

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

**Entwicklung eines in-vitro 3D-Modells der  
Plaquentstehung bei Atherosklerose für die  
Untersuchung siRNA oder mRNA basierter  
therapeutischer Ansätze**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Reinert, Isabel, geb. Golla

2024

Dekan: Professor Dr. B.Pichler

1.Berichtserstatter: PD. Dr. Andrea Nolte-Karayel

2.Berichtserstatter: Professorin Dr. K. Klingel

3.Berichtserstatter: Professor Dr. Ossowski

Tag der Disputation: 18.12.2023

Meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis .....	V
1 Einleitung.....	- 1 -
1.1 Risikofaktoren .....	- 2 -
1.2 Therapieansätze .....	- 3 -
1.3 Anatomie der Gefäßwand und die beteiligten Zellen.....	- 6 -
1.4 Monozyten und ihre Rolle bei der Atherosklerose.....	- 8 -
1.5 RNA-Interferenzen und siRNA .....	- 9 -
1.6 Transfektionsmethoden.....	- 12 -
Biologische Verfahren .....	- 13 -
Physikalische Verfahren.....	- 13 -
Chemische Verfahren.....	- 13 -
1.7 Zielsetzung.....	- 14 -
2 Material und Methoden.....	- 15 -
Medien .....	- 21 -
Anzüchten von Endothelzellen .....	- 28 -
Zellzahlbestimmung .....	- 29 -
Zellzahlbestimmung mittels CASY .....	- 30 -
Anzüchten von SMCs.....	- 30 -
Einfrieren von Zellen .....	- 31 -
Mediumswechsel und Splitten.....	- 32 -
Auftauen von Zellen aus dem Stickstofftank .....	- 32 -
Aufzucht der hTERT- immortalized Human Carotid Artery Smooth Muscle Cells (Firma abm®).....	- 33 -
MonoMacs-6 (acute monocytic leukemia, Firma DSMZ) Kultivierung ...	- 33 -
Stimulation von Endothelzellen mit TNF $\alpha$ .....	- 34 -
Antikörperfärbung und FACSen der Endothelzellen.....	- 35 -
Fluoreszenzmikroskopie-Färbung .....	- 35 -
Die DAPI-Vorbereitung.....	- 36 -
Durchflusszytometriefärbung (FACS).....	- 36 -
Transfektion von Zellen mit siRNAs .....	- 38 -
Co-Kultivierung von MM6s und ECs .....	- 39 -

RNA-Isolation .....	- 39 -
Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung der Gesamt-mRNA .....	- 40 -
cDNA-Synthese.....	- 41 -
qRT-PCR.....	- 42 -
Prototyp-Herstellung .....	- 43 -
2.1 Statistik .....	- 46 -
3 Ergebnisse.....	- 47 -
3.1 Differenzierung VSMCs/ hTERT SMCs/ ECs.....	- 47 -
3.2 Auswertung der Durchflusszytometrie ECs/ VSMCs / hTERT-SMCs .....	- 47 -
3.3 FACS-Ergebnis der ECs .....	- 47 -
3.4 Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Antikörperfärbung der ECs .....	- 49 -
3.5 FACS-Ergebnis der VSMCs und hTERT-SMCs.....	- 50 -
3.6 Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Antikörperfärbung der VSMCs und hTERT-SMCs .....	- 52 -
3.7 Aufbau des Prototyps.....	- 54 -
3.8 Auswertung der qRT-PCR des Prototyps.....	- 59 -
4 Diskussion .....	- 66 -
5 Fazit und Ausblick .....	- 78 -
6 Zusammenfassung .....	- 80 -
7 Literaturverzeichnis .....	- 82 -
Erklärung zum Eigenanteil.....	- 92 -
Danksagung .....	- 93 -

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Aufbau einer Gefäßwand.....	- 7 -
Abbildung 2 RNA-Transkription .....	- 9 -
Abbildung 3 RNA-Prozessierung.....	- 10 -
Abbildung 4 Mechanismus der siRNA.....	- 12 -
Abbildung 5 Prototyp-Aufbau.....	- 44 -
Abbildung 6 FACS-Auswertung der ECs.....	- 48 -
Abbildung 7 Endothelzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop .....	- 49 -
Abbildung 8 FACS-Auswertung der selbst isolierten SMCs .....	- 50 -
Abbildung 9 FACS-Auswertung der hTERT-SMCs .....	- 51 -
Abbildung 10 Fluoreszenzbild der selbst gezüchteten SMCs.....	- 53 -
Abbildung 11 Fluoreszenzbild der gefärbten hTERT-SMCs in einer 20 µm Vergrößerung .....	- 54 -
Abbildung 12 Prototyp nach aussäen der hTERT-SMCs .....	- 55 -
Abbildung 13 Prototyp am 3. Tag .....	- 56 -
Abbildung 14 Prototyp der Reihe 2B am 7.Tag .....	- 57 -
Abbildung 15 Prototyp der Reihe 2A am 10 .....	- 58 -
Abbildung 16 Prototyp 2B am 15. Tag.....	- 59 -
Abbildung 17 Prototyp nach Transfektion.....	- 60 -
Abbildung 18 Prototyp nach Transfektion mit TNFα .....	- 61 -
Abbildung 19 qRT-PCR Auswertung der Mittelwerte der drei Prototypen nach entsprechender Genexpression. ....	- 62 -
Abbildung 20 qRT-PCR Auswertung der Mittelwerte der drei Prototypen nach entsprechender Genexpression. ....	- 63 -

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 verwendete Geräte und Materialien.....	- 16 -
Tabelle 2 verwendete Reagenzien/Chemikalie/Antikörper .....	- 20 -
Tabelle 3 verwendete Primer und Sequenzen.....	- 26 -
Tabelle 4 Beschriftung der qRT-PCR Platten des Prototyps. ....	- 45 -

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
AK	Antikörper
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovine Serum Albumin
CASY	Zellzähler und Analyse Gerät
CCL2	CC-Chemokinligand 2
CCL5	CC-Chemokin Ligand 5
CD-	cluster of differentiation-Unterscheidungsgruppe der Oberflächenmerkmale von Zellen
CD 31-PE	Oberflächenprotein der Proteinphosphatasen Antigen für Endothelzellen
CD14	Oberflächenprotein der Proteinphosphatasen Antigen für Monozyten
CD-40L	CD Oberflächenmerkmal, Membranprotein primär von TH2-Zellen exprimiert
CD45	Oberflächenprotein der Proteinphosphatasen Antigen für Leukozyten
CD68	Oberflächenprotein der Proteinphosphatasen Antigen für Makrophagen
CD90 FITC/ sek Cy3	Oberflächenprotein der Proteinphosphatasen Antigen unter anderem für aktivierte Endothelzellen mit Fluoresceinisothiocyanat
cDNA	complementary Desoxyribonucleinacid, Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cDNA	Copy-DNA; kodierte DNA
CX43	Connexin 43
DAPI	4',6-Diamifino-2-Phenylindol Fluoreszenzfarbstoff
DEAE	Diethylaminoethyl-Dextran
DEPC	Diethylpyrocarbonat, behandeltes Wasser

DES	Drug Eluting Stent, Medikament-freisetzender Stent
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid, Desoxyribonucleinsäure
DO <sub>260</sub>	Optical density at 260nm wavelength, optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260nm
DPBS, +Ca+Mg	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline mit Calcium und Magnesium
DPBS, - Ca,-Mg	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline ohne Calcium und Magnesium
dsRNA	Double stranded Ribonucleinacid, doppelsträngige Ribonukleinsäure
ECM	Extracellular matrix, extrazelluläre Matrix
ECs	Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIV	E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1
E-Sel	Endothel Selektin
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting Durchflusszytometrie
FCS	Foetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter, Vorwärtsstreulicht
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyde 3-Phosphat Dehydrogenase
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating factor, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Fraktor
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Reines Wasser
HCl	Chlorwasserstoff
HDL	High Density Lipoprotein
HIMEC	Human intestinal microvascular endothelial cells, Humane zum Darmkanal gehörende mikrovaskuläre Endothelzellen
hTERT	Immortalisierte humane glatte Muskelzellen der Carotide

HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells, Humane zur Nabelschnurvene gehörende Endothelzellen
ICAM1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin-8
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
M	Mol
M-CSF	Macrophage Colony Stimulation Factor, Makrophagen koloniestimulierender Faktor aus der Gruppe der Zytokine
mg	Milligramm
min	Minuten
miRNA	Micro Ribonucleinacid, mikro-Ribonukleinsäure
ml	Milliliter
mM	Millimol
MM6	Mono Macs 6; Monozyt
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
mRNA	Messenger Ribonucleinacid, Boten-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
ng	Nanogramm
nM	Nanomol
nm	Nanometer
nm	Newtonmeter
NO	Stickstoff
PBS	Phosphate gepufferte Saline
PECAM	plattiertes endothelialisiertes Adhäsionsmolekül
PenStrep	Penicillin, Streptomycin
pH-Wert	Pondus Hydrogenii, „Gewicht des Wasserstoffs“ Maß der Menge an Säuren und Basen in einer Lösung
PLGA Stent	Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) Stent, Poly (D,L-Milch-Co-Glykolsäure) Stent
Prä-mRNA	Präkursor-mRNA
PTCA	Perkutane transluminale Coronar-Angioplastik
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion

RISC	RNA-induced-silencing-complex, RNA induzierte-Unterdrückungskomplex aus RNA und Proteinen
RNA	Ribonucleinacid, Ribonukleinsäure
RNAi	Ribonucleinacid interferences, Ribonukleinsäure Interferenzen
rpm	Revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute (Drehzahleinheit)
RPMi	Zellkulturmedium für normale und neoplastische Leukozyten
rRNA/riRNA -	Ribonucleic Acid, ribosomale Ribonukleinsäure
SARS-CoV	Serere acute respiratiry syndrome - Coronavirus, Schweres-akutes-Atemwegssyndrom-Coronavirus
SCR siRNA	Scramble- gemischte siRNA
sec	Sekunden
siRNA	Small interfering Ribonucleinacid, kleine eingreifende Ribonukleinsäure
SMCs	Glatte Muskelzellen
SSC	Side Scatter, Seitwärtsstreulicht
TATA-Box	Promotorregion eines Gens (bestehend aus 25-30 Thymin und Adenin Basenpaaren)
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor
TNS	Trypsin Neutralisierungslösung
TNS $\alpha$	Trypsin neutralisierende Lösung
tRNA	Transfer Ribonucleinacid, Transport-Ribonukleinsäure
U.S. FDA	United States Food and Drug Administration, US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel
VCAM1	Vaskuläres Adhäsionsmolekül 1
VSMCs	Vaskuläre glatte Muskelzellen
xg	Relative Zentrifugalkraft

# 1 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind immer noch die Nummer eins der häufigsten Todesfälle weltweit mit mehr als 17.9 Millionen Menschen jedes Jahr (WHO, 2021, Piepoli et al., 2016). Dabei ist Atherosklerose als Hauptursache für die pathologischen und degenerativen Erkrankung des Blutkreislaufes verantwortlich. Es kann verschiedene Bereiche wie Herz, Lunge, Nieren und das Gehirn betreffen. Die relevanten Läsionen zeigen sich häufig erst im mittleren Alter, die Grundlagen dafür wurden jedoch bereits in der Jugend geschaffen (O'Keefe et al., 2018). Dieser Zeitraum verdeutlicht die Chancen und Ansatzpunkte für die Behandlung der Erkrankung.

Atherosklerose betrifft hauptsächlich die mittelgroßen bis große Arterien wie Koronararterien, die Karotiden und periphere Arterien. An der Entwicklung sind vor allem die Endothelzellen, Leukozyten und vaskulären glatten Muskelzellen der Intima beteiligt, aber auch „low-density“ Lipoproteine (LDL) aus dem Blutkreislauf, die Gefäßmatrix und intrazelluläre Lipide spielen eine Rolle.

Es gibt verschiedene Theorien über den pathologischen Ursprung, die immer wieder aktualisiert werden. Im Allgemeinen wird von einer Dysfunktion oder Schädigung der Endothelzellschicht ausgegangen, bei der es vermehrt zu einer Expression von VCAM-1 kommt. Dies ist ein Adhäsionsmolekül, das von Endothelzellen generiert wird und als erster Schritt der Pathogenese von Atherosklerose beschrieben werden kann (Li et al., 1993). Es folgt eine Kaskade von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen, die Monozyten dazu veranlassen in die Intima einzuwandern (Gu et al., 1998). Gleiches gilt für die T-Zellen, die durch ein Trio von Zytokinen, getriggert durch Interferon- $\gamma$ , zu der entstehenden Plaque rekrutiert werden (Mach et al., 1999). Dort reifen die Monozyten zu Makrophagen heran, unterstützt durch den „Macrophage Colony Stimulation“ Faktor (M-CSF) (Clinton et al., 1992). Der Abbau von „low density“- Lipiden führt zu einer Oxidation (Steinbrecher et al., 1984). Dies begünstigt die vermehrte Aufnahme von modifizierten LDLs durch Makrophagen über den Scavenger-Rezeptor und unterstützt so den phagozytischen Prozess zu Schaumzellen (Feng et al., 2003).

Es bilden sich Lipideinschlüsse, die auch „fatty streaks“ (Kreuzer and Teifenbacher, 2003) genannt werden. Diese kapseln sich später ab und bilden einen nekrotischen Kern mit Lipiden, toten Makrophagen und Proteoglykanen und stellen damit ein fortgeschrittenes Stadium der Atherosklerose dar. Libby thematisiert in seinem Review 2012, dass der CD40 Ligand (CD-40L) ein relevanter Aktivator bei der Expression von Gewebethromboplastin (tissue factor) in humanen Makrophagen ist (Mach et al., 1997) und dadurch sowohl die Thrombogenität im Plaque als auch die Integrität der protektiven, fibrösen Kapsel selbst reguliert wird. Einige Entzündungsmediatoren werden von phagozytierenden Makrophagen (Li et al., 2005), als auch von den glatten Muskelzellen selbst exprimiert wie z.B. Interleukin-1 $\beta$ , -18, Tumornekrosefaktor- $\alpha$  und - $\beta$  (TNF- $\alpha$ / $\beta$ ), CD-40L mit weitreichendem Einfluss auf die Mitogenese, intrazelluläre Matrixproliferation, Angiogenese und die Bildung von Schaumzellen (Crowther, 2005). Es beginnt ein Kreislauf, bei dem die Makrophagen, T-Zellen, glatte Muskelzellen und die Entzündungsmediatoren ein komplexes Netz bilden, bis die Plaque so weit anschwillt, dass es zu einer Stenose und im Zuge dessen zu einer Perforation kommen kann (Davies et al., 1993, Wal et al., 1994). Allerdings können auch äußere Faktoren wie Stress (Yao et al., 2019) oder körperliche Anstrengung dafür ursächlich sein. Die Folgen von Stenosen, Ulzerationen und Ruptur sind vielfältig. Sie reichen von: Thrombosen, koronare Herzkrankheiten wie Hypertonie, Herzinfarkt, Angina Pectoris, zerebrale Ischämien wie Schlaganfall und vaskulärer Demenz bis hin zu peripheren und arterielle Verschlusskrankheiten und betreffen fast immer den gesamten Körper.

## 1.1 Risikofaktoren

Bei der Entstehung von Atherosklerose sind eine Vielzahl von Einflussgrößen beteiligt, die durch die aktuelle Forschung immer wieder um neue Erkenntnisse erweitert werden.

Zu den klassischen Risikofaktoren zählen:

- Lebensalter
- Prädisposition bei Männern

- genetische Veranlagung bzw. erbliche Häufung
- Lipidstoffwechselstörung (erhöhter LDL-Cholesterinspiegel und verringerter HDL-Cholesterinspiegel)
- Hypertonie
- Diabetes mellitus (Typ 2)
- Rauchen
- Adipositas und Bewegungsmangel

Zu den neueren Risikofaktoren zählen zudem:

- Lipidstoffwechselstörung (Hypertriglyceridämie, spezifische LDL-Morphologie, Lipoprotein(a)- Erhöhung, Apolipoproteinase A-1 und B-100 Varianten)
- Gerinnungsstörungen (erhöhte prothrombotische Aktivität, verminderte Fibrinolyse, hoher Fibrinogenspiegel, niedriger Antithrombinspiegel)
- Insulinresistenz, Hyperinsulinämie, Glukoseintoleranz
- ausgeprägter Alkoholkonsum
- Hyperhomocysteinämie
- erhöhtes reaktives C-Protein

Einige wichtige, bereits genannte Faktoren treten oft kombiniert auf und bilden so die ersten Ansatzpunkte bei der Prävention und Therapie der Erkrankung (Kreuzer and Teifenbacher, 2003). Die multifaktoriellen Ursachen und die individuellen Parameter der einzelnen Patienten lassen sich jedoch nicht so einfach auf ein einheitliches Konzept übertragen (Lechner et al., 2020). Somit ist der Bedarf nach einem Wirkstoff, der trotz dieser Varianz eine Wirkung in allen Bereichen erzielt, sehr groß.

## **1.2 Therapieansätze**

Heutzutage wird in der Medizin das Thema der kardiovaskulären Erkrankung bereits früh thematisiert und über einfache präventive Maßnahmen, zum Beispiel im Zuge von „Check-up“ beim Hausarzt, durchgeführt. Dabei kann die allgemeine Anamnese bereits wertvolle Inhalte liefern wie: Alter, familiäre Erkrankungen,

Raucher, sportliches Aktivitätslevel, Ernährung, Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2, Hypertonie, Größe und Gewicht für den BMI (Body-Mass-Index). Ergänzend dazu präzisiert die Blutdruckmessung, eine aktuelle Blutanalyse und eine physische Untersuchung von Herz, Lunge und Aorta (Lewis, 2009) die Prädisposition für diese Erkrankung.

Die medikamentösen Ansätze zielen beispielsweise auf den LDL-Stoffwechsel ab. Zu nennen sind hier zum Beispiel Statine- Cholesterin-Synthese-Hemmer - und die Kombination mit Cholesterin-Resorptionshemmer wie Ezetimib, die als Cholesterinsenker fungieren und so über das Blut direkt einwirken können. Des Weiteren kann eine Therapie über die Blutverdünnung mittels Thrombozytenaggregationshemmer oder über Blutdruckmittel (ACE-Hemmer, Betablocker, Diuretika, Kalziumantagonisten und Sartane) ratsam sein. Zusätzlich wird bei Diabetikern die Einnahme von Antidiabetika zur Regulierung des Blutzuckerspiegels empfohlen (Kannel and McGee, 1979).

In schweren Fällen kann interventionell oder über operative Maßnahmen eingegriffen werden. Mittels PTCA (perkutane transluminale Coronar-Angioplastie) können Stenosen aufgedehnt und die Revaskularisation sichergestellt werden. Dieses Vorgehen wurde bereits von Herrn Grüntzig 1979 beschrieben (Grüntzig and Kumpe, 1979). Es hat sich herausgestellt, dass bei der reinen Ballon-Angioplastie ohne Stents, die Restenoserate direkt nach Eingriffen und auch kurze Zeit später noch sehr hoch waren und die Ergebnisse von Stentimplantationen deutlich bessere Ergebnisse lieferten (Fischman et al., 1994). Die Komplikationen von In-Stent-Restenosen und Stent-Thrombosen (Byrne et al., 2015) zeigen auch hier die bestehende Limitation und den Drang, neue therapeutische Ansätze zu erforschen. Die Weiterentwicklung von Stents, die Medikamente freisetzen, DES, (engl. drug eluting stents), wurde bereits im Jahr 2007 von Finn et al. in einem Review zusammengefasst, indem sowohl Cypher™ -Stents als auch Taxus™ -Stents eine Restenose verhindern. Da die Stent-Technologie allerdings noch nicht vollkommen ausgereift ist, führen die aktuell eingesetzten Stents noch zu einem erhöhten Thromboserisiko (Finn et al., 2007). Interessant werden in dem Zuge neue Beschichtungen von Stents, mit mRNA und/ oder siRNA, die hier, im Gegenteil zu den bekannten PLGA-Stents,

spezifisch das Endothelzellwachstum verbessern anstatt es durch z.B. Zytostatika zu verlangsamen und damit die Thrombosegefahr über einen längeren Zeitraum unterbinden (Koenig et al., 2017, Zengerle, 2019).

Die siRNA als zukünftiges Therapeutikum ist ein künstlich hergestelltes, sequenzspezifisches RNA-Fragment, bestehend aus 21-25 Nukleotiden, zur Hemmung der Genexpression. Damit wird ein physiologischer Mechanismus ausgenutzt, der durch die Unterdrückung oder Regulation der Proteinbiosynthese direkt pharmakologisch tätig wird und den selektiven komplementären mRNA-Abbau ansteuert und abbaut. Dieser Nutzen wird bereits mittels Medikamente erfolgreich eingesetzt. Die „U.S Food and Drug Administration“ (FDA) hat 2018 das erste siRNA Medikament namens „ONPATTRO™“ (Partisiran) zugelassen, welches zur Behandlung von Transthyretin-Amyloidose eingesetzt wird (Weng et al., 2019). Weitere siRNA basierende Therapeutika wie Givosiran (Givlaan), zur Behandlung von akuten hepatischen Porphyrien, wurde 2019 zugelassen (Scott, 2020), sowie Lumasiran, welches 2020 die Zulassung zur Behandlung von Hyperoxalurie Typ 1 bekam (Administration, 2020-11-23) [Accessed 14.09.2022]. Das aktuelle Medikament der Firma „Anylam Pharmaceuticals“ richtet sich gegen die Infektion von SARS-CoV und SARS-CoV2 namens ALN-COV (VIR 2703) (Mehta and Dhapte-Pawar, 2021).

Die mRNA (Boten-Ribonukleinsäure) hingegen ist ein exakter Bauplan (eine einzelsträngige RNA), die aus einem DNA-Strang transkribiert wird. Es enthält die Information für die Proteinbiosynthese, die direkt zu funktionellen Proteinen oder Peptiden umgewandelt werden kann (Mascola and Fauci, 2020). Die mRNA-Transkripte sind sehr effektiv bei einer geringen Toxizität, da sie nicht in den Zellkern eindringen müssen, um translatiert zu werden (Conry et al., 1995). Der aktuelle Stand der Technik hat nach der Einführung der mRNA als Impfstoff oder Therapeutikum die Produktion fast aller funktionellen Proteine und Peptide im menschlichen Körper ermöglicht (Qin et al., 2022). Daraus werden derzeit aktuell Impfstoffe gegen SARS-CoV-2 (Corbett et al., 2020), Influenza (Hekele et al., 2013), Zika (Van Craenenbroeck et al., 2015), Tollwut (Alberer et al., 2017, Armbruster et al., 2019) und Studien zu HIV (Leal et al., 2018) sowie mRNA-basierte Proteinersatztherapien (fürs Herz (Magadam, 2019 #166), Lunge (Sahu

et al., 2019), Krebs-Immuntherapien (Vallazza et al., 2015)) und mRNA-basierte Therapeutika für pluripotente Stammzellen (Anttila et al., 2020) entwickelt.

Aus den oben genannten Gründen ist es wichtig ein 3D Modell zur Erforschung und Weiterentwicklung von siRNA und mRNA basierten Therapeutika zu ermöglichen. Durch den Prototyp würde sich ein Modell für eine schnellere Generierung von Ergebnissen für ein effektives Screening nebenwirkungsärmerer Therapieansätze ergeben. Damit könnten Tierversuche verringert werden, weil man eine physiologische Gewebesimulation bereits im Labor erschafft und die Weiterentwicklung von den verschiedenen Stadien der Atherosklerose hiermit zusätzlich verwirklichen kann.

### **1.3 Anatomie der Gefäßwand und die beteiligten Zellen**

Der Wandaufbau von Arterien und Venen lässt sich in 3 Schichten einteilen:

- die Tunica externa/ adventitia (Externa)
- die Tunica media (Media)
- die Tunica intima (Intima)

Die Externa befestigt das Gefäß mit seiner Umgebung und besteht aus elastischen und kollagenen Fasern, in denen Nervenfasern zur Regulation der Durchblutung verlaufen. Je nach Gefäßtyp besteht die mittlere Wand, Tunica media, entsprechend ihrem Funktionstyp aus elastischen und kollagenen Fasern sowie glatten Muskelzellen. Bei sehr großen Gefäßen kann die Tunica externa und die Tunica media durch eine Membrana elastica externa voneinander getrennt sein. Die innerste Schicht bildet die Tunica intima mit einschichtigen Epithelzellen, die auch als Endothel bezeichnet werden kann, und auf einer Basalmembran sitzen. Darunter kommt das Stratum subendotheliale, welches aus lockerem Bindegewebe, eingelagerten glatten Muskelzellen und Immunzellen besteht. Auch hier kann je nach Größe des Gefäßes eine Membrana elastica interna zur Abgrenzung vorhanden sein. Je nach Ausdehnung, Lage und Funktion (Arterien/Venen) finden sich unterschiedliche Ausprägungen der einzelnen Wandschichten wieder (Engele, 2006).

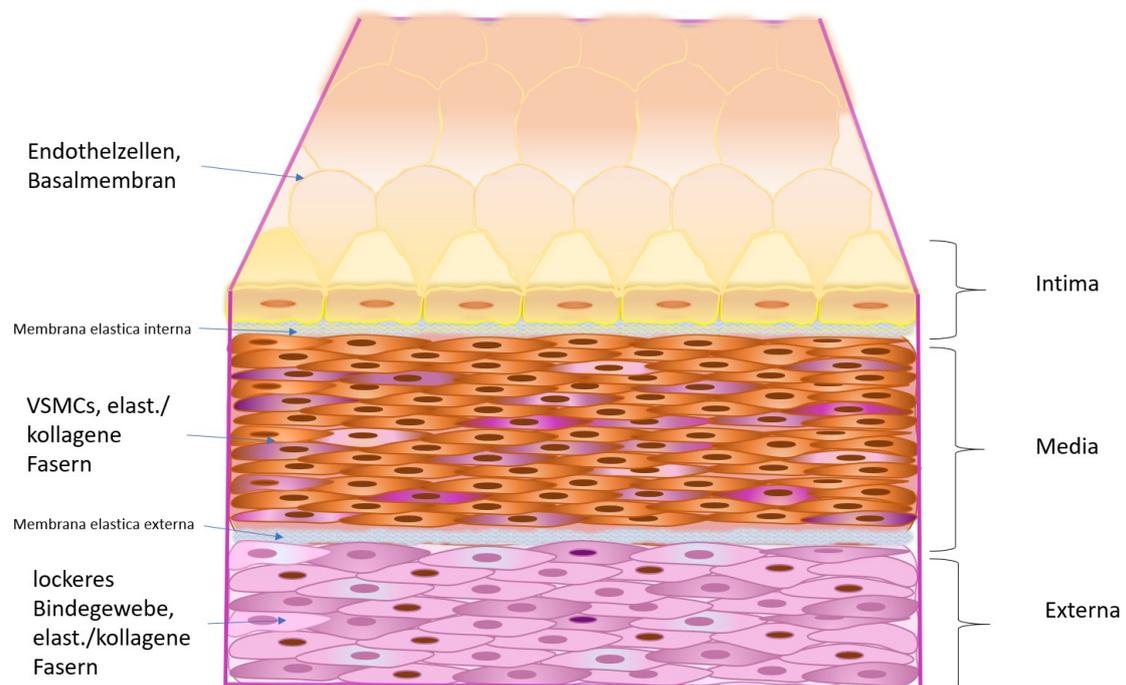


Abbildung 1 Aufbau einer Gefäßwand ; diese Graphik zeigt den schematischen Aufbau mit den 3 Schichten der Intima (Endothelzellen und Basalmembran), der Media (VSMCs, elastische und kollagene Fasern), und der Externa (lockeres Bindegewebe mit elastischen und kollagenen Fasern und Nervenfasern) (Quelle: adaptiert nach Hrejsa, C., 2019, www.istockphoto.com)

Die Endothelzellen (EC) sind spezialisierte Epithelzellen, die ein einschichtiges Plattenepithel ausbilden und die innerste Schicht von Blutgefäßen auskleiden. Man kann drei verschiedene und spezialisierte Arten unterscheiden. Das kontinuierliche, das fenestrierte und das diskontinuierliche Endothel. ECs übernehmen verschiedene physiologische Funktionen, die über die Begrenzung des Lumens einer Gefäßwand hinausgehen. Neben der Produktion von NO (Stickstoff) zur Blutdruckregulation, sind sie auch an der Blutgerinnung beteiligt, beeinflussen den transmembranen Austausch (Sauerstoff, Diapedese) und spielen auch bei Entzündungsvorgängen und der Angiogenese eine Rolle.

Die vaskulären glatten Muskelzellen sind vereinzelt in der Intima und vor allem in der Media ansässig. Es handelt sich dabei um längliche, spindelförmige Zellen mit kontraktile Eigenschaften. Sie können in Single-Unit Typ und Multi-Unit Typ eingeteilt werden und kommen auch als Mischform z.B. in der Gefäßmuskulatur vor. Die Innervation dieser Muskelzellen wird über das vegetative Nervensystem vollzogen, mittels Neurotransmitter wie Noradrenalin für den Sympathikus und Acetylcholin für den Parasympathikus. Dabei ist die Kontraktilität auf

Myofilamente, bestehend aus Aktin und Myosinanteilen, und Intermediärfilamenten sowie nicht-muskulärem Aktin zurückzuführen, die zusammen das Zytoskelett der Zellen bilden (Engele, 2006).

## **1.4 Monozyten und ihre Rolle bei der Atherosklerose**

Monozyten gehören zu den Leukozyten und sind die größten Zellen im peripheren Blut (10-20 µm). Sie entstehen im Knochenmark als Vorläuferzellen, die durch bestimmte Wachstumsfaktoren (GM-CSF, M-CSF) zu Monoblasten heranreifen, bis sie sich zu Monozyten entwickeln. Zirkulierende Monozyten verweilen ein bis drei Tage im Blut und sind amöboid beweglich sowie in der Lage, sich an Oberflächen zu adhären, bevor sie sich differenzieren und in bestimmte Gewebe einwandern. Sie beinhalten Granula mit Enzymen wie Lysozym, saure Phosphatasen, Sulfatasen und unspezifische Esterasen und gehören dem mononukleären Phagozytensystem (MPS) unseres Immunsystems an.

Entscheidend bei der Entstehung von Atherosklerose ist die Dysfunktion der Endothelzellen, die über veränderte Stickoxidstoffwechsel und Reaktivität der Gefäße hinaus geht und die Permeabilität und Oxidation von Lipoproteinen beeinflusst. Darüber hinaus wird aber auch die Adhäsion von Monozyten sowie deren Ansammlung in der Intima gesteigert. Daher sind Monozyten und Makrophagen bereits sehr früh in die Pathogenese involviert. Die pathologischen Reize dafür können proinflammatorische Zytokine, Bakterienprodukte, Viren, sowie einige weitere Faktoren sein (Gimbrone and García-Cardeña, 2013). Durch die Aufnahme von modifizierten LDL-Partikeln über die Scavenger-Rezeptoren (Murphy et al., 2005) von Makrophagen, kommt es zu einer Anhäufung von modifizierten LDLs und zur Umwandlung in Schaumzellen, die die erste Plaque bilden, den „fatty streaks“. Diese ersten Läsionen führen zu einer Rekrutierung von weiteren Entzündungszellen und extrazellulären Lipiden und bilden eine pathologische Signalkette. Aus diesem Grund sind die Monozyten wichtige Zellen in der Betrachtung der Atherosklerose und Bestandteil des Versuchsaufbaus, bei dem die Adhäsionsmechanismen sowie die dadurch in

Gang gesetzten phagozytischen Abbauprozesse selektiv durch siRNA gehemmt werden sollen.

## 1.5 RNA-Interferenzen und siRNA

Aus unserer DNA (Desoxyribonucleinsäure) können über die RNA-Polymerase Abschnitte an Informationen über Gene und Stoffwechselfvorgänge und die dafür jeweilige benötigte RNA (Ribonucleinsäure) abgelesen werden.

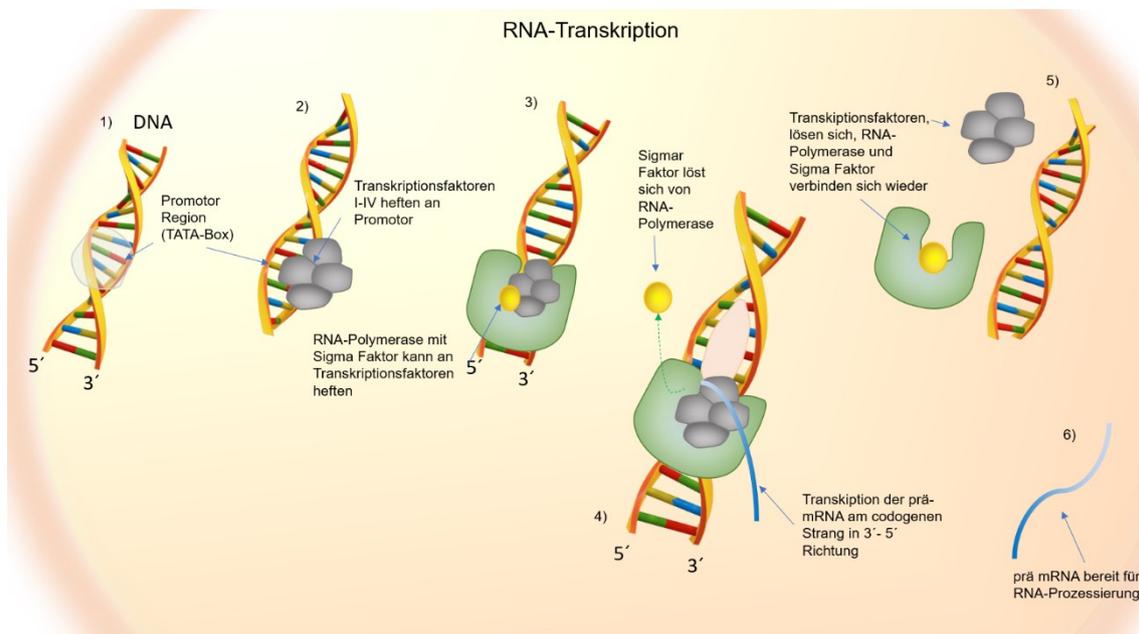


Abbildung 2 RNA-Transkription 1) die DNA besitzt eine Promotorregion, die sogenannten TATA-Box, 2) an die Nukleotidsequenz „TATA“ lagern sich die Transkriptionsfaktoren I-IV an, 3) nun kann die RNA-Polymerase kombiniert mit dem Sigma Faktor an die Faktoren anheften, 4) nach der Verbindung von RNA-Polymerase und den Transkriptionsfaktoren löst sich der Sigma Faktor ab und die Transkription der prä-mRNA am codogenen Strang beginnt in 3'-5' Richtung, 5) der Komplex erreicht eine Terminationsstelle und löst sich von der DNA und beendet die Transkription, 6) die fertige prä-mRNA ist zur RNA Prozessierung bereit (Quelle: adaptiert nach ©Garland Science, 2010).

Dabei wird die Doppelhelix aufgespalten und der codogene Strang komplementär mit den Nukleotiden aufgefüllt, was zur Entstehung der prä-mRNA führt. Bei der RNA werden die Basen Adenin, Guanin und Cytosin sowie Uracil anstatt Thymin, wie bei der DNA-Polymerase, verwendet.

Auf die Transkription der prä-mRNA folgt die RNA-Prozessierung. Dabei wird ein „5' Capping“ an das 5' Ende mit 7-Methyl-Guanyl-Triphosphaten und eine „Polyadenylierung“ an das 3' Ende, durch die Endonuklease, gehängt. Es entsteht eine Anreihung von Adenosin-Nukleotiden. Das „RNA-Editing“, mit der

Insertion, Deletion und Konvertierung von Nukleotiden zur Veränderung der mRNA, ergänzt durch das „Splicing“, dem Herausschneiden der Introns und Zusammenfügen der Exons, die RNA-Synthese und schließt diese ab (siehe Abb.2). Es wird je nach Funktion zwischen tRNA (Transport-RNA), mRNA (Messenger-RNA), rRNA (ribosomale RNA), miRNA (mikro-RNA) sowie siRNA (small interfering RNA) und weiteren RNA-Typen (Kapranov et al., 2010, Eddy, 2001) unterschieden.

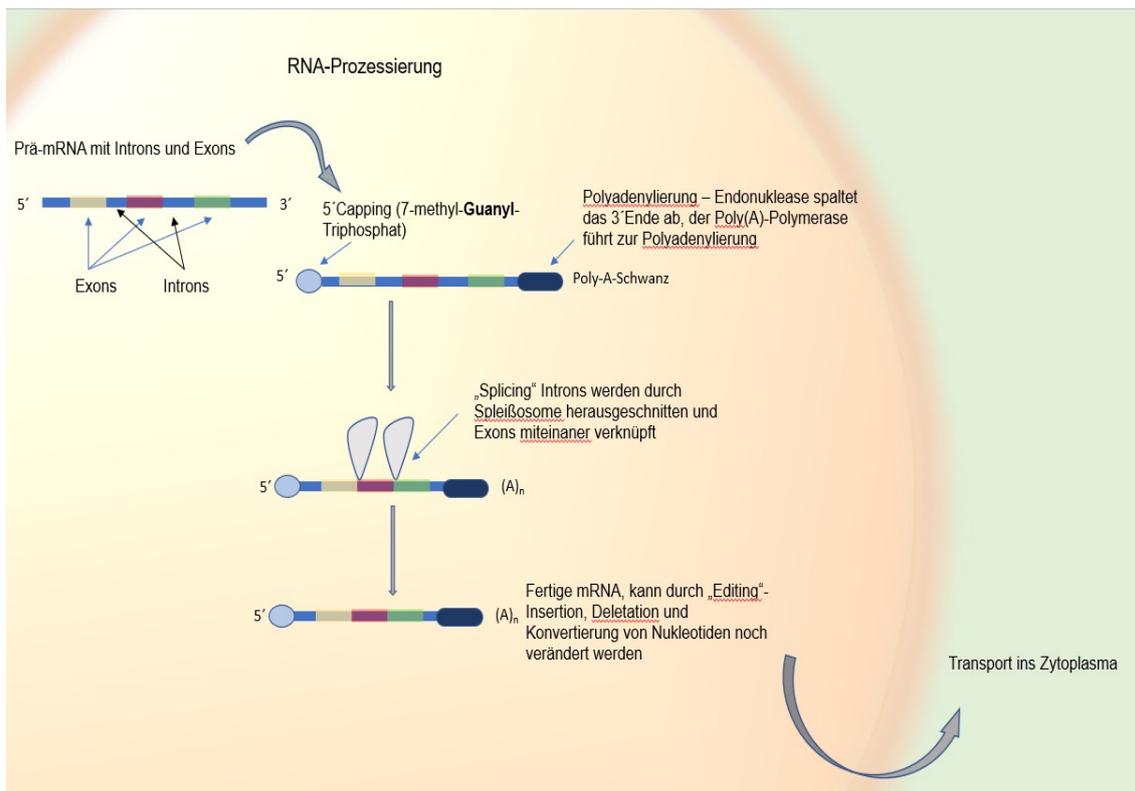


Abbildung 3 RNA-Prozessierung Die erstellte prä-mRNA wird am 5' Ende mit einer 7-methyl-Guanyl-Triphosphat-Kappe zum Schutz versetzt, sowie das 3' Ende durch die Polyadenylierung mittels Endonuklease mit einem Poly-Adenyl-Schwanz versehen. Über Spleißosome werden die Introns (nicht kodierte Bereiche) herausgeschnitten und die Exons (kodierte Bereiche) miteinander verbunden. Durch „Editing“ kann die mRNA noch modifiziert werden, bevor sie ins Zytosol abgegeben wird (Quelle: adaptiert nach Brigitte Meinhard, 2014, „Besonderheiten der Proteinbiosynthese bei Eukaryonten“).

Der natürliche Weg bei eukaryotischen Zellen eine bestimmte Genexpression zu hemmen, wird als RNA-Interferenz (Leal et al.) beschrieben. Die gezielte Genausschaltung wurde anfangs bei Pflanzen untersucht und dann beim Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* von Andrew Fire und Craig Mello 1998 postuliert (Fire et al., 1998). Dabei wird ein spezifischer Gen-Knockdown oder eine Genregulation der mRNA provoziert. Ihnen wurde dafür 2006 der Nobelpreis

für „Physiologie oder Medizin“ verliehen. Darauf aufbauend konnten im Jahr 1999 Hamilton und Baulcombe die siRNA (small interfering RNA), mit ihren 25 Nukleotiden, in Pflanzen isolieren und so den Zusammenhang des Knockdowns über die gezielte Basenpaarung der Ziel-RNAs und der daraus resultierenden besonderen Funktion aufzeigen (Hamilton and Baulcombe, 1999). Die fehlerfreie Übertragung auf eukaryotische Zellen war erst durch Elbashir und Kollegen im Jahr 2001 erfolgreich, die eine auf 21 Nukleotiden reduzierte Variante verwendet haben, die nicht die Protein-Kinase-R aktiviert, aber dennoch funktionstüchtig im Bereich des Gen-Silencing war (Elbashir et al., 2001a, Elbashir et al., 2001b). Der Vorgang der Genregulation oder des Knockdowns wird durch das Aufspalten der dsRNA, die von extern oder aus dem Zellkern stammt, durch ein Enzym namens „Dicer“ eingeleitet und es entstehen kleinere Fragmente von 20-25 Basenpaaren (siRNAs und miRNAs). Darauffolgend lagern sich mehrere Proteine, die den RNA-induced-silencing-complex (O'Driscoll et al.) bilden, an die passende siRNA oder miRNA an und lösen diese in zwei Einzelstränge auf. Der entgegengesetzte „antisense“ Leitstrang, komplementär zur Ziel-mRNA, wird benötigt, um an die Ziel-mRNA anzulagern. Der andere „sense“ Strang wird nicht benötigt und wieder abgebaut. Durch die komplementären Nukleotide findet eine Anlagerung an das passende Gegenstück der mRNA statt, wobei die siRNA passgenau ist und die miRNA nur teilweise kurze Basenpaarungen benötigt. Daraufhin wird die mRNA in kleine Fragmente zerschnitten. Diese kleineren Fragmente sind nicht sehr stabil und werden in kurzer Zeit wieder abgebaut. Dadurch verringert sich die Gesamtmenge der abzulesenden mRNA, dies bedeutet, dass auch ihre Intensität abnimmt, so dass es zu einer Inaktivierung der Genexpression kommt. Durch miRNA wird beispielsweise die Anlagerung von Ribosome verhindert und ebenfalls die Translation der mRNA unterbunden. Das Wirkspektrum der siRNA wird in Kombination mit der Transfektion in unserem Versuch genutzt, indem die siRNA mit Hilfe einer Transfektionsmethode (siehe Kapitel Transfektionsmethoden) in die Zelle eingebracht wird und dort zielgerichtet an die zu unterdrückende mRNA anlagert und somit ein Knockdown hervorrufen kann.

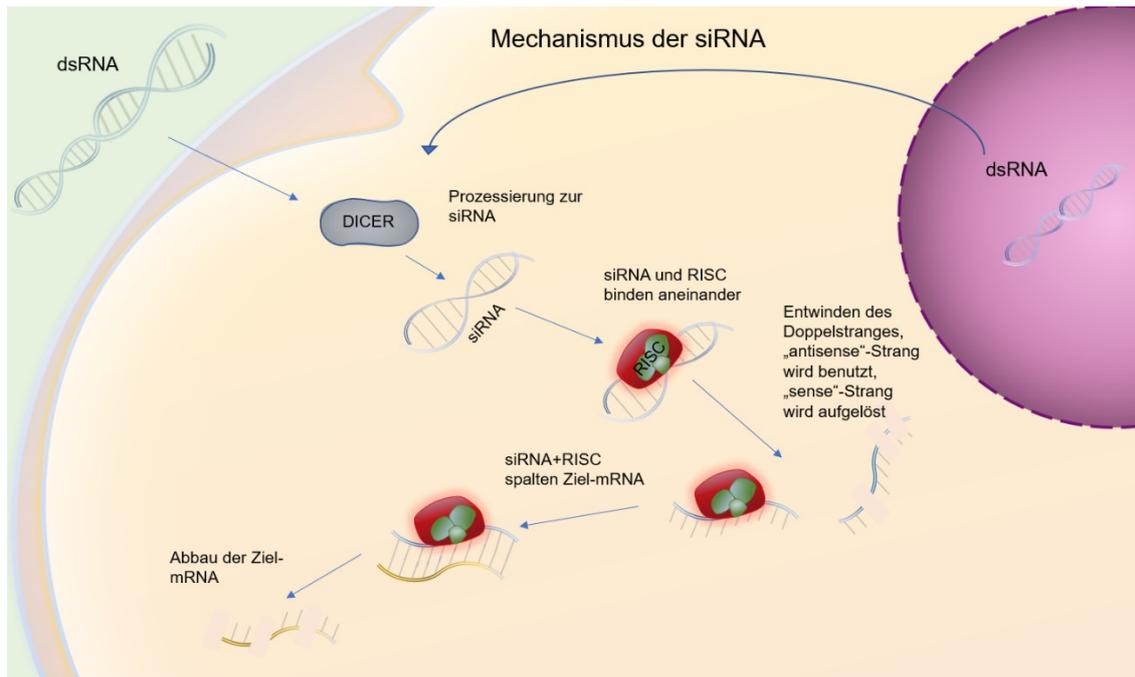


Abbildung 4 Mechanismus der siRNA dsRNA kann sowohl von Extern als auch aus dem Zellkern ins Zytosol gelangen, dort haftet sich das Enzym „Dicer“ an und prozessiert es zu einer siRNA um. An die siRNA kann sich nun der RNA-induced Silencing Complex (O’Driscoll et al.) anlagern und den Doppelstrang entwinden, so dass der „antisense“ von „sense“- Strang gelöst wird. Der „sense“-Strang wird aufgelöst und der „antisense“-Strang mitsamt des RISC lagern an die komplementäre mRNA an mit dem Ziel diese abzubauen. Die mRNA-Fragmente werden über Enzyme weiter abgebaut (Quelle: adaptiert nach ©Richard Robinson/PLoS).

## 1.6 Transfektionsmethoden

Die Transfektion beschreibt das Einbringen fremder DNA/RNA in eukaryotische Zellen, mit dem Ziel, Plasmide, Antisense-Oligonukleotide oder siRNA zeitweilig oder permanent einzuschleusen. Es besteht dabei die Herausforderung negativ geladene Moleküle, wie die RNA, in das Zytosol der Zelle einzubringen, die von einer negativ geladenen Doppellipidmembran isoliert wird. Hierbei kann die mRNA, die Expression von zellfremden Proteinen und die siRNA, die zelleigene Proteinsynthese verringern und / oder unterdrücken. Man unterscheidet im Wesentlichen drei Gruppen mit verschiedenen Methoden und Reagenzien entsprechend ihrer Funktion.

## ***Biologische Verfahren***

Dieses Verfahren benutzt biologische Transportmittel für die Einschleusung von Plasmid-DNA in die Zelle. Als Beispiel kann die rezeptorvermittelte Transfektion (Transduktion) oder die virusvermittelte Transfektion genannt werden, bei der nicht mehr pathogene Retro-, Adeno- oder Lentiviren verwendet werden.

## ***Physikalische Verfahren***

Zu den physikalischen Verfahren zählen die Mikroinjektion, die Elektroporation, die „Particle Gun“ Methode (Williams et al., 1991), die „Magnet assisted Transfection“ (Bertram, 2006) sowie die Sonoporation (Song et al., 2007). Alle diese Verfahren sind aufwändig in der Anwendung oder brauchen teure Gerätschaften zur Durchführung. Sie perforieren die Membranwand, um sie durchlässig für Fremd-DNA/ -RNA zu machen oder überwinden direkt die Doppellipidschicht und präsentieren die RNA im Zytosol.

## ***Chemische Verfahren***

Um die beiden jeweils negativ geladenen Pole (RNA und Zellmembran) miteinander zu verschmelzen werden bei den biochemischen Verfahren Kalziumphosphat, Diethylaminoethyl-Dextran (DEAE) oder kationische Liposome verwendet, die eine Neutralisation oder eine positiv geladene Ummantelung vermitteln, so dass das Transfektionsreagenz in der Lage ist mit der RNA die Zellmembran zu passieren (Gstraunthaler and Lindl, 2013).

Sowohl DEAE als auch kationischen Liposomen besitzen eine gewisse Zytotoxizität, die konzentrationsabhängig ist und sich oft direkt in der Transfektionseffizienz von schwer zu transfizierenden Zellarten widerspiegelt (Koenig et al., 2017). In unserem Versuchsaufbau wird die Transfektion der siRNAs mittels Interferin, ein kationisches Lipid, durchgeführt.

## 1.7 Zielsetzung

Da Atherosklerose die Grundlage für die meisten Herzkreislauferkrankungen darstellt und durch genetische wie auch umweltbedingte Faktoren beeinflusst wird (Libby, 2012), zeigt sich trotz medizinischen Fortschritts keine eindeutig überlegende Therapiestrategie. Durch die Weiterentwicklung der Aufklärung der Erkrankung und chirurgische Strategien, sowie Materialien mit therapeutischen Ansätzen, wird das individuelle Therapiekonzept immer weiter verbessert. Allerdings bleiben die Risiken von iatrogenen Komplikationen, Restenosen und das Voranschreiten der Erkrankung immer noch bestehen.

Aus diesem Grund ist die Entwicklung eines Modells einer Gefäßwand, zur Verfolgung von therapeutischen Ansätzen, ein weiterer Schritt in der Erforschung der multifaktoriellen Erkrankung mitsamt seiner Komplexität. Die bereits bestehenden Gerüste, die zur Aufzucht von Zellen geeignet sind, zeigen einen Ansatz, der allerdings bis jetzt meistens auf eine Zellschicht selbst in einem 3D Modell beschränkt und auf allogenes oder xenogenes Material angewiesen ist. Dabei wird die Komplexität, bestehend aus dem dreidimensionalen Gefäßwandaufbau sowie der Interaktion zwischen den Zellen und den Zelltypen, meist außen vorgelassen.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Etablierung eines Prototyps einer Gefäßwand und konzipiert damit eine Basis die Ansätze der Atherosklerose und ihre Verlaufsstadien, in unserem Fall das initiale Stadium, in vitro zu betrachten. Gleichzeitig werden die Eigenschaften aller beteiligten Zelltypen sowie deren Interaktion und Beeinflussung untereinander real in den Versuchsaufbau integriert. Der zweite Teil verknüpft die Anwendung siRNA/ mRNA basierter Therapieansätze, die bereits bekannte Protagonisten in vielfältigen Forschungsbereichen sind, mit dem in vitro 3D Modell einer Gefäßwand. Die Anwendungsmöglichkeit der siRNA soll als direkte Transfektion auf die Endothelzellschicht des Modells aufgebracht werden und so die Hemmung der Leukozytenanheftung und Diapedese bewirken. Dabei soll festgestellt werden, ob diese Methode, mit dem hier verwendeten Gewebekleber Beriplast® und den verwendeten Zelltypen (ECs, hTERT-SMCs, MM6), eine

simplere und individuellere Therapiestrategie zunächst für Forschungszwecken simulieren kann. Das klinische Ziel soll die Unterdrückung der Adhäsionsmolekülkaskade oder später auch anderer pathologischer Eigenschaften sein und damit eine spezialisierte Genausschaltung, die langfristig eine patienten-individuell ausgerichtete Anwendung ermöglicht.

## 2 Material und Methoden

Gerät	Hersteller (Ort)
Abstrich-Wattestäbchen steril, einzeln, 15cm	
Axiovert 135, Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf AG, Jülich, Deutschland
Bio-Rad Microseal® „B“ seal	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hemel Hempstead, United Kingdom
CASY-1 Technology	Schärfer System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Centrifuge 5415C	Eppendorf AG, Jülich, Deutschland
Centrifuge 5415R	Eppendorf AG, Jülich, Deutschland
Centrifuge 5810	Eppendorf AG, Jülich, Deutschland
CFX Connect™ Real-Time System	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirch, Deutschland
Chirurgische Pinzette, 15 cm	GeVuMed©, Tuttlingen, Deutschland
Chirurgische Schere, Standart, gerade	GeVuMed©, Tuttlingen, Deutschland
Corning® Costar® Stripette® serologische Pipetten 10 mL, 25 mL	Sigma Aldrich Co. LLC, Vertrieb Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Eppendorf Dualfilter 100 µl, PCR clean/steril	Eppendorf AG, Jülich, Deutschland
Eppendorf Tube 0,5 mL DNA LoBind	Eppendorf AG, Jülich, Deutschland
Eppendorf Tube 1,5 mL DNA LoBind	Eppendorf AG, Jülich, Deutschland
Eppendorf Tube 2.0 mL DNA LoBind	Eppendorf AG, Jülich, Deutschland
Eppendorf Tubes 2.0 mL Safe-Lock	Eppendorf AG, Jülich, Deutschland
Eppendorf twin.tec realtime PCR Plate 96	Eppendorf AG, Jülich, Deutschland
FACScan Becton Dickinson	Becton Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ, USA
Greiner Bio-One Cellstar® Multiwellplatte 12-Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Greiner Bio-One Cellstar® Multiwellplatte 6-Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Greiner Bio-One Cellstar® Petrischale 100/20 MM	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Greiner Bio-One Cellstar® Tubes 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Greiner Bio-One Cellstar® Zellkulturflasche T175	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Greiner Bio-One Cellstar® Zellkulturflasche T75	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Greiner Bio-One CRYO.S™	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Greiner Cellstar Tubes 15 mL	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Heraeus Sepatech Varifuge 3.2 RS	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
Hera-Safe sterile Werkbank	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
Inkubator	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Inkubator	Thermo Fischer Scientific Inc, Waltham, MA, USA
Kamera AxioCam MRm	Carl Zeiss AB, Oberkochen, Deutschland
Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Jülich, Deutschland
Mini Spin Plus	Eppendorf AG, Jülich, Deutschland
Multiply®-Pro Gefäß 0,2 ml PP	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Schüttelwasserbad GFL 1083	LAUDA-Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Starlab Tipone Filtertip 100 µl	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
Starlab Tipone Filtertip 1000 µl	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
Starlab Tipone Filtertip 20 µl	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
Sterile Einmal-Handschuhe Peha- Soft® nitril Gr.S	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Jülich, Deutschland
Tischautoclave Systec DX-23	Systec GmbH, Linden, Deutschland
Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation	PEQ-Lab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Vortex Genie-2	Scientific Industries Inc., Bohemia NY, USA

*Tabelle 1 verwendete Geräte und Materialien*

Reagenzien/Chemikalie/Antikörper	Hersteller und Sitz des Herstellers
0,05% Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	gibco® by life Technologies™, Carlsbad Kalifornien USA
10% FBS Superior (Fetal Bovine Serum)	Biochrom GmbH, Berlin Deutschland
37% HCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
99% Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Alpha Actin FITC, monoclonal Anti-Actin, α-smooth muscle FITC	Sigma Aldrich Co. LLC, Vertrieb Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Alpha Actin PerCP, alpha smooth muscle Actin Antibody	Sigma Aldrich Co. LLC, Vertrieb Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Amphotericin B 250µg/ml	PromoCell, Heidelberg Deutschland
Ampuwa 1000 ml Plastipur®	Fresenius Kabi, Bad Homburg Deutschland
Anti-Human CD-90 FITC	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Basalmedium ECs VascuLife®	Lifeline Cell Technology, CellSystems® Biotechnologie Vertrieb GmbH, Troisdorf Deutschland
Beriplast P® Combi-Set 0,5/1/3 ml	CSL Behring GmbH, Marburg Deutschland
BSA	gibco® by life Technologies™, Carlsbad Kalifornien USA
CASYTon®	Innovatis AG, Reutlingen Deutschland
CD14	BioRad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA
CD45	BioRad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA

CD68	BioRad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA
Connexin 43	BioRad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA
DAPI	Sigma Aldrich Co. LLC, Vertrieb Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
DMEM Dulbecco's modified eagle Medium	gibco® by life Technologies™, Carlsbad Kalifornien USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	gibco® by life Technologies™, Carlsbad Kalifornien USA
DPBS +Ca,+Mg	gibco® by life Technologies™, Carlsbad Kalifornien USA
DPBS -Ca,-Mg	gibco® by life Technologies™, Carlsbad Kalifornien USA
E-Selektin	BioRad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA
FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg Deutschland
FACS Rinse	BD Biosciences, Heidelberg Deutschland
FCS	gibco® by life Technologies™, Carlsbad Kalifornien USA
GAPDH	BioRad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA
Gentamycin 50mg/mL	gibco® by life Technologies™, Carlsbad Kalifornien USA
HCl	Sigma Aldrich Co. LLC, Vertrieb Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
hTERT- immortalized Human Carotid Artery Smooth Muscle Cells	abm® Applied Biological Materials Inc., Richmond BC, Canada
ICAM-1	BioRad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA

IL-8	BioRad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA
Interferin (siRNA)	BioRad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA
Interferin®	Polyplus Transfektion®, Illkirch, Frankreich
iQTM SYBR® Green Supermix	BioRad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA
iSCRIPT cDNA Synthesis Kit	BioRad Laboratories GmbH, München Deutschland
Kollagenase Typ II K02-039	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
LifeFactors® VascuLife® EnGS	Lifeline Cell Technology, CellSystems® Biotechnologie Vertrieb GmbH, Troisdorf Deutschland
LifeFactors® VascuLife® VEGF	Lifeline Cell Technology, CellSystems® Biotechnologie Vertrieb GmbH, Troisdorf Deutschland
MM6-Medium VLE RPMI 1640 Medium	gibco® by life Technologies™, Carlsbad Kalifornien USA
MonoMacs-6 acute monocytic leukemia	DSMZ, Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Braunschweig Deutschland
MycoKill™	Avidin Biotechnology, Szeged, Ungarn
NEAA (non-essential amino acids 100x Cat M11-003)	gibco® by life Technologies™, Carlsbad Kalifornien USA
OPI Supplement (Hybri-Max Supplements Lyophilisat)	Sigma Aldrich Co. LLC, Vertrieb Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich Co. LLC, Vertrieb Merck KGaA Darmstadt, Deutschland

PBS	gibco® by life Technologies™, Carlsbad Kalifornien USA
PE Mouse Anti-Human CD31-PE	BD Pharmingen™, San Jose, CA, USA
PECAM	BioRad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA
PenStrep (+10,000 Units/mL Penecillin, +10,000 Units/mL Streptomycin)	gibco® by life Technologies™, Carlsbad Kalifornien USA
Pirigrow II Medium, LifeFactors®	Lifeline Cell Technology, Troisdorf Deutschland
qRT-PCR klassifiziertes Wasser	BioRad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA
RNA Isolation Kit	BioRad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA
SCR siRNA	BioRad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA
siRNA	Qiagen, Hilden Deutschland
TNF alpha	gibco® by life Technologies™, Carlsbad Kalifornien USA
TNS alpha (Trypsin Neutralizing solution)	gibco® by life Technologies™, Carlsbad Kalifornien USA
Tween® Detergenz	Sigma Aldrich Co. LLC, Vertrieb Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Universal siMAX siRNA Buffer	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachussetts, USA
VascuLife® SMC	Lifeline Cell Technology, CellSystems® Biotechnologie Vertrieb GmbH, Troisdorf Deutschland
VCAM-1	BioRad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA
VLE-RPMI Medium 1640, -Glutamine, -Phenol Red	gibco® by life Technologies™, Carlsbad Kalifornien USA

*Tabelle 2 verwendete Reagenzien/Chemikalie/Antikörper*

## **Medien**

### Lösung A:

Die Lösung A wird auf 1 Liter berechnet und es wurden Lösungen in der Menge von 500 ml mittels Ampuwa hergestellt. Es wird ein pH-Wert von 7,3 eingestellt und daraufhin in 50 ml Falcons aliquotiert. Diese 50 ml Falcons können auch auf Vorrat eingefroren werden.

Berechnung pro Liter:

137 mM NaCl (8,006 g/L)

5,4 mM KCl (0,403 g/L)

4,2 mM NaHCO<sub>3</sub> (0,353 g/L)

5 mM D-Glucose (0,901 g/L)

### Kollagenase:

K02-039 PAA

Kollagenase Typ 2

1 ml der Kollagenase zu 11 ml PBS hinzugeben und unter aseptischen Bedingungen zusammen pipettieren und nicht mehr filtern.

### RNA- Isolierung:

Es wird das Aurum Total RNA Mini Kit (BioRad) # 732-6820 verwendet.

Das Vorgehen zur RNA-Isolierung als genaue Methode ist unter Kapitel 2.1.18 detailliert beschrieben.

### cDNA-Synthese und qRT-PCR:

Der cDNA- Ansatz wird wie folgt hergestellt:

15 µl RNA-Lösung bestehend aus: 200 ng RNA in 15 µl H<sub>2</sub>O auflösen und dann mit dem Kit vermischen. 1 µl Reverse Transkriptase + 4 µl 5-fach Mix sind als Kit bereits vorhanden und werden zusammen vermischt.

Hauptmix:

Besteht  $\frac{3}{4}$  aus SYBR® Green Menge und  $\frac{1}{4}$  Primermenge (siehe Primermix) und wird wie folgt hergestellt:

36 µl (Hauptmix für die Triplets) x (Menge der Proben) +1 (Triplet), dies entspricht der Menge des Hauptmixes insgesamt.

Primermix:

Primer nach Angaben von Operon® in benötigter Menge H<sub>2</sub>O auflösen, so dass eine 100 µM Konzentration entsteht.

800 µl H<sub>2</sub>O + 15 µl sense und 15 µl antisense Primer ergeben den Primermix.

Mix für die Triplets der qRT-PCR:

36 µl des Hauptmixes und 18 µl cDNA ergeben jeweils 15 µl Gemisch pro Triplet für die qRT-PCR Platten.

### FACS-Lösung:

12,5 g Paraformaldehyd mit PBS auf Gesamtmenge von 500 ml auffüllen.

Im Wasserbad soll dies unter dem Abzug auflöst werden.

Es wird ein pH von 7,4 eingestellt und steril filtriert.

Abschließend in 50 ml Falcon aliquotieren.

#### 0,5% FCS:

Fertiges inaktiviertes FCS in 500 ml PBS auflösen.

Einen pH von 7,4 mit Hilfe von 600 µl NaOH einstellen und steril filtrieren, abschließend in 50 ml Falcon aliquotieren.

.

#### Färbepuffer:

Bestehend aus PBS mit 0,5% BSA und 0,5% Tween (Detergenz).

#### DAPI:

DAPI in 2 ml H<sub>2</sub>O lösen (entspricht 5 mg/ml = 10,9 mM DAPI-Stocklösung).

Stocklösung mit PBS 1:40.000 verdünnen (100 ml PBS + 2,75 µl DAPI-Stocklösung) und in eine Flasche geben und eine Konzentration von 300 nM herstellen.

#### 2M HCl:

2010 µl H<sub>2</sub>O (Ampuwa) + 490 µl 37% HCl in 15 ml Falcon ansetzen.

#### Waschpuffer:

PBS mit 0,5% BSA (2,5 g BSA in 500 ml PBS) lösen.

#### Sodiumborat:

10,6 g Paraformaldehyd in 500 ml PBS auflösen und einen pH von 7,4 herstellen.

#### 70% Ethanol

35 ml 99% Ethanol mit 15 ml Ampuwa ansetzen, dies kann auf Vorrat eingefroren werden.

#### Prigrow II Medium:

Prigrow II (TM002) Medium mit 5% FBS und 5 ml Pen/Strep versetzen.

SMC-Medium:

Basalmedium VascuLife®+ LifeFactors®Kit (L-Glutamine, rh Insulin, rhFGF-b, Ascorbic Acid, rh EGF, RBS) + Amphotericin B (0,5 ml 15 µl/ml) +Gentamycin (0,5 ml 30 mg/ml) mischen.

VascuLife® EnGS-Medium (ECs):

VascuLife® EnGS-Medium + LifeFactors®Kit (FBS, L-Glutamine, rh EGF, Heparin, EnGS, ohne Hydrocortisone Hemiscuccinate) + Amphotericin B (0,5 ml 15 µl/ml) +Gentamycin (0,5 ml 30 mg/ml) mischen.

VLE-RPMI 1640 Medium- Firma Biochroma AG:

90% RPMI 1640, + 10% h.i. FBS, + 2 mM L-Glutamine, + Non-Essential Amino acids, +1 mM Sodium Pyruvate, + 10 µg/ ml Human Insulin + 1% OPI Media Supplement Hybrid-Max (Sigma) mischen.

VascuLife® VEGF-Medium:

VascuLife®-Medium + LifeFactors®Kit (rh FGT, Ascorbic Acid, Hydrocortisone Hemiscuccinate, FBS, L-Glutamin, rh IGF-1, rh EGF, rh VEGF, Heparin Sulfate) + Amphotericin B (0,5 ml 15 µl/ml) +Gentamycin (0,5 ml 30 mg/ml) mischen.

Beriplast P®:

Combi-Set 0,5/1/3 ml Pulver und Lösungsmittel

Combi-Set I besteht aus: humanem Fibrinogen, Gerinnungsfaktor XII (human), Aprotinin (aus Rinderlunge)

Combi-Set II besteht aus: humanem Thrombin, Calciumchlorid

Pro 100 µl: 4,44 µl Fibrinlösung + 95,5 µl PBS

0,5 µl Thrombinlösung + 99,5 µl PBS mischen.

Umrechnung auf ein Well mit 300 µl Gewebekleber:

Pro Well werden insgesamt 300 µl Gewebekleber mit Zellen benötigt, dies entspricht .150 µl (Fibrinlösung +PBS) + 150 µl (Thrombinlösung + PBS).

MycoKill™:

1000fach Konzentration auf 500 µl / 500 mlMedium aufteilen.

Verwendete Primer/Sequenzen:

qRT-PCR Primer:

Name	Richtung	Sequenz 5´nach 3´
humGAPDH	sense	TCAACAGCGACACCCACTCC (20)
	antisense	TGAGGTCCACCACCCTGTTG (20)
Human Connex43	sense	TTTAAGCAAAAGAGTGGTGC (20)
	antisense	GTTGAGTAGGCTTGAACCTT (20)
Human CD68	sense	TACCAGGCCCTCTGAGCATT (20)
	antisense	CGGCGTGTCGAGGAAATAAG (20)
CD45	sense	TGGTGGGAATACAATCAGTTTGG AG (24)
	antisense	CCAATGTGCTGTGTCCTCCAG (21)
IL-8	sense	GACTTCCAAGCTGGCCGTG (19)
	antisense	CTCCTTGGCAAACACTGCACC (20)
PECAM 1	sense	GAACGGAAGGCTCCCTTGA (19)
	antisense	AGGGCAGGTTTCATAAATAAGTG C (23)
Human ICAM-1	sense	CTTGAGGGCACCTACCTCTGTC (22)
	antisense	CGGCTGCTACCACAGTGATG (20)
Human VCAM-1	sense	ACACTTTATGTCAATGTTGCC C (23)
	antisense	Nicht von Operon molecules for life angegeben
Selectin E	sense	GCCCAGAGCCTTCAGTGTACC (21)
	antisense	GGAATGGCTGCACCTCACAG (20)

CD14	sense	GTTGCTGCTGCTGCTGCC (18)
	antisense	AAGTTGCAGACGCAGCGGA (19)
Interferine $\alpha$	sense	CCGTCTCCTACCAGACCAAGG (21)
	antisense	CTGGAAGACCCCTCCCAGATA G (22)
SCR siRNA	Nicht von Operon molecules for life angegeben	Nicht von Operon molecules for life angegeben

*Tabelle 3 verwendete Primer und Sequenzen*

Definition der verwendeten Marker:

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

Das Protein wird als Haushaltsgen beschrieben und in fast allen Zellen exprimiert und kann deshalb als Ladungskontrolle für die qRT-PCR als Biomarker herangezogen werden. Es katalysiert die Glykolyse, spaltet Glukose und generiert Karbonmoleküle, des Weiteren ist es an Transkriptionsvorgängen, RNA-Transport und DNA-Replikation und Apoptose beteiligt (Sirover, 2020).

Cx 43: Connexin 43

Cx 43 ist ein Strukturprotein und Teil der „Gap Junctions“-Familie. Es ist ein homomeres Connexon und kann über Clusters Zell-zu-Zellverbindungen herstellen, die für viele biologische Prozesse wie „Zellmigration, Embryogenese, Zellpolarität, Spermatogenese und Entzündungen“ eine Rolle spielt. Darüber hinaus scheint durch die Hochregulation der Cx-43 Expression, zum Beispiel von Makrophagen ausgelöst, die Regulation des Schweregrades einer entzündlichen Erkrankung wie Atherosklerose beeinflussbar zu sein (Li et al., 2018b).

CD68: Oberflächenprotein aus der Gruppe der LAMP-Proteine und Zelladhäsionsmolekül

Es handelt sich vor allem um ein Protein der monozytischen Zelllinienabstammung, wie zirkulierende Makrophagen und Gewebemakrophagen und dient als Zelltypmarker.

CD45: Oberflächenprotein aus der Gruppe der Proteinphosphatasen

Der Rezeptor-Typ Tyrosin-Proteinphosphatase C ist ein membranständiges Protein und wird vorwiegend von hämatopoetischen Zellen und Leukozyten exprimiert. Er stellt einen wichtigen Anteil bei der rezeptorvermittelten Aktivierung von B- und T-Zellen sowie Leukozyten.

IL-8: Interleukin 8

IL-8 ist ein neutrophiler chemotaktischer Faktor und wird als Chemokin beispielsweise von Makrophagen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen sowie Epithelzellen produziert. Es spielt eine entscheidende Rolle bei Entzündungsreaktionen (Harada et al., 1994).

PECAM-1: Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül

Synonym ist es auch als CD31 bekannt und ein transmembranes Glykoprotein und wird konstant von allen vaskulären Zellen exprimiert und spielt eine Rolle bei entzündlichen Prozessen sowie der Interaktion von Leukozyten und Endothelzellen. Darüber hinaus regelt es die Angiogenese, Thrombozytenfunktion und Thrombose (Newman et al., 2001, Woodfin et al., 2007).

ICAM-1: Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1

Ist ein interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 der Gruppe der Immunoglobuline. Es wird vorwiegend von Endothelzellen, Epithelzellen und Immunzellen exprimiert (Hubbard and Rothlein, 2000). ICAM-1 ist bei der Diapedese von Lymphozyten in das Gefäßendothel beteiligt und wird damit ein Teil des inflammatorischen Prozesses.

VCAM-1: vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1

Entstammt aus der Gruppe der Immunoglobuline und wird in großen sowie kleinen Blutgefäßen von stimulierten Endothelzellen exprimiert. Es ist verantwortlich für die Rekrutierung, Anheftung und Transmigration von verschiedenen Zellen wie Monozyten, Lymphozyten, basophilen und eosinophilen Zellen (Meigs et al., 2004).

E-Selektin: Endothel-Selektin

Das Endothel-Leukozyten-Adhäsionsmolekül ist ein Zelladhäsionsmolekül, das ausschließlich von Endothelzellen exprimiert wird. Dabei werden die Zellen von Zytokinen wie beispielsweise TNF $\alpha$  aktiviert und spielen eine entscheidende Rolle bei entzündlichen Prozessen.

CD14: Glykoprotein CD14

Es handelt sich um ein Oberflächenprotein, das Liposaccharide bindet und als Endotoxin-Rezeptor fungiert. CD14 wird vor allem von Monozyten und Makrophagen gebildet (Naeim et al., 2018) und ist Teil des unspezifischen Immunsystems und an der Apoptose von Endothelzellen beteiligt.

SCR-siRNA: scramble siRNA

Die SCR-siRNA stellt eine verschlüsselte Sequenz mit der gleichen Nukleotidzusammensetzung, wie die zu untersuchende siRNA dar, mit dem Unterschied, dass es eine durcheinander gebrachte Reihenfolge ist und somit als Nullprobe für die originale siRNA dienen soll, um so die funktionale Spezifität der siRNA zu prüfen.

### ***Anzüchten von Endothelzellen***

Ein Venenstück wird für 20 Minuten bei 37°C in ein Vollmedium aus DMEM oder RPMI gelegt. Danach erfolgt eine Spülung mit 10 ml Lösung A. Als nächstes wird die Vene mit 1-2 ml Kollagenase gespült und ein Ende mittels Bulldogklemme verschlossen. Es wird mit so viel Kollagenase wie möglich aufgefüllt und das zweite Ende durch eine weitere Bulldogklemme verschlossen. Das Venenstück wird in eine Petrischale gelegt, mit etwas Medium feucht gehalten und bei 37°C für 1 Stunde in den Brutschrank gestellt.

Nach Ablauf der Zeit wird eine der beiden Bulldogklemmen entfernt und der gesamte Inhalt in ein 15 ml Falcon gegossen. Eine 10 ml Spritze wird mit PBS (-Ca, Mg) aufgezogen und zum Spülen der Vene verwendet, auch diese Flüssigkeit wird wieder im selben Falcon aufgefangen. Das Falcon wird bei 200-300xg für 5

Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das gewonnene Zellpellet wird in 1 ml Endothelzellmedium aufgenommen und der gesamte Inhalt in ein Well einer 6-Well Platte pipettiert und mit 2 ml Medium ergänzt. Am darauffolgenden Tag erfolgt ein Mediumswechsel, der die restliche Kollagenase entfernt.

Je nach Dichte und Homogenität der Zellen, sollte ein Well/ Flasche alle 4-6 Tage gesplittet werden, um ein gleichmäßiges Wachstum zu induzieren.

Die Endothelzellen müssen zunächst aus den Zellkulturflaschen/ Wells gelöst werden.

Dazu wird das Zellmedium abgesaugt und die Zellen mit 3 ml (bei einer 6 Wellplatte pro Well) PBS (ohne Ca und Mg) gewaschen.

Anschließend werden 3 ml Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben. Der Ablösevorgang kann unter dem Mikroskop beobachtet werden und durch vorsichtiges Klopfen gegen die Wellplatte oder Zellkulturflasche unterstützt werden.

Nach dem vollständigen Ablösen der Zellen wird 3 ml TNS zu den Zellen dazugegeben. Dies stoppt den enzymatischen Verdau.

Die Zellsuspension wird anschließend in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 200-300xg für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml frischem Endothelzellmedium gelöst.

Wenn die Zellkultur in Flaschen ausgesät wird, muss die Menge entsprechend der Flaschengröße angepasst werden, d.h. bei 25 ml Flaschen wird 6ml Trypsin/EDTA und 6 ml TNS $\alpha$  verwendet.

### ***Zellzahlbestimmung***

Hierfür werden 20  $\mu$ l der 1 ml gelösten Zellsuspension mit 80  $\mu$ l Trypanblau vermischt. Die Neubauerzählkammer wird nochmal kurz mit einem trockenen Tuch gereinigt und das Deckgläschen auf der Kammer befestigt (z.B. durch

Anhauchen). Es wird genau so viel Zellsuspension in die Kammer pipettiert, dass sie bis zum Rand gefüllt ist, jedoch keine Flüssigkeit herausquillt.

Anschließend wird die Zellzahl in allen vier großen Quadraten gezählt, um daraus die Gesamtzellzahl zu ermitteln.

### ***Zellzahlbestimmung mittels CASY***

Um die Zellzahl zu bestimmen werden 20 µl des Zellpellets der ECs entnommen und in 5 ml CASY-Lösung hinein pipettiert, mit weiteren 5 ml CASY-Lösung versetzt, und in das Gerät gestellt. Bei den SMCs wird eine Menge von 40 µl auf 10 ml CASY-Lösung verwendet und das jeweilige Programm entsprechend der Zellgröße zur Auszählung ausgewählt.

### ***Anzüchten von SMCs***

Nach dem Ablösen der Endothelzellschicht wird das Venen-/ Arterienstück in eine neue Petrischale gelegt und mit Hilfe einer Pinzette und Schere aufgeschnitten. Die Endothelzellseite wird mittels eines Schabers oder eines Wattebüschels ausgestrichen und mit der Endothelseite nach unten auf die Petrischale gelegt. Darauf wird mit zwei Pinzetten vorsichtig versucht das Fettgewebe sowie die Fibroblastenschicht abziehen, bis die Adventitia vollständig beseitigt wurde.

Das gesamte Gewebestück wird in viele kleinere Teilstücke zerschnitten, vorsichtig auf eine 6 Well-Platte mit Gelatine übertragen und glattgestrichen. Die Endothelzellseite zeigt nach unten, um eine möglichst großflächige Anheftung zu gewährleisten. Die 6-Well-Platte wird für 30 Minuten ohne Medium in den Brutkasten gestellt. Danach wird jedes Well mit 1,5 ml Medium benetzt, so dass alle Gewebestücke vollständig bedeckt sind. Es hat sich nach einigen Versuchen gezeigt, dass mehr Zellen schneller auf dem Well unter dem Mikroskop zu sehen sind, wenn das Venenstück in viele kleinere Stücke zerteilt wird, so dass die SMCs mehr Möglichkeiten haben herauszuwachsen.

Beim Mediumswechsel wird das Medium mit der Hilfe eines Pipetus abgesaugt und durch ein neues Medium ersetzt. Nach ca. 2-3 Wochen sprießen die ersten Zellen aus dem Gewebe ins Well ein. Sobald ein Gewebestück im Well mit einer dicht besiedelten Umgebung zu beobachten ist, können die Gewebestücke entfernt und das Well vollständig und flächendeckend besiedelt werden. Sobald zwei Wells flächendeckend sind, können diese mittels Trypsin 3ml/Well und TNF $\alpha$  3 ml/Well abgelöst und in einem Falcon mit der Größe von 15 ml aufgefangen werden. Sie werden zentrifugiert (200-300xg für 5min). Man kann entsprechend der Zellzahl neue Wells oder Flaschen besiedeln. Dabei ergibt eine 6-Well Platte eine orangene Flasche mit 12 ml Inhalt, oder eine orangene Flasche kann auf 2 neue aufgeteilt werden. Des Weiteren kann eine orangene Flasche auch auf eine 25 ml rote Flasche umgesiedelt werden.

Die 6-Well Platten werden mit 3ml, die orangenen Flaschen mit 12 ml und die roten Flaschen mit 25 ml Medium befüllt. Der Mediumswechsel sollte je nach Mediumszustand und Zellzahl alle 3-4 Tage durchgeführt werden, wobei die Besiedelungsdichte der Zellen nicht mehr als  $\frac{3}{4}$  der Fläche betragen sollte, um Stressfaktoren bei der Aufzucht zu vermeiden.

### ***Einfrieren von Zellen***

Die Zellen (ECs, SMCs, MM6) sollten vor dem Passagieren der Kultur mit PBS gewaschen und über Trypsin und TNS (jeweils 3/6/12,5 ml für 6-well Platten / 12 ml Flasche/ 25 ml Flasche) vom Well oder der Flasche gelöst werden. Der Überstand wird in ein Falcon 15 ml/30 ml-Größe aufgenommen und bei 200-300xg 5 Minuten (bei MM6s laut Herstellerangaben 6 Minuten) lang zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in 900  $\mu$ l Medium aufgenommen und vorsichtig in ein Cryo-Röhrchen pipettiert, in das vorher 100 $\mu$ l DMSO gegeben wurde. Anschließend wird das Zellpellet mit Medium über eine Gefrierbox (Ethanolgemisch) in einen minus 80°C Kühlschrank für 24 Stunden gegeben und danach in einen Tank mit Flüssigstickstoff überführt. In einem Cryo-Röhrchen von 1ml Inhalt sollten ca.  $2 \times 10^6$  Zellen (EC)/  $4-6 \times 10^6$  SMC / $5 \times 10^6$

MM6 eingefroren werden. Mittels CASY wird die Zellanzahl einer Flasche bestimmt und auf die Cryo-Röhrchen verteilt.

### ***Mediumswechsel und Splitten***

Das Medium wird abgesaugt, zu einem Well 2 ml /6 ml/12 ml in der Flasche 6 ml PBS hinzugefügt, geschwenkt und ebenfalls nach kurzer Einwirkzeit von 1-2 Minuten abgesaugt. Als nächstes folgt 2 ml/ 6 ml/12 ml Trypsin (Promocell), dies soll kurz einwirken, um die Zellen abzulösen. Dieser Vorgang sollte unter einem Mikroskop beobachtet werden, da sobald die Zellen kugelig werden, sofort 1,5 ml/ 6 ml TNS (Promocell) hinzugefügt werden muss, um den Vorgang abzupuffern. Durch 1-2 gezielte leichte Schläge gegen den Rand sollten sich alle Zellen vom Boden lösen. Daraufhin wird der gesamte Inhalt abgesaugt und in einem Falcon aufgefangen, sowie mit entsprechendem Gegengewicht bei 200-300xg für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet mit 1000 µl Medium versetzt und auf und ab pipettiert, um die Zellen wieder zu lösen.

### ***Auftauen von Zellen aus dem Stickstofftank***

Vor dem Auftauen wird das jeweilige Zellmedium im Wasserbad bei 37 Grad Celsius aufgewärmt. Das Cryo-Röhrchen wird aus dem Stickstofftank laut Arbeitsanweisung mit den vorgesehenen Handschuhen und Gesichtsvision vorsichtig herausgenommen und zügig mit der unteren Hälfte in das Wasserbad positioniert. Nach 60 Sekunden wird es wieder entfernt, wobei noch leichte Eiskristalle zu erkennen sein sollten. Das Zellpellet wird nun unter der Werkbank resuspendiert und einem 15 ml Falcon, bei 5 ml Medium, hinzugefügt. Anschließend werden die Zellen bei 200-300xg bei 3 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wird aufgesaugt und in frischem Medium resuspendiert, anschließend auf eine Zellkulturplatte (6;12-Well) ausgesät und in einem Inkubator bei 37 Grad Celsius und 5 % CO<sub>2</sub> aufbewahrt.

### ***Aufzucht der hTERT- immortalized Human Carotid Artery Smooth Muscle Cells (Firma abm®)***

Das Prigrow II (TM002) Medium sollte in einem Wasserbad von 37°C angewärmt werden. Die bestellten hTERT-SMCs werden aus dem Flüssigstickstofftank entsprechend den Sicherheitsvorschriften entnommen und das Cryo-Röhrchen wird nur mit dem unteren Drittel für 1 Minute ins Wasserbad dazugestellt. Es sollten noch einzelne kleine Eiskristalle zusehen sein, da das DMSO ansonsten toxisch für die Zellen ist. Die Menge wird noch einmal resuspendiert und in ein 15 ml steriles Falcon mit 5 ml Prigrow II (TM002) Medium gegeben. Das Pellet sollte bei 1500 rpm für 3 Minuten zentrifugiert werden. Danach kann der Überstand abgesaugt werden, das Zellpellet mit 1ml frischen Medium resuspendiert und bei einer Zelldichte von 6.000- 10.000 Zellen / cm<sup>2</sup> laut Herstellerangaben (abm®) ausgesät werden. Das Medium wird zusätzlich mit MycoKill® versehen.

### ***MonoMacs-6 (acute monocytic leukemia, Firma DSMZ) Kultivierung***

Die gekauften Zellen werden wie nach Herstellerangaben der Firma DSMZ aus der Cryo-Phiole aufgetaut und eine Zellkultur angelegt. Die Zellen werden in VLE-RPMI 1640 Medium- Firma Biochroma AG (90% RPMI 1640, + 10% h.i. FBS, + 2 mM L-Glutamine, + non-essential amino acids, +1 mM sodium pyruvate, + 10 µg/ ml human Insulin + 1% OPI Media Supplement Hybri-Max (Sigma)) kultiviert und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank, bis zur erreichten Zellzahl für eine Teilung, gelagert. Bei der Teilung der Kultur wird das Medium vollständig mittels Pipetten abgesaugt, in einem Falcon aufgefangen und 6 Minuten bei 230xg zentrifugiert. Der Überstand kann abgesaugt werden. Das Zellpellet wird anschließend in ein neues Medium resuspendiert und kann in weitere Wells oder Flaschen ausgesät werden. Das Medium sollte eine Temperatur von ca.20-24°C (Raumtemperatur) haben. Die Zellen bekommen alle 3-4 Tage ca. 10 ml neues Medium oder werden gesplittet, indem das gesamte Medium abgesaugt wird, in ein Falcon 50 ml pipettiert sowie mit der Zentrifuge bei 200-300xg für 6 Minuten zentrifugiert wird. Der Überstand wird erneut abgesaugt und das übrige Zellpellet mit 1000 µl RPMI-Medium aufgenommen

und in eine neue Flasche mit 25 ml Medium verteilt. Zu Beginn der Kultivierung sollten die Flaschen hingestellt werden, damit die Zellen auf Zellkontakt stoßen und sich besser proliferieren können. Nach ein paar Tagen kann das Medium etwas erhöht werden und die neu angesetzte Flasche hingelegt werden.

Die Zellzahl kann im CASY®, mittels des HEK-Programms, mit einem Verhältnis von 50 µl auf 10 ml Casy Ton gemessen werden. Wegen der „Giant Cells“ sollte der Aggregationsfaktor gegen die Cell counts subtrahiert werden (Cellcounts/Agg. = dies ist mit den Zählungen der Neubauerplatte zu vergleichen), da das HEK-Programm eigentlich für andere Zelllinien bestimmt ist.

Werden MM6 aus dem Stickstoff aufgetaut, so wird ein 15 ml Falcon mit 8ml RPMI-Medium vorbereitet, in das der soeben aufgetaute Inhalt des Cryo-Röhrchens pipettiert wird. Danach wird das Falcon in die Zentrifuge mit dem geeigneten Programm gegeben. Der Überstand wird abpipettiert und das Zellpellet in 1000 µl Medium aufgenommen und in die vorgesehene Flasche mit Medium pipettiert.

Falls ein Überstand an Zellen nach einer Versuchsreihe besteht, können diese ohne Probleme eingefroren und in Stickstoff gelagert werden. Dazu wird die Zellzahl bestimmt und mit einer Zellzahl von ca.  $5 \times 10^6$  in 70% Medium + 20% FBS + 10% DMSO in 1000 µl Cryoröhrchen eingefroren.

### ***Stimulation von Endothelzellen mit TNF $\alpha$***

Die Expression von Adhäsionsmolekülrezeptoren wie E-Selektin kann durch eine Inkubation der Zellen mit TNF $\alpha$  stimuliert werden.

Hierzu werden 2,5 µl TNF $\alpha$  (1 ng/µl) zu 1 ml Zellmedium pipettiert. Die Kontrollen sollen ohne TNF $\alpha$  stimuliert werden. Je nach weiterem Gebrauch, kann und soll die Stimulation einmalig 3- 12 Stunden andauern (bei E-Selektin 3-4 Stunden, bei ICAM und VCAM 12 Stunden).

## ***Antikörperfärbung und FACSen der Endothelzellen***

Nach 3 Stunden der Aktivierung durch  $\text{TNF}\alpha$ , können die ECs mit dem spezifischen Antikörper für E-Selektin (CD 62) gefärbt werden. Dafür wird ein Mastermix aus 13 ml 0,5% FCS und 45  $\mu\text{l}$  AK angesetzt.

Anschließend wird das Medium der Zellen abgesaugt und mit 500  $\mu\text{l}$  PBS (ohne Ca+Mg) gewaschen. Darauf folgt 500  $\mu\text{l}$  Trypsin zum Ablösen der Zellen, der Vorgang wird mittels 500  $\mu\text{l}$  TNS gestoppt. Die gesamte Zellsuspension wird in ein FACS-Röhrchen überführt und bei 300 xg für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand wird vorsichtig abgesaugt. Das Zellpellet kann nun in 150  $\mu\text{l}$  FACS-Lösung aufgenommen und gevortext werden.

## ***Fluoreszenzmikroskopie-Färbung***

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine spezielle Form der Lichtmikroskopie, bei der Fluoreszenz-Marker verwendet werden, die durch Licht bestimmter Wellenlänge angeregt werden und mit Hilfe von speziellen Filtern am Mikroskop deutlich sichtbar gemacht werden können. So können verschiedene Strukturen und Eigenschaften an Zellen vergrößert dargestellt werden, was wiederum dem Nachweis der verwendeten Marker bzw. Zellbestandteile dient.

Bevor die Mehrfachfärbung durchgeführt werden kann, müssen die Antikörper- (CD90, Alpha-Actin-FITC, CD31) und DAPI- Färbung zunächst einzeln getestet werden.

Zuvor sollen 150.000 Zellen in ein 12-Well angezüchtet werden, für Endothelzellen 2x2-Wells, für SMCs 200.000 Zellen in 4x2-Wells anzüchten. Das Medium der Zellen wird abgesaugt und die Zellen mit 1 ml 0,5% FCS gewaschen. Danach werden 500  $\mu\text{l}$  0,5% FCS und 2,5  $\mu\text{l}$  anti-Maus igG-Cy3 zu den Zellen geben, die dann bei 37°C für 30 Minuten im Brutschrank inkubieren. Es folgen 2 Waschgänge der Zellen mit jeweils 500  $\mu\text{l}$  PBS (-Ca,-Mg).

Anschließend folgt die DAPI-Färbung (siehe Protokoll). Zu den Zellen wird 1 ml FACS-Lösung hinzugegeben, um diese dann 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren zu lassen. Die FACS-Lösung wird abgesaugt und für 10 Minuten (bei

Raumtemperatur) wird 1 ml -20°C kaltes Perm Buffer zum Fixieren der Zellen benutzt.

Danach werden die Zellen 2x mit 1 ml PBS gewaschen. Als Färbung der Endothelzellen wird nun anschließend die DAPI-Färbung durchgeführt und mikroskopiert, für die SMCs verfährt man wie folgt weiter. Den Zellen wird 500 µl 0,5% FCS hinzugefügt und 10 µl alpha-Actin-FITC. Die Zellen werden bei 37°C im Brutschrank für 30 Minuten inkubiert und anschließend 2x mit 1 ml PBS gewaschen.

Beiden Zelllinien (ECs+SMCs) wird 500 µl DAPI-Lösung (300 nM) für 3 Minuten hinzugegeben. Anschließend mindestens 3x mit 1 ml PBS waschen und wieder mikroskopieren.

### ***Die DAPI-Vorbereitung***

DAPI in 2 ml H<sub>2</sub>O lösen, das entspricht 5 mg/ml bzw. 10,9 mM DAPI-Stocklösung. Diese bei -20°C einfrieren. Die Stocklösung mit PBS 1:40.000 verdünnen, so dass es einer 300 nM Konzentration entspricht (d.h. 100 ml PBS + 2,75 µl DAPI-Stocklösung).

### ***Durchflusszytometriefärbung (FACS)***

Die Durchflusszytometrie ist eine Methodik der Zell-Vermessung, bei der die Zellen einzeln an einer elektrischen Spannung oder einem Lichtstrahl vorbeifließen und vermessen werden. Mit Hilfe von Struktur/ Form und Größe bzw. Färbung der Zellen werden spezielle Effekte graphisch aufgezeigt anhand derer man die Eigenschaften der Zellen näher bestimmen kann. Beim FACS (Fluorescence-activated Cell Sorting) werden die Zellen mittels Fluoreszenzmarker in verschiedene Reagenzgefäße sortiert mittels des Fluss-Sortierer Gerätes (flow sorter), wobei FACS ein Handelsname ist. Der Laserstrahl trifft mit 488 nm auf den Zellfluss und es entsteht eine Streuung der Strahlen, die in unterschiedlichen Winkel zum Laserstrahl detektiert werden können. Über die Forward Scatter (FSC) Streuung des Lasers in Einstrahlrichtung wird die Größe

der Zellen bestimmt und über die Side Scatter (SSC) Seitwärtsstreuung kann eine Aussage zur Granularität der Zellen vorgenommen werden. Dabei können zusätzliche intra- und extrazelluläre Färbungen (fluoreszenzmarkierte DNA-Plasmide oder oberflächliche Antikörper) für weitere Eigenschaften der verwendeten Zellpopulation herangezogen werden.

Es werden für die Durchflusszytometriefärbung die Antikörper: CD90-FITC für Fibroblasten, Alpha-Actin-PerCP für SMCs, CD31-PE für die ECs verwendet.

Ein Tag zuvor müssen 150.000 Zellen in einer 12-Well Platte angezüchtet werden, für Endothelzellen in der Aufteilung 2x3-Wells, für SMCs 4x3-Wells.

Das Medium der Zellen wird abgesaugt, danach werden die Zellen mit 500 µl 0,5% FCS gewaschen und die Flüssigkeit abschließend abgesaugt. Als nächstes wird wieder 500 µl 0,5% FCS hinzugegeben sowie 5µl des Antikörpers, entweder CD90-FITC oder CD31-PE. Daraufhin inkubieren die Zellen bei 37°C im Brutschrank für 30 Minuten. Dann werden die Zellen 2x mit 1000 µl PBS(-Ca,-Mg) gewaschen. Anschließend mit 500 µl Trypsin abgelöst und mit 500 µl TNS der Vorgang wieder abgestoppt. Die Suspension wird über eine Pipette in ein Falcon pipettiert und in der Zentrifuge 200-300xg 5 min lang zentrifugiert. Wenn nur mit Endothelzellen eine Färbung durchgeführt wird, kann der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 150 µl FACS-Lösung versetzt und bis zur Messung im Kühlschrank gelagert werden. Wird die Färbung mit SMCs durchgeführt, soll das Zellpellet mit 100 µl -20°C kaltem 70%igen Ethanol für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden, indem die Zellsuspension der drei gleichen Wells jeweils vereint und resuspendiert wird. Es wird 500 µl Waschpuffer zu dem Ethanol-Zellgemisch gegeben und alles wieder resuspendiert, zentrifugiert (200-300xg 5 min) und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wird in 100 µl 2 M HCl für 20 Minuten inkubiert, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die 2 M HCl-Lösung wird kurz vorher frisch in einem 15 ml Falcon angesetzt. Die Zellen werden nach der weiteren Zugabe von 500 µl Waschpuffer resuspendiert, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das gewonnene Zellpellet in 500 µl 0,1 M Natriumborat resuspendieren und 1 Minute warten. Nun 500 µl Waschpuffer dazugeben, zentrifugieren und den Überstand absaugen. Danach

500 µl Färbepuffer und 10 µl AlphaActin-PerCP hinzufügen und bei 37°C 1 Stunde lang im Brutschrank inkubieren lassen. Als nächstes 500 µl Waschpuffer hinzufügen, zentrifugieren und den Überstand absaugen. Das Zellpellet in 150 µl FACS-Lösung hinzugeben und FACSen.

### ***Transfektion von Zellen mit siRNAs***

Als Transfektion wird das Einbringen fremder DNA/RNA in eine Zelle verstanden, wobei es zur Proteinsynthese eines Genproduktes kommt. Im Allgemeinen wird dadurch der Gentransfer von Viren beschrieben, doch mittlerweile wird sich dieser Methode auch in der gezielten Erforschung von Genausschaltungen in der Zellbiologie bedient.

Grundsätzlich werden 20 µM konzentrierte siRNAs verwendet, die während der Transfektion zwischen 1-150 nM liegen. Die Kontrollen ohne siRNA werden, während der 2-stündigen Transfektion mit Basalmedium inkubiert, in diesem Fall mit RPMI-Medium. Es werden Kontrollen mit scrRNA angesetzt und Wells mit funktioneller siRNA: E-Selektin, VCAM-1, ICAM-1 in einem Verhältnis 0,6: 0,6:1.

(25 nM ICAM-1 siRNA + 12,5 nM E-Selektin + 12,5 nM VCAM-1 werden pro Well mit 1,75 µl Interferin vermischt) In zwei 2 ml Eppendorf Cup werden einmal die scrRNA 50 nM vorbereitet (1,6 µl scrRNA + 3,5 µl Interferin + 635 µl Basalmedium) und einmal die 50 nM siRNA (0,4 µl E-Selektin + 0,4 µl VCAM-1 + 0,8 µl ICAM-1 + 3,5 µl Interferin + 635 µl Basalmedium).

Die Endothelzellen werden einen Tag vorher angezüchtet mit einer Zellzahl von 100.000 Zellen/Well. Die für die Transfektion angegebene Menge siRNA wird in das Basalmedium, in dem vorbereiteten Eppendorf Cup aufgelöst, dann wird das Interferin hinzugefügt. Die Eppendorf Cups 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen, zur Bildung der Transfektionskomplexe. Das Medium der Wells absaugen und mit 500 µl PBS waschen und absaugen. In die 12-Well Löcher jeweils 300 µl der Transfektionskomplexe hinzufügen, alle übrigen Wells mit Basalmedium 300 µl behandeln und alles bei 37°C 2 Stunden im Brutschrank inkubieren lassen.

Danach werden die Transfektionskomplexe/das Basalmedium abgesaugt und frisches Medium von 1000 µl zu den Zellen gegeben. Alles für mindestens 1 Stunde oder länger im Brutschrank bei 37°C inkubieren lassen und danach mit jeweils 5 µl TNFα (1 ng/µl) für 12 Stunden aktivieren.

### ***Co-Kultivierung von MM6s und ECs***

3-4 Tage vor Versuchsbeginn werden die MM6s angezüchtet (siehe Protokoll MM6s). 12 Stunden vor der Co-Kultivierung werden die ECs (ca. 300.000/Well) mit 5 µl TNFα pro Well in 1 ml EC-Medium - VEGF aktiviert. Nach Aktivierung der Endothelzellen werden pro Well 300.000 MM6s hinzugefügt und mit 1 ml VLE RPMI-Medium versetzt und für 30 Minuten in den Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Alle Wells werden 2 x mit 500 µl PBS gewaschen und Bilder unter einem Mikroskop angefertigt. Darauf folgt die RNA-Isolation (siehe Protokoll).

### ***RNA-Isolation***

Die RNA-Isolation dient der Extraktion von RNA aus den zu untersuchenden Zellen durch eine biochemische Methode, um diese für eine Analyse der Genexpression zu nutzen. Es gibt verschiedene Methoden, die meistens auf dem Zellaufschluss basieren. In diesem Verfahren wird ein Hersteller-Kit verwendet, das die selektive Adsorption, die mittels spezieller RNA-bindender Matrixtubes funktioniert, nutzt. In unserer Versuchsreihe wird das Biorad-RNA Isolation Kit benutzt mit RNA-bindender Matrix in den Tubes. In allen Methoden wird die RNA gewonnen, indem die Zellen durch eine chemische Umgebung lysiert und so die RNasen schnell denaturiert und von restlichen zellulären Bestandteilen getrennt werden.

Auf jedes angezüchtete Well werden 500 µl Lysepuffer Purezol (Gewebe) gegeben und auf und ab pipettiert. Der gesamte Inhalt des Wells wird in ein Eppendorf Cup 1,5 ml verteilt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Jedes Eppendorf Cup wird mit 100 µl Chloroform versetzt und für 15 Sekunden gevortext. Es wird erneut für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen

gelassen. Darauf folgt das Zentrifugieren für 15 Minuten bei 12.000xg und 4°C. Die klare Lösung, die sich abgesetzt hat, wird in ein neues Eppendorf Cup pipettiert und mit 300 µl 70% Ethanol versetzt und 2 Sekunden gevortext. Der gesamte Inhalt wird auf RNA bindende Säulen verteilt. Das transferierte Lysat wird 30 Sekunden lang zentrifugiert und der Überstand weggeschüttet. Auf die Säule wird 700 µl „Low Stringency Wash“ gegeben und 30 Sekunden zentrifugiert. Das Filtrat wird verworfen und mit 80 µl DNase I 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (5 µl DNase I werden mit 75 µl DNase „Delution Solution“ verdünnt) und 30 Sekunden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Daraufhin werden 700 µl „High Stringency Wash“ ergänzt, die für 30 Sekunden lang zentrifugiert werden. Der Überstand wird verworfen. Es folgen 700 µl „Low Stringency Wash“, die wieder für 1 Minute zentrifugiert werden. Der Überstand wird verworfen. und ein weiteres Mal für 2 Minuten zentrifugiert. Die RNA bindende Säule wird in ein 1,5 ml Eppendorf Cup mit Deckel transferiert. Es werden 60 µl der 70°C warmen „Elution Solution“ auf die Membran gegeben und für 1 Minuten inkubiert und 2 Minuten zum Eluieren zentrifugiert. Der Inhalt kann an diesem Punkt bei -80°C eingefroren oder zur cDNA-Synthese verwendet werden.

### ***Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung der GesamtmRNA***

Zur Konzentrationsbestimmung der RNA-Menge werden 5 µl mRNA und 45 µl DEPC behandelten H<sub>2</sub>O in eine Küvette gegeben und mittels Photometer bei 230 nm - 320 nm Absorptionsspektrum von Nukleinsäuren und Proteinen vermessen (Bio-Rad, o. J.). Eine 50 µl reine H<sub>2</sub>O – Küvette dient als Leerprobe.

Die Probenkonzentration kann direkt durch Umformen des LambertBeer'schen Gesetzes berechnet werden. Dadurch ergibt sich OD<sub>260</sub>, ein spezifischer Multiplikationsfaktor für DNA/RNA, hier 40 µl für RNA.

Die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration kann mit folgender Formel berechnet werden:

1.  $1 \text{ OD}/40 \mu\text{g/ml} = \text{OD}_{260}/x$
2.  $X = \text{OD}_{260} * 40 \mu\text{g/ml} / 1$
3.  $X = \text{RNA in } \mu\text{g/ml in der Kuvette}$
4.  $\text{RNA}_{\text{Probe}} \text{ in } \mu\text{g/ml} = x * \text{Verdünnungsfaktor}$

### **cDNA-Synthese**

Die cDNA ist eine durch die RT-PCR (quantitative Polymerasekettenreaktion) aus RNA hergestellte DNA-Kopie einer bestimmten und gewünschten Sequenz. Dies wird durch das Enzym Reverse Transkriptase erreicht, welches eine spezifische, RNA-abhängige DNA-Polymerase ist und mittels eines Primers an die RNA binden kann. Als Primer dient meist ein Oligo-dt-Nukleotid, welches komplementär zur Polyadenylierung des 3'Ende eukaryotischer mRNA ist. Die Ausgangs-RNA wird hybridisiert und somit entsteht eine cDNA. Mittels des spezifisch verwendeten Primers wird verhindert, dass zusätzlich tRNA und rRNA (Transfer-RNA und ribosomale-RNA) umgeschrieben werden können.

Für die cDNA-Synthese werden 200 ng RNA umgeschrieben und in 15  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O gelöst. Zu Beginn wird mit Hilfe eines Photometers die Konzentration gemessen, um die Umrechnung der benötigten 200 ng RNA auf 15  $\mu\text{l}$  RNA-Lösung zu berechnen (siehe Konzentrationsberechnung). Daraufhin wird der cDNA-Ansatz hergestellt. Dieser besteht aus 15  $\mu\text{l}$  RNA-Lösung, 1  $\mu\text{l}$  Reverse Transkriptase und 4  $\mu\text{l}$  des 5xMix, so dass ein Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{l}$  hergestellt wird. Die Eppendorf Tubes 0,5 ml, werden alle in den PCR-Cycle gegeben und das Programm ISCRIPPT gestartet. Die cDNA-Synthese verläuft nach dem Reaktionsprotokoll des Herstellers (5 Minuten bei 25°C, 30 Minuten bei 42°C und 5 Minuten bei 85°C). Nach Herstellung der cDNA können die Eppendorf Tubes in einem -80°C Kühlschrank eingefroren oder direkt weiter zur Herstellung der qRT-PCR benutzt werden.

## **qRT-PCR**

Die qRT-PCR (quantitative Real-Time Polymerase chain reaction; schnelle Echtzeit Polymerasekettenreaktion) ist eine Vervielfältigung von DNA-Sequenzen in Echtzeit. Ein vollautomatisierter Vorgang, um die Quantifizierung von Genexpression mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen darzustellen. Es gibt zwei verschiedene Techniken, die spezifische und die unspezifische Methode, wobei in diesem Fall die unspezifische Methode verwendet wird.

- 1. siehe Protokoll cDNA-Synthese; verdünnen 1:25 (96  $\mu$ l H<sub>2</sub>O+ 4  $\mu$ l cDNA)
- 2. Hauptmix herstellen: Menge der Proben +1 (Tripletts) ergibt die Menge des Hauptmixes insgesamt
- Gesamtmenge des Hauptmixes/4 = ergibt die Primermenge
- Primermenge x3 = SYBR Green (vorher auftauen)
- (10x Hauptmix wie Primer-Angabe, Anzahl x Mix für Tripletts zu bestimmen)

1985 entwickelten Kary Mullis und Kollegen die Polymerasekettenreaktion (PCR) für diagnostische Zwecke, wofür er 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurde. Durch die PCR wurde die Möglichkeit geschaffen jede Nukleinsäuresequenz in einem zyklischen Prozess zu amplifizieren, um eine Vielzahl an identischen Kopien herzustellen. Dadurch können Fragestellungen beispielsweise von Erkrankungsrisiken, Vaterschaftstests und Infektionskrankheiten diagnostiziert werden. Es konnten DNA-Manipulationen, Gentechnik und die Sequenzierung durchgeführt werden, allerdings mit Einschränkungen, die die Analytik (Kubista et al., 2006) betrafen. Das Problem der quantitativen Auswertung wurde durch Higuchi und Kollegen im Jahr 1992 durch die Echtzeit-PCR gelöst. Auf diese Weise kann die Menge des gebildeten Produktes, das durch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert wird und sich proportional zur Menge des gebildeten Produktes und der Amplifikationsvorgänge verhält, in seiner exponentiellen Phase ausgewertet werden (Higuchi et al., 1992).

Die Real-Time PCR (RT-PCR) eignet sich auch für die Ermittlung und Quantifizierung von RNA, dabei wird über die Reverse Transkriptase eine cDNA hergestellt, die dann über die quantitative PCR (qPCR) ausgewertet werden kann. Dies kann als One-Step oder Two-Step RT-qPCR erfolgen. Dabei kommen entweder Farbstoffe wie Ethidiumbromid oder SYBR Green®, wie in unserem Fall, oder verschiedene Sonden (FRET – Förster-Resonanzenergietransfer, LightCycler-, LoopTag- und die TaqMan-Sonde) zum Einsatz. Bei der Nutzung eines Fluoreszenzfarbstoffes, lagert sich dieser an die DNA an. Durch jeden Zyklus vermehrt sich die Menge an DNA und zeitgleich steigt auch die gemessene Fluoreszenzemission proportional an.

### ***Prototyp-Herstellung***

Um eine geeignete Simulation einer Gefäßwand zu etablieren, werden gekaufte hTERT- immortalized Human Carotid Artery Smooth Muscle Cells verwendet, die in ihrer Reinheit und der Zellzahl reproduzierbar sind.

Ein Well einer 6-Well Platte wird mit á 300 µl insgesamt (6,66 µl Fibrinogen + 143,25 µl PBS // 0,75 µl Thrombin + 149,4 µl PBS+ und ca. 400.000 - 600.000 hTERT SMCs bestückt, dabei wird die Anzahl an Zellen pro Well in 1 ml Eppendorf Reaktionsgefäße vorpipettiert. Je nach Anzahl der hTERT SMCs verlängert sich die Zeit in der Zellkultur, bis eine flächendeckende Besiedelung unter dem Mikroskop zu sehen ist.

## Prototyp-Aufbau

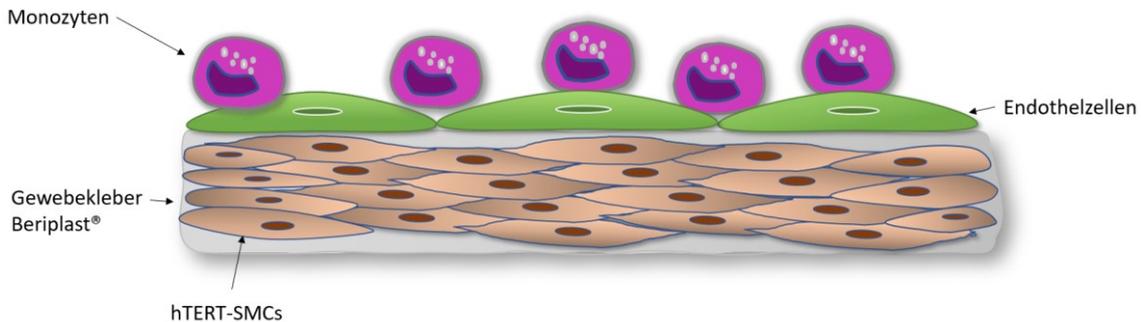


Abbildung 5 Prototyp-Aufbau ; die Graphik stellt den schematischen Aufbau des 3D-Modells eines Prototyps dar, mit den verwendeten hTERT-SMCs innerhalb des Gewebeklebers Beriplast®, den darauf aufliegenden Endothelzellen und den aufgesetzten Monozyten. Das verwendete Zellpellet der hTERT SMCs wird nach dem Zentrifugieren wie oben beschrieben in 149,4 µl PBS<sup>+</sup> pro Well gelöst, dann mit 6,66 µl Fibrinogen angereichert und auf das Well verteilt. Daraufhin wird langsam über den Rand das Thrombingerisches (0,75 µl Thrombin + 149,4 µl PBS<sup>+</sup>) hinein pipettieren. Wichtig ist es, langsam und homogen zu applizieren, damit sich mittig keine Kuhle ausbilden kann. Der Wellinhalt wird bei 37°C für 30 Minuten polymerisiert. Darauf folgt die Zugabe von 1 ml Prigrow II-Medium der hTERT-SMCs. Über zwei bis vier Wochen wird alle drei bis vier Tage ein Mediumswechsel durchgeführt, bis eine dichte einheitliche Schicht der hTERT-SMCs in verschiedenen Ebenen erreicht ist. Dies ist unter dem Mikroskop zu beobachten. Auf den mehrschichtigen Aufbau der glatten Muskelzellen werden nun ECs für drei bis vier Tage in der Menge á 100.000 Zellen pro Well für eine flächendeckende Besiedelung angesiedelt und mit dem VEGF-Medium versetzt. Nach drei bis vier Tagen wird mit einem Teil der ECs auf den Wells die Transfektion mit siRNA (E-Sel, VCAM, ICAM und SCRsiRNA) durchgeführt. Parallel zu der Transfektion werden MM6-Zellen aufgetaut und in entsprechender Zellzahl á 250.000 MM6s pro Well nach weiteren drei bis vier Tagen hinzugefügt (siehe Protokoll Co-Kultivierung ECs+ MM6). Anschließend folgen die Protokolle der RNA-Isolation und cDNA-Synthese sowie die qRT-PCR. Die qRT-PCR kann auch ein paar Tage später durchgeführt werden, wenn die Ansätze der cDNA in einem -20°C Kühlschrank eingefroren werden. Der Aufbau des Prototyps in den Well-Platten mit und ohne Transfektion sowie die jeweiligen

Marker können als Triplets auf die qRT-PCR-Platten übertragen werden und zeigen sich wie folgt.

	Platte A					Platte B
	E-sel	VCAM	PECAM	CD14		IL-8
Prototyp ohne TNF, ohne MM6	Triplet					Triplet
Prototyp + TNF, + MM6						
Prototyp ohne TNF, +MM6						
Prototyp +TNF, +MM6, +EIV						
Prototyp + SCR, +MM6, +TNF						

	ICAM	CD45	GAPDH	CD68		CX43
Prototyp ohne TNF, ohne MM6	Triplet					Triplet
Prototyp + TNF, + MM6						
Prototyp ohne TNF, +MM6						
Prototyp + TNF, +MM6, +EIV						
Prototyp + SCR, +MM6, +TNF						

*Tabelle 4 Beschriftung der qRT-PCR Platten des Prototyps. Die fünf Versuchsreihen des Prototyps gliedern sich wie folgt: „ohne TNFα und ohne MM6“ dient als Nullprobe, „mit TNFα und mit MM6“ und „ohne TNFα mit MM6“ sind direkte Vergleiche Adhäsion der Monozyten mit und ohne Transfektion mit TNFα. Die Versuchsreihe „+TNFα, +MM6, +EIV“ wird die zusätzliche Transfektion mit den siRNAs: E-Selektin und ICAM-1 und VCAM-1 wird im direkten Vergleich zur „mit SCR, mit MM6 und mit TNFα“ scrambled-siRNA die Transfektion mit den siRNAs darstellen. Die fünf Versuchsreihen werden jeweils auf ihre Genexpression von E-Selektin, VCAM-1, ICAM-1, PECAM, CD14, IL-8, CD45, CD68 und CX-43 untersucht und an GAPDH in der Auswertung ausgerichtet.*

## 2.1 Statistik

Alle Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Der Vergleich der unterschiedlichen Proben erfolgte über einfache Varianzanalysen (ANOVAs). Als Post-Test wurde die Bonferroni-Korrektur verwendet. Bei signifikanten Unterschieden werden diese in den Abbildungen mit \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p > 0,01$  oder \*\*\* =  $p < 0,005$  dargestellt. Es konnten bei den Untersuchungen der Marker mittels qRT-PCR keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Daher wird auf den Hinweis in den Abbildungslegenden "\*", \*\*, \*\*\*" verzichtet.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Differenzierung VSMCs/ hTERT SMCs/ ECs**

Die Zelltypen ECs und VSMCs, die als Bestandteile des zu etablierenden Prototyps einer Gefäßwand fungieren, wurden sowohl durch die Fluoreszenzmikroskopie als auch über die Durchflusszytometrie mittels der jeweils spezifischen Antikörper CD31, CD90 und Alpha-Actin getestet.

### **3.2 Auswertung der Durchflusszytometrie ECs/ VSMCs / hTERT-SMCs**

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wird der Prozentsatz der Zellen ermittelt, die positiv auf den jeweiligen Antikörper detektiert und somit als typischen Zelltyp markiert werden. Zu Beginn wird eine Probe ohne Antikörper als Nullprobe untersucht und ein Marker/Schwellenwert etabliert, anhand dessen die Zellen, die sich außerhalb oder innerhalb dieses Referenzwertes befinden, als positiv bzw. negativ in Bezug auf den jeweiligen Antikörper bewertet werden.

### **3.3 FACS-Ergebnis der ECs**

Das Ergebnis der Durchflusszytometrie ergab bei den getesteten Endothelzellen mit Hilfe des Antikörpers CD31-PE, dass eine hohe Spezifität für Endothelzellen vorliegt. Es handelt sich somit, bei allen positiv auf den gefärbten Antikörper detektierten Zellen, um ECs (siehe Abb.6). Aus diesem Grund wurden für die Versuchsreihe, die eigens in Zellkultur gezüchteten ECs aus verschiedenen Spendervenen (V40, 41, 42, 46, 55) verwendet.

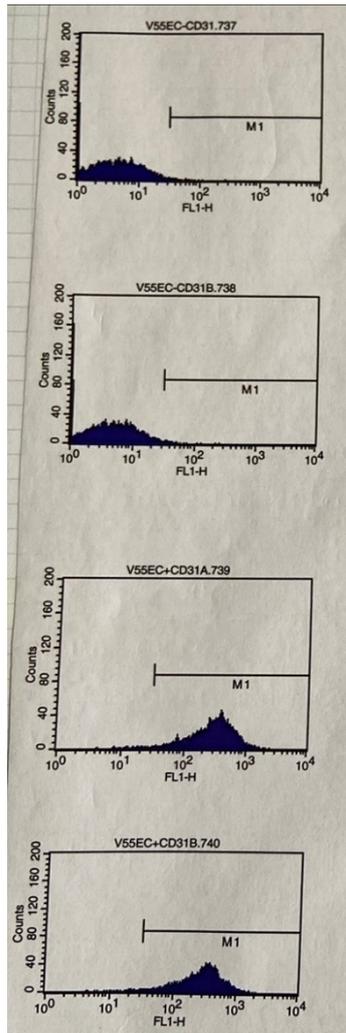


Abbildung 6 FACS-Auswertung der ECs. Die x-Achse beschreibt FL1-H logarithmisch den Antikörper CD31-PE und die y-Achse die Counts pro Sekunde (Scan des Laborausdruckes).

Das Ergebnis der Durchflusszytometrie zeigt hier beispielhaft an der Vene 55 in der Abbildung 6, dass es sich um positive Endothelzellen in Bezug auf den Marker CD31-PE handelt. Durch die Markersetzung nach der Messung „ohne CD31“ bei einer Nenngröße von 1 bei „100% Gated“, zeigt sich bei den zwei Versuchen mit der exemplarischen Zelllinie V55 A und B ein Ergebnis von 98,52% und 98,76% Gated positiv. Bei nahezu 100% positiv detektierten Zellen kann in diesem Versuch von sehr reinen Endothelzelllinien ausgegangen werden. Es wurden insgesamt 10 Versuchsreihen mit den Venen 40, 41, 42, 46 und 55 durchgeführt und ein Durchschnittswert von 88,45% erzielt. Die starke Abweichung von 31,56% Gated bei der Vene 40, stellt den einzigen Ausreißer dar und wurde somit aus der Statistik entfernt.

### 3.4 Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Antikörperfärbung der ECs

Anschließend werden bei der Fluoreszenzmikroskopie, mit den Antikörpern CD31-FITC und der DAPI-Zellkern Färbung, die Zellen einzeln und kombiniert gefärbt. Anhand der Bilder (Abb.7) zeigen sich die ECs als eindeutig markiert. CD31- FITC zeigt sich intensiv grün fluoreszierend und DAPI färbt die Zellkerne blau fluoreszierend.

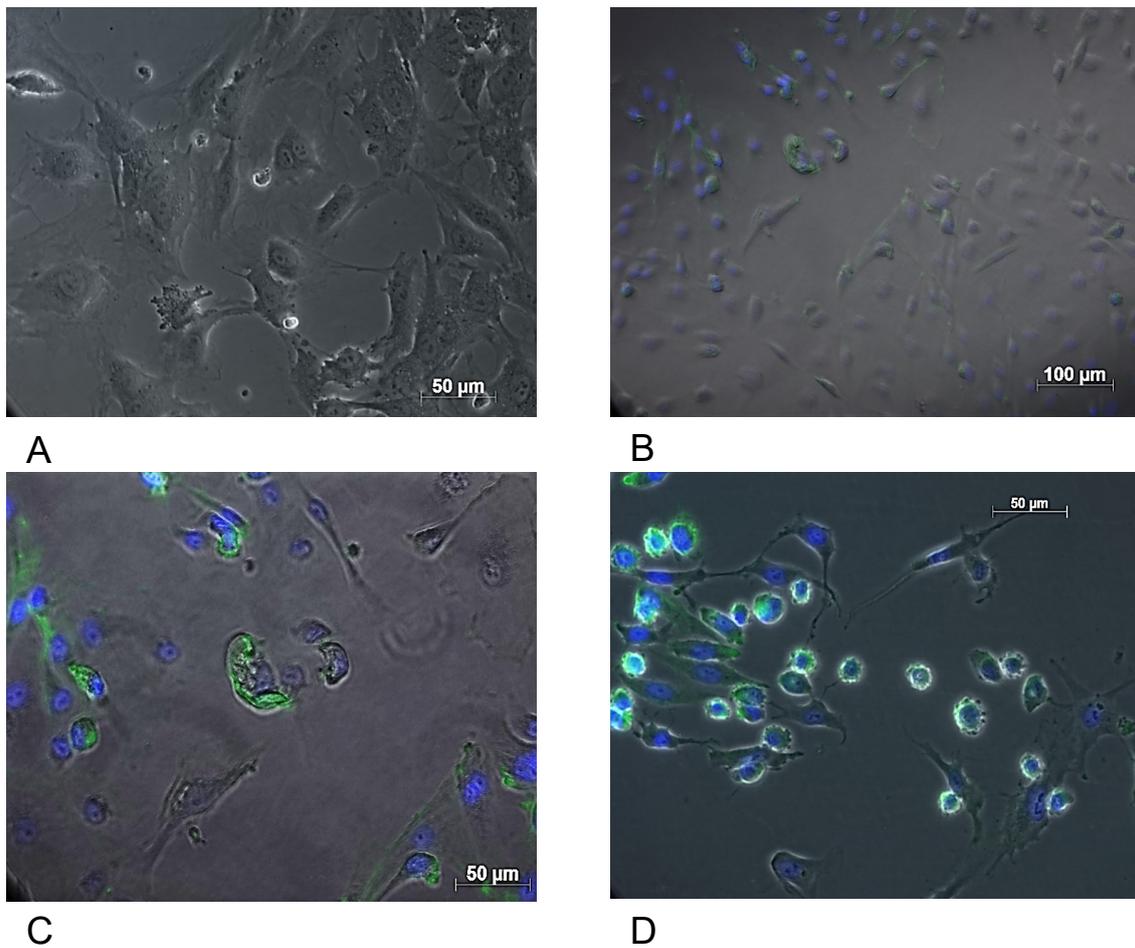


Abbildung 7 Endothelzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop A ECs ohne UV-Filter bei 50  $\mu\text{m}$  Vergrößerung, B ein weiterer Ausschnitt mit DAPI-Zellkern Färbung bei 100  $\mu\text{m}$  Vergrößerung, C DAPI und die CD31-FITC Antikörperfärbung mit einer 50  $\mu\text{m}$  Vergrößerung, D DAPI und CD31-FITC bei einer Vergrößerung von 50  $\mu\text{m}$

### 3.5 FACS-Ergebnis der VSMCs und hTERT-SMCs

Die Auswertung der Durchflusszytometrie der VSMCs soll die Reinheit der gewonnenen Zellen aus den Venenstücken darlegen. Dabei werden die Antikörper CD90-FITC und Alpha-Actin-PerCP verwendet. Auch hier wird zunächst eine Nullprobe festgelegt anhand derer, der Marker mit den Antikörpern verglichen werden kann.

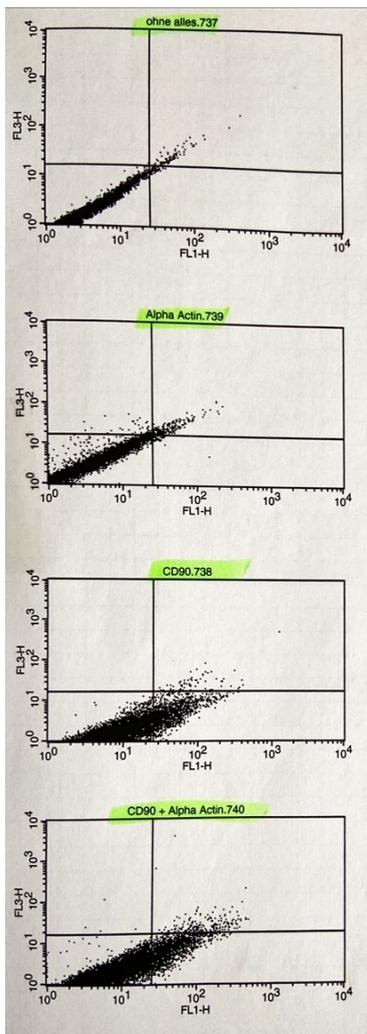


Abbildung 8 FACS-Auswertung der selbst isolierten SMCs die x-Achse stellt FL1-H (CD90) logarithmisch, die y-Achse FL3-H (Alpha-Actin) logarithmisch dar (Scan des Laborausdruckes).

Bei den selbstgewonnenen VSMCs hat sich herausgestellt, dass es sich vorwiegend um CD90 positiv getestete Zellen handelt, was in Kombination mit Alpha-Actin nicht eindeutig auf VSMCs, sondern vermehrt auf Fibroblasten schließen lässt (siehe Abb.8). Die Zellwolke liegt vermehrt unterhalb der

Markergrenze von FL3-H im Bereich von FL1-H, siehe die Auswertung „CD90“, „CD90-AlphaActin“ in Abbildung 4. Dabei wurden 99,27% als CD90 positiv detektiert und bei der Anwendung beider Antikörper 97,77%. Der Antikörper für Alpha-Actin wurde mit 3,07% positiv bei der individuellen Testung bewertet und mit 2,23% positiv im Versuch kombiniert mit CD90 getestet.

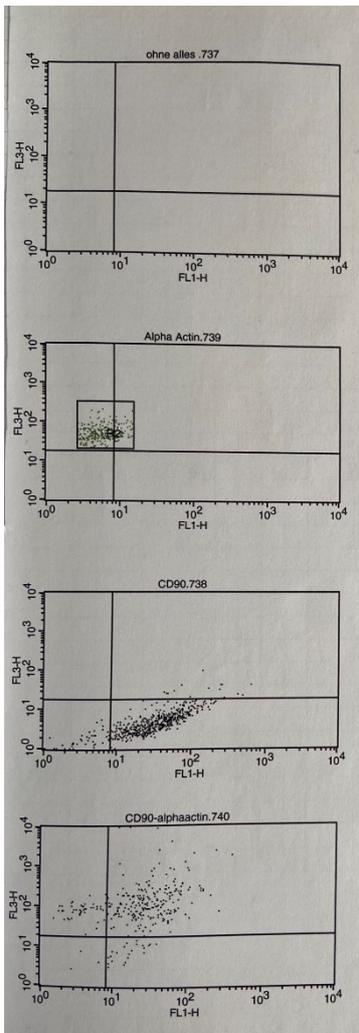


Abbildung 9 FACS-Auswertung der hTERT-SMCs , die x-Achse zeigt den FL1-H (CD90) logarithmisch an, die y-Achse FL3-H (Alpa-Actin) (Scan des Laborausdruckes).

Das Ergebnis der FACS-Auswertung der hTERT-SMCs in Abbildung 9 zeigt auf, dass bei dem Versuch nur mit Alpha-Actin 100% positiv getestete Zellen vorhanden sind. In der Kombinationsfärbung mit Alpha-Actin und CD90 wurden 90,67% der untersuchten Zellen Alpha-Actin positiv und nur 9,34% CD90 positiv detektiert, auch wenn die Gesamtanzahl der getesteten Zellen insgesamt eher gering war. Durch die jeweilige Markierung von FL1-H und FL3-H wird deutlich,

dass sich der Großteil der Counts in der gemeinsamen Betrachtung von CD90 und Alpha-Actin im oberen Bereich der FL3-H Markergrenze befindet und dies mehr Counts durch Alpha-Actin darstellt.

### **3.6 Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Antikörperfärbung der VSMCs und hTERT-SMCs**

Zur Beurteilung unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Antikörper CD90+ sekundärer Antikörper Cyanin™ 3, Alpha-Actin-FITC und DAPI-Zellkernfärbung verwendet.

Die VSMCs zeigen im Ausschnitt in Abbildung 5 einen deutlich hohen Anteil an CD90, der sich in der grünlichen Färbung darstellt (Abb.10, C), sowie eine eher unspezifische Alpha-Actin-Färbung, die sich rötlich zeigt (Abb.10, B). Die DAPI-Zellkernfärbung wird im Ausschnitt D in bläulicher Farbe eindeutig dargestellt. Da es sich wiederholt um denselben Ausschnitt handelt, zeigt der Antikörper Alpha-Actin keine typische Färbung des Zytoskeletts im Vergleich zur CD90-Färbung, die sich fast flächendeckend gleichen (vgl. Abb 10, B+C). Aus diesem Grund ist nicht eindeutig erkennbar, dass es sich um VSMCs handelt, sondern dass eher eine Färbung von Fibroblasten dargestellt wird.

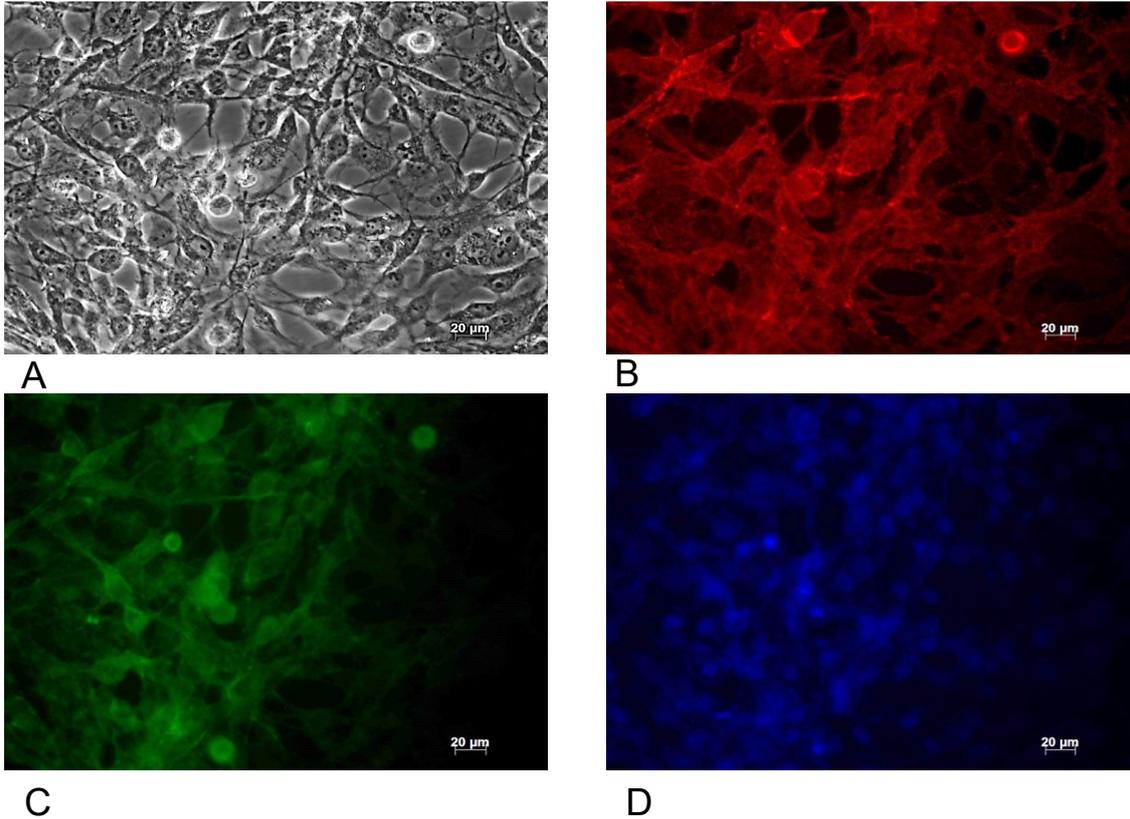


Abbildung 10 Fluoreszenzbild der selbst gezüchteten SMCs A glatte Muskelzellen in einer 20 µm Vergrößerung ohne UV-Filter, B derselbe Ausschnitt mit der Alpha-Actin-FITC Färbung bei 20 µm Vergrößerung, C CD90-FITC Färbung, D der gleiche Ausschnitt wiederholt mit der DAPI-Zellkernfärbung

Die Bilder der hTERT-SMCs (Abb.11) dagegen zeigen in dem Ausschnitt, dass es sich eindeutig um vaskuläre glatte Muskelzellen handelt. Bei der Überlagerung aller Antikörper und der DAPI-Färbung in Abbildung 11 E, wurde das Zytoskelett der Zellen durch die Alpha-Actin Färbung eindeutig dargestellt, im Vergleich zum Antikörper CD90, der kaum flächenmäßig grün fluoreszierend in Kontrast tritt (siehe Abb.11 D, E).

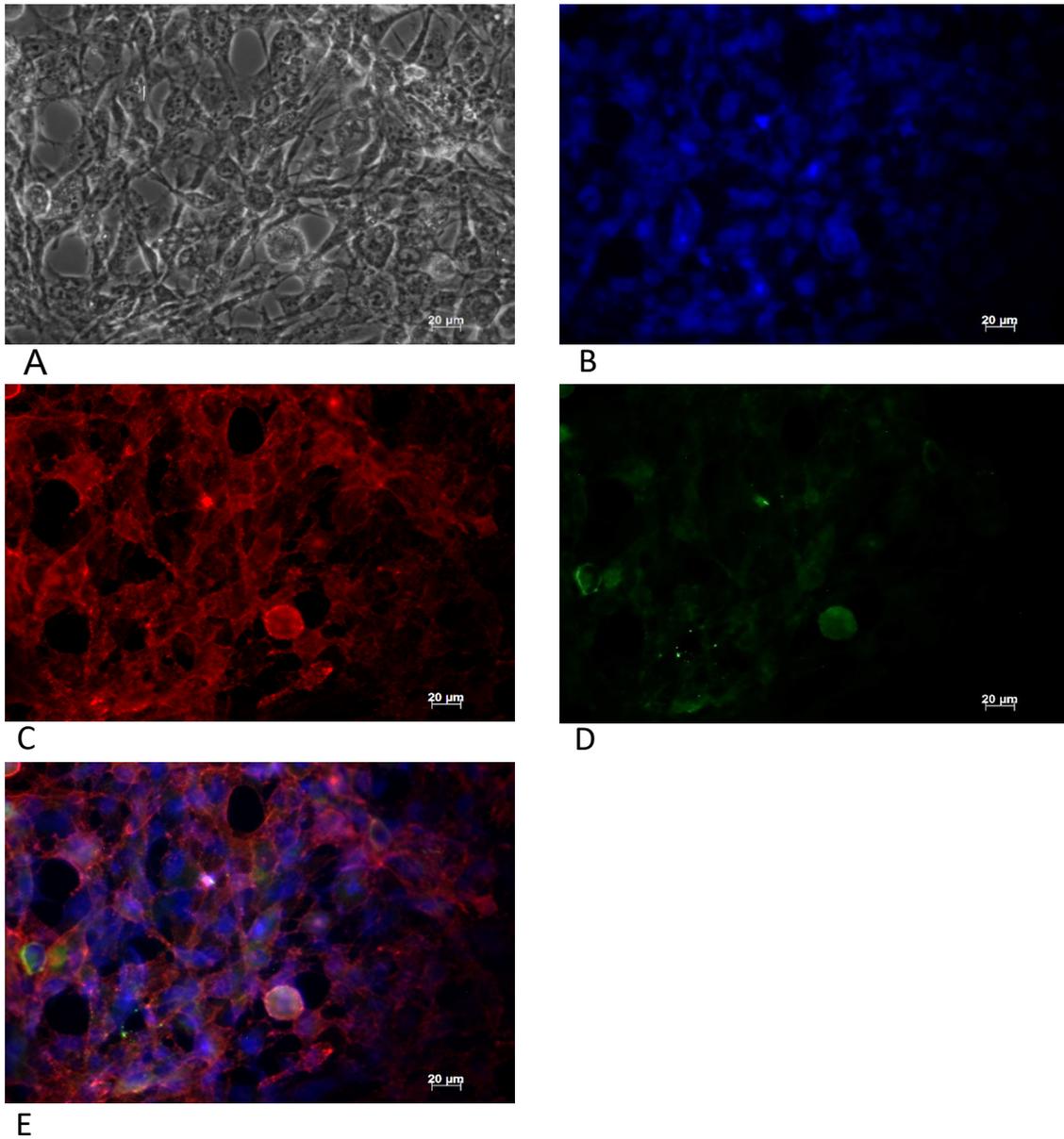


Abbildung 11 Fluoreszenzbild der gefärbten hTERT-SMCs in einer 20  $\mu\text{m}$  Vergrößerung , A ein Ausschnitt mit markierten hTERT-SMCs ohne UV-Filter nach Färbung in 20  $\mu\text{m}$  Vergrößerung, B die DAPI-Zellkernfärbung, C das Zytoskelett mittels Alpha Actin-FITC Färbung, D der CD90-FITC Marker, E der Gesamtausschnitt durch den gemeinsamen UV-Filter

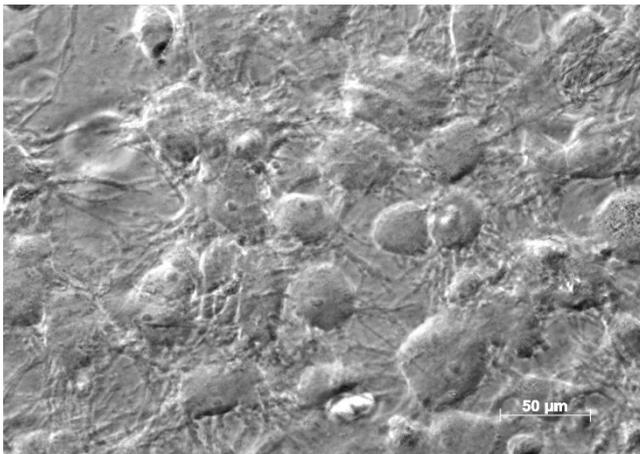
### 3.7 Aufbau des Prototyps

Der zu etablierende Prototyp einer Gefäßwand wird mit Hilfe von VSMCs, dem Gewebekleber Beriplast P® und ECs aufgebaut, dabei wird eine mehrschichtige Gefäßwand simuliert.

Die hTERT-SMCs sollen dabei die äußeren Schichten dreidimensional in vitro verkörpern. Die verschiedenen Ebenen entwickeln sich dabei mittels des

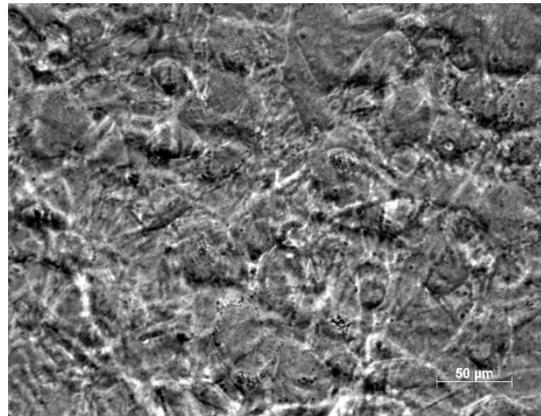
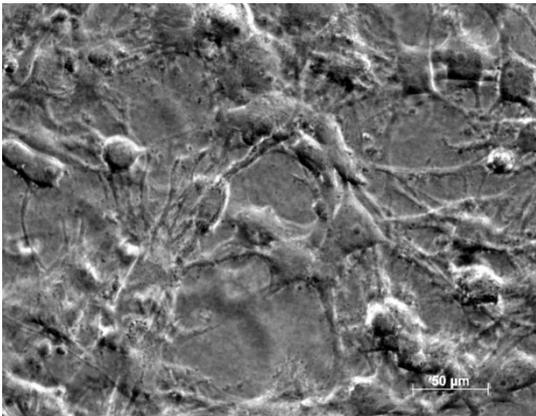
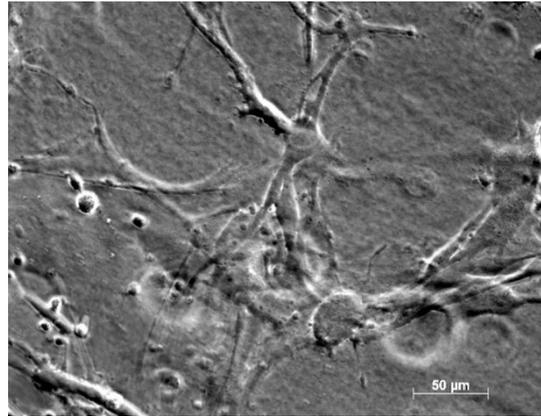
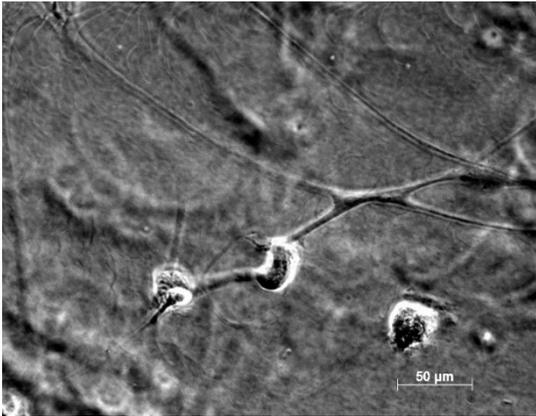
Gewebeklebers Beriplast P® und den hTERT-SMCs. Die simulierte innerste Gefäßschicht wird als letztes durch die ausgesäten ECs vervollständigt. Diese brauchen ein paar Tage Inkubationszeit, um flächendeckend zu proliferieren. Anschließend ergeben sie eine einheitliche Zellschicht.

Die Abbildungen 12 – 16 zeigen den zeitlichen Verlauf eines Prototyps sowie die Entwicklung, die mikroskopisch festgehalten wurde. Anschließend wurde der fertige Prototyp samt Besiedelung mit MM6 nach Transfektion mit TNF $\alpha$  und der teilweisen Aktivierung durch die siRNAs E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 und der SCR-siRNA mikroskopisch abgelichtet (siehe Abb. 17,18). Es wurden drei Prototypen fertig gestellt, die anschließend über die qRT-PCR jeweils ausgewertet wurden.



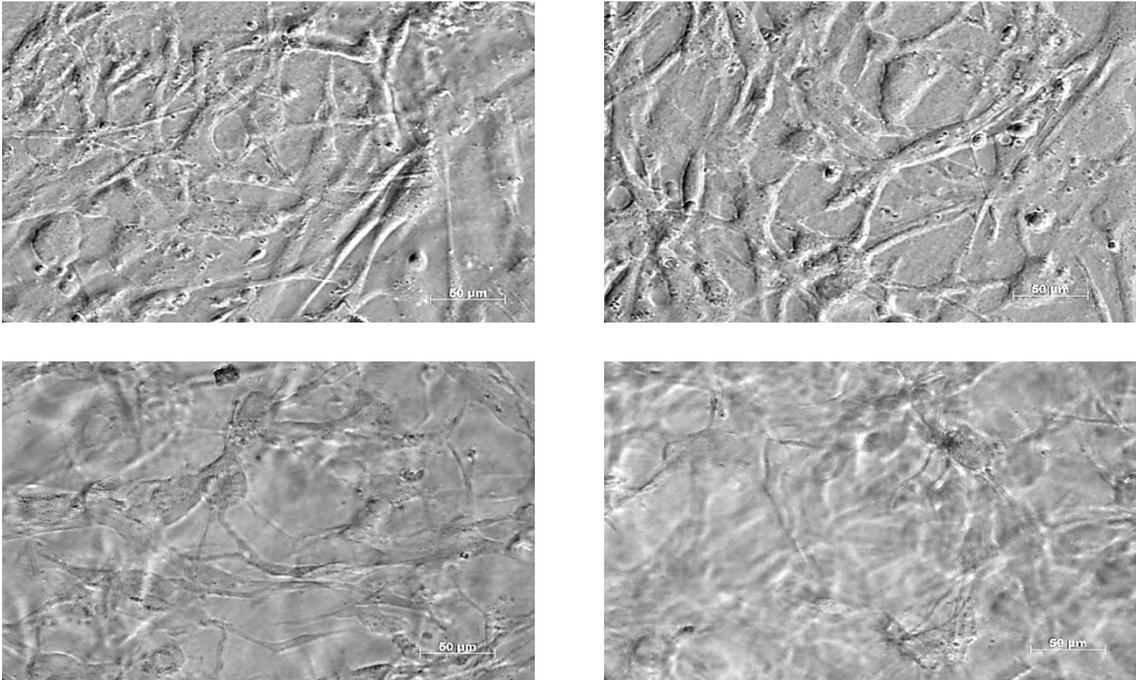
Prototyp 2B Tag 1

*Abbildung 12 Prototyp nach aussäen der hTERT-SMCs in der Kombination mit Beriplast P® in 50 µm Vergrößerung. Der grundlegende Prototyp wird unbehandelt an Tag 1 dargestellt*



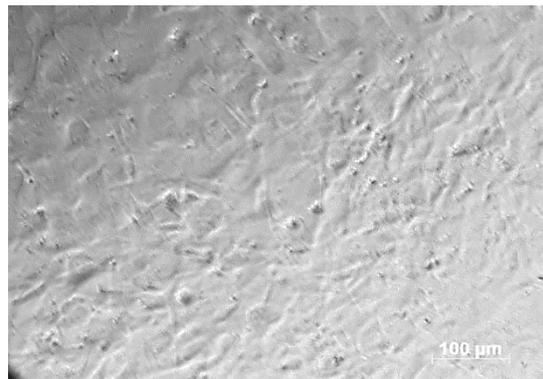
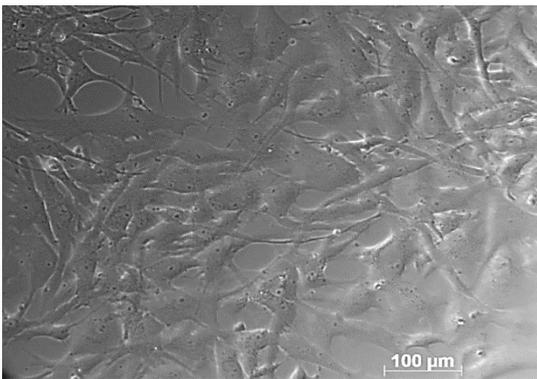
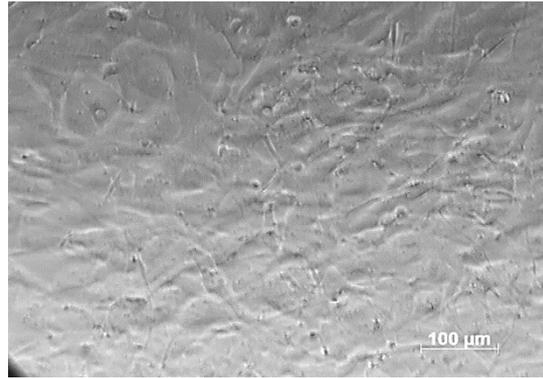
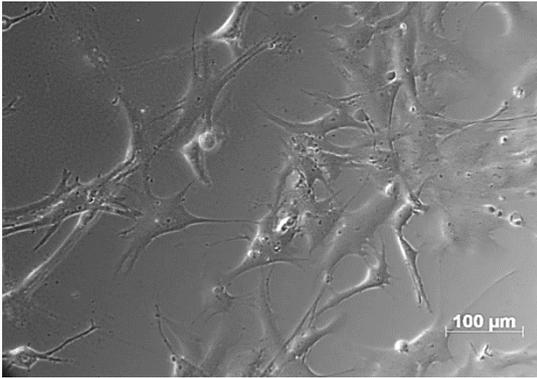
Prototyp 2B Tag 3

*Abbildung 13 Prototyp am 3. Tag im selben Ausschnitt, in verschiedenen Schnitttiefen bei einer 50 μm Vergrößerung und unbehandelt dargestellt.*



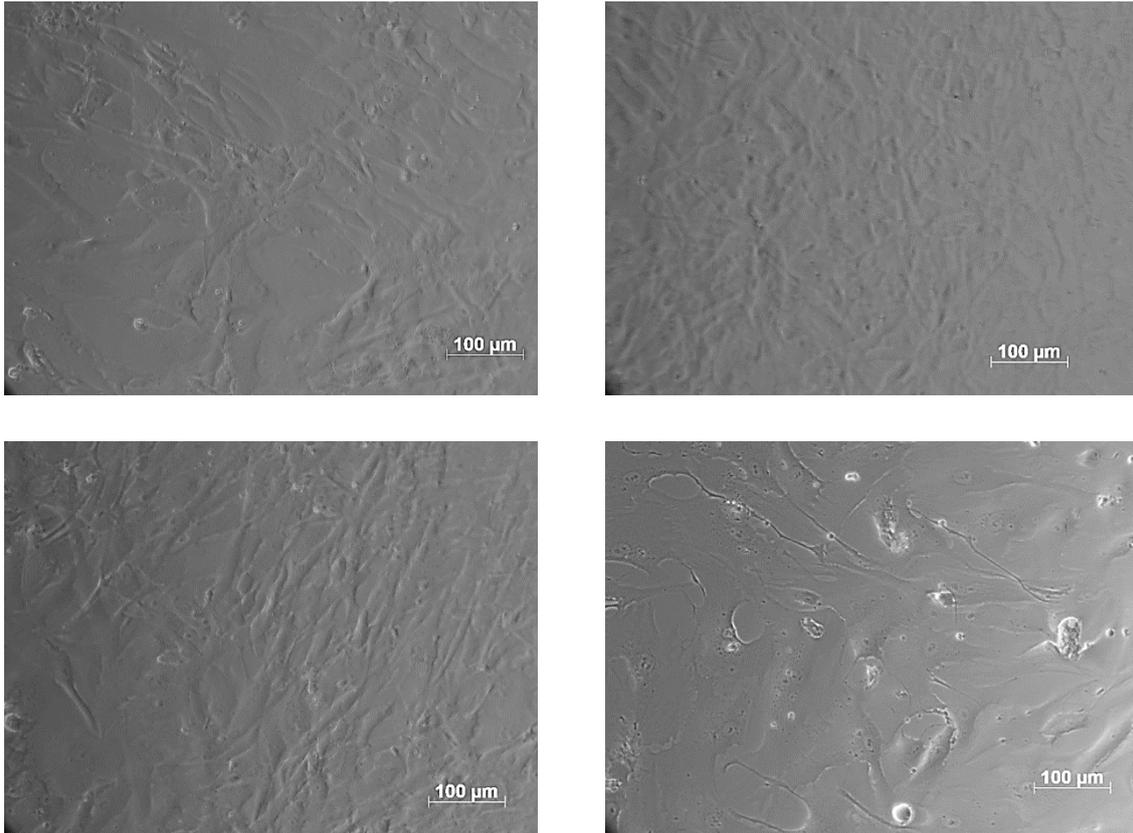
Prototyp 2B Tag7

*Abbildung 14 Prototyp der Reihe 2B am 7. Tag in verschiedenen Schichten, im selben Ausschnitt bei 50 µm Vergrößerung. Die hTERT-SMCs zeigen sich in ihrer ursprünglichen entspannten Zellform und kleiden mehr als eine Schicht aus und zeigen den unbehandelten Prototypen.*



Prototyp 2A Tag 10

*Abbildung 15 Prototyp der Reihe 2A am 10Tag in einer 100 µm Vergrößerung. Es handelt sich um denselben Ausschnitt in verschiedenen Schichttiefen und unbehandelten grundlegenden Prototyp.*

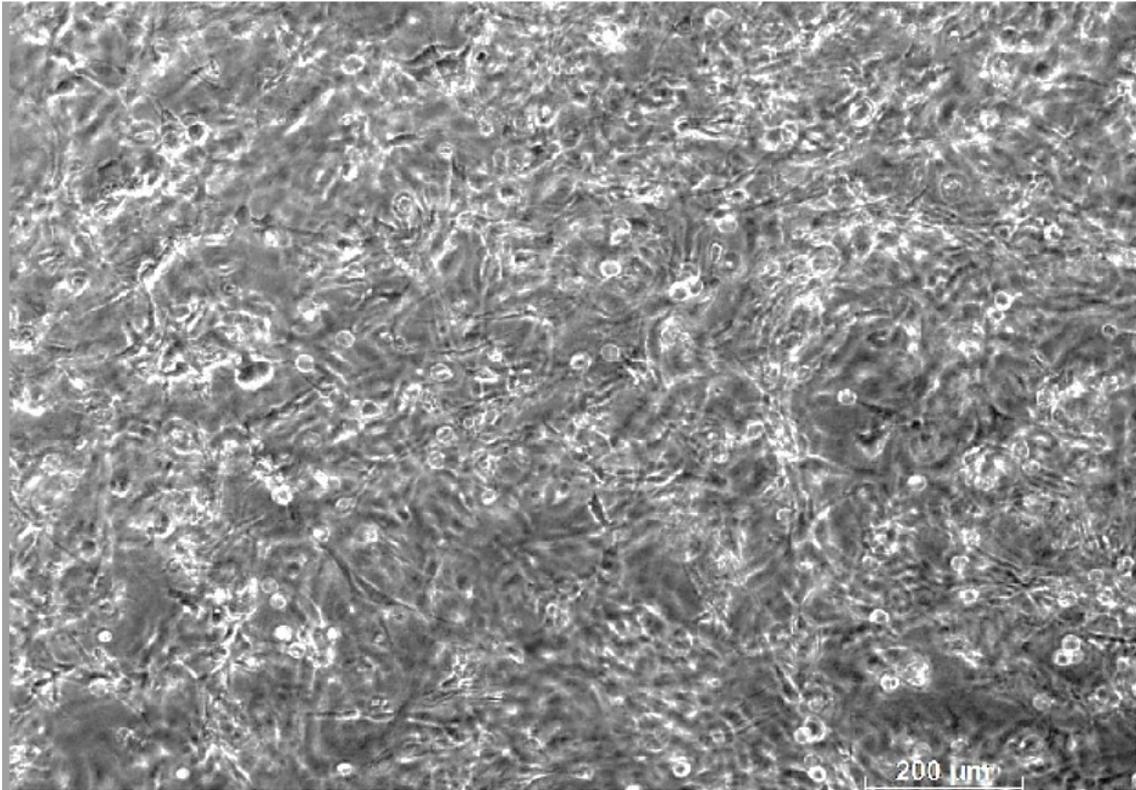


Prototyp 2B Tag 15

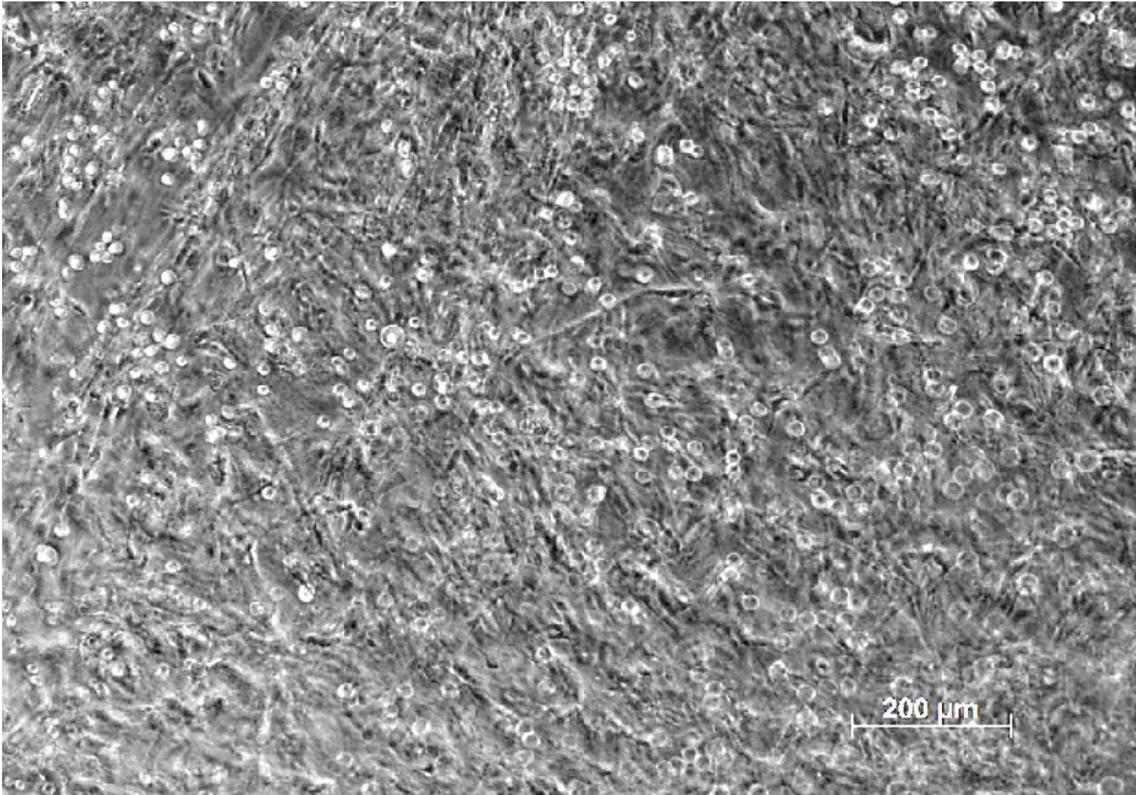
*Abbildung 16 Prototyp 2B am 15. Tag in einer Vergrößerung von 100 µm in verschiedenen Schichttiefen bei demselben Ausschnitt des grundlegenden, unbehandelten Prototyps.*

### **3.8 Auswertung der qRT-PCR des Prototyps**

Das fertige 3D-Modell wird nach der Transfektion entweder mit den siRNAs E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 (EIV) oder mit SCR-siRNA versetzt, um den Wirkungsgrad der siRNAs zu untersuchen. Mit Hilfe der Primer CD 14, CD 45, CD 68, IL-8, Cx 43, ICAM-1, V-CAM-1, E-Selektin, PECAM und GAPDH (Referenzgen) kann gezielt die Menge an Monozyten, die an der Endothelzellschicht adhären bestimmt werden, sowie die Expression der Adhäsionsmolekülmarker untersucht werden. Durch die siRNAs soll ein Knockdown der Adhäsionsmoleküle provoziert werden, so dass schließlich keine Monozyten auf der Oberfläche verbleiben.



*Abbildung 17 Prototyp nach Transfektion mit TNF $\alpha$  und ausgesäten MM6 in 200  $\mu$ m Vergrößerung. Es wird das initiale Stadium der Atherosklerose simuliert, hervorgerufen durch TNF $\alpha$  mit angehefteten MM6.*



*Abbildung 18 Prototyp nach Transfektion mit TNF $\alpha$ , mit MM6 und SCR-siRNA in 200  $\mu$ m Vergrößerung. Es wird das initiale Stadium der Atherosklerose simuliert, hervorgerufen durch TNF $\alpha$  und zusätzlich mit SCR-siRNA transfiziert.*

Die drei endgültigen Prototypen werden mittels der qRT-PCR statistisch ausgewertet (siehe Abb. 19, 20).

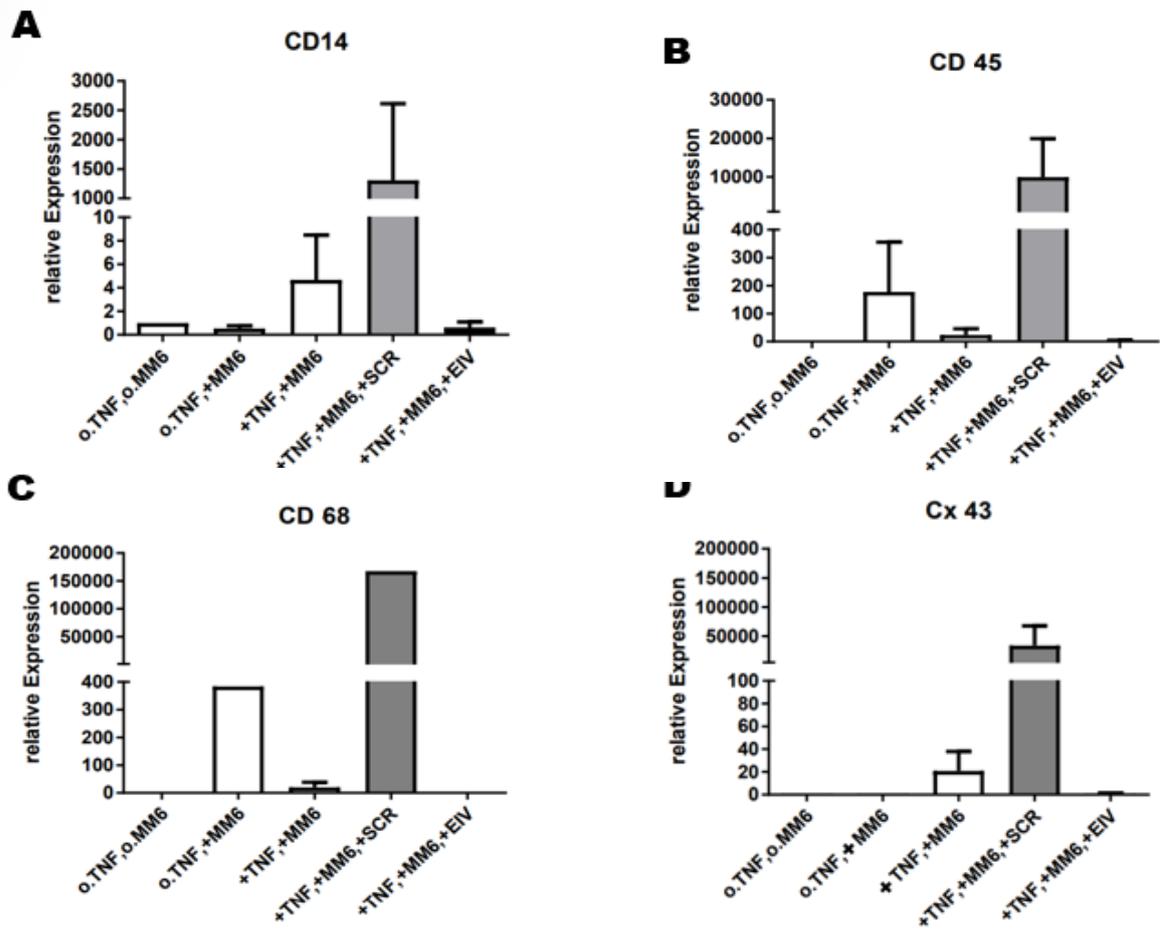


Abbildung 19 qRT-PCR Auswertung der Mittelwerte der drei Prototypen nach entsprechender Genexpression.

Die y-Achse zeigt die relative Genexpression der Monozytenmarker (CD14, CD45, CD68) sowie dem Marker für das Oberflächenstrukturmolekül Cx43 als Mittelwert mit Standardabweichung aus drei Versuchen, die x-Achse beinhaltet die Versuchsreihen „ohne TNF $\alpha$ , ohne MM6“, „ohne TNF $\alpha$  mit MM6“, „mit TNF $\alpha$  und MM6“, „mit TNF $\alpha$  und MM6 und der scrambled siRNA“ sowie „mit TNF $\alpha$  und MM6 und den siRNAs E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1. In Abb. A wird CD14, in B CD45, in C CD68, in D Cx43 dargestellt.

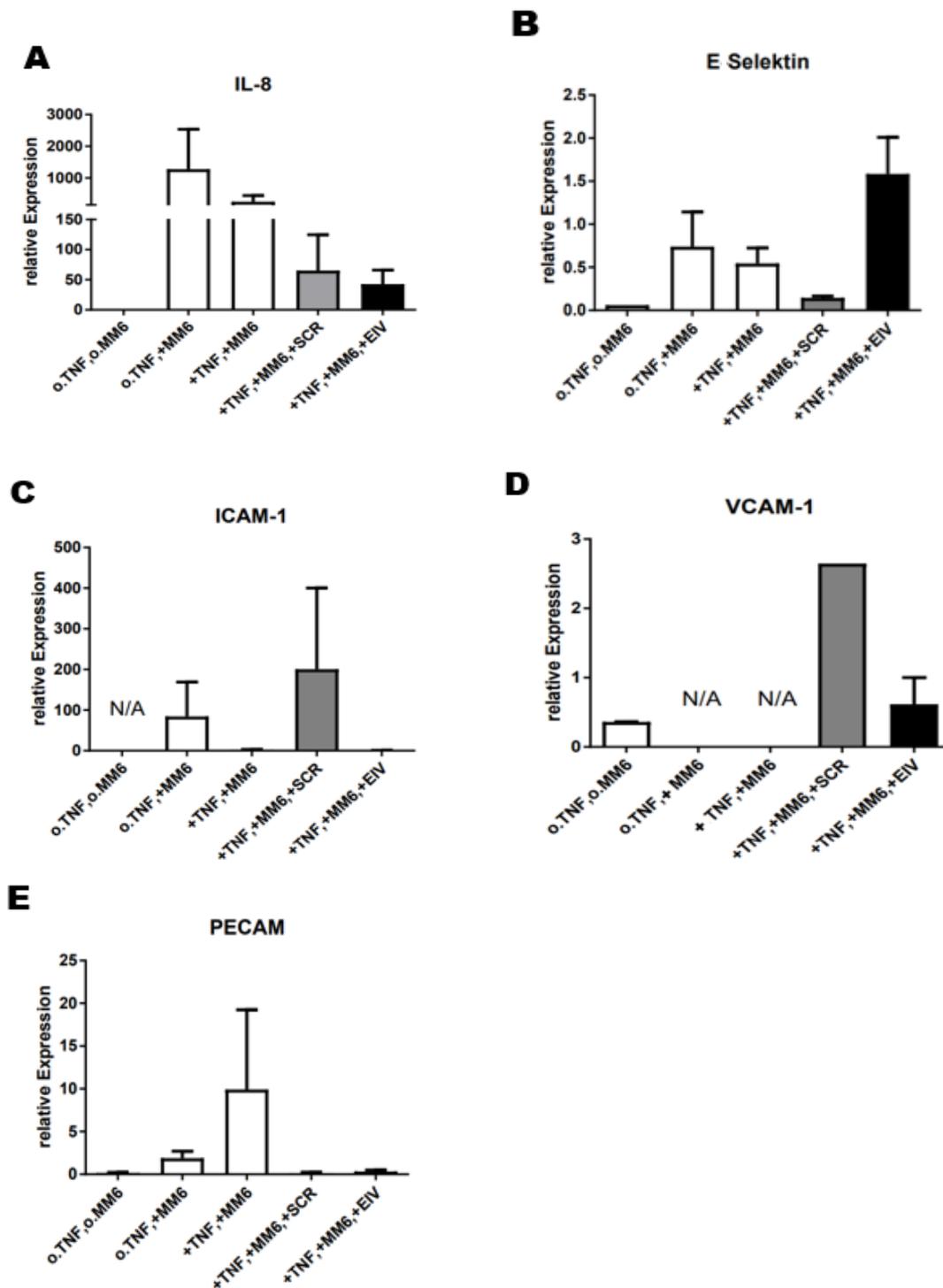


Abbildung 20 qRT-PCR Auswertung der Mittelwerte der drei Prototypen nach entsprechender Genexpression.

Die y-Achse zeigt die relative Genexpression des Entzündungsmarker IL-8 und der Adhäsionsmarker (E-Sel, ICAM-1, VCAM-1 und PECAM) als Mittelwert mit Standardabweichung aus 3 Versuchen, die x-Achse beinhaltet die Versuchsreihen „ohne TNF $\alpha$ , ohne MM6“, „ohne TNF $\alpha$  mit MM6“, „mit TNF $\alpha$  und MM6“, „mit TNF $\alpha$  und MM6 und der scrambled siRNA“ sowie „mit TNF $\alpha$  und MM6 und den siRNAs E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1. In Abb. A wird IL-8, in B E-Selektin, in C ICAM-1, in D VCAM-1, in E PECAM dargestellt.

Die Ergebnisse der qRT-PCR wurde anhand des Referenzgens GAPDH ausgewertet und die Nullprobe (ohne TNF, ohne MM6) auf 1 (dies entspricht 100%) festgelegt. Die Expressionswerte wurden graphisch in Bezug auf GAPDH dargestellt und zeigen drei Versuchsreihen des Prototyps auf.

Die Adhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 sowie das Zytokin IL-8, die Monozytenmarker CD 45 und CD 68 zeigen bereits in Anwesenheit von MM6 ohne eine Aktivierung mit TNF $\alpha$  (o.TNF $\alpha$ ,+MM6) eine Hochregulation (E-Sel auf 0,741 vgl. Aktivierung (+TNF $\alpha$ ,+MM6) von 0,545; ICAM-1 auf 84,557 vgl. (+TNF $\alpha$ ,+MM6) mit 2,2; IL-8 von 1277,1 vgl. (+TNF $\alpha$ ,+MM6) mit 250,871, sowie CD 45 auf 178,01 vgl. (+TNF $\alpha$ ,+MM6) mit 23,348; CD68 von 388,474 vgl. (+TNF $\alpha$ ,+MM6) mit 20,141. Die Anwesenheit von TNF $\alpha$  zeigt in diesem Fall keine gesteigerte Aktivierung, wie eigentlich zu erwarten wäre. Hier steigen die Expressionswerte bei der Behandlung mit TNF $\alpha$  (+TNF $\alpha$ ,+MM6) bei CD 14 um das 4,7 fache (SD= 14,01), Cx 43 um 20,8 fache (SD= 41,67), CD 45 um das 23,4-fache (SD= 70,05), CD 68 um das 20,1-fache (SD= 40,28), und ICAM-1 um das 2,2 fache.

Die Auswertung der MM6 Marker zeigt bei der Inkubation der MM6 in Anwesenheit von TNF $\alpha$  und SCR-siRNA (+TNF $\alpha$ ,+MM6,+SCR) auf den Prototypen in den meisten Fällen den höchsten gemessenen Anstieg bei den untersuchten Genexpressionen an, hierbei erhöhte sich CD 14 um das 1308-fache (SD = 3923 s. Abb. 19 A), CD 45 9970 fach (SD= 29.911 s. Abb. 19 B), CD 68 167.520-fach (s. Abb.19 C). Einen weiteren Anstieg zeigte Cx 43 um das 33860-fache (SD=67.720 s. Abb. 19 D) und die Adhäsionsmoleküle VCAM-1 um das 2,6-fache (s. Abb. 20 D) sowie ICAM-1 200-fach (SD= 601,7, s. Abb. 20 C).

Die Transfektion mit dem siRNA Cocktail (E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1) zeigt eine reduzierte relative Expression von ICAM-1 auf 86 % und VCAM-1 auf 61,6%, jedoch zeigte E-Selektin entgegen den Erwartungen eine erhöhte Expression mit 158 %: Die Monozytenmarker CD 14 und CD 45 sowie CD68 zeigen unterschiedliche Ergebnisse, CD 14 reduziert sich auf 63 %, CD 45 und CD 68

steigen auf das 2,4-fache bzw., 1,8-fache. Cx 43 verändert seine Expression nicht. Der Endothelzellmarker PECAM reduziert seine Expression auf 32 %.

Bei den Adhäsionsmarkern ICAM-1 konnte die Versuchsreihe (o.TNF $\alpha$ ,o.MM6), sowie bei VCAM-1 die Versuchsreihen (o.TNF,+MM6) und (+TNF $\alpha$ ,+MM6) auf Grund einer zu geringen mRNA-Menge nicht ausgewertet werden und in Bezug zur siRNA gesetzt werden.

## 4 Diskussion

Die Entwicklung eines in-vitro 3D-Modells der Plaqueentstehung bei Atherosklerose für die Untersuchung siRNA- oder mRNA- basierter therapeutischer Wirkstoffe ist ein zukunftsorientierter Ansatz in der Bekämpfung der multifaktoriellen Erkrankung. Das Ziel einen Prototyp zu erstellen, wird zu einem „proof-of-concept“ und zeigt das Potential für die notwendige Grundlagenforschung auf diesem Gebiet. Die Simulation eines initialen Stadiums der Erkrankung, durch die Behandlung mit TNF $\alpha$  und die initiale Anheftung durch MM6-Zellen, lassen einen ersten Eindruck über die Verwendung und Vielfältigkeit des Modells zu. Es gibt mittlerweile viele grundlegende und erfolgsversprechende Modelle, die auf Hydrogelen, wie Kollagenmatrix (Franke et al., 2014), Alginat-Hydrogelen (Gao et al., 2022) bzw. Fibrin-Hydrogelen (Wachendörfer et al., 2022) aufgebaut sind. Diese enthalten zum Teil auch einen mehrschichtigen Aufbau sowie die Verwendung von verschiedenen Zelltypen. In Bezug auf die Atherosklerose-Anwendungen implementieren diese zellbeladenen Hydrogel-Konstrukte ein 3D-in-vivo-Nachahmungsmodell, durch die zelluläre Interaktion und Pathophysiologie beobachtet werden können und dabei niedrigere Kosten, verbesserte Kontrollierbarkeit sowie eine höhere Anwendbarkeit im Vergleich zu Tiermodellen geschaffen wird (Chen et al., 2021). Diese Vorteile zeigen auch den Nutzen durch das hier vorgestellte Modell, das darüber hinaus zusätzlich eine mehrschichtige VSMC-Schicht samt innerer EC-Schicht, die der physiologischen Anatomie entspricht, umsetzen kann. Es wurde durch die Arbeitsgruppe von Carvalho et al. berichtet, dass sich die Arzneimittelreaktion des 3D-Modells von der des 2D-Modells unterscheidet und im 3D-Modell eine signifikant höhere Arzneimittelresistenz im Vergleich zu 2D-Modellen beobachtet wurde (Carvalho et al., 2017). Aus diesem Grund sollten Therapieansätze zukünftig so naheliegend an der Physiologie untersucht werden wie möglich und die 3D Simulationen weiter in den Fokus rücken und vertieft werden.

Um ein 3D Modell aufzubauen, braucht es die typischen Zellen wie glatte vaskuläre Muskelzellen und Endothelzellen. Dazu wurden die Zellen von abm® als hTERT VSMCs (immortalisierte humane aus der Carotide stammende VSMCs) sowie selbst gezüchtete Endothelzellen aus Spendervenen verwendet und charakterisiert. Die Endothelzellen waren eindeutig im Ergebnis typisiert und zeigten, dass das Protokoll für die Isolierung und Aufzucht als geeignet einzustufen ist. Die Fluoreszenzmikroskopie der ECs ist bereits als Grundlage ausreichend belegt und wurde auch in unserem Fall mit dem bekannten Antikörper „CD 31-PE“ getestet. Dieser Antikörper ist als Synonym für PECAM bekannt und ein transmembranes Glykoprotein, das z.B. bei endothelialen Zellverknüpfungen exprimiert wird und als Marker für folgende Zellen dient: Stammzellen der myeloischen Reihe, Thrombozyten, natürliche Killerzellen, neutrophile Granulozyten, Plasmazellen, Histozyten und Endothelzellen (DeLisser et al., 1993).

Für die Beurteilung der glatten Muskelzellen wird laut Protokoll eine dreifach-Färbung mittels CD 90, AlphaActin und DAPI vorgesehen, die sowohl über die Durchflusszytometrie als auch über die Fluoreszenzmikroskopie untersucht wurde.

Alpha-Actin ist ein Protein, das vorwiegend in glatten Muskelzellen zu finden ist und die Motilität und Kontraktilität der Zellen ermöglicht. Es wird als Antikörper in fast allen Gewebetypen vorwiegend im Zytoskelett exprimiert und kann sehr stark differenziert werden. Die Fluoreszenzbilder der Abbildung 10 zeigen deutlich die starke grünliche Färbung der vermeintlichen VSMCs an der Membranseite anstatt am zu erwartenden Zytoskelett, so dass in der Auswertung vermehrt von Fibroblasten als von glatten Muskelzellen auszugehen ist. Dies wurde auch durch das FACS-Ergebnis bestätigt.

Bei den verwendeten Antikörpern zur Fluoreszenzmikroskopie wird CD 90 in Kombination mit dem sekundären Antikörper anti-Maus igG-CY3 verwendet. CD 90 ist ein Antikörper zur Detektion von Fibroblasten und zählt zu den Oberflächenmolekülen.

Das Protokoll zur Isolierung von SMCs beinhaltet das Zerkleinern der Venenstücke sowie das Ablösen der Endothelzellen und des äußeren Bindegewebes, um die glatte Muskelzellschicht der Venen freizulegen. Damit wird die Möglichkeit geschaffen, diese auf 6-Wellplatten zu etablieren. Bei dem Versuch SMCs aus einem Venenstück zu extrahieren, zeigt sich eher das mikroskopische Bild von Fibroblasten im Well, die vermutlich schneller über Kontakte proliferieren als glatte Muskelzellen. Das Ergebnis des FACS-Versuches (Abb.8) weist deutlich mehr Ausschläge für den Antikörper CD 90, der ein Fibroblasten-Marker ist, als für Alpha-Actin auf. Es ist davon auszugehen, dass es makroskopisch, wie im Protokoll beschrieben, nicht möglich ist die Bindegewebsschicht der Vene exakt und vollständig zu entfernen, um die darunter liegende Muskelzellschicht freizulegen. Um eine Simulation der Gefäßwand durchführen zu können, muss eine reproduzierbare einheitliche Muskelzellschicht angesät werden können. Deshalb wurde während der Versuchsreihe auf die konstante Zelllinie der hTERT-SMCs zurückgegriffen (siehe Abb.9) und das Protokoll zur Gewinnung der VSMCs aus Spenderven und Arterien wieder verworfen.

Bei den hTERT-SMCs handelt es sich um immortalisierte humane glatte Muskelzelllinien aus der Karotide. Immortalisierte Zelllinien basieren auf Tumorzellen, die sich endlos teilen oder von genmanipulierten Zellen abstammen und somit über mehrere Passagen wachsen können. Dabei sind sie sehr gut erforscht und bieten die Vorteile von identischen Populationen, die zumeist homogen und konsistente, reproduzierbare Ergebnisse liefern. Zudem sind sie einfacher und robuster in ihrer Kultivierung. Davon abgesehen ist genau diese Möglichkeit der „endlosen“ Proliferation auch ein Nachteil, da die Zellen sich damit von den in vivo Zellen unterscheiden und es zu veränderten Genexpressionen oder verändertem Verhalten in vitro kommen kann. Daher wird geraten die Zelllinien nicht zu oft zu passagieren und in Abständen auf ihre Ursprünglichkeit zu testen (Carter and Shieh, 2015).

Die hTERT-SMCs sollen sich in den äußeren Schichten dreidimensional in vitro ansiedeln. Die verschiedenen Ebenen entwickeln sich dabei gestützt durch den Gewebekleber Beriplast P®. Durch regelmäßige Mediumswechsel sollen die

Zellen weiter proliferieren und im optimalen Fall flächendeckend ausstreuen. Beriplast P® wird eigentlich in der Chirurgie als unterstützende Therapie bei der Verbesserung der Hämostase sowie zur Förderung der Verklebung/Verschluss der Nahtsicherung verwendet. Die Bestandteile sind humanes Fibrinogen, Gerinnungsfaktor XII (human), Aprotinin (aus Rinderlunge) sowie humanes Thrombin und Calciumchlorid (CSL Behring GmbH, o.J.).

Die zurzeit bekannten Hydrogele lassen sich in natürliche und synthetische Hydrogele einteilen und werden verwendet, um In-vitro-Gewebe und Krankheitsmodelle zu entwickeln. Natürliche Hydrogele können aufgrund ihrer chemischen Natur in drei Hauptgruppen eingeteilt werden: Hydrogele auf Polysaccharidbasis (z. B. Hyaluronsäure, Chitosan, Dextran und Alginat), Protein- / Peptid-basierte Hydrogele (z. B. Kollagen, Gelatine, Elastin, Fibrin und Matrigel) und dezellularisierte extrazelluläre Matrix (dECM) -basierte Hydrogele (Liaw et al., 2018).

Trotz der Vorteile natürlicher Proteinhydrogele haben diese Biomaterialien potenzielle Probleme wie „Batch-to-Batch-Variationen“. Darüber hinaus werden einige Produkte von Säugetieren gewonnen, die höhere Kosten verursachen und möglicherweise Krankheitserreger übertragen könnten (Liaw et al., 2018).

Dies zeigt warum die Verwendung des Gewebeklebers in dem hier vorgestellten Modell interessant ist und einen anderen Ansatz bei der 3D Simulation zur Entwicklung eines geeigneten Prototyps darstellt, sowie eine interferenzfreie Anwendung des Gewebekleber verfolgt.

Die im Modell zu simulierende innerste Gefäßschicht wird durch die als letztes ausgesäten ECs vervollständigt. Diese ergeben anschließend eine flächendeckende, einheitliche Zellschicht. Anhand der mikroskopischen Beurteilung sieht man nach Wochen der Aufzucht einen dreidimensionalen Aufbau (siehe Abb.13,14), so dass man als Ergebnis eine gefäßähnliche Struktur erkennt.

Auf Grund der Anzahl der benötigten Zellen (pro Prototypen: 10 Wells mit mindestens 300.000 Zellen/Well), die für einen Versuch gebraucht werden,

wurden viele Prototypen begonnen, allerdings nur drei Stück bis zur qRT-PCR-Auswertung gebracht. Dies ist bei Versuchen mit Zellkulturen, die weit über vier bis sechs Wochen Anzuchtzeit haben, keine Seltenheit, da häufig mit Kontamination durch Mycoplasmen gerechnet werden muss (Drexler and Uphoff, 2002). Durch die lange Lagerungszeit im Brutschrank oder die Kombination beim Auftauen aus dem Stickstoff-Tank sowie durch das Verwenden von mehreren Zelllinien, besteht ein erhöhtes Risiko zur Kontamination (Windsor et al., 2010). Aus diesem Grund wurden die hTERT-SMCs nach dem Auftauen zusätzlich mit MycoKill™ in ihrem Medium behandelt (Suresh and West, 2020).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, die Anheftung oder Einwanderung von Entzündungszellen und die damit verbundene inflammatorische Reaktionskette über eine Transfektion durch siRNAs zu verhindern. So kann angenommen werden, dass der Entstehungsprozess und die Bildung von Plaques bei einem initialen Stadium der Atherosklerose durch spezifische siRNAs, die gegen Adhäsionsmoleküle gerichtet sind, verhindert werden kann.

Bisher wurden bereits viele Studien zu therapeutischen Ansätzen der RNAi aufgezeigt, die die Ausschaltung der Genexpressionen von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin, wie bei uns verwendet, belegt haben (Qu et al., 2009, Walker et al., 2007). Aktuell sind die ersten siRNA- und mRNA- basierten Therapeutika auf dem Markt erschienen, die bereits in Kapitel 1.2 Therapieansätze beschrieben wurden. Auf Grund dieser Studien ist es ein Bestreben die Weiterentwicklung in-vitro zu fokussieren, um diese Ansätze auch in einem 3D-Modell zu testen und dabei die vielschichtigen Gegebenheiten sowie die verschiedenen Atherosklerose-Stadien genauer zu betrachten und schneller therapeutische Ansätze in klinischen Studien testen zu können.

Zum Beispiel zeigen sich SMC-Phänotypen in der Lage eine faserige Kappe zu produzieren, die eine fortgeschrittene Plaque stabilisieren und damit das Risiko eines Bruchs verringern, andererseits die Bildung eines Thrombus verhindert. Ohne eine solche Stabilisierung könnte die Plaque reißen, was zu einer Thrombose führen würde, die häufig in fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose auftritt (Oppi et al., 2019). Darüber hinaus können SMCs, die in

der atheromatösen Plaque vorhanden sind, eine mineralisierte Matrix bilden, die zu Calciumablagerungen führen. Es wurde gezeigt, dass frühe Mikroverkalkungen die Plaque destabilisieren, während ausgedehntere Verkalkungen als stabilisierende Komponente für das Atherom dienen (Shi et al., 2020). Diese aktuellen Studien zeigen, aus welchen unterschiedlichen Ansatzpunkten ein Atherosklerosemodell betrachtet werden muss und wie das Modell weiterentwickelt werden könnte.

Die Untersuchung der mRNA-Menge bzw. der relativen Genexpression erfolgte in unserem Fall mittels der qRT-PCR und ermöglichte die Quantifizierung der Expression von Adhäsionsmolekülen und Monozytenmarkern. Die Monozyten werden normalerweise unter natürlichen Umständen vermehrt von den exprimierten Adhäsionsmolekülen (EIV), während eines inflammatorischen Prozesses, an der Endothelzelloberfläche rekrutiert und festgehalten. Durch die siRNAs wird eine Umkehrung des Effektes erzielt, die dem Knockdown der Rezeptoren geschuldet ist (Leuschner et al., 2011).

Die statistische Auswertung in unserem Fall beruht auf drei Versuchsdurchführungen und ermöglicht so eine erste Einschätzung des Prototyps und der gewählten siRNAs und soll als „proof-of-principle“ gesehen werden.

Es wurde die Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 untersucht. Zusätzlich wurde zur Quantifizierung der Monozytenbindung an den Prototypen die Expression von Monozytenmarkern (CD 14, CD 45, CD 68 und Connexin 43) und des Entzündungsmarkers IL-8 untersucht.

Der gesetzte Erwartungshorizont wurde bei ICAM-1, VCAM-1, PECAM, CD 14, CD 45, CD 68, Cx 43 und IL-8 in Bezug auf dem Knockdown durch die siRNAs „EIV“ vollständig erfüllt, indem eine geringe, bis keine Genexpression gemessen wurde. Somit werden die Gene zur Adhäsion in verschiedenen Ansatzpunkten gezielt herunterreguliert bzw. komplett gehemmt.

Bei CD 45 handelt es sich zum Beispiel, um einen generellen Leukozytenmarker, der sich auf allen Zellen hämatopoetischen Ursprungs befindet und die

mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) zur zellulären Aggregation anregt (Lorenz et al., 1993) und somit auch für die Integrin vermittelte Adhäsion von Makrophagen verantwortlich ist (Roach et al., 1997). CD 68 ist ein bekannter Monozytenmarker, der eine Rolle als spezifisches Bindungsprotein von oxidiertem LDL bei umgewandelten Makrophagen spielt (van der Kooij et al., 1997) und damit eine entscheidende Rolle bei der Therapie von Atherosklerose bietet. Des Weiteren zeigen die Daten von CD 14 und Cx 43, dass Monozyten vermehrt nach der Transfektion mit TNF $\alpha$  adhäreren und durch die Anwendung der siRNAs die Adhäsion erfolgreich reduziert werden kann. Connexin 43 ist das am meisten verbreitete Connexin in unserem kardiovaskulären System und ist sowohl in physiologische Prozesse als auch in verschiedene kardiovaskuläre Veränderungen, unter anderem auch Atherosklerose, involviert (Lee et al., 2012). Es zeigt sich in humanen atheromatösen Plaques hochreguliert und verbessert unter anderem die Migration von Monozyten in die Intima sowie deren Proliferation und Apoptose (Derouette et al., 2009, Wong et al., 2003). Ergebnisse einer Studie von Li et al. deuten auf eine pathogene Rolle von Cx43-Hemikanälen bei sterilen schädlichen sowie infektiösen entzündlichen Erkrankungen hin (Li et al., 2018b). Daher scheint die Runter-Regulation ein weiterer Ansatzpunkt in der Erkrankung zu sein.

E-Selektin zeigte anders als erwartet die stärkste Genexpression mit einer Hochregulation, um das 1,583 fache an, bei der Aktivierung mit TNF $\alpha$  und den siRNAs „EIV“, anstatt des erwarteten Knockdowns. Dies lässt sich wahrscheinlich dadurch erklären, dass E-Selektin aufgrund des TNF $\alpha$  Stimulus innerhalb der ersten zwölf Stunden stark exprimiert wird und die Transfektion durch die siRNAs im Anschluss von zwei bis drei Stunden wiederum schnell abgebaut wird. TNF $\alpha$  hat in unserer Versuchsreihe eine deutlich längere (zwölf bis dreizehn Stunden) Aktivierungszeit. Der Ansatz mit E-Selektin und den siRNAs zeigt, dass wahrscheinlich bis zum Zeitpunkt der Untersuchung die siRNAs bereits vollständig aufgebraucht wurden und nicht mehr vorhanden waren, um E-Selektin zu unterdrücken. Es gilt in weiteren Versuchen zu eruieren, ob das zeitliche Intervall der Aktivierung und Transfektion angepasst und Notfalls die siRNA-Konzentration für E-Selektin neu festgelegt werden muss. Bereits in

der Studie von Haraldsen et al., in der die Genexpression von E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nach Transfektion mit IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und LPS (Lipopolysaccharide) von HIMEC (human intestinal microvascular endothelial cells) anstatt der bekannten HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) betrachtet wird, zeigt sich die unterschiedliche Auswirkung auf Grund der verschiedenen Zelllinien und die damit verbundene Veränderung in der z.B. nachhaltigen Expression von E-Selektin nach 72 Stunden nach IL-1 $\beta$  Transfektion (Haraldsen et al., 1996). Neuste Studien von Deng et al. zeigen, dass eine gezielte Ausschaltung des Tumornekrosefaktorrezeptors 1 durch zum Beispiel eine mikroRNA (-29a-3p) zur Reduzierung der TNF $\alpha$  induzierten Endotheldysfunktion führt (Deng et al., 2019). Dies kann bedeuten, dass kleine mikroRNA, obwohl sie unkodierte Nukleotidsequenzen sind, ähnlich wie die untersuchten siRNAs, bereits die Transfektion vermindern bzw. beeinflussen können und somit zu Interferenzen führen könnten, ohne dass dies beabsichtigt wurde, da sie vom Körper selbst produziert werden können.

Die Auswertung von ICAM-1, VCAM-1 zeigt eine erfolgreiche Runterregulation bzw. Hemmung durch die siRNAs, wobei bei VCAM-1 in den Reihen „o.TNF $\alpha$ ,+MM6“ und „+TNF $\alpha$ ,+MM6“, wie bereits beschrieben keine auswertbaren Ergebnisse geliefert hat und somit nicht aussagekräftig in der Gesamtbetrachtung mit einbezogen werden kann. VCAM-1, das als vaskuläres Adhäsionsmolekül ähnlich wie ICAM-1 zählt, und zu den ersten Adhäsionsmolekülen in der Pathogenese von Atherosklerose führt, ist ein wichtiger Marker und kann darüber hinaus sogar in fortgeschrittenen Stadien durch IL-8 auch in glatten Muskelzellen exprimiert werden (Hastings et al., 2009). Im Ergebnis lassen sich über die ICAM-1 und VCAM-1-Bindung sowie die intrazelluläre Signalübertragung interessante Ansatzpunkte finden, die durch die Hemmung und Reduktion der Expression Einfluss auf verschiedene Erkrankungen haben könnten. Das Review aus dem Jahr 2011 von Cook-Mills et al. ergänzt, dass eine selektive Hemmung der VCAM-1 Funktion eine übermäßige Entzündung der VCAM-1 vermittelten Erkrankungen blockiert und gleichzeitig die vorteilhafte antimikrobielle Immunantwort aufrechterhält, die von ICAM-1 und PECAM-1 genutzt wird (Cook-Mills et al., 2011). PECAM zeigt nach

der Aktivierung durch TNF $\alpha$  und der Besiedelung von MM6 eine hohe Standardabweichung im Ergebnis auf, was eher auf ein Artefakt schließen lässt, da es als Endothelzellmarker grundsätzlich immer in gleicher Menge vorhanden sein sollte. Darüber hinaus zeigt eine andere Studie, dass eine ICAM-1-Antikörper-Vernetzung in HUVECs eine gesteigerte Produktion von IL-8 und CCL5 (CC-Chemokin Ligand 5) hervorruft (Dragoni et al., 2017) (Lomakina and Waugh, 2010), wobei beide Moleküle nachweislich die Endothelzell-Permeabilität beeinträchtigen (Talavera et al., 2004, Yu et al., 2013, Terao et al., 2008). Durch eine erhöhte Endothelzell-Permeabilität kann der inflammatorische Prozess weiter voranschreiten und mehr Entzündungszellen rekrutiert werden.

Die Marker E-Selektin, IL-8 und ICAM-1 zeigen bei der Versuchsreihe „o.TNF $\alpha$ ,+MM6“ alle eine hohe Genexpression zum Teil mit hoher Standardabweichung.

Dies lässt die Vermutung zu, dass der Versuchsaufbau, bei dem es sich um ein statisches Modell handelt, den vorhandenen Blutfluss bzw. Strömungen in vivo nicht simulieren kann. In der Folge kann die Adhäsion, die sonst durch die Zirkulation unter natürlichen Umständen vielleicht unterbunden bzw. minimiert wird, nicht imitiert werden. Vollblutperfusionsstudien zeigten erhöhte Leukozyteninteraktionen (Zellrollen und -adhärenz) an Stenosen eines gesunden und entzündeten Endothels an. Dies wiederum unterstreicht deutlich die Bedeutung von Gefäßentzündungen, Strömungsstörungen und Gefäßgeometrie bei der Rekapitulation der atherogenen Mikroumgebung. Zusammengefasst erleichtert der 3D-Stenosechip die quantitative Untersuchung der Hämodynamik und der Leukozyten-Endothel-Interaktionen und kann zu einem „Point-of-Care-Blutprofilierungsgerät“ für Atherosklerose und andere Gefäßerkrankungen weiterentwickelt werden. (Venugopal Menon et al., 2018).

So wird auch in anderen Studien beschrieben, dass unter anderem ECs und ansässige Immunzellen, mit myeloischen Ursprungs, für chemotaktische Signale an immunkompetenten Zellen und freigegebene Zytokine verantwortlich sein könnten (Li et al., 2018a, Mai et al., 2013). Weiter beschreiben Rong und Shapiro, dass VSMCs in verschiedenen Umgebungen dazu in der Lage sind, bestimmte

kontraktile Marker runter zu regulieren wie z.B. SM22a, wo hingegen andere wie CD 68 oder ABCA1 hochreguliert werden können (Rong et al., 2003).

Ein anderer Ansatz wäre durch Wongsurawat et al. bewiesen, die zeigen, dass VSMCs z.B. durch mechanischen Stress, Hyperlipidämie oder einem akuten Myocardinfarkt in der Lage sind, direkt oder indirekt Reaktionen zu zeigen, indem sie über Zell-zu-Zell Kontakte oder Zell-zu-extrazellulärer Matrix Interaktionen aufnehmen (Wongsurawat et al., 2018). Es ist nicht auszuschließen, dass die hTERT-SMCs durch das Wachsen innerhalb des Gewebeklebers und für die lange Versuchsdauer unter Stress standen. Darüber hinaus besteht ein möglicher Zusammenhang zwischen der Heterogenität der VSMCs (Majesky, 2007) und den Subtypen, basierend auf ihre embryonalen Ursprünge (Cheung et al., 2012) sowie die Schlüsselrolle bei der Vaskulogenese und Angiogenese (Wasteson et al., 2008, Jiang et al., 2000) in Betrachtung ihrer differenzierten Eigenschaften und Funktionen. Majesky beschreibt die Heterogenität und gibt einen Ausblick, warum unterschiedliche Blutgefäße verschieden auf gleiche Risikofaktoren in Verbindung mit Gefäßerkrankungen reagieren. Wong et al. zeigen, dass es bei entzündlichen Prozessen auf die Anpassung der VSMCs und ihrer Eigenschaft, zwischen verschiedenen Phenotypen zu wechseln (Wang et al., 2015), ankommt. Studien haben darüber hinaus gezeigt, dass apoptotische VSMCs und Immunzellen reichlich Zytokine wie IL-6, CCL2 (monocyte chemotactic protein-1) sowie ICAM-1, dass eine hohe inflammatorische Wirkung hat, produzieren (Silvestre-Roig et al., 2014). Retrospektiv betrachtet könnten auch apoptotische hTERT-SMCs aus dem Prototyp die Ergebnisse beeinflusst haben, da sich die Zellen durch die lange Aufzuchtphase in ihrer Umgebung verändert haben könnten. Zudem sind wie bereits beschrieben die Eigenschaften von immortalisierten Zelllinien nicht gleich mit denen der natürlichen Zelltypen in vivo.

In den dargestellten Versuchsreihen hat sich die SCR siRNA bei CD 14, CD 45, CD 68, Cx 43, ICAM-1 und VCAM-1 nicht als Negativprobe gegenüber den siRNAs verhalten, sondern zu einer gesteigerten Genexpression geführt. Es muss die Sequenz der SCR-siRNA zu den untersuchten siRNAs nochmals getestet und die Passgenauigkeit der verwendeten Sequenzen verifiziert werden. Buehler

et al. beschreiben in einer kleinen Studie 2012, dass SCR siRNAs nicht mehr als Nullprobe herangezogen werden sollten, da die Pflicht der Überprüfbarkeit zwischen richtig und falsch positiven Ergebnissen nicht gegeben sei. Sie verwendeten keine gegen das Genom überprüfte SCR siRNA, sondern nutzten potente target-siRNAs und tauschten z.B. Base 9 gegen 11 aus, um ein „mismatch“ in der mRNA zu erzeugen. Diese siRNAs eigneten sich viel besser, bei der Kategorisierung von „Off-Target Effekt“ und „On-Target-Effekt“ der siRNAs (Buehler et al., 2012). Ebenso wird in einer anderen Studie beschrieben, dass „scrambled“ siRNA nicht markierte Gene translatorisch unterdrücken kann, indem sie Dupletten mit Bulge-Loops der RNA eingehen und so den miRNA-Mechanismus initiieren (Doench et al., 2003). Ebenso wird eine weitere Frage aufgeworfen, inwieweit die Transfektion an sich, als einen Faktor selbst, berücksichtigt werden muss und Einfluss auf die Zellen ausübt. Da davon ausgegangen werden kann, dass ein gewisser Zellstress provoziert wird und dieser eventuell für eine zusätzliche Hochregulation verantwortlich sein kann, muss beim Betrachten des Ergebnisses von „EIV“-siRNA eventuell weiter differenziert werden. Libby beschreibt, dass Entzündungsmechanismen auch ohne klassische Risikofaktoren, wie beispielsweise Hyperlipidämie, Atherosklerose hervorgerufen werden kann (Libby, 2012). Unter anderem wird der Transfektion mit TNF $\alpha$  zugeschrieben, einen oxidativen Stress auf Endothelzellen auszuüben und damit Adhäsionsmoleküle weiter zu triggern und Leukozytenadhäsion sowie Migration zu begünstigen samt Inflammationskaskade (Kleinbongard, 2011, Wang, 2014).

Abschließend können die Schwankungen bzw. die nicht eingetroffenen Erwartungen einiger Ergebnisse zukünftig genauer analysiert werden, indem Endothelzell- sowie Muskelzellzahlen noch genauer quantifiziert werden. So könnte durch CD 90 oder AlphaActin gegenüber GAPDH als Referenzwert, das von allen Zellen exprimiert wird, die verschiedenen Zellmengen anders quantifiziert und eine Auswertung der Genexpressionen durchgeführt werden. Eine andere Möglichkeit wäre es eine Analyse der einzelnen Zellschichten unabhängig voneinander vorzunehmen und deren RNA zu extrahieren, um diese genauer differenzieren zu können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse einen guten Trend beschreiben bezüglich des Knockdowns von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen. Der Versuch zeigt das Potential der siRNAs, die gezielte Runterregulierung der Genexpression bis hin zur Hemmung der Adhäsion von MM6 an der Endothelzellschicht innerhalb des vorgestellten 3D Prototyps und der simulierten initialen Phase der Atherosklerose. Dadurch wird eine gezielte Genregulation möglich und langfristig die Basis geschaffen, bereits die ersten Prozesse der Atherosklerose präventiv zu unterbinden, in dem die lokale Transfektion die Adhäsion, Rekrutierung und Diapedese von inflammatorischen Entzündungszellen verhindert.

## 5 Fazit und Ausblick

Auf Grund unserer Ergebnisse zeigt sich bereits die erkennbare klinische Relevanz des 3D Modells für die therapeutische Anwendung von siRNA und mRNA. Da es sich bei dieser Arbeit zunächst um die Etablierung eines Prototyps in vitro handelt, muss anschließend der Trend der Ergebnisse durch eine statistisch relevante Anzahl weiter vertieft werden.

An der stetigen Weiterentwicklung und Verbesserung von 2D sowie 3D Modellen wird bereits gearbeitet und vor allem die Technik des „Bioprintings“ könnte eine wertvolle Ergänzung zu diesem 3D Modell sein. Diese Techniken bieten ein hohes Maß an Bionik, indem sie die Komplexität von Geweben und Organen nachbilden und für die Herstellung und Produktion auch hochskaliert werden können. Wichtig ist, dass Strategien der Biofabrikation die raumzeitliche Modulation von Zell-Zell- und Zell-extrazellulärer Matrix (ECM) -Interaktionen ermöglichen (Lind et al., 2017), (Dai et al., 2017), und durch die Formulierung und Verwendung von technischen Materialien wie Hydrogelen, die die Migration von Zellen ermöglichen, für die ECM-Abscheidung umgestaltet werden können (Moroni et al., 2018).

Mit Hilfe des in-vitro angesetzten Modells, können in der ersten Forschungsphase, die ausgewählten Therapeutika zielgerichtet getestet werden und benötigen wie in dem konkreten Fall keine viralen Vektoren mehr, reduzieren teure Tierversuche und sind näher an physiologischen Gegebenheiten. Es könnte zukünftig an eine direkte Transfektion von z.B. Venenstücken, die für Bypässe gedacht werden oder auch über einen chirurgisch minimalinvasiven Kathetereinsatz eine direkte Transfektion lokal verfolgt werden. Seit geraumer Zeit werden verschiedenen Anwendung von siRNAs in diversen Arten von Beschichtungen im Bereich von Stents (Koenig et al., 2017, Moses et al., 2003), Verhinderungen von Restenosen (Li et al., 2010) weiterverfolgt und bereits als Therapeutika eingesetzt. So können nun lokale Ansatzpunkte und 3D Modelle sowie deren Weiterentwicklung zu dynamischen Systemen neu betrachtet werden und nicht nur rein chirurgische Maßnahmen und Materialien ausgebaut werden.

In Zukunft sollte der Fokus auf den interferenzfreien Aufbau des 3D-Modells gelegt werden, indem eine ausreichende Zellzahl zeitgleich zur Verfügung steht. Durch eine statistisch angemessene Anzahl an Versuchsdurchführungen würde sichergestellt werden, dass die bereits ausgewählten siRNAs oder die SCR-siRNA eine gute Basis für weitere Adhäsionskonzepte der Atherosklerose bieten. Je nach Schwerpunkt würde sich das Modell darüber hinaus dazu eignen, stabile 3D Schnitte auch über ein Rasterelektronenmikroskop auszuwerten, um beispielsweise Eindringtiefen von inflammatorischen Zellen und Prozessbeteiligung zu beobachten. Die daraus weiteren Einsatzmöglichkeiten und Therapieansätze können zum Beispiel transendotheliale Migration („TEM“) differenziert untersuchen (Martinelli et al., 2014). Darüber hinaus könnte die in einem anderen Modell bekannte Membranvesikel (extrazelluläre Vesikel) und deren Effekt auf die Dysfunktion von Endothelzellen im Zusammenhang mit einer erhöhten Produktion von entzündlichen Zytokinen, wie VCAM-1, ICAM-1, IL-6, IL-1 $\beta$  (Charla et al., 2020, Huber et al., 2002), weiterverfolgt werden. Im gesamten Kontext der Atherosklerose würde man sich dadurch weiter von alloplastischen Methoden wie Stents, Ballons usw. entfernen und somit weniger iatrogene Komplikationen und Immunreaktionen provozieren. Außerdem könnte man so einem frühzeitigeren, individuelleren und schonenden Therapieansatz verfolgen.

## 6 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, ein in-vitro 3D-Modell zu entwickeln, das bei der Plaquettenentstehung im Zuge der Atherosklerose für die Untersuchung von siRNA oder mRNA basierter therapeutischer Ansätze herangezogen werden kann.

Zu Beginn wurden sowohl Endothelzellen als auch glatte vaskuläre Muskelzellen aus Resten von Spendervenestücken von Patienten aus der Chirurgie isoliert und mittels Fluoreszenzmikroskopie und FACS charakterisiert. Die Ergebnisse zeigten, dass das bereits aus der Literatur bekannte Protokoll für EC-Isolierung funktioniert und die ECs mittels des Markers CD31 für das jeweilige Verfahren bestätigt werden konnten. Zur Auswertung der VSMCs wurden die Marker CD90, Alpha-Actin verwendet. Über die Fluoreszenzmikroskopie als auch über die Ergebnisse des FACS ist davon auszugehen, dass es sich nicht eindeutig um VSMCs handelt. Die hohe Anzahl an CD90 positiven Zellen, deutet vielmehr auf Fibroblasten hin. Das Protokoll zur makroskopischen Isolierung von VSMCs stellte sich als nicht ausreichend heraus. Daraus abgeleitet, wurden hTERT-VSMCs von der Firma abm® eingekauft.

Anschließend wurde der Prototyp mittels des Gewebeklebers Beriplast® und den hTERT-VSMCs angesetzt. Das Ziel war es eine mehrschichtige, einheitliche Besiedlung zu bewirken, auf die abschließend Endothelzellen angesiedelt werden konnten. Parallel dazu wurden MM6 angezüchtet. Darauf folgend wurden die Zellen entsprechend des von uns formulierten Versuchsaufbaus „ohne TNF $\alpha$ , ohne MM6“, „mit TNF $\alpha$ , ohne MM6“, „mit TNF $\alpha$ , mit MM6“, „mit TNF $\alpha$ , mit MM6, mit SCR-siRNA“, „mit TNF $\alpha$ , mit MM6, mit EIV“ transfiziert und die MM6 ausgesät. Abschließend wurde die qRT-PCR zur Messung der Genexpression mit den Markern CD 14, 45, 68, Cx 43, E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1, IL-8 und PECAM-1 in Bezug auf das Referenzgen GAPDH ausgewertet.

Das Ergebnis hat gezeigt, dass die Tendenz des Knockdowns über die verwendeten siRNAs erreicht werden kann, so dass nicht vermehrt MM6 Zellen an der Oberfläche des Prototyps adhären. Allerdings zeigte sich die hier verwendete SCR-siRNA nicht wie beabsichtigt als Negativprobe, sondern in fast allen Fällen wurde eine erhöhte Genexpression gemessen.

Abschließend lässt sich sagen, dass das 3D-Modell eine weitere Möglichkeit zur Forschung in vitro darstellen kann, da bereits mit Fibringerüsten und Hydrogelen geforscht wird. Es werden immer noch viele Bausteine der Pathogenese und Einflussfaktoren zur Ursache von Atherosklerose diskutiert, wie z.B. die Interaktion zwischen ECs und VSMCs sowie der Einfluss des Gerinnungsfaktors XII, oder die embryonale Herkunft und damit die Eigenschaften von VSMCs sowie ihre Heterogenität im Gesamtkontext. Zusammenfassend weist das Ergebnis eine Perspektive im Umgang mit der immer noch weltweit verbreiteten Gefäßerkrankung Atherosklerose auf, die sehr individuelle Ansatzpunkte bietet. Die Idee bezieht sich auf das aktuelle Forschungsgebiet der siRNAs und ihre therapeutischen Ansätze, indem nicht nur alloplastische Transplantate im Mittelpunkt der Angioplastie stehen, sondern die Beschichtung, wie in unserem Fall, simuliert direkt an der Gefäßwand angewendet wird. Dadurch erhofft man sich, dass weniger Immunreaktion auf Fremdmaterial hervorgerufen und iatrogene Komplikationen anteilig ausgeschlossen werden und ein schnellerer und günstigerer Versuchsaufbau zur Verfügung stehen könnte.

## 7 Literaturverzeichnis

- ADMINISTRATION, U. S. F. A. D. 2020-11-23. *FDA Approves First Drug to Treat Rare Metabolic Disorder* [Online]. Available: <https://fda.gov/news-events/presannouncements/fda-approves-first-drug-treat-rare-metabolic-disorder> [Accessed].
- ALBERER, M., GNAD-VOGT, U., HONG, H. S., MEHR, K. T., BACKERT, L., FINAK, G., GOTTARDO, R., BICA, M. A., GAROFANO, A., KOCH, S. D., FOTIN-MLECZEK, M., HOERR, I., CLEMENS, R. & VON SONNENBURG, F. 2017. Safety and immunogenicity of a mRNA rabies vaccine in healthy adults: an open-label, non-randomised, prospective, first-in-human phase 1 clinical trial. *Lancet*, 390, 1511-1520.
- ANTTILA, V., SARASTE, A., KNUUTI, J., JAAKKOLA, P., HEDMAN, M., SVEDLUND, S., LAGERSTRÖM-FERMÉR, M., KJAER, M., JEPSSON, A. & GAN, L. M. 2020. Synthetic mRNA Encoding VEGF-A in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting: Design of a Phase 2a Clinical Trial. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 18, 464-472.
- ARMBRUSTER, N., JASNY, E. & PETSCH, B. 2019. Advances in RNA Vaccines for Preventive Indications: A Case Study of A Vaccine Against Rabies. *Vaccines (Basel)*, 7.
- BERTRAM, J. 2006. MATra - Magnet Assisted Transfection: combining nanotechnology and magnetic forces to improve intracellular delivery of nucleic acids. *Curr Pharm Biotechnol*, 7, 277-85.
- BIO-RAD, L. G. o. J. *RNA Isolation* [Online]. Hertfordshire: Bio-Rad Laboratories GmbH, . Available: <https://www.bio-rad.com/> [Accessed 14.02.2021].
- BUEHLER, E., CHEN, Y.-C. & MARTIN, S. 2012. C911: A bench-level control for sequence specific siRNA off-target effects. *PLoS one*, 7, e51942-e51942.
- BYRNE, R. A., JONER, M. & KASTRATI, A. 2015. Stent thrombosis and restenosis: what have we learned and where are we going? The Andreas Grüntzig Lecture ESC 2014. *European Heart Journal*, 36, 3320-3331.
- CARTER, M. & SHIEH, J. 2015. Chapter 14 - Cell Culture Techniques. In: CARTER, M. & SHIEH, J. (eds.) *Guide to Research Techniques in Neuroscience (Second Edition)*. San Diego: Academic Press.
- CARVALHO, M. R., LIMA, D., REIS, R. L., OLIVEIRA, J. M. & CORRELO, V. M. 2017. Anti-Cancer Drug Validation: the Contribution of Tissue Engineered Models. *Stem Cell Rev Rep*, 13, 347-363.
- CHARLA, E., MERCER, J., MAFFIA, P. & NICKLIN, S. A. 2020. Extracellular vesicle signalling in atherosclerosis. *Cellular signalling*, 75, 109751-109751.
- CHEN, J., ZHANG, X., MILLICAN, R., LYND, T., GANGASANI, M., MALHOTRA, S., SHERWOOD, J., HWANG, P. T., CHO, Y., BROTT, B. C., QIN, G., JO, H., YOON, Y. S. & JUN, H. W. 2021. Recent Progress in in vitro Models for Atherosclerosis Studies. *Front Cardiovasc Med*, 8, 790529.
- CHEUNG, C., BERNARDO, A. S., TROTTER, M. W., PEDERSEN, R. A. & SINHA, S. 2012. Generation of human vascular smooth muscle subtypes provides insight into

- embryological origin-dependent disease susceptibility. *Nat Biotechnol*, 30, 165-73.
- CLINTON, S. K., UNDERWOOD, R., HAYES, L., SHERMAN, M. L., KUFE, D. W. & LIBBY, P. 1992. Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am J Pathol*, 140, 301-16.
- CONRY, R. M., LOBUGLIO, A. F., WRIGHT, M., SUMEREL, L., PIKE, M. J., JOHANNING, F., BENJAMIN, R., LU, D. & CUIEL, D. T. 1995. Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector. *Cancer Res*, 55, 1397-400.
- COOK-MILLS, J. M., MARCHESE, M. E. & ABDALA-VALENCIA, H. 2011. Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxidants & redox signaling*, 15, 1607-1638.
- CORBETT, K. S., FLYNN, B., FOULDS, K. E., FRANCICA, J. R., BOYOGLU-BARNUM, S., WERNER, A. P., FLACH, B., O'CONNELL, S., BOCK, K. W., MINAI, M., NAGATA, B. M., ANDERSEN, H., MARTINEZ, D. R., NOE, A. T., DOUEK, N., DONALDSON, M. M., NJI, N. N., ALVARADO, G. S., EDWARDS, D. K., FLEBBE, D. R., LAMB, E., DORIA-ROSE, N. A., LIN, B. C., LOUDER, M. K., O'DELL, S., SCHMIDT, S. D., PHUNG, E., CHANG, L. A., YAP, C., TODD, J. M., PESSAINT, L., VAN RY, A., BROWNE, S., GREENHOUSE, J., PUTMAN-TAYLOR, T., STRASBAUGH, A., CAMPBELL, T. A., COOK, A., DODSON, A., STEINGREBE, K., SHI, W., ZHANG, Y., ABIONA, O. M., WANG, L., PEGU, A., YANG, E. S., LEUNG, K., ZHOU, T., TENG, I. T., WIDGE, A., GORDON, I., NOVIK, L., GILLESPIE, R. A., LOOMIS, R. J., MOLIVA, J. I., STEWART-JONES, G., HIMANSU, S., KONG, W. P., NASON, M. C., MORABITO, K. M., RUCKWARDT, T. J., LEDGERWOOD, J. E., GAUDINSKI, M. R., KWONG, P. D., MASCOLA, J. R., CARFI, A., LEWIS, M. G., BARIC, R. S., MCDERMOTT, A., MOORE, I. N., SULLIVAN, N. J., ROEDERER, M., SEDER, R. A. & GRAHAM, B. S. 2020. Evaluation of the mRNA-1273 Vaccine against SARS-CoV-2 in Nonhuman Primates. *N Engl J Med*, 383, 1544-1555.
- CROWTHER, M. A. 2005. Pathogenesis of Atherosclerosis. *Hematology*, 2005, 436-441.
- CSL BEHRING GMBH. o.J. *Beriplast® P Combi-Set* [Online]. Available: <https://www.beriplast.de/> [Accessed 07.03.2021].
- DAI, X., LIU, L., OUYANG, J., LI, X., ZHANG, X., LAN, Q. & XU, T. 2017. Coaxial 3D bioprinting of self-assembled multicellular heterogeneous tumor fibers. *Sci Rep*, 7, 1457.
- DAVIES, M. J., RICHARDSON, P. D., WOOLF, N., KATZ, D. R. & MANN, J. 1993. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *British heart journal*, 69, 377-381.
- DELISSER, H. M., NEWMAN, P. J. & ALBELDA, S. M. 1993. *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (CD31)*, Berlin, Springer.
- DENG, X., CHU, X., WANG, P., MA, X., WEI, C., SUN, C., YANG, J. & LI, Y. 2019. MicroRNA-29a-3p Reduces TNF $\alpha$ -Induced Endothelial Dysfunction by Targeting Tumor Necrosis Factor Receptor 1. *Mol Ther Nucleic Acids*, 18, 903-915.
- DEROUELLE, J. P., WONG, C., BURNIER, L., MOREL, S., SUTTER, E., GALAN, K., BRISSET, A. C., ROTH, I., CHADJICHRISTOS, C. E. & KWAK, B. R. 2009. Molecular role of Cx37 in advanced atherosclerosis: a micro-array study. *Atherosclerosis*, 206, 69-76.

- DOENCH, J. G., PETERSEN, C. P. & SHARP, P. A. 2003. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev*, 17, 438-42.
- DRAGONI, S., HUDSON, N., KENNY, B. A., BURGOYNE, T., MCKENZIE, J. A., GILL, Y., BLABER, R., FUTTER, C. E., ADAMSON, P., GREENWOOD, J. & TUROWSKI, P. 2017. Endothelial MAPKs Direct ICAM-1 Signaling to Divergent Inflammatory Functions. *J Immunol*, 198, 4074-4085.
- DREXLER, H. G. & UPHOFF, C. C. 2002. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*, 39, 75-90.
- EDDY, S. R. 2001. Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nature Reviews Genetics*, 2, 919-929.
- ELBASHIR, S. M., HARBORTH, J., LENDECKEL, W., YALCIN, A., WEBER, K. & TUSCHL, T. 2001a. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411, 494-498.
- ELBASHIR, S. M., LENDECKEL, W. & TUSCHL, T. 2001b. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 15, 188-200.
- ENGELE, J. 2006. Herz-Kreislauf-System- Grundlagen. In: AUMÜLLER, G., AUST, G., DOLL, A., ENGELE, J., KIRSCH, J., MENSE, S., REIßIG, D., SALVETTER, J., SCHMIDT, W., SCHMITZ, F., SCHULTE, E., SPANEL-BOROWSKI, K., WOLFF, W., WURZINGER, L. J. & ZILCH, H.-G. (eds.) *Duale Reihe- Anatomie*. 1st ed. Stuttgart: Thieme.
- FENG, B., ZHANG, D., KURIAKOSE, G., DEVLIN, C. M., KOCKX, M. & TABAS, I. 2003. Niemann-Pick C heterozygosity confers resistance to lesional necrosis and macrophage apoptosis in murine atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 10423-8.
- FINN, A. V., NAKAZAWA, G., JONER, M., KOLODZIE, F. D., MONT, E. K., GOLD, H. K. & VIRMANI, R. 2007. Vascular Responses to Drug Eluting Stents. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27, 1500-1510.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E. & MELLO, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-11.
- FISCHMAN, D. L., LEON, M. B., BAIM, D. S., SCHATZ, R. A., SAVAGE, M. P., PENN, I., DETRE, K., VELTRI, L., RICCI, D., NOBUYOSHI, M., CLEMAN, M., HEUSER, R., ALMOND, D., TEIRSTEIN, P. S., FISH, R. D., COLOMBO, A., BRINKER, J., MOSES, J., SHAKNOVICH, A., HIRSHFELD, J., BAILEY, S., ELLIS, S., RAKE, R. & GOLDBERG, S. 1994. A Randomized Comparison of Coronary-Stent Placement and Balloon Angioplasty in the Treatment of Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine*, 331, 496-501.
- FRANKE, K., SAPUDOM, J., KALBITZER, L., ANDEREGG, U. & POMPE, T. 2014. Topologically defined composites of collagen types I and V as in vitro cell culture scaffolds. *Acta Biomater*, 10, 2693-702.
- GAO, Y., KANG, Y., WANG, T., LI, C., SHEN, S., QU, C., GONG, S., LIU, P., YANG, L., LIU, J., HAN, B. & LI, C. 2022. Alginate microspheres-collagen hydrogel, as a novel 3D culture system, enhanced skin wound healing of hUCMSCs in rats model. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 219, 112799.

- GIMBRONE, M. A., JR. & GARCÍA-CARDEÑA, G. 2013. Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 22, 9-15.
- GRÜNTZIG, A. & KUMPE, D. A. 1979. Technique of percutaneous transluminal angioplasty with the Grüntzig balloon catheter. *AJR Am J Roentgenol*, 132, 547-52.
- GSTRAUNTHALER, G. & LINDL, T. 2013. *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*, Berlin, Springer Spektrum.
- GU, L., OKADA, Y., CLINTON, S. K., GERARD, C., SUKHOVA, G. K., LIBBY, P. & ROLLINS, B. J. 1998. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell*, 2, 275-81.
- HAMILTON, A. J. & BAULCOMBE, D. C. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286, 950-2.
- HARADA, A., SEKIDO, N., AKAHOSHI, T., WADA, T., MUKAIDA, N. & MATSUSHIMA, K. 1994. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 56.
- HARALDSEN, G., KVALE, D., LIEN, B., FARSTAD, I. N. & BRANDTZAEG, P. 1996. Cytokine-regulated expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human microvascular endothelial cells. *J Immunol*, 156, 2558-65.
- HASTINGS, N. E., FEAVER, R. E., LEE, M. Y., WAMHOFF, B. R. & BLACKMAN, B. R. 2009. Human IL-8 regulates smooth muscle cell VCAM-1 expression in response to endothelial cells exposed to atheroprone flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29, 725-31.
- HEKELE, A., BERTHOLET, S., ARCHER, J., GIBSON, D. G., PALLADINO, G., BRITO, L. A., OTTEN, G. R., BRAZZOLI, M., BUCCATO, S., BONCI, A., CASINI, D., MAIONE, D., QI, Z. Q., GILL, J. E., CAIAZZA, N. C., URANO, J., HUBBY, B., GAO, G. F., SHU, Y., DE GREGORIO, E., MANDL, C. W., MASON, P. W., SETTEMBRE, E. C., ULMER, J. B., CRAIG VENTER, J., DORMITZER, P. R., RAPPUOLI, R. & GEALL, A. J. 2013. Rapidly produced SAM(®) vaccine against H7N9 influenza is immunogenic in mice. *Emerg Microbes Infect*, 2, e52.
- HIGUCHI, R., DOLLINGER, G., WALSH, P. S. & GRIFFITH, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*, 10, 413-7.
- HUBBARD, A. K. & ROTHLEIN, R. 2000. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med*, 28, 1379-86.
- HUBER, J., VALES, A., MITULOVIC, G., BLUMER, M., SCHMID, R., WITZTUM, J. L., BINDER, B. R. & LEITINGER, N. 2002. Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, 101-7.
- JIANG, X., ROWITCH, D. H., SORIANO, P., MCMAHON, A. P. & SUCOV, H. M. 2000. Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development*, 127, 1607-16.
- KANNEL, W. B. & MCGEE, D. L. 1979. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *Jama*, 241, 2035-8.

- KAPRANOV, P., ST LAURENT, G., RAZ, T., OZSOLAK, F., REYNOLDS, C. P., SORENSEN, P. H., REAMAN, G., MILOS, P., ARCECI, R. J., THOMPSON, J. F. & TRICHE, T. J. 2010. The majority of total nuclear-encoded non-ribosomal RNA in a human cell is 'dark matter' un-annotated RNA. *BMC Biol*, 8, 149.
- KOENIG, O., ZENGERLE, D., PERLE, N., HOSSFELD, S., NEUMANN, B., BEHRING, A., AVCI-ADALI, M., WALKER, T., SCHLENSAK, C. & WENDEL, H. P. 2017. RNA-eluting surfaces for the modulation of gene expression as a novel stent concept. *Pharmaceuticals*, 10, 23.
- KREUZER, J. & TEIFENBACHER, C. 2003. *Atherosklerose*, Stuttgart, Thieme
- KUBISTA, M., ANDRADE, J. M., BENGTTSSON, M., FOROOTAN, A., JONÁK, J., LIND, K., SINDELKA, R., SJÖBACK, R., SJÖGREEN, B., STRÖMBOM, L., STÅHLBERG, A. & ZORIC, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 95-125.
- LEAL, L., GUARDO, A. C., MORÓN-LÓPEZ, S., SALGADO, M., MOTHE, B., HEIRMAN, C., PANNUS, P., VANHAM, G., VAN DEN HAM, H. J., GRUTERS, R., ANDEWEG, A., VAN MEIRVENNE, S., PICH, J., ARNAIZ, J. A., GATELL, J. M., BRANDER, C., THIELEMANS, K., MARTÍNEZ-PICADO, J., PLANA, M. & GARCÍA, F. 2018. Phase I clinical trial of an intranodally administered mRNA-based therapeutic vaccine against HIV-1 infection. *Aids*, 32, 2533-2545.
- LECHNER, K., VON SCHACKY, C., MCKENZIE, A. L., WORM, N., NIXDORFF, U., LECHNER, B., KRÄNKEL, N., HALLE, M., KRAUSS, R. M. & SCHERR, J. 2020. Lifestyle factors and high-risk atherosclerosis: Pathways and mechanisms beyond traditional risk factors. *European journal of preventive cardiology*, 27, 394-406.
- LEE, E. S., VAN SPYK, E. N., CHUN, K. C., PITTS, R. L., WU, M. H. & YUAN, S. Y. 2012. Monocytic adhesion molecule expression and monocyte-endothelial cell dysfunction are increased in patients with peripheral vascular disease versus patients with abdominal aortic aneurysms. *J Surg Res*, 177, 373-81.
- LEUSCHNER, F., DUTTA, P., GORBATOV, R., NOVOBRANTSEVA, T. I., DONAHOE, J. S., COURTIES, G., LEE, K. M., KIM, J. I., MARKMANN, J. F., MARINELLI, B., PANIZZI, P., LEE, W. W., IWAMOTO, Y., MILSTEIN, S., EPSTEIN-BARASH, H., CANTLEY, W., WONG, J., CORTEZ-RETAMOZO, V., NEWTON, A., LOVE, K., LIBBY, P., PITTET, M. J., SWIRSKI, F. K., KOTELIANSKY, V., LANGER, R., WEISSLEDER, R., ANDERSON, D. G. & NAHRENDORF, M. 2011. Therapeutic siRNA silencing in inflammatory monocytes in mice. *Nat Biotechnol*, 29, 1005-10.
- LEWIS, S. J. 2009. Prevention and Treatment of Atherosclerosis: A Practitioner's Guide for 2008. *The American Journal of Medicine*, 122, S38-S50.
- LI, H., CYBULSKY, M. I., GIMBRONE, M. A., JR. & LIBBY, P. 1993. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb*, 13, 197-204.
- LI, J. M., NEWBURGER, P. E., GOUNIS, M. J., DARGON, P., ZHANG, X. & MESSINA, L. M. 2010. Local arterial nanoparticle delivery of siRNA for NOX2 knockdown to prevent restenosis in an atherosclerotic rat model. *Gene Therapy*, 17, 1279-1287.

- LI, M., QIAN, M., KYLER, K. & XU, J. 2018a. Endothelial-Vascular Smooth Muscle Cells Interactions in Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med*, 5, 151.
- LI, W., BAO, G., CHEN, W., QIANG, X., ZHU, S., WANG, S., HE, M., MA, G., OCHANI, M., AL-ABED, Y., YANG, H., TRACEY, K. J., WANG, P., D'ANGELO, J. & WANG, H. 2018b. Connexin 43 Hemichannel as a Novel Mediator of Sterile and Infectious Inflammatory Diseases. *Scientific Reports*, 8, 166.
- LI, Y., SCHWABE, R. F., DEVRIES-SEIMON, T., YAO, P. M., GERBOD-GIANNONE, M.-C., TALL, A. R., DAVIS, R. J., FLAVELL, R., BRENNER, D. A. & TABAS, I. 2005. Free Cholesterol-loaded Macrophages Are an Abundant Source of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Interleukin-6: MODEL OF NF- $\kappa$ B- AND MAP KINASE-DEPENDENT INFLAMMATION IN ADVANCED ATHEROSCLEROSIS\*. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 21763-21772.
- LIAW, C. Y., JI, S. & GUVENDIREN, M. 2018. Engineering 3D Hydrogels for Personalized In Vitro Human Tissue Models. *Adv Healthc Mater*, 7.
- LIBBY, P. 2012. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32, 2045-51.
- LIND, J. U., BUSBEE, T. A., VALENTINE, A. D., PASQUALINI, F. S., YUAN, H., YADID, M., PARK, S. J., KOTIKIAN, A., NESMITH, A. P., CAMPBELL, P. H., VLASSAK, J. J., LEWIS, J. A. & PARKER, K. K. 2017. Instrumented cardiac microphysiological devices via multimaterial three-dimensional printing. *Nat Mater*, 16, 303-308.
- LOMAKINA, E. B. & WAUGH, R. E. 2010. Signaling and Dynamics of Activation of LFA-1 and Mac-1 by Immobilized IL-8. *Cell Mol Bioeng*, 3, 106-116.
- LORENZ, H. M., HARRER, T., LAGOO, A. S., BAUR, A., EGER, G. & KALDEN, J. R. 1993. CD45 mAb Induces Cell Adhesion in Peripheral Blood Mononuclear Cells via Lymphocyte Function-Associated Antigen-1 (LFA-1) and Intercellular Cell Adhesion Molecule 1 (ICAM-1). *Cellular Immunology*, 147, 110-128.
- MACH, F., SAUTY, A., IAROSSO, A. S., SUKHOVA, G. K., NEOTE, K., LIBBY, P. & LUSTER, A. D. 1999. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest*, 104, 1041-50.
- MACH, F., SCHÖNBECK, U., BONNEFOY, J. Y., POBER, J. S. & LIBBY, P. 1997. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation*, 96, 396-9.
- MAI, J., VIRTUE, A., SHEN, J., WANG, H. & YANG, X. F. 2013. An evolving new paradigm: endothelial cells--conditional innate immune cells. *J Hematol Oncol*, 6, 61.
- MAJESKY, M. W. 2007. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27, 1248-58.
- MARTINELLI, R., ZEIGER, A. S., WHITFIELD, M., SCIUTO, T. E., DVORAK, A., VAN VLIET, K. J., GREENWOOD, J. & CARMAN, C. V. 2014. Probing the biomechanical contribution of the endothelium to lymphocyte migration: diapedesis by the path of least resistance. *Journal of cell science*, 127, 3720-3734.
- MASCOLA, J. R. & FAUCI, A. S. 2020. Novel vaccine technologies for the 21st century. *Nat Rev Immunol*, 20, 87-88.

- MEHTA, P. P. & DHAPTE-PAWAR, V. 2021. Novel and Evolving Therapies for COVID-19 Related Pulmonary Complications. *The American Journal of the Medical Sciences*, 361, 557 - 566.
- MEIGS, J. B., HU, F. B., RIFAI, N. & MANSON, J. E. 2004. Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. *Jama*, 291, 1978-1986.
- MORONI, L., BURDICK, J. A., HIGHLEY, C., LEE, S. J., MORIMOTO, Y., TAKEUCHI, S. & YOO, J. J. 2018. Biofabrication strategies for 3D in vitro models and regenerative medicine. *Nat Rev Mater*, 3, 21-37.
- MOSES, J. W., LEON, M. B., POPMA, J. J., FITZGERALD, P. J., HOLMES, D. R., O'SHAUGHNESSY, C., CAPUTO, R. P., KEREIAKES, D. J., WILLIAMS, D. O., TEIRSTEIN, P. S., JAEGER, J. L. & KUNTZ, R. E. 2003. Sirolimus-Eluting Stents versus Standard Stents in Patients with Stenosis in a Native Coronary Artery. *New England Journal of Medicine*, 349, 1315-1323.
- MURPHY, J. E., TEDBURY, P. R., HOMER-VANNIASINKAM, S., WALKER, J. H. & PONNAMBALAM, S. 2005. Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. *Atherosclerosis*, 182, 1-15.
- NAEIM, F., NAGESH RAO, P., SONG, S. X. & PHAN, R. T. 2018. Chapter 2 - Principles of Immunophenotyping. In: NAEIM, F., NAGESH RAO, P., SONG, S. X. & PHAN, R. T. (eds.) *Atlas of Hematopathology (Second Edition)*. Academic Press.
- NEWMAN, D. K., HAMILTON, C. & NEWMAN, P. J. 2001. Inhibition of antigen-receptor signaling by Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (CD31) requires functional ITIMs, SHP-2, and p56(lck). *Blood*, 97, 2351-7.
- O'DRISCOLL, C. M., BERNKOP-SCHNÜRCH, A., FRIEDL, J. D., PRÉAT, V. & JANNIN, V. 2019. Oral delivery of non-viral nucleic acid-based therapeutics - do we have the guts for this? *Eur J Pharm Sci*, 133, 190-204.
- O'KEEFFE, L. M., SIMPKIN, A. J., TILLING, K., ANDERSON, E. L., HUGHES, A. D., LAWLOR, D. A., FRASER, A. & HOWE, L. D. 2018. Sex-specific trajectories of measures of cardiovascular health during childhood and adolescence: A prospective cohort study. *Atherosclerosis*, 278, 190-196.
- OPPI, S., LÜSCHER, T. F. & STEIN, S. 2019. Mouse Models for Atherosclerosis Research- Which Is My Line? *Front Cardiovasc Med*, 6, 46.
- PIEPOLI, M. F., HOES, A. W., AGEWALL, S., ALBUS, C., BROTONS, C., CATAPANO, A. L., COONEY, M. T., CORRÀ, U., COSYNS, B., DEATON, C., GRAHAM, I., HALL, M. S., HOBBS, F. D. R., LØCHEN, M. L., LÖLLGEN, H., MARQUES-VIDAL, P., PERK, J., PRESCOTT, E., REDON, J., RICHTER, D. J., SATTAR, N., SMULDERS, Y., TIBERI, M., VAN DER WORP, H. B., VAN DIS, I., VERSCHUREN, W. M. M. & BINNO, S. 2016. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J*, 37, 2315-2381.
- QIN, S., TANG, X., CHEN, Y., CHEN, K., FAN, N., XIAO, W., ZHENG, Q., LI, G., TENG, Y., WU, M. & SONG, X. 2022. mRNA-based therapeutics: powerful and versatile tools to combat diseases. *Signal Transduct Target Ther*, 7, 166.

- QU, Y., SHI, X., ZHANG, H., SUN, W., HAN, S., YU, C. & LI, J. 2009. VCAM-1 siRNA reduces neointimal formation after surgical mechanical injury of the rat carotid artery. *J Vasc Surg*, 50, 1452-8.
- ROACH, T., SLATER, S., KOVAL, M., WHITE, L., MCFARLAND, E. C., OKUMURA, M., THOMAS, M. & BROWN, E. 1997. CD45 regulates Src family member kinase activity associated with macrophage integrin-mediated adhesion. *Current Biology*, 7, 408-417.
- RONG, J. X., SHAPIRO, M., TROGAN, E. & FISHER, E. A. 2003. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 13531-6.
- SAHU, I., HAQUE, A., WEIDENSEE, B., WEINMANN, P. & KORMANN, M. S. D. 2019. Recent Developments in mRNA-Based Protein Supplementation Therapy to Target Lung Diseases. *Mol Ther*, 27, 803-823.
- SCOTT, L. J. 2020. Givosiran: First Approval. *Drugs*, 80, 335-339.
- SHI, X., GAO, J., LV, Q., CAI, H., WANG, F., YE, R. & LIU, X. 2020. Calcification in Atherosclerotic Plaque Vulnerability: Friend or Foe? *Front Physiol*, 11, 56.
- SILVESTRE-ROIG, C., DE WINTHER, M. P., WEBER, C., DAEMEN, M. J., LUTGENS, E. & SOEHNLEIN, O. 2014. Atherosclerotic plaque destabilization: mechanisms, models, and therapeutic strategies. *Circ Res*, 114, 214-26.
- SIROVER, M. A. 2020. Moonlighting glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: posttranslational modification, protein and nucleic acid interactions in normal cells and in human pathology. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 55, 354-371.
- SONG, Y., HAHN, T., THOMPSON, I. P., MASON, T. J., PRESTON, G. M., LI, G., PANIWNYK, L. & HUANG, W. E. 2007. Ultrasound-mediated DNA transfer for bacteria. *Nucleic Acids Res*, 35, e129.
- STEINBRECHER, U. P., PARTHASARATHY, S., LEAKE, D. S., WITZTUM, J. L. & STEINBERG, D. 1984. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81, 3883-3887.
- SURESH, V. & WEST, J. L. 2020. 3D Culture Facilitates VEGF-Stimulated Endothelial Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells. *Annals of Biomedical Engineering*, 48, 1034-1044.
- TALAVERA, D., CASTILLO, A. M., DOMINGUEZ, M. C., GUTIERREZ, A. E. & MEZA, I. 2004. IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *J Gen Virol*, 85, 1801-1813.
- TERAO, S., YILMAZ, G., STOKES, K. Y., RUSSELL, J., ISHIKAWA, M., KAWASE, T. & GRANGER, D. N. 2008. Blood cell-derived RANTES mediates cerebral microvascular dysfunction, inflammation, and tissue injury after focal ischemia-reperfusion. *Stroke*, 39, 2560-70.
- VALLAZZA, B., PETRI, S., POLEGANOV, M. A., EBERLE, F., KUHN, A. N. & SAHIN, U. 2015. Recombinant messenger RNA technology and its application in cancer

- immunotherapy, transcript replacement therapies, pluripotent stem cell induction, and beyond. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 6, 471-99.
- VAN CRAENENBROECK, A. H., SMITS, E. L., ANGUILE, S., VAN DE VELDE, A., STEIN, B., BRAECKMAN, T., VAN CAMP, K., NIJS, G., IEVEN, M., GOOSSENS, H., BERNEMAN, Z. N., VAN TENDELOO, V. F., VERPOOTEN, G. A., VAN DAMME, P. & COOLS, N. 2015. Induction of cytomegalovirus-specific T cell responses in healthy volunteers and allogeneic stem cell recipients using vaccination with messenger RNA-transfected dendritic cells. *Transplantation*, 99, 120-7.
- VAN DER KOOIJ, M. A., VON DER MARK, E. M., KRUIJT, J. K., VAN VELZEN, A., VAN BERKEL, T. J. & MORAND, O. H. 1997. Human monocyte-derived macrophages express an approximately 120-kD Ox-LDL binding protein with strong identity to CD68. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17, 3107-16.
- VENUGOPAL MENON, N., TAY, H. M., PANG, K. T., DALAN, R., WONG, S. C., WANG, X., LI, K. H. H. & HOU, H. W. 2018. A tunable microfluidic 3D stenosis model to study leukocyte-endothelial interactions in atherosclerosis. *APL Bioeng*, 2, 016103.
- WACHENDÖRFER, M., SCHRÄDER, P., BUHL, E. M., PALKOWITZ, A. L., BEN MESSAOUD, G., RICHTERING, W. & FISCHER, H. 2022. A defined heat pretreatment of gelatin enables control of hydrolytic stability, stiffness, and microstructural architecture of fibrin-gelatin hydrogel blends. *Biomater Sci*.
- WAL, A. C. V. D., BECKER, A. E., LOOS, C. M. V. D. & DAS, P. K. 1994. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*, 89, 36-44.
- WALKER, T., WENDEL, H. P., TETZLOFF, L., RAABE, C., HEIDENREICH, O., SIMON, P., SCHEULE, A. M. & ZIEMER, G. 2007. Inhibition of adhesion molecule expression on human venous endothelial cells by non-viral siRNA transfection. *Journal of cellular and molecular medicine*, 11, 139-147.
- WANG, G., JACQUET, L., KARAMARITI, E. & XU, Q. 2015. Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells. *J Physiol*, 593, 3013-30.
- WASTESON, P., JOHANSSON, B. R., JUKKOLA, T., BREUER, S., AKYÜREK, L. M., PARTANEN, J. & LINDAHL, P. 2008. Developmental origin of smooth muscle cells in the descending aorta in mice. *Development*, 135, 1823-32.
- WENG, Y., XIAO, H., ZHANG, J., LIANG, X. J. & HUANG, Y. 2019. RNAi therapeutic and its innovative biotechnological evolution. *Biotechnol Adv*, 37, 801-825.
- WHO. 2021. *Cardiovascular Diseases* [Online]. Available: [https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1) [Accessed 06.03.2021].
- WILLIAMS, R. S., JOHNSTON, S. A., RIEDY, M., DEVIT, M. J., MCELLIGOTT, S. G. & SANFORD, J. C. 1991. Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 2726-2730.
- WINDSOR, H. M., WINDSOR, G. D. & NOORDERGRAAF, J. H. 2010. The growth and long term survival of *Acholeplasma laidlawii* in media products used in biopharmaceutical manufacturing. *Biologicals*, 38, 204-210.

- WONG, C. W., BURGER, F., PELLI, G., MACH, F. & KWAK, B. R. 2003. Dual benefit of reduced Cx43 on atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Cell Commun Adhes*, 10, 395-400.
- WONGSURAWAT, T., WOO, C. C., GIANNAKAKIS, A., LIN, X. Y., CHEOW, E. S. H., LEE, C. N., RICHARDS, M., SZE, S. K., NOOKAEW, I., KUZNETSOV, V. A. & SOROKIN, V. 2018. Distinctive molecular signature and activated signaling pathways in aortic smooth muscle cells of patients with myocardial infarction. *Atherosclerosis*, 271, 237-244.
- WOODFIN, A., VOISIN, M. B. & NOURSHARGH, S. 2007. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27, 2514-23.
- YAO, B.-C., MENG, L.-B., HAO, M.-L., ZHANG, Y.-M., GONG, T. & GUO, Z.-G. 2019. Chronic stress: a critical risk factor for atherosclerosis. *The Journal of international medical research*, 47, 1429-1440.
- YU, H., HUANG, X., MA, Y., GAO, M., WANG, O., GAO, T., SHEN, Y. & LIU, X. 2013. Interleukin-8 regulates endothelial permeability by down-regulation of tight junction but not dependent on integrins induced focal adhesions. *Int J Biol Sci*, 9, 966-79.
- ZENGERLE, D. S. 2019. *Verringerung pathogenetischer Prozesse in der Gefäßwand durch eine siRNA freisetzende Polymerbeschichtung*. Eberhard Karls Universität Tübingen.

## **Erklärung zum Eigenanteil**

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

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Andrea Nolte-Karayel, Leiterin der Arbeitsgruppe Bioaktive Implantate. Sie hat die Arbeit betreut und das Manuskript korrigiert.

Sämtliche Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Dr. Andrea Nolte-Karayel und Labormitglieder wie z. B. Andreas Behring, Bernd Neumann, Dr. Olivia König, Kerstin Späth, Dr. Diane Zengerle, Dr. Heidi Stoll und Dr. Sandra Krajewski) von mir eigenständig durchgeführt.

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

Ich versichere das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren, als die von mir angegebenen, Quellen verwendet zu haben. Ich erkläre, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Datensätze, Abbildungen, Fotos sowie graphische Darstellungen meiner Eigenleistung entstammen oder unter Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht wurden.

Aichwald, den 16.02.2022

## **Danksagung**

Ein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Wendel sowie Prof. Dr Meltem Avci-Adali für die Überlassung des interessanten Themas und für die Möglichkeit meine Dissertation im klinischen Forschungslabor der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie schreiben zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Andrea Nolte-Karayel, meiner Betreuerin und Doktormutter, die jederzeit für mich da war und mich vom ersten bis zum letzten Schritt der Erstellung dieser Arbeit begleitet und unterstützt hat. Ich danke Ihr für ihre menschliche und fachliche Kompetenz und die Möglichkeit von ihrer Erfahrung zu profitieren. Die Arbeit im Labor hat mir Spaß gemacht und eine intensive Abwechslung von meinem Studienalltag in der Zahnmedizin geboten. Ich hätte die Aktualität zur heutigen Pandemie und der Verwendung von mRNA-Impfstoffen nicht vorhersehen können und bin einmal mehr über die Erweiterung meines Studienhorizontes dankbar. Vielen herzlichen Dank für die durchgehende Betreuung, auch in dieser Ausnahmesituation.

Ich danke für viele fruchtbare Gespräche, Anregungen und Hilfestellungen vor allem auch dem THG-Forschungslabor, darunter Olivia König, Kerstin Späth, Diane Zengerle, Heidi Stoll, Ludmilla Hann, Sandra Stopinski, Andreas Behring, Stefanie Krajewski, Ani Brüggling und dem gesamten Team, die für eine herzliche Atmosphäre gesorgt haben.

Nicht zuletzt möchte ich ganz besonders meiner Familie, meinem Mann, unserer Tochter sowie meinen Eltern und meiner Schwester und Ihrem Mann danken, die mich immer motiviert und in jeder Lebenslage unterstützt haben. Ohne Euch und Euer Verständnis, Eure Ermutigungen und Eure Geduld wäre es nicht möglich gewesen! Dabei möchte ich meine Schwiegereltern, für unzählige Babysitter-Stunden und die dadurch gewonnene Freiheit zum Schreiben, nicht vergessen.