(3): p. 263-72.
89. Svintradze, D.V. and G.M. Mrevlishvili, *Fiber molecular model of atelocollagen–small interfering RNA (siRNA) complex*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2005. **37**(5): p. 283-286.
90. Minakuchi, Y., et al., *Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing in vitro and in vivo*. *Nucleic Acids Research*, 2004. **32**(13): p. e109-e109.
91. Ahn, K., et al., *A permanent human cell line (EA.hy926) preserves the characteristics of endothelin converting enzyme from primary human umbilical vein endothelial cells*. *Life Sciences*, 1995. **56**(26): p. 2331-2341.
92. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
93. Uhl, W., et al., *PMN-elastase in comparison with CRP, antiproteases, and LDH as indicators of necrosis in human acute pancreatitis*. *Pancreas*, 1991. **6**(3): p. 253-9.
94. Lip, G.Y., et al., *Fibrin D-dimer and beta-thromboglobulin as markers of thrombogenesis and platelet activation in atrial fibrillation. Effects of introducing ultra-low-dose warfarin and aspirin*. *Circulation*, 1996. **94**(3): p. 425-31.
95. Jaronczyk, K., J.B. Carmichael, and T.C. Hobman, *Exploring the functions of RNA interference pathway proteins: some functions are more RISCy than others?* *Biochem J*, 2005. **387**(Pt 3): p. 561-71.
96. Davis, M.E., et al., *Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles*. *Nature*, 2010. **464**(7291): p. 1067-1070.
97. Roth, G.A., et al., *Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990 to 2013*. *Circulation*, 2015. **132**(17): p. 1667-78.
98. Bundesärztekammer (BÄK), K.B.K., Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), *Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische KHK – Leitlinienreport, Version 6.0. 2022 [cited: 2022-05-11]. . 2022*.
99. Bonzel, T., et al., *Percutaneous coronary interventions (PCI)*. *Clin Res Cardiol*, 2008. **97**(8): p. 513-47.
100. Bittl, J.A., et al., *Bayesian methods affirm the use of percutaneous coronary intervention to improve survival in patients with unprotected left main coronary artery disease*. *Circulation*, 2013. **127**(22): p. 2177-85.
101. Hlawaty, H., et al., *Inhibition of MMP-2 gene expression with small interfering RNA in rabbit vascular smooth muscle cells*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. **293**(6): p. H3593-601.
102. Shyu, K.G., et al., *RNA interference for discoidin domain receptor 2 attenuates neointimal formation in balloon injured rat carotid artery*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(8): p. 1447-53.

103. San Juan, A., et al., *Development of a functionalized polymer for stent coating in the arterial delivery of small interfering RNA*. *Biomacromolecules*, 2009. **10**(11): p. 3074-80.
104. Xu, M., et al., *Reduction of pancreatic cancer cell viability and induction of apoptosis mediated by siRNA targeting DNMT1 through suppression of total DNA methyltransferase activity*. *Mol Med Rep*, 2010. **3**(4): p. 699-704.
105. Lo, C.M., et al., *Cell movement is guided by the rigidity of the substrate*. *Biophys J*, 2000. **79**(1): p. 144-52.
106. Janmey, P.A., et al., *The Hard Life of Soft Cells*. Cell motility and the cytoskeleton, 2009. **66**(8): p. 597-605.
107. Saunders, R.L. and D.A. Hammer, *Assembly of Human Umbilical Vein Endothelial Cells on Compliant Hydrogels*. Cellular and molecular bioengineering, 2010. **3**(1): p. 60-67.
108. Nolte, A., et al., *Impact of polyelectrolytes and their corresponding multilayers to human primary endothelial cells*. *J Biomater Appl*, 2013. **28**(1): p. 84-99.
109. Bella, J., B. Brodsky, and H.M. Berman, *Hydration structure of a collagen peptide*. *Structure*, 1995. **3**(9): p. 893-906.
110. Honma, K., et al., *Atelocollagen-Based Gene Transfer in Cells Allows High-Throughput Screening of Gene Functions*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001. **289**(5): p. 1075-1081.
111. Takeshita, F., et al., *Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. **102**(34): p. 12177-12182.
112. Inaba, S., et al., *Atelocollagen-mediated Systemic Delivery Prevents Immunostimulatory Adverse Effects of siRNA in Mammals*. *Molecular Therapy*, 2012. **20**(2): p. 356-366.
113. Monaghan, M., et al., *A Collagen-based Scaffold Delivering Exogenous MicroRNA-29B to Modulate Extracellular Matrix Remodeling*. *Molecular Therapy*, 2014. **22**(4): p. 786-796.
114. Mu, P., et al., *Systemic delivery of siRNA specific to tumor mediated by atelocollagen: combined therapy using siRNA targeting Bcl-xL and cisplatin against prostate cancer*. *Int J Cancer*, 2009. **125**(12): p. 2978-90.
115. Nolte, A., et al., *Small-interfering RNA-eluting surfaces as a novel concept for intravascular local gene silencing*. *Mol Med*, 2011. **17**(11-12): p. 1213-22.
116. Dykxhoorn, D.M., C.D. Novina, and P.A. Sharp, *Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(6): p. 457-467.
117. Vogler, E.A. and C.A. Siedlecki, *Contact activation of blood-plasma coagulation*. *Biomaterials*, 2009. **30**(10): p. 1857-69.
118. Esmon, C.T., *The interactions between inflammation and coagulation*. *British Journal of Haematology*, 2005. **131**(4): p. 417-430.

## 7. Erklärung zum Eigenanteil

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

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. Olivia König.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. Olivia König, PD Dr. Andrea Nolte-Karayel und Bernd Neumann von mir eigenständig durchgeführt. Die Versuche zur Hämokompatibilität wurden mit der Unterstützung von Dr. Olivia König und Bernd Neumann durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte durch Dr. Olivia König und Dimitrios Nothdurft.

Es erfolgte im Februar 2017 eine Veröffentlichung durch Olivia König, Dimitrios Nothdurft et al. Im Journal „*Molecular Therapies – Nucleic acids*“ der „*Nature publishing group*“. Die o.g. Veröffentlichung wurde mit Unterstützung durch PD Dr. Andrea Nolte-Karayel von Olivia König und Dimitrios Nothdurft verfasst. Enthalten sind die Ergebnisse, die in Abbildung 4 -12 vorgestellt wurden. Die entsprechenden Abbildungen in der Veröffentlichung wurden von Dimitrios Nothdurft und Dr. Olivia König erstellt und erstmalig publiziert. Abbildungen 4-12 wurden in modifizierter Form aus der o.g. Veröffentlichung übernommen.

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

Leipzig, den 04.10.2021

\_\_\_\_\_  
D. Nothdurft

\_\_\_\_\_  
Apl. Prof. Dr. H. P. Wendel

\_\_\_\_\_  
Dr. O. König

\_\_\_\_\_  
PD Dr. A. Nolte-Karayel

## 7. Erklärung zum Eigenanteil

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

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. Olivia König.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. Olivia König, PD Dr. Andrea Nolte-Karayel und Bernd Neumann von mir eigenständig durchgeführt. Die Versuche zur Hämokompatibilität wurden mit der Unterstützung von Dr. Olivia König und Bernd Neumann durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte durch Dr. Olivia König und Dimitrios Nothdurft.

Es erfolgte im Februar 2017 eine Veröffentlichung durch Olivia König, Dimitrios Nothdurft et al. Im Journal „*Molecular Therapies – Nucleic acids*“ der „*Nature publishing group*“. Die o.g. Veröffentlichung wurde mit Unterstützung durch PD Dr. Andrea Nolte-Karayel von Olivia König und Dimitrios Nothdurft verfasst. Enthalten sind die Ergebnisse, die in Abbildung 4 -12 vorgestellt wurden. Die entsprechenden Abbildungen in der Veröffentlichung wurden von Dimitrios Nothdurft und Dr. Olivia König erstellt und erstmalig publiziert. Abbildungen 4-12 wurden in modifizierter Form aus der o.g. Veröffentlichung übernommen.

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

Leipzig, den 04.10.2021

\_\_\_\_\_  
D. Nothdurft

\_\_\_\_\_  
Apl. Prof. Dr. H. P. Wendel

\_\_\_\_\_  
Dr. O. König

\_\_\_\_\_  
PD Dr. A. Nolte-Karayel

\_\_\_\_\_  
B. Neumann

\_\_\_\_\_  
I. Degenkolbe

Nicht mehr im Labor erreichbar: Andreas Behring (Curevac), Tobias Walker, Nadja Perle, Prof. Dr. C. Schlensak.

## 8. Veröffentlichungen

Teile dieser Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Koenig O, Nothdurft D, Perle N, Neumann B, Behring A, Degenkolbe I, Walker T, Schlensak C, Wendel HP, Nolte A. *An Atelocollagen Coating for Efficient Local Gene Silencing by Using Small Interfering RNA*. *Molecular Therapies - Nucleic Acids*. 2017 Mar 17;**6**:290-301.

## 9. Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle meinen herzlichen Dank an Dr. Olivia König, PD Dr. Andrea Nolte-Karayel sowie Herrn Apl. Prof. Dr. Hans-Peter Wendel für die direkte und intensive Betreuung richten. Weiterhin an meine Familie, die diese Arbeit mit ihrer bedingungslosen Unterstützung für mich überhaupt möglich gemacht hat. Und auch an meine Tübinger Freunde, die auch nach langen Labortagen stets eine offene Tür und ein offenes Ohr für mich hatten. Zuletzt an Juli. Du hast mir gezeigt, dass auch ein großer Schritt nur aus vielen kleinen besteht.