

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

**In vitro Studie zur Anwendung modifizierter TIMP3 und
eNOS mRNA zur Reduktion Stent-Angioplastie
assoziierter Komplikationen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Diener, Christoph

2018

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. H.P. Wendel

2. Berichterstatter:

Professor Dr. D. Alexander-
Friedrich

Tag der Disputation:

29.01.2018

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-------------|
| Abkürzungsverzeichnis | V |
| Tabellenverzeichnis | VIII |
| Abbildungsverzeichnis | IX |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Atherosklerose | 1 |
| 1.1.1 Definition und Epidemiologie | 1 |
| 1.1.2 Pathogenese | 2 |
| 1.1.3 Risikofaktoren | 3 |
| 1.1.4 Therapie | 4 |
| 1.1.5 Therapie mit Stents | 6 |
| 1.2 Messenger RNA (mRNA) | 8 |
| 1.2.1 Grundlagen | 8 |
| 1.2.2 Eigenschaften der mRNA | 10 |
| 1.2.3 Therapeutische Anwendungen der mRNA | 10 |
| 1.2.4 Eigenschaften der mRNA und der Vergleich mit Plasmid DNA (pDNA) | 11 |
| 1.3 Transfektion | 12 |
| 1.4 Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) | 15 |
| 1.5 Gewebsspezifischer Metalloproteaseinhibitor 3 (TIMP3) | 18 |
| 1.6 Zielsetzung | 21 |
| 2 Materialien | 22 |
| 2.1 Zelllinien | 22 |
| 2.1.1 A549 | 22 |
| 2.1.2 EA.hy926 | 22 |
| 2.1.3 Nährmedium | 22 |
| 2.2 Geräte | 23 |
| 2.3 Verbrauchsmaterialien | 25 |
| 2.4 Chemikalien, Reagenzien und Kits | 28 |
| 2.5 Medien, beigefügte Zusätze und Reagenzien zur Zellkultivierung | 33 |
| 3 Methoden | 35 |
| 3.1 Amplifikation der Plasmide durch Polymerase Chain | 35 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| | Reaction (PCR) | |
| 3.2 | Messung der Konzentration und Agarosegelelektrophorese der amplifizierten DNA | 37 |
| 3.3 | <i>In-vitro</i> Transkription (IVT) | 37 |
| 3.4 | Messung der Konzentration und Agarosegelelektrophorese der hergestellten mRNA | 39 |
| 3.5 | Zellkultivierung von A549 und EA.hy926 Zellen | 40 |
| 3.6 | Zellzahlbestimmung | 40 |
| 3.7 | Cryokonservierung und Auftauen der Zellen | 41 |
| 3.8 | Anzucht auf 12-Well Platten | 41 |
| 3.9 | Transfektion der Zellen mit mRNA | 42 |
| 3.10 | Bestimmung der Zellviabilität mit dem MTT-Assay | 43 |
| 3.11 | ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) | 43 |
| 3.12 | Durchflusszytometrie (FACS: Fluorescence activated cell sorter) | 44 |
| 3.13 | Minipreparation mit Escherichia coli (E.coli) | 46 |
| 3.14 | Plasmidisolation | 47 |
| 3.15 | Restriktionsverdau | 47 |
| 3.16 | SensoLyte 520 MMP-1 Assay Kit | 47 |
| 4 | Ergebnisse | 50 |
| 4.1 | Die Herstellung der mRNA der Enzyme TIMP3 und eNOS | 50 |
| | 4.1.1 PCR aus den beiden Plasmiden | 50 |
| | 4.1.2 <i>In-vitro</i> Transkription | 53 |
| 4.2 | Transfektion und anschließende Kontrolle der Enzymexpression | 57 |
| | 4.2.1 Messung der Zellviabilität mit dem MTT-Assay | 57 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.2.1.1 | Messung der Zellviabilität nach Trans – fektion mit 100% modifizierter mRNA | 58 |
| 4.2.1.2 | Messung der Zellviabilität nach Trans – fektion mit 25 % modifizierter mRNA | 59 |
| 4.2.1.3 | Vergleich der Viabilitäten der mit 25 % und 100 % modifizierten mRNA | 61 |
| 4.2.2 | ELISA zum Nachweis von TIMP3 in den Mediumsüberständen transfizierter Zellen | 62 |
| 4.2.2.1 | ELISA aus den Überständen der mit 100 % modifizierten mRNA transfizierten Zellen | 63 |
| 4.2.2.2 | ELISA aus den Überständen der mit 25 % modifizierten mRNA transfizierten Zellen | 65 |
| 4.2.2.3 | Vergleich der Expression der mit 25 % und 100 % Modifizierten mRNA transfizierten Zellen | 67 |
| 4.2.3 | Durchflusszytometrie aus der Überständen der mit eNOS transfizierten Zellen | 68 |
| 4.3 | Darstellung der Vermehrung des Plasmids durch Bakterien | 70 |
| 4.4 | Darstellung der TIMP3 Enzymaktivität im SensoLyte Assay | 72 |
| 5 | Diskussion | 77 |
| 5.1 | Herstellung der mRNA | 79 |
| 5.2 | Verträglichkeit der Transfektion | 81 |
| 5.3 | Transfektionserfolge für TIMP3 und eNOS | 83 |
| 5.3.1 | Vergleich mit anderen Studien | 84 |
| 5.3.2 | Therapeutischer Einsatz von Transfektion mit mRNA | 87 |
| 5.3.3 | Mögliche Gründe für die nicht erfolgreiche Transfektion von eNOS | 88 |
| 5.4 | Funktionalitätsprüfung des exprimierten Enzyms TIMP3 | 90 |
| 5.5 | Fazit und Ausblick | 93 |
| 6 | Zusammenfassung | 95 |
| | Literaturverzeichnis | 97 |

| | |
|---|------------|
| Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift | 105 |
| Danksagung | 106 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| ADAM | ADAM-Metalloprotease (A Disintegrin and Metalloproteinase) |
| ARCA | Anti-Reverse Cap Analog |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| Bp | Basenpaare |
| BMI | Body Mass Index |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| Bzw | Beziehungsweise |
| Ca ²⁺ | Calcium |
| cGMP | zyklisches Guanosinmonophosphat |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CPD | Cyclobutan Pyrimidin Dimere |
| CTP | Cytidintriphosphat |
| ddH ₂ O | doppelt-destilliertes Wasser (double-distilled water) |
| DES | Medikamenten-beschichtete Stents (drug-eluting Stents) |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| DOPE | Dioleoylphosphatidylethanolamine |
| DOTAP | 1,2-dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan |
| E.coli | Escherichia Coli |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| eNOS | endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase |
| EZM | extrazelluläre Matrix |
| FACS | Fluorescence Activated Cell Sorting (Durchflusszytometrie) |
| FCS | Fetales Kälberserum (Fetal calf serum) |

| | |
|------------------|--|
| FD | Fast Digest |
| FSC | Forward scatter signal |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| H ⁺ | Proton |
| H ₂ O | Wasser |
| HDL | Lipoprotein hoher Dichte (High Density Lipoprotein) |
| iNOS | induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase |
| IVT | <i>In-vitro</i> Transkription |
| KHK | koronare Herzkrankheit |
| kPa | Kilopascal |
| LB | Lysogeny Broth |
| LDL | Lipoprotein niederer Dichte (Low Density Lipoprotein) |
| LE | Niedrige Elektroendosmose (Low Electroendosmosis) |
| MEM | Minimal Essential Medium |
| MEN | MOPS – EDTA – Natriumacetat |
| MMP | Matrix-Metalloproteasen |
| MOPS | 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure |
| MTT | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide |
| mRNA | Messenger Ribonukleinsäure |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat |
| NF-κB | nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells |
| NK | Natürliche Killerzelle |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NOS | Stickstoffmonoxid-Synthase |
| nNOS | neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase |
| O ₂ | Sauerstoff |
| pAVK | periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) |
| PBS | phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered |

| | |
|-----------------|---|
| | Saline) |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction) |
| PDGF | Platelet-derived growth factor |
| pDNA | Plasmid DNA |
| PE | Phycoerythrin |
| PenStrep | Penicillin/Streptomycin |
| PKR | Protein Kinase R |
| PTA | Perkutane transluminale Angioplastie |
| PTCA | Perkutane transluminale Koronarangioplastie (percutaneous transluminal coronary angioplasty) |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| SOC | Super Optimal Broth with Catabolite repression |
| SSC | Side scatter signal |
| TBE | TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) - Borat - EDTA |
| TIMP3 | Gewebsspezifischer Metalloproteaseinhibitor 3 (tissue inhibitor of metalloproteinase 3) |
| TLR | Toll-ähnliche Rezeptoren (Toll-like receptors) |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor α |
| tPA | Gewebsspezifischer Plasminogenaktivator (tissue plasminogen activator) |
| u.a. | unter anderen/m |
| UTP | Uridintriphosphat |
| UV | Ultraviolett |
| VCAM-1 | Vascular cell adhesion molecule 1 |
| VEFG-Rezeptor 2 | Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor 2 |
| vWF | von Willebrand Faktor |
| z.B. | zum Beispiel |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-------------|---|----|
| Tabelle 1: | Verwendete Zelllinien | 22 |
| Tabelle 2: | Verwendete Geräte | 23 |
| Tabelle 3: | Eingesetzte Verbrauchsmaterialien | 25 |
| Tabelle 4: | Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Kits, sortiert nach den einzelnen Versuchen | 28 |
| Tabelle 5: | Eingesetzte Medien für die Schritte der Zellkultivierung, inklusive aller Zusätze | 33 |
| Tabelle 6: | Zusammensetzung der PCR-Ansätze zur Amplifikation der Plasmide | 36 |
| Tabelle 7: | Standardeinstellung des PCR-Cyclers | 36 |
| Tabelle 8: | Reagenzien für die <i>in-vitro</i> Transkription nach T7 MEGAscript | 38 |
| Tabelle 9: | Ansätze zur Denaturierung | 39 |
| Tabelle 10: | Ansatz für den Restriktionsverdau | 47 |
| Tabelle 11: | Zusammensetzung der Kontrollen des SensoLyte Assays | 49 |
| Tabelle 12: | Einstellungen des PCR-Cyclers für die PCR des eNOS-Plasmids | 53 |
| Tabelle 13: | Darstellung der Viabilitäten der A549 | 61 |
| Tabelle 14: | Darstellung der Viabilitäten der EA.hy926 | 61 |
| Tabelle 15: | Darstellung der Expression der A549 nach 24 h | 67 |
| Tabelle 16: | Darstellung der Expression der A549 nach 48 h | 67 |
| Tabelle 17: | Darstellung der Expression der EA.hy926 nach 24 h | 68 |
| Tabelle 18: | Darstellung der Expression der EA.hy926 nach 48 h | 68 |
| Tabelle 19: | Konzentrationen nach Restriktionsverdau der vermehrten Plasmide | 72 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|---------------|--|----|
| Abbildung 1: | Biosynthese von NO | 15 |
| Abbildung 2: | Formel zur Berechnung der Menge der benötigten Zellsuspension für 150.000 Zellen | 42 |
| Abbildung 3: | Formel zur Berechnung des Volumens der eingesetzten mRNA | 42 |
| Abbildung 4: | Agarosegel der TIMP3-DNA | 51 |
| Abbildung 5: | Agarosegel der eNOS-DNA | 52 |
| Abbildung 6: | Agarosegel der 100 % modifizierten TIMP3-mRNA | 54 |
| Abbildung 7: | Agarosegel der 25 % modifizierten TIMP3-mRNA | 55 |
| Abbildung 8: | Agarosegel der eNOS-mRNA | 56 |
| Abbildung 9: | Viabilität der A549 nach Transfektion mit 100 % modifizierter mRNA | 58 |
| Abbildung 10: | Viabilität der EA.hy926 nach Transfektion mit 100 % modifizierter mRNA | 58 |
| Abbildung 11: | Viabilität der A549 nach Transfektion mit 25 % modifizierter mRNA | 60 |
| Abbildung 12: | Viabilität der EA.hy926 nach Transfektion mit 25 % modifizierter mRNA | 60 |
| Abbildung 13: | TIMP3 Konzentration der A549 nach 24 h und 48 h nach Verwendung 100 % modifizierter mRNA | 63 |
| Abbildung 14: | TIMP3 Konzentration der EA.hy926 nach 24 h und 48 h nach Verwendung 100 % modifizierter mRNA | 64 |
| Abbildung 15: | TIMP3 Konzentration der A549 24 h und 48 h nach Verwendung 25 % modifizierter mRNA | 65 |
| Abbildung 16: | TIMP3 Konzentration der EA.hy926 24 h und 48 h nach Verwendung 25 % modifizierter mRNA | 66 |
| Abbildung 17: | Expression des eNOS Proteins nach 24 h | 69 |
| Abbildung 18: | Expression des eNOS Proteins nach 24 h | 71 |
| Abbildung 19: | Schnittstellen des Restriktionsenzym XbaI | 72 |
| Abbildung 20: | Fluoreszenz nach 0 min, Versuch 1 | 73 |
| Abbildung 21: | Fluoreszenz nach 15 min, Versuch 1 | 73 |
| Abbildung 22: | Fluoreszenz nach 30 min, Versuch 1 | 74 |
| Abbildung 23: | Fluoreszenz nach 0 min, Versuch 2 | 74 |
| Abbildung 24: | Fluoreszenz nach 15 min, Versuch 2 | 75 |
| Abbildung 25: | Fluoreszenz nach 30 min, Versuch 2 | 75 |

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Arteriosklerose wird als ein Überbegriff für verschiedene degenerative Erkrankungen arterieller Gefäße verwendet. Dabei lässt sich die Arteriosklerose in die Atherosklerose, Arteriolosklerose und die Mönckeberg-Sklerose unterteilen. Bei der in dieser Arbeit im Vordergrund stehenden Atherosklerose handelt es sich um eine herdförmige, in der Intima der Gefäße lokalisierte Erkrankung, welche über Jahre zu einer Stenosierung der betroffenen Gefäßabschnitte führt. Diese in der Intima lokalisierten Lipidablagerungen lassen sich an großen und mittelgroßen arteriellen Gefäßen im gesamten Körper auffinden. Im Gegensatz dazu befällt die Arteriolosklerose vor allem kleinere Gefäße wie die Arteriolen im Bereich der Bauchorgane. Davon abzugrenzen ist des Weiteren die Mönckeberg-Sklerose oder auch fokale Kalzifizierung, bei welcher es aufgrund von altersbedingter Degeneration glatter Muskelzellen zu Lipideinlagerungen in der Media kommt [1, 2].

Auf der Grundlage von atherosklerotischen Gefäßveränderungen können sich manifeste Krankheitsbilder wie die koronare Herzkrankheit (KHK), die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) oder zerebrale bzw. viszerale Durchblutungsstörungen entwickeln. Somit lassen sich etwa 95 % der Fälle von KHK und 90 % der diagnostizierten pAVK ursachenbedingt auf atherosklerotische Prozesse in den Gefäßen zurückverfolgen. Im Alter von 40-79 Lebensjahren liegt somit die Prävalenz von koronarer Herzkrankheit bei etwa 9 %, Männer sind etwa doppelt so häufig betroffen wie Frauen. Dabei ist in 30 % der Fälle bei Patienten mit KHK der Herzinfarkt die erste klinische Manifestation, welcher weiterhin zu den häufigsten Todesursachen im Erwachsenenalter in den westlichen Industrienationen zählt [1, 3].

Die periphere arterielle Verschlusskrankheit tritt bei Personen älter als 50 Jahre mit einer Prävalenz von etwa 10 % auf, wobei Männer etwa 5 mal häufiger betroffen sind als Frauen [4].

1.2 Pathogenese

Bei der Atherosklerose handelt es sich um einen chronischen Prozess, welcher aufgrund lokaler Funktionsstörungen der inneren Schicht der Gefäße, des Endothels, ausgelöst wird. Dabei triggern bestimmte Risikofaktoren wie Rauchen oder arterieller Hypertonus diese endotheliale Dysfunktion, welche sich bereits ab dem Kindesalter in geringeren Ausmaßen auszubilden scheint [1].

Kompensatorisch beginnt am Endothel eine Entzündungsreaktion, welche mit Veränderungen der Permeabilitäts- und Adhäsionseigenschaften, sowie der lokalen Produktion von Zytokinen, vasoaktiven Substanzen oder Wachstumsfaktoren einhergeht [1]. Somit kommt es u.a. zu einer verminderten Produktion der antisklerotisch wirkenden Substanzen Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin, welche den Gefäßtonus senken und die Thrombozytenaggregation und Leukozytenadhäsion im gesunden Endothel hemmen [2]. Gleichzeitig werden mehr vasokonstriktorisch wirkende Mediatoren wie Endothelin, Thromboxan A₂ oder Angiotensin II von inflammatorischen Zellen wie Makrophagen gebildet [1].

Durch das geschädigte Endothel wandern nun Monozyten in die Intima ein, welche sich unter dem Einfluss von Zytokinen zu Makrophagen umwandeln [1, 2]. An freigelegte, negativ geladene Proteoglykane lagert sich die Apolipoproteindomäne B100 der Lipoproteine niederer Dichte (LDL) an, diese akkumulieren somit in der Intima [5]. Reaktive Sauerstoffspezies, freigesetzt von inflammatorischen Zellen, oxidieren das LDL, welches danach von Makrophagen der Intima über Scavenger-Rezeptoren aufgenommen wird. Die mit den Lipiden beladenen Makrophagen werden auch als Schaumzellen bezeichnet [1, 2].

Unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren, welche aus dem Endothel und Makrophagen abgegeben werden, wandern glatte Muskelzellen aus der Media unter die Intima ein und bilden zusammen mit den Makrophagen frühe atherosklerotische Läsionen, die sogenannten fatty streaks. Des Weiteren kommt es zu einer Aktivierung und nachfolgenden Einwanderung von T-Lymphozyten in die Gefäßwand und einer Anlagerung von Thrombozyten und Leukozyten an der Endotheloberfläche. Die nach subintimal migrierten glatten Muskelzellen produzieren Kollagene und Proteoglykane, welche über Jahre bis Jahrzehnte

eine fibrinöse Matrix innerhalb der entstandenen Plaques, aber auch eine fibrinöse Kappe zur Begrenzung gegenüber des Gefäßlumens ausbilden. Im Inneren der Plaques bildet sich durch Akkumulation von apoptotischen Zellen, Debris und Cholesterin-Kristallen ein nekrotischer Kern aus [1, 6].

Neben der zunehmenden Stenosierung des betroffenen Gefäßabschnittes kann es ebenso zu einer Ulzeration oder Ruptur der fibrinösen Kappe kommen, wobei thrombogene Substanzen aus dem Plaque in das Blut übertreten können und es durch Bildung eines Thrombus zu einer akuten Verlegung der Gefäße kommen kann. Die z.B. dadurch ausgelösten Krankheitsbilder des Herzinfarkts und Schlaganfalls gehören zu den häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrienationen im Erwachsenenalter.

Eine solche Ruptur des Plaques kann auf der einen Seite durch körperliche Anstrengung, mechanischen Stress oder Vasokonstriktion, auf der anderen Seite aber auch durch Produktion von Matrix-Metalloproteasen oder anderen proteolytischen Enzymen durch aktivierte Makrophagen ausgelöst werden [1].

1.3 Risikofaktoren

Die Entstehung und das Voranschreiten von lokaler, endothelialer Dysfunktion, welche der Hauptauslöser von Atherosklerose ist, werden durch verschiedene Risikofaktoren getriggert. Zu den Hauptrisikofaktoren zählen arterieller Hypertonus, Nikotinabusus, Hyper- oder Dyslipoproteinämie und Diabetes mellitus [1].

Der arterielle Hypertonus führt vor allem zu einer verminderten Produktion von Stickstoffmonoxid, welches als ein potenter Vasodilatator gilt [7]. Wird ein arterieller Hypertonus zu spät behandelt, können seine negativen Effekte auf die Funktion des Endothels irreversibel werden [8]. Weitere endotheliale Schäden werden durch oxidativen Stress an den Blutgefäßen nach Konsum von Zigaretten ausgelöst, wobei nachgewiesen werden konnte, dass der Schaden mit der Anzahl der gerauchten Zigaretten korreliert. Hinzu kommt, dass viele schädliche Effekte des Zigarettenrauchens nach Beenden des Konsums reversibel sein können [1]. Patienten mit Diabetes mellitus zeigen ebenfalls ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung atherosklerotischer Läsionen, etwa 75 % der Mortalität dieser

Patientengruppe lässt sich auf diese Genese zurückführen [9]. Durch erhöhte Glucosespiegel im Blut oder vermehrtes Inflammationsgeschehen kommt es über die Bildung von Superoxid (O_2^-) und dessen Reaktion mit NO zu einer vermehrten Akkumulation von Peroxinitrit [10]. Diese reaktive Sauerstoffverbindung kann den Kofaktor der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) oxidieren und somit zu einer eNOS Entkopplung führen. Die entkoppelte eNOS synthetisiert anstatt Stickstoffmonoxid Superoxid, welches den oxidativen Stress am Endothel verstärkt [11]. Zusätzlich lösen ungünstige Konstellationen an Blutfettwerten eher atherosklerotische Läsionen aus. Demnach wirken sich hohe Werte an oxidiertem LDL und niedrige Werte von Lipoprotein hoher Dichte (HDL) nachteilig auf endotheliale Funktionen wie zum Beispiel Auslösung einer Vasodilatation aus.

Ebenso führen altersbedingte Umbauprozesse in den Gefäßwänden zu einer verminderten Vasodilatations-Fähigkeit und können dadurch auch eine endotheliale Dysfunktion bedingen. Bei Frauen werden atherosklerotische Läsionen später festgestellt, dies liegt wohl an den protektiven Effekten des vor allem prämenopausal gebildeten Östrogens [8].

Somit haben Raucher ein 2 - 4 fach erhöhtes Risiko für die Ausbildung einer pAVK, dabei korreliert die Anzahl der gerauchten Zigaretten mit dem Risiko einer pAVK, gleichzeitig nimmt es bei erfolgreichem Unterlassen des Konsums wieder ab. Des Weiteren führt ein arterieller Blutdruck systolisch höher als 140 mmHg und diastolisch höher als 90 mmHg bei Frauen zu einem 4 fach und bei Männern einem 2,5 fach erhöhtem Risiko für das Auftreten von pAVK [1].

1.4 Therapie

Im Vordergrund bei der Therapie der Atherosklerose steht die Reduktion der die endotheliale Dysfunktion auslösenden Risikofaktoren. Dazu gehören vornehmlich eine Beendigung des Zigarettenkonsums, eine Gewichtsabnahme unter einen Body Mass Index (BMI) von 25 kg/m^2 , eine gesündere Ernährung wie mediterrane Kost, sowie Medikamente zur Reduktion des Blutdrucks, der Blutfette und zur Einstellung eines Diabetes mellitus. Das zur Gewichtsabnahme ausgewählte Training sollte in Maßen durchgeführt werden, wie zum Beispiel 30

Minuten täglich, um eine Plaqueruptur, ausgelöst durch den physischen Stress, zu verhindern. Diese Maßnahmen können alle der Primär- und Sekundärprävention dieser Erkrankung zugeordnet werden [1, 12].

Bei den aktuell etablierten Medikamenten, eingesetzt bei Patienten mit manifester Atherosklerose oder einem besonderen Risikoprofil für diese Erkrankung, eignet sich nur die Klasse der Statine zur Primärprävention. Diese senken über Hemmung der Cholesterinsynthese die Blutspiegel von LDL, verbessern die Endothelfunktion und stabilisieren sich bereits ausgebildete Plaques [13]. Andere zur Sekundärprävention eingesetzten Medikamente sind β -Blocker und ACE-Hemmer, welche die endotheliale Funktion zum Beispiel über antiproliferative Wirkweisen wieder verbessern können [14, 15]. Des Weiteren werden prophylaktisch Medikamente zur Thrombozytenaggregationshemmung wie Aspirin oder Clopidogrel eingesetzt, um im Falle einer Plaqueruptur die Ausbildung eines Thrombus unwahrscheinlicher zu machen [12, 16].

Kommt es dennoch zur Ausbildung eines Thrombus, kann bei Detektion eine systemische Fibrinolyse mit Streptokinase oder rekombinant hergestellten Fibrinolytika wie Alteplase durchgeführt werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit der invasiven Entfernung des Thrombus mittels Thrombendarteriektomie, bei der der Thrombus unter Eröffnen des Gefäßes entfernt wird. Bei peripheren Verschlüssen findet ebenfalls die Thrombektomie Anwendung, hierbei wird ein Katheter an dem Thrombus vorbeigeführt, aufgefüllt und mitsamt des Thrombus zurückgezogen. Rezidivierende atherosklerotische Läsionen werden zudem mit Atherektomien therapiert. Die Plaques werden mittels rotierenden Kathetern oder Lasern abgetragen. Ein weiteres angioplastisches Verfahren ist die Ballondilatation. Nach Einführen eines Katheters in das Gefäßssystem wird dieser im Bereich der Stenose aufgeblasen, dadurch kommt es zu einer Dehnung des verengten Gefäßabschnittes. Dabei schließt sich zum Beispiel der perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) der Herzkranzgefäße häufig eine Stentimplantation an, um die Stenose dauerhaft offen zu halten.

Um einen verengten Gefäßabschnitt zu umgehen, können in der Bypasschirurgie Gefäße mit einer geringeren Relevanz wie oberflächliche Hautvenen des Beines

als Umgehungskreisläufe der verengten Passage eingefügt werden [1, 4].

1.5 Therapie mit Stents

Die perkutante transluminale Koronarangioplastie (PTCA) ist die häufigste angewandte Therapieoption zur koronararteriellen Rekanalisation. Im Zuge dieser Katheterintervention kann nach Wiedereröffnen der Stenose ein Stent zur längerfristigen Stabilisierung des erweiterten Gefäßabschnittes eingesetzt werden [17]. Die Indikation einer PTCA stellt sich zum Beispiel bei instabiler oder stabiler Angina pectoris, falls während einer koronarangiografischen Untersuchung eine Ischämie distal der Stenose des Gefäßes nachgewiesen wurde. Kommt es therapeutisch nur zu einer Erweiterung der stenosierten Abschnitte, zum Beispiel durch eine Ballondilatation, leiden 20 - 40 % der behandelten Patienten nach 6 Monaten unter den Folgen einer Re-Stenose, also einem Wiederverschluss des dilatierten Gefäßbereiches. Wird das erweiterte arterielle Segment jedoch mit einem beschichteten Stent stabilisiert, fällt die Re-Stenose-Rate auf ungefähr 8 % [18, 19].

Eine Ballondilatation mit darauffolgender Implantation eines Stents ist der Bypasschirurgie vor allem bei kurzstreckigen und proximal im Koronargefäßnetz lokalisierten Stenosen vorzuziehen. Dagegen hat sie ihre Grenzen bei koronarer Mehrgefäßerkrankung oder durch Atherosklerose ausgelöste Hauptstammstenosen der linken Koronararterie, in diesen Fällen ist eine chirurgische Intervention oft die einzige Behandlungsmöglichkeit. Dabei liegt die Letalität einer Katheterintervention mit unter 1 % niedriger als die Sterblichkeit der weitaus invasiveren Bypassoperation.

Ein ähnliches Therapiekonzept findet bei der pAVK Anwendung, hier wird bei der perkutanen transluminalen Angioplastie (PTA) der stenosierte Gefäßabschnitt erweitert und daraufhin in dem größten Teil der Fälle mit einem Stent stabilisiert. Die PTA findet ebenfalls hauptsächlich bei kurzstreckigen Stenosen Anwendung [1, 4].

Zunächst wurden unbeschichtete Metallstents zum Erhalt des Gefäßlumens implantiert. Dabei kam es immer noch bei 20 – 30 % der therapierten Patienten zu einer In-Stent-Restenose, also zu einem zunehmendem Verschluss des

Lumens auf Höhe des eingesetzten Stents [20]. Dieser Verschluss entsteht auf der Grundlage des mechanischen Stresses bei der Dilatation der PTCA und Einbringen des Stents in das Gefäßsystem. Reaktive Entzündungsprozesse führen zur Migration und Proliferation glatter Muskelzellen der Media, welche über die Bildung von extrazellulärer Matrix ein Remodelling des Endothels am Stent auslösen. Dieses neue Gewebe wird auch als Neointima bezeichnet und engt das Gefäßlumen ein, wodurch die Entstehung von In – Stent – Restenosen getriggert wird [21]. Mit dem Ziel die durch die PTCA ausgelöste Inflammation mit anschließender Proliferation glatter Muskelzellen einzuschränken, wurden mit Medikamenten beschichtete Stents, die sogenannten drug – eluting Stents, entwickelt. Die Stents bestehen aus drei Komponenten, zum Einen der Stent Plattform, bestehend aus einem nichtrostenden feinen Stahlgerüst, und zum Anderen dem beschichteten immunsuppressiven Medikament, welches an ein Polymer, einen chemischen Trägerstoff gebunden ist, welcher die Abgabe der Antiproliferativa reguliert [17, 22].

Etablierte Medikamente zur Beschichtung der Stents sind das Zytostatikum Paclitaxel und das Immunsuppressivum Sirolimus [18, 19], wobei es unter Einsatz von mit Sirolimus beschichteten Stents etwas seltener zu Stent-Thrombosen, aber einer ähnlich hohen Langzeitmortalität kommt [23]. Trotz der signifikant verringerten Inzidenz an In-Stent-Restenosen, kommt es nach Einsetzen eines drug-eluting Stents häufiger zu späten Stent-Thrombosen, also thrombotischen Ereignissen nach mehr als 30 Tagen nach Stentimplantation, im Vergleich zu unbeschichteten Metallstents [24]. Dies lässt sich auf eine stark verzögerte Re-Endothelialisierung, also Einwachsen des Stents in die Gefäßintegrität durch Neubildung von Endothel auf der Stentoberfläche, erklären. Durch die freiliegende Metallstruktur des Stents können sich leicht Thromben in deren Bereich ausbilden. Dabei ist die Re-Endothelialisierung bei unbeschichteten Metallstents nach 6 – 7 Monaten, bei den beschichteten Stents erst nach mehr als 40 Monaten abgeschlossen [25]. Der verzögerte Heilungsprozess wird durch mangelnden Kontakt zwischen Stent und Gefäßwand ausgelöst, wenn der Durchmesser des Stents zu klein gewählt wurde, dieser im Zuge der Intervention nicht richtig positioniert wird, oder verkalkte

Gefäßabschnitte die flexiblen Anpassungsfähigkeiten der Gefäßwände einschränken [26]. Des Weiteren hemmen die in der Beschichtung enthaltenen Medikamente und das Polymer die Neubildung des Endothels auf der Stentoberfläche [17].

Aufgrund dieses Nachteils der ersten Generation der beschichteten Stents gibt es viele Ansätze neuartiger Stent-Varianten. Auf der einen Seite versucht man die Stent-Struktur durch den Einsatz dünnerer Gitter noch flexibler zu machen, damit sich Gefäßwand und Stent besser aneinander anlegen können [27]. Des Weiteren werden neue Medikamente erprobt, welche weniger lokale Entzündungsreaktionen am Gefäß auslösen und besser vertragen werden. Somit wurden zum Beispiel die beiden Sirolimus-Derivate Zotarolimus und Everolimus als neue Beschichtungsalternativen getestet [28, 29]. Auf der anderen Seite liegt der Schwerpunkt in den letzten Jahren auf der Entwicklung von resorbierbaren Materialien, also nach einer gewissen Zeit sich selbst auflösenden Stents oder Polymeren. Die durch permanente Polymere ausgelöste Aktivierung von Entzündungszellen wie Granulozyten, welche ein Jahr nach Implantation weiter ansteigt, könnte somit deutlich vermindert werden [30, 31]. Ebenso hätten resorbierbare Stents die Vorteile, dass die Gefäßhomöostase nach Auflösung des Fremdkörpers schneller wiederhergestellt werden würde und eine medikamentöse Hemmung der Thrombozytenaggregation früher beendet werden könnte [32].

1.2 Messenger RNA (mRNA)

1.2.1 Grundlagen

Das Genom einer Zelle beschreibt die Zusammensetzung der in der Erbinformation befindlichen Gene. Es besteht aus vier verschiedenen Basen, welche zusammen mit der Pentose Desoxyribose und Phosphatresten in Form von DNA zu den Chromosomen zusammengesetzt sind. Dabei befindet sich an Position 1' der zyklischen Pentose (Desoxyribose) die zum Nukleosid (Pentose und Base zusammen) gehörige Base. Über die Positionen 3' und 5' sind die

Zuckerringe über Diphosphatbindungen mit weiteren Nucleosiden verbunden. Je nach Abfolge der vier Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin ergibt sich eine für die Proteine basierende Grundinformation, welche im Zellkern jeder eukaryoten Zelle in Form der Chromosomen gespeichert ist. Die Gene, welche sich auf den Chromosomen befinden, codieren für Proteine, welche als Enzyme wirken, Transport und Kommunikation zwischen Zellen steuern, stützende Funktionen ausüben und viele weitere vielfältige Funktionen einnehmen können. Um aus der DNA fertige Proteine zu erhalten, wird die doppelsträngige DNA zunächst in einzelsträngige RNA umgeschrieben. Dieser Vorgang wird durch eine DNA-abhängige RNA Polymerase durchgeführt, welche die RNA komplementär zu einem der DNA-Stränge aufbaut, wobei Thymin durch Uracil und Desoxyribose durch Ribose ersetzt wird. Dieser Vorgang wird als Transkription bezeichnet.

Die entstandene RNA wird zur Weiterverarbeitung zunächst modifiziert. Hierfür wird an das 5' – Ende 7-Methyl-Guanosin und an das 3' – Ende ein Poly-A-Schwanz (etwa 250 Adenosinmonophosphatreste) angehängt. Der Poly-A-Schwanz begrenzt die Transkription auf die für die Proteinsynthese relevante DNA-Sequenz. Im letzten Modifizierungsschritt werden nicht codierende Introns herausgeschnitten und die codierenden Exons durch Spleißen zur fertigen mRNA zusammengefügt, bevor die mRNA über Shuttleproteine in das Zytoplasma transportiert wird. Der Name mRNA leitet sich aus der Botenfunktion ab, welche die mRNA bei der Übermittlung der im Zellkern befindlichen Erbinformation in das Zytoplasma einnimmt.

Die Fortsetzung der Proteinsynthese erfolgt an den Ribosomen im Zytoplasma der Zellen. Hierbei wird die einzelsträngige mRNA abgelesen und für jedes Codon (drei aufeinanderfolgende Basen) wird eine Aminosäure mit weiteren über Peptidbindungen zum fertigen Protein zusammengesetzt. Dabei ist für jede Kombination eines Codons eine von 20 verschiedenen Aminosäuren festgelegt, welche die Grundbausteine für die fertigen Proteine bilden. Der Vorgang der Umschreibung der mRNA in die Proteine nennt sich Translation. Nach der Translation wird die mRNA durch zelluläre RNasen abgebaut [33].

1.2.2 Eigenschaften der mRNA

Die Stabilität von mRNA ist geringer als die von DNA. Zelluläre RNasen spalten das Biomolekül, falls die Translation abgeschlossen ist und die mRNA nicht mehr benötigt wird. Auch die durch Transfektion exogen zugeführte mRNA zeigt eine hohe Immunogenität, d.h. sie wird schnell vom Immunsystem als fremd erkannt und abgebaut [34]. Durch Modifikation der mRNA lässt sich diese Instabilität jedoch signifikant verringern. Dabei werden die Nukleoside Uridin und Cytidin durch Pseudouridin und 5'-Methylcytidin ersetzt. Dies führt zu einer erhöhten Stabilität und auch zu vermehrter Expression in den transfizierten Zellen [35]. Neueste Ergebnisse zeigen, dass der Einsatz von N(1)-Methylpseudouridin anstelle von Pseudouridin zu einer weiteren Verringerung der Immunogenität und einer verbesserten Zellverträglichkeit führen [36]. Des Weiteren lässt sich durch Modifikation des Verhältnisses modifizierte zu unmodifizierte Nukleoside die Stabilität beeinflussen. Es fiel auf, dass die Verwendung 25 % modifizierter mRNA zu einer erhöhten Stabilität und verringerter Immunogenität führte, dies ließ sich durch eine verringerte Aktivierung von Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR) 3, 7 und 8 sowie durch eine erniedrigte Cytokinausschüttung zeigen [37]. Eine weitere Modifikation zur Verbesserung der Stabilität sind das Capping und Anfügen eines Poly-A-Schwanzes an die jeweiligen Enden exogen zugeführter mRNA [38].

1.2.3 Therapeutische Anwendungen von mRNA

In den letzten Jahren kam es zu einem raschen Anstieg der Publikationen zu therapeutischen Möglichkeiten transfizierter mRNA.

Eine potentielle Anwendung ist die Vakzinierung von Tumoren, in diesem Fall maligner Melanome, mit dendritischen Zellen, welche mit autologer Tumor mRNA transfiziert wurden. Transfizierte dendritische Zellen erkennen daraufhin in den Tumoren spezifische Antigene und können somit gezielt immunologisch gegen die Karzinomzellen vorgehen. Diese Therapie erlaubt eine individualisierte Herangehensweise an die Behandlung von Tumoren [39].

2010 gelang Warren und Kollegen die Reprogrammierung von somatischen Zellen durch Induktion von Pluripotenz. Durch den Einsatz von mRNA basierter

Transfektion werden direkte Eingriffe am Genom vermieden und es bieten sich somit vielversprechende therapeutische Einsätze in der regenerativen Medizin [40].

Auch bei der Behandlung genetischer Erkrankungen gibt es aussichtsreiche Resultate in der Anwendung von mRNA zur Transfektion. Somit konnte bei der zystischen Fibrose eine gesteigerte Expression des ATP abhängigen Chlorid-Kanals (CFTR) erreicht werden, welcher bei der zystischen Fibrose ursächlich in seiner Funktion eingeschränkt ist. Dafür wurde CFTR - codierende mRNA den Zellen hinzugefügt und 24 h nach Transfektion konnte das Protein als Ionenkanal in der Zellmembran nachgewiesen werden [41].

Auf dem Gebiet der Therapie von Entzündungen wurden durch Modifikationen von mesenchymalen Stammzellen Erfolge erzielt. Die Transfektion der mesenchymalen Stammzellen mit der mRNA codierend für Interleukin 10 und zwei Homing Liganden führte zu signifikanten antiinflammatorischen Effekten *in vivo* [42].

1.2.4 Eigenschaften der mRNA und der Vergleich mit Plasmid DNA (pDNA)

Die Transfektion von Zellen mit mRNA hat sich in den letzten Jahren fortgehend weiterentwickelt und immer mehr etabliert. Es zeichnet sich eine vielversprechende Alternative zu der schon seit längerer Zeit etablierten Transfektion mit pDNA ab. Dabei wird per Transfektion eine ringförmige, doppelsträngige DNA-Sequenz in die Zellen eingeschleust (Plasmid). Die DNA-Sequenz kodiert dabei für das gewünschte Protein. Die pDNA wird in das zelleigene Genom im Zellkern aufgenommen und im Zuge der Proteinsynthese mittels Transkription und Translation synthetisiert. Dabei ist die Aufnahme in die Zellkerne von der Zellteilung abhängig, da die Kernmembran während der Mitose durchlässig wird und in sich wenig teilenden Zellen ist die Aufnahme der pDNA somit limitiert [43].

1.3 Transfektion

Als Transfektion wird das Einbringen von fremder DNA und RNA in eukaryotische Zellen bezeichnet. Durch diese Methode können die Zellen ablesbare Vorlagen für die Herstellung von Proteinen erhalten, die normalerweise nicht im Genom enthalten sind.

Bevor RNA und DNA von den Zellen zur Proteinherstellung abgelesen werden können, müssen die Nukleinsäuren die Zellmembran passieren. Die Zellmembran ist aus amphipathischen Molekülen, d.h. Molekülen mit polaren und unpolaren Strukturen, aufgebaut. Den Hauptteil der Zellmembran machen Lipide aus, wobei überwiegend Phospholipide vorkommen, welche sich im Zentrum der Membran mit ihren lipophilen Lipidschwänzen aneinander anlagern und somit eine Lipiddoppelschicht bilden. Nach Außen und in das Innere der Zellen zeigen die hydrophilen und polaren Köpfe der Phospholipide.

Somit können kleine unpolare Moleküle die Zellmembran eher überqueren als große polare Moleküle, dabei spielen Konzentrations- und Ladungsgradienten über der Zellmembran ebenfalls eine große Rolle. Um solche Strukturen dennoch aufnehmen zu können, besitzt die Zelle verschiedene Mechanismen. Auf der einen Seite befinden sich in der Zellmembran Transportproteine, welche über aktiven Transport, also unter Energieverbrauch, große Moleküle in die Zellen befördern. Eine andere Möglichkeit der Aufnahme geschieht über Verpackung der Moleküle extrazellulär in Membranvesikel, darauffolgendem Übertritt der Membranvesikel über die Zellmembran und abschließende Endozytose in das Zytoplasma [33].

Da es sich bei den Nukleinsäuren RNA und DNA um große, polare (negativ geladene) Moleküle handelt, brauchen diese Unterstützungen zum Transport über die Zellmembran.

Um die Nukleinsäuren in die Zellen zu transferieren gibt es verschiedene Möglichkeiten, von denen im Folgenden die wichtigsten dargestellt werden.

Zum einen gibt es biochemische Transfektionsverfahren. Für diese experimentelle Doktorarbeit wurde das Verfahren der Lipofektion gewählt, welches im Folgenden ausführlich dargestellt wird. Dabei ist das Prinzip die

Verpackung der negativ geladenen Nukleinsäuren in positive, kationische Moleküle, den Liposomen. Somit bleiben die Komplexe positiv geladen und können sich der Außenseite der Zellmembranen anlagern, welche negativ geladen ist. Die Annäherung ermöglicht den Vorgang der Endozytose, bei dem die Liposomen mit der Zellmembran verschmelzen und sich im Zellinneren zu neuen endosomalen Strukturen formieren. Dabei ist der letzte Schritt der Abgabe der Nukleinsäuren aus den Endosomen in das umgebene Zytoplasma noch nicht vollständig geklärt [44]. Die Transfektionseffizienz hängt von den Mengen der eingesetzten Nukleinsäuren und Transfektionsmittel, von der Art des Transfektionsmittels, dem pH-Wert des Ansatzes sowie der transfizierten Zelllinie ab. Kationische Carrier, welche angewandt werden, sind u.a. DOTAP/DOPE (1,2-dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan/Dioleoylphosphatidylethanolamin) und Lipofectamine. Dabei konnte gezeigt werden, dass es nach Transfektion von mRNA mit Lipofectamine zu einer höheren und längeren (8 Tage) Transfektion kommt, als nach Verwendung von DOTAP/DOPE (2 Tage). Schon nach 30 Minuten konnte die erste Expression der transfizierten Proteine nachgewiesen werden, das Maximum ließ sich nach einem Tag erkennen. Des Weiteren konnten 80 % der verwendeten Zellen transfiziert werden [45].

Avci-Adali und Kollegen fanden heraus, dass die Menge von 0,8 – 1,6 μ l Lipofectamine 2000 pro 1 μ g mRNA die besten Transfektionsergebnisse erzielt, zu hohe Mengen an Transfektionsmittel wirken toxisch, zu niedrige Mengen verringern die Transfektionseffizienz [46].

Ein weiteres biochemisches Verfahren der Transfektion ist die Calcium-Phosphat-Präzipitation, bei welcher ausfallendes Calciumphosphat sich mit DNA verbindet und per Endozytose in die Zellen aufgenommen wird.

Transfektion kann auch mit physikalischen Methoden durchgeführt werden. In diesem Fall wird die Durchlässigkeit der Zellmembran mit physikalischen Methoden erhöht. So wird zum Beispiel bei der Elektroporation die Zellmembran für wenige Mikrosekunden einer hohen elektrischen Gleichspannung ausgesetzt, bei der die Lipidanordnung instabil wird und Nukleinsäuren in die Zellen eintreten können [47]. Nachteile dieses Verfahrens sind die geringere Zellviabilität, die erforderliche Verfügbarkeit spezieller Geräte und Erfahrung mit dem Verfahren.

Dagegen können Transfektionseffizienzen von 90 – 100 % erreicht werden [44].

Ein großer Unterschied in der Transfektion von pDNA und mRNA ist das Eingreifen in das Genom nach pDNA Transfektion. Um die DNA ablesen zu können, muss diese zunächst in den Nucleolus der Zellen aufgenommen werden, dies ist abhängig von der Zellteilung, da die Membran des Nucleolus während dieser an Durchlässigkeit zunimmt [43]. Somit ist die Transfektionseffizienz vor allem bei sich selten teilenden Zellen gering und erreicht nach biochemischer Transfektion durchschnittlich Werte von etwa 40 % [45]. Dagegen ist DNA stabiler als mRNA und weist eine geringere Immunogenität auf. Nach Transfektion von pDNA in eine Zelle lassen sich Expressionen der transfizierten Proteine für etwa 2 Wochen nachweisen.

Transfizierte mRNA wird nicht in das Genom integriert, sie bleibt im Zytoplasma und kann direkt an den Ribosomen zu Proteinen abgelesen werden, somit kommt es schon nach 30 min zu messbaren Expressionen. Durch die kurze Verzögerung zwischen Transfektion und Expression können die Proteinspiegel besser kontrolliert werden, des Weiteren ist die Expression unabhängig von der Zellteilung. Studien konnten zeigen, dass es bis zu Tag 8 nach Transfektion noch nachweisbare Expressionen gab. Biochemische Transfektion führt dabei in den meisten Fällen zu mindestens 80 % Transfektionseffizienz [45]. Nachteile der mRNA sind die geringere Stabilität und erhöhte Neigung, das Immunsystem zu aktivieren. Durch verschiedene Modifikationen der mRNA kann diesen Nachteilen jedoch vorteilhaft entgegengewirkt werden (siehe Punkt mRNA).

In dieser Arbeit wurde modifizierte mRNA der Proteine TIMP3 und eNOS verwendet. Dabei wurde die mRNA auf zwei unterschiedliche Weisen modifiziert. Für die 100 % modifizierte mRNA wurden die Nukleoside Uridin und Cytidin zu 100 % mit Pseudouridin und 5'-Methylcytidin, bei Herstellung der 25 % mRNA zu 25 % ersetzt. Des Weiteren wurde anstelle des physiologischen Cap Analogs das ARCA (Anti-Reverse Cap Analog) verwendet, welche zu einem Anstieg der Transfektionseffizienz führt [48]. Als Transfektionsmittel diente Lipofectamine 2000, welches als kationischer Carrier fungiert.

1.4 Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS)

Eine Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) katalysiert die Herstellung von Stickstoffmonoxid (NO) aus der proteinogenen Aminosäure Arginin. In Abbildung (Abb.) 1 ist diese Synthese anhand der Strukturformeln der beteiligten Moleküle und alle beteiligten Reaktions- und Zwischenprodukte ausführlich dargestellt.

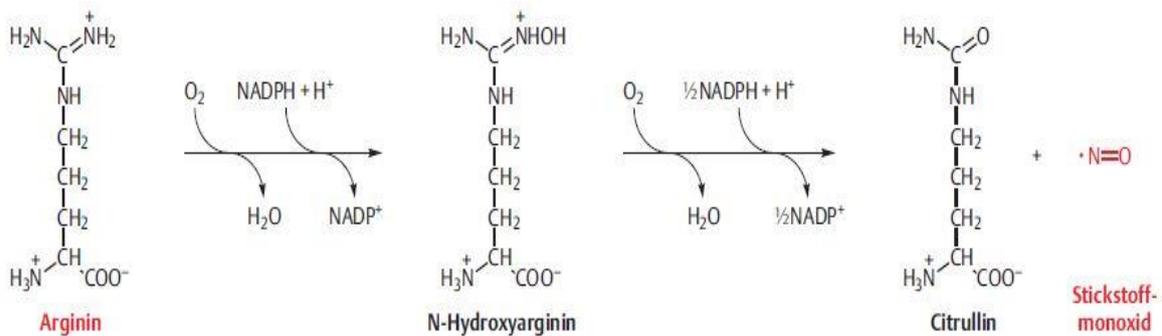


Abb. 1: Biosynthese von NO

Die komplette Reaktion findet an den Stickstoffmonoxid-Synthasen statt. Bei diesen Enzymen handelt es sich um Monooxygenasen, welche molekularen Sauerstoff (O₂) über ein Häm-gebundenes Eisen-Ion binden können. Als Reduktionsmittel dienen Nicotinamidadeninucleotidphosphate und Protonen (NADPH + H⁺), welche während der Reaktionsschritte oxidiert werden. Bei der Reaktion wird zusätzlich Tetrahydrobiopterin als Kofaktor benötigt um die Elektronen zwischen den Reaktionspartnern zu übertragen.

Im ersten Reaktionsschritt wird die Guanidino-Gruppe der Aminosäure Arginin mittels O₂ oxidiert. Dabei wird ein Sauerstoffatom unter Lieferung der Elektronen von NADPH + H⁺ für die Bildung von Wasser (H₂O) verwendet. Das Zwischenprodukt N-Hydroxyarginin wird in einem nächsten Reaktionsschritt unter Bildung von H₂O erneut mithilfe von Sauerstoff und NADPH + H⁺ oxidiert. Dabei bindet ein Sauerstoffatom ein Stickstoffatom der zuvor oxidierten Guanidinogruppe und bildet das Radikal Stickstoffmonoxid. Als Nebenprodukt entsteht die nicht proteinogene Aminosäure Citrullin.

Steht für die Reaktion zu wenig Tetrahydrobiopterin zur Verfügung, produzieren

die NOS statt NO Superoxid, ein von Sauerstoff abgeleitetes Dioxid Anion (O_2^-). Dieses reagiert mit Stickstoffmonoxid weiter zu Peroxinitrit, welches weiteres Tetrahydrobiopterin abbaut und somit den Prozess verstärkt. Dieser Teufelskreis wird auch als Entkopplung der eNOS bezeichnet und begünstigt durch den oxidativen Stress, ausgelöst durch die schädlichen Radikale, die Entstehung von Atherosklerose und arterieller Hypertonie [49].

Im menschlichen Körper kommen drei verschiedene Isoformen der Stickstoffmonoxid-Synthasen vor. Zum einen gibt es die endotheliale NOS, welche konstitutiv von Endothelzellen exprimiert wird und in dieser Arbeit näher behandelt wird. Des Weiteren kommen in unserem Körper die in Neuronen dauerhaft exprimierte neuronale NOS (nNOS) und die induzierbare NOS (iNOS) vor, wobei letztere vorwiegend während Entzündungen von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten nach Stimulation durch Zytokine und Endotoxine exprimiert wird.

Die Regulation der Expression der Stickstoffmonoxid-Synthasen geschieht auf der einen Seite über Phosphorylierungen durch Proteinkinasen, wodurch es zu einer gesteigerten Expression des Enzyms kommt. Auf der anderen Seite wird die Synthese der eNOS und der nNOS durch den intrazellulären Anstieg von Calcium gesteigert, welches in Verbindung mit dem Calcium bindenden regulatorischen Protein Calmodulin in die Regulation der Expression der NOS eingreift. Somit kommt es durch Einfluss aller Agonisten, welche die intrazelluläre Calcium Konzentration erhöhen, zu einer gesteigerten Synthese der NOS, wie dies z.B. bei allergischen Reaktionen über die Bindung von Histamin an den Histamin-1-Rezeptor an den Endothelzellen geschieht.

Stickstoffmonoxid besitzt ein ungepaartes Elektron und ist somit ein Radikal, welches sehr reaktiv und instabil ist. Innerhalb weniger Sekunden zerfällt es durch Reaktionen mit Wasser und Sauerstoff zu den stabileren Molekülen Nitrit und Nitrat. Aufgrund seiner geringen Größe kann NO problemlos Zellmembranen überqueren und zu Wirkungsorten wie glatten Muskelzellen oder Thrombozyten diffundieren.

Stickstoffmonoxid entfaltet seine Wirkungen über zwei verschiedene Mechanismen. Zum einen wird vor allem über iNOS gebildetes NO zur Bekämpfung von phagozytierten Mikroorganismen verwendet. NO und andere Radikale wie Peroxinitrit, welches durch die Reaktion von NO mit Superoxid entsteht, greifen als reaktive Radikale die Zellmembranen der Mikroorganismen an.

Zum anderen kommt es durch Bindung von NO an zweiwertiges Eisen einer Häm-Gruppe von zytosolischen Guanylatzyklasen zu einer Konformationsänderung, wodurch das Enzym aktiviert wird. Die Guanylatzyklase bildet aus Guanosintriphosphat (GTP) zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), welches in unserem Körper die Aufgabe eines second messenger, also eines zellulären Botenstoffes, einnimmt.

Durch die Aktivierung cGMP-abhängiger Proteinkinasen kommt es über Absenkung intrazellulärer Calciumspiegel zur Relaxation glatter Muskelzellen, wodurch es zu Gefäßdilatation kommt. Diese rasche Erweiterung von Gefäßen wird sich durch die Gabe von Nitraten bei Angina pectoris zu Nutzen gemacht, um verengte Herzkranzgefäße akut zu erweitern.

Des Weiteren kann NO über cGMP-abhängige Proteinkinasen die Aggregation und Adhäsion von Thrombozyten verhindern, dadurch wird die Bildung von Thromben reduziert.

Bei Patienten mit Atherosklerose fällt auf, dass biologisch verfügbares Stickstoffmonoxid durch die endotheliale Dysfunktion vermindert ist. Es kommt zu einer vermehrten Thrombozytenaktivierung, wodurch verstärkt Botenstoffe wie Serotonin, Thromboxan A2 oder Platelet-derived growth factor (PDGF) aus Thrombozyten freigesetzt werden. Diese Mediatoren führen zu einer Vasokonstriktion und stimulieren atherogene Wachstumsprozesse der Gefäßwand. Zudem ist durch den Mangel an NO dessen hemmende Wirkung auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B vermindert. Durch dessen verstärkte Aktivierung kommt es zu einer vermehrten Expression der an Gefäßen lokalisierten Adhäsionsmoleküle E-Selectin, P-Selectin und VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule 1). Über die Adhäsionsmoleküle treten vermehrt Entzündungszellen wie Leukozyten in die Gefäßwand über und verstärken die

durch Atherosklerose verursachte Entzündungsreaktion. Außerdem verhindert Stickstoffmonoxid die Oxidation von Low Density Lipoprotein (LDL), wobei vermutet wird, dass diese Oxidation eine der initialen pathologischen Veränderungen bei Atherosklerose ist [2, 33, 50].

1.5 Gewebsspezifischer Metalloproteaseinhibitor 3 (TIMP3)

Metalloproteaseinhibitoren sind Enzyme der Klasse der Endopeptidasen, welche die von Zellen zum Umbau von Bindegewebe abgegebenen Metalloproteasen hemmen [51]. Insgesamt sind 4 humane TIMP bekannt, wobei alle eine Größe zwischen 184 und 194 Aminosäuren und 6 Disulfidbrücken besitzen [52].

Der Raum zwischen einzelnen Zellen besteht aus Bindegewebe, welches sich aus der extrazellulären Matrix (EZM) zusammensetzt, einer sehr zellarmen Substanz, welche von den umgebenden Zellen gebildet wird. So bilden zum Beispiel glatte Muskelzellen das sie in den Gefäßen umgebende Bindegewebe. Die Bestandteile des Bindegewebes sind zum einen das Glykoprotein Kollagen, von dem etwa 20 Typen bekannt sind. Des Weiteren kommen das Protein Elastin, Wasser-bindende Proteoglykane, welche sich überwiegend aus Kohlenhydraten zusammensetzen und weitere nicht-kollagene Glykoproteine in unterschiedlichen Verhältnissen vor. So bestehen u.a. Gefäße, welche vor allem ein Mindestmaß an Dehnbarkeit und Reißfestigkeit benötigen, aus den Proteinen Elastin, Kollagen Typ 1 und 2 und dem Kohlenhydrat Chondroitinsulfat. Eine entscheidende Rolle spielt dabei das hydrophobe Protein Elastin, welches einen hohen Gehalt an den Aminosäuren Prolin und Lysin besitzt und durch seine besondere, netzartige Struktur im Gegensatz zu Kollagen sehr dehnbar ist.

Die extrazelluläre Substanz unterliegt einem ständigen Auf- und Abbau, dessen Bilanz auch als Umsatz bezeichnet wird. Ursachen einer neuartig benötigten Zusammensetzung oder Veränderung der Struktur können Ersatz abgenutzter Bestandteile, Wundheilung, Anpassung als Antwort auf Veränderung der

Funktion der Gewebe, Weg bahnen für Zellen der Abwehr oder auch maligne Prozesse sein. Neben der Synthese der Bestandteile des Bindegewebes, welche maßgeblich im rauen endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat der Zellen stattfindet, erfolgt der Abbau durch von den umgebenden Zellen sezernierten Proteasen, zu denen u.a. die Klasse der Matrix-Metalloproteasen (MMP) gehört. Diese Peptidasen besitzen in ihrem aktiven Zentrum ein Zink-Ion und arbeiten Calcium-abhängig. Um einen unkontrollierten Abbau der extrazellulären Matrix zu verhindern, sind diese Peptidasen nur räumlich limitiert aktiv und werden des Weiteren über Proteaseinhibitoren, wie den TIMP, gehemmt [50, 53].

TIMP werden in vielen humanen Geweben gebildet, die höchste Expression wurde in der Plazenta nachgewiesen, weitere Gewebe mit hohen nachweisbaren Werten befinden sich in Niere und Herz [51]. Die Inhibition der Matrix-Metalloproteasen geschieht über 1:1 molare stöchiometrische Verhältnisse, wobei die aminoternale Domäne der Proteaseinhibitoren die hemmende Wirkung ausübt. Ein aminoterminal gelegener Cysteinbaustein des Inhibitors bildet einen Chelatkomplex mit dem Zink-Ion im aktiven Zentrum der Protease aus. Des Weiteren interagiert ein aminoterminal liegender Threoninrest mit dem katalytischen Zentrum der MMP, beide Prozesse führen zu einer wirkungsvollen Inhibition der Proteasen. Neben den Matrix-Metalloproteasen hemmen die TIMP auch die Familie der ADAM-Metalloproteasen (ADAM), welche im aktiven Zentrum ebenfalls ein Zink-Atom besitzen. Im Allgemeinen können alle gewebsspezifischen Metalloprotease-Inhibitoren alle bekannten MMP hemmen, jedoch jede einzelne mit unterschiedlichen Potentialen. So zeigt die in dieser Arbeit verwendete TIMP3 eine sehr breite Hemmwirkung, neben allen bekannten MMP werden die Proteasen ADAM 10 [54], 12 [55] und 17 [56] effektiv gehemmt [52, 57].

Neben den Protease-inhibierenden Eigenschaften zeigt die TIMP3 weitere Wirkungen auf Prozesse im menschlichen Körper. Zum einen hemmt TIMP3 inflammatorische Vorgänge, indem es die Anzahl von Makrophagen und Monozyten reduziert, wodurch atherosklerotische Plaques stabilisiert werden. Diese Wirkung basiert vor allem auf der Hemmung von ADAM 17, welches die

Prozessierung des Tumornekrosefaktors α (TNF- α) reguliert. Dieser führt ungehemmt zu Rekrutierung von T-Zellen und Monozyten und weiteren entzündlichen Vorgängen [58, 59]. TIMP3 zeigt weiterhin Einfluss auf Proliferation und Apoptose von Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass TIMP3 in Melanomzellen Todesrezeptoren wie FAS stabilisiert und somit zur Apoptose der betroffenen Zellen führt [60]. Zudem blockiert TIMP3 den Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor 2 (VEGF-Rezeptor 2), wodurch die Angiogenese, also Neubildung von Gefäßen, gehemmt wird [61].

Stöhr und Kollegen führten 2014 einen Knockout von TIMP3 bei Mäusen durch und konnten daraufhin Arteriosklerose-assoziierte Veränderungen an den Tieren feststellen. Zunächst wurden im Blut höhere Werte an totalem Cholesterin festgestellt. Des Weiteren fand man heraus, dass es zu geringeren Raten an β -Oxidation, also dem Abbau von Fettsäuren in der Mitochondrienmatrix und damit zu einer Akkumulation dieser kommt. Dementsprechend wurden in den Gefäßwänden der Mäuse vermehrt atherosklerotische Läsionen und Lipide nachgewiesen. Zudem kam es durch die verminderte inhibierende Wirkung der TIMP3 zu einem erniedrigten Gehalt an Kollagen in den Gefäßen, hervorgerufen durch die überaktiven MMP [62].

Misst man die Expression von TIMP3 in atherosklerotischen Plaques in Gefäßwänden bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit oder Diabetes mellitus Typ 2, fällt auf, dass weniger TIMP3 gebildet wird. Dagegen haben zu hohe Spiegel an TIMP3 protektive Auswirkungen. So führt eine Überexpression an TIMP3 zu verringertem oxidativen Stress in den betroffenen Geweben. Es wurde nachgewiesen, dass es zu weniger Lipidperoxidation kommt, welche normalerweise über die Entstehung von Schaumzellen zu atherosklerotischen Läsionen führt. [59]

1.6 Zielsetzung

Ein Großteil der Mortalität in westlichen Industrienationen wird durch Krankheiten bedingt, welche ursächlich mit atherosklerotischen Läsionen im Bereich der Gefäßwände einhergehen. Auf Grundlage dieser Störung der Gefäßintegrität bilden sich Krankheitsbilder wie die koronare Herzkrankheit oder ein akuter Gefäßverschluss durch einen Thrombus aus, welcher unter anderen zu Herzinfarkt oder Schlaganfall führen kann. Falls konservative Therapiemöglichkeiten versagen oder es zu einer starken Einengung des Gefäßabschnittes kommt, werden invasive Therapiemodalitäten wie eine Bypassoperation oder eine Stentimplantation eingesetzt, um einen Blutfluss in das peripher der Stenose liegende Gebiet weiterhin zu gewährleisten. Gerade in der Stenttherapie wird nach vielen neuartigen Optimierungen gesucht, um die Fremdkörper verträglicher und Komplikationen wie zum Beispiel eine Restenose am Stent unwahrscheinlicher zu machen.

Ziel dieser Arbeit ist es, eine neuartige Beschichtungsoption zu erproben, welche auf mRNA für im Körper physiologisch vorkommende Enzyme basierend schonendere Einflüsse auf die Gefäßhomöostase hätte als aktuell etablierte Medikamente wie Paclitaxel oder Sirolimus. Die mRNA für TIMP3 und eNOS soll hierbei aus dem Stent freigesetzt und von den umgebenen Endothelzellen aufgenommen werden. Durch den Einsatz von mRNA erhofft man sich eine rasche Expression unabhängig vom Zellzyklus, da die mRNA auch ohne Einbau in das Genom eine Expression der Zielenzyme induzieren kann.

Dabei stellt sich in dieser Arbeit zunächst die Frage, ob mRNA für die beiden Enzyme TIMP3 und eNOS in die Zellen transfiziert und eine anschließende Expression der beiden Enzyme nachgewiesen werden kann. Gleichzeitig wird anhand von Zellviabilitätsbestimmungen vor und nach Transfektion erläutert, inwiefern die Einbringung der mRNA toxische Einflüsse auf die Zellen hat. Zur Überprüfung und Optimierung der Transfektion werden zwei verschiedene Zelllinien eingesetzt und zwei Varianten der mRNA Modifikation durchgeführt. Des Weiteren soll im Fall einer erfolgreichen Expression der Enzyme deren Funktionalität in einem weiteren Test untersucht werden.

2 Materialien

Auf den folgenden Seiten stelle ich meine verwendeten Materialien vor.

2.1 Zelllinien

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

| Name | Hersteller | Basalmedium |
|----------|---------------------|--|
| A549 | ATCC, Manassas, USA | Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose |
| EA.hy926 | ATCC, Manassas, USA | DMEM High Glucose |

2.1.1 A549

Bei der A549-Zelllinie handelt es sich um humane epitheliale Adenokarzinom-Zellen. 1972 wurden diese Zellen das erste Mal von Giard DJ et al.[63] aus tumorösem Lungengewebe isoliert. Sie zeichnen sich durch ein adhärentes Wachstum aus.

2.1.2 EA.hy926

Die EA.hy926 Zellen sind endotheliale, adhärent wachsende humane Zellen. Die Zellen wurden 1983 als Kreuzung von humanen A549 Zellen mit humanen Endothelzellen aus der Nabelvene etabliert [64]. EA.hy926 Zellen sind immortalisiert, zeigen einen niedrigeren Bedarf an Wachstumsfaktoren und exprimieren vWF, tPA und weitere endotheliale Boten- und Funktionsstoffe, u.a. das Protein der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) [65] [66].

2.1.3 Nährmedium

Als Basalmedium für das Wachstum der Zellen wurde DMEM High Glucose

verwendet. Unmittelbar vor Verwendung wurden dem Medium fetales Kälberserum (FCS) mit einer Endkonzentration von 10 % (Vol/Vol), sowie je 1 % (Vol/Vol) PenStrep (Endkonzentration: (100 units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) und Glutamin (Endkonzentration: 2 mM) hinzugefügt (siehe Tabelle 5). Das Medium wurde bei 4 °C gelagert.

2.2 Geräte

Tabelle 2: Verwendete Geräte

| Gerät | Hersteller | Standort |
|--|--------------------------|------------------------------------|
| Absaugpumpe KNF Lab | KNF Neuberger GmbH | Freiburg, Deutschland |
| Agarose-Gel Kammer Mini-Subcell GT | Bio-Rad | Krefeld, Deutschland |
| Autoclav Systec DX23 | Systec-GmbH | Wettenberg, Deutschland |
| BioPhotometer | Eppendorf AG | Hamburg, Deutschland |
| Brutschrank Heraus 6000 | Thermo Fisher Scientific | Langenselbold, Deutschland |
| CASY® Cellcounter ABX Micros 60 | Schärfe System GmbH | Reutlingen, Deutschland |
| EON™ High Performance Microplate Spectrophotometer | BioTek | Bad Friedrichshall, Deutschland |

| | | |
|---------------------------------------|--|--|
| FACScan BD | BD Biosciences | Heidelberg, Deutschland |
| Feinwaage ALJ Messbereich bis 120g | Kern & Sohn GmbH | Balingen, Deutschland |
| Heizblock Thermomixer Compact | Eppendorf AG | Hamburg, Deutschland |
| Mastercycler®gradient | Eppendorf AG | Hamburg, Deutschland |
| Mehrkanalpipette 50 - 1200 µl | Biohit Proline | Rosbach, Deutschland |
| Mithras LB 940 | Berthold Technologies GmbH & Co. KG | Bad Herrenalb, Deutschland |
| Mikroskop Axiovert 135 | Carl Zeiss AG | Jena, Deutschland |
| Pipetierhilfe | Hirschmann Laborgeräte | Eberstadt, Deutschland |
| Sicherheitswerkbank Klasse 2 | BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH | Sonnenbühl- Genkingen, Deutschland |
| Sicherheitswerkbank Herasafe HS 12 | Thermo Fisher Scientific | Langenselbold, Deutschland |
| Tischzentrifuge Minispin Plus | Eppendorf AG | Hamburg, |

| | | |
|--|--|-------------------------------|
| | | Deutschland |
| Universal Hood II Molecular Imager GelDoc™ XR System | Bio-Rad | Krefeld, Deutschland |
| Vortexer Mixer Uzusio VTX-3000L | LMS Corp. | Tokio, Japan |
| Wasserbad GFL 1083 | GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH | Burgwedel, Deutschland |
| Zentrifuge 5415R | Eppendorf AG | Hamburg, Deutschland |
| Zentrifuge Cryofuge 5500i | Heraeus Instrument GmbH | Osterode, Deutschland |
| Zentrifuge Varifuge 3.2 RS Heraeus® Sepatech | Thermo Fisher Scientific | Langenselbold, Deutschland |

2.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Eingesetzte Verbrauchsmaterialien

| Bezeichnung | Hersteller | Standort |
|---------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| 15 ml Cellstar Tube | Greiner Bio-One, International AG | Kremsmünster, Deutschland |

| | | |
|--|---------------------------|----------------------------|
| 50 ml BD Falcon | BD Bioscience | San Jose, USA |
| 12-Well Platte | Corning Incorporated | New York, USA |
| 96-Well Platte Nunc Immuno Maxi Sorp | VWR International GmbH | Bruchsal, Deutschland |
| Amicon® Ultra 2ml Centrifugal Filters | Sigma-Aldrich Chemie GmbH | Steinheim, Deutschland |
| CASY® Cups | Schärfe System GmbH | Reutlingen, Deutschland |
| Corning® 96-Well plates, opaque bottom, black polystyrene | Sigma-Aldrich Chemie GmbH | Steinheim, Deutschland |
| Costar® 10 ml Stripette®, serologische Pipettenspitze | Corning Incorporated | New York, USA |
| Costar® 2 5ml Stripette®, serologische Pipettenspitze | Corning Incorporated | New York, USA |
| Cryo.S™ Einfrierröhrchen 2 ml | Greiner Bio-One GmbH | Frickenhausen, Deutschland |
| Eppendorf Tubes® Safe-lock DNA LoBind Tube 0,5 ml, 1,5ml, 2,0 ml | Eppendorf AG | Hamburg, Deutschland |
| Eppendorf Tubes® Safe-lock Protein LoBind Tube 0,5 ml, | Eppendorf AG | Hamburg, Deutschland |

| | | |
|---|---|---------------------------------|
| 1,5 ml, 2,0 ml | | |
| FACS BD Falcon | BD Biosciences | San Jose, USA |
| MiniElute™ Spin Column | Quiagen GmbH | Hilden, Deutschland |
| Parafilm M | BEMIS Company, Incorporated | Neenah, USA |
| Pasteurpipetten aus Glas | WU Wilhelm Ulbrich GdbR Laborglaswaren | Mainz, Deutschland |
| Pipettenspitzen Dualfilter (PCR clean, steril) 10 µl, 100 µl, 1000 µl | Eppendorf AG | Hamburg, Deutschland |
| Pipettenspitzen Mehrkanalpipette 50 – 1200 µl | Biozym Scientific GmbH | Hess. Oldendorf, Deutschland |
| RNeasy Mini Spin Column | Quiagen GmbH | Hilden, Deutschland |
| Sigma® Cell Culture Dish – Petrischalen | Sigma-Aldrich Chemie GmbH | Steinheim, Deutschland |
| TipOne® Filter- Pipettenspitzen (steril) 10µl, 100µl, 1000µl | Starlab Group | Hamburg, Deutschland |
| Uvette 220 – 1600nm | Eppendorf AG | Hamburg, |

| | | |
|---------------------------------------|----------------------|---------------|
| (RNase-, DNA-, Protein-free) | | Deutschland |
| Zellkulturflasche 150 cm ² | Corning Incorporated | New York, USA |

2.4 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Kits, sortiert nach den einzelnen Versuchen

| Methode | Bezeichnung | Hersteller | Standort |
|---------------|--|--|---------------------------|
| PCR | Plasmid pUC57-eNOS_opt | Eurofins Genomic | Ebersberg, Deutschland |
| | Plasmid pEX-A2-TIMP3 | Eurofins Genomic | Ebersberg, Deutschland |
| | Hotstar HiFidelity Polymerase Kit | Quiagen GmbH | Hilden, Deutschland |
| | Mini Elute Kit | Quiagen GmbH | Hilden, Deutschland |
| Transkription | T7 MEGAscript® T7 Transkription Kit | Ambion® by lifetechnologies ^T M | Carlsbad, USA |
| | RNeasy Mini Kit | Quiagen GmbH | Hilden, Deutschland |

| | | | |
|-------------|--|--|--|
| | | | |
| | Ethanol absolute | AppliChem GmbH | Darmstadt, Deutschland |
| | Antarctic Phosphatase MO289S | NEB | Ipswich, UK |
| Agarose-Gel | Seakem® LE Agarose | Lonza | Rockland, USA |
| | TBE Puffer (10x) pH=8,0 108g Trisodiumcitrat 55g Borsäure 7,4g EDTA H ₂ O destilliert | Merck KGaA Sigma-Aldrich Chemie GmbH Sigma-Aldrich Chemie GmbH | Darmstadt, Deutschland Steinheim, Deutschland Steinheim, Deutschland |
| | GelRed Nucleid Acid Stain 10.000 in Dimethylsulfoxid (DMSO) | Biotium Incorporated | Hayward, USA |
| | Range Mix DNA Ladder 80bp – 10.000bp | Peqlab | Erlangen, Deutschland |
| | 500bp – 10.000bp RNA Ladder | Invitrogen® by lifetechnologies ^T M | Carlsbad, USA |

| | | | |
|--------------|--|--|--|
| | 6x Loading Buffer | Peqlab | Erlangen, Deutschland |
| | Ladepuffer RNA-Gel: Formamid Formaldehyd 37% 10x MEN-Puffer Gel Loading Buffer | Merck KGaA Merck KGaA Ambion® by lifetechnologies ^T M | Darmstadt, Deutschland Darmstadt, Deutschland Carlsbad, Deutschland |
| | 10x MEN-Puffer: 20,9g MOPS 2,05g Natriumacetat 1,9g EDTA 450ml H ₂ O steril | Sigma-Aldrich Chemie GmbH Merck KGaA Sigma-Aldrich Chemie GmbH Merck KGaA | Steinheim, Deutschland Darmstadt, Deutschland Steinheim, Deutschland Darmstadt, Deutschland |
| Transfektion | Lipofectamine 2000 Reagent | Invitrogen® by lifetechnologies ^T M | Carlsbad, USA |
| | Opti-MEM® Reduced Serum Medium [-] Phenol Red | Gibco® by lifetechnologies ^T M | Carlsbad, USA |
| | SILAC™ RPMI 1640 Flex | Gibco® by | Carlsbad, USA |

| | | | |
|-----------|--|--|----------------------------|
| MTT-Assay | Media [-] Phenol Red [-] Glucose | lifetechnologies ^T M | |
| | MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) | Invitrogen® by lifetechnologies ^T M | Carlsbad, USA |
| | DMSO (Dimethylsulfoxid) | Serva Elektrophoresis GmbH | Heidelberg, Deutschland |
| ELISA | Human TIMP-3 DuoSet ELISA | R&D Systems | Minneapolis, USA |
| | Reagent Diluent: 1% BSA (Bovines Serum Albumin) in PBS | Sigma-Aldrich Chemie GmbH | Steinheim, Deutschland |
| | Waschpuffer: 0,05% Tween® 20 (Polyoxy- ethylensorbitanmonolaurat) in PBS | Merck KGaA | Darmstadt, Deutschland |
| FACS | PE Mouse anti-eNOS | BD Biosciences | San Jose, USA |
| | FACS-Lösung: Dulbecco's PBS (1x), ohne Ca ²⁺ & Mg ²⁺ Paraformaldehyd (2,5%) | PAA Laboratories Merck KGaA | Pasching, Österreich |

| | | | |
|------------------------|---|--|-------------------------------|
| | | | Darmstadt, Deutschland |
| | FCS (Fetales Kälberserum) 0,5% in PBS | Invitrogen® by lifetechnologies ^T M | Carlsbad, USA |
| | FACS Clean Solution | BD Bioscience | San Jose, USA |
| | FACS Rinse Solution | BD Bioscience | San Jose, USA |
| Miniprep mit E.coli | Ampicillin | Thermo Fisher Scientific | Langenselbold, Deutschland |
| | LB-Medium | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| | LB-Agar | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| | S.O.C. Medium | Thermo Fisher Scientific | Langenselbold, Deutschland |
| | One Shot® Top10 Chemically Competent E.coli | Thermo Fisher Scientific | Langenselbold, Deutschland |
| Plasmidiso- lation | QIAprep Spin Miniprep Kit | Quiagen GmbH | Hilden, Deutschland |

| | | | |
|-------------------------|---|-------------------------------|-----------------------------|
| Restriktions -verdau | FastDigest Buffer 10x | Thermo Fisher Scientific | Langensfeld, Deutschland |
| | FastDigest Xba I Enzyme | Thermo Fisher Scientific | Langensfeld, Deutschland |
| Sensolyte | Sensolyte 520 MMP-1 Assay Kit | AnaSpec | Fremont, USA |
| Allgemein | Nuklease-freies Wasser | Quiagen GmbH | Hilden, Deutschland |
| | Ampuwa, steriles, pyrogenfreies Wasser | Fresenius Kabi Deutschland | Bad Homburg, Deutschland |

2.5 Medien, beigefügte Zusätze und Reagenzien zur Zellkultivierung

Tabelle 5: Eingesetzte Medien für die Schritte der Zellkultivierung, inklusive aller Zusätze

| Medium/Lösung & Zusätze | Hersteller | Standort |
|--|-----------------------------|---------------|
| DMEM High Glucose (1x) 4.5g/L.D. Glucose [-] Glutamin [-] Pyruvate | Gibco® by lifetechnologies™ | Carlsbad, USA |
| + Heat inactivated FBS | Gibco® by lifetechnologies™ | Carlsbad, USA |
| + L-Glutamin 200 mM (100x) | Gibco® by lifetechnologies™ | Carlsbad, USA |

| | | |
|--|-----------------------------|--------------------------|
| + Penicillin/Streptomycin (10000 units/ml Penicillin und 10,000 µg/ml Streptomycin) | Gibco® by lifetechnologies™ | Carlsbad, USA |
| Dulbecco's PBS (1x), ohne Ca ²⁺ & Mg ² | PAA Laboratories | Pasching, Österreich |
| Trypsin/EDTA (0,05%) | Gibco® by lifetechnologies™ | Carlsbad, USA |
| CASY® - Tone | Roche Diagnostics GmbH | Mannheim, Deutschland |

3 Methoden

Im Bereich Methoden wird die Durchführung der einzelnen Versuche dargestellt. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Versuche steril unter der Werkbank durchgeführt. Die Arbeitsflächen und die verwendeten Materialien wurden mit 70% Ethanol desinfiziert. Bei der Herstellung von mRNA wurde diese mit der Anwendung von RNase Zap ergänzt. Für das Arbeiten unter sterilen Bedingungen wurden nur sterile Lösungen und sterile Einmalartikel verwendet.

3.1 Amplifikation der Plasmide durch Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Bereitstellung der benötigten mRNA erfordert zunächst die Amplifikation der Plasmid-DNA per PCR. Die PCR wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt. Die Amplifikation der zu vervielfältigenden DNA verläuft in drei sich wiederholenden Schritten. Der erste Schritt ist die Denaturierung, bei der die DNA bei 94 - 96 °C in zwei Einzelstränge aufgespalten wird. Nach dem Spalten der DNA folgt die Primerhybridisierung, bei der sich die beiden hinzugefügten Primer, zwei Oligonukleotide, den beiden Enden der Einzelstränge anlagern. Dieser Schritt findet bei 55 – 65 °C statt. Nun findet die Elongation statt, hier komplementiert die beigefügte DNA-Polymerase die beiden Einzelstränge in 5' → 3' Richtung mit den hinzugefügten Nukleotiden. Die Primer dienen hierbei als Startpunkte für die DNA Polymerase, welche bei 68 – 72 °C am besten arbeitet. Nach Abschließen dieses Zyklus beginnt die nächste Denaturierung und somit können große Mengen an DNA amplifiziert werden. In der Regel finden 20 – 30 Zyklen statt [67]. Es wurde mit dem Hotstar HiFidelity Polymerase Kit und nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll gearbeitet. In Tabelle 6 sind die beigefügten Zutaten dargestellt, welche zwischen der Zugabe der einzelnen Reagenzien gevortext wurden. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Polymerase, das Enzym, als letztes hinzugefügt wurde. Die Menge des eingesetzten Template variierte je nach Plasmid und Ansatz. Die Konzentration des TIMP3 Plasmids betrug 3,9 ng/µl, bei einer Menge von 50 ng wurden somit 12,8 µl Template eingesetzt. Die Konzentration des Plasmids der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) betrug 7 ng/µl, jedoch wurde hier bei der eingesetzten Menge Template

zwischen 50 – 250 ng variiert.

In Tabelle 7 sind die vorgenommenen Einstellungen am PCR Cycler angegeben. Da es sich bei dem eNOS-Plasmid mit knapp 4000 Basen um ein sehr langes Gen handelt, wurden für die PCR optimierte Einstellungen verwendet. Die Annealing Temperatur wurde zwischen 55 und 62 °C variiert, die Elongationszeiten von einer, zwei und vier Minuten angewandt und die Anzahl der Zyklen mit 20, 25 und 30 angepasst.

Die Aufreinigung des PCR-Produkts erfolgte mit dem Mini Elute Kit nach Angaben des Herstellers zur Entfernung überschüssiger Nebenprodukte, Primersequenzen und Salzen. Nach der Aufreinigung erfolgte durch Zugabe von 2 x 10 µl Nuklease-freiem Wasser die Elution des Produktes.

Tabelle 6: Zusammensetzung der PCR-Ansätze zur Amplifikation der Plasmide

| Reagenz | Konzentration | Menge |
|--------------------|---------------|-------------------------------------|
| Forward Primer | 0,7 µM | 7µl |
| Reverse Primer | 0,7 µM | 7µl |
| Q Solution | 1x | 20 µl |
| 5x Puffer | 1x | 20µl |
| Polymerase | 2,5 U | 1 µl |
| Template | 50-250 ng | |
| ddH ₂ O | | Ansatz aufgefüllt auf 100 µl |

Tabelle 7: Standardeinstellung des PCR-Cyclers

| Schritt | Temperatur | Zeit | Anzahl Zyklen |
|------------------------|------------|-------|---------------|
| Initiale Denaturierung | 94 °C | 3 min | 1 |
| Denaturierung | 94 °C | 45 s | 25 |
| Annealing | 55 °C | 1 min | 1 |
| Elongation | 72 °C | 1 min | 30 |
| Finale Elongation | 72 °C | 5 min | 1 |
| Hold | 4 °C | | |

3.2 Messung der Konzentration und Agarosegelelektrophorese der amplifizierten DNA

Zur Messung der Konzentration und der Reinheit des PCR Produktes wurden 1 – 2 µl der amplifizierten DNA in eine Küvette überführt, diese wurde dann auf das Volumen von 50 µl mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt. Die Messung erfolgte mit dem Photometer bei 260 und 280 nm. Um auszuschließen, dass im PCR-Produkt unerwünschte Nebenprodukte vorhanden sind, wurde eine Probe der amplifizierten DNA einer Agarosegelelektrophorese zugeführt. Die Herstellung des 1 % igen Gels erfolgte aus 0,5 g Agarose und 50 ml TBE Puffer (1x), zu deren Gemisch 3 µl GelRed vor dem Erhärten hinzugegeben wurden. Die Taschen des Gels wurden mit einer Lösung aus 2 µl 6 x Loading Dye und 200 – 300 ng DNA beladen. Als Referenzmarker zur Auswertung der Länge der DNA Fragmente diente ein DNA – Marker, welcher ebenfalls in eine der Taschen übertragen wurde. Danach wurde eine Spannung von 100 V für 60 – 75 min angeschlossen, bevor die Auswertung der Elektrophorese im Molecular Imager mit UV (Ultraviolett) Fluoreszenz erfolgte.

Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die amplifizierte DNA bei -20 °C gelagert.

3.3 *In-vitro* Transkription (IVT)

Im nächsten Schritt wurde die amplifizierte DNA in mRNA umgeschrieben. Die Transkription wird dabei durch eine DNA-abhängige RNA Polymerase katalysiert. Sie entwindet und trennt die doppelsträngige DNA auf einer Länge von 10 – 20 Basenpaaren (bp) und fügt zur DNA Matrix komplementäre Ribonukleotide zu einem Einzelstrang zusammen. Dabei wird Pyrophosphat zur Bildung einer Esterbindung zwischen den Basenpaaren abgespalten. Die Ablesung der DNA geschieht in 3' → 5' Richtung, die Synthese der einzelsträngigen RNA somit in 5' → 3' Richtung. Am Terminationskomplex, einer Stelle des DNA Stranges mit bestimmten Folgen von DNA-Nukleotiden (z.B. GC Nukleotide), wird die Transkription gestoppt und die RNA Polymerase löst sich von der DNA [68].

Hierfür wurde das T7 MEGAscript Transkription Kit verwendet und nach Angaben des Herstellers gearbeitet. In Tabelle 8 sind die zugegebenen Reagenzien mit Quantitäten und Konzentrationen angegeben. Neben 100 % modifizierter mRNA

wurde auch 25 % modifizierte mRNA hergestellt. Dabei beschreibt die Modifikation den Einsatz der veränderten Basen 5'-Methylcytidin und Pseudouridin anstelle von CTP und UTP. Die Zutaten wurden steril unter der Werkbank zusammengefügt, wobei die Arbeitsfläche vorher zusätzlich mit RNase Zap desinfiziert wurde. Zwischen dem Hinzufügen der Reagenzien wurde regelmäßig gevortext und die finalen 40 µl 5 - 6 s zentrifugiert. Danach erfolgte eine Inkubation für 4 h bei 37 °C im Thermomixer, bevor 1 µl Desoxyribonuklease (DNase) hinzugefügt wurden. Nach einer weiteren Inkubation von 15 min bei 37 °C folgte die Aufreinigung des Produktes mit dem RNeasy Mini Kit nach den empfohlenen Angaben des Herstellers. Die Elution der aufgereinigten mRNA erfolgte mit 2 x 30 µl nuklease-freiem Wasser.

Der *in-vitro* Transkription folgte eine Dephosphorylierung, um überschüssige 5'-Phosphate zu entfernen. Hierfür wurden zu der aufgereinigten mRNA 7 µl 10 x Puffer und 3 µl Antarctic Phosphatase beigefügt. Es folgte eine Inkubation für 60 min bei 37 °C im Thermomixer, der sich eine Aufreinigung mit dem RNeasy Mini Kit nach Herstellerangaben anschloss. Das aufgereinigte Produkt wurde mit 2 x 40 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert. Die Zwischenlagerung der hergestellten mRNA geschah bei – 80 °C.

Tabelle 8: Reagenzien für die *in-vitro* Transkription nach T7 MEGAscript

| Reagenz | Stock Konzentration | Konzentration/ Menge | Eingesetzte Menge für 100% mod. mRNA | Eingesetzte Menge für 25% mod. mRNA |
|-----------------|---------------------|----------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| ATP | 75 mM | 7,5 mM | 4 µl | 4 µl |
| GTP | 75 mM | 1,875 mM | 1 µl | 1 µl |
| 5'Methylcytidin | 100 mM | 7,5 mM | 3 µl | 0,75 µl |
| Pseudouridin | 100 mM | 7,5 mM | 3 µl | 0,75 µl |
| CTP | 75 mM | 4,2 mM | | 2,25 µl |
| UTP | 75mM | 4,2 mM | | 2,25 µl |
| ARCA | 10 mM | 2,5 mM | 10 µl | 10 µl |
| Reaktionspuffer | 10 x | 1 x | 4 µl | 4 µl |

| | | | | |
|------------------|--------------------|---------|-------------------------------|-------------------------------|
| H ₂ O | | | Auffüllen auf 40 µl | Auffüllen auf 40 µl |
| Template | Je nach Messung | 1500 ng | 0 – 10 µl | 0 – 10 µl |
| RNAse Inhibitor | 2500 U | 1 µl | 1 µl | 1 µl |
| T7 Enzym-Mix | | 4 µl | 4 µl | 4 µl |

3.4 Messung der Konzentration und Agarosegelelektrophorese der hergestellten mRNA

Zur Messung der Konzentration und der Reinheit des Transkriptionsproduktes, wurden 1-2 µl mRNA mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt und in eine Küvette überführt. Die Messung im Photometer erfolgte bei 260 und 280 nm.

Die Herstellung des Agarosegels erfolgte wie unter Punkt 4.2 beschrieben. Vor der Auftragung der Proben auf das Gel erfolgte ihre Inkubation mit Puffer für 10 min bei 65 °C im Thermomixer zur Denaturierung. In Tabelle 9 sind die Ansätze für die Denaturierung dargestellt, der auch der mRNA-Marker zugeführt wurde. Es wurden 200 ng mRNA-Produkt eingesetzt, welches mit Nuklease-freiem Wasser auf 3 µl Volumen aufgefüllt wurde.

Die Auswertung erfolgte durch den Molecular Imager mit UV Fluoreszenz, wobei die Banden des mRNA-Markers als Referenz für die Länge des mRNA-Produktes dienten. Die Aufbewahrung der mRNA erfolgte erneut bei -80 °C.

Tabelle 9: Ansätze zur Denaturierung

| Reagenz | Menge |
|------------------|--------|
| Formamid | 3,3 µl |
| 10 x MEN | 1 µl |
| Formaldehyd 37 % | 1 µl |
| 6 x Loading Dye | 1,7 µl |
| mRNA/Marker | 3 µl |

3.5 Zellkultivierung von A549 und EA.hy926 Zellen

Beide verwendeten Zelllinien (siehe Punkt 3.1), benötigen als Zellkulturmedium DMEM High Glucose (siehe Punkt 3.5). Die Zellen wurden in 150 cm² Zellkulturflaschen in 26 ml Medium angezüchtet. Die Umgebungsbedingungen von 37 °C und 5% CO₂ erzeugte ein Brutschrank. Alle 3 Tage erfolgte ein Wechsel der 26 ml des Zellkulturmediums. Durch regelmäßige mikroskopische Kontrolle wurde eine Konfluenz von etwa 80 % detektiert und die Passagierung der Zellen konnte eingeleitet werden. Hierfür wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und 6 ml PBS hinzugefügt. Nach 30 Sekunden wurde die Waschlösung wieder abgesaugt. Nun erfolgte die Zugabe von 6 ml Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) (0,05%) zur Ablösung der Zellen, wobei die Zellen für etwa 2 Minuten im Brutschrank inkubierten und die Zellen durch leichtes Klopfen an die Zellkulturflasche abgelöst wurden. Die Peptidase Trypsin löst in diesem Prozess die Zell-Matrix-Verbindungen mit der Zellkulturflasche, wobei EDTA als Chelator Ca²⁺ bindet und somit die Zell-Zell-Verbindungen auflöst. Das Stoppen der ablösenden Wirkung von Trypsin/EDTA erfolgte durch die Zugabe von 6 ml Zellkulturmedium zu den Zellen. Im nächsten Schritt wurde die Zellsuspension in ein steriles 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgesaugt und das zurückbleibende Zellpellet mit 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nun entweder neuer Zellkulturflaschen, der Anzucht in 12-Well Platten zur Transfektion oder der Cryokonservierung für spätere Verwendung zugeführt.

3.6 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte im Cellcounter CASY. Hierfür wurden 5 µl der 1 ml Zellsuspension in 10 ml CASY-Ton, eine Elektrolytlösung, gegeben. Das Prinzip der Technik basiert auf einer Widerstandsmessung. Aus der Elektrolytlösung werden dreimal Proben in eine Messkapillare aspiriert. Über zwei Elektroden wird eine Spannung von 1 MHz an die Kapillare angelegt. Die Zellen agieren als Isolatoren und erhöhen den elektrischen Widerstand in der Kapillare, welcher höher ist als der definierte Widerstand der reinen, gut leitenden

Elektrolytlösung. Anhand der Widerstandserhöhung kann auf das Volumen der Zellen geschlossen werden. Es ist wichtig, dass die Zellen einzeln von der Messkapillare aspiriert werden. Des Weiteren ermöglicht der Cellcounter die Unterscheidung zu toten Zellen. Da deren Zellmembran zerstört ist, dringt der Strom in die Zellen ein und diese erscheinen kleiner, und zwar in der Größe ihres Zellkerns [69]. Da das CASY von einer Verdünnung von 1:200 ausgeht, musste die berechnete Zellzahl noch mit 10 multipliziert werden.

3.7 Cryokonservierung und Auftauen der Zellen

Die Cryokonservierung bietet die Möglichkeit, die Zellen außerhalb der Zellkulturflasche im - 80 °C Kühlschrank aufzubewahren. Um die Konservierung durchzuführen, wurden 900 µl Zellsuspension mit einem Gehalt von mindestens 2 Millionen Zellen mit 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) in einem Cryoröhrchen vermischt. Nach Zugabe der DMSO-Lösung erfolgte sofortiges Invertieren des Behältnisses. Dieses wird danach für 48 h in einem speziellen Einfrierbehälter, gefüllt mit Isopropanol, bei - 80 °C gelagert, bevor die Zellen ohne Isopropanol bei - 80 °C aufbewahrt werden können.

Der rasche Prozess des Auftauens wurde durch Schwenken im 37 °C Wasserbad eingeleitet, die 1 ml Inhalt wurden sofort nach vollständiger Verflüssigung der Zellsuspension zu 10 ml Zellkulturmedium gegeben. Durch Zentrifugieren für 5 min bei 300 x g gelang die Isolation eines Zellpellets, mit welchem wie bei Punkt 4.5 beschrieben weiterverfahren wurde.

3.8 Anzucht auf 12-Well Platten

Zunächst wurden die Zellen wie unter Punkt 4.5 abgelöst, passagiert und gezählt. Die 12-Well Platten wurden vorbereitet, indem zu jedem Well je 1 ml Zellkulturmedium hinzugefügt wurde.

Da pro Well 150.000 Zellen angezüchtet werden sollten, ließ sich mit Formel 1 die benötigte Menge an Zellsuspension pro Well errechnen. Nach Berechnung erfolgte die Zugabe der Zellsuspension zu den einzelnen Wells, bevor die Zellen für 24 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ gelagert wurden.

Abb. 2: Formel zur Berechnung der Menge der benötigten Zellsuspension für 150.000 Zellen

$$\frac{\text{Zellanzahl absolut pro Well}}{\text{Gemessene Zellzahl im Cellcounter} \left[\frac{1}{\mu\text{l}} \right]} = \text{Benötigte Menge der Zellsuspension pro Well} [\mu\text{l}]$$

3.9 Transfektion der Zellen mit mRNA

Es wurden die mRNA der Enzyme eNOS und TIMP3 in die A549 und EA.hy926 Zellen transfiziert. Hierfür wurden die mRNAs mit dem Transfektionsmittel zunächst komplexiert. Als Transfektionsmittel diente Lipofectamine 2000. Die Herstellung der Ansätze geschah mit 500 μl OptiMEM pro Loch einer 12-Well Platte und 1,33 μl Lipofectamine pro μg mRNA. Als Mengen an mRNA wurden 0,25 μg , 0,5 μg , 1,0 μg , 1,5 μg und 2,5 μg verwendet. Die benötigte Menge mRNA ließ sich aus der am Photometer bestimmten Konzentration nach Formel 2 errechnen. Nach Zugabe und Vortexen der Reagenzien inkubierten die Transfektionsansätze für 20 min bei Raumtemperatur zur Komplexierung.

Lipofectamine 2000 bildet in flüssiger Lösung positiv geladene Liposomen, welche sich mit der negativ geladenen mRNA zu gering positiv geladenen Komplexen verbinden. Durch Verschmelzung der Liposomen mit der lipophilen Zellmembran gelangt die mRNA in das Zellinnere [70].

Danach wurde das Zellkulturmedium aus den Wells abgesaugt, die Zellen mit 1 ml PBS pro Well gewaschen und 500 μl der Transfektionsansätze den Zellen hinzugefügt. Nun erfolgte die Inkubation der Zellen im Brutschrank für 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach diesen 4 h wurde der Transfektionsansatz abgesaugt und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Dieses wurde ebenfalls wieder abgesaugt und es wurde 1 ml Zellkulturmedium den Zellen hinzugefügt. Die Zellen wurden dann für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert.

Abb. 3: Formel zur Berechnung des Volumens der eingesetzten mRNA

$$\frac{\text{Menge der benötigten mRNA} [\text{ng}]}{\text{Konzentration der mRNA} \left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right]} = \text{Volumen der beigefügten mRNA} [\mu\text{l}]$$

3.10 Bestimmung der Zellviabilität mit dem MTT-Assay

Der MTT-Assay diente zur Überprüfung der Viabilität der mit der mRNA behandelten Zellen. Der Test basiert auf der Messung der Aktivität zytosolischer und mitochondrialer Dehydrogenasen. Dabei wird nur die Aktivität der Dehydrogenasen von lebenden Zellen gemessen.

Hierfür verwendet man ein Tetrazolium Salz, das MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid), welches gelblich gefärbt ist. Der Tetrazolium Ring wird von den Dehydrogenasen in aktiven Mitochondrien lebender Zellen gespalten und es entsteht Formazan, welches eine dunkelblaue Färbung besitzt [71]. Um den MTT-Assay durchzuführen, wurde nach 24 h Inkubation im Brutschrank das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurden 300 µl RPMI Medium und 30 µl gelbe MTT – Lösung pro Well zu den Zellen hinzugefügt, bevor diese wieder für 4 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert wurden. Nach den 4 h konnte der Ansatz abgesaugt werden und es wurden 300 µl DMSO pro Well hinzugefügt. Von den nun blauen Zellüberständen wurden je Well 100 µl auf eine 96-Well Platte überführt. Die photometrische Auswertung des Assays erfolgte im Mithras LB 940 bei 540 nm über die Messung der Absorption.

3.11 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Nach der Transfektion der Zelllinien A549 und EA.hy926 wurde die erfolgreiche Induktion der TIMP3 Expression mit einem ELISA verifiziert. Der direkte ELISA arbeitet nach dem „ELISA-Sandwich“ Verfahren. Zunächst wird eine Testplatte mit einem für das Substrat spezifischen Antikörper („capture antibody“) beschichtet. Im nächsten Schritt erfolgt die Zugabe des Substrates (also TIMP3), welches an den Antikörper bindet. Ein sekundärer Antikörper gegen das gleiche Substrat („detection antibody“) wird hinzugefügt; dieser ist an ein Enzym gekoppelt, welches einen am Ende hinzugefügten Farbstoff durch Spaltung aktiviert. Die Quantifizierung der Farbreaktion erfolgt im Spektrophotometer [72]. Häufig (so auch in dem von mir eingesetzten Assay) ist der Sekundärantikörper nicht direkt an ein Enzym gekoppelt, sondern mit Biotinmolekülen konjugiert. Die hochaffine Bindung von Streptavidin, das seinerseits mit einem Enzym (hier eine

Peroxidase) konjugiert ist, dient als Verstärkungsreaktion, um mehrere Enzymmoleküle an die Stellen der Testplatte, an der sich das nachzuweisende Substrat befindet, zu binden [73].

Für den ELISA wurden zunächst die Antikörper gelöst. Der Capture Antibody wurde in 1 ml PBS, der Detection Antibody in 1 ml Reagent Diluent aufgelöst. Der TIMP3 Standard, für die Standardreihe und somit die Quantifizierung der Ergebnisse, wurde in 500 µl PBS gelöst. Als Testplatte wurde eine Maxi Sorp 96-Well Platte verwendet. Diese wurde 24 h vor Versuchsbeginn mit dem Capture Antibody mit 100 µl pro Well beschichtet.

Von den auf den 12-Well Platten angezüchteten und transfizierten Zellen wurden nach 24 und 48 h Zellüberstände entnommen und wieder mit 1 ml Zellkulturmedium ersetzt.

Nach 24 h Inkubation mit dem Capture Antibody wurden die Wells der 96-Well Platte je dreimal mit 400 µl Waschpuffer gewaschen, um überschüssige und nicht gebundene Reagenzien auszuwaschen (Ziel jedes folgenden Waschschrilles). Danach wurde die Platte für 1 h mit Reagent Diluent blockiert, indem pro Well 300 µl hinzugefügt wurden. Diese Blockade verhindert unspezifische Bindungen des Antikörpers. Nun folgte erneut ein Waschschrill mit dreimal 400 µl Waschpuffer. Im nächsten Schritt wurden die Standardreihe und je 100 µl der Zellüberstände als Doppelbestimmungen auf die Wells aufgetragen, bevor diese 2 h inkubierten. Nach einer weiteren Zugabe von Waschpuffer wurde die Mikrotiterplatte mit 100 µl Detection Antibody für 2 h inkubiert. Der Inkubation schloss sich ein weiterer Waschschrill an, bevor 100 µl Streptavidin-Meerrettichperoxidase für 20 min zu jedem Well hinzugefügt wurden, wobei das Streptavidin an das Biotin auf dem Detection Antibody bindet. Die Inkubation erfolgte im Dunklen.

Diesem Schritt schloss sich ein letzter Waschgang an. Nun wurde 100 µl Substrat pro Well hinzugegeben und dieses für maximal 20 min inkubiert, wobei die Platte in dieser Zeit erneut in einer dunklen Umgebung platziert wurde. Das Substrat dient als Farbstoff, welches von der hinzugefügten Peroxidase gespalten wird. Falls der Farbumschlag schnell und intensiv abläuft, wurde die Inkubation früher als 20 min gestoppt. Als Stopp-Lösung diente 50 µl 2 molarer Schwefelsäure pro

Well.

Zur Quantifizierung der Farbreaktion diente als Spektrophotometer der Mithras oder das EON™ Spectrophotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm.

3.12 Durchflusszytometrie (FACS: Fluorescence activated cell sorter)

Der Transfektionserfolg mit der mRNA für das Enzym eNOS wurde über die Durchflusszytometrie bestätigt.

Bei der Durchflusszytometrie wird die Fluoreszenz von Zellen gemessen, welche einzeln einen Laserstrahl durchqueren und dabei Licht emittieren. Als Laser dient üblicherweise ein Argon Laser, dessen Licht eine Wellenlänge von 488 nm besitzt. Wird eine Zelle von dem Laserstrahl erfasst, wird das Licht von der Zelle gestreut. Dabei kann dies auf zwei verschiedenen Wegen geschehen. Wird das Licht nach vorne abgelenkt, entsteht das sogenannte „forward scatter signal“ (FSC-Signal), welches von der Größe der Zelle abhängig ist. Wird es jedoch zur Seite gestreut, erfassen die Detektoren das „side scatter signal“ (SSC-Signal), welches von Form und Granularität der Zellen abhängt und somit Hinweise auf das Überleben der Zellen gibt. Um Zellen voneinander unterscheiden zu können, kann man diese zum Beispiel mit einem Fluoreszenz-markierten Antikörper markieren [74, 75].

Zunächst wurden die in den 12-Well Platten angezüchteten Zellen mit 500 µl FCS gewaschen. Danach wurden erneut 500 µl FCS hinzugefügt, welchem weitere 20 µl des Anti-eNOS Antikörpers beigefügt wurden. Dabei wurden zwei Wells un behandelter Zellen mit eNOS Antikörper und zwei Wells ohne eNOS Antikörperfärbung gemessen, um einen Nullwert für die Kalibrierung des Durchflusszytometers zu haben. Ab der Zugabe des fluoreszierenden Antikörpers wurde darauf geachtet, dass mit so wenig Licht wie nötig weitergearbeitet wurde. Nach einer halben Stunde im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂, in welcher der Anti-eNOS Antikörper an das an der Zellmembran gebundene eNOS binden konnte, wurden die Zellen abgelöst (siehe Punkt 4.5). Der Überstand wurde in FACS-Röhrchen überführt und diese bei 300 x g für 5 min zentrifugiert. Nun wurden die FACS-Röhrchen schnell invertiert, um den

Überstand zu entfernen, das Zellpellet aber nicht zu verlieren. Durch eine Zugabe von 150 µl FACS-Lösung zu jedem FACS Röhrchen wurden die Zellpellets fixiert und konnten im Durchflusszytometer ausgewertet werden. Dabei musste darauf geachtet werden, dass das Durchflusszytometer etwa 30 min vor Verwendung angeschaltet wurde. Durch die Markierung der Zellen mit dem fluoreszierenden Antikörper erfolgte ausschließlich eine Unterscheidung zwischen markierten und nicht markierten Zellen. Detektierte Fluoreszenz wurde hierbei erfolgreicher Transfektion gleichgesetzt und der Erfolg der Transfektion über % gated ermittelt. Bei der Messung der Kontrolle (unbehandelte Zellen) wurde die gemessene Fluoreszenz auf 1 % Zellen gesetzt, um einen niedrigen Ausgangswert zu haben. Um die Gesamtkonzentration fluoreszierender Zellen zu ermitteln, wurde der gemessene Wert (gated %) mit 1 % subtrahiert.

3.13 Minipreparation mit Escherichia coli (E.coli)

Mit Hilfe einer Miniprep wurde das eNOS-Plasmid in das Genom chemisch kompetenter E.coli transformiert um die Plasmidsequenz zu vermehren. Zur Vorbereitung wurde eine Ampicillin-Stammlösung mit einer Konzentration von 50 µg / ml hergestellt. Zur Herstellung von Agarplatten wurden 40 g LB Agar in 1 l Ampuwa gelöst und für 20 min bei 121 °C und 200 kPa autoklaviert. Im nächsten Schritt wurde die Lösung auf etwa 50 °C abgekühlt und Ampicillin zu einer Endkonzentration von 0,25 µg/ml hinzugefügt. Anschließend wurde der LB Agar in Petrischalen ausgegossen und bei 4 °C aufbewahrt.

Das LB Flüssigmedium wurde durch Lösen von 25 g LB Medium in 1 l Ampuwa hergestellt. Danach wurde das Flüssigmedium autoklaviert, abgekühlt und im letzten Schritt 0,25 µg/ml Ampicillin beigefügt, bevor das Medium bei 4 °C aufbewahrt wurde.

Für die Transformation wurden 2 µl Plasmid, bzw. Nuklease-freies Wasser als Kontrolle, in die Eppis mit den kompetenten E.colis gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 30 s bei 42 °C im Wasserbad, bevor die E.colis wieder auf Eis gelegt wurden. Nach Zugabe von 400 µl SOC Medium pro Reaktionsgefäß wurden die Bakterien erneut für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nun wurde jeder

Transformationsansatz auf 2 Petrischalen ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden 2 Kolonien von jeder Petrischale gepickt und diese in Falcons mit 5 ml Flüssigmedium gegeben. Die Flüssigkulturen wurden für eine weitere Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.14 Plasmidisololation

Die Plasmidisololation erfolgte mit dem QIAPrep Spin Miniprep Kit von Qiagen nach Herstellerangaben. Anschließend wurden Reinheit und Konzentration mittels Photometer bei 260 und 280 nm bestimmt.

3.15 Restriktionsverdau

Zur Verifizierung der isolierten Plasmide wurden diese mit dem Restriktionsenzym Xba I verdaut. Hierfür wurde der Ansatz aus Tabelle 10 hergestellt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Aufreinigung mittels des MinElute PCR Purification Kits nach Angaben des Herstellers (siehe Punkt 4.1, PCR). Zur Bestimmung der Reinheit und Konzentration erfolgte eine photometrische Messung. Anschließend wurde eine Agarosegelelektrophorese zur Kontrolle der Länge der DNA-Fragmente durchgeführt. Zur Herstellung des Agarosegels und der Durchführung der Elektrophorese siehe Punkt 4.2.

Tabelle 10: Ansatz für den Restriktionsverdau

| Reagenz | Menge |
|------------------------|----------------------------|
| 10 x FD Puffer | 8 µl |
| FD Enzym Xba I | 4 µl |
| Vermehrte DNA | 1 µg |
| Nuklease-freies Wasser | Auf 80 µl auffüllen |

3.16 SensoLyte 520 MMP-1 Assay Kit

Dieser Assay diente zum Test der Funktionalität des von den Zellen exprimierten Metalloprotease-Hemmers TIMP3.

In diesem Versuch wird die Aktivität einer Metalloprotease, in diesem Fall einer

Kollagenase (MMP-1), durch die Messung von Fluoreszenz, dargestellt. Dabei wird ein Substrat, in diesem Test ein Peptid, durch die Kollagenase gespalten. Durch das Spalten der Verbindung fällt die fluoreszenzhemmende Wirkung des einen Spaltproduktes weg und es kommt zu einem messbaren Anstieg der Fluoreszenz [76]. Durch diesen Versuch sollte die Metalloprotease-hemmende Wirkung von TIMP3 gezeigt werden, welches über die Überstände der transfizierten Zellen hinzugefügt wurde.

Zunächst wurde die MMP-1 Substrat Lösung hergestellt. Dafür wurde Komponente A des Kits mit Assay Buffer 1:100 gemischt. Zur Verdünnung der MMP-1 wurde diese mit Assay Buffer ebenfalls im Verhältnis 1:100 vermischt. Die Herstellung der TIMP 3 Standardreihe geschah mit 1:4 verdünnten DMEM-Zellkulturmedium ohne Phenol-Red (aufgrund der interferierenden Fluoreszenz) in Assay Buffer. Im nächsten Schritt wurde die Stammlösung des TIMP 3 Standards (aus dem Human TIMP-3 DuoSet, siehe Punkt 4.11, ELISA) mit dem in Assay Buffer gelösten Medium 1:100 verdünnt. Nun konnte eine Standardreihe mit den TIMP 3 Konzentrationen von 1000 ng/ml bis 15,625 ng/ml absteigend in halbierenden Schritten gebildet werden. Dazu wurde ebenfalls ein Nullwert angesetzt (nur Medium und Assay Buffer). Des Weiteren wurden vier Kontrollen hergestellt (siehe Tabelle 11), wobei das Substrat erst nach Inkubation der Platte beigefügt wurde. Die nach dem Hersteller benannte „positive control“ überprüft dabei die allgemeine Funktionalität des Testes, „vehicle“ und „test compound control“ ermitteln Eigen-Fluoreszenzen des Zellkulturmediums und der TIMP 3 Stammlösung und die „substrate control“ testet, ob das Substrat ohne Zugabe der MMP-1 eine stark verringerte Fluoreszenz aufweist.

Die Zellüberstände wurden vor Auftragen auf die 96-Well Platte aufkonzentriert. Hierfür wurden die Überstände von den doppelt angelegten Zellkulturen der 12-Well Platten gepoolt und in zentrifugale Filterröhrchen gegeben. Nun wurden die Proben für 20 min bei 4000 x g zentrifugiert, wobei Substrate kleiner als 3000 Dalton den Filter passierten. Im nächsten Schritt wurde das Filtrat verworfen und der Filter auf dem Kopf erneut für 2 min bei 1000 x g zentrifugiert um das Konzentrat aus Inhalten größer als 3000 Dalton zu isolieren. Somit konnte der TIMP 3 Überstand auf das 31-fache konzentriert werden.

Nun folgte das Übertragen der Proben auf eine schwarze 96-Well Platte. Jede Probe wurde als Doppelbestimmung aufgetragen. Dabei wurden zunächst 25 µl MMP-1 zu jedem Well außer der „test compound control“ und der „substrate control“ hinzugefügt. Danach wurde die TIMP 3 Standardreihe durch Hinzufügen von 25 µl der vorher angesetzten Ansätze zu jedem Well hergestellt. Des Weiteren wurden die Kontrollen mit den noch fehlenden Reagenzien ergänzt (außer Substrat) und die aufkonzentrierten Zellüberstände den Wells hinzugefügt (25 µl pro Well). Nun wurde die 96-Well Platte für 10 – 15 min bei 37 °C inkubiert, bevor zu jedem Well (außer der „test compound control“) 50 µl Substrat hinzugefügt wurden. Im Mithras erfolgte die photometrische Auswertung mit der Einstellung excitation/emission = 490 nm / 520 nm zu den Zeitpunkten 0, 15 und 30 min. Dabei wurden die Wells unmittelbar vor Auswertung durch leichtes Schütteln vermischt.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Kontrollen des SensoLyte Assays

| Kontrolle | MMP-1 | Assay Buffer | DMEM | TIMP 3 Stammlösung | Substrat |
|-----------------------|-------|--------------|-------|--------------------|----------|
| Positive control | 25 µl | 25 µl | | | 50 µl |
| Vehicle | 25 µl | | 25 µl | | 50 µl |
| Test compound control | | 99 µl | | 1 µl | |
| Substrate control | | 50 µl | | | 50 µl |

4 Ergebnisse

4.1 Die Herstellung der mRNA der Enzyme TIMP3 und eNOS

Als Ausgangssubstanz zur Herstellung der mRNA der beiden Enzyme TIMP3 und eNOS diente jeweils ein Plasmid, auf dessen Sequenz das Gen des Enzyms in Form von DNA-Basenpaarungen codiert ist. Um die spezifische Sequenz des Enzyms zu isolieren und amplifizieren, wurde zunächst eine PCR durchgeführt. Der Erfolg der PCR wurde mit photometrischer Messung und anschließendem Agarosegel quantifiziert und qualifiziert.

Per *in-vitro* Transkription wurden aus den DNA-Doppelsträngen komplementäre mRNA- Einzelstränge gebildet. Hierbei wurde der erfolgreiche Versuch ebenfalls mit photometrischer Messung und Agarosegel verifiziert.

4.1.1 PCR aus den beiden Plasmiden

Zunächst erfolgte die Isolation und Amplifikation der Plasmid DNA der beiden Enzyme durch eine PCR. Zum Ausschluss unerwünschter Nebenprodukte wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Des Weiteren ließ sich dadurch die Länge des amplifizierten Produktes nachweisen. Im Folgenden sind die Ergebnisse der PCR's der beiden Enzyme separat dargestellt, siehe Abbildung 4 und 5.

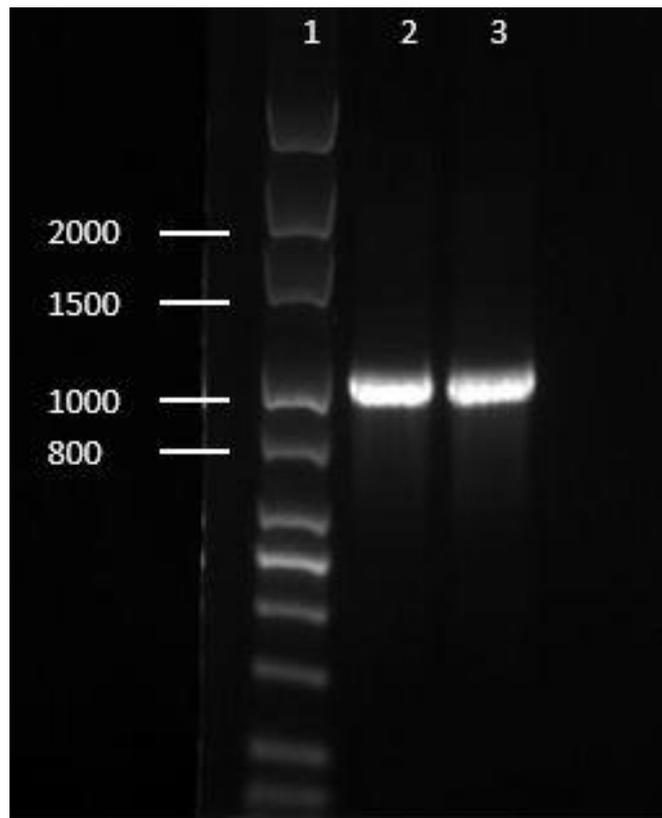


Abb. 4: Agarosegel der TIMP3-DNA

Darstellung der Agarosegelelektrophorese der TIMP3-DNA.

Reihe 1: Referenzmarker (DNA Ladder 100 – 3.000 bp)

Reihe 2 und 3: Proben des PCR Produktes

Dargestellt ist eine Agarosegelelektrophorese zweier PCR Produkte der TIMP3-DNA. Man erkennt jeweils eine Bande bei knapp über 1.000 Basenpaaren (bp) für beide aufgetragenen Proben. Die kodierende Sequenz des TIMP3 Enzym hat eine Länge von 893 bp, Das etwas längere Produkt entsteht durch die Anknüpfung des Primers während der PCR, dieser hat eine Länge von etwa 150 bp. Die Schlierenbildung lässt sich auf eine Überladung der Geltaschen zurückführen, außerdem lassen sich keine unerwünschten Nebenprodukte in Form von Banden erkennen.

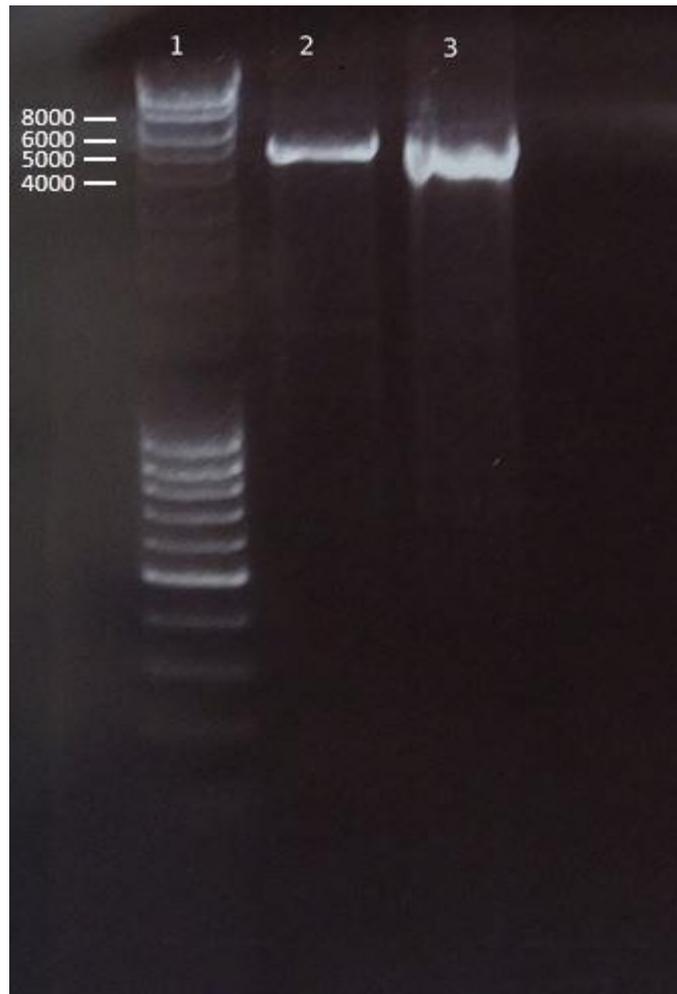


Abb. 5: Agarosegel der eNOS-DNA

Darstellung der Agarosegelelektrophorese der eNOS-DNA. Reihe 1: Referenzmarker (DNA Ladder 80 – 10.000 bp)

Reihe 2 und 3: Proben des PCR Produktes

Die kodierende Sequenz für das eNOS-Enzym hat eine Länge von 3815 bp. Die Bande der DNA Probe in Reihe 2 in Abbildung 5 befindet sich bei etwa 5000 bp. Dagegen ist die Länge des DNA-Produktes der Reihe 3 in Abbildung 5 etwas kürzer und befindet sich etwa auf der Höhe der 4000 bp Marke des DNA-Markers. Die Schlierenbildung ober- und unterhalb der Banden spricht für eine leichte Überbeladung der Geltaschen. Es lassen sich keine weiteren Banden erkennen, welches das Vorhandensein unerwünschter Nebenprodukte ausschließt.

Die Herstellung der DNA per PCR aus dem eNOS-Plasmid erwies sich als

schwierig. Es wurden sehr viele Versuche durchgeführt, welche gar keine Bande oder zu lange Produkte (wie in Abbildung 5 dargestellt) als Resultat hatten. Zur Optimierung der PCR wurden die Einstellungen am PCR-Cycler verändert. In Tabelle 12 sind die Einstellungen angegeben, welche bei der Herstellung der im Gel dargestellten DNA-Produkte angewandt wurden. Bei der Herstellung der ersten Probe (Reihe 2, Abb. 5) wurden 100 ng des ursprünglichen Plasmid als Ausgangssubstanz verwendet. Dagegen wurden für die zweite Probe (Reihe 3, Abb. 5) 100 ng des über Miniprep vermehrten Plasmids verwendet.

Tabelle 12: Einstellungen des PCR-Cyclers für die PCR des eNOS-Plasmids

| Schritt | Temperatur | Zeit | Anzahl Zyklen |
|------------------------|------------|-------|---------------|
| Initiale Denaturierung | 94 °C | 3 min | 1 |
| Denaturierung | 94 °C | 45 s | 25 |
| Annealing | 58 °C | 1 min | 1 |
| Elongation | 68 °C | 4 min | 1 |
| Finale Elongation | 68 °C | 5 min | 30 |
| Hold | 4 °C | | |

Die Konzentrationsmessung im Photometer ergab für das Produkt aus dem ursprünglichen Plasmid 128,8 µg / ml und für das Produkt des vermehrten Plasmids 157,95 µg / ml.

4.1.2 *In-vitro* Transkription

Im nächsten Schritt erfolgte die Weiterverarbeitung der amplifizierten DNA zu mRNA mittels *in-vitro* Transkription. Aus der TIMP3-DNA wurden zwei Varianten der mRNA hergestellt, zum Einen die 100 % modifizierte mRNA mit ausschließlicher Verwendung der modifizierten Nukleoside 5'-Methylcytidin und Pseudouridin statt Cytidin und Uracil, zum Anderen die 25 % modifizierte mRNA, welche zu 25 % Cytidin und Uracil mit 5'-Methylcytidin und Pseudouridin ersetzt hat. Zur Bestimmung der Länge des Transkriptionsproduktes und zum

Ausschluss unerwünschter Nebenprodukte wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Die beiden Enzyme sind zur Übersicht erneut separat dargestellt.

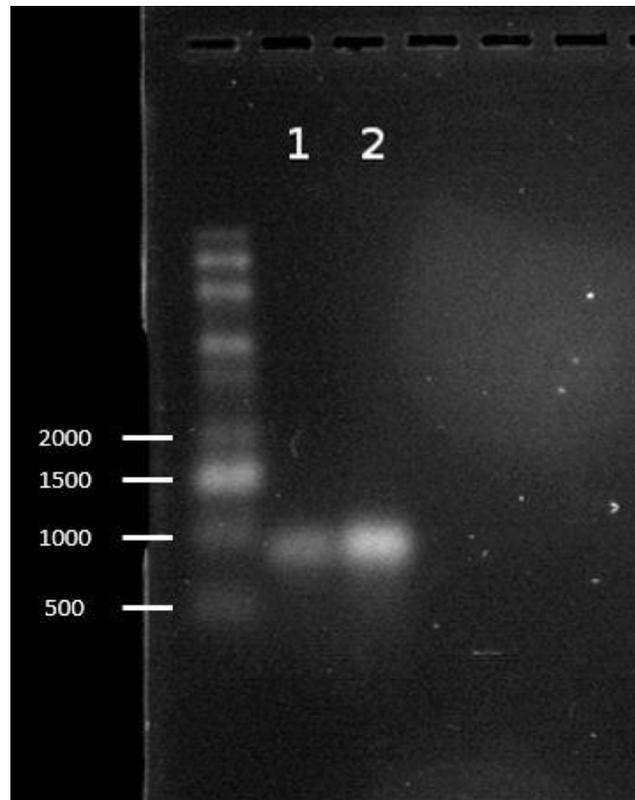


Abb. 6: Agarosegel der 100 % modifizierten TIMP3-mRNA

Darstellung der Agarosegelelektrophorese der 100 % modifizierten TIMP3-mRNA.

Reihe 3: Referenzmarker (RNA Ladder 500 – 10.000 bp)

Reihe 1 und 2: mRNA-Produkte

Nach Auswertung des Agarosegels sind bei den Proben 1 und 2 zwei deutliche Banden bei knapp 1.000 bp zu erkennen, dies entspricht der Länge der kodierenden Sequenz für das TIMP3 Enzym von 893 bp. Die Schlierenbildung unterhalb der Banden lässt auf eine Überladung der Geltaschen zurückzuführen. Als Ausgangssubstanz für die IVT wurden 1500 ng TIMP3 Template verwendet. Die photometrische Messung ergab für die Probe 1 eine Konzentration von 894,9 µg / ml und für die Probe 2 eine Konzentration von 1617 µg / ml. Dieser Konzentrationsunterschied erklärt die hellere Bande bei Probe 2.

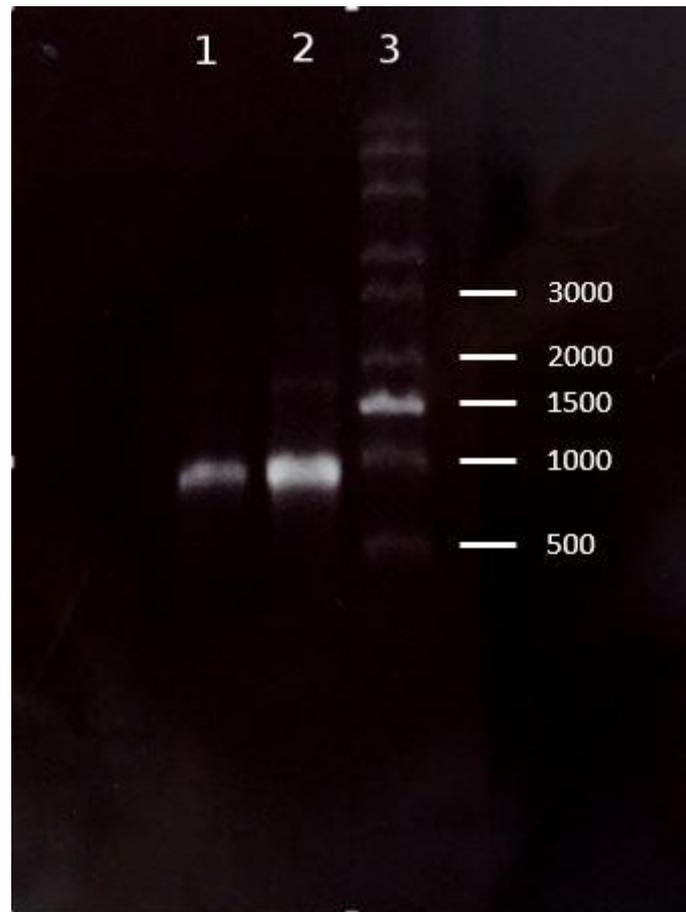


Abb. 7: Agarosegel der 25 % modifizierten TIMP3-mRNA

Darstellung der Agarosegelelektrophorese der 25 % modifizierten TIMP3-mRNA.

Reihe 3: Referenzmarker (RNA Ladder 500 – 10.000 bp)

Reihe 1 und 2: mRNA-Produkte

Bei Betrachten des Agarosegels fallen die deutlichen Banden der beiden Proben 1 und 2 bei knapp 1.000 bp auf. Die Länge der kodierenden Sequenz des TIMP3 Enzyms entspricht 839 bp, die Länge der Produkte stimmt somit mit der Länge der kodierenden Sequenz überein. Des Weiteren fällt bei Probe 2 eine sehr schwache Bande mit einer Länge zwischen 1.500 und 2.000 bp auf. Da die Länge etwa die doppelte der des Gens ist, handelt es sich hierbei sehr wahrscheinlich um ein Dimer, also einer Aggregation zweier TIMP3 mRNAs. Dies ist bei einer so geringen Konzentration nicht problematisch und behindert nicht die Fortsetzung des Versuches.

Als Ausgangssubstanz wurden 1.500 ng TIMP3-DNA verwendet. Die Messung der RNA Konzentration im Photometer ergab einen Wert von 1096,1 µg / ml für Probe 1 und für Probe 2 einen Wert von 704,6 µg / ml.

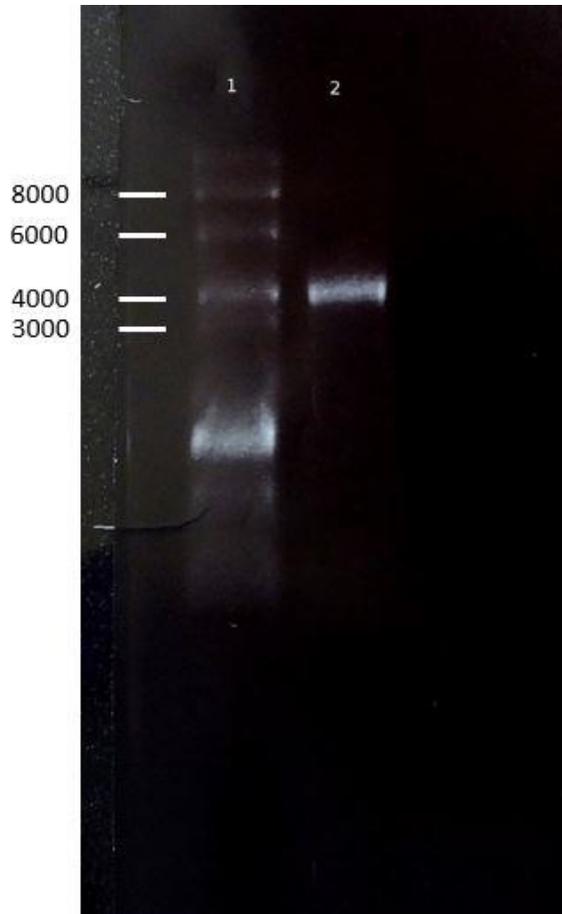


Abb. 8: Agarosegel der eNOS-mRNA

Darstellung der Agarosegelelektrophorese der eNOS-mRNA.

Reihe 1: Referenzmarker (RNA Ladder 500 – 10.000 bp).

Reihe 2: mRNA-Produkt

Das Produkt aus der Transkription hat eine deutliche Bande bei etwa 4.000 bp, die mRNA ist somit intakt und es hat keine Degradation stattgefunden, siehe Abb. 8. Die Länge entspricht den 3815 bp des eNOS Plasmids. Als Ausgangssubstanz wurden 1500 ng der im Agarosegel mit Nummer 3 dargestellten DNA verwendet (siehe Abb.5).

Es lässt sich keine Bande an einer anderen Stelle des Gels erkennen, dies spricht gegen das Vorhandensein unerwünschter Nebenprodukte. Mit einem Photometer wurde die Konzentration der mRNA ermittelt. Für diese Probe betrug die

Konzentration 1316,4 µg / ml.

4.2 Transfektion und anschließende Kontrolle der Enzym-Expression

Die hergestellte mRNA wurde nun in die Zellen der humanen Lungenkarzinomzelllinie A549 und die endotheliale Zelllinie EA.hy926 transfiziert. Dabei wurden die Zellen mit den Transfektionsansätzen für 4 h inkubiert. Nach 24 h und 48 h wurde die Transfektion ausgewertet.

Die Zellen wurden mit 0,25 µg, 0,5 µg und 1,0 µg TIMP3-mRNA transfiziert. Dabei wurden Zellen jeweils mit der 100 % und der 25 % modifizierten mRNA kodierend für das TIMP3-Protein behandelt. Für die Transfektion der eNOS-mRNA wurden 1,0 µg und 2,5 µg eingesetzt, da die Sequenz von eNOS länger ist.

Anschließend wurde der Transfektionserfolg im Fall von TIMP3 mit einem ELISA, bei eNOS mit einer Durchflusszytometrie ermittelt. Parallel wurden mit TIMP3 transfizierte Zellen einem MTT-Assay unterzogen um den Einfluss der Transfektion auf die Zellviabilität zu untersuchen.

4.2.1 Messung der Zellviabilität mit dem MTT-Assay

Mit dem MTT-Assay wurde gemessen, ob die mRNA Transfektion zytotoxisch für die Zellen ist. Dabei wurde die Absorption des Farbstoffs, einem Tetrazoliumsalz, der als Kontrolle diente, auf 100 % gesetzt und die transfizierten Zellen mit dieser Kontrolle verglichen. Die Auswertung enthält Daten von drei Versuchen. Es wurden nur Viabilitätsmessungen mit den TIMP3-mRNA transfizierten Zellen durchgeführt, da die Transfektion mit eNOS nur unbefriedigende Ergebnisse im Anstieg der Expression zeigte.

4.2.1.1 Messung der Zellviabilität nach Transfektion mit 100 % modifizierter mRNA

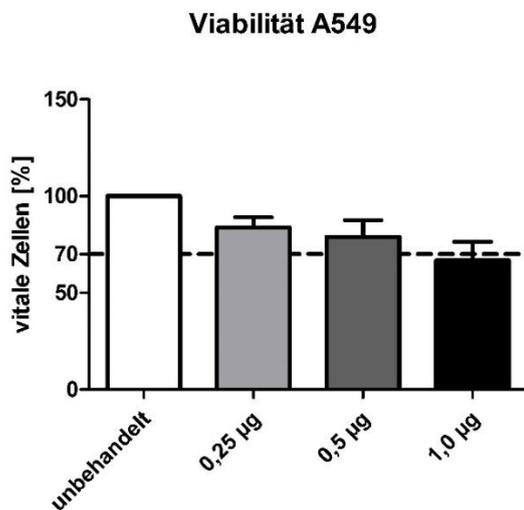


Abb. 9: Viabilität der A549 nach Transfektion mit 100 % modifizierter mRNA

Es sind die Viabilitäten der Zelllinien [%] im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle (= 100 %) aufgetragen. Auf der Y-Achse erkennt man die Viabilität [%], während die X-Achse die eingesetzten mRNA Mengen anzeigt. Werte sind Mittelwerte (Balken) + mittlerer Fehler des Mittelwerts (Linie), n = 3. Die gestrichelte Linie markiert die kritische Grenze von 70 %, die als untere Grenze für eine Verträglichkeit des Genkonstrukts gesetzt wurden.

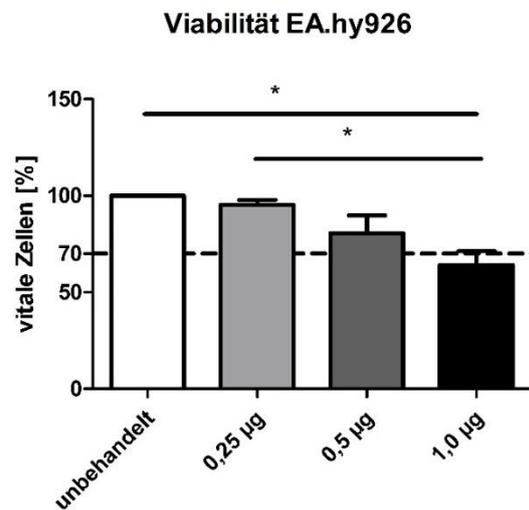


Abb. 10: Viabilität der EA.hy926 nach Transfektion mit 100 % modifizierter mRNA

Es sind die Viabilitäten der Zelllinien [%] im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle (=100 %) aufgetragen. Auf der Y-Achse erkennt man die Viabilität [%], während die X-Achse die eingesetzten mRNA Mengen anzeigt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ gesetzt, signifikante Unterschiede sind mit * und ** dargestellt. Werte sind Mittelwerte (Balken) + mittlerer Fehler des Mittelwerts (Linie), n = 3. * $p < 0,05$. Die gestrichelte Linie markiert die kritische Grenze von 70 %, die als untere Grenze für eine Verträglichkeit des Genkonstrukts gesetzt wurden

Man kann in Abbildung 9 erkennen, dass nach Transfektion der A549 Zellen keine signifikanten Unterschiede in der Viabilität der behandelten Zellen zu verzeichnen sind. Dennoch fällt auf, dass mit höheren Mengen transfizierter mRNA die Menge an überlebenden Zellen tendenziell, jedoch nicht signifikant, absinkt. Werden 0,5 µg der 100 % modifizierten mRNA eingesetzt, ist die Viabilität noch bei etwa 80 %, setzt man jedoch 1,0 µg ein, sinkt sie um über 30 %.

Die Viabilitätsdaten der EA.hy926 sind in Abbildung 10 dargestellt. Man erkennt signifikante Unterschiede der Anzahl der überlebenden Zellen zwischen der Kontrolle und den mit 1,0 µg mRNA behandelten Zellen, sowie den mit 0,25 µg und 1,0 µg mRNA behandelten Proben. Erneut sinkt die Viabilität der Zellen mit ansteigender Menge an transfizierter mRNA. Während die Zellen, welche mit 0,5 µg mRNA transfiziert wurden, ein Überleben von knapp über 80 % im Vergleich zur Kontrolle aufweisen, sinkt dieses bei den mit 1,0 µg behandelten Zellen um 35 %.

Des Weiteren zeigen die mit 0,25 µg 100 % modifizierter mRNA transfizierten Zellen ein fast genauso hohes Überleben wie die unbehandelte Kontrolle.

4.2.1.2 Messung der Zellviabilität nach Transfektion mit 25 % modifizierter mRNA

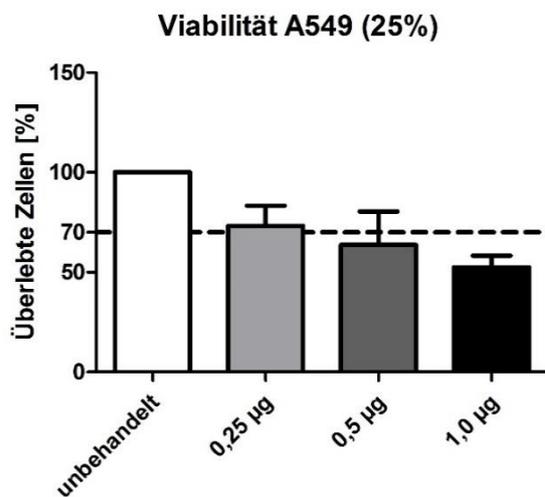


Abb. 11: Viabilität der A549 nach Transfektion mit 25 % modifizierter mRNA

Es sind die Viabilitäten der Zelllinien [%] im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle (= 100 %) aufgetragen. Auf der Y-Achse erkennt man die Viabilität [%], während die X-Achse die eingesetzten mRNA Mengen anzeigt. Werte sind Mittelwerte (Balken) + mittlerer Fehler des Mittelwerts (Linie), n = 3. Die gestrichelte Linie markiert die kritische Grenze von 70 %, die als untere Grenze für eine Verträglichkeit des Genkonstrukts gesetzt wurden.

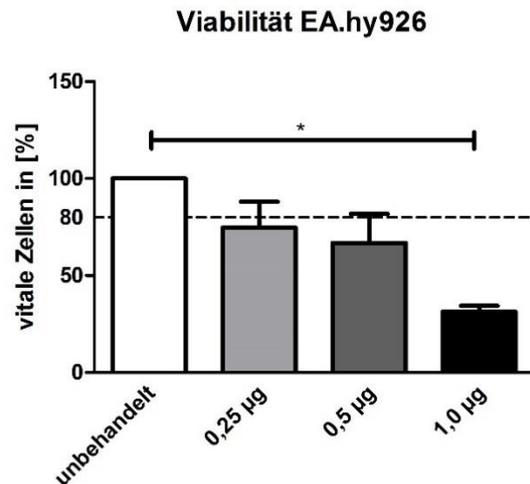


Abb. 12: Viabilität der EA.hy926 nach Transfektion mit 25 % modifizierter mRNA

Es sind die Viabilitäten der Zelllinien [%] im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle (=100 %) aufgetragen. Auf der Y-Achse erkennt man die Viabilität [%], während die X-Achse die eingesetzten mRNA Mengen anzeigt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ gesetzt, signifikante Unterschiede sind mit * dargestellt. Werte sind Mittelwerte (Balken) + mittlerer Fehler des Mittelwerts (Linie), n = 3. * $p < 0,05$. Die gestrichelte Linie markiert die kritische Grenze von 70 %, die als untere Grenze für eine Verträglichkeit des Genkonstrukts gesetzt wurden.

Nach Transfektion der mit 25 % modifizierter mRNA transfizierten A549 Zellen erkennt man in Abbildung 11 keine signifikanten Unterschiede im Überleben der Zellen. Dennoch lässt sich erkennen, dass je mehr mRNA in die Zellen gelangt, desto weniger Zellen überleben. Von den mit 1,0 µg mRNA transfizierten Zellen haben nur noch knapp über 50 % Zellaktivität gezeigt.

In Abbildung 12 sind die vitalen EA.hy926 Zellen [%] in Bezug zu ansteigenden transfizierten mRNA Mengen dargestellt. Es gibt einen signifikanten Unterschied zwischen unbehandelten und mit 1,0 µg 25 % modifizierter mRNA transfizierten Zellen, welche eine Viabilität von nur noch knapp über 30 % aufweisen. Im Vergleich dazu ist die Viabilität bei den mit 100 % modifizierter mRNA transfizierten Zellen mit 64 % um einiges höher.

4.2.1.3 Vergleich der Viabilitäten der mit 25 % und 100 % modifizierten mRNA transfizierten Zellen

Tabelle 13: Darstellung der Viabilitäten der A549

| Behandlung | Viabilität (100 % mRNA) | Viabilität (25 % mRNA) |
|--------------|-------------------------|------------------------|
| unbehandelt | 100 % | 100 % |
| 0,25 µg mRNA | 83,6 % | 73,2 % |
| 0,5 µg mRNA | 78,9 % | 63,6 % |
| 1,0 µg mRNA | 66,7 % | 52,5 % |

Tabelle 14: Darstellung der Viabilitäten der EA.hy926

| Behandlung | Viabilität (100 % mRNA) | Viabilität (25 % mRNA) |
|--------------|-------------------------|------------------------|
| unbehandelt | 100 % | 100 % |
| 0,25 µg mRNA | 95,3 % | 74,6 % |
| 0,5 µg mRNA | 80,5 % | 66,9 % |
| 1,0 µg mRNA | 64,1 % | 31,3 % |

In dem direkten Vergleich der vitalen Zellen [%] bezüglich der eingesetzten

mRNA Menge erkennt man klare Unterschiede. Zellen, welche mit 25 % modifizierter mRNA transfiziert wurden, zeigen für jede eingesetzte Menge mRNA eine niedrigere Rate an überlebenden Zellen. Dies ist für A549 und EA.hy926 Zellen der Fall. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die 25 % modifizierte mRNA von den Zellen schlechter vertragen wird und somit höhere toxische Effekte aufweist als die 100 % modifizierte mRNA. Außerdem reagiert die A549 Zelllinie weniger sensitiv auf die mRNA Transfektion als die immortalisierten Endothelzellen.

4.2.2 ELISA zum Nachweis von TIMP3 in den Mediumsüberständen transfizierter Zellen

Zum Nachweis der Proteinexpression nach TIMP3-mRNA Transfektion wurden die Überstände mit einem ELISA gegen das Enzym getestet. Hierfür wurden nach Transfektion die Überstände der Zellen nach 24 h und 48 h entnommen. In den folgenden Grafiken sind die Mengen des exprimierten Enzyms TIMP3 abhängig von den eingesetzten Mengen mRNA zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h dargestellt. Die beiden transfizierten Zelllinien A549 und EA.hy926 sind in zwei separaten Graphiken dargestellt, des Weiteren gibt es eine Aufteilung nach 25 % und 100 % modifizierter mRNA.

Unbehandelte A549 Zellen wurden in ihrer Expression auf 0 gesetzt, da diese das Enzym nicht selbstständig synthetisieren. Während der ELISA der Überstände der EA.hy926 Zellen fiel hingegen auf, dass diese Zelllinie eine Kodierung für das TIMP3-Protein im zellständigen Genom enthält, da die Zellen auch unbehandelt nachweisbare Mengen an TIMP3 exprimierten.

4.2.2.1 ELISA aus den Überständen der mit 100 % modifizierten mRNA transfizierten Zellen

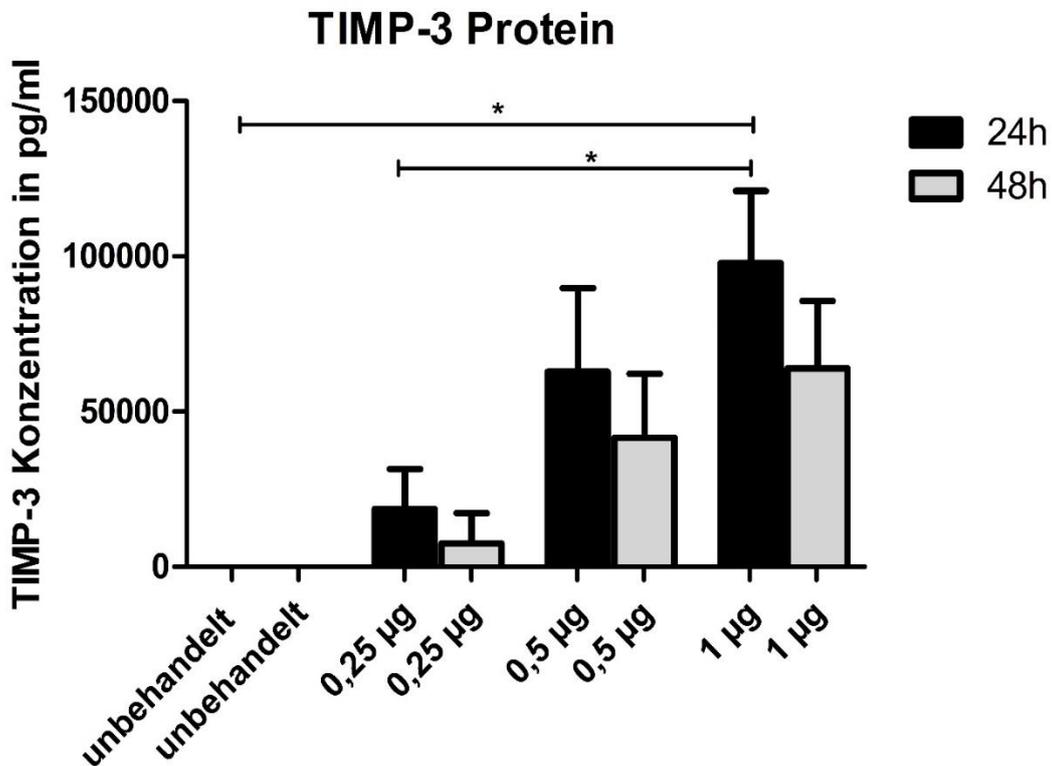


Abb. 13: TIMP3 Konzentration der A549 nach 24 h und 48 h nach Verwendung 100 % modifizierter mRNA

Auf der Y-Achse erkennt man die exprimierte TIMP3 Konzentration. Die X-Achse stellt die eingesetzten mRNA Mengen dar. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ gesetzt, signifikante Unterschiede sind mit * dargestellt. Werte sind Mittelwerte (Balken) + mittlerer Fehler des Mittelwerts (Linie), $n = 3$.

Aus dem ELISA der A549 geht hervor, dass die eingesetzte Menge von 1 µg mRNA nach 24 h eine signifikante Erhöhung der TIMP3 Konzentration hervorbringt, siehe Abb. 13. Doch auch schon bei 0,5 µg sind hohe Anstiege der TIMP3 Konzentration zu vermerken. Des Weiteren fällt auf, dass nach 24 h mehr TIMP3 exprimiert wird als nach 48 h.

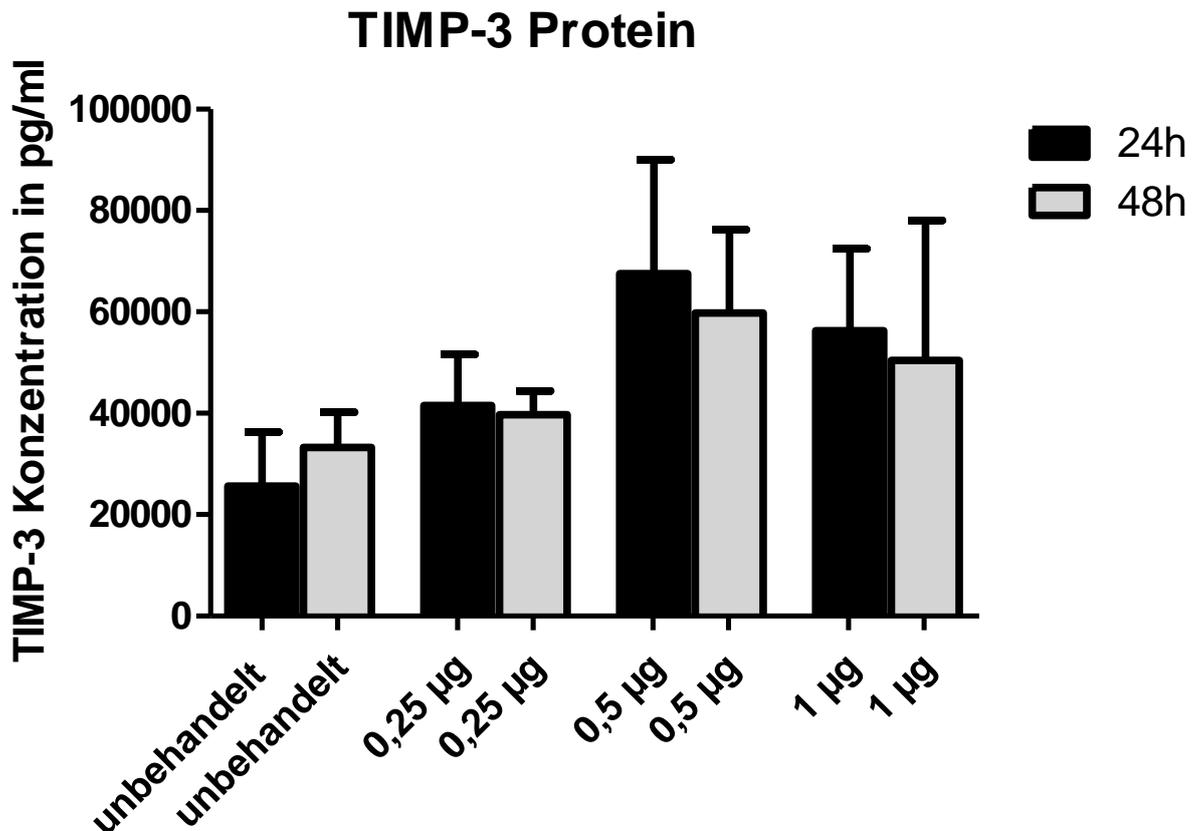


Abb. 14: TIMP3 Konzentration der EA.hy926 nach 24 h und 48 h nach Verwendung 100 % modifizierter mRNA

Auf der Y-Achse erkennt man die exprimierte TIMP3 Konzentration. Die X-Achse stellt die eingesetzten mRNA Mengen dar. Werte sind Mittelwerte (Balken) + mittlerer Fehler des Mittelwerts (Linie), n = 3.

Die EA.hy926 Zelllinie exprimiert natürlicherweise das Enzym TIMP3, dadurch ließen sich die unbehandelten Zellen hinsichtlich der TIMP3 Expression nicht von den transfizierten unterscheiden und wurden somit nicht auf null gesetzt. In Abbildung 14 fällt auf, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Expression der verschiedenen behandelten Zellen gibt. Die höchste Bildung an TIMP3 findet in mit 0,5 µg mRNA transfizierten Zellen nach 24 h statt. Bei 1,0 µg mRNA ist die Expression von TIMP3 niedriger, trotz der höheren Menge an eingesetzter mRNA. Wie bei den A549 Zellen fällt auf, dass die Expression nach 48 h geringer ist als nach 24 h, außer bei den unbehandelten Zellen.

4.2.2.2 ELISA aus den Überständen der mit 25 % modifizierten mRNA transfizierten Zellen

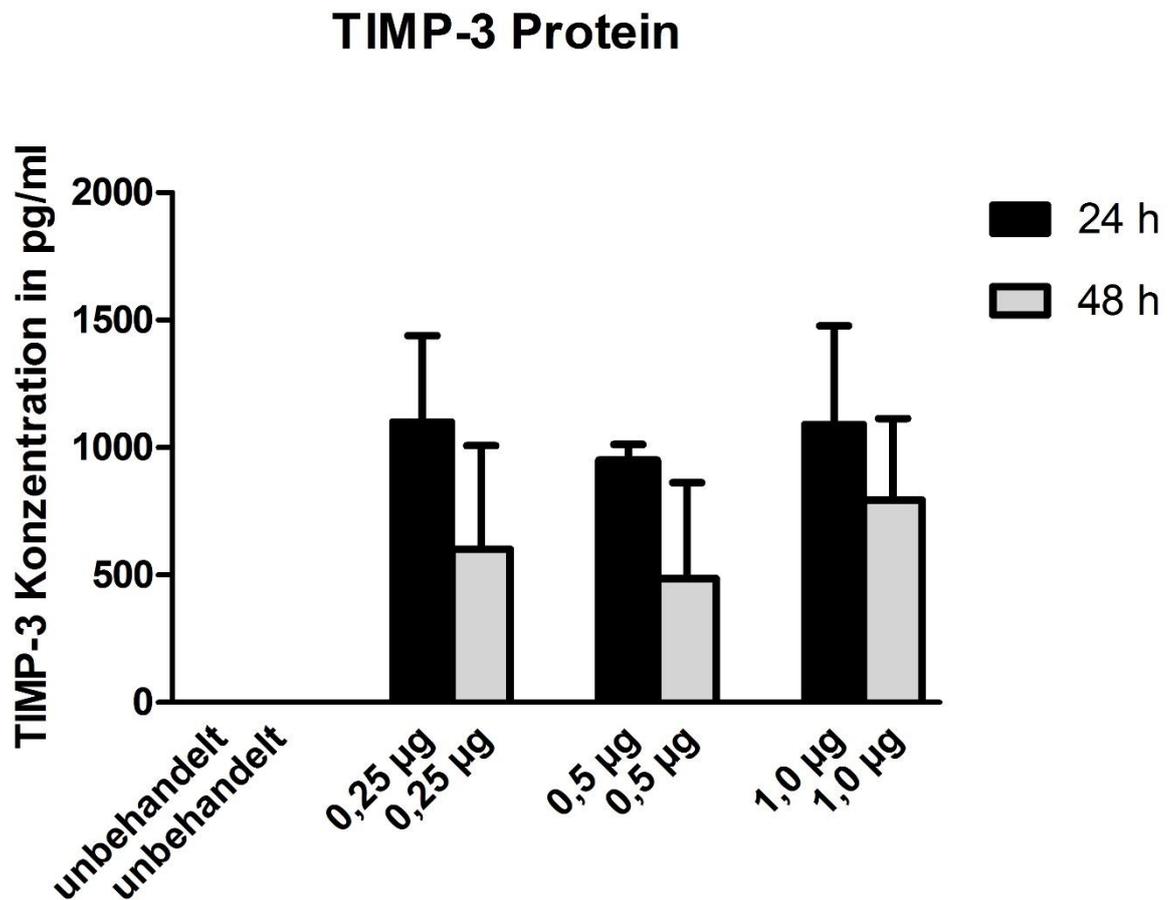


Abb. 15: TIMP3 Konzentration der A549 nach 24 h und 48 h nach Verwendung 25 % modifizierter mRNA

Auf der Y-Achse erkennt man die exprimierte TIMP3 Konzentration. Die X-Achse stellt die eingesetzten mRNA Mengen dar. Werte sind Mittelwerte (Balken) + mittlerer Fehler des Mittelwerts (Linie), n = 3.

Bei Betrachten der Abb.15 fällt auf, dass es keine signifikanten Unterschiede in den TIMP3 Expressionen der verschieden behandelten Zellen gibt. Des Weiteren sind die Expressionen von TIMP3 Protein [pg / ml] im Überstand mit knapp 1000 pg / ml nach 24 h wesentlich geringer ausgeprägt als die Expressionen der mit

100 % modifizierter mRNA behandelten Zellen (siehe Abb. 13). Zudem sehen die Expressionen trotz unterschiedlich eingesetzter Mengen an mRNA in ihrer Höhe sehr ähnlich aus, es gibt also keine wesentlich gesteigerte Expression bei höherer mRNA Menge. Nach 48 h ist die Expression erneut geringer als nach 24 h.

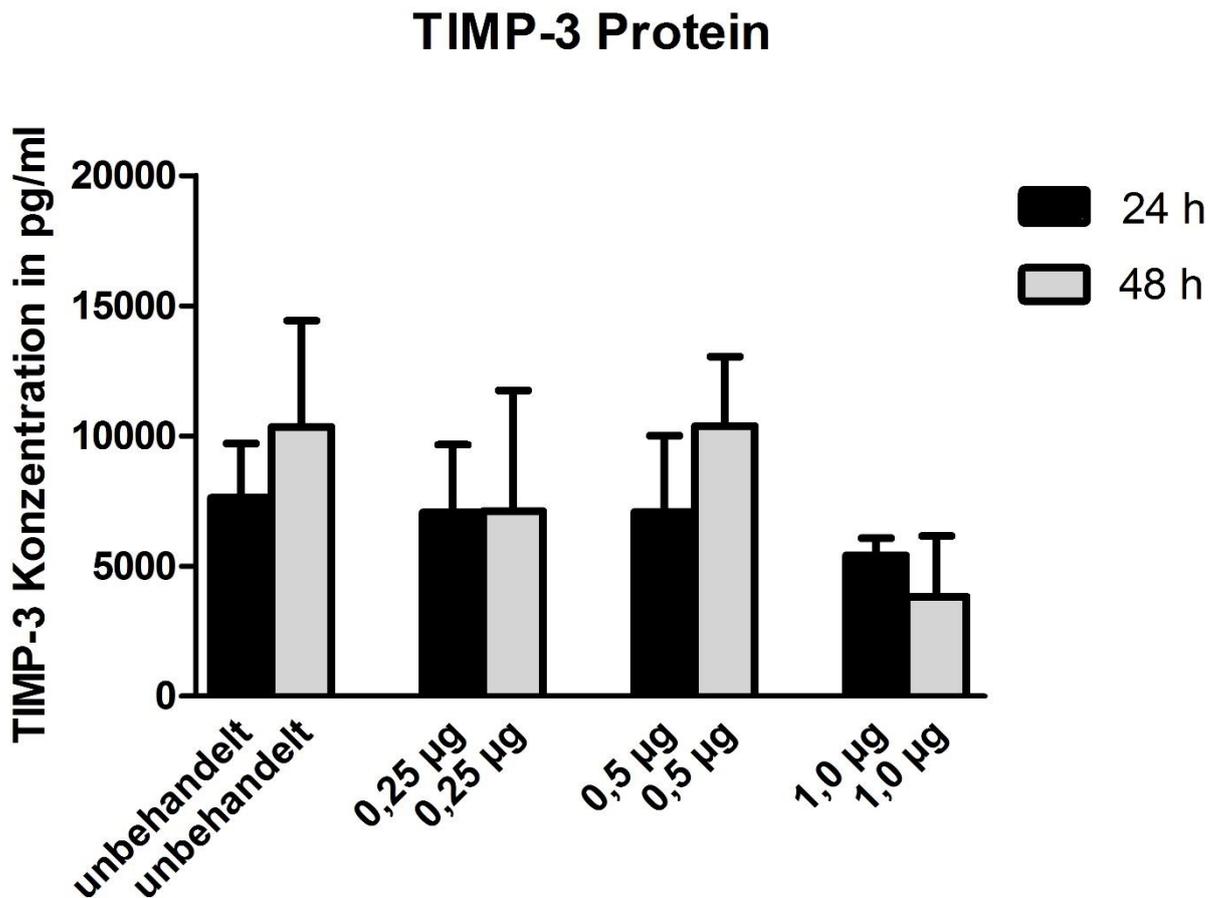


Abb. 16: TIMP3 Konzentration der EA.hy926 24 h und 48 h nach Verwendung 25 % modifizierter mRNA

Auf der Y-Achse erkennt man die exprimierte TIMP3 Konzentration. Die X-Achse stellt die eingesetzten mRNA Mengen dar. Werte sind Mittelwerte (Balken) + mittlerer Fehler des Mittelwerts (Linie), n = 3.

Es lässt sich aus Abb. 16 ableiten, dass die Expression von TIMP3-Protein niedriger ist im Vergleich zu den mit 100 % mRNA modifizierten Zellen (siehe Abb. 14), weiterhin bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den

Gruppen. Zudem erzeugt die höchste Menge mRNA (1 µg) die geringste Expression an TIMP3. Die unbehandelte Zelllinie exprimiert tendenziell am meisten TIMP3, welches für diese Zellen auch einen normalen Vorgang darstellt. Zudem sind die Unterschiede der Werte des Nachweises aus den 24 h und 48 h Überstand nicht so eindeutig wie bei den Darstellungen davor. Tendenziell zeigt sich nach 48 h eine höhere Expression an TIMP3-Protein.

4.2.2.3 Vergleich der Expression der mit 25 % und 100 % modifizierten mRNA transfizierten Zellen

Tabelle 15: Darstellung der Expression der A549 nach 24 h

| Behandlung | Expression (100 % mRNA) | Expression (25 % mRNA) |
|--------------|-------------------------|------------------------|
| unbehandelt | 0 µg / ml | 0 µg / ml |
| 0,25 µg mRNA | 18,6 µg / ml | 1,10 µg / ml |
| 0,5 µg mRNA | 62,8 µg / ml | 0,95 µg / ml |
| 1,0 µg mRNA | 97,8 µg / ml | 1,09 µg / ml |

Tabelle 16: Darstellung der Expression der A549 nach 48 h

| Behandlung | Expression (100 % mRNA) | Expression (25 % mRNA) |
|--------------|-------------------------|------------------------|
| unbehandelt | 0 µg / ml | 0 µg / ml |
| 0,25 µg mRNA | 7,54 µg / ml | 0,60 µg / ml |
| 0,5 µg mRNA | 41,5 µg / ml | 0,49 µg / ml |
| 1,0 µg mRNA | 63,9 µg / ml | 0,79 µg / ml |

Tabelle 17: Darstellung der Expression der EA.hy926 nach 24 h

| Behandlung | Expression (100 % mRNA) | Expression (25 % mRNA) |
|--------------|-------------------------|------------------------|
| unbehandelt | 25,6 µg / ml | 7,62 µg / ml |
| 0,25 µg mRNA | 41,6 µg / ml | 7,06 µg / ml |
| 0,5 µg mRNA | 67,6 µg / ml | 7,07 µg / ml |
| 1,0 µg mRNA | 56,3 µg / ml | 3,83 µg / ml |

Tabelle 18: Darstellung der Expression der EA.hy926 nach 48 h

| Behandlung | Expression (100 % mRNA) | Expression (25 % mRNA) |
|--------------|-------------------------|------------------------|
| unbehandelt | 33,3 µg / ml | 10,3 µg / ml |
| 0,25 µg mRNA | 39,7 µg / ml | 7,11 µg / ml |
| 0,5 µg mRNA | 59,8 µg / ml | 10,4 µg / ml |
| 1,0 µg mRNA | 50,5 µg / ml | 3,83 µg / ml |

Der Vergleich der Expression nach Behandlung mit 25 % und 100 % modifizierter mRNA zeigt trotz gleicher eingesetzter Mengen in jedem Fall eine erhöhte Expression nach Behandlung mit 100 % modifizierter mRNA. Die 100 % modifizierte mRNA führt in vielen Fällen zu einer bis 100-fach höheren Expression im Vergleich zu der Expression nach Transfektion mit 25 % modifizierter mRNA. Daraus lässt sich schließen, dass die 25 % modifizierte mRNA nicht nur toxische Effekte hat (siehe Punkt 5.2.1.3), sondern auch nicht so gut von den Zellen abgelesen und verwertet werden kann.

4.2.3 Durchflusszytometrie aus den Überständen der mit eNOS transfizierten Zellen

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Transfektion mit der eNOS-mRNA dargestellt. Es wurden nur Zellen der A549 Zelllinie transfiziert, da die EA.hy926 Zelllinie das Enzym eNOS auch schon ohne Transfektion exprimiert. Der Test richtete sich gegen die exprimierten eNOS Enzyme, welche sich in hohen Konzentration im inneren Bereich der Zellmembran anreichern. Dabei befindet sich das Epitop der endothelialen Stickstoffmonoxid Synthase außen auf der

Zellmembran. Fluoreszenzmarkierte Antikörper binden an das Epitop und markieren Zellen, welche die eNOS exprimieren. Es wurden Überstände nach 24 h entnommen, um exprimiertes eNOS Enzym nachweisen zu können. Die folgende Grafik veranschaulicht die Abhängigkeit der Expression von eNOS von der eingesetzten mRNA Menge bei Transfektion.

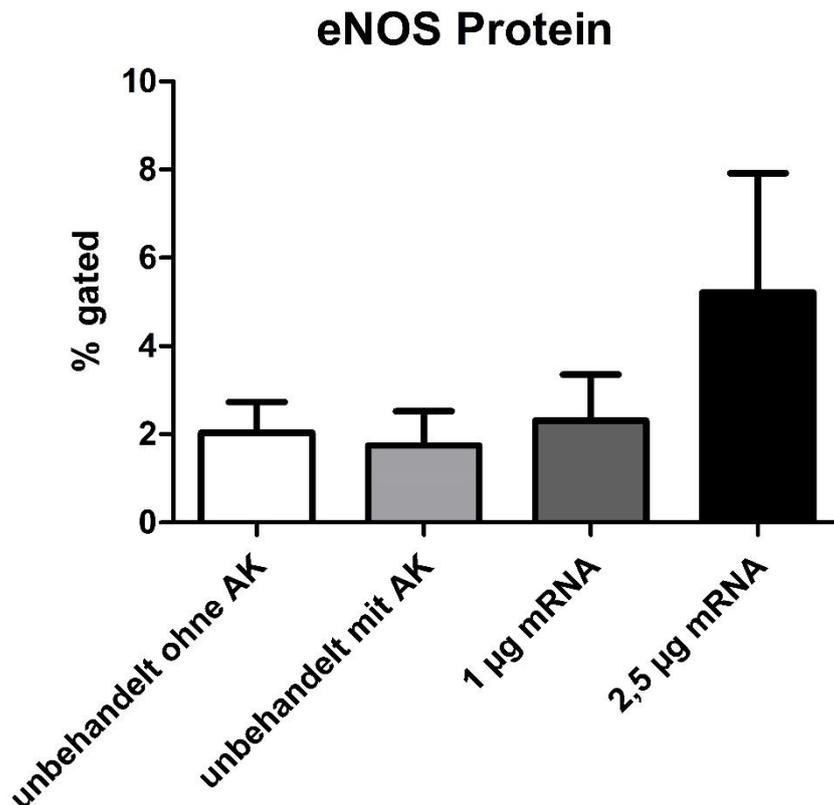


Abb. 17: Expression des eNOS Proteins nach 24 h

Auf der Y-Achse erkennt man den Prozentsatz der Zellen, welche mit einem gegen eNOS gerichteten Antikörper gefärbt wurden und somit mittels Durchflusszytometrie detektiert werden konnte. Die X-Achse stellt die eingesetzten mRNA Mengen dar. Werte sind Mittelwerte (Balken) + mittlerer Fehler des Mittelwerts (Linie), n = 3.

Die unbehandelte Kontrolle ohne Antikörper gilt als Negativkontrolle. Es fällt auf, dass sich keine signifikanten Unterschiede durch Transfektion der Zellen erreichen ließen. Die mit 2,5 µg mRNA transfizierten Zellen zeigen zwar eine erhöhte Expression der endothelialen NO-Synthase, diese ist jedoch mit einem Durchschnitt von knapp über 5 % Zellen sehr gering. Der höchste Wert, welcher

durch die Transfektion erreicht wurde, waren etwa 11 % exprimierende Zellen, somit lässt sich die Transfektionseffizienz als unbefriedigend bewerten.

Da die Transfektion zu keiner signifikanten Erhöhung der Expression der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase führte, wurde kein MTT-Assay zur Überprüfung der Zellviabilität durchgeführt.

4.3 Darstellung der Vermehrung des Plasmids durch Bakterien

Zur Optimierung der PCR des eNOS-Plasmids wurden zahlreiche Versuche durchgeführt, welche zu einem Verbrauch des Plasmid-Eduktes führten. Zur Bereitstellung weiterer Plasmid-DNA wurde eine Vermehrung der Plasmid Sequenz in E.coli durchgeführt. Hierfür wurde das Plasmid in das Genom der Bakterien transformiert und somit durch den physiologischen Vermehrungszyklus der Bakterien vervielfältigt. Nach Vermehrung wurde das Plasmid isoliert und aufgereinigt. Das Produkt wurde über photometrische Konzentrationsmessung und Agarosegelelektrophorese auf seine Reinheit und korrekte Länge überprüft. Für die Elektrophorese wurde das Plasmid zunächst mit einem Restriktionsenzym inkubiert, welches die zirkuläre Plasmid-DNA in einen linearen DNA-Doppelstrang spaltet.

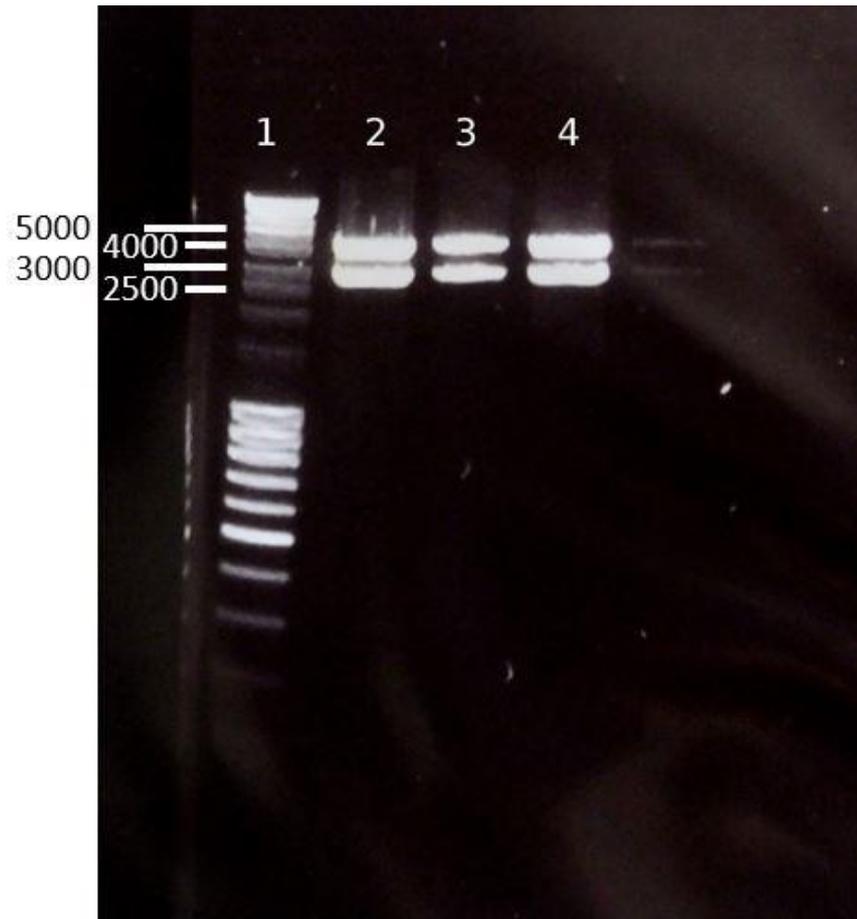


Abb. 18: Agarosegel der Produkte der Plasmidvermehrung

Reihe 1: DNA – Marker

Reihen 2, 3 und 4: Produkte der Plasmidvermehrungen nach Inkubation mit einem Restriktionsenzym

Bei Betrachten des Agarosegels fallen jeweils zwei Banden bei den Proben 2, 3 und 4 auf. Die längere Bande ist bei etwa 4.000, die kürzere bei knapp 3.000 Basenpaaren Länge. Somit würde die längere Bande in der Länge mit der eNOS DNA (3.815 bp) übereinstimmen. Die gesamte Länge des Plasmides, auf welchem die eNOS Sequenz codiert ist, stimmt in der Summe mit den beiden Banden in ihrer Gesamtheit überein.

Vor Auftragen der Produkte, welche durch Transformation in Bakterien vermehrt wurden, wurden die vermehrten Plasmide dem Restriktionsverdau zugeführt. Durch Zugabe des Restriktionsenzym Xba I wurde die Plasmid-DNA in lineare DNA-Fragmente gespalten. Dabei durchtrennt das Enzym Doppelstränge im

Bereich ganz bestimmter Basenfolgen (Siehe Abbildung 19). Auf dem eNOS Plasmid befindet sich exakt eine solche Sequenz zweimal, am Anfang und am Ende des eNOS Gens. Somit führt der Restriktionsverdau mit XbaI durch zwei Schnitte durch das ringförmige Plasmid zu zwei linearen DNA-Fragmenten, von denen eine die eNOS-DNA ist.



Abb. 19: Schnittstellen des Restriktionsenzym XbaI

In Tabelle 19 sind die Konzentrationen der drei Proben aus der photometrischen Messung angezeigt.

Tabelle 19: Konzentrationen nach Restriktionsverdau der vermehrten Plasmide

| Probe (als Zahl im Gel) | Konzentration [$\mu\text{g} / \text{ml}$] |
|-------------------------|---|
| 2 | 88,4 |
| 3 | 61,2 |
| 4 | 80,3 |

4.4 Darstellung der TIMP3 Enzymaktivität im SensoLyte Assay

Der SensoLyte Assay diente der Darstellung der Funktionalität der von den Zellen produzierten TIMP3-Proteine. In der Theorie soll der in den Zellüberständen durch Expression vorhandene Metalloprotease-Inhibitor TIMP3 eine im Test vorhandene Metalloprotease hemmen, wodurch es zu einem Abfall der Fluoreszenz kommt. Hierfür wurden Überstände von mit 0,5 μg und 1,0 μg 100 %

modifizierter TIMP3 mRNA transfizierten A549 Zellen nach 24 h dem Test zugeführt. Als Kontrolle dienten unbehandelte A 549 Zellen. Es wurden zwei unabhängige Versuche, welche jeweils drei unabhängig transfizierte Ansätze enthielten, durchgeführt. Im ersten Versuchsgang wurden auch Überstände von unbehandelten EA.hy926 Zellen eingesetzt, welche TIMP3 auch schon im unbehandelten Zustand exprimieren.

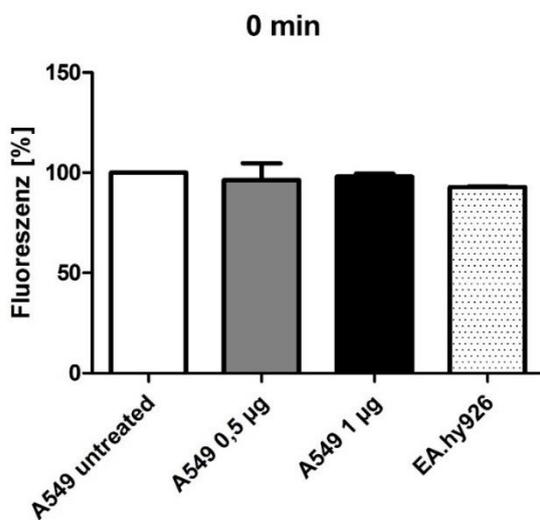


Abb. 20: Fluoreszenz nach 0 min, Versuch 1

Dargestellt ist die gemessene Fluoreszenz, gemessen zum Zeitpunkt 0 min, abhängig von der eingesetzten mRNA-Menge, bzw. der Zelllinie. Unbehandelte A549 Zellen sind auf 100 % gesetzt. Werte sind Mittelwerte (Balken) + mittlerer Fehler des Mittelwerts (Linie), n = 3.

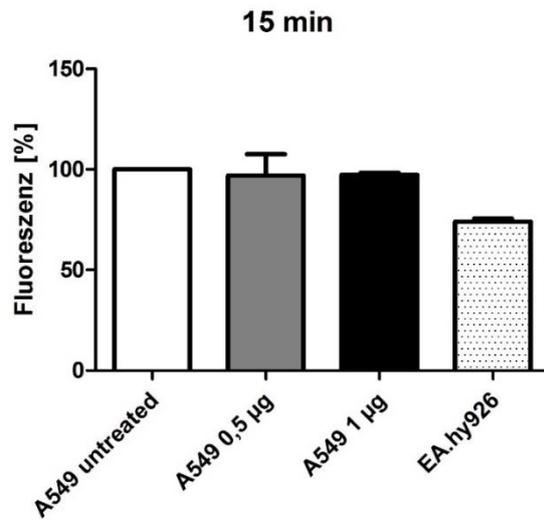


Abb. 21 Fluoreszenz nach 15 min, Versuch 1

Dargestellt ist die gemessene Fluoreszenz, gemessen zum Zeitpunkt 15 min, abhängig von der eingesetzten mRNA-Menge, bzw. der Zelllinie. Unbehandelte A549 Zellen sind auf 100 % gesetzt. Werte sind Mittelwerte (Balken) + mittlerer Fehler des Mittelwerts (Linie), n = 3.

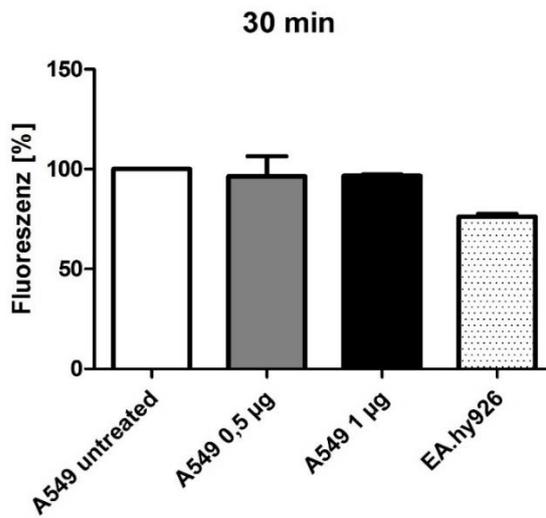


Abb. 22: Fluoreszenz nach 30 min, Versuch 1

Dargestellt ist die gemessene Fluoreszenz, gemessen zum Zeitpunkt 30 min, abhängig von der eingesetzten mRNA-Menge, bzw. der Zelllinie. Unbehandelte A549 Zellen sind auf 100 % gesetzt. Werte sind Mittelwerte (Balken) + mittlerer Fehler des Mittelwerts (Linie), n = 3.

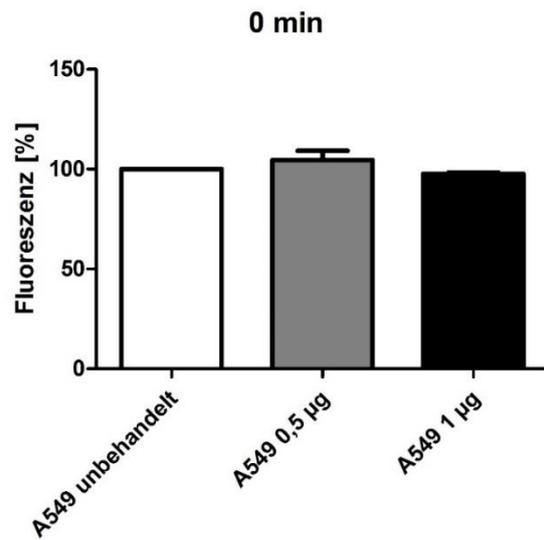


Abb. 23: Fluoreszenz nach 0 min, Versuch 2

Dargestellt ist die gemessene Fluoreszenz, gemessen zum Zeitpunkt 0 min, abhängig von der eingesetzten mRNA-Menge, bzw. der Zelllinie. Unbehandelte A549 Zellen sind auf 100 % gesetzt. Werte sind Mittelwerte (Balken) + mittlerer Fehler des Mittelwerts (Linie), n = 3.

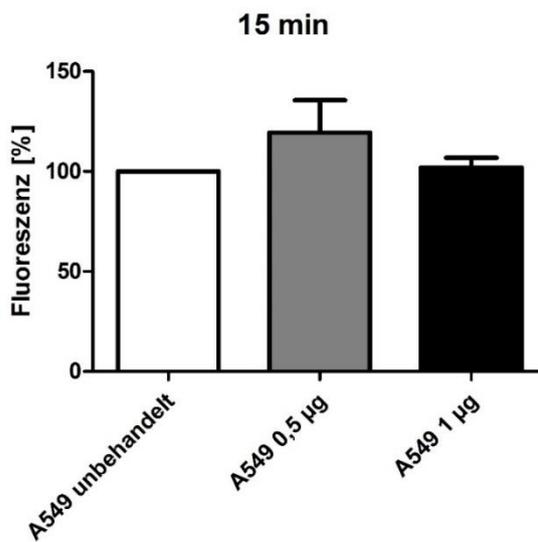


Abb. 24: Fluoreszenz nach 15 min, Versuch 2

Dargestellt ist die gemessene Fluoreszenz, gemessen zum Zeitpunkt 15 min, abhängig von der eingesetzten mRNA-Menge, bzw. der Zelllinie. Unbehandelte A549 Zellen sind auf 100 % gesetzt. Werte sind Mittelwerte (Balken) + mittlerer Fehler des Mittelwerts (Linie), n = 3.

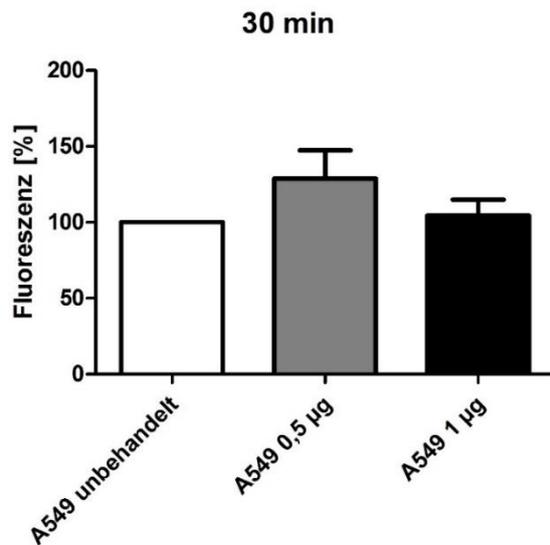


Abb. 25: Fluoreszenz nach 30 min, Versuch 2

Dargestellt ist die gemessene Fluoreszenz, gemessen zum Zeitpunkt 30 min, abhängig von der eingesetzten mRNA-Menge, bzw. der Zelllinie. Unbehandelte A549 Zellen sind auf 100 % gesetzt. Werte sind Mittelwerte (Balken) + mittlerer Fehler des Mittelwerts (Linie), n = 3.

In Abbildungen 20 - 25 sind die Fluoreszenzen der verschieden behandelten Zellen zu den Zeitpunkten 0 min, 15 min und 30 min dargestellt. Dabei wurden unbehandelte A549 Zellen auf 100 % Fluoreszenz gesetzt und Werte der transfizierten und EA.hy926 daran angeglichen. Zunächst fällt auf, dass die unbehandelten EA.hy926 Zellen vor allem nach 15 min und 30 min mit etwa 75 % eine erniedrigte Fluoreszenz im Vergleich zu unbehandelten A549 zeigen. Dies ist zwar kein signifikanter Unterschied, zeigt aber dennoch eine stärkere Hemmung der Metalloprotease an, welche durch die zelleigene Produktion von TIMP3 hervorgerufen wird. Diese Hemmung gibt Hinweise darauf, dass das Prinzip des Tests in der Durchführung funktioniert hat. Des Weiteren lassen sich

in den Abbildungen keine signifikanten Unterschiede in der Fluoreszenz der unbehandelten und transfizierten A549 Zellen erkennen. Stattdessen sind die Fluoreszenzen in Versuch 1 in etwa gleich und in Versuch 2 überwiegt die Fluoreszenz der mit 0,5 µg transfizierten Zellen. Dieses Ergebnis gibt Hinweise darauf, dass das von den Zellen produzierte und im ELISA nachgewiesene TIMP3 nicht funktional ist. Der Nachweis im ELISA bestätigt zwar das Vorhandensein und die Expression des TIMP3-Proteins, jedoch scheint dieses seine enzymatische metalloprotease-hemmende Wirkung verloren zu haben.

5 Diskussion

Eine in der Prävalenz weltweit führende Erkrankung ist die Arteriosklerose. Bei dieser degenerativen Erkrankung arterieller Gefäße, welche auf Grundlage einer endothelialen Dysfunktion entsteht, bilden sich Lipidablagerungen, die auf lange Sicht zu einer Verengung der Gefäße führen oder aufgrund der verletzten Gefäßintegrität eine Thrombenentstehung triggern können. Die klinisch am meisten relevante Unterform ist dabei die Atherosklerose, welche die Intima von mittelgroßen und großen und damit hämodynamisch bedeutenderen Arterien betrifft [1].

Eine etablierte therapeutische Intervention zur Entlastung der Stenose im Gefäß ist die Ballondilatation mit darauffolgender Implantation eines Stents [17]. Nachdem zunächst unbeschichtete Metallstents eingesetzt wurden [20], verwendet man heutzutage vor allem beschichtete, sogenannte drug-eluting Stents. Diese zeigen auf der einen Seite geringere Raten an In-Stent-Restenosen, also Verschlüssen auf Höhe der eingesetzten Stents durch Remodelling am Endothel, dennoch kommt es auf der anderen Seite zu einem vermehrten Auftreten von späten Stent-Thrombosen, welche sich ab dem 30. Tag nach Implantation unter anderem aufgrund von irritativen Effekten der beschichteten Immunsuppressiva am Endothel ausbilden [17, 24]. Das Einbringen eines Stents, also eines Fremdkörpers in das Gefäßsystem, führt zu einer Immunreaktion, die die Integration des Stents in die Arterienwand verlangsamt. Von den beeinträchtigten Endothelzellen werden Chemokine ausgeschüttet, dadurch werden Leukozyten rekrutiert, die sich am Endothel anheften. Des Weiteren lagern sich Thrombozyten an, wodurch es zu einer vermehrten Bildung und Ablagerung von Fibrin kommt. Die von den Entzündungszellen beeinflussten Zellen im Endothel bilden vermehrt Wachstumsfaktoren, in der Folge kommt es zu einer verstärkten Bildung von extrazellulärer Matrix. Die veränderte Zusammensetzung der Gefäßwand führt zu Veränderungen in ihrer Konsistenz und zur Erhöhung des Restenoserisikos nach Stentimplantation [77].

Um diese im Körper hervorgerufene Immunreaktion zu verringern, werden

verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen. In dieser Arbeit wird der mögliche Einsatz von zwei Enzymen getestet, welche die Immunreaktion inhibieren und die Gefäßintegrität erhöhen könnten. Dabei wird die Proteinsynthese durch Transfektion mit mRNA bewirkt, welche ohne in das Genom einzudringen frühzeitig die Produktion der Enzyme induziert. Durch Modifizierung der verwendeten Basen wurde die Stabilität der mRNA erhöht und gleichzeitig die Immunogenität vermindert [35]. Für die Transfektion, also dem Einbringen der mRNA in die Zielzellen, wurde in der Arbeit Lipofectamine verwendet. Der lipophile Carrier erlaubt ein Einschleusen von Substanzen über die Doppellipidschicht der Zellmembran mittels Endozytose. Dabei weist er gegenüber anderen Methoden Vorteile in der Transfektionseffizienz und Zellverträglichkeit auf [44, 45].

Die beiden erprobten Enzyme sind die endotheliale NO Synthase und der Matrixmetalloprotease Inhibitor TIMP3, beide antiinflammatorisch und protektiv am Gefäß wirkend. TIMP3 hemmt somit vom Endothel freigegebene Proteasen, welche im Zuge der Immunreaktion zum Umbau der Gefäßwand freigesetzt werden und den optimalen Einbau des Stents verhindern [50]. Außerdem wird über die Hemmung der Metalloprotease ADAM 17 die Rekrutierung von inflammatorischen Zellen und damit die Abstoßungsreaktion gegenüber dem Stent vermindert [59]. Die Wirkungen der eNOS werden über ihr Syntheseprodukt NO vermittelt, welches vor allem als potenter Vasodilatator die entzündungsbedingte Vasokonstriktion an Gefäßen entgegensteuert. Des Weiteren hemmt NO die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten, welche sich sonst zahlreich am Fremdkörper anlagern. Durch die Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B kommt es außerdem zu einer geringeren Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Endotheloberfläche und somit zu einer geringeren Rekrutierung von Leukozyten [2].

In dieser Arbeit wurde getestet, inwiefern sich durch mRNA Transfektion die Expression der Enzyme eNOS und TIMP3 beeinflussen lässt. Aus Plasmid DNA hergestellte mRNA wurde mittels Lipofectamine in immortalisierte Endothelzellen und Adenokarzinomzellen transfiziert. Dabei wurde die Enzymexpression anhand eines ELISA im Fall von TIMP3 und mithilfe der Durchflusszytometrie bei

der eNOS Induktion mittels mRNA nachgewiesen. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Verträglichkeit der transfizierten mRNA auf die Zellen wurde durch eine Viabilitätsbestimmung mithilfe eines MTT-Assay bestimmt. Nach erfolgreicher Expression von TIMP3 wurde zusätzlich ein funktioneller Test durchgeführt, welcher die Metalloprotease-hemmenden Eigenschaften über eine Veränderung der Fluoreszenz nachweisen sollte.

5.1 Herstellung der mRNA

Zur Herstellung der mRNA wurde zunächst sequenzspezifische Plasmid DNA erworben und per PCR amplifiziert. Im nächsten Schritt wurde diese unter Hilfe von *in-vitro* Transkription in mRNA umgeschrieben. Aufgrund ihrer besseren Verträglichkeit und geringeren Immunogenität wurde modifizierte mRNA verwendet, das heißt statt den Nukleosiden Cytidin und Uridin wurden 5'-Methylcytidin und Pseudouridin verwendet. Zur Erweiterung der experimentellen Möglichkeiten wurde mit 25 und 100 % modifizierter mRNA gearbeitet. Das amplifizierte DNA Produkt, sowie die transkribierte mRNA wurden photometrisch und mittels Agarosegelelektrophorese auf ihre Konzentration, Reinheit und korrekte Länge überprüft.

Die Herstellung der TIMP3 mRNA gestaltete sich ohne größere Probleme. Das PCR Produkt sowie die Produkte der *in-vitro* Transkription zeigten hohe Werte an mRNA Konzentration sowie die korrekte Länge bei Nachweis mit Agarosegelelektrophorese unabhängig ob 25 oder 100 % modifizierte mRNA hergestellt wurde. Lediglich das Auftreten einer blassen Bande des IVT Produktes der 25 % modifizierten mRNA in der Gelelektrophorese im Bereich der doppelten Länge der erwarteten Größe konnte als Unterschied zur Herstellung der 100 % modifizierten mRNA detektiert werden (Abb. 7). Diese Bande lässt auf eine Dimerbildung des mRNA Produktes zurückschließen, diese ist jedoch in solchen geringen Konzentrationen kein Hindernis für eine Versuchsfortsetzung. Die guten Resultate der mRNA Herstellung aus der im Plasmid kodierten DNA für TIMP3 lassen sich auf die relativ kurze Sequenz zurückverfolgen. Die kodierende Sequenz für das TIMP3 Gen hat eine Basenlänge von 893 bp und ist

damit stabiler als die DNA des eNOS Gens, dessen Länge 3815 bp beträgt.

Somit erwies sich die Herstellung der mRNA für eNOS als schwierig. Begonnen wurde mit den im Labor erarbeiteten optimierten Einstellungen am PCR-Cycler. Zunächst wurde die Annealing Temperatur variiert. Unter dem Annealing versteht man die Anlagerung der Primer, also der Startpunkte für die Vervielfältigung der DNA, an die zu vermehrenden DNA-Einzelstränge. Diese Temperatur ist für jeden Primer spezifisch und hängt vom Gehalt der Basen Guanin und Cytosin ab, je höher deren Anzahl ist, desto höher ist auch die optimale Annealing Temperatur [50]. Für die im Labor verwendeten Primer wurde 55 °C als günstigste Temperatur bestimmt. Diese errechnete Annealing Temperatur ist jedoch nicht immer genau und gerade bei längeren DNA Edukten kann diese optimale Temperatur etwas höher liegen. Dabei wird durch die Erhöhung der Annealing Temperatur das Auftreten von unspezifischen Amplifikaten, welche zum Beispiel eine andere Länge als die Zielsequenz haben, unwahrscheinlicher gemacht [78].

Außerdem wurden die Einstellungen der Elongation variiert. Während diesem Schritt synthetisiert die DNA-Polymerase anhand der Matrizen-DNA mithilfe der zugegebenen Nukleosidtriphosphate die vermehrten DNA-Doppelstränge [50]. Nach Herstellerangaben von Quiagen® wurde die Temperatur von 72 auf 68 °C für DNA Transkripte länger als 2000 bp gesenkt. Zudem wurde unter Verwendung einer Zeit von 4 Minuten Elongation pro Zyklus statt normalerweise 1 Minute das beste Ergebnis erzielt, womöglich aufgrund des höheren Zeitbedarfs der DNA-Polymerase zur Vermehrung des längeren DNA-Transkripts [79].

Mit den durch die Optimierung der PCR erlangten und in Tabelle 12 angegebenen Einstellungen konnte nach einer großen Anzahl von Optimierungsschritten aus dem eNOS Plasmid eine nachweisbare DNA mit einer Länge von etwa 4000 bp amplifiziert werden. Eine photometrische Konzentrationsmessung ergab einen Wert von etwa 158 µg / ml. Die Bande im Agarosegel bei 4000 bp erschien zwar etwas breit (Abb. 5), dies lässt sich jedoch auch auf eine unsaubere Probenauftragung auf das Agarosegel erklären.

Die hergestellte eNOS DNA wurde nun als Template für die *in vitro* Transkription verwendet. Diese ergab eine gute mRNA Konzentration von 1316,4 µg / ml und

eine deutliche Bande bei 4000 bp im Agarosegel. Im Vergleich dazu wies die 100 % modifizierte mRNA von TIMP3 eine Konzentration von etwa 1617 µg / ml auf, die 25 % modifizierte mRNA zeigte eine Konzentration von 1258 µg / ml. Folglich konnte mithilfe der Optimierungsschritte eine mRNA mit der richtigen Länge der eNOS mRNA und einer hohen Konzentration und Reinheit der Nukleinsäure generiert werden.

5.2 Verträglichkeit der Transfektion

Um zu überprüfen, inwiefern die transfizierte mRNA toxische Effekte auf die Zielzellen ausübt, wurden verschiedene Mengen an mRNA eingesetzt. Hierfür wurden Transfektionsansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen an modifizierter mRNA hergestellt und die beiden Zelllinien mit diesen inkubiert. Einen Tag nach der Transfektion wurde den separat hergestellten Ansätzen der Farbstoff (MTT) zugeführt, nach 4 Stunden Inkubation die Lyse der Zellen herbeigeführt und die Absorption des umgesetzten Farbstoffs gemessen um Rückschlüsse auf die Viabilität der Zellen zu erhalten.

Da durch Transfektion keine signifikante Erhöhung der Expression des eNOS Enzyms erzielt werden konnte, wurden hier die Viabilitätsversuche nicht durchgeführt und im Folgenden werden ausschließlich die Ergebnisse nach TIMP3 mRNA Transfektion diskutiert.

Zunächst konnte festgestellt werden, dass höhere Konzentrationen an mRNA im Transfektionsansatz zu einer geringeren Zellviabilität führen. Als kritische Grenze der Verträglichkeit des Genkonstruktes wurde die Marke 70 % überlebende Zellen der Ausgangszellzahl als nicht toxisch festgelegt (gemäß EN ISO 10993-5:2009, Prüfungen auf *in-vitro* Zytotoxizität). Diese Grenze wurde bei der eingesetzten Menge von 0,25 µg mRNA immer eingehalten, außerdem für die eingesetzte Menge von 0,5 µg 100 % modifizierter mRNA. Wird die Menge der mRNA auf 1 µg erhöht, wird die Grenzmarke von 70 % für beide Modifikationen der mRNA unterschritten.

Des Weiteren scheint die 25 % modifizierte mRNA mehr zytotoxische Effekte zu haben als die 100 % modifizierte mRNA. Schon bei einer eingesetzten Menge von 0,5 µg wird hier die kritische Grenze unterschritten.

Synthetische, aber auch von Mikroorganismen freigegebene RNA aktiviert das Immunsystem über Stimulation von Toll-like Rezeptoren [80]. Diese Rezeptoren sind Bestandteil der angeborenen Immunabwehr und werden somit sofort nach Fremdkörperkontakt aktiv. Dabei erkennen die Rezeptoren bestimmte „pathogen associated molecular patterns“, charakteristische Merkmale wie zum Beispiel spezifische Nukleotidsequenzen von Mikroorganismen. Die Aktivierung der Rezeptoren führt zur Freisetzung von Zytokinen wie Interferon α oder TNF- α und der Stimulation von Lymphozyten, also Zellen des erworbenen Immunsystems [81, 82]. Aktuell sind drei Toll-like Rezeptoren bekannt, welche therapeutische mRNA erkennen und eine Aktivierung des Immunsystems stimulieren. Die beiden TLR 7 und 8 binden einzelsträngige RNA, zu deren Klasse auch die mRNA gehört [83]. Des Weiteren erkennt und bindet der TLR 3 einzelsträngige mRNA [84], obwohl dieser vor allem für seine Affinität für doppelsträngige RNA Moleküle, welche überwiegend bei der Replikation von Viren freigegeben werden, bekannt ist [85].

Forschungen an mRNA als mögliches Werkzeug zur Gentherapie zeigen, dass modifizierte Nukleoside das Immunsystem weniger stimulieren als die physiologisch in der mRNA am häufigsten vorkommenden Nukleoside Adenosin, Guanosin, Uridin und Cytidin. Erprobte modifizierte Nukleoside, welche eine geringere Immunogenität der mRNA bewirken, sind 6'-Methyladenosin, Pseudouridin, 5'-Methyluridin, 2'-Hydroxy-Methyluridin und 5'-Methylcytidin [86]. Kormann und Kollegen konnten hingegen nachweisen, dass 25 % modifizierte mRNA eine geringere Immunogenität aufweist. Dies ist durch die geringere Bindung der modifizierten mRNA an die TLR 3, 7 und 8 bedingt, wodurch das Immunsystem eine schwächere Aktivierung erfährt [37]. Diese Ergebnisse lassen sich durch diese Arbeit nicht bestätigen, stattdessen weisen die Resultate auf eine höhere Immunogenität und somit eine vermehrte Toxizität für die transfizierten Zellen der 25 % modifizierten mRNA hin. Jedoch waren die Modifikationen unterschiedlich gewählt, Kormann und Kollegen ersetzten Uridin und Cytidin mit 2'-Thiouridin und 5'-Methylcytidin, in dieser Arbeit wurde mit Pseudouridin und 5'-Methylcytidin ersetzt.

Um der Toxizität der mRNA, bedingt durch die Immunsystem aktivierenden Eigenschaften der Nucleinsäuren, entgegenzuwirken, wurden in den letzten Jahren viele Studien zur Verbesserung der Verträglichkeit dieser durchgeführt. Dabei wurde nachgewiesen, dass der Einsatz von N(1)-Methylpseudouridin anstelle von unmethyliertem Pseudouridin zu einer besseren Verträglichkeit der modifizierten mRNA führt. Dieses Ergebnis ließ sich besonders auf die geringere Aktivierung des Toll-like Rezeptors 3 zurückführen [36]. Dagegen führt der Einbau des seltenen Nucleosid Inosin zu einer verstärkten Erkennung der modifizierten mRNA durch die TLR 7 und 8. Das Nucleosid Inosin entsteht aus dem in der RNA häufig vorkommenden Nucleosid Adenosin im Zuge des RNA-Editing. Dieses geschieht zum Beispiel während der viralen Replikation, die Toll-like Rezeptoren können somit bestimmte virale Prozesse erkennen und die Immunabwehr in Gang setzen [87].

Ein weiterer Abwehrmechanismus gegen fremde RNA geschieht durch die Interferon-anhängige Stimulation von 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase. Diese aktiviert die RNase L, welche einzelsträngige RNA in Bereichen mit der Basenfolge Uracil-Uracil oder Uracil-Adenin vorwiegend spaltet. Den Forschern fiel auf, dass nach Ersetzen des Nucleosids Uridin durch Pseudouridin dieses Abwehrsystem der angeborenen Immunantwort weniger aktiv wird [88].

Die Wahl zur Verwendung der modifizierten Nucleoside Pseudouridin und 5-Methylcytidin fiel aufgrund der Etablierung dieser Methode durch andere Forschungsgruppen [89, 90]. Warren und Kollegen wiesen ebenso nach, dass die Kombination der beiden Modifikationen bessere Ergebnisse erzielt als die singuläre Verwendung der beiden modifizierten Nucleoside [40].

5.3 Transfektionserfolge für TIMP3 und eNOS

Nach Herstellung der modifizierten mRNA für die beiden Enzyme TIMP3 und eNOS wurden diese in die Zielzellen transfiziert. Hierfür wurden Ansätze mit verschiedenen Konzentrationen an mRNA und Transfektionsmittel hergestellt, um die Auswirkung verschiedener Konzentrationen auf die Expression

darzustellen. Des Weiteren wurde wie bereits erwähnt für TIMP3 25 % und 100 % modifizierte mRNA durch IVT hergestellt.

Der Transfektionserfolg für TIMP3 wurde über einen ELISA kontrolliert. Die am Ende des ELISA stattfindende Farbreaktion quantifiziert die Mengen an exprimierten Enzym, in diesem Fall an TIMP3. Dabei wurden Zellüberstände nach 24 h und 48 h auf im Überstand enthaltenes TIMP3 überprüft.

In den Grafiken der Ergebnisse (Abb. 13) fällt auf, dass der größte Transfektionserfolg mit 100 % modifizierter mRNA in transfizierten A549 Zellen zu erzielen war. Die unbehandelte Kontrolle ergab, dass diese Zellen im physiologischen Ausgangszustand kein TIMP3 exprimieren. Die Transfektion von 1,0 µg mRNA erzeugte eine signifikante Expressionssteigerung im Vergleich zu unbehandelten und mit 0,25 µg mRNA transfizierten Zellen.

Nach der Transfektion der EA.hy926 Zellen, welche bestimmte Mengen an TIMP3 auch schon physiologisch exprimieren, gibt es die maximale Expression bei Verwendung von 0,5 µg 100 % modifizierter mRNA. Eine Steigerung der eingesetzten Menge mRNA scheint eventuell aufgrund von zytotoxischen Effekten keinen weiteren Expressionsanstieg hervorzurufen. Dennoch ist die TIMP3 Expression höher als im unbehandelten Ausgangszustand, nach Transfektion mit 0,5 µg mRNA sogar mehr als doppelt so hoch.

In allen Fällen nach Transfektion mit 100 % modifizierter mRNA ist die Expression nach 24 h höher als nach 48 h (Abb. 13 und 14). Dies spricht für das schnelle Ablesen der mRNA an Ribosomen im Zytoplasma, ohne dass diese in das zelleigene Genom eingebaut werden muss.

Im Gegensatz dazu kommt es nach Transfektion mit 25 % modifizierter mRNA zu einem geringeren Anstieg der Expression. Diese ist im Fall der A549 Zellen etwa um einen Faktor 100 geringer als die Expression nach Transfektion mit 100 % modifizierter mRNA. Des Weiteren fallen keine signifikanten Unterschiede abhängig von der eingesetzten Menge der mRNA auf. Nach Transfektion der EA.hy926 Zelllinie zeigt die Expression keine Unterschiede zum unbehandelten Zustand und scheint sogar nach Transfektion von 1,0 µg mRNA im Ausgangszustand zu bleiben.

Die aus dem ELISA ablesbaren Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der Zellviabilität überein, in denen die 25 % modifizierte mRNA ebenfalls vermehrt zytotoxische Eigenschaften vorzuweisen scheint. Wohl durch diese geringere Verträglichkeit, aber eventuell auch niedrigere Verwendung in den Zellen als Transkript, ist die Transfektionseffizienz deutlich niedriger als die der 100 % modifizierten mRNA.

5.3.1 Vergleich mit anderen Studien

Das Potential der mRNA als Werkzeug in der Gentherapie ist in den letzten Jahren immer deutlicher geworden. Viele Studien untersuchten dabei vor allem die Unterschiede in der Verwendung von DNA und RNA als Gen-Träger. Ein grundlegender Vorteil in der Anwendung von mRNA liegt in der Aussparung der Veränderung am Genom. Zellen, welche mit mRNA transfiziert wurden, behalten diese im Zytosol, denn dort kommt es direkt zu einer Ablesung durch die dort ansässigen Ribosomen. Danach kann das fertige Enzym sofort an seinen Wirkungsort, zum Beispiel im Extrazellulärraum oder der Zellmembran, gebracht werden und seine Wirkung entfalten [33]. Dagegen kommt es nach Transfektion von DNA zu einem Einbau dieser in das Genom und dadurch zu irreversiblen Veränderungen. McCormack und Kollegen konnten demnach zeigen, dass nach Transfektion des Interleukin 2 Rezeptor Gens mithilfe von viralen Vektoren Leukämien induziert wurden. Dies geschah durch die Integration des Retrovirus in ein Onkogen mit darauffolgender Aktivierung [91]. In der Gentherapie bereits verwendete Adeno-assoziierte Viren können ebenfalls als virale Vektoren zur Transfektion von pDNA verwendet werden. Bei Mäusen konnte jedoch nach Transfektion des β -Glucuronidase Gens mittels dieser Vektoren eine erhöhte Inzidenz an hepatozellulärem Karzinom nachgewiesen werden [92]. Zudem muss die DNA, um als Schablone zur Proteinsynthese genutzt werden zu können, in das zelleigene Genom eingebaut werden. Damit dies geschehen kann, muss die DNA die Kernmembran passieren, um das Zellgenom zu erreichen. Diese Passage ist jedoch nur bei Zellteilung möglich, da die Kernhülle hierbei durchlässig wird. In sich wenig oder nicht teilenden Zellen ergibt sich somit ein Hindernis für die Gentherapie mit pDNA. Im Zytoplasma lokalisierte Nukleasen

degradieren die eingebrachte DNA, falls diese nicht in den Zellkern übertreten kann [93].

Der Vergleich der Transfektion von mRNA und pDNA, sowie die Optimierung der mRNA Transfektion wurden von Rejman und Kollegen untersucht [45]. Zunächst wurden verschiedene Transfektionsmethoden für die mRNA Einbringung in die Zellen getestet. Hierbei konnte der kationische Liposomen-Carrier Lipofectamine die längste Expression des verwendeten lumineszenten Proteins Luciferase von 8 Tagen hervorrufen. Im Gegensatz dazu kam es nach einer Transfektion mithilfe von DOTAP/DOPE, welches die Grundlage von Lipofectamine bildet, nur zu einer Expression innerhalb der ersten beiden Tage. In beiden Fällen ist die Expression in den ersten 24 Stunden am höchsten, vergleichbar mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit. Einbringen der Nukleinsäuren in Zellen mittels Elektroporation konnte eine nachweisbare Expression sogar nur in den ersten 12 Stunden induzieren. Mit Lipofectamine transfizierte pDNA, kodierend für Luciferase, bewirkte sogar eine Expression bis einschließlich Tag 17. Außerdem wurde die Transfektionseffizienz, definiert als die Anzahl der Luciferase exprimierenden Zellen, bestimmt. 80 % der Zellen, welche mit einem Ansatz aus mRNA und Lipofectamine transfiziert wurden, produzierten später das fertige Enzym, bei Verwendung von DOTAP/DOPE waren es sogar knapp über 90 %. Im Vergleich dazu wurde die niedrigste Transfektionseffizienz für pDNA mit dem Transfektionsmittel Lipofectamine erreicht, diese lag mit 40 % weit unter der Effizienz der mRNA Transfektion. Diese niedrige Effizienz wird wohl durch die Notwendigkeit der Einbringung der DNA in das Genom bedingt, sich nicht teilende Zellen konnten die DNA nicht integrieren und das Enzym somit auch nicht exprimieren. Zuletzt wies die Forschungsgruppe nach, dass schon 30 Minuten nach mRNA Transfektion das Luciferase Enzym von den Zellen in nachweisbaren Mengen exprimiert wird [45].

Die Modifikation an der mRNA verbessert nicht nur die Verträglichkeit, sondern auch die Raten der Expression. Es wurde gezeigt, dass *in vitro* transkribierte unmodifizierte mRNA die Translation des eigenen Transkripts und zellulärer mRNA inhibiert. Dies lässt sich durch eine Aktivierung der Protein Kinase R (PKR) erklären, welche den eukaryotischen Translations-Initiationsfaktor 2 α

phosphoryliert, wodurch die Translation gehemmt wird. Nach Austausch des Nukleosid Uridin gegen Pseudouridin kommt es zu einer geringeren Aktivierung der PKR und die Proteinexpression ist verstärkt nachweisbar [94]. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die schlechtere Verträglichkeit und geringere Transfektionseffizienz nach Transfektion von 25 % modifizierter mRNA, da in dieser der Gehalt an der modifizierten Base Pseudouridin niedriger ist als jener der 100 % modifizierten mRNA. Ebenfalls begründen diese Ergebnisse die Beobachtung meiner Versuche, dass transfizierte EA.hy926 Zellen weniger Protein herstellen, da diese TIMP3 schon im unbehandelten Zustand produzieren und daher diese eigenständige Produktion von der transfizierten mRNA gehemmt wird.

Keine Übereinstimmung findet sich erneut mit den Ergebnissen von Kormann und Kollegen, welche neben einer besseren Verträglichkeit auch einer erhöhte Expression nach Transfektion mit 25 % modifizierter mRNA nachweisen konnten [37]. Jedoch könnte dies auf die unterschiedliche Modifikation des Nukleosid Uridin zurückführbar sein.

5.3.2 Therapeutischer Einsatz von Transfektion mit mRNA

Die Anwendung von mRNA als verbesserte Alternative zu transfizierter DNA hat in den letzten Jahren zugenommen. Somit konnte durch mRNA Transfektion, durchgeführt mithilfe von Elektroporation, das Homing, also die Rückkehr von Immunzellen in Immungewebe wie Lymphknoten oder Milz, von Natürlichen Killerzellen (NK) verbessert werden. Hierfür wurde die mRNA für den Chemokinrezeptor CCR7 transfiziert, welcher im Nachhinein an der Zelloberfläche der Natürlichen Killerzellen nachgewiesen werden konnte. Mithilfe dieses Rezeptors können die NK über diverse Liganden in Lymphknoten oder das Knochenmark geleitet werden, wodurch maligne Tumore wie Leukämien gezielt einer Therapie unterzogen werden können. Durch die Modifizierung der Chemokinrezeptoren erhofft man sich Herstellung von Immunzellen, welche individuell Tumore bekämpfen können [95].

Nach Transfektion modifizierter mRNA in kardiale Fibroblasten konnten diese in Kardiomyozyten-ähnliche Zellen umgewandelt werden. Dieses Verfahren könnte

sich nach einem Herzinfarkt anbieten, um aus dem infarzierten Gewebe erneut funktionierende Herzzellen zu gewinnen. Die in der Arbeit transfizierten Transkriptionsfaktoren führten nach 14 Tagen zu einer erhöhten Expression von Markergenen aus Kardiomyozyten. Die Transfektionseffizienz, sowie die Verträglichkeit des Transfektionsansatzes, wurden durch den Zusatz eines „Heart-Targeting“ Peptides erhöht, welches aufgrund seiner positiven Ladung die Endozytose der negativ geladenen mRNA verbessert [96].

Ein weiterer Ansatz der mRNA Transfektion versuchte dessen Anwendung zur Einbringung von im Menschen physiologisch nicht vorkommenden Photolyasen. Diese DNA-Reparaturenzyme reparieren lichtabhängig durch Ultraviolettstrahlung B ausgelöste DNA Schäden, sogenannte Cyclobutan Pyrimidin Dimere (CPD). Bei Akkumulation dieser defekten DNA werden Entzündung, vorzeitige Alterung und Hautkrebs getriggert. Hierfür wurden Keratinozyten unter Hilfe von Lipofectamine gesteuerter Transfektion durch mit Pseudouridin modifizierter mRNA zur Synthese der Photolyasen angeregt, dabei produzierten circa 95 % der transfizierten Zellen das fertige Protein. Schon nach einer Stunde konnte nachgewiesen werden, dass 60 % der Cyclobutan Pyrimidin Dimere repariert waren. Des Weiteren wurden die durch die Ultraviolettstrahlung B in Gang gesetzten Effekte des Interleukin-6 Anstiegs und des induzierten Zellzyklusarrests durch die Photolyase Transfektion gehemmt [97].

5.3.3 Mögliche Gründe für die nicht erfolgreiche Transfektion von eNOS

Die Versuche, Zellen mit eNOS zu transfizieren, waren nicht erfolgreich. Für die Transfektion von eNOS wurden höhere Konzentrationen an mRNA verwendet, da das Transkript aufgrund seiner größeren Länge auch ein höheres Molekulargewicht besitzt. Da in den Versuchen mit TIMP3 zytotoxische Effekte der 25 % modifizierten mRNA nachgewiesen wurden, wurde für die Transfektion nur mit 100 % modifizierter mRNA gearbeitet. Des Weiteren wurden nur A549 Zellen transfiziert, da die EA.hy926 Zelllinie auch schon im unbehandelten Zustand eNOS exprimiert. Der Nachweis des exprimierten Enzyms auf der Zelloberfläche erfolgte über Fluoreszenz-markierte Antikörper gegen eNOS mittels Durchflusszytometrie.

Die schon in der Herstellung sich als schwierig erweisende mRNA des eNOS Proteins induzierte nach Transfektion keinen signifikanten Anstieg der Expression des Enzyms. Zwar führte der Einsatz von 2,5 µg mRNA zu einem Anteil von 5 % exprimierende Zellen (höchster gemessener Wert 11 %), ein Transfektionserfolg wurde jedoch auf einen Mindestwert von 70 oder 80 % exprimierende Zellen festgelegt. Möglich sind Fehler auf Ebenen der PCR und IVT, die zu einer mangelhaften mRNA Herstellung führten. Diese These wird durch die schwierige und zeitaufwändige Optimierung der PCR gestützt, welche vielfach keine oder sehr schwach konzentrierte DNA hervorbrachte. Die am Ende verwendete DNA könnte demnach Nebenprodukte enthalten, welche ebenfalls eine Länge von etwa 4000 bp besitzen und dadurch zur Herstellung einer ebenso langen mRNA durch die IVT führen. Dass das Verfahren allgemein funktioniert hat, zeigen die leichten Anstiege der eNOS Proteinproduktion im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Ebenso scheint die Methode der Lipofektion gut zu funktionieren, wie es die Ergebnisse von TIMP3 belegen. Dennoch sollten auch andere Transfektionsmethoden wie die Elektroporation in Betracht gezogen werden.

In der Fachliteratur und in Publikationen ließen sich keine Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zur Transfektion von eNOS mRNA finden. Dagegen gibt es Resultate zur Transfektion von eNOS Plasmid DNA zur Induktion der von NO getriggerten Effekte. Somit wurde nachgewiesen, dass mit eNOS pDNA beschichtete Stents, *in vitro* implantiert in eine Iliakalarterie, zu einer erhöhten NO Produktion der den Stent umgebenden Zellen führen. Dieser Effekt konnte bis zum fünften Tag nach Implantation beobachtet werden. Des Weiteren zeigte sich im Vergleich zu einer Kontrolle eine verbesserte Re-Endothelialisierung im Bereich des mit eNOS pDNA beschichteten Stents [98].

Eine weitere Studie untersuchte im Tierversuch eine Liposomen-vermittelte Transfektion von pDNA des Enzyms induzierbare NO Synthase in Zellen von Koronar- und Femoralarterien. Auch hier konnte eine gesteigerte Expression des Enzyms iNOS nachgewiesen werden, außerdem war die Rate an neointimalen Läsionen, welche nach Stentimplantation die Entstehung von In-Stent-

Restenosen auslösen, vermindert [99].

Nachdem die Herstellung der TIMP3 mRNA sowie dessen Expression nach Transfektion zu guten Ergebnissen führte, konnte mit dem eNOS Protein nicht dasselbe erlangt werden. Zurückführen lässt sich das - wie schon oben beschrieben - eventuell auf die Länge des eNOS Transkripts, doch auch nach Optimierung der Zyklen der PCR auf das längere Ausgangsprodukt konnten nach Transfektion keine signifikant erhöhte Expression der Zielzellen festgestellt werden. Um in Zukunft ebenfalls mit mRNA als mögliches Beschichtungsmittel von Stents arbeiten zu können, sind demnach weitere Verbesserungen der PCR und *in vitro* Transkription erforderlich. Zum Beispiel könnte man alternative Transfektions-Verfahren wie die Elektroporation anwenden, welche ebenfalls gute Transfektionsraten zwischen 75 und 90 % und Zellviabilitäten zwischen 60 und 95 % beschreibt [100, 101]. Auf der anderen Seite könnte man versuchen mit wiederholten Transfektionen die Expressionsraten des fertigen Enzyms zu erhöhen, wie dies auch schon von anderen Arbeitsgruppen untersucht wurde [37].

5.4 Funktionalitätsprüfung des exprimierten Enzyms TIMP3

Nachdem die Transfektion beider Zelllinien mit 100 % modifizierter mRNA hohe Expressionsraten von TIMP3 induzierte, stellte sich die Frage, ob das Protein auch matrixmetalloprotease-hemmende Eigenschaften aufweist. In dem verwendeten SensoLyte Assay führt die Aktivität der Matrixmetalloprotease 1 (MMP-1) durch Peptidspaltung zu einer Erhöhung der Fluoreszenz. Dem Assay wurden die Überstände, in welchen zuvor hohe Konzentrationen an TIMP3 nachgewiesen wurden, hinzugefügt, mit der Erwartung, dass es zu keiner Erhöhung der Fluoreszenz kommt. Es wurden die eingefrorenen Überstände der A549 Zelllinie verwendet, welche im unbehandelten Zustand kein TIMP3 exprimieren und nach Transfektion die höchsten Expressionsraten an TIMP3 aufwiesen. Als Kontrolle dienten unbehandelte A549 Zellen. In einem der beiden Assays, welche jeweils dreimal durchgeführt wurden, dienten ebenfalls unbehandelte EA.hy926 Zellen als Kontrolle, welche TIMP3 schon im

untransfizierten Zustand exprimieren.

Aus den Ergebnissen lässt sich ablesen, dass das im Überstand per ELISA nachgewiesene TIMP3 die MMP-1 aus dem Assay nicht hemmen konnte (Abb. 20 - 25). Die Raten an Fluoreszenz zeigen im Vergleich zur Kontrolle der unbehandelten A549 keine deutlichen Unterschiede. Dennoch senken Überstände unbehandelter EA.hy926 die Fluoreszenz auf Raten von etwa 75 % im Vergleich zum ungehemmten Zustand. Diese Minderung der Fluoreszenz gibt Hinweise darauf, dass der Test im Prinzip funktioniert hat; von den EA.hy926 physiologisch exprimierte Matrixmetalloprotease Inhibitoren hemmen die MMP-1 und vermindern dadurch die Fluoreszenzerhöhung. Auch andere Arbeitsgruppen, welche mit dem Assay arbeiteten, konnten dessen Funktionalität bestätigen [102, 103]. In dieser Arbeit zeigte jedoch die Positivkontrolle, welche die Funktionalität des Tests überprüft und nur aus MMP-1, Substrat mit dem spaltbaren Peptid und Reaktionspuffer besteht, zwar erhöhte Werte gegenüber der Substratkontrolle, jedoch niedrigere Werte als die mit den TIMP3 Überständen behandelten Proben (Tabelle 11). Bei einem funktionalen TIMP3-Enzym hätte man hier niedrigere Fluoreszenzen gegenüber der Positivkontrolle erwartet. Des Weiteren waren die Messwerte der Positivkontrolle zwar höher, aber nicht deutlich als die der Substratkontrolle, einem Gemisch aus Reaktionspuffer und Peptid, welches aufgrund der fehlenden Spaltung des Peptids eine niedrige Fluoreszenz anzeigen sollte. Außerdem wurde eine „vehicle control“ angesetzt, welche die Eigenfluoreszenz des verwendeten Zellmediums misst. Die Messwerte ergaben hohe Fluoreszenzmesswerte, sogar höhere Werte als die der Positivkontrolle. Dies spricht für eine hohe Eigenfluoreszenz des verwendeten Zellmediums DMEM, welches nicht mit dem Farbstoff und pH Indikator Phenolrot angesetzt wurde, um die Eigenfluoreszenz zu senken. Alternativ könnte man speziell hergestellte Medien, welche eine Eigenfluoreszenz von 10 % im Vergleich zum DMEM ohne Phenolrot besitzen, verwenden [104]. Dies kann jedoch nicht als einzige Erklärung der Testergebnisse angesehen werden, da ebenfalls mit DMEM behandelte untransfizierete EA.hy926 Zellen, welche niedrigere TIMP3 Konzentrationen als transfizierete A549 Zellen im Überstand aufweisen, die Fluoreszenz geringer hielten.

Jedoch scheint die TIMP3, welche in hohen Konzentrationen in den Überständen gemessen wurde, keine oder stark verminderte funktionelle Eigenschaften zu besitzen. Zum einen stellt sich die Frage, ob TIMP3 ein potentieller Inhibitor der MMP-1 ist. In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass TIMP3 neben allen bekannten MMP auch andere ADAM-Metalloproteasen wirkungsvoll hemmt [57]. Außerdem könnte die TIMP3 in zu geringen Konzentrationen exprimiert worden sein. Nach Transfektion mit 1 µg 100 % modifizierter mRNA wurden etwa 100.000 pg / ml TIMP3 Protein im Überstand nachgewiesen. Für den Assay wurden 25 µl Überstand pro Well verwendet, also 2,5 ng für jede Probe. Für den zweiten Assay wurden die Überstände sogar noch auf das 31 Fache aufkonzentriert, somit ergab sich eine Menge von etwa 75 ng. In der Betriebsanleitung des Assays wird für die Erprobung der MMP-Aktivität, der Hauptanwendung des Tests, eine Menge von 30 ng pro Well angegeben [76]. Mit dieser relativ hohen Menge und Konzentration von 3 ng / µl sollte sich genug TIMP3 für ein positives Ergebnis des SensoLyte Assay befinden.

Auf der anderen Seite wäre es denkbar, dass das sezernierte TIMP3 Enzym nicht funktionsfähig ist. Die funktionelle Komponente der TIMP3 sitzt am aminoterminalen Ende, die im ELISA hinzugegebenen Antikörper könnten somit an Epitope gebunden haben, welche wenig oder keinen Einfluss auf die Funktion des Enzyms haben [52]. Aus den Angaben des Herstellers der beiden Antikörper des ELISA lassen sich die Epitope leider nicht herausfinden. Ebenfalls wäre ein teilweiser Abbau durch proteolytische Enzyme möglich. TIMP werden demnach zum Beispiel durch Neutrophile Elastasen abgebaut [105]. Eine Degradation durch andere Enzyme ist jedoch fast auszuschließen, da die Überstände zwischen den Versuchen bei – 20 °C eingefroren wurden und unter diesen Bedingungen fast jegliche enzymatische Aktivität eingestellt ist.

In Betracht zu ziehen sind Fehler in der Versuchsdurchführung oder hygienische Mängel während dieser. Durch Wiederholung des Versuches und Arbeit nach Protokoll des Herstellers wurde das Auftreten von Fehlern versucht zu minimieren.

5.5 Fazit und Ausblick

Die Transfektion der 100 % modifizierten mRNA, kodierend für TIMP3, führte zu einer signifikanten Erhöhung der Expression, auch noch nach 48 Stunden. Dabei sank die Zellviabilität nur geringfügig. Versuche mit 25 % modifizierter mRNA führten zu der Erkenntnis, dass diese ein höheres Potential zur Zelltoxizität besitzt. Des Weiteren konnten nur geringere Expressionen als nach Transfektion mit 100 % modifizierten mRNA erzielt werden. Die Funktionalität des exprimierten TIMP3 Enzyms konnte dagegen nicht bewiesen werden, hier sollten weitere Nachforschungen, zum Beispiel mit einem neuen Versuchskonzept, stattfinden. Die parallel durchgeführten Experimente mit dem Protein eNOS konnten leider nicht die guten Ergebnisse wie TIMP3 präsentieren. Hier gilt es, die Transfektion weiter zu verbessern und vor allem auf dem Gebiet der Herstellung langer mRNA Produkte weiter nach Optimierungen zu suchen.

Diese Ergebnisse bilden die Grundlage für die Beschichtung von in Gefäßsysteme eingebrachte Stents mit mRNA. Damit ließen sich die Vorteile der mRNA, Schonung des Genoms, schnelle und transiente Expression mit dem etablierten Verfahren der Stentangioplastie kombinieren. Durch die Beschichtung mit der mRNA, kodierend für im Körper physiologisch vorkommende Enzyme, könnten Alternativen zu dem aktuell bewährten Zytostatikum Paclitaxel und dem Immunsuppressivum Sirolimus geschaffen werden. Die Enzyme eNOS und TIMP3 wirken zudem den Effekten der beschichteten Stents, welche eine späte Stent-Thrombose, die Hauptkomplikation der aktuellen beschichteten Stents, auslösen, durch ihre Eigenschaften als antiinflammatorisch wirkende Substanzen entgegen. Das von eNOS gebildete NO hemmt außerdem direkt die Thrombozytenaktivierung und – aggregation, demnach könnte die medikamentöse Antikoagulation nach Stenteingriff verringert werden.

Bis zur Verwendung als neue Beschichtungsvariante müssen jedoch noch weitere Versuche durchgeführt werden. Wie erwähnt, sind eine Verbesserung der Herstellung der mRNA und eine andere Funktionalitätsbestimmung von TIMP3 anzustreben. Außerdem würden spezielle Stent-Plattformen, welche die mRNA über einen längeren Zeitraum langsam freigeben können, die therapeutische Wirksamkeit der Stents verlängern und damit verbessern. Zuletzt müssten die

beschichteten Stents im Tierversuch erprobt werden, um deren Sicherheit und Nutzen unter physiologischen Bedingungen zu belegen.

Zusammenfassung

Die akuten und chronischen Folgen der koronaren Herzerkrankung (KHK) sind in den westlichen Industrienationen die häufigste Todesursache im Erwachsenenalter. Die degenerativen Veränderungen der Herzkranzgefäße führen akut vor allem zum Myokardinfarkt und chronisch zu einer eingeschränkten Herzfunktion, einhergehend mit Herzinsuffizienz. In 95 % entsteht die KHK auf Basis von atherosklerotischen Läsionen im Bereich der Gefäßwände, welche durch Lipidablagerungen in der Intima und dadurch Stenosierung der Gefäßabschnitte charakterisiert sind. Neben einer Lebensstilumstellung und langfristigen Medikamenteneinnahme bieten sich therapeutisch aufwendige Bypassoperationen oder das Einsetzen eines Stents in den verengten Gefäßabschnitt an.

Das Ziel dieser Arbeit war es, geeignete Wirkstoffe für eine mRNA Beschichtung von Stentimplantaten zu entwickeln, welche die Effektivität der Implantation erhöhen und die Restenose Rate im Bereich der Stents verringern können. Dazu wurden zwei Zelllinien, A549 und EA.hy926, mit modifizierter mRNA kodierend für die zwei Enzyme TIMP3 und eNOS, beide gefäßprotektiv und antiinflammatorisch wirkend, transfiziert und die exprimierten Enzyme anhand eines ELISA oder antikörperabhängig (Durchflusszytometrie) nachgewiesen. Die Verträglichkeit der Transfektion wurde durch Beurteilung der Reduktion der Zellzahl überprüft. Zur Abstimmung der Balance zwischen Transfektionseffizienz und Zelltoxizität wurden verschiedene Konzentrationen der mRNA transfiziert und die Modifikationen der mRNA mit 25 oder 100 % variiert. Während die Transfektion mit eNOS und die Verwendung der EA.hy926 keine signifikanten Veränderungen der Expression der Enzyme ergab, exprimierten A549 Zellen, welche mit 100 % modifizierter mRNA kodierend für TIMP3 transfiziert wurden, signifikant erhöhte Mengen des entsprechenden Enzyms. Die Verwendung 25 % modifizierter mRNA kodierend für TIMP3 führte aufgrund toxischer Eigenschaften zu keiner signifikanten Erhöhung der Expression der Enzyme. Zudem wurde ein funktioneller Test zur Kontrolle der enzymatischen Eigenschaften der exprimierten TIMP3 nach Transfektion durchgeführt, welcher aber nicht die physiologische metalloproteasehemmende Wirkung nachweisen konnte. Die hier

in der Arbeit angewandte Methodik lässt sich somit erfolgreich für die mRNA Transfektion einsetzen; vor therapeutischer Anwendung muss dieses Verfahren jedoch weiter optimiert und somit die Wirksamkeit des transfizierten Enzyms verbessert und das Spektrum möglicher Zielzellen weiter ausgeweitet werden.

Literaturverzeichnis

1. Renz-Polster, H., *Basislehrbuch Innere Medizin*. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2004.
2. Schmidt, F.L., Manfred Heckmann, *Physiologie des Menschen*. Springer, 2010.
3. Gößwald, A., *Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013. **Robert-Koch-Institut**.
4. Schaps K., O.K., Ulrich Fetzner, *Innere Medizin*. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2007.
5. Tabas, I., K.J. Williams, and J. Boren, *Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications*. *Circulation*, 2007. **116**(16): p. 1832-44.
6. Hansson, G.K., A.K. Robertson, and C. Soderberg-Naucler, *Inflammation and atherosclerosis*. *Annu Rev Pathol*, 2006. **1**: p. 297-329.
7. Gkaliagkousi, E., et al., *Nitric oxide dysfunction in vascular endothelium and platelets: role in essential hypertension*. *J Hypertens*, 2009. **27**(12): p. 2310-20.
8. Glasser, S.P., A.P. Selwyn, and P. Ganz, *Atherosclerosis: risk factors and the vascular endothelium*. *Am Heart J*, 1996. **131**(2): p. 379-84.
9. Carr, M.E., *Diabetes mellitus: a hypercoagulable state*. *J Diabetes Complications*, 2001. **15**(1): p. 44-54.
10. Rask-Madsen, C. and G.L. King, *Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes*. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2007. **3**(1): p. 46-56.
11. Kuzkaya, N., et al., *Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(25): p. 22546-54.
12. e.V., D.G.f.K.H.-u.K., *Diagnostik und Therapie der peripheren arteriellen Erkrankungen*. ESC Pocket Guidelines, 2012.
13. Ray, K.K. and C.P. Cannon, *The potential relevance of the multiple lipid-independent (pleiotropic) effects of statins in the management of acute coronary syndromes*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. **46**(8): p. 1425-33.
14. Sipahi, I., et al., *Beta-blockers and progression of coronary atherosclerosis: pooled analysis of 4 intravascular ultrasonography trials*. *Ann Intern Med*, 2007. **147**(1): p. 10-8.
15. Dominiak, M., [Commentary to the article: ONTARGET Investigators, Yusuf S, Teo KK, Pogue J et al. Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. *N Engl J Med* 2008; 358: 1547-59]. *Kardiol Pol*, 2008. **66**(6): p. 705-6; discussion 707.
16. Wallentin , L., et al., *Ticagrelor versus Clopidogrel in Patients with Acute*

- Coronary Syndromes*. New England Journal of Medicine, 2009. **361**(11): p. 1045-1057.
17. Simard, T., et al., *The evolution of coronary stents: a brief review*. Can J Cardiol, 2014. **30**(1): p. 35-45.
 18. Stone, G.W., et al., *A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease*. N Engl J Med, 2004. **350**(3): p. 221-31.
 19. Moses, J.W., et al., *Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery*. N Engl J Med, 2003. **349**(14): p. 1315-23.
 20. Serruys, P.W., et al., *A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group*. N Engl J Med, 1994. **331**(8): p. 489-95.
 21. ER, O.B., et al., *Pathogenesis of neointima formation following vascular injury*. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2011. **11**(1): p. 30-9.
 22. Rodriguez-Granillo, A., et al., *Advantages and disadvantages of biodegradable platforms in drug eluting stents*. World J Cardiol, 2011. **3**(3): p. 84-92.
 23. Schomig, A., et al., *A meta-analysis of 16 randomized trials of sirolimus-eluting stents versus paclitaxel-eluting stents in patients with coronary artery disease*. J Am Coll Cardiol, 2007. **50**(14): p. 1373-80.
 24. Stone, G.W., et al., *Safety and efficacy of sirolimus- and paclitaxel-eluting coronary stents*. N Engl J Med, 2007. **356**(10): p. 998-1008.
 25. Joner, M., et al., *Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk*. J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(1): p. 193-202.
 26. Cook, S., et al., *Incomplete stent apposition and very late stent thrombosis after drug-eluting stent implantation*. Circulation, 2007. **115**(18): p. 2426-34.
 27. Rogers, C. and E.R. Edelman, *Endovascular stent design dictates experimental restenosis and thrombosis*. Circulation, 1995. **91**(12): p. 2995-3001.
 28. Kandzari, D.E., *Development and performance of the zotarolimus-eluting Endeavor coronary stent*. Expert Rev Med Devices, 2010. **7**(4): p. 449-59.
 29. Park, K.W., et al., *Everolimus-eluting versus sirolimus-eluting stents in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the EXCELLENT (Efficacy of Xience/Promus Versus Cypher to Reduce Late Loss After Stenting) randomized trial*. J Am Coll Cardiol, 2011. **58**(18): p. 1844-54.
 30. Finn, A.V., et al., *Differential response of delayed healing and persistent inflammation at sites of overlapping sirolimus- or paclitaxel-eluting stents*. Circulation, 2005. **112**(2): p. 270-8.
 31. Garg, S., et al., *The twelve-month outcomes of a biolimus eluting stent with a biodegradable polymer compared with a sirolimus eluting stent with a durable polymer*. EuroIntervention, 2010. **6**(2): p. 233-9.
 32. Serruys, P.W., et al., *A bioabsorbable everolimus-eluting coronary stent system (ABSORB): 2-year outcomes and results from multiple imaging methods*. Lancet, 2009. **373**(9667): p. 897-910.

33. Horn, F., *Biochemie des Menschen*. Georg Thieme Verlag KG, 2015.
34. Van Tendeloo, V.F., P. Ponsaerts, and Z.N. Berneman, *mRNA-based gene transfer as a tool for gene and cell therapy*. *Curr Opin Mol Ther*, 2007. **9**(5): p. 423-31.
35. Kariko, K., et al., *Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability*. *Mol Ther*, 2008. **16**(11): p. 1833-40.
36. Andries, O., et al., *N(1)-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice*. *J Control Release*, 2015. **217**: p. 337-44.
37. Kormann, M.S., et al., *Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice*. *Nat Biotechnol*, 2011. **29**(2): p. 154-7.
38. Gallie, D.R., *The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency*. *Genes Dev*, 1991. **5**(11): p. 2108-16.
39. Kyte, J.A., et al., *Preclinical full-scale evaluation of dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA for melanoma vaccination*. *Cancer Gene Ther*, 2005. **12**(6): p. 579-91.
40. Warren, L., et al., *Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA*. *Cell Stem Cell*, 2010. **7**(5): p. 618-30.
41. Bangel-Ruland, N., et al., *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mRNA delivery: a novel alternative for cystic fibrosis gene therapy*. *J Gene Med*, 2013. **15**(11-12): p. 414-26.
42. Levy, O., et al., *mRNA-engineered mesenchymal stem cells for targeted delivery of interleukin-10 to sites of inflammation*. *Blood*, 2013. **122**(14): p. e23-32.
43. Rolland, A., *Nuclear gene delivery: the Trojan horse approach*. *Expert Opin Drug Deliv*, 2006. **3**(1): p. 1-10.
44. Diener, Y., et al., *RNA-based, transient modulation of gene expression in human haematopoietic stem and progenitor cells*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 17184.
45. Rejman, J., et al., *mRNA transfection of cervical carcinoma and mesenchymal stem cells mediated by cationic carriers*. *J Control Release*, 2010. **147**(3): p. 385-91.
46. Avci-Adali, M., et al., *Optimized conditions for successful transfection of human endothelial cells with in vitro synthesized and modified mRNA for induction of protein expression*. *J Biol Eng*, 2014. **8**(1): p. 8.
47. Fuchs, G., *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag KG, 2014.
48. Mockey, M., et al., *mRNA transfection of dendritic cells: synergistic effect of ARCA mRNA capping with Poly(A) chains in cis and in trans for a high protein expression level*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **340**(4): p. 1062-8.
49. Forstermann, U., *Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its*

- pharmacological reversal*. Biol Chem, 2006. **387**(12): p. 1521-33.
50. Rassow J. , K.H., Roland Netzker, Rainer Deutzmann, *Duale Reihe Biochemie*. Georg Thieme Verlag KG, 2012.
 51. Apte, S.S., M.G. Mattei, and B.R. Olsen, *CLONING OF THE CDNA-ENCODING HUMAN TISSUE INHIBITOR OF METALLOPROTEINASES-3 (TIMP-3) AND MAPPING OF THE TIMP3 GENE TO CHROMOSOME-22*. Genomics, 1994. **19**(1): p. 86-90.
 52. Murphy, G., *Tissue inhibitors of metalloproteinases*. Genome Biology, 2011.
 53. Lüllman-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. Thieme, 2009.
 54. Amour, A., et al., *The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3*. FEBS Lett, 2000. **473**(3): p. 275-9.
 55. Jacobsen, J., et al., *Catalytic properties of ADAM12 and its domain deletion mutants*. Biochemistry, 2008. **47**(2): p. 537-47.
 56. Amour, A., et al., *Inhibition of the metalloproteinase domain of mouse TACE*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **878**: p. 728-31.
 57. Brew, K. and H. Nagase, *The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1803**(1): p. 55-71.
 58. Smookler, D.S., et al., *Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 regulates TNF-dependent systemic inflammation*. J Immunol, 2006. **176**(2): p. 721-5.
 59. Casagrande, V., et al., *Overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 in macrophages reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(1): p. 74-81.
 60. Ahonen, M., et al., *Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 induces apoptosis in melanoma cells by stabilization of death receptors*. Oncogene, 2003. **22**(14): p. 2121-34.
 61. Qi, J.H., et al., *A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2*. Nat Med, 2003. **9**(4): p. 407-15.
 62. Stohr, R., et al., *Loss of TIMP3 exacerbates atherosclerosis in ApoE null mice*. Atherosclerosis, 2014. **235**(2): p. 438-43.
 63. Giard, D.J., et al., *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors*. J Natl Cancer Inst, 1973. **51**(5): p. 1417-23.
 64. Edgell C-J, S., C.C. McDonald, and J.B. Graham, *PERMANENT CELL LINE EXPRESSING HUMAN FACTOR-VIII RELATED ANTIGEN ESTABLISHED BY HYBRIDIZATION*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1983. **80**(12): p. 3734-3737.
 65. van Leeuwen, E.B.M., et al., *Characterization of immortalized human umbilical and iliac vein endothelial cell lines after transfection with SV40 large T-antigen*. Blood Coagulation and Fibrinolysis, 2000. **11**(1): p. 15-25.
 66. Xia, N., et al., *Role of SIRT1 and FOXO factors in eNOS transcriptional*

- activation by resveratrol*. Nitric Oxide, 2013. **32**: p. 29-35.
67. Mortimer, C.E., Müller, Ulrich, *Das Basiswissen der Chemie*. Georg Thieme Verlag KG, 2015.
 68. Nordheim, A.K., Rolf, *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag KG, 2015.
 69. AG, R.I., *CASY® Cell Counter + Analyser System - Operator Manual* <http://www.geminibv.nl/labware/roche-innovatis-ag-casy-cel-teller/roche-innovatis-casy-manual.pdf>, Download am 24.10.2015.
 70. Zohra, F.T., E.H. Chowdhury, and T. Akaike, *High performance mRNA transfection through carbonate apatite-cationic liposome conjugates*. Biomaterials, 2009. **30**(23-24): p. 4006-13.
 71. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
 72. Engvall, E. and P. Perlmann, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry, 1971. **8**(9): p. 871-4.
 73. Gould, E.A., A. Buckley, and N. Cammack, *Use of the biotin-streptavidin interaction to improve flavivirus detection by immunofluorescence and ELISA tests*. J Virol Methods, 1985. **11**(1): p. 41-8.
 74. Fulwyler, M.J., *STATUS QUO IN FLOW-THROUGH CYTOMETRY*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1974. **22**(7): p. 605-606.
 75. Biosciences, B., *BD FACSCalibur Instructions For Use*. 2007.
 76. AnaSpec, *SensoLyte® 520 MMP-1 Assay Kit *Fluorimetric* Manual*. October 2014.
 77. Welt, F.G. and C. Rogers, *Inflammation and restenosis in the stent era*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(11): p. 1769-76.
 78. Rychlik, W., W.J. Spencer, and R.E. Rhoads, *Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro*. Nucleic Acids Res, 1990. **18**(21): p. 6409-12.
 79. Quiagen®, *HotStar HiFidelity PCR Handbook*. 2010.
 80. Deane, J.A. and S. Bolland, *Nucleic acid-sensing TLRs as modifiers of autoimmunity*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 6573-8.
 81. Ablasser, A., et al., *Selection of molecular structure and delivery of RNA oligonucleotides to activate TLR7 versus TLR8 and to induce high amounts of IL-12p70 in primary human monocytes*. J Immunol, 2009. **182**(11): p. 6824-33.
 82. Lüllmann, H. and K.W. Mohr, Martin, *Pharmakologie und Toxikologie*. Thieme, 2016.
 83. Heil, F., et al., *Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1526-9.
 84. Kariko, K., et al., *mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3*. J Biol Chem, 2004. **279**(13): p. 12542-50.

85. Alexopoulou, L., et al., *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3*. Nature, 2001. **413**(6857): p. 732-8.
86. Kariko, K., et al., *Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA*. Immunity, 2005. **23**(2): p. 165-75.
87. Sarvestani, S.T., et al., *Inosine-mediated modulation of RNA sensing by Toll-like receptor 7 (TLR7) and TLR8*. J Virol, 2014. **88**(2): p. 799-810.
88. Anderson, B.R., et al., *Nucleoside modifications in RNA limit activation of 2' - 5' -oligoadenylate synthetase and increase resistance to cleavage by RNase L*. Nucleic Acids Research, 2011. **39**(21): p. 9329-9338.
89. Miki, K., et al., *Efficient Detection and Purification of Cell Populations Using Synthetic MicroRNA Switches*. Cell Stem Cell, 2015. **16**(6): p. 699-711.
90. Wroblewska, L., et al., *Mammalian synthetic circuits with RNA binding proteins for RNA-only delivery*. Nat Biotech, 2015. **33**(8): p. 839-841.
91. McCormack, M.P. and T.H. Rabbitts, *Activation of the T-cell oncogene LMO2 after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency*. N Engl J Med, 2004. **350**(9): p. 913-22.
92. Donsante, A., et al., *AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma*. Science, 2007. **317**(5837): p. 477.
93. Dean, D.A., D.D. Strong, and W.E. Zimmer, *Nuclear entry of nonviral vectors*. Gene Ther, 2005. **12**(11): p. 881-90.
94. Anderson, B.R., et al., *Incorporation of pseudouridine into mRNA enhances translation by diminishing PKR activation*. Nucleic Acids Research, 2010. **38**(17): p. 5884-5892.
95. Levy, E.R., M. Carlsten, and R.W. Childs, *mRNA Transfection to Improve NK Cell Homing to Tumors*. Methods Mol Biol, 2016. **1441**: p. 231-40.
96. Lee, K., et al., *Peptide-enhanced mRNA transfection in cultured mouse cardiac fibroblasts and direct reprogramming towards cardiomyocyte-like cells*. Int J Nanomedicine, 2015. **10**: p. 1841-54.
97. Boros, G., et al., *Transfection of pseudouridine-modified mRNA encoding CPD-photolyase leads to repair of DNA damage in human keratinocytes: a new approach with future therapeutic potential*. J Photochem Photobiol B, 2013. **129**: p. 93-9.
98. Brito, L.A., et al., *Non-viral eNOS gene delivery and transfection with stents for the treatment of restenosis*. Biomed Eng Online, 2010. **9**: p. 56.
99. Muhs, A., et al., *Preclinical evaluation of inducible nitric oxide synthase lipoplex gene therapy for inhibition of stent-induced vascular neointimal lesion formation*. Hum Gene Ther, 2003. **14**(4): p. 375-83.
100. Selmeczi, D., et al., *Large-Scale mRNA Transfection of Dendritic Cells by Electroporation in Continuous Flow Systems*. Methods Mol Biol, 2016. **1428**: p. 151-61.
101. Choi, Y., et al., *A high throughput microelectroporation device to introduce a*

- chimeric antigen receptor to redirect the specificity of human T cells*. Biomed Microdevices, 2010. **12**(5): p. 855-63.
102. Scheffel, D.L., et al., *Inactivation of matrix-bound matrix metalloproteinases by cross-linking agents in acid-etched dentin*. Oper Dent, 2014. **39**(2): p. 152-8.
103. Xu, X., M.T. Padilla, and Y. Lin, *Measurement of TACE Activity in Extracts from Cultured Cells*. Bio Protoc, 2014. **4**(20).
104. Inc., T.F.S., *FluoroBrite™ DMEM*. 2015(<https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/classical-media/fluorobrite-media.html>).
105. Nunes, G.L., et al., *Mechanism of heparin acceleration of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) degradation by the human neutrophil elastase*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e21525.

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie an der Universitätsklinik Tübingen unter Betreuung von Professor Dr. Hans Peter Wendel durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Andrea Nolte-Karayel, wissenschaftliche Angestellte und Betreuerin im klinischen Forschungslabor.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder Andrea Nolte-Karayel und Andreas Behring von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Andrea Nolte-Karayel.

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

Tübingen, den 27.10.2016

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Professor Dr. Hans Peter Wendel, Leiter des klinischen Forschungslabor der Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, bedanken, da er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine experimentelle Promotion unter seiner Leitung durchzuführen.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Dr. Andrea Nolte-Karayel, welche mich während meiner wissenschaftlichen Arbeit hervorragend betreut und mir stets hilfsbereit zur Seite gestanden hat.

Ich danke besonders den Mitarbeitern des Forschungslabors, die angenehme Arbeitsatmosphäre und dauernde Unterstützung waren Grundlagen für das erfolgreiche Ableisten dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich meiner Familie danken, welche durch ihre liebevolle Unterstützung mein Studium und somit auch diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht hat.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen Freunden und Bekannten, welche mich loyal während meiner Doktorarbeit begleitet haben.