

Modifikation von Zellen und blutkontaktierenden Oberflächen zur Verbesserung der Geweberegeneration

DISSERTATION

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Denis Franz Canjuga
aus Lahr/Schwarzwald

Tübingen

2024

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

08.11.2024

Dekan:

Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter/-in:

Prof. Dr. Meltem Avci-Adali

2. Berichterstatter/-in:

Prof. Dr. Boris Macek

Danksagung

Ich möchte mich zunächst herzlichst bei Frau Prof. Dr. Meltem Avci-Adali und Prof. Dr. Wendel dafür bedanken, dass sie meine Promotion am klinischen Forschungslabor der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Tübingen möglich machten und mir stets ihr Vertrauen entgegenbrachten. Die Fähigkeit mich stets zu motivieren und zu unterstützen war eine enorme Hilfe während meiner Arbeit. Die unzähligen gemeinsamen Gespräche und der Zusammenhalt vor allem in schwierigen Zeiten prägten mich und mein Vertrauen in Prof. Avci-Adali. Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Macek für die Begutachtung meiner Dissertation.

Danken möchte ich auch meinen Kollegen des klinischen Forschungslabors für die freundliche und konstruktive Zusammenarbeit und insbesondere Bernd Neumann für die sehr gute und motivierende Zusammenarbeit während der gesamten Zeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, welche mich mit Ihrem Vertrauen und ihrer Liebe von der Hauptschule bis zum Studium und der anschließenden Promotion bedingungslos begleitet haben. Ich danke ebenfalls den wenigen Freunden, die mich auch in schwierigen Zeiten zu jeder Zeit unterstützt und an mich geglaubt haben. Mein abschließender tiefster Dank gilt meinen Eltern, die mich mit Ihrer bedingungslosen Liebe bis heute unterstützt und immer an mich geglaubt haben auch wenn andere es nicht mehr taten. Ich bin durch euch das, was ich heute bin.

„Das schönste Glück des denkenden Menschen ist, das Erforschliche erforscht zu haben und das Unerforschliche zu verehren.“

Johann Wolfgang von Goethe (1749 - 1832)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Zusammenfassung	III
Abstract	V
1 Einleitung	1
1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen	1
1.2 Zelltherapie	2
1.3 Endotheliale Progenitorzellen	2
1.4 Gentherapie als therapeutischer Ansatz in der regenerativen Medizin	4
1.4.1 Synthetische mRNA als Therapeutikum.....	6
1.4.2 Immunogenität synthetischer mRNA.....	9
1.5 Endothelzellen	11
1.6 Oberflächenmodifikation von Zellen und Biomaterialien	12
1.6.1 Kovalente Konjugation	13
1.6.2 Hydrophobe Insertion.....	14
1.6.3 Klick-Chemie als Werkzeug zur Oberflächenmodifikation von Zellen und Biomaterialien.....	14
1.7 Hämokompatibilität von ECMO-Membranen.....	16
1.8 Hämokompatibilität.....	19
2 Zielsetzung.....	21
3 Ergebnisse	23
3.1 Publikation I: Homing of mRNA-modified endothelial progenitor cells to inflamed endothelium	23
3.2 Publikation II: Improving hemocompatibility of artificial lungs by click conjugation of glycoengineered endothelial cells onto blood-contacting surfaces. ...	25
4 Diskussion.....	28
4.1 Homing von mRNA-modifizierten endothelialen Progenitorzellen zum entzündeten Endothel.....	28

4.2	Verbesserung der Hämokompatibilität künstlicher Lungen durch Klick-Konjugation von metabolisch modifizierten Endothelzellen an blutkontaktierende Oberflächen.....	33
5	Ausblick.....	40
6	Literaturverzeichnis	41
7	Anhang.....	59
7.1	Eigenanteil der wissenschaftlichen Veröffentlichungen.....	59
7.1.1	Publikation I	59
7.1.2	Publikation II:	60
7.2	Liste aller wissenschaftlichen Veröffentlichungen im Rahmen der Dissertation.....	61
7.3	Wissenschaftliche Veröffentlichungen im Original	63
7.3.1	Publikation I:	63
7.3.2	Publikation II:	79

Abkürzungsverzeichnis

AAVs	Adeno-assoziierte Viren
Ac4ManAz	N-Azidoacetylmannosamine-tetraacylated
AFM	Atomic Force Mikroskopie
AMI	Akuter Myokardinfarkt
BM-MNCs	Bone Marrow derived Mononuclear Cells
BM-PC	Bone Marrow-derived Progenitor Cells
CAMs	Zelluläre Adhäsionsmoleküle
CCL2	CC-Chemokin-Ligand-2
CD	Cluster of Differentiation
CF	Zystische Fibrose
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
COVID-19	Coronavirus SARS-CoV-2
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
Cu	Kupfer
CuAAC	Kupferfreie Azid-Alkin Zykoaddition
CVD	Kardiovaskuläre Erkrankung
CXCR4	C-X-C-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DAMPs	Damage-associated molecular Patterns
DBCO	Dibenzocyclooctyne
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECMO	Extrakorporale Membranoxygenierung
ECs	Endothelzellen
EPCs	Endotheliale Progenitorzellen
E-Selektin	Endotheliales Selektin
FX	Faktor X
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
HFMs	Hohlfasermembranen
HGF	Hepatozytenwachstumsfaktor
HIT	Heparin-induzierte Thrombozytopenie
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IFN	Interferon
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
iPSCs	Induzierte pluripotente Stammzellen
ISG	Interferon-stimulierendes Gen
IVT	In vitro Transkription
m¹ψ	N1-Methylpseudouridin
m⁵C	5-Methylcytosin
m⁶A	N6-Methyladenosin
m⁷G	7-Methylguanosin
ManNAz	N-azidoacetylmannosamine tetraacylated
MDA5	Melanomdifferenzierungs-assoziiertes Protein 5
MLC	Myosin-light chain
mRNA	Boten RNA

N₃	Azidgruppe
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NHS-Ester	N-Hydroxysuccinimid Ester
OAS	Oligoadenylat-Synthase
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
pDNA	Plasmid DNA
PEG	Polyethylenglykol
PEG	Polyethylenglykol
PKR	Proteinkinase R
PMEA	Poly(2-methoxyethylacrylat)
PMN Elastase	Polymorphonuklear Elastase
PMP	Polymethylpenten
PP	Polypropylen
PRR	Pattern Recognition Receptors
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
PVA	Polyvenylalkohol
RIG-I	Retinsäure-induzierbares Gen I
RLR	Retinsäure-induzierbares Gen I (RIG-I)-ähnlicher Rezeptor
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2
sC5b9	Faktor des Komplementsystems
SDF-1α	Stromal cell-derived factor 1 alpha
SPAAC	Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition
STAT	Signal transducer and activator of transcription proteins
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
TALENs	Transkriptionsaktivator-ähnliche (TAL) Effektornukleasen
TAT	Thrombin-Antithrombin Komplex
TLRs	Toll-like Rezeptoren
TNFα	Tumornekrose Faktor alpha
tPA	Tissue Plasminogen Activator
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ψ	Pseudo

Zusammenfassung

In der regenerativen Medizin stellt der Einsatz von Stammzellen und Zellen, wie den Endothelzellen (ECs) und deren Vorläufern, einen vielversprechenden Ansatz in der Gewebereparatur und Regeneration durch das Fördern der Angiogenese dar. Verschiedene Ansätze werden von Forschenden untersucht, um die Vaskularisierung von Geweben oder Organen zu verbessern. Beispiele hierfür sind, unter anderem die Schaffung künstlicher Blutgefäße oder die Optimierung der Mikrozirkulation bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit, aber auch bei Gefäßverschlüssen, welche zum Myokardinfarkt führen können. Des Weiteren können ECs in Biomaterialien integriert oder auf Biomaterialien angebracht werden, um die Hämokompatibilität von Implantaten zu verbessern.

Endotheliale Progenitorzellen (EPCs) nehmen eine wichtige Stellung in der Neovaskularisierung von Geweben ein, die durch ischämische Erkrankungen wie dem Myokardinfarkt oder dem ischämischen Insult verursacht werden. Ihre sehr geringe Anzahl und Homing-Rate schränken ihren klinischen Einsatz in der Behandlung von ischämischen Erkrankungen ein. Um das therapeutische Potenzial von EPCs zu verbessern, wurden im Rahmen dieser Arbeit murine EPCs mit synthetischen mRNAs, die für den C-X-C-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) und dem P-Selektin Glykoprotein-Ligand 1 (PSGL-1) kodieren transfiziert, um die Homing- und Migrationseffizienz von EPCs zum entzündeten Endothel zu verbessern. Durchflusszytometrische Messungen konnten zeigen, dass die Transfektion von EPCs mit CXCR4 und PSGL-1-mRNA im Vergleich zu unmodifizierten EPCs zu einer erhöhten Expression dieser Marker auf der Zelloberfläche führte und dabei keinen negativen Einfluss auf die Zellviabilität hatte. CXCR4-mRNA-modifizierte EPCs zeigten in einem chemotaktischen Migrationstest ein signifikant höheres Migrationspotenzial als unmodifizierte EPCs. Die Bindungsstärke der EPCs an das entzündete Endothel wurde mit Hilfe der Einzelzell-Atomkraftmikroskopie (AFM) bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die mRNA-modifizierten EPCs eine dreifach höhere Ablösekraft benötigten, um sich vom TNF α -aktivierten Endothel abzulösen als unmodifizierte EPCs. Des Weiteren konnte in einem dynamischen Flussmodell eine signifikant höhere Bindung der mRNA-modifizierten EPCs an das entzündete Endothel festgestellt werden.

Neben der Therapie von ischämischen Erkrankungen mit endothelialen Progenitorzellen, können auch (aus)differenzierte ECs eingesetzt werden, um die Eigenschaft von

Biomaterialien zu verbessern. Insbesondere bei künstlichen Lungen, die bei der extrakorporalen Membranoxygenierung (ECMO) verwendet werden, können ECs eingesetzt werden, um die bislang schlechte Hämokompatibilität zu verbessern und eine längere Anwendungsdauer zu ermöglichen. Aus diesem Grund wurde im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit eine neuartige Strategie zur effizienteren Endothelialisierung blutkontaktierender Materialien entwickelt, um die Hämokompatibilität zu verbessern. Hierfür wurden Hohlfasermembranen (HFMs) mit Dibenzylcyclooctin (DBCO) funktionalisiert, und ECs durch metabolische Modifikation mittels kupferfreier Klick-Chemie kovalent an die Membran konjugiert. Die metabolische Modifizierung der Zellen mit Azidoacetylmannosamin-tetraacyliert (Ac₄ManNAz) führte zu einer hocheffizienten Funktionalisierung von ECs mit Azid (N₃)-Molekülen auf der Zelloberfläche ohne negative Auswirkungen auf die Viabilität. Nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit den DBCO-funktionalisierten Membranen, konnte im Vergleich zu unmodifizierten HFMs eine deutlich verbesserte Endothelialisierung gezeigt werden. Die Zellen reagierten nach Stimulation mit TNF α und exprimierten adhäsionsfördernde Moleküle (E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1). Des Weiteren wurde durch dynamische Inkubation mit frischem humanem Blut die Hämokompatibilität untersucht. DBCO-beschichtete und unbeschichtete HFMs zeigten eine vergleichbare Hämokompatibilität bei der vermehrte Zellablagerung nachgewiesen werden konnten. Die Endothelialisierung der HFM reduzierte deutlich die Thrombozytenaktivierung und die Gerinnung. Interessanterweise führte die Inkubation endothelialisierter HFM mit humanem Blut zu einer weiteren Reduktion der E-Selektin- und VCAM-1-Expression auf den ECs. Die so etablierte, hocheffiziente und zellkompatible Methode, die auf der kupferfreien Klick-Chemie beruht, kann zur Endothelialisierung von künstlichen Lungen, aber auch anderer Biomaterialien eingesetzt werden, um die Biokompatibilität zu verbessern.

Abstract

In regenerative medicine, the use of stem cells and cells such as endothelial cells and their precursors represents a promising approach in tissue repair and regeneration by promoting angiogenesis. Various approaches are being investigated by researchers to improve the vascularization of tissues or organs, such as the creation of artificial blood vessels or the optimization of microcirculation in peripheral arterial occlusive disease, but also in vascular occlusions that can lead to myocardial infarction. Furthermore, endothelial cells can be integrated into biomaterials or attached to biomaterials in order to improve the hemocompatibility of implants. Endothelial progenitor cells (EPCs) play an important role in the neo-vascularization of tissues caused by ischemic diseases such as myocardial infarction or ischemic insult. Their very low number and homing rate limits their clinical use in the treatment of ischemic diseases. To improve the therapeutic potential of EPCs, murine EPCs were transfected with synthetic mRNAs encoding the C-X-C motif chemokine receptor 4 (CXCR4) and the P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) to improve the homing and migration efficiency of EPCs to the inflamed endothelium. Flow cytometric measurements showed that transfection of EPCs with CXCR4 and PSGL-1 mRNA resulted in increased expression on the cell surface compared to unmodified EPCs and had no effect on cell viability. CXCR4 mRNA modified EPCs showed a significantly higher migration potential than unmodified EPCs in a chemotactic migration assay. The binding strength of the EPCs to the inflamed endothelium was determined using single-cell atomic force microscopy (AFM). This showed that the mRNA-modified EPCs required a threefold higher detachment force to detach from the TNF α -activated endothelium than unmodified EPCs. Furthermore, a significantly higher binding of the mRNA modified EPCs to the inflamed endothelium was observed in a dynamic flow model. In addition to the therapy of ischemic diseases with endothelial progenitor cells, endothelial cells can also be used to improve the properties of biomaterials. Especially in artificial lungs used in extracorporeal membrane oxygenation (ECMO), endothelial cells can be used to improve the previously poor hemocompatibility and enable a longer duration of use. For this reason, a novel strategy for more efficient endothelialization of blood-contacting materials was developed in the second part of the present work to improve hemocompatibility. For this purpose, hollow fiber membranes (HFMs) were functionalized with dibenzylcyclooctyne (DBCO), and endothelial cells were covalently conjugated to the membrane by metabolic modification using copper-free click chemistry. Metabolic modification of

the cells with azidoacetylmannosamine-tetraacylated (Ac4ManNAz) led to a highly efficient functionalization of endothelial cells with azide (N₃) molecules on the cell surface without negative effects on viability. After incubation of the cells with the DBCO-functionalized membranes for 48 hours, a significantly improved endothelialization was shown compared to unmodified HFMs. The cells reacted after stimulation with TNF α and expressed adhesion-promoting molecules (E-selectin, VCAM-1 and ICAM-1). Furthermore, the hemocompatibility was investigated by dynamic incubation with fresh human blood. DBCO-coated and uncoated HFMs showed comparable hemocompatibility with increased cell deposition. The endothelialization of the HFMs significantly reduced platelet activation and coagulation. Interestingly, the incubation of endothelialized HFM with human blood led to a further reduction of E-selectin and VCAM-1 expression on the endothelial cells. The established, highly efficient and cell-compatible method, which is based on copper-free click chemistry, can be used to endothelialize artificial lungs, but also other biomaterials, in order to improve biocompatibility.

1 Einleitung

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen wie etwa akute Myokardinfarkte (AMI), zerebrale und periphere arterielle Verschlusskrankungen, sowie die arterielle Hypertonie und deren Komplikationen, sind weltweit eine der häufigsten Todesursachen [1]. Während eines akuten AMIs setzen Gewebeschäden und Nekrose eine Reihe von pathologischen Reaktionen in Gang, darunter Entzündung, Hypoxie, oxidativer Stress und die Aktivierung des neurohormonellen Systems [2, 3], welche sich negativ auf die ECs auswirken und diese weiterhin aktivieren. Da das kardiale System über eine nur sehr geringe Regenerationskapazität verfügt, führt eine anhaltende Minderdurchblutung des Gewebes zum irreversiblen Verlust von Kardiomyozyten und dem Untergang der Gefäße, welche essenziell für die Aufrechterhaltung der Gewebe- und Organfunktion sind [4]. Der Niedergang von Herzmuskelzellen führt zum sogenannten Remodelling des Gewebes, wobei das zuvor gesunde Gewebe durch Fibroblasten ersetzt wird und die Vernarbung des Gewebes zur Folge hat, was letztendlich zur kardialen Hypertrophie führt [5]. Hierdurch wird das gesamte kardiale System erheblich belastet, was sich in der Ausbildung einer Herzinsuffizienz und Nierenschwäche, in Ödemen, sowie Apnoe widerspiegelt [6].

Oberstes Ziel bei ischämischen Erkrankungen ist die Revaskularisierung des Gewebes. Derzeit gibt es keine ausreichend wirksamen medikamentösen oder chirurgischen Verfahren zur Vorbeugung von ischämischen Erkrankungen oder der vollständigen Regeneration des geschädigten Herzmuskelgewebes [7]. Die Behandlung von Hypertonien oder Dyslipidämien erfolgt üblicherweise durch medikamentöse Therapien [8]. Die Therapie des Myokardinfarktes beschränkt sich bislang auf Standardverfahren wie der perkutanen Koronarangiographie oder dem arteriellen koronaren Bypass, um die Blutversorgung zum ischämischen Gewebe wieder herzustellen [9, 10]. Einer der wichtigsten Gründe für inoperable Herzerkrankungen sind hierbei die Mikroangiopathien, bei welchen Störungen der Mikrozirkulation zu weiteren Ischämien führen. Die derzeitigen Therapien sind unzureichend und die Entwicklung neuer, sicherer und wirksamer Behandlungen ist daher zwingend erforderlich. Die Stammzell- und Gentherapie oder deren Kombination stellen hierbei die vielversprechendsten Therapiemöglichkeiten dar. Stammzellen vermögen das körpereigene Potential zur Regeneration zu stimulieren und bieten letztendlich eine Grundlage zur vollständigen Geweberegeneration.

1.2 Zelltherapie

Die Wiederherstellung und Reparatur von Organen oder Geweben nach Traumata, Krankheit oder angeborenen Erkrankungen ist ein wichtiges Ziel, auf das sich die regenerative Medizin fokussiert. Die Zelltherapie ist ein vielversprechendes therapeutisches Mittel in der Bekämpfung von entzündlichen Prozessen und unterschiedlichsten Erkrankungen, bei denen Zellen, konditionierte Medien oder auch mit Zellen besiedelte Patches eingesetzt werden können. In einer Reihe von präklinischen Studien, konnte gezeigt werden, dass die Stammzelltherapie die Entstehung oder Progression von pathologischen Prozessen in den unterschiedlichsten Organen wie der Lunge [11-15] oder dem Herzen [16-18] durch immunmodulatorische, wie auch parakrine Prozesse, verhindern kann. Auch wird der Einsatz der Zelltherapie mit Immunzellen in der Transplantationsmedizin untersucht, bei der in der Funktion beeinträchtigte Organe repariert, die Auswirkungen von Reperfusionsschäden nach Ischämie verringert und die Immuntoleranz nach Transplantationen verbessert werden sollen [19-21].

Die Forschung konzentriert sich unter anderem auf die Techniken der regenerativen Medizin, welche die Verwendung von Stammzellen einschließt, um funktionale Organe und Gewebe wiederherzustellen und zu regenerieren. Hierbei finden auch Biomaterialien und das Tissue Engineering zunehmend an Bedeutung. Diese, das Herz regenerierende Technologie, die darauf abzielt, die Struktur und Funktion des Herzens wiederherzustellen, wurde von der Organ- und Zelltransplantation abgeleitet [22]. Verschiedene Arten von Stammzellen wie bone marrow-derived mononuclear cell (BM-MNCs), embryonale Stammzellen, induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs) oder EPCs wurden als geeignete Zell-Ressource entdeckt. Darüber hinaus wurden einige Biomaterialien und sogenannte Scaffolds entwickelt, um die Überlebensrate und Retention dieser transplantierten Zellen zu erhöhen. EPCs sind aufgrund ihres Differenzierungspotentials zu ECs von besonderem Interesse bei der Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen.

1.3 Endotheliale Progenitorzellen

Endotheliale Progenitorzellen (EPCs) sind vordifferenzierte adulte Stammzellen, welche die Eigenschaft besitzen in ECs differenzieren zu können [23]. Nach vaskulären Verletzungen oder Ischämien, werden EPCs aus dem Knochenmark mobilisiert und in

Einleitung

den Blutkreislauf abgegeben, wo sie die Reparatur des Gewebes durch sezernierte parakrine Faktoren induzieren [24-27] (Abbildung 1). Die Rekrutierung der Zellen zum Ort der ischämischen Läsion wird hierbei unter anderem durch die Ausschüttung EPC-mobilisierender Zytokine, wie dem stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) oder CXC-chemokine ligand 12 (CXCL12) [28-30], dem granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF) [31] und dem vascular endothelial growth factor (VEGF) [32] herbeigeführt, welche die Revaskularisierung und Regeneration der ECs induzieren soll [33].

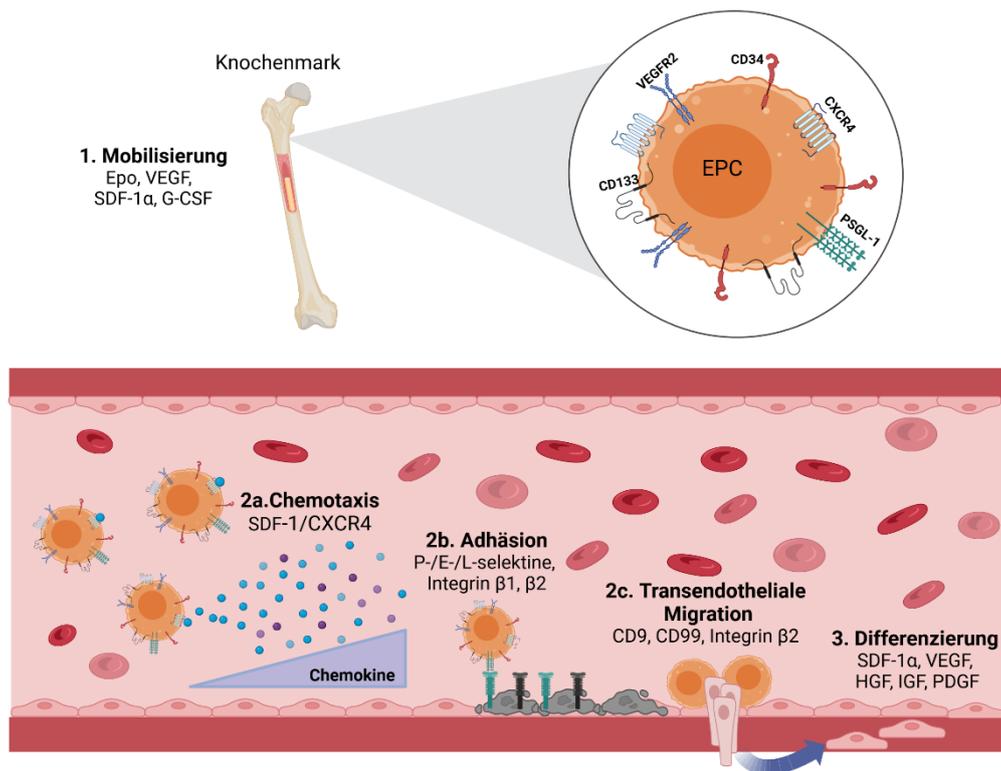


Abbildung 1: Mehrstufiger Prozess der Ansiedlung und Anheftung von EPCs. Die Rekrutierung und der Einbau von Progenitorzellen in ischämisches oder verletztes Gewebe erfordert einen koordinierten mehrstufigen Prozess, der die Adhäsion an das Endothel, die transendotheliale Migration, Chemotaxis, Invasion und Differenzierung in situ beinhaltet. Abkürzungen: SDF-1 α : Stromal cell-derived factor 1 α , VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor, HGF: Hepatocyte Growth Factor, IGF: Insulin-like growth factor. Erstellt mit BioRender.com.

Die therapeutische Wirkung von EPCs bei der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen wurde in den letzten Jahren in zahlreichen Studien untersucht [34-36]. Das Homing der endothelialen Progenitorzellen hin zu den Läsionen und der Neovaskularisierung beinhaltet einen mehrteiligen und dynamischen Prozess der Mobilisation,

Einleitung

Chemotaxis, Adhäsion, Transmigration und Differenzierung in das Subendothel [37], bei dem multiple Zytokine, Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle beteiligt sind [38, 39]. Die Freisetzung von Chemokinen aus dem ischämischen Gewebe und deren Interaktion mit Oberflächenmolekülen auf den EPCs, sowie die Anbindung an deren Liganden auf dem aktivierten Endothel ist ein wichtiger Prozess beim Homing von EPCs. Insbesondere SDF-1 α ist hierbei ein wichtiger Akteur bei der Rekrutierung von EPCs in Richtung des ischämischen Gewebes [40]. Dies wurde bereits in einer Studie gezeigt, bei der EPCs erfolgreich zu den, mit SDF-1-mRNA modifizierten EPCs migrierten [41]. Der Mechanismus, mit der SDF-1 α seine chemotaktische Wirkung ausübt, beruht auf der Bindung zu seinem Rezeptor, dem C-X-C-motiv-chemokine receptor 4 (CXCR4), der von EPCs exprimiert wird [42, 43]. Sowohl SDF-1 α , als auch CXCR4 werden durch Hypoxie hochreguliert und regulieren somit verschiedene Schritte der Rekrutierung von Progenitorzellen, einschließlich der Chemotaxis, der transendothelialen Migration und Adhäsion an ECs und Integrine [44]. Die SDF-1/CXCR4-vermittelte Rekrutierung von Progenitorzellen aus dem Knochenmark (BM PC) hin zum ischämischen Herzgewebe konnte in einer Studie gezeigt werden, bei der EPCs in präklinischen Modellen zum Gefäßwachstum und einer verbesserten Herzmuskelfunktion beitrugen [28]. Zusätzlich zur Chemotaxis weisen Zelladhäsionsmoleküle wie P-Selektin und E-Selektin, die auf aktiviertem Endothel exprimiert werden eine wichtige Funktion bei der Adhäsion und Migration von EPCs auf [45, 46]. Das P-Selektin wird hierbei sowohl auf Thrombozyten als auch auf ECs nach deren Aktivierung exprimiert. Die Expression von E-Selektin ist ausschließlich auf ECs limitiert. Ein wesentlich limitierender Faktor der den Erfolg in der klinischen Anwendung, wie auch das Einleiten der Angiogenese von EPCs reduziert, ist die zu geringe Retentionsrate und das geringe Überleben der eingewanderten EPCs in das ischämische Gewebe [47-49]. Um eine effiziente Behandlung und Ansiedlung von EPCs zu erzielen sind zwingend neue Strategien erforderlich. Dies kann etwa die Vorbehandlung des Zielgewebes mit stimulierenden Faktoren oder die Modifikation der EPCs selbst sein.

1.4 Gentherapie als therapeutischer Ansatz in der regenerativen Medizin

In den vergangenen Jahren wechselte das Interesse bei der Entwicklung von Arzneimitteln vom Testen kleiner chemischer Verbindungen zunehmend hin zu

Einleitung

unterschiedlichen Biopharmazeutika, wie Proteinen, Peptiden und Nukleinsäuren [50-53]. Hierbei lag das Augenmerk auf der Entwicklung einer neuen Generation von Biopharmazeutika, unter denen sich Nukleinsäure-basierte Arzneimittel aufgrund ihres therapeutischen Potenzials auf dem Gebiet der Gentherapie und regenerativen Medizin als besonders geeignete Kandidaten zeigten. Nukleinsäure-basierte Therapien zielen hierbei auf die Behandlung oder der präventiven Therapie verschiedenster Erkrankungen, wie Krebs, neurodegenerativen, kardiovaskulären und viralen Erkrankungen durch das Ersetzen, der Korrektur oder der Inhibierung spezifischer Zielgene ab [54-58]. Das Konzept der Gentherapie liegt daher im Ersetzen von fehlerhaften Genen oder dem Hinzufügen neuer Gene durch das sichere Einbringen von genetischem Material in die Zielzelle [51-53]. Nach dem Einbringen des genetischen Materials, können somit fehlende oder defekte Proteine in der Zielzelle hergestellt werden. Der Gentherapie gegenüber stehen Proteinsubstitutionstherapien durch direkte Applikation rekombinanter Proteine. Diese sind allerdings aufgrund der Menge, die benötigt wird, um die Funktion aufrechtzuerhalten, unwirtschaftlich. Des Weiteren besitzen sie eine sehr geringe Halbwertszeit [59]. Um eine anhaltende Proteinexpression zu initiieren, wurde die Technik der rekombinanten Plasmid-DNA (pDNA) entwickelt, die bei Vakzinierungen oder der Zelltherapie eingesetzt werden kann.

Die Plasmid-DNA muss hierbei in den Nukleus gelangen, dort wird die mRNA transkribiert, die dann wiederum, für die Translation des gewünschten Proteins ins Zytoplasma exportiert wird. Hindernisse waren bei diesem Ansatz allerdings die geringe zelluläre Aufnahme der Plasmid-DNA, sowie die ineffiziente Translokation dieser in den Zellkern. Zahlreiche neuere Ansätze, wie die viralen und nicht-viralen Vektorsysteme zielten deshalb darauf hin, diese Hindernisse zu umgehen [60-67]. Retrovirale oder lentivirale Vektoren eignen sich gut für den Gentransfer, da diese in das Genom integrieren und zu einer stabilen Proteinexpression führen. Diese Genomintegration birgt allerdings auch erhebliche Risiken nicht zielgerichteter Mutationen, welche zu unkontrollierter Expression und vermehrter Immunreaktion führen kann [68]. Adeno-assoziierte Viren (AAVs) sind häufig eingesetzte virale Vektoren, um DNA, welche für ein therapeutisches Protein kodiert, mit einem geringen Risiko der genomischen Integration in die Zelle einzubringen. Hierdurch kann die physiologische Proteinfunktion wiederhergestellt werden [69]. Trotz dieser Vorteile können auch AAVs zur Aktivierung des Immunsystems und folglich zu schweren Immunreaktionen führen [70].

1.4.1 Synthetische mRNA als Therapeutikum

Die mRNA ist ein einzelsträngiges Molekül, welches die genetische Information trägt, wodurch nach dem Ablesen durch Ribosomen Proteine hergestellt werden. Obwohl die mRNA bereits Anfang der 1960er Jahren entdeckt wurde [71], dauerte es bis in die 1990er Jahre bis Methoden zur DNA- und RNA-Produktion etabliert werden konnten, um präklinische Studien in der Immuntherapie und der mRNA-basierten Vakzinierung initiieren zu können [72, 73]. In den vergangenen Jahren hat der Einsatz synthetischer mRNA aufgrund mehrerer Vorteile das Interesse der wissenschaftlichen Gemeinschaft geweckt [74]. Essenziell für die Verwendung in präklinischen Studien für Immuntherapie und mRNA-basierter Vakzinierung war die Entwicklung geeigneter Applikationsmethoden und Formulierungen die v.a. im Fall der mRNA basierten Therapeutika eine ausreichende Stabilität *in vivo* gewährleisten sollten. Da mRNAs nicht in das Genom integrieren, werden damit verbundene Risiken der Insertionsmutagenese vermieden [51]. Des Weiteren sind synthetische mRNAs nur transient in der Zelle vorhanden und werden durch physiologische, körpereigene Prozesse rückstandsfrei wieder abgebaut [72, 75] und so Komplikationen durch eine dauerhafte Proteinüberexpression verhindert [76]. Ein weiterer Vorteil der synthetischen mRNA ist, dass diese im Vergleich zur Plasmid-DNA nicht im Kern prozessiert werden muss [77]. Nach der Freisetzung in das Zytoplasma, wird sie durch die Ribosomen direkt in das gewünschte Protein translatiert. Das erste liposomale Einbringen von mRNA in die Zelle gelang Malone und Kollegen [78]. Sowohl DNA- als auch mRNA-basierte Therapeutika ermöglichen es Zellen fehlende oder defekte Proteine bei Erkrankungen herzustellen [79]. Nukleinsäure-basierte Therapien sind somit vorteilhafter als der Einsatz rekombinanter Proteine, bei dem ein fehlendes Protein dauerhaft substituiert werden muss. Ein weiterer entscheidender Vorteil Nukleinsäure-basierter Therapeutika ist, die Möglichkeit der wirtschaftlichen und schnellen Herstellung ohne Limitierung der Größe. Auch können bestimmte Proteine wie membrangebundene Glykoproteine nicht effizient *in vitro* exprimiert werden. Post-translationale Modifikationen der Proteine [73, 79], die in der Zelle vorgenommen werden und für die Proteinfunktion essenziell sind fehlen häufig bei *in vitro* hergestellten rekombinanten Proteinen oder müssen in aufwendigen Verfahren hinzugefügt werden.

Zahlreiche Faktoren erschweren die Anwendung protein-basierter Therapeutika. Beispielsweise ist die Größe des Proteins häufig limitierend, auch die richtige

Einleitung

Proteinfaltung ist nicht immer gegeben. Weiterhin können Immunogenität und Instabilität der Proteine die Dosierungsmöglichkeiten und damit den Aufbau eines therapeutischen Spiegels im Körper einschränken [80]. Hohe Produktionskosten machen den Einsatz der rekombinanten Therapie im Vergleich zu mRNA-basierten Therapien unattraktiv und sehr teuer. Das Einbringen exogener mRNA in die Zelle und die transiente Expression ist demnach ein vielversprechender Ansatz die Proteinexpression ohne Risiken von genomischen Integrationen zu steuern [72]. DNA-basierte Ansätze in der Therapie von Erbkrankheiten wurden lange Zeit favorisiert. Hierbei ist allerdings nicht nur das effektive Einbringen der DNA in das Zytoplasma entscheidend, sondern auch die Translokation in den Zellkern, da diese dort zunächst in mRNA umgeschrieben werden muss, um das therapeutische Protein zu exprimieren [81, 82]. Über viele Jahre hinweg wurde der mRNA aufgrund ihrer Instabilität (Verdau durch ubiquitäre RNasen) und Immunogenität (Aktivierung des Immunsystems) kein großer therapeutischer Nutzen zugeschrieben [77, 81, 83] bis es Kariko und Kollegen mit ihren wegweisenden Entdeckungen 2008 gelang, durch die Substitution von Uridinresten in der mRNA mit dem bereits natürlich vorkommenden modifizierten Nucleosid, Pseudouridin dieses Hindernis zu umgehen [84]. Hierdurch konnte die Translation durch die Veränderung der Sekundärstruktur erhöht und die Erkennung der mRNA durch Toll-like Rezeptoren (TLRs) und Nukleasen verringert werden [84, 85]. Die so modifizierte mRNA zeigt eine bessere Stabilität und minimierte die Immunogenität. Sie kann innerhalb von Minuten sehr effektiv (hohe Expressionsrate), kontrolliert (durch die Menge an modifizierter mRNA) und transient exprimiert werden mit effizienter Translation, ohne der Gefahr genomischer Integration, was den Einsatz sicher macht und letztendlich zu keiner Aktivierung des angeborenen Immunsystems führt. Für ihre wegweisende Arbeit erhielt Katalin Kariko 2023 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin. Der erfolgreiche Einsatz synthetischer mRNA konnte bereits in einer Vielzahl von Studien aus den unterschiedlichsten Teilgebieten der regenerativen Medizin gezeigt werden. Hierzu gehören unter anderem die Transdifferenzierung von Zellen [86-89], die Modifikationen von (Stamm-) Zellen, um das Homing-Verhalten zu verbessern [90, 91], die Reprogrammierung somatischer Zellen [75, 89, 92], sowie die Herstellung von Wachstumsfaktoren [41, 58, 93-96] (Abbildung 2).

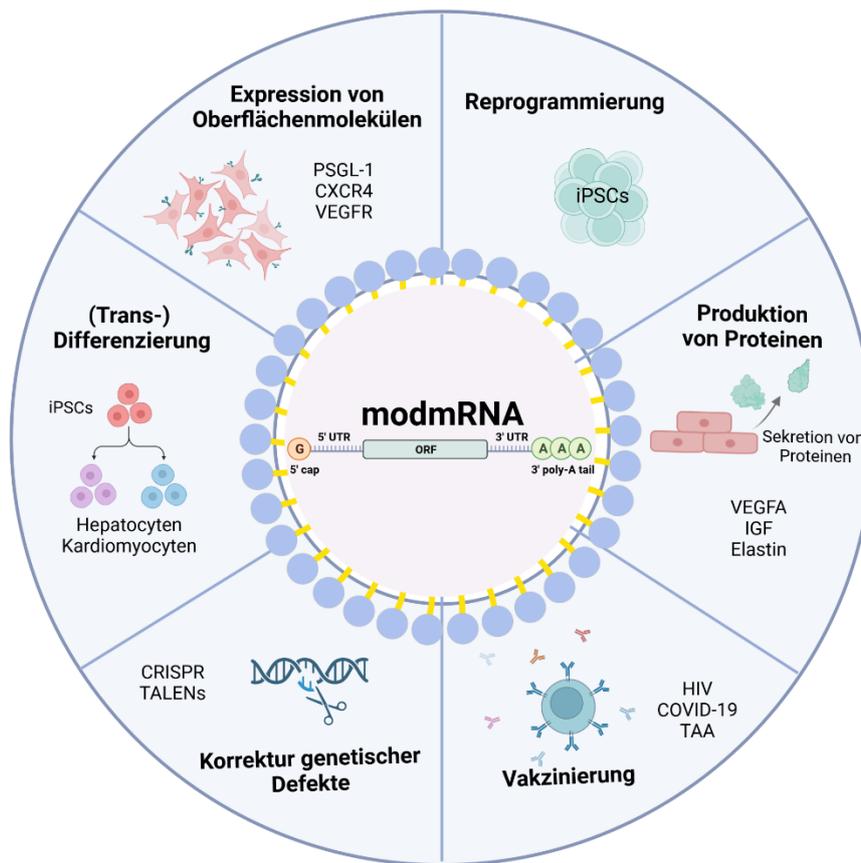


Abbildung 2: Mögliche Einsatzgebiete synthetischer mRNA. Gerichtete (Trans-) Differenzierung von Zellen aus induzierten pluripotenten Stammzellen in gewünschte Zelltypen (ECs, Kardiomyozyten) durch exogen zugeführte synthetische mRNA, Reprogrammierung somatischer Zellen (Fibroblasten) in iPSCs, Überexpression von Rezeptoren (CXCR4, PSGL-1, VEGFR) auf EPCs zur Verbesserung des Homings, Produktion sekretierbarer Proteine in Zellen, Vakzinierung gegen Krebszellen oder Viren, Reparatur von Gendefekten. Abkürzungen: TAA: Tumor assoziierte Antigene, HIV: Humanes Immundefizienz-Virus, iPSC: induzierte pluripotente Stammzellen, TALENs: Transcription Activator-like Effector Nucleases, CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, COVID-19: Coronavirus disease 2019, PSGL-1: P-selectin glycoprotein ligand 1. Erstellt mit BioRender.com

Fehlende oder defekte Proteine können somit durch den Einsatz synthetischer mRNA substituiert werden oder Zellen so verändert werden, dass diese funktionale Proteine exprimieren, die nicht zwingend unter normalen Bedingungen in der Zelle exprimiert werden. Spätestens seit dem Ausbruch der COVID-19-Pandemie im Jahr 2020, konnte die Entwicklung von mRNA-basierten Therapien enorm beschleunigt werden und Zugang im Bereich der Krebsvakzinierung und Infektionsprophylaxe finden. mRNA-

Einleitung

basierte Impfstoffe wie Comirnaty® und Spikevax® konnten hier ihren bemerkenswerten Nutzen unter Beweis stellen und ihre Wirksamkeit, sowie Sicherheit bestätigen. Auch mRNA-basierte Krebsvakzine befinden sich derzeit in der klinischen Entwicklung. So konnte beispielsweise in einer Studie mit BNT111 mRNA (BioNTech), das für vier tumor-assoziierte Antigene (TAAs) kodiert, eine effektive Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem Melanom gezeigt werden [97].

1.4.2 Immunogenität synthetischer mRNA

Die synthetische mRNA kann durch in vitro Transkription (IVT) kosteneffektiv und im großen Maßstab hergestellt und anschließend in Zellen eingebracht werden, wo sie eine transiente Expression ohne der Gefahr einer Insertionsmutagenese ermöglicht. Die unmodifizierte mRNA ist sehr instabil und wird durch die hohe Aktivität ubiquitärer RNasen sehr schnell abgebaut. Des Weiteren wird die Aktivierung des angeborenen Immunsystems stimuliert, weshalb sie nach dem Einbringen in die Zelle diesem entgegen muss. Im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem, welches Pathogene spezifisch erkennt, arbeitet das angeborene Immunsystem durch das Erkennen allgemeiner Signale für Zellschäden oder Infektionen. Diese werden als Schaden-assoziierte molekulare Muster (DAMPs) und Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) bezeichnet, je nachdem, ob diese in der Wirtsumgebung selbst oder in Pathogenen vorkommen. Erkannt werden diese molekularen Muster durch sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (PRRs). Das angeborene Immunsystem schützt unter anderem vor viralen Infektionen. Exogen zugeführte mRNA suggeriert die Anwesenheit von Viren und fungiert daher als DAMP, was zur Inflammation, Hemmung der Translation und zur Degradation der mRNA führt. Endosomal vorhanden, wird einzelsträngige RNA, einschließlich der mRNA, von Toll-like Rezeptoren (TLRs) 7 [98-100] und TLR8 [100] als DAMP erkannt (Abbildung 3).

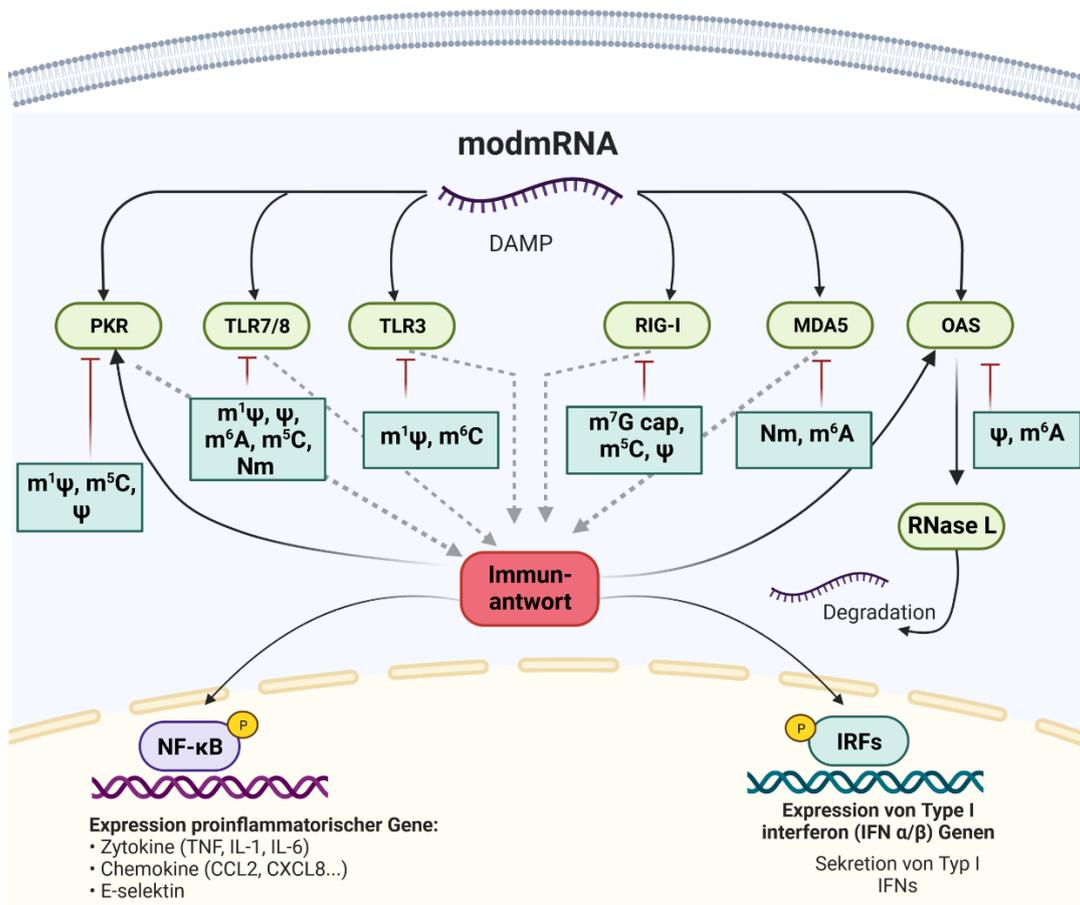


Abbildung 3: Immunogenität unmodifizierter mRNA vereinfacht dargestellt. Exogene und unmodifizierte mRNA wird als DAMP von Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems als fremd erkannt. Durch diese Erkennung werden immunologische Prozesse in Gang gesetzt, welche durch Aktivierung proinflammatorischer Gene zu einer inflammatorischen Auswirkung haben und zum anderen zur Degradation der mRNA führen. Die Modifikation in vitro transkribierter mRNA mit modifizierten Nucleotiden kann sowohl die endosomale als auch zytoplasmatische Erkennung durch PRRs vermeiden, die Immunogenität verringern und gleichzeitig die Translation erhöhen. Abkürzungen: DAMPs: Damage-associated molecular patterns, modmRNA: modified mRNA, Damage-associated molecular pattern, PKR: Proteinkinase R, RIG-I: Retinoic acid-inducible gene I, MDA5: Melanoma differentiation-associated protein 5, OAS: 2'-5'-oligoadenylate synthase, TLR: Toll-like Rezeptor, IRFs: Interferon regulatory factors. Erstellt mit BioRender.com

Doppelsträngige RNA wird sowohl endosomal als auch zytoplasmatisch von TLR3 [101, 102] und Retinsäure-induzierbares Gen-I (RIG-I)-ähnlichen Rezeptoren (RLRs), zu dem das Melanomdifferenzierungs-assoziiertes Protein 5 (MDA5) [103, 104] gehört, wie auch der Proteinkinase R (PKR) [105], erkannt. Nach Aktivierung der TLRs wird die Genexpression des Nuklearfaktor κB (NF- κB) und eine antivirale Immunantwort

Einleitung

induziert, woraufhin proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 sekretiert werden. Des Weiteren bewirkt die Hochregulierung von Interferon-stimulierten Genen (ISG) eine vermehrte Expression RNA-abbauender Enzyme, wie der 2'-5'-Oligoadenylat-Synthase (OAS) und der RNase L. Um die Stabilität der mRNA zu verbessern und gleichzeitig die Immunogenität synthetischer mRNA zu verringern, können chemische Modifikationen am RNA-Terminus, den Nukleotiden [106-109] oder an der Ribose selbst vorgenommen werden, bei der die Entfernung eines Protons am 2'-OH die TLR7/8 und MDA5-Bindung negativ beeinflusst und so die Erkennung durch das Immunsystem verhindert [110, 111]. Viele der modifizierten Nukleotide wie das Pseudouridin (ψ), 5-Methylcytidin (m^5C), N⁶-methyladenosin (m^6A) oder das 2'-O-methylierte Nukleosid (Nm) kommen auch natürlicherweise vor, weshalb sie in modifizierter mRNA als Therapeutikum eingesetzt werden können. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung unterschiedlich modifizierter Nukleotide die TLR-Aktivierung vermieden werden kann. Bereits Kariko und Kollegen konnten durch Substitution aller Uridinreste durch modifizierte Nukleotide (Pseudouridin und 2-thiouridin) die Immunogenität der *in vitro* transkribierten mRNA umgehen und die Translationseffizienz verbessern [85]. Auch andere Modifikationen wie m^5U , m^5C oder m^6A resultierten in einer Abnahme der TLR-Aktivierung [112].

1.5 Endothelzellen

Das vaskuläre Endothel ist eine heterogene Einzelschicht aus hoch spezialisierten Zellen, den sogenannten ECs, die das Lumen von allen Gefäßen auskleidet und die erste physiologische Barriere für Moleküle und zirkulierende Zellen oder Pathogene im Blut bilden [113]. Die auskleidende Gesamtfläche des Endothels beträgt etwa 1.000 m², weshalb es neben der Haut als das größte Organ im menschlichen Körper gesehen werden kann [114]. Diese einzigartige Zellschicht agiert auch als endokrines Organ und stellt durch den kontrollierten Austausch von Substanzen zwischen dem Blut und dem umgebenden Gewebe in den spezifischen Organen eine selektiv permeable Barriere zwischen extra- und intravaskulären Kompartimenten dar [115-119]. Jahre lang wurde das Endothel als einfache, die Blutgefäße auskleidende Barriere gesehen [120, 121]. Inzwischen ist jedoch bekannt, dass das Endothel durch die Regulation des Gefäßtonus, durch den Austausch von Flüssigkeiten und Stoffen, durch die Angiogenese, und durch das Aufrechterhalten eines anti-inflammatorischen und anti-thrombogenen

Einleitung

Status, eine weitaus wichtigere Funktion in der kardiovaskulären Physiologie und Pathophysiologie zukommt [122-133]. Unter physiologischen Bedingungen verhindern ECs die Bildung von Thrombosen durch unterschiedliche gerinnungshemmende und anti-thrombozytäre Mechanismen. Durch die kontrollierte Expression von Bindungsstellen für gerinnungshemmende und gerinnungsfördernde Faktoren auf der Zelloberfläche, vermögen ECs die Gerinnung genauestens zu regulieren [134]. Ein weiterer Schritt von ECs die Gerinnung zu steuern ist das Bereitstellen von Gewebefaktoren und Thrombininhibitoren, wie auch Rezeptoren zur Protein C Aktivierung [135]. In den letzten Jahren wurden stetig weitere regulierende Gene, Signalwege und Moleküle identifiziert, welche in den Erhalt des anti-thrombogenen Status involviert sind [136-139].

Neben der Regulation von Hämostase und Thrombose, spielen ECs bei entzündlichen Prozessen eine wichtige Rolle, weil sie auf entzündliche Mediatoren sehr schnell reagieren können [140]. ECs sorgen aktiv für eine erhöhte Durchblutung des entzündeten Gewebes, steuern die Rekrutierung zirkulierender Leukozyten und ermöglichen es diesen Immunzellen dadurch aus dem Blut in das betroffene Gewebe einzudringen. Die Leukozytenrekrutierung wird dabei auch durch einen Kalziumanstieg, bei der es zur Phosphorylierung der Myosin-light-chain (MLC) kommt, induziert. Das aktivierte MLC führt zur P-Selektin-Translokation zur zellulären luminalen Oberfläche, welches wiederum zirkulierende neutrophile Granulozyten rekrutiert [141]. Während der akuten Entzündung, werden ECs durch den Tumornekrose Faktor (TNF- α) und Interleukin-1 (IL-1) stimuliert, was zur weiteren Aktivierung pro-inflammatorischer Transkriptionsfaktoren wie dem NF- κ B führt [140]. Die Aktivierung pro-inflammatorischer Signalwege führt wiederum zur vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen wie dem E-Selektin [142], dem intrazellulären Adhäsionsmolekül 1 (ICAM1), dem vaskulären Adhäsionsmolekül 1 (VCAM1) und einer Vielzahl an Chemokinen wie dem CXC-Motiv-Chemokin 8 (CXCL8) und dem CC-Chemokin-Ligand-2 (CCL2) [143].

1.6 Oberflächenmodifikation von Zellen und Biomaterialien

Durch die zellbasierte Therapie konnte der Einfluss auf das Tissue Engineering, die Krebsimmuntherapie und die regenerative Medizin im Allgemeinen deutlich an Bedeutung gewinnen. Aufgrund ihrer spezifischen Homing-Effekte durch Chemotaxis, ihrer

Einleitung

Differenzierungsfähigkeiten, ihrer sekretorischen Funktionen, ihres ausgeprägten therapeutischen Potentials und der Fähigkeit, *in vitro* und *in vivo* expandiert werden zu können, sind Zellen zu einem attraktiven und strategischen Werkzeug in der Therapie unterschiedlichster Erkrankungen geworden. Daher ist die Fähigkeit, Zellen zu modifizieren und entsprechend den beabsichtigten therapeutischen Zwecken zu manipulieren von großem Interesse für die biomedizinische Forschung. Hier wurden viele innovative Methoden entwickelt, bei der die genetische Modifizierung von Zellen einen der fortschrittlichsten Techniken der Oberflächenmodifikation von Zellen darstellt. Obwohl die genetische Manipulation mittels viraler Vektoren ein leistungsfähiges Werkzeug ist, ist ihre Anwendbarkeit aufgrund der permanenten Veränderung der Zellen und möglicher Mutationen bislang sehr begrenzt. Alternativ hierzu wurden Anstrengungen unternommen, um verbesserte Techniken zur Oberflächenmodifikation zu entwickeln. Hierzu zählen die kovalente chemische, enzymatische und metabolische Konjugationen [144-146], polymere Verkapselung [147], hydrophobe Insertion [148], sowie die neuartige und optimierte genetische Modifikation mittels synthetischer mRNA, um bestimmte Rezeptoren an der Zelloberfläche exprimieren zu können. Neben der Modifikation von Zelloberflächen, können sowohl Zellen als auch Oberflächen von Biomaterialien mittels bioorthogonaler Chemie modifiziert werden, um deren Biokompatibilität erheblich zu verbessern.

1.6.1 Kovalente Konjugation

Die kovalente Konjugation auf dem chemischen, enzymatischen oder metabolischen Weg kann bioaktive Substanzen an die Zellmembran koppeln [93, 145, 146, 149-152]. Die chemische Konjugation stellt hierbei eine der einfachsten Methode dar, die sich die Vorteile von oberflächenexponierten funktionellen Gruppen auf der Zellmembran als Bindungsstellen zu Nutze macht. Bislang werden N-Hydroxyl-succinimidyl Ester (NHS)-Gruppen [149-152], Maleimide [144] und Pyridyldithiol [153, 154] als die gängigsten chemischen Quervernetzungslinker eingesetzt. Der Einsatz von NHS-aktivierten Estern modifiziert an der Zelloberfläche exponierte Aminogruppen von bioaktiven Molekülen. Maleimid-konjugierte Biomoleküle können selektiv an die oberflächenexponierte Thiolgruppe gebunden werden, wodurch eine nicht spaltbare Thioetherbindung entsteht. Der entscheidende Vorteil bei der chemischen Konjugation ist die vielfältige Anwendbarkeit. Biomaterialien, die mit Quernetzverlinkern funktionalisiert sind, können zur Modifikation von Zellen eingesetzt werden. Anders als bei der

Einleitung

zufälligen chemischen Konjugation, bieten enzymatische und metabolische Methoden der Konjugation eine selektive Bindung an Biomaterialien.

Die Sialinsäurebiosynthese, die physiologisch nicht in humanen Zellen vorkommt, wird durch den unnatürlichen Zucker N- α -azidoacetylmannosamin (ManNAz), einem Analogon des nativen Zuckers N-Acetylmannosamin, induziert, wenn Zellen diesem Zucker ausgesetzt werden. Bei diesem Prozess wird N- α -Azidoacetylsialinsäure (SiaNAz), ein Metabolit des ManNAz in die Membran konjugiert. Die so eingebauten Azidgruppen (N₃) stellen durch die Klick-Chemie [155, 156] oder Staudinger-Ligation [145, 146], Bindungsstellen für beschichtete Biomaterialien dar, um kovalent an diese binden zu können. Wie bei der metabolischen Konjugation, ermöglicht die enzymatische Konjugation ebenfalls eine kovalente Bindung von Biomaterialien an definierten Stellen der Zelloberfläche. So konnte gezeigt werden, dass durch die Transpeptidase Sortase A aus *Staphylokokkus aureus* (Staph. aureus) effizient Peptide oder auch ganze Proteine mit einem LPETG-Motiv an das N-terminale Glycin auf der Zelloberfläche konjugiert werden können [157]. Verglichen mit anderen nicht genetischen Oberflächenmodifikationen sind Modifikationen durch kovalente Konjugation sehr stabil [149, 152].

1.6.2 Hydrophobe Insertion

Amphiphile Polymere wie das Phospholipid-konjugierte Polyethylenglykol (PEG) und der Polyvinylalkohol (PVA), die aus langen Alkylketten bestehen, bieten ein nicht-invasives Mittel zur Veränderung der Zelloberfläche durch hydrophobe Wechselwirkungen. Verschiedenste Zelltypen wurden bereits durch hydrophobe Wechselwirkungen mit Lipid-konjugierten Biomaterialien für spezifische Anwendungen modifiziert [158-164]. Im Gegensatz zur kovalenten Konjugation oder elektrostatischen Interaktionen, welche relativ stark und starr sind, erlauben Oberflächenmodifikationen durch hydrophobe Insertion membrangebundener, bioaktiver Moleküle, der Zellmembran weiterhin sich dynamisch verändern zu können. Des Weiteren konnte bisher gezeigt werden, dass Lipid-konjugierte Biomaterialien eine geringe Toxizität und eine physiologische zelluläre Aktivität aufweisen [165-167].

1.6.3 Klick-Chemie als Werkzeug zur Oberflächenmodifikation von Zellen und Biomaterialien

Die bioorthogonale Chemie beruht auf dem mathematischen Konzept der Orthogonalität und bezeichnet eine Reihe von chemischen Reaktionen, welche in biologischer

Einleitung

Umgebung ablaufen können, ohne biochemische Prozesse selbst zu beeinflussen [146, 168-172]. Hierzu zählen unter anderem die Tetrazin-Ligation, die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin Zyклоaddition (CuAAC) und die kupferfreie Azid-Alkin Zyκλοaddition (SPAAC), auch bekannt als Klick-Chemie. Erstmals postuliert wurde der Begriff 2001 von Sharpless und Meldal, welche unabhängig voneinander die These aufstellten, dass der Einsatz von Kupfer, die Reaktion der Azid-Alkin Zyκλοaddition deutlich erhöht [171, 172]. Typische Charakteristika der Klick-Chemie sind die hohe Ausbeute, ein breites Anwendungsspektrum, eine hohe Stereospezifität, wie auch weniger zytotoxische Nebenprodukte bei der Reaktion selbst [173]. Der Vorteil der Klick-Chemie, liegt im Gegensatz zu anderen chemischen Reaktionen in der Anwendbarkeit unter physiologischen Bedingungen und der irreversiblen chemischen Bindungen, weshalb diese für die Modifikation von Biomolekülen wie Nukleinsäuren, Lipiden, Proteinen und Biomaterialien eingesetzt werden kann. Die Verwendung von CuAAC in biologischen Systemen ist jedoch aufgrund ihrer zytotoxischen Eigenschaft nur wenig geeignet, da die verwendeten Kupfer-II-Vorläufer (Cu(II)) oxidative Schäden an der Zelle verursachen. Auch der Einsatz von Kupfer-I (Cu(I)), welches durch Zugabe weiterer Reduktionsmittel wie Ascorbat zu Cu(II) oxidiert wird, kann durch seine Nebenprodukte zellschädigende Prozesse auslösen. Um den Einsatz der Klick-Chemie auch in lebenden Zellen einsetzen zu können und die Notwendigkeit von Kupferkatalysatoren zu eliminieren, wurde von Bertozzi et al. die Kupfer-freie Azid-Alkin Zyκλοaddition, besser bekannt als strain-promoted azide-alkyne cycloaddition, entwickelt, die zudem die langsame Kinetik der bislang Kupfer-freien Reaktionen verbessern sollte [168, 174]. Das terminale Alkin, welches bei der CuAAC eingesetzt wird, wird bei der SPAAC durch ein zyklisches Alkin, wie dem Dibenzocyclooctin (DBCO) ausgetauscht, wodurch sich dieses mit Aziden verbinden kann.

Die metabolische Veränderung von Zellen zielt darauf ab, die Glykosylierung und den zellulären Stoffwechsel zu manipulieren, um die Expression nicht natürlicher Monosaccharide wie Alkin- oder Azid-modifizierte Glykane an der Zelloberfläche einzubauen. Dieser Schritt ist ein wesentlicher Bestandteil in der Klick-Chemie, der es durch chemische Markierung erlaubt, Zellen oder Moleküle an Oberflächen kovalent zu binden. Biologische Komponenten wie Aminosäuren, Zucker oder Lipide werden in lebenden Zellen verstoffwechselt. Diese physiologische Eigenschaft kann genutzt werden, um chemische Markierungen auf Glykanen [146, 175, 176], Proteinen [177, 178] und Lipiden [179, 180] vorzunehmen und diese für den Einsatz in der Klick-Chemie

Einleitung

oberflächlich zu markieren. Die metabolische Veränderung durch den Einsatz von Zuckeranaloga zur Einführung von SPAAC-Substraten in Zellen ist hier ein besonders nützliches Werkzeug [175, 181, 182]. Dabei werden unterschiedliche Zucker wie Azid-modifiziertes Mannosamin (ManNAz) oder tetraacetyliertes N-Azidoacetyl-Mannosamin (Ac₄ManNAz) verwendet, welche durch den Oligosaccharid-Biosynthesignalweg unter anderem zu Azidoacetyl-Neuraminsäure metabolisiert werden, dann in sialinsäurehaltige Glykoproteine der Zelle integriert werden, und anschließend auf der Zelloberfläche als Azide exprimiert werden [175, 176, 183]. DBCO bildet mit Aziden Triazolverbindungen aus, ohne dabei unspezifisch mit Tetrazinen zu reagieren. Der Einsatz von DBCO als Klick-Ligand bietet daher, zusammen mit chemisch modifizierten Sacchariden, eine alternative Methode zu herkömmlichen Verknüpfungsmethoden, sowohl *in vitro* (für die Beschichtung von Biomaterialien, Markierung von Proteinen und Nukleinsäuren), als auch *in vivo* (für Zell-Zellinteraktionen oder dem targeted drug delivery).

1.7 Hämkompatibilität von ECMO-Membranen

Atemwegserkrankungen sind weltweit für eine hohe Morbidität und Mortalität verantwortlich. Derzeit gilt die Lungentransplantation als die einzige kurative Option für die Behandlung von Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen im Endstadium, wie der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (COPD), zystischer Fibrose (CF), Lungenödem und interstitiellen Lungenerkrankungen. Leider führt der immer noch bestehende Mangel an Spenderlungen dazu, dass eine hohe Anzahl an Patienten, die auf einer Transplantationsliste stehen versterben, da die mittlere Wartezeit für eine Transplantation bis zu eineinhalb Jahre betragen kann [184]. Die schlechte Prognose hat die Nachfrage nach künstlichen Lungen, die die Funktion der geschädigten Lunge temporär übernehmen können, um die Zeit bis zur Transplantation zu überbrücken, deutlich erhöht. Zum ersten Mal wurden künstliche Lungen Anfang der 1950er Jahre in der Herzchirurgie als kardiopulmonaler Bypass (CPB) eingesetzt [185]. Die extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) stellt hierbei ein Unterstützungssystem dar, welches bei schwerem Lungenversagen eingesetzt wird, um die Zeit bis zur möglichen Transplantation zu überbrücken [186, 187]. Hierbei wird das patienteneigene Blut durch eine gasdurchlässige Oxygenatormembran gepumpt, um das Blut zu oxygenieren und gleichzeitig Kohlendioxid aus dem Blut zu entfernen [188]. Insbesondere seit

Einleitung

dem weltweiten Ausbruch der Coronapandemie Ende 2019, bei der das neuartige Coronavirus (SARS-CoV-2) die alveolaren Zellen der Lunge infizierte, stieg die Rate an ECMO-Einsätzen deutlich an [189] und rettete tausenden Menschen das Leben. Die standardmäßig eingesetzten Oxygenatoren bestehen aus Bündeln von mikroporösen Hohlfasermembranen (HFMs), die meist aus Polypropylen (PP) oder Polymethylpenten (PMP) bestehen und eine Oberfläche von etwa 2m^2 aufweisen, um die klinisch relevanten Transportraten für Sauerstoff (O_2) und Kohlenstoffdioxid (CO_2) zu erreichen. Der Sauerstoff fließt dabei durch die Lumina der Hohlfasern und das Blut durch die Zwischenräume der Hohlfaserbündel (Abbildung 4).

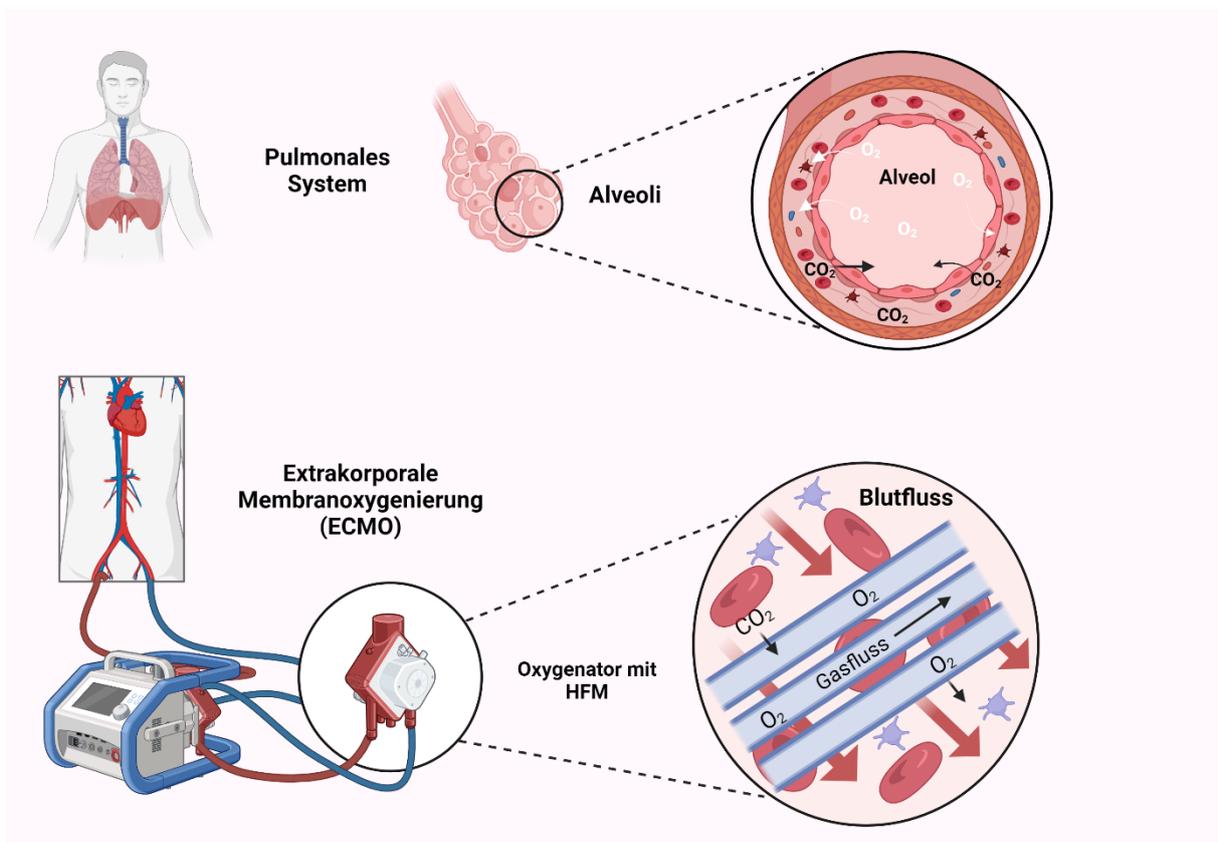


Abbildung 4: Funktionsprinzip der Lunge im Vergleich zum Oxygenator. Oben: Gasaustausch in den Lungen hin zu den Lungenbläschen zur Anreicherung des Blutes mit Sauerstoff und dem Ausatmen von Kohlenstoffdioxid. Unten: Aufbau eines ECMO-Systems stark vereinfacht mit dem Oxygenator als Hauptbestandteil und der darin befindlichen HFMs. Gas fließt durch die Kanäle der HFMs hindurch, wobei das Blut an den HFM vorbeifließt und somit das Blut oxygeniert oder decarboxyliert. Abkürzungen: CO_2 : Kohlendioxid, O_2 : Sauerstoff, HFM: Hohlfasermembran. Erstellt mit BioRender.com

Der Einsatz von PP-Membranen ist aufgrund der stark porösen Struktur für einen längeren Einsatz am Patienten nicht geeignet, da es zum Austritt von Plasma in die

Einleitung

Membranen kommt und dadurch den Gasaustausch behindert. Die Entwicklung von PMP-Membranen konnte den Einsatz der ECMO auf bis zu drei Wochen verlängern [190], aber auch hier ist kein längerer Einsatz möglich.

Trotz der Behandlung mit gerinnungshemmenden Medikamenten, wie Heparin, welches bei der ECMO eingesetzt werden, führt die Fremdoberfläche der künstlichen Lungen zur Aktivierung der Gerinnungs- und Komplementsysteme, was den längerfristigen Einsatz am Patienten erschwert, sodass diese für nur einige wenige Tage bis wenige Wochen eingesetzt werden können [191]. Um die Hämokompatibilität von blutkontaktierenden Materialien zu verbessern, wird seit Jahrzehnten an neuen Methoden geforscht [192, 193]. Bisher konnten verschiedene kommerzielle Oberflächenbeschichtungen für den klinischen Einsatz [194] entwickelt werden, wie etwa oberflächengebundenes Heparin, einer bioaktiven Beschichtung von Cortiva [195], die biopassive Beschichtung von Safeline, bei der rekombinantes humanes Albumin als Beschichtung eingesetzt wird [196], dem Phisio (Phosphorylcholin) [197], der X-Beschichtung (Poly(2-methoxyethylacrylat), PMEA) [198] oder der aktiven Mehrfachbeschichtung durch Bioloin (Maquet), dass Heparin kovalent mit rekombinantes humanes Albumin an der Oberfläche beschichtet [199]. Die Beschichtung der HFM-Oberflächen mit Heparin stellt den häufigsten Ansatz dar, um die Hämokompatibilität zu verbessern. Der positive Effekt dieser Beschichtung ist allerdings nicht ausreichend, um die Notwendigkeit einer systemischen Gabe von Antikoagulantien zu beseitigen. Außerdem kann sich im Laufe der Zeit das gebundene Heparin lösen und zur Ausbildung von Thromben führen [200]. Neben möglichen Blutungen, die auftreten können, birgt die Langzeitexposition gegenüber Heparin das Risiko, dass ECMO-Patienten eine Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) entwickeln [201-204]. Bei der entstehenden HIT werden Antikörper gegen den Heparin- und den Plättchenfaktor 4-Komplex gebildet, die Thrombozyten aktivieren, zu einer vermehrten Thrombinbildung und Aktivierung führen und so schwere thromboembolische Komplikationen hervorrufen. Trotz der zahlreichen Fortschritte bei der Entwicklung neuer Materialien und Oberflächenbeschichtungen ist die Hämokompatibilität von Oxygenatormembranen immer noch nicht ausreichend, weshalb an weiteren hämokompatiblen Beschichtung geforscht wird [205, 206]. Das Endothel, das physiologischer Weise die luminalen Seiten der Blutgefäße auskleidet und aus ECs besteht, bleibt die optimale Oberfläche für den Blutkontakt. Unter physiologischen Bedingungen stellt das Endothel eine nicht-thrombogene Oberfläche dar und bildet zugleich eine gerinnungshemmende und anti-

thrombotische Wirkung aus. Aufgrund dieser Vorteile, stellt die vollständige Endothelialisierung künstlicher Oberflächen eine vielversprechende Strategie dar, um die Hämokompatibilität von Biomaterialien zu verbessern und Reaktionen gegen die künstlichen Materialien zu verhindern [47, 207].

1.8 Hämokompatibilität

Die Blutverträglichkeit ist ein wesentliches Merkmal für Biomaterialien, welche nach der Implantation in den Patienten mit Blut und dessen zellulären Bestandteilen (Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten), sowie auch im Plasma gelösten Bestandteilen (Salze und Plasmaproteinen) in Berührung kommen. Die Zusammensetzung von Biomaterialien, wie auch das Biomaterial an sich, muss mit dem Blut in Kontakt kommen können, ohne klinisch relevante Komplikationen wie die Hämolyse oder, die Aktivierung von Thrombozyten-, Leukozyten und Komplementfaktoren, hervorzurufen. Im Gegensatz zum gesunden Endothel, welches Thrombosen und Entzündungen durch die Expression und Sekretion von Faktoren wie dem tissue plasminogen activator (tPA), Thromboglobulin oder Prostaglandinen [208] aktiv entgegenwirkt, können Biomaterialien durch komplexe und miteinander verbundenen Prozesse die Gerinnungsaktivierung erhöhen [209]. Der Kontakt von Biomaterialien mit Blut führt innerhalb kürzester Zeit zur Adsorption von Plasmaproteinen auf der deren Oberfläche [210, 211]. Immunglobuline, Albumin und Fibrinogen sind hierbei die am häufigsten vorkommenden Plasmaproteine [212], wovon Fibrinogen das zentrale Protein in der Gerinnungskaskade ist und auf der Oberfläche von Biomaterialien adsorbiert wird [213]. Die Gerinnungskaskade besteht hierbei aus einer Vielzahl an Proteasen, welche sich gegenseitig aktivieren und zur Bildung von Thrombin und letztendlich zur Ausbildung eines festen Fibrinnetzes führen [214]. Generell kann die Gerinnungskaskade in den extrinsischen Weg und den intrinsischen Weg eingeteilt werden, die jeweils unterschiedlich aktiviert werden, aber die Aktivierung des Faktors X (FX) gemeinsam haben, bei dem als Endprodukt ein Gerinnsel aus Fibrin ausgebildet wird [215]. Der extrinsische Weg der Gerinnungskaskade wird hierbei durch die Expression des Gewebefaktors (TF) von geschädigten Zellen eingeleitet, während der intrinsische Weg durch die Wechselwirkung der Materialoberfläche (Kontaktaktivierung) mit den adsorbierten Proteinen induziert wird und der Faktor XII (FXII) zu FXIIa gespalten wird. Die so an der Materialoberfläche gebundenen Proteine spielen auch

Einleitung

eine wichtige Rolle bei der Adhäsion von Thrombozyten, was nicht selten thromboembolische Ereignisse und weitere Komplikationen, durch das Ablösen des Thrombus, nach sich zieht. Insbesondere die Bindung vom Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten begünstigt die Bindung an das Fibrinogen, was eine weitere Stimulation der Thrombozyten zur Folge hat und zur Freisetzung der in den α -Granula gespeicherten Faktoren führt. Die adsorbierten Proteine beeinflussen hierbei nicht nur die Aktivierung der Gerinnung und der Thrombozytenadhäsion, sondern auch die Aktivierung des Komplementsystems und der Leukozyten. Der alternative Signalweg des Komplementsystems kann dabei direkt durch Biomaterialien durch die Hydrolyse der Komplementfaktoren C3 und C5 initiiert werden [216]. Letztendlich können die reaktiven Fragmente C3a und C5a die Leukozytenadhäsion- und Aktivierung beeinflussen [217].

Um potenzielle Biomaterialien auf Hämokompatibilität zu prüfen, gibt es zahlreiche standardisierte Methoden, welche in der ISO10993-4 – „Biologische Beurteilung von Medizinprodukten – Teil 4: Auswahl von Test für Interaktion mit Blut“. Unterschiedliche Inkubationsmethoden wie die statische Inkubation [218, 219] oder die dynamische Inkubation [176, 220] können eingesetzt werden, um die Physiologie von implantierten Biomaterialien annähernd gleich zu halten. Hierbei können nach der Inkubation unterschiedliche Parameter wie etwa der Thrombin-Anti-Thrombin Komplex (TAT – Gerinnung), die Hämolyse, das SC5b9 (Komplementaktivierung) und das Blutbild (Hämatologie) untersucht werden.

2 Zielsetzung

Herz-Kreislaufkrankungen gehören gemeinsam mit den Lungenerkrankungen zu den häufigsten Todesursachen weltweit und stellen die Gesundheitssysteme vor eine große Herausforderung. Herzkreislaufkrankungen umfassen hierbei eine Reihe von Erkrankungen des Herzens, wie dem akuten Myokardinfarkt, Hypertonie oder Herzinsuffizienz. Lungenerkrankungen betreffen primär das Atmungssystem mit der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) oder der Lungenfibrose als häufigste Erkrankung. Trotz der Fortschritte in der Behandlung ischämischer Erkrankungen mit Medikamenten und interventionellen Eingriffen, ist die Behandlung der Patienten mit AMIs, welche einen Verlust des Herzmuskelgewebes erleiden, nach wie vor eine Herausforderung. EPCs spielen eine wichtige Rolle bei der Neovaskularisierung von ischämischem Gewebe, aber auch bei der Reendothelialisierung verletzter Blutgefäße. In mehreren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass das Alter und bestimmte Risikofaktoren, wie Rauchen und Lebensstil, die Verfügbarkeit und die Funktion zirkulierender EPCs erheblich beeinträchtigen können. Strategien zur Verbesserung des Homing zirkulierender Zellen zum ischämischen Gebiet, aber auch der Zelladhäsion und das Überleben der Zellen sicherzustellen, sind von entscheidender therapeutischer Bedeutung. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte deshalb eine Strategie zur Verbesserung des Homings von EPCs hin zum entzündeten Endothel etabliert werden. Hierbei wurden murine EPCs *in vitro* kultiviert und mittels synthetischer mRNA modifiziert. Die *in vitro* transkribierte mRNA kodiert hierbei für wichtige Migrations- und Adhäsionsfaktoren wie dem CXCR4 und dem PSGL-1. Nach erfolgreicher mRNA-Synthese und Transfektion der Zellen, sollten die mRNA-modifizierten Zellen auf Migrations- und Adhäsionspotential hin untersucht werden, bei dem aktivierte ECs als Model gelten sollen, um die mRNA-basierte Modifikation der EPCs zu testen. Im zweiten Teil der Arbeit sollte eine neuartige Beschichtung etabliert werden, um die Hämokompatibilität von in Oxygenatoren verbauten Hohlfasermembranen zu verbessern. Da die bislang verwendeten HFMs aufgrund ihrer schlechten Verträglichkeit nur für eine geringe Zeit am Patienten eingesetzt werden können, sollte dies mit der neuen Beschichtungsmethode verbessert werden. Hierbei war zunächst das primäre Ziel eine Beschichtungsmethode basierend auf der kupfer-freien Klick-Chemie zu entwickeln. Dazu sollten die Membranen durch unterschiedliche Schritte mit DBCO beschichtet und anschließend mit metabolisch veränderten ECs kovalent konjugiert werden. Die Beschichtung der HFMs mit ECs soll aufgrund der anti-inflammatorischen

Zielsetzung

und anti-thrombogenen Eigenschaften der ECs die Aktivierung der Gerinnung, der Thrombozyten und des Komplementsystems verringern. Um diese Hypothesen zu bestätigen, sollten die modifizierten und endothelialisierten HFMs auf Ihre hämokompatiblen Eigenschaften gemäß Vorgaben der EN ISO 10993-4 bewertet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Publikation I: Homing of mRNA-modified endothelial progenitor cells to inflamed endothelium

Denis Canjuga, Heidrun Steinle, Jana Mayer, Ann-Kristin Uhde, Gerd Klein, Hans-Peter Wendel Christian Schlensak,
Meltem Avci-Adali

MDPI - Pharmaceuticals

Akzeptiert am 30. May 2022

Zusammenfassung:

Endotheliale Vorläuferzellen (EPCs) gehören zu den wichtigsten Stammzellen für die Neovaskularisierung von Geweben, die durch ischämische Erkrankungen wie Herzinfarkt, ischämischen Schlaganfall oder kritische Extremitätenischämie geschädigt wurden. Ihre geringe Homing-Effizienz bei der Behandlung von ischämischen Geweben schränkt jedoch ihre potenziellen klinischen Anwendungen ein. Die Verwendung synthetischer mRNA für die Zellmodifikation stellt eine neue und vielversprechende Technologie zur Modulation des Zellverhaltens und der Geweberegeneration dar. Um das therapeutische Potenzial von EPCs zu verbessern, wurden EPCs aus der Maus mit synthetischen mRNAs transfiziert, die für den C-X-C-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) und den P-Selektin-Glykoprotein-Liganden 1 (PSGL-1) kodieren, um die Homing- und Migrationseffizienz der EPCs zum entzündeten Endothel zu erhöhen. Durchflusszytometrische Messungen ergaben, dass die Transfektion von EPCs mit CXCR4 und PSGL-1 mRNA zu einer erhöhten Expression von CXCR4 und PSGL-1 auf der Zelloberfläche im Vergleich zu den unmodifizierten EPCs führte. Die Transfektion von EPCs mit mRNAs hatte hierbei keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen. CXCR4-mRNA-modifizierte EPCs zeigten in einem chemotaktischen Migrations-Assay ein deutlich höheres Migrationspotenzial als unmodifizierte Zellen. Die Bindungsstärke der EPCs an das entzündete Endothel wurde mit der Einzelzell-Rasterkraftmikroskopie (AFM) bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die mRNA-modifizierten EPCs eine dreifach höhere Ablösekraft benötigten, um sich vom TNF- α -aktivierten Endothel zu lösen, als unmodifizierte EPCs. Darüber hinaus wurde in einem dynamischen

Ergebnisse

Flussmodell eine deutlich erhöhte Bindung der mRNA-modifizierten EPCs an das entzündete Endothel festgestellt. Diese Studie konnte zeigen, dass die Modifikation von EPCs mit synthetischen mRNAs, welche Homing-Faktoren kodieren, das Homing- und Migrationspotenzial dieser Stammzellen zum entzündeten Endothel erhöht. Somit stellt diese Strategie eine vielversprechende Möglichkeit dar, das therapeutische Potenzial von EPCs für die Behandlung von ischämischem Gewebe zu erhöhen.

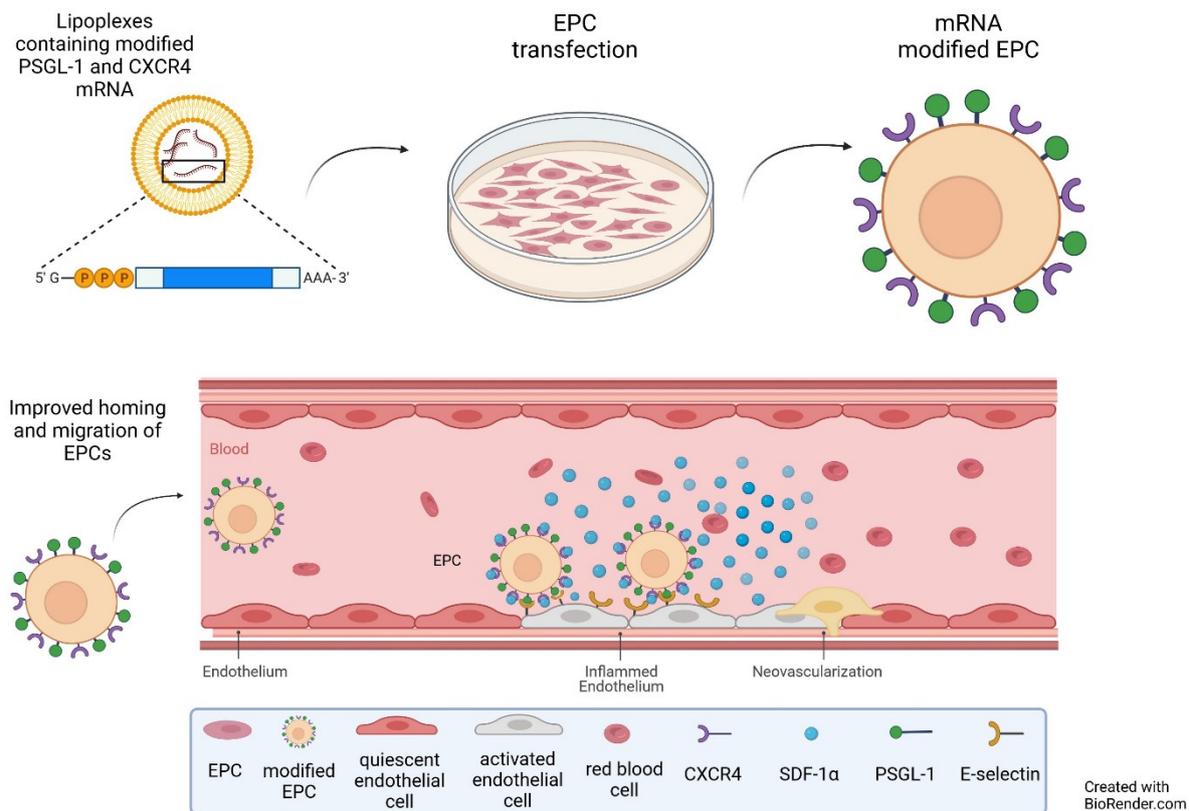


Abbildung 5: Grafische Zusammenfassung. Herstellung und Komplexierung der IVT-mRNA kodierend für CXCR4 und PSGL-1 mit Lipofectamine™ 2000 und Transfektion der kultivierten EPCs. Nach der Transfektion wurde mittels Durchflusszytometrie die Expression der Oberflächenrezeptoren und Liganden untersucht. In Migrations- und Adhäsions-Assays zeigten die mRNA-modifizierten Zellen sowohl signifikant höhere Migration zu einem Chemokingradienten, als auch eine starke Adhäsion und Bindung an aktiviertem Endothel verglichen mit nicht modifizierten EPC: Endotheliale Progenitor Zellen, PSGL-1: P-selectin Glycoprotein Ligand-1, SDF-1α: Stromal cell-derived factor 1. Erstellt mit BioRender.com

3.2 Publikation II: Improving hemocompatibility of artificial lungs by click conjugation of glycoengineered endothelial cells onto blood-contacting surfaces.

Denis Canjuga, Caroline Hansen, Franziska Halbrügge, Ludmilla Hann, Sarina Weiß,
Christian Schlensak, Hans Peter Wendel,
Meltem Avci-Adali

Biomaterials Advances

Akzeptiert am 20. April 2022

Zusammenfassung:

Künstliche Lungen, welche auch Oxygenatoren genannt werden, ermöglichen das Überleben von Patienten mit schwerem Lungenversagen durch die effiziente Oxygenierung des Blutes. Die unzureichende Hämokompatibilität der derzeit verfügbaren künstlichen Lungen verhindert jedoch ihre langfristige Verwendung. In dieser Studie wurde daher eine neuartige Methode zur effizienten Endothelialisierung blutkontaktierender Oberflächen entwickelt, um deren Hämokompatibilität zu verbessern. Hierfür wurden Hohlfasermembranen (HFM) zunächst mit Dibenzylcyclooctin (DBCO) funktionalisiert und mit metabolisch-funktionalisierten ECs mittels kupferfreier Click-Reaktion kovalent mit DBCO konjugiert. Durch metabolisches Glycoengineering unter Verwendung von tetraacyliertem Azidoacetylmannosamin (Ac4ManNAz) konnte eine hocheffiziente Funktionalisierung von ECs mit Azid (N₃)-Molekülen auf der Zelloberfläche ohne negative Auswirkungen auf die Viabilität der Zellen, erreicht werden. Nach 48 Stunden wurde auf den mit DBCO funktionalisierten HFM-Oberflächen im Vergleich zu unmodifizierten HFM eine deutlich verbesserte Endothelialisierung festgestellt. Die ECs reagierten auf Entzündungsreize und exprimierten adhäsionsfördernde Moleküle (E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1). Darüber hinaus wurde die Hämokompatibilität der HFMs durch dynamische Inkubation mit frischem menschlichem Blut analysiert. DBCO-beschichtete und unbeschichtete HFM zeigten eine vergleichbare Hämokompatibilität, aber die Endothelialisierung der HFM reduzierte die Aktivierung der Blutgerinnung und der Blutplättchen erheblich. Interessanterweise führte die Inkubation endothelialisierter HFM mit menschlichem Blut zu einer weiteren Verringerung der Expression von E-Selektin und VCAM-1 in

Ergebnisse

ECs. In dieser Studie wurde somit eine hocheffiziente, zellkompatible Methode zur Endothelialisierung künstlicher Lungen etabliert. Diese auf Click-Chemie basierende Methode kann auch für die Endothelialisierung anderer künstlicher Oberflächen für das Tissue-Engineering und regenerative Medizinanwendungen eingesetzt werden.

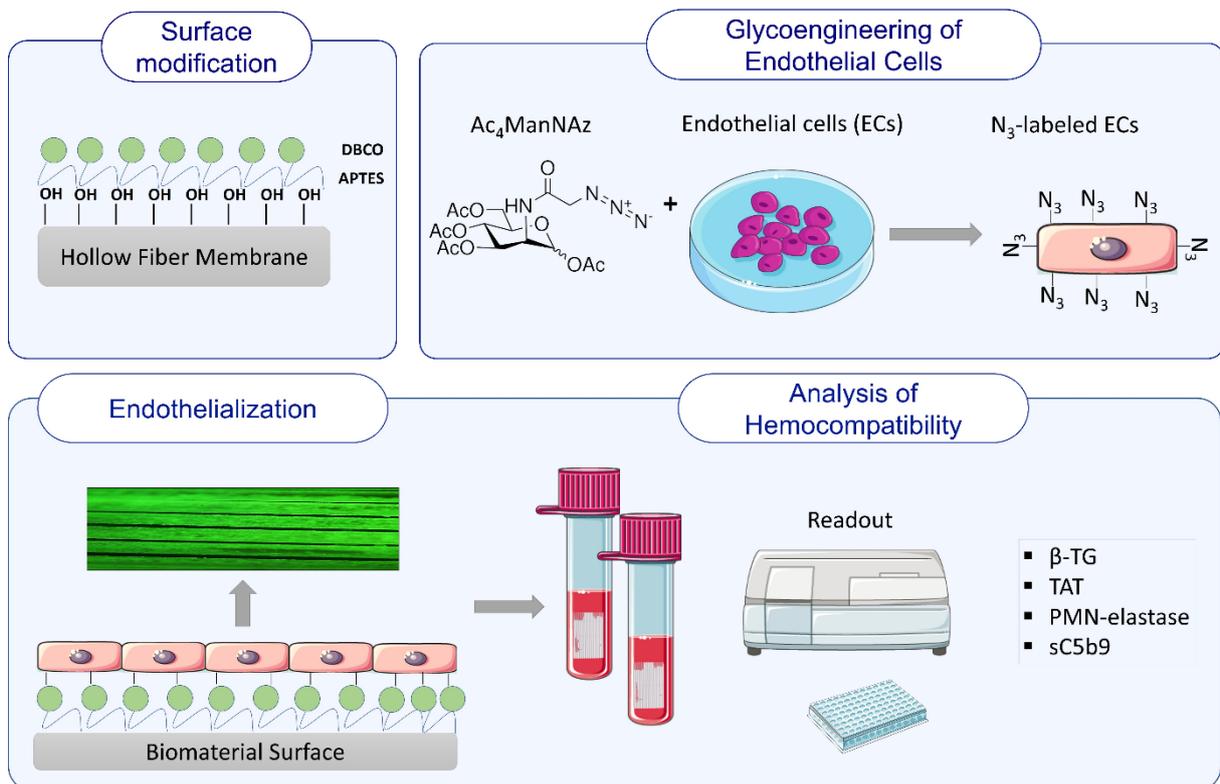


Abbildung 6: Grafische Zusammenfassung: Entwicklung einer biokompatiblen Beschichtung zur Verbesserung der Hämokompatibilität von Hohlfasermembranen. PMP-Membranen wurden zunächst mit Sauerstoffplasma behandelt, um Hydroxylgruppen und anschließend durch Inkubation mit APTES Aminogruppen zu generieren. Zuletzt wurde das DBCO an die Aminogruppen konjugiert. ECs wurden mit Ac₄ManNAz inkubiert, um Azidgruppen (N₃) an der Zelloberfläche zu generieren. Die metabolisch veränderten ECs wurden mit den modifizierten HFMs inkubiert, wodurch sich durch kupfer-freie Klick-Chemie eine konfluente Endothelzellschicht ergab. Die modifizierten und endothelialisierten HFMs wurden mit humanem Vollblut inkubiert und die Hämokompatibilität im Vergleich zu unmodifizierten HFMs untersucht. Analysiert wurden unter anderem Parameter wie β-TG, TAT, PMN-Elastase und sC5b9, als Marker für die Aktivierung der Gerinnung, der Thrombozyten, des Immunsystems wie auch des Komplementsystems. Abkürzungen: Ac₄ManNAz: Tetraacetyliertes N-

Ergebnisse

Azidoacetyl-Mannosamin, β -TG: Beta-Thromboglobulin, TAT: Thrombin-Antithrombin Komplex, PMN-Elastase: Polymorphonuklear-Elastase, sC5b9: Löslicher terminaler Komplement-Komplex.

4 Diskussion

4.1 Homing von mRNA-modifizierten endothelialen Progenitorzellen zum entzündeten Endothel

Herz-Kreislaufkrankungen stellen bis heute eine der häufigsten Todesursachen weltweit dar, in denen sich unter anderem ischämische Erkrankungen wie der Myokardinfarkt mit fast 46 % manifestieren [221, 222]. Der Myokardinfarkt führt hierbei zu zahlreichen Komplikationen, angefangen von der Myokardnekrose bis hin zur Schädigung des gesamten Herzmuskels, welcher eine nur sehr geringe Regenerationsfähigkeit aufweist [223] und nicht selten zum Tod des Patienten führt. Trotz des medizinischen Fortschritts in der Behandlung ischämischer Erkrankungen, darunter dem Myokardinfarkt, bestehen immer noch erhebliche Einschränkungen in der Therapie der Patienten. Die Entwicklung neuer technischer Methoden wie der DNA- oder mRNA-basierten Therapie und dem Einsatz rekombinanter Proteine hat die klinische Umsetzung und Anwendbarkeit deutlich beschleunigt [73]. Unterschiedliche Faktoren wie das Remodelling des Herzgewebes, dessen Entzündungsgeschehen und das daraus resultierende fibrotische Milieu, beeinträchtigen hierbei das proliferative Potential der Herzmuskelzellen [3]. Unter der Gruppe von unspezialisierten Zellen weisen Stammzellen die Fähigkeit auf, sich ständig zu erneuern und in unterschiedlichste Zelltypen ihrer Nische zu differenzieren [224]. Hierbei sind Stammzellen an der Reparatur des Herzmuskelgewebes durch die direkte Differenzierung in Herzmuskelzellen oder ECs beteiligt und sezernieren parakrine Faktoren, die sowohl die Angiogenese und Selbstreparatur fördern, als auch entzündliche Immunreaktionen hemmen können [225].

Eine vielversprechende Strategie zur Verbesserung der Revaskularisierung und Regeneration von ischämischem Gewebe stellt der kombinierte Ansatz der Zelltherapie mit synthetisch modifizierten mRNAs dar. In der vorliegenden Arbeit konnte die effiziente Modifikation von EPCs mit synthetischen mRNAs zur Expression von CXCR4 und PSGL-1 auf der Zelloberfläche gezeigt werden und somit ihr Homing-Potenzial zum entzündeten Endothel zu erhöhen. Die mRNA-Modifikation ermöglichte es den EPCs zudem, effizienter und zielgerichtet zum aktivierten Endothel zu wandern und sich dort anzuhafte. Diese Erkenntnisse resultieren somit in einer vielversprechenden Strategie zur Behandlung und Regeneration von ischämischem Gewebe. EPCs spielen

Diskussion

durch ihr vaskulogenes- und angiogenes Potential eine wesentliche Rolle bei der post-natalen Gefäßreparatur- und Umstrukturierung und stellen daher eine vielversprechende therapeutische Option für vaskuläre Erkrankungen dar [226]. Ihre Mobilisierung aus dem Knochenmark und ihre effiziente Ansiedlung in ischämische Gebiete ist daher entscheidend für eine erfolgreiche Gewebsregeneration und der Begrenzung von Gewebsschäden. Sowohl der Einfluss der Gewebsschädigung als auch endogener Stimulus als auch die exogene Verabreichung von Zytokinen (z. B. Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor, GM-CSF) als Einflussfaktoren zur Mobilisierung von EPCs wurden bereits untersucht [227]. Dabei führte die Induktion einer lokalen Ischämie in Kaninchen- und Mausmodellen zu einer erhöhten Anwesenheit von zirkulierenden EPCs [227]. Bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt (AMI) oder koronarer Herzkrankheit (KHK), wurden vermehrt erhöhte Mengen von EPCs mobilisiert und im Blutkreislauf nachgewiesen, welche nahezu doppelt so hoch waren wie bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit [26, 228]. Neben der hohen Anzahl an rekrutierten EPCs konnten hohe VEGF-Spiegel nachgewiesen werden, die mit den EPC-Spiegeln der Patienten korrelierten [229, 230].

Die Ansiedlung von EPCs wird hauptsächlich durch verschiedene Zytokine und Chemokine vermittelt. VEGF fördert nachweislich die Mobilisierung und trägt maßgeblich zur Neovaskularisierung bei [32, 33, 231]. Andere Wachstumsfaktoren oder Chemokine, wie Angiopoietin-1 (ANG-1) oder SDF-1, haben ebenfalls gezeigt, dass sie die Rekrutierung von EPCs stimulieren können [231, 232]. Vergangene Studien konnten zeigen, dass die Funktionalität von EPCs, die von Patienten mit KHK stammen, beeinträchtigt ist [233, 234]. Dies wurde auf eine unzureichende Fähigkeit zur Ansiedlung der EPCs in den ischämischen Regionen, selbst nach der Mobilisierung aus dem Knochenmark zurückgeführt. Des Weiteren spielen auch das Alter [235], Vorerkrankungen wie Diabetes mellitus [236] und Risikofaktoren wie Rauchen [237] oder ungesunde Lebensweise eine entscheidende Rolle, welche die Funktionalität von EPCs beeinträchtigen können. Um diese Einschränkungen zu überwinden und die Angiogenese zu verbessern, wurde das betroffene Zielgewebe oder die EPCs selbst vorbehandelt. Dies wurde zum Beispiel mit viralen Vektoren, die für VEGF-A [238, 239] oder HIF-1 [240] kodieren umgesetzt. In einer anderen Studie wurde SDF-1-kodierende Plasmid-DNA eingesetzt, um das vaskuläre Endothel zu transfizieren und durch die Expression von SDF-1, injizierte EPCs zum Gewebe zu rekrutieren [241]. SDF-1 wird physiologischer Weise aus dem ischämischen Gewebe freigesetzt und trägt durch seine

Diskussion

Interaktion mit CXCR4 auf der Oberfläche von EPCs, zur Ansiedlung von EPCs bei [232]. So konnte in *in vivo* Studien eine induzierte EPC-Mobilisierung, wie auch eine verstärkte Angiogenese beobachtet werden, nachdem SDF-1-kodierende Plasmide in ischämische Hintergliedmaßen von Mäusen [242] oder in das ischämische Myokard von Ratten [243] injiziert wurde. Obwohl der gezielte Einsatz von Zytokinen zur Behandlung von Ischämien wirkungsvoll ist, kann es aufgrund der permanenten Expression von Angiogenese-induzierenden Faktoren zu erheblichen Nebenwirkungen wie unter anderem, Neoplasien kommen. Ein vielversprechender Ansatz zur Umgehung der potenziellen Nebenwirkungen einer kontinuierlichen exogenen Proteinexpression, ist die Verwendung synthetischer mRNA, die zur transienten Proteinexpression führt. In einer Studie von Steinle et al. wurden beispielsweise synthetische mRNAs, die für die angiogenen Faktoren ANG-1, SDF-1 und VEGFA kodieren zur Modifizierung von EPCs verwendet [41]. Neben erfolgreicher Expression der angiogenen Faktoren, zeigten diese mRNA-transfizierten EPCs eine erhöhte chemotaktische Aktivität, wie auch ein erhöhtes Wundheilungspotential im Vergleich zu untransfizierten EPCs. Interessanterweise zeigten insbesondere ANG-1 mRNA-modifizierte EPCs in einem Chorioallantoismembranen (CAM)-Assay in Hühnereiern ein starkes angiogenes Potential, welches sich durch eine erhöhte Gefäßdichte auszeichnete. In der vorliegenden Arbeit führte die Transfektion von EPCs mit synthetischen mRNAs, die für CXCR4 oder PSGL-1 kodieren, zu einer erhöhten Expression des CXCR4-Homing-Faktors und des PSGL-1 Adhäsionsmoleküls nach nur einmaliger und kombinierter Applikation der mRNAs, ohne dass negative Auswirkungen auf die Viabilität der Zellen festzustellen waren.

Da SDF-1 an den CXCR4-Chemokinrezeptor bindet, kann das Homing zum geschädigten Gewebe gefördert werden [42, 43]. Durch die Transfektion der EPCs mit CXCR4-mRNA oder einer Kombination aus beiden mRNAs, konnte eine signifikant höhere Migration im Vergleich zu nativen EPCs beobachtet werden, was die Bedeutung von CXCR4 für den Homing-Prozess belegt. Darüber hinaus wurde durch Einzelzell-Atomic Force-Mikroskopie (AFM) eine signifikant stärkere Anheftung der mRNA-modifizierten EPCs am entzündeten Endothel nachgewiesen, was zu höheren Kräften führte, die für die Ablösung der EPCs vom TNF α -aktivierten und nicht aktivierten Endothel erforderlich waren. Die Aktivierung des Endothels mit TNF α führte zu einer erhöhten Expression von E-Selektin. Dadurch kam es zu einer stärkeren Bindung

Diskussion

der mRNA-modifizierten EPCs an das aktivierte Endothel im Vergleich zum nicht aktivierten Endothel. Des Weiteren wurde ein dynamischer Adhäsionstest verwendet, um die Ansiedlung und Anhaftung zirkulierender EPCs an entzündetes oder verletztes Gefäßendothel *in vitro* zu simulieren. EPCs, die mit dem mRNA-Cocktail transfiziert wurden, hafteten und akkumulierten stärker an TNF α -aktiviertem Endothel als an nicht aktiviertem Endothel. Zusätzlich zu den oben genannten Beobachtungen wurden keine weiteren Unterschiede zwischen mRNA-modifizierten und unmodifizierten EPCs auf nicht aktiviertem Endothel gemessen. Dies deutet darauf hin, dass sich modifizierte EPCs nur am verletzten und entzündeten Endothel effizient ansiedeln. Die mit mRNA modifizierten EPCs zeigten auf aktiviertem Endothel eine verstärkte Bindung im Vergleich zu unmodifizierten EPCs.

Neben den Chemokinen, die die Zellen zu den verletzten Stellen im Gewebe leiten, spielen die Adhäsionsmoleküle und ihre Liganden eine entscheidende Rolle bei der Bindung der mobilisierten EPCs an das verletzte Endothel. EPCs exprimieren β 2-Integrine, die mit ihrem Hauptliganden, dem interzellulären Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1), auf der Oberfläche des verletzten Endothels interagieren können [244]. In mehreren Studien konnte so gezeigt werden, dass eine erhöhte ICAM-1-Expression im ischämischen Muskelgewebe zu einer verstärkten Rekrutierung von EPCs und einer erhöhten Angiogenese führt und somit die Reparatur von geschädigtem Gewebe fördert [245, 246]. Diese Studien haben gezeigt, dass die Stimulierung der Expression von Molekülen, die an der Bindung von EPCs an das entzündete Endothel beteiligt sind, die Bindung erhöhen und damit das Homing der EPCs an den gewünschten Stellen verbessern kann. Die in dieser Arbeit durchgeführte Transfektion von EPCs mit CXCR4- und PSGL-1-mRNA, erhöhte die Adhäsionskräfte und das Homing zum aktivierten Endothel im dynamischen Adhäsionstest und bestätigte damit die Wirksamkeit dieser Strategie. Die verstärkte Bindung von EPCs an E-Selektin und P-Selektin als Folge einer erhöhten PSGL-1-Expression wurde auch von Foubert und Kollegen nach der Aktivierung von EphB4 mit einem chimären Ephrin-B2-Fc-Protein nachgewiesen [247]. Wie bereits frühere Studien zeigen konnten, ist die Anzahl, sowie die Funktion und das Überleben von EPCs bei älteren Menschen beeinträchtigt [248, 249]. Aufgrund der eingeschränkten Funktionalität und Anheftung der EPCs kann die klinische Anwendung von EPCs in der kardiovaskulären Zelltherapie bei älteren Patienten auf einige Hindernisse stoßen [250]. Um die Funktion und Regenerierungskapazität der EPCs zu

Diskussion

verbessern, können sie mit Wachstumsfaktoren wie dem Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) [251], insulinähnlichem Wachstumsfaktor (IGF-1) [235] oder knochenmorphogenetischem Protein 4 (BMP4) behandelt werden [252]. Li und Kollegen zeigten außerdem, dass die Transfektion von EPCs mit Micro-RNAs (miR326-5p), die angiogene Kapazität von EPCs signifikant erhöht [253]. Die Transplantation von miR-326-5p-überexprimierenden EPCs verbesserte die Herzfunktion in einem akuten Myokardinfarkt-Modell in Mäusen. In einer kürzlich durchgeführten Studie von Huang und Kollegen, führte die Behandlung von EPCs mit Exosomen aus von SIRT1-überexprimierenden adipösen Stammzellen (ADSCs) [254] zu einer erhöhten Expression von C-X-C-Motiv-Chemokin 12 (CXCL12) und Nuclear Factor E2-Related Factor 2 (Nrf2) in EPCs von Patienten mit akutem Myokardinfarkt und verbesserte dadurch die Funktion dieser EPCs.

In einer anderen Studie wiesen Masuda und Kollegen nach, dass die Verwendung eines neuen Kulturmediums, des sogenannten Qualitäts- und Quantitätskulturmediums (QQ-Kulturmedium) für periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) die Vaskulogenese und Angiogenesefunktionen von mononukleären Zellen (MNCs) gesunder Probanden verbessern kann [255]. In der Folge wurde auch gezeigt, dass dieses Medium das vaskulogene Potenzial von CD34⁺-Zellen aus diabetischem humanem peripherem Blut im Vergleich zu unbehandelten Zellen erhöht [256]. In einer neueren Studie untersuchten Chruewkamlow und Kollegen dieses Kulturmedium, um den Einfluss auf die Funktionalität von PBMCs aus Patienten mit chronischer Ischämie der Gliedmaßen (CLTI) zu analysieren [257]. Die Kultivierung von MNCs in QQ-Kulturmedium zeigte auch, dass der Anteil der CD34⁺/CD133⁺ EPCs entzündungshemmenden Zellpopulation erhöht wurde und im Vergleich zu MNCs, die in Standardkulturmedium kultiviert wurden, zu einer verbesserten Angiogenese führte. Diese verbesserten Kulturbedingungen könnten in Kombination mit einer mRNA-Modifikation verwendet werden, um die Anzahl der EPCs in der Kultur zu erhöhen und funktionelle Defizite der EPCs im klinischen Einsatz zu kompensieren. Darüber hinaus könnte die mRNA-Modifikation von EPCs vor einer Transplantation die Wirksamkeit von EPC-basierten Therapien deutlich verbessern, indem es ihre Ansiedlung an den gewünschten ischämischen Geweben fördert. Die in dieser Studie angewandte und auf synthetischer mRNA basierende Strategie der Zellmodifikation, erfordert jedoch die Isolierung und Kultivierung von EPCs aus Patienten, die sehr zeitaufwändig sein kann und eine akute Therapie somit verzögern würde. Darüber hinaus ist die Menge

an zirkulierenden EPCs im peripheren Blut von Patienten sehr gering, weshalb diese mit Zytokinen wie dem G-CSF behandelt werden müssten, um die Zahl der EPCs im Blut zu erhöhen. Die CD34⁺/CD133⁺ positiven Zellen können direkt aus dem Knochenmark, dem Fettgewebe oder peripherem Blut von Patienten durch Verwendung von magnetischen Beads und der Durchflusszytometrie isoliert werden, um eine konzentriertere Menge an EPCs zu erhalten. Diese angereicherten EPCs können im Anschluss direkt mit synthetischer mRNA transfiziert und in den Patienten zurück appliziert werden. Die Verwendung synthetischer mRNAs, die für Adhäsionsmoleküle und ihre Liganden, wie CXCR4 und PSGL-1 kodieren, stellt eine neue Methode dar, um die Ansiedlung und Adhäsion von EPCs in das ischämische Gewebe zu erhöhen und um die niedrige Retentionsraten nach der Transplantation zu umgehen. Da die exogen zugeführte mRNA nur eine transiente Proteinexpression induziert, besteht kein Risiko einer genomischen Integration und potenzielle Nebenwirkungen können somit reduziert werden, was somit eine wirksame Behandlung von Patienten mit ischämischen Herz-Kreislauf-Erkrankungen darstellen würde.

In dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass die Modifikation von EPCs mit synthetischer mRNA, die für CXCR4 und PSGL-1 kodieren, das Homing und die Adhäsion am entzündeten Endothel verbessert. Die erfolgreiche Translation der mRNA, wurde nach Transfektion der Zellen nachgewiesen und die verbesserte Migrations- und Adhäsionsfähigkeit der mRNA-modifizierten EPCs gezeigt. Diese Technik stellt einen innovativen Ansatz zur Expression von Rezeptoren auf unterschiedlichsten Zellen dar, um ihr Homing-Potenzial in das ischämische Areal zu verbessern und Erkrankungen wie dem Myokardinfarkt, Insulte oder periphere arterielle Verschlusskrankungen durch Verbesserung der Vaskularisierung zu therapieren.

4.2 Verbesserung der Hämokompatibilität künstlicher Lungen durch Klick-Konjugation von metabolisch modifizierten Endothelzellen an blutkontaktierende Oberflächen.

Künstliche Lungen und die extrakorporale Membranoxygenierung gelten seit langem als Standardmethode in der Behandlung von fortgeschrittenem Herzkreislauf- und Lungenversagen [258]. Extrakorporale Lebenserhaltungssystem (ECLS), wie sie bei

Diskussion

offenen Herzeingriffen als kardio-pulmonaler Bypass eingesetzt werden, unterstützen das Herz-Kreislaufsystem sowohl bei operativen Eingriffen als auch bei der Behandlung von schweren Lungenerkrankungen auf Intensivstationen. Ein wesentlicher Bestandteil bei ECLS-Systemen ist der Membranoxygenator an sich. Bereits während der letzten Influenza Epidemie stieg der Einsatz an ECMOs ebenso stark an wie bei der 2019 ausgebrochenen Coronapandemie und ermöglichte eine regenerierende Therapie der Patienten, durch Unterstützung des Kreislaufsystems [259-261]. Künstliche Lungen können unter anderem zur Überbrückung bis zur erforderlichen Lungentransplantation oder als Assistenzsystem, bis zur Erholung der Lunge eingesetzt werden, um das Überleben von Patienten mit fortgeschrittenem Lungenversagen zu ermöglichen [259]. Darüber hinaus erwies sich während der Coronapandemie, die ECMO als überaus nützliche Therapie bei Patienten mit akutem Atemnot-Syndrom (ARDS) und Lungenversagen [262].

Die ersten Oxygenatoren wurden aus Polypropylen hergestellt mit einer mikroporösen Oberfläche. Diese eigneten sich nur für den kurzzeitigen Einsatz, da die poröse Struktur dieser Membranen nach wenigen Stunden zum Plasmaaustritt führte. Dabei trat das Plasma durch die Poren in das Innere der Membranen und verhinderte den weiteren Gasaustausch. Dies geschieht vor allem durch die Adsorption von Plasmaproteinen auf der Membranoberfläche. Die auftretende Plasmaadsorption führt des Weiteren zur Aktivierung des Immun- und Komplementsystems, wie auch zur Induktion der Gerinnungskaskade. Die Weiterentwicklung zu Polymethylpenten Membranen (PMP) konnte den Einsatz durch Veränderung der Porosität bei einem geringen Verlust der Oxygenierungseffizienz verlängern, da der Plasmaaustritt, in das Innere der Membranen, verhindert wurde. Der größte Nachteil bei bislang eingesetzten Oxygenatoren besteht allerdings nicht in der Leistungsfähigkeit der Permeabilität der verbauten HFMs, sondern in der schlechten Hämokompatibilität der für den Sauerstoff- und Kohlendioxidaustausch verwendeten Hohlfasermembranen mit dem Risiko der Thrombusbildung und Adsorption von Blutbestandteilen [263]. Dadurch ist ihr langfristiger Einsatz auf wenige Tage bis zu einigen wenigen Wochen begrenzt [191].

Der Kontakt von Blut mit künstlichen Oberflächen kann unterschiedliche aktivierende Mechanismen in Gang setzen. Die Adsorption von Plasmaproteinen, sowie die Adhäsion von Zellen (Thrombozyten und Leukozyten) führt zur Aktivierung der Gerinnung,

Diskussion

wobei die Kontaktaktivierung zur Thrombinbildung und letztendlich zu Komplementaktivierung führt [217]. Um eine sichere Anwendung von blutkontaktierenden Materialien sicherzustellen, müssen unerwünschte Nebenwirkungen wie Thrombenbildung oder die Aktivierung der Gerinnungs- und Komplementkaskade vermieden werden. Bei der Vermeidung dieser Nebenwirkungen spielt die Oberflächenmodifikation durch chemische oder physikalische Funktionalisierung der Biomaterialien, eine entscheidende Rolle. Aus diesem Grund wurden in den vergangenen Jahren mehrere Methoden zur Herstellung einer hämokompatiblen Oberfläche entwickelt. Diese konzentrierten sich vor allem auf die Reduzierung der Proteinadsorption und Adhäsion von Zellen, sowie auf der Hemmung der Gerinnung und Thrombozytenaktivierung zu denen passive und aktive Methoden zählen, um die Wechselwirkungen zwischen Blut und Material zu verbessern [264].

Biopassive Modifikationen wie zwitterionische Polymere (z. B. Sulfobetain (SB)-co-Methacrylsäure (MA)-Blockcopolymer (SBMAb-COOH) [265] oder SB-Blockcopolymere mit niedrigem Molekulargewicht und N-Hydroxysuccinimid ester (SBNHS) oder Siloxangruppen (SBNHSi) [266], nichtionische Polymer Bürsten (z. B. Poly-N-(2-hydroxypropyl)methacrylamid (HPMA)) [148], flüssige Perfluorkohlenstoffe (TLP) [267] oder Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholin (MPC) [268] zielen hierbei auf die Modifikation der Oberflächenchemie und Morphologie ab. Bioaktive Methoden, wie Stickstoffmonoxid (NO) freisetzende Beschichtungen [269] oder C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH)-Beschichtungen [270] zielen hingegen auf die Eigenschaften des Endothels ab, welche direkt in biochemische Prozesse wie der Gerinnung eingreifen. Trotz dieser Fortschritte ist die optimale Oberfläche blutkontaktierender Materialien immer noch das native Endothel. Daher wurden verschiedene Fängermoleküle und Strategien angewandt, um Implantate mit Blutkontakt zu endothelialisieren [47, 271]. Bislang wurden HFM mit Heparin/Albumin [272], cRGD [273], Titandioxid [274] oder Fibronectin [275-277] beschichtet, um die Endothelialisierung zu fördern. Allerdings kann die Beschichtung mit subendothelialen extrazellulären Matrixbestandteilen, wie dem Fibronectin, zu einer unspezifischen Adhäsion unerwünschter Zellen führen. Des Weiteren kann es in Bereichen, die nicht endothelialisiert wurden, zur Adhäsion von Thrombozyten kommen, die als Folge aktiviert werden und es zur Ausbildung von Thromben kommt. Auch die Verwendung von cRGD zur Bindung von ECs an die Oberfläche ist unspezifisch. Mehrere Zellen, darunter auch Thrombozyten, haben cRGD-bindende Integrine auf

Diskussion

ihrer Oberfläche, was zu einer unspezifischen Adhäsion von Zellen an der blutberührenden Oberfläche führen kann. Um eine effiziente Endothelialisierung der HFM von künstlichen Lungen zu ermöglichen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine neue Strategie zur Endothelialisierung blutkontaktierender Oberflächen mit ECs entwickelt, bei der N₃-markierte ECs über kupferfreie Klick-Chemie an die DBCO-funktionalisierte HFM-Oberfläche kovalent konjugiert wurden. Durch 48-stündige Inkubation der ECs mit Ac₄ManNAz im Zellkulturmedium, wurden diese metabolisch so verändert, dass diese hocheffiziente Azidgruppen an der Zelloberfläche exprimierten, ohne dabei die Zellviabilität negativ zu beeinflussen. Der Prozess des Ac₄ManNAz-Einbaus in die Zelloberfläche, wurde von Wang et al. [31] beschrieben und umfasst zunächst nach Eintritt in die Zelle die Hydrolyse durch unspezifische Esterasen. Im nächsten Schritt findet die Phosphorylierung von C₆-OH und die Isomerisierung von der zyklischen zur offenkettigen Struktur statt. Im Anschluss wird das offenkettige Acetyl-Azidomannosamin einer Aldol-Reaktion mit intrazellulärer Phosphoenolbrenztraubensäure zugeführt. Nach Umlagerungs- und Dephosphorylierungsreaktionen wird Azidosialinsäure gebildet, die dann an ein Glykoprotein konjugiert und auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Neben Ac₄ManNAz können auch andere azidfunktionalisierte Monosaccharide, wie Ac₄GlcNAz oder Ac₄GalNAz zur Funktionalisierung der Oberfläche von ECs mit Azidgruppen verwendet werden. Die Oberfläche von HFMs wurde nach der Behandlung mit O₂-Plasma und APTES effizient mit DBCO-Molekülen funktionalisiert. Um den Erhalt der Oberflächenstruktur nach der Modifikation zu untersuchen, wurden die HFMs mit toluidinblauhaltiger Lösung für 3 h unter einem Druck von 250 mmHg inkubiert, wonach keine Leckagen und damit keine negative Beeinträchtigung der Membranen beobachtet werden konnte. Die metabolisch modifizierten ECs wurden im Anschluss mittels SPAAC kovalent an die DBCO-funktionalisierte HFM-Oberfläche konjugiert. Die SPAAC-Reaktion, die erstmals von Bertozzi und Kollegen [168] entwickelt wurde, ermöglicht kupferfreie Klick-Reaktionen in lebenden Zellen und verhindert dadurch die kupferinduzierte Zytotoxizität. Im Vergleich zu unmodifizierten HFMs, zeigten metabolisch veränderte Zellen eine deutlich verbesserte Anheftung und Endothelialisierung nach 48-stündiger Inkubation. Die ECs bildeten eine konfluente Zellschicht mit Zell-Zell-Kontakten aus, was durch Färbung der Zellen mit einem anti-VE-Cadherin-Antikörper nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus zeigte die Endothelzellschicht eine physiologische Aktivität und reagierte auf einen entzündlichen Stimulus durch das

Diskussion

Zytokin TNF- α , was zu einer erhöhten Expression von Adhäsionsfördernden Molekülen (E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1) führte.

In dieser Studie wurde frisches humanes Vollblut verwendet, um die Hämokompatibilität der HFMs nach den Leitlinien der ISO 10993-4 zu bewerten. Diese Untersuchung ermöglicht es, komplexe Informationen über den Aktivierungsstatus von humanem Blut zu erhalten, indem gleichzeitig die Aktivierung von Gerinnung, Blutplättchen, Komplementsystem und Entzündung untersucht wird. Die dynamische Inkubation mit unbeschichteten, DBCO-funktionalisierten und endothelialisierten HFMs wurde für 90 Minuten durchgeführt. Die Hämokompatibilität von DBCO-beschichteten HFMs war ähnlich gering, wie die der unbeschichteten HFMs, wobei endothelialisierte HFMs die Aktivierung der Gerinnung (TAT-Spiegel) und Thrombozyten (β -TG-Spiegel) im Vergleich zu unmodifizierten Membranen signifikant senken konnten. Darüber hinaus zeigten SEM-Analysen geringere Mengen von Fibrinbildung auf endothelialisierten HFMs im Vergleich zu unmodifizierten HFM-Membranen. Dies deutet eindeutig auf die Wichtigkeit der Endothelschicht bei der Verhinderung der Thrombusbildung hin. Die Analyse von aktivierten Blutplättchen durch CD62P (P-Selektin)-Expression, wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt und zeigte eine signifikant geringere Anzahl aktivierter Thrombozyten in Blutproben, die mit endothelialisierten HFMs inkubiert wurden, was somit die anti-thrombogene Eigenschaft der ECs deutlich aufzeigt. ECs können die Hämostase steuern, indem sie die Expression von anti-thrombogenen und entzündungshemmenden Molekülen aktiv regulieren [278]. Interessanterweise zeigten die mit humanem Vollblut endothelialisierten HFMs eine weitere Reduktion der E-Selektin und VCAM-1-Expression, verglichen zu endothelialisierten HFMs im Zellkulturmedium. Durch die Inkubation der endothelialisierten HFMs mit humanem Vollblut konnte eine in vivo-ähnliche Umgebung nachgestellt werden, in der die ECs einen signifikant niedrigeren Aktivierungsstatus aufwiesen als Zellen, die in Zellkulturmedium inkubiert wurden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die ausgesäten ECs ihre anti-thrombogenen und anti-inflammatorischen Eigenschaften beibehalten und die Hämokompatibilität der künstlichen Oberfläche deutlich verbessert haben. Diese Eigenschaften könnten die Verwendbarkeit der künstlichen Lungen bei Patienten verlängern könnte. Die Klick-Reaktion führt zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen den Azidgruppen auf den ECs und dem DBCO auf der Materialoberfläche.

Diskussion

Dies deutet auf eine stabile Bindung der ECs hin. Allerdings sollte die Stabilität der Endothelschicht in weiteren Studien, auch unter Flussbedingungen untersucht werden, um dies zu bestätigen. Darüber hinaus ist ein ausreichender Gasaustausch ein wichtiger Leistungsindikator der künstlichen Lungen. Studien von Klein et al. untersuchten die Langzeitstabilität und die Gasaustauschleistung von endothelialisierten, RGD-konjugierten PDMS-Membranen in einem Modellsystem [34] und konnten nachweisen, dass die Endothelzellschicht unter physiologischem Druck von 0,5 Pa für bis zu 33 Tage vorhanden war und nur eine geringe, aber nicht signifikante Abnahme der Gasübertragungsraten über längere Kulturzeiten (19 und 33 Tage) beobachtet werden konnte. In dieser Studie wurde deutlich gezeigt, wie wichtig es ist, den Gastransfer nach der Endothelialisierung der Oberflächen unter Langzeitkulturen zu testen. Des Weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit humane Nabelvenen-Endothelzellen (HUVECs) für die Endothelialisierung von HFMs verwendet. Diese Zellen sind meist allogenen Ursprungs und können daher Abstoßungsreaktionen hervorrufen. Ein weiteres Ziel ist daher die Erzeugung autologer ECs aus patientenspezifischen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs), welche Abstoßungsreaktionen verhindern und somit die künstlichen Lungen einen großen Schritt in Richtung klinischer Langzeitanwendung führen können. Ein weiterer Vorteil von iPSCs ist ihre unbegrenzte Fähigkeit zur Vermehrung. Dass dieses Konzept funktioniert und ECs aus iPSCs an HFMs angebracht werden können, konnte durch Pflaum et al. prinzipiell gezeigt werden [276]. Allerdings wurden hier die ECs mittels Fibronectin an die Oberfläche der HFMs angebracht was ein Risiko der Thrombozytenadhäsion und Aktivierung birgt. Auch fehlten in vielen Studien die Untersuchungen der Hämokompatibilität unter in vivo Bedingungen. Zusätzlich muss in weiteren Studien untersucht werden, wie lange es dauert, um ausreichende Mengen an ECs zu generieren, aber auch wie lange es dauert, um Oxygenatoren effizient zu endothelialisieren, da schwerkranke Patienten eine nur limitierte Zeit haben. Durch Differenzierung von iPSCs in ECs [279, 280] und der Anwendung der in dieser Studie entwickelten Methode könnten große Oberflächen, wie die von Oxygenatoren endothelialisiert werden. Allerdings gilt es auch bei dieser Methode zu prüfen, wie zeitintensiv die vollständige Modifikation und Endothelialisierung der Oxygenatoren ist, bis diese erfolgreich zum Einsatz kommen kann. Bislang wurden alle auf dem Gebiet der ECLS-Modifikation durchgeführten Studien in kleinem Labormaßstab durchgeführt, was viele positive

Diskussion

Strategien zur Oberflächenmodifikation aufzeigte. Generell gilt es aber auch zu untersuchen, wie sich diese Modifikationen in vivo, vor allem in Großtiermodellen auszeichnen und die Hämokompatibilität auch wirklich verbessern und die Anwendung von ECMOs langfristig verlängern können.

5 Ausblick

Auf der Suche nach innovativen und wirksamen Behandlungen hat sich die Zelltherapie als innovativer Ansatz in der präklinischen Forschung herausgestellt. Bei der Zelltherapie werden Zellen verwendet, die häufig aus dem eigenen Körper des Patienten oder von kompatiblen Spendern stammen, um geschädigtes Gewebe zu reparieren, zu ersetzen oder zu regenerieren. Im Zusammenhang mit Herz-Kreislauf- und Lungenkrankheiten birgt die Zelltherapie in Kombination mit der Gentherapie ein enormes Potenzial für die Behandlung der zugrunde liegenden Pathologien und der Förderung der Gewebereparatur. Dieser Ansatz nutzt die einzigartigen regenerativen Fähigkeiten verschiedener Zelltypen, einschließlich Stammzellen, um die natürlichen Heilungsprozesse des Körpers zu verbessern.

Der Einsatz der mit synthetischer mRNA transfizierten murinen EPCs, die CXCR4 und dem PSGL-1 kodieren, konnte unter Laborbedingungen zeigen, dass die Homing- und Migrationseffizienz von EPCs zum entzündeten Endothel deutlich verbessert wurde, was zu der Annahme führt, dass eine Therapie ischämischer Erkrankungen mit Hilfe der mit mRNA-transfizierten EPCs möglich ist. Im nächsten Schritt muss der Behandlungserfolg in weiteren Tier-Modellen validiert werden, um so den Grundstein für den Übergang in die klinische Phase zu legen.

Nicht zuletzt hat uns die Corona Pandemie gezeigt, wie wichtig der Einsatz funktionaler effizienter ECMOs ist. Durch eine Beschichtung der HFMs mit ECs, konnte eine Verbesserung der Hämokompatibilität erzielt werden, die nach Validierung im *in vivo* Modell einen wichtigen Beitrag zum langfristigen Einsatz in Patienten, die auf eine künstliche Lunge angewiesen sind, ermöglicht. Einen Schritt in diese Richtung könnte der kombinierte Einsatz von mRNA-modifizierten ECs sein, die mittels der neuen und auf der kupferfreien Klick-Chemie beruhenden Methode auf die Membranen aufgebracht werden und zusätzlich anti-thrombogene Proteine exprimieren. Entscheidend ist jedoch, dass die hier entwickelte Methode weiterentwickelt wird, um ganze Oxygenatoren effizient mit Endothelzellen zu beschichten und diese in Großtiermodellen zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

1. Ralapanawa, U. and R. Sivakanesan, *Epidemiology and the Magnitude of Coronary Artery Disease and Acute Coronary Syndrome: A Narrative Review*. J Epidemiol Glob Health, 2021. **11**(2): p. 169-177.
2. Cohn, J.N., R. Ferrari, and N. Sharpe, *Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling*. J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(3): p. 569-82.
3. Prabhu, S.D. and N.G. Frangogiannis, *The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis*. Circ Res, 2016. **119**(1): p. 91-112.
4. Wu, X., et al., *Angiogenesis after acute myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2021. **117**(5): p. 1257-1273.
5. Talman, V. and H. Ruskoaho, *Cardiac fibrosis in myocardial infarction--from repair and remodeling to regeneration*. Cell Tissue Res, 2016. **365**(3): p. 563-81.
6. Konstam, M.A., et al., *Evaluation and Management of Right-Sided Heart Failure: A Scientific Statement From the American Heart Association*. Circulation, 2018. **137**(20): p. e578-e622.
7. Behfar, A., et al., *Cell therapy for cardiac repair--lessons from clinical trials*. Nat Rev Cardiol, 2014. **11**(4): p. 232-46.
8. Kostis, J.B., *The importance of managing hypertension and dyslipidemia to decrease cardiovascular disease*. Cardiovasc Drugs Ther, 2007. **21**(4): p. 297-309.
9. Serruys, P.W., et al., *Percutaneous coronary intervention versus coronary-artery bypass grafting for severe coronary artery disease*. N Engl J Med, 2009. **360**(10): p. 961-72.
10. Mason, D., et al., *Cardiac gene therapy: Recent advances and future directions*. J Control Release, 2015. **215**: p. 101-11.
11. Garcia, O., et al., *Amniotic fluid stem cells inhibit the progression of bleomycin-induced pulmonary fibrosis via CCL2 modulation in bronchoalveolar lavage*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e71679.
12. Mei, S.H., et al., *Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by mesenchymal stem cells overexpressing angiotensin 1*. PLoS Med, 2007. **4**(9): p. e269.
13. Xu, T., et al., *Mesenchymal stem cell-based therapy for radiation-induced lung injury*. Stem Cell Res Ther, 2018. **9**(1): p. 18.
14. Zhen, G., et al., *Mesenchymal stem cells transplantation protects against rat pulmonary emphysema*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 3415-22.

15. Zhen, G., et al., *Mesenchymal stem cell transplantation increases expression of vascular endothelial growth factor in papain-induced emphysematous lungs and inhibits apoptosis of lung cells*. *Cytotherapy*, 2010. **12**(5): p. 605-14.
16. Galipeau, J., et al., *International Society for Cellular Therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials*. *Cytotherapy*, 2016. **18**(2): p. 151-9.
17. Miteva, K., et al., *Mesenchymal Stromal Cells Modulate Monocytes Trafficking in Coxsackievirus B3-Induced Myocarditis*. *Stem Cells Transl Med*, 2017. **6**(4): p. 1249-1261.
18. Wang, X., et al., *Concomitant Retrograde Coronary Venous Infusion of Basic Fibroblast Growth Factor Enhances Engraftment and Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells for Cardiac Repair after Myocardial Infarction*. *Theranostics*, 2015. **5**(9): p. 995-1006.
19. Leventhal, J.R., et al., *Nonchimeric HLA-Identical Renal Transplant Tolerance: Regulatory Immunophenotypic/Genomic Biomarkers*. *Am J Transplant*, 2016. **16**(1): p. 221-34.
20. Sawitzki, B., et al., *Regulatory cell therapy in kidney transplantation (The ONE Study): a harmonised design and analysis of seven non-randomised, single-arm, phase 1/2A trials*. *Lancet*, 2020. **395**(10237): p. 1627-1639.
21. Zwang, N.A. and J.R. Leventhal, *Cell Therapy in Kidney Transplantation: Focus on Regulatory T Cells*. *J Am Soc Nephrol*, 2017. **28**(7): p. 1960-1972.
22. Vunjak-Novakovic, G., et al., *Bioengineering heart muscle: a paradigm for regenerative medicine*. *Annu Rev Biomed Eng*, 2011. **13**: p. 245-67.
23. Avci-Adali, M., et al., *New strategies for in vivo tissue engineering by mimicry of homing factors for self-endothelialisation of blood contacting materials*. *Biomaterials*, 2008. **29**(29): p. 3936-45.
24. Inoue, T., et al., *Mobilization of CD34-positive bone marrow-derived cells after coronary stent implantation: impact on restenosis*. *Circulation*, 2007. **115**(5): p. 553-61.
25. Losordo, D.W. and D.E. Vaughan, *Going mobile: enhanced recovery from myocardial infarction via stem cell mobilization and homing for tissue repair*. *J Am Coll Cardiol*, 2014. **63**(25 Pt A): p. 2873-4.
26. Massa, M., et al., *Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction*. *Blood*, 2005. **105**(1): p. 199-206.
27. Sobrino, T., et al., *The increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome*. *Stroke*, 2007. **38**(10): p. 2759-64.
28. Askari, A.T., et al., *Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy*. *Lancet*, 2003. **362**(9385): p. 697-703.
29. Ceradini, D.J., et al., *Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1*. *Nat Med*, 2004. **10**(8): p. 858-64.

Literaturverzeichnis

30. Li, J.H., et al., *Role of Stromal Cell-Derived Factor-1 in Endothelial Progenitor Cell-Mediated Vascular Repair and Regeneration*. Tissue Eng Regen Med, 2021. **18**(5): p. 747-758.
31. Orlic, D., et al., *Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(18): p. 10344-9.
32. Asahara, T., et al., *VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells*. Embo j, 1999. **18**(14): p. 3964-72.
33. Asahara, T., et al., *Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization*. Circ Res, 1999. **85**(3): p. 221-8.
34. Brunt, K.R., et al., *Ex vivo Akt/HO-1 gene therapy to human endothelial progenitor cells enhances myocardial infarction recovery*. Cell Transplant, 2012. **21**(7): p. 1443-61.
35. Deutsch, M.A., et al., *Cardioprotective Potential of Human Endothelial-Colony Forming Cells from Diabetic and Nondiabetic Donors*. Cells, 2020. **9**(3).
36. Sun, R., et al., *Targeted trapping of endogenous endothelial progenitor cells for myocardial ischemic injury repair through neutrophil-mediated SPIO nanoparticle-conjugated CD34 antibody delivery and imaging*. Acta Biomater, 2022. **146**: p. 421-433.
37. Langer, H., et al., *Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro*. Circ Res, 2006. **98**(2): p. e2-10.
38. Chavakis, E. and S. Dimmeler, *Homing of progenitor cells to ischemic tissues*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(4): p. 967-80.
39. de la Puente, P., et al., *Cell trafficking of endothelial progenitor cells in tumor progression*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(13): p. 3360-8.
40. Chavakis, E., C. Urbich, and S. Dimmeler, *Homing and engraftment of progenitor cells: a prerequisite for cell therapy*. J Mol Cell Cardiol, 2008. **45**(4): p. 514-22.
41. Steinle, H., et al., *Improving the Angiogenic Potential of EPCs via Engineering with Synthetic Modified mRNAs*. Mol Ther Nucleic Acids, 2018. **13**: p. 387-398.
42. Hoenig, M.R., C. Bianchi, and F.W. Sellke, *Hypoxia inducible factor-1 alpha, endothelial progenitor cells, monocytes, cardiovascular risk, wound healing, cobalt and hydralazine: a unifying hypothesis*. Curr Drug Targets, 2008. **9**(5): p. 422-35.
43. Kawakami, Y., et al., *SDF-1/CXCR4 axis in Tie2-lineage cells including endothelial progenitor cells contributes to bone fracture healing*. J Bone Miner Res, 2015. **30**(1): p. 95-105.
44. Lo Celso, C., et al., *Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche*. Nature, 2009. **457**(7225): p. 92-6.

45. Liu, Z.J., et al., *Identification of E-selectin as a novel target for the regulation of postnatal neovascularization: implications for diabetic wound healing*. *Ann Surg*, 2010. **252**(4): p. 625-34.
46. Oh, I.Y., et al., *Involvement of E-selectin in recruitment of endothelial progenitor cells and angiogenesis in ischemic muscle*. *Blood*, 2007. **110**(12): p. 3891-9.
47. Avci-Adali, M., et al., *Current concepts and new developments for autologous in vivo endothelialisation of biomaterials for intravascular applications*. *Eur Cell Mater*, 2011. **21**: p. 157-76.
48. Lipiec, P., et al., *Impact of intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction on left ventricular perfusion and function: a 6-month follow-up gated ^{99m}Tc-MIBI single-photon emission computed tomography study*. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2009. **36**(4): p. 587-93.
49. Terrovitis, J.V., R.R. Smith, and E. Marbán, *Assessment and optimization of cell engraftment after transplantation into the heart*. *Circ Res*, 2010. **106**(3): p. 479-94.
50. Opalinska, J.B. and A.M. Gewirtz, *Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications*. *Nat Rev Drug Discov*, 2002. **1**(7): p. 503-14.
51. Sahin, U., K. Kariko, and O. Tureci, *mRNA-based therapeutics--developing a new class of drugs*. *Nat Rev Drug Discov*, 2014. **13**(10): p. 759-80.
52. Steinle, H., et al., *Concise Review: Application of In Vitro Transcribed Messenger RNA for Cellular Engineering and Reprogramming: Progress and Challenges*. *Stem Cells*, 2017. **35**(1): p. 68-79.
53. Vallazza, B., et al., *Recombinant messenger RNA technology and its application in cancer immunotherapy, transcript replacement therapies, pluripotent stem cell induction, and beyond*. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2015. **6**(5): p. 471-99.
54. Diken, M., et al., *mRNA: A Versatile Molecule for Cancer Vaccines*. *Curr Issues Mol Biol*, 2017. **22**: p. 113-128.
55. Oberli, M.A., et al., *Lipid Nanoparticle Assisted mRNA Delivery for Potent Cancer Immunotherapy*. *Nano Lett*, 2017. **17**(3): p. 1326-1335.
56. Richner, J.M., et al., *Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection*. *Cell*, 2017. **168**(6): p. 1114-1125 e10.
57. Wong, S.S. and R.J. Webby, *An mRNA vaccine for influenza*. *Nat Biotechnol*, 2012. **30**(12): p. 1202-4.
58. Zangi, L., et al., *Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction*. *Nat Biotechnol*, 2013. **31**(10): p. 898-907.
59. Gupta, R., J. Tongers, and D.W. Losordo, *Human Studies of Angiogenic Gene Therapy*. *Circulation Research*, 2009. **105**(8): p. 724-736.
60. Guan, S. and J. Rosenecker, *Nanotechnologies in delivery of mRNA therapeutics using nonviral vector-based delivery systems*. *Gene Ther*, 2017. **24**(3): p. 133-143.

Literaturverzeichnis

61. Hardee, C.L., et al., *Advances in Non-Viral DNA Vectors for Gene Therapy*. Genes (Basel), 2017. **8**(2).
62. Hecker, J.G., *Non-Viral, Lipid-Mediated DNA and mRNA Gene Therapy of the Central Nervous System (CNS): Chemical-Based Transfection*. Methods Mol Biol, 2016. **1382**: p. 307-24.
63. Khorsand, B., et al., *Regeneration of bone using nanoplex delivery of FGF-2 and BMP-2 genes in diaphyseal long bone radial defects in a diabetic rabbit model*. J Control Release, 2017. **248**: p. 53-59.
64. Liu, X., et al., *Incorporation of Viral Glycoprotein VSV-G Improves the Delivery of DNA by Erythrocyte Ghost into Cells Refractory to Conventional Transfection*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2017. **181**(2): p. 748-761.
65. Ni, R., et al., *Virus-inspired nucleic acid delivery system: Linking virus and viral mimicry*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2016. **106**: p. 3-26.
66. Schnodt, M., et al., *Improving the purity of Adeno-associated viral vector preparations using DNA minicircle technology*. Human Gene Therapy, 2016. **27**(11): p. A44-A44.
67. Slivac, I., et al., *Non-viral nucleic acid delivery methods*. Expert Opin Biol Ther, 2017. **17**(1): p. 105-118.
68. Zhao, T., et al., *Immunogenicity of induced pluripotent stem cells*. Nature, 2011. **474**(7350): p. 212-5.
69. Naso, M.F., et al., *Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy*. BioDrugs, 2017. **31**(4): p. 317-334.
70. Mingozzi, F. and K.A. High, *Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(5): p. 341-55.
71. Brenner, S., F. Jacob, and M. Meselson, *An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis*. Nature, 1961. **190**: p. 576-581.
72. Hajj, K.A. and K.A. Whitehead, *Tools for translation: non-viral materials for therapeutic mRNA delivery*. Nature Reviews Materials, 2017. **2**(10).
73. Kowalski, P.S., et al., *Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery*. Mol Ther, 2019. **27**(4): p. 710-728.
74. Steinle, H., et al., *Delivery of synthetic mRNAs for tissue regeneration*. Adv Drug Deliv Rev, 2021. **179**: p. 114007.
75. Plews, J.R., et al., *Activation of pluripotency genes in human fibroblast cells by a novel mRNA based approach*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e14397.
76. Wadhwa, A., et al., *Opportunities and Challenges in the Delivery of mRNA-based Vaccines*. Pharmaceutics, 2020. **12**(2).
77. Zhong, Z., et al., *mRNA therapeutics deliver a hopeful message*. Nano Today, 2018. **23**: p. 16-39.
78. Malone, R.W., P.L. Felgner, and I.M. Verma, *Cationic liposome-mediated RNA transfection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(16): p. 6077-81.

Literaturverzeichnis

79. Trepotec, Z., et al., *Delivery of mRNA Therapeutics for the Treatment of Hepatic Diseases*. Mol Ther, 2019. **27**(4): p. 794-802.
80. Rahban, M., et al., *Stabilization challenges and aggregation in protein-based therapeutics in the pharmaceutical industry*. RSC Adv, 2023. **13**(51): p. 35947-35963.
81. Granot-Matok, Y., et al., *Therapeutic mRNA delivery to leukocytes*. J Control Release, 2019. **305**: p. 165-175.
82. Weng, Y., et al., *The challenge and prospect of mRNA therapeutics landscape*. Biotechnol Adv, 2020. **40**: p. 107534.
83. Sahu, I., et al., *Recent Developments in mRNA-Based Protein Supplementation Therapy to Target Lung Diseases*. Mol Ther, 2019. **27**(4): p. 803-823.
84. Karikó, K., et al., *Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability*. Mol Ther, 2008. **16**(11): p. 1833-40.
85. Karikó, K., et al., *Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA*. Immunity, 2005. **23**(2): p. 165-75.
86. Goparaju, S.K., et al., *Rapid differentiation of human pluripotent stem cells into functional neurons by mRNAs encoding transcription factors*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 42367.
87. Kim, B.E., et al., *Single-Factor SOX2 Mediates Direct Neural Reprogramming of Human Mesenchymal Stem Cells via Transfection of In Vitro Transcribed mRNA*. Cell Transplant, 2018. **27**(7): p. 1154-1167.
88. Simeonov, K.P. and H. Uppal, *Direct reprogramming of human fibroblasts to hepatocyte-like cells by synthetic modified mRNAs*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e100134.
89. Steinle, H., et al., *Reprogramming of Urine-Derived Renal Epithelial Cells into iPSCs Using srRNA and Consecutive Differentiation into Beating Cardiomyocytes*. Mol Ther Nucleic Acids, 2019. **17**: p. 907-921.
90. Canjuga, D., et al., *Homing of mRNA-Modified Endothelial Progenitor Cells to Inflamed Endothelium*. Pharmaceutics, 2022. **14**(6).
91. Levy, O., et al., *mRNA-engineered mesenchymal stem cells for targeted delivery of interleukin-10 to sites of inflammation*. Blood, 2013. **122**(14): p. e23-32.
92. Warren, L., et al., *Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(5): p. 618-30.
93. Huang, C.L., et al., *Synthetic chemically modified mrna-based delivery of cytoprotective factor promotes early cardiomyocyte survival post-acute myocardial infarction*. Mol Pharm, 2015. **12**(3): p. 991-6.

94. Karikó, K., et al., *Increased erythropoiesis in mice injected with submicrogram quantities of pseudouridine-containing mRNA encoding erythropoietin*. Mol Ther, 2012. **20**(5): p. 948-53.
95. Lescan, M., et al., *De Novo Synthesis of Elastin by Exogenous Delivery of Synthetic Modified mRNA into Skin and Elastin-Deficient Cells*. Mol Ther Nucleic Acids, 2018. **11**: p. 475-484.
96. Lui, K.O., et al., *Driving vascular endothelial cell fate of human multipotent Isl1+ heart progenitors with VEGF modified mRNA*. Cell Res, 2013. **23**(10): p. 1172-86.
97. Sahin, U., et al., *An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma*. Nature, 2020. **585**(7823): p. 107-112.
98. Diebold, S.S., et al., *Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1529-31.
99. Diebold, S.S., et al., *Nucleic acid agonists for Toll-like receptor 7 are defined by the presence of uridine ribonucleotides*. Eur J Immunol, 2006. **36**(12): p. 3256-67.
100. Heil, F., et al., *Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1526-9.
101. Alexopoulou, L., et al., *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3*. Nature, 2001. **413**(6857): p. 732-8.
102. Karikó, K., et al., *mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3*. J Biol Chem, 2004. **279**(13): p. 12542-50.
103. Hornung, V., et al., *5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I*. Science, 2006. **314**(5801): p. 994-7.
104. Rehwinkel, J. and M.U. Gack, *RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing*. Nat Rev Immunol, 2020. **20**(9): p. 537-551.
105. Nallagatla, S.R. and P.C. Bevilacqua, *Nucleoside modifications modulate activation of the protein kinase PKR in an RNA structure-specific manner*. Rna, 2008. **14**(6): p. 1201-13.
106. Badiyan, Z.S. and T. Evans, *Concise Review: Application of Chemically Modified mRNA in Cell Fate Conversion and Tissue Engineering*. Stem Cells Transl Med, 2019. **8**(8): p. 833-843.
107. Freund, I., et al., *RNA Modifications Modulate Activation of Innate Toll-Like Receptors*. Genes (Basel), 2019. **10**(2).
108. McCown, P.J., et al., *Naturally occurring modified ribonucleosides*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2020. **11**(5): p. e1595.
109. Uchida, S., et al., *Nanomedicine-Based Approaches for mRNA Delivery*. Mol Pharm, 2020. **17**(10): p. 3654-3684.
110. Kauffman, K.J., et al., *Efficacy and immunogenicity of unmodified and pseudouridine-modified mRNA delivered systemically with lipid nanoparticles in vivo*. Biomaterials, 2016. **109**: p. 78-87.

Literaturverzeichnis

111. Züst, R., et al., *Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5*. Nat Immunol, 2011. **12**(2): p. 137-43.
112. Lou, X., et al., *Emerging role of RNA modification N6-methyladenosine in immune evasion*. Cell Death Dis, 2021. **12**(4): p. 300.
113. Reitsma, S., et al., *The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization*. Pflugers Arch, 2007. **454**(3): p. 345-59.
114. Augustin, H.G., D.H. Kozian, and R.C. Johnson, *Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes*. Bioessays, 1994. **16**(12): p. 901-6.
115. Cahill, P.A. and E.M. Redmond, *Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health*. Atherosclerosis, 2016. **248**: p. 97-109.
116. Jaffe, E.A., *Cell biology of endothelial cells*. Hum Pathol, 1987. **18**(3): p. 234-9.
117. Krüger-Genge, A., et al., *Vascular Endothelial Cell Biology: An Update*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(18).
118. Pi, X., L. Xie, and C. Patterson, *Emerging Roles of Vascular Endothelium in Metabolic Homeostasis*. Circ Res, 2018. **123**(4): p. 477-494.
119. Pries, A.R., T.W. Secomb, and P. Gaehtgens, *The endothelial surface layer*. Pflugers Arch, 2000. **440**(5): p. 653-66.
120. Florey, *The endothelial cell*. Br Med J, 1966. **2**(5512): p. 487-90.
121. Virchow, R., *Der ateromatose prozess der arterien*. Wien. Med. Wochenschr., 1856(6): p. 825–827.
122. Baldwin, A.L. and G. Thurston, *Mechanics of endothelial cell architecture and vascular permeability*. Crit Rev Biomed Eng, 2001. **29**(2): p. 247-78.
123. de Graaf, J.C., et al., *Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions*. Circulation, 1992. **85**(6): p. 2284-90.
124. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
125. Gimbrone, M.A., Jr. and R.W. Alexander, *Angiotensin II stimulation of prostaglandin production in cultured human vascular endothelium*. Science, 1975. **189**(4198): p. 219-20.
126. Komori, K. and P.M. Vanhoutte, *Endothelium-derived hyperpolarizing factor*. Blood Vessels, 1990. **27**(2-5): p. 238-45.
127. Libby, P., et al., *Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial cells*. Am J Pathol, 1986. **124**(2): p. 179-85.
128. Moncada, S., et al., *Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium*. Thromb Res, 1977. **11**(3): p. 323-44.

Literaturverzeichnis

129. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. *Nature*, 1987. **327**(6122): p. 524-6.
130. Rubanyi, G.M. and L.H. Botelho, *Endothelins*. *Faseb j*, 1991. **5**(12): p. 2713-20.
131. Schnittler, H.J., *Structural and functional aspects of intercellular junctions in vascular endothelium*. *Basic Res Cardiol*, 1998. **93 Suppl 3**: p. 30-9.
132. Vane, J.R., *The Croonian Lecture, 1993. The endothelium: maestro of the blood circulation*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1994. **343**(1304): p. 225-46.
133. Weksler, B.B., A.J. Marcus, and E.A. Jaffe, *Synthesis of prostaglandin I₂ (prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. **74**(9): p. 3922-6.
134. Rajendran, P., et al., *The vascular endothelium and human diseases*. *Int J Biol Sci*, 2013. **9**(10): p. 1057-69.
135. van Hinsbergh, V.W., *Endothelium--role in regulation of coagulation and inflammation*. *Semin Immunopathol*, 2012. **34**(1): p. 93-106.
136. Kirsch, J., et al., *Endothelial Dysfunction, and A Prothrombotic, Proinflammatory Phenotype Is Caused by Loss of Mitochondrial Thioredoxin Reductase in Endothelium*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016. **36**(9): p. 1891-9.
137. Lin, J., et al., *MicroRNA-181b inhibits thrombin-mediated endothelial activation and arterial thrombosis by targeting caspase recruitment domain family member 10*. *Faseb j*, 2016. **30**(9): p. 3216-26.
138. Wu, Q., et al., *Effect of Autophagy Regulated by Sirt1/FoxO1 Pathway on the Release of Factors Promoting Thrombosis from Vascular Endothelial Cells*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(17).
139. Yau, J.W., et al., *Endothelial-specific deletion of autophagy-related 7 (ATG7) attenuates arterial thrombosis in mice*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2017. **154**(3): p. 978-988.e1.
140. Pober, J.S. and W.C. Sessa, *Evolving functions of endothelial cells in inflammation*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(10): p. 803-15.
141. Egan, K. and G.A. FitzGerald, *Eicosanoids and the vascular endothelium*. *Handb Exp Pharmacol*, 2006(176 Pt 1): p. 189-211.
142. Ley, K. and J. Reutershan, *Leucocyte-endothelial interactions in health and disease*. *Handb Exp Pharmacol*, 2006(176 Pt 2): p. 97-133.
143. Munro, J.M., J.S. Pober, and R.S. Cotran, *Tumor necrosis factor and interferon-gamma induce distinct patterns of endothelial activation and associated leukocyte accumulation in skin of *Papio anubis**. *Am J Pathol*, 1989. **135**(1): p. 121-33.
144. Huang, B., et al., *Active targeting of chemotherapy to disseminated tumors using nanoparticle-carrying T cells*. *Sci Transl Med*, 2015. **7**(291): p. 291ra94.
145. Prescher, J.A., D.H. Dube, and C.R. Bertozzi, *Chemical remodelling of cell surfaces in living animals*. *Nature*, 2004. **430**(7002): p. 873-7.

Literaturverzeichnis

146. Saxon, E. and C.R. Bertozzi, *Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction*. Science, 2000. **287**(5460): p. 2007-10.
147. Aboudzadeh, M.A. and S. Hamzehlou, *Special Issue on "Function of Polymers in Encapsulation Process"*. Polymers (Basel), 2022. **14**(6).
148. Obstals, F., et al., *Improving Hemocompatibility of Membranes for Extracorporeal Membrane Oxygenators by Grafting Nonthrombogenic Polymer Brushes*. Macromol Biosci, 2018. **18**(3).
149. Cabric, S., et al., *Islet surface heparinization prevents the instant blood-mediated inflammatory reaction in islet transplantation*. Diabetes, 2007. **56**(8): p. 2008-15.
150. Contreras, J.L., et al., *A novel approach to xenotransplantation combining surface engineering and genetic modification of isolated adult porcine islets*. Surgery, 2004. **136**(3): p. 537-47.
151. Lee, D.Y., et al., *Minimization of immunosuppressive therapy after islet transplantation: combined action of heme oxygenase-1 and PEGylation to islet*. Am J Transplant, 2006. **6**(8): p. 1820-8.
152. Yun Lee, D., J. Hee Nam, and Y. Byun, *Functional and histological evaluation of transplanted pancreatic islets immunoprotected by PEGylation and cyclosporine for 1 year*. Biomaterials, 2007. **28**(11): p. 1957-66.
153. Digilio, G., et al., *Exofacial protein thiols as a route for the internalization of Gd(III)-based complexes for magnetic resonance imaging cell labeling*. J Med Chem, 2010. **53**(13): p. 4877-90.
154. Torres, A.G. and M.J. Gait, *Exploiting cell surface thiols to enhance cellular uptake*. Trends Biotechnol, 2012. **30**(4): p. 185-90.
155. Baskin, J.M., et al., *Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(43): p. 16793-7.
156. Hong, V., et al., *Labeling live cells by copper-catalyzed alkyne--azide click chemistry*. Bioconjug Chem, 2010. **21**(10): p. 1912-6.
157. Swee, L.K., et al., *One-step enzymatic modification of the cell surface redirects cellular cytotoxicity and parasite tropism*. ACS Chem Biol, 2015. **10**(2): p. 460-5.
158. Itagaki, T., et al., *Interaction between cells and poly(ethylene glycol)-lipid conjugates*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2015. **135**: p. 765-773.
159. Lim, K.S., et al., *Cell surface-engineering to embed targeting ligands or tracking agents on the cell membrane*. Biochem Biophys Res Commun, 2017. **482**(4): p. 1042-1047.
160. Rabuka, D., et al., *Noncovalent cell surface engineering: incorporation of bioactive synthetic glycopolymers into cellular membranes*. J Am Chem Soc, 2008. **130**(18): p. 5947-53.
161. Teramura, Y., Y. Kaneda, and H. Iwata, *Islet-encapsulation in ultra-thin layer-by-layer membranes of poly(vinyl alcohol) anchored to poly(ethylene glycol)-lipids in the cell membrane*. Biomaterials, 2007. **28**(32): p. 4818-25.

162. Teramura, Y., et al., *Behavior of synthetic polymers immobilized on a cell membrane*. *Biomaterials*, 2008. **29**(10): p. 1345-55.
163. Tomita, U., et al., *Poly(ethylene glycol)-Lipid-Conjugated Antibodies Enhance Dendritic Cell Phagocytosis of Apoptotic Cancer Cells*. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2012. **5**(5): p. 405-16.
164. Won, Y.W., A.N. Patel, and D.A. Bull, *Cell surface engineering to enhance mesenchymal stem cell migration toward an SDF-1 gradient*. *Biomaterials*, 2014. **35**(21): p. 5627-35.
165. Agudelo, C.A., Y. Teramura, and H. Iwata, *Cryopreserved agarose-encapsulated islets as bioartificial pancreas: a feasibility study*. *Transplantation*, 2009. **87**(1): p. 29-34.
166. Fujita, E., et al., *Pharmacokinetics and tissue distribution of tacrolimus (FK506) after a single or repeated ocular instillation in rabbits*. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2008. **24**(3): p. 309-19.
167. Miura, S., Y. Teramura, and H. Iwata, *Encapsulation of islets with ultra-thin polyion complex membrane through poly(ethylene glycol)-phospholipids anchored to cell membrane*. *Biomaterials*, 2006. **27**(34): p. 5828-35.
168. Agard, N.J., J.A. Prescher, and C.R. Bertozzi, *A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems*. *J Am Chem Soc*, 2004. **126**(46): p. 15046-7.
169. Blackman, M.L., M. Royzen, and J.M. Fox, *Tetrazine ligation: fast bioconjugation based on inverse-electron-demand Diels-Alder reactivity*. *J Am Chem Soc*, 2008. **130**(41): p. 13518-9.
170. Devaraj, N.K., R. Weissleder, and S.A. Hilderbrand, *Tetrazine-based cycloadditions: application to pretargeted live cell imaging*. *Bioconjug Chem*, 2008. **19**(12): p. 2297-9.
171. Rostovtsev, V.V., et al., *A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2002. **41**(14): p. 2596-9.
172. Tornøe, C.W., C. Christensen, and M. Meldal, *Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides*. *J Org Chem*, 2002. **67**(9): p. 3057-64.
173. Kolb, H.C., M.G. Finn, and K.B. Sharpless, *Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2001. **40**(11): p. 2004-2021.
174. Agard, N.J., et al., *A comparative study of bioorthogonal reactions with azides*. *ACS Chem Biol*, 2006. **1**(10): p. 644-8.
175. Agard, N.J. and C.R. Bertozzi, *Chemical approaches to perturb, profile, and perceive glycans*. *Acc Chem Res*, 2009. **42**(6): p. 788-97.
176. Canjuga, D., et al., *Improving hemocompatibility of artificial lungs by click conjugation of glycoengineered endothelial cells onto blood-contacting surfaces*. *Biomater Adv*, 2022. **137**: p. 212824.

Literaturverzeichnis

177. Kiick, K.L., et al., *Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 19-24.
178. Parker, C.G. and M.R. Pratt, *Click Chemistry in Proteomic Investigations*. Cell, 2020. **180**(4): p. 605-632.
179. Ford, D.A., *A BOSS platform: using functionalized lipids and click chemistry for new discoveries in lipid research*. J Lipid Res, 2021. **62**: p. 100025.
180. Ricks, T.J., et al., *Labeling of Phosphatidylinositol Lipid Products in Cells through Metabolic Engineering by Using a Clickable myo-Inositol Probe*. Chembiochem, 2019. **20**(2): p. 172-180.
181. Oliveira, B.L., Z. Guo, and G.J.L. Bernardes, *Inverse electron demand Diels-Alder reactions in chemical biology*. Chem Soc Rev, 2017. **46**(16): p. 4895-4950.
182. Späte, A.K., et al., *Rapid labeling of metabolically engineered cell-surface glycoconjugates with a carbamate-linked cyclopropene reporter*. Bioconjug Chem, 2014. **25**(1): p. 147-54.
183. Du, J., et al., *Metabolic glycoengineering: sialic acid and beyond*. Glycobiology, 2009. **19**(12): p. 1382-401.
184. Zych, B., D. Garcia-Saez, and A.R. Simon, *Lung donor shortage - how to overcome it?* Kardiochir Torakochirurgia Pol, 2016. **13**(3): p. 195-197.
185. Baffes, T.G., et al., *Extracorporeal circulation for support of palliative cardiac surgery in infants*. Ann Thorac Surg, 1970. **10**(4): p. 354-63.
186. Biscotti, M., J. Sonett, and M. Bacchetta, *ECMO as bridge to lung transplant*. Thorac Surg Clin, 2015. **25**(1): p. 17-25.
187. Valapour, M., et al., *OPTN/SRTR 2019 Annual Data Report: Lung*. Am J Transplant, 2021. **21 Suppl 2**: p. 441-520.
188. Schmidt, M., et al., *Blood oxygenation and decarboxylation determinants during venovenous ECMO for respiratory failure in adults*. Intensive Care Med, 2013. **39**(5): p. 838-46.
189. Barbaro, R.P., et al., *Extracorporeal membrane oxygenation support in COVID-19: an international cohort study of the Extracorporeal Life Support Organization registry*. Lancet, 2020. **396**(10257): p. 1071-1078.
190. Lehle, K., et al., *Efficiency in extracorporeal membrane oxygenation-cellular deposits on polymethylpentene membranes increase resistance to blood flow and reduce gas exchange capacity*. Asaio j, 2008. **54**(6): p. 612-7.
191. Arens, J., et al., *Toward a Long-Term Artificial Lung*. Asaio j, 2020. **66**(8): p. 847-854.
192. de Mel, A., B.G. Cousins, and A.M. Seifalian, *Surface modification of biomaterials: a quest for blood compatibility*. Int J Biomater, 2012. **2012**: p. 707863.

193. Wendel, H.P. and G. Ziemer, *Coating-techniques to improve the hemocompatibility of artificial devices used for extracorporeal circulation*. Eur J Cardiothorac Surg, 1999. **16**(3): p. 342-50.
194. Zhang, M., et al., *Anti-thrombogenic Surface Coatings for Extracorporeal Membrane Oxygenation: A Narrative Review*. ACS Biomater Sci Eng, 2021. **7**(9): p. 4402-4419.
195. Videm, V., et al., *Reduced complement activation with heparin-coated oxygenator and tubings in coronary bypass operations*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1992. **103**(4): p. 806-13.
196. Zimmermann, A.K., et al., *Effect of biopassive and bioactive surface-coatings on the hemocompatibility of membrane oxygenators*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2007. **80**(2): p. 433-9.
197. Schulze, C.J., et al., *Phosphorylcholine-coated circuits improve preservation of platelet count and reduce expression of proinflammatory cytokines in CABG: a prospective randomized trial*. J Card Surg, 2009. **24**(4): p. 363-8.
198. Mueller, X.M., et al., *Poly2-methoxyethylacrylate (PMEA) coated oxygenator: an ex vivo study*. Int J Artif Organs, 2002. **25**(3): p. 223-9.
199. de Vroege, R., et al., *The impact of heparin-coated circuits on hemodynamics during and after cardiopulmonary bypass*. Artif Organs, 2005. **29**(6): p. 490-7.
200. Rajsic, S., et al., *Anticoagulation Strategies during Extracorporeal Membrane Oxygenation: A Narrative Review*. J Clin Med, 2022. **11**(17).
201. Choi, J.H., et al., *Heparin-induced thrombocytopenia during extracorporeal life support: incidence, management and outcomes*. Ann Cardiothorac Surg, 2019. **8**(1): p. 19-31.
202. Greinacher, A., *CLINICAL PRACTICE. Heparin-Induced Thrombocytopenia*. N Engl J Med, 2015. **373**(3): p. 252-61.
203. Lüsebrink, E., et al., *Heparin-Induced Thrombocytopenia in Patients Undergoing Venoarterial Extracorporeal Membrane Oxygenation*. J Clin Med, 2023. **12**(1).
204. Pollak, U., *Heparin-induced thrombocytopenia complicating extracorporeal membrane oxygenation support: Review of the literature and alternative anticoagulants*. J Thromb Haemost, 2019. **17**(10): p. 1608-1622.
205. Evseev, A.K., et al., *Membranes in Extracorporeal Blood Oxygenation Technology*. Membranes and Membrane Technologies, 2019. **1**(4): p. 201-211.
206. Ontaneda, A. and G.M. Annich, *Novel Surfaces in Extracorporeal Membrane Oxygenation Circuits*. Front Med (Lausanne), 2018. **5**: p. 321.
207. Ren, X., et al., *Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications*. Chem Soc Rev, 2015. **44**(15): p. 5680-742.
208. Gbyli, R., et al., *Achieving Totally Local Anticoagulation on Blood Contacting Devices*. Advanced Materials Interfaces, 2018. **5**(4).

Literaturverzeichnis

209. Jaffer, I.H., et al., *Medical device-induced thrombosis: what causes it and how can we prevent it?* J Thromb Haemost, 2015. **13 Suppl 1**: p. S72-81.
210. Sarode, D.N. and S. Roy, *In Vitro models for thrombogenicity testing of blood-recirculating medical devices*. Expert Rev Med Devices, 2019. **16(7)**: p. 603-616.
211. Sotiri, I., et al., *BloodSurf 2017: News from the blood-biomaterial frontier*. Acta Biomater, 2019. **87**: p. 55-60.
212. Xu, L.C., J.W. Bauer, and C.A. Siedlecki, *Proteins, platelets, and blood coagulation at biomaterial interfaces*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2014. **124**: p. 49-68.
213. Sperling, C., et al., *Blood coagulation on biomaterials requires the combination of distinct activation processes*. Biomaterials, 2009. **30(27)**: p. 4447-56.
214. Kidane, A.G., et al., *Anticoagulant and antiplatelet agents: their clinical and device application(s) together with usages to engineer surfaces*. Biomacromolecules, 2004. **5(3)**: p. 798-813.
215. Monroe, D.M. and M. Hoffman, *What does it take to make the perfect clot?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26(1)**: p. 41-8.
216. Nilsson, B., et al., *The role of complement in biomaterial-induced inflammation*. Mol Immunol, 2007. **44(1-3)**: p. 82-94.
217. Jaffer, I.H. and J.I. Weitz, *The blood compatibility challenge. Part 1: Blood-contacting medical devices: The scope of the problem*. Acta Biomater, 2019. **94**: p. 2-10.
218. Mohan, C.C., K.P. Chennazhi, and D. Menon, *In vitro hemocompatibility and vascular endothelial cell functionality on titania nanostructures under static and dynamic conditions for improved coronary stenting applications*. Acta Biomater, 2013. **9(12)**: p. 9568-77.
219. Weber, M., et al., *Blood-Contacting Biomaterials: In Vitro Evaluation of the Hemocompatibility*. Front Bioeng Biotechnol, 2018. **6**: p. 99.
220. Gerling, K., et al., *A Novel C1-Esterase Inhibitor Oxygenator Coating Prevents FXII Activation in Human Blood*. Biomolecules, 2020. **10(7)**.
221. Roth, G.A., et al., *Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study*. J Am Coll Cardiol, 2020. **76(25)**: p. 2982-3021.
222. Tsao, C.W., et al., *Heart Disease and Stroke Statistics-2022 Update: A Report From the American Heart Association*. Circulation, 2022. **145(8)**: p. e153-e639.
223. Notari, M., et al., *The local microenvironment limits the regenerative potential of the mouse neonatal heart*. Sci Adv, 2018. **4(5)**: p. eaao5553.
224. Martinez, E.C. and T. Kofidis, *Adult stem cells for cardiac tissue engineering*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50(2)**: p. 312-9.
225. Porrello, E.R. and E.N. Olson, *A neonatal blueprint for cardiac regeneration*. Stem Cell Res, 2014. **13(3 Pt B)**: p. 556-70.

Literaturverzeichnis

226. Leal, V., et al., *Intrinsic Vascular Repair by Endothelial Progenitor Cells in Acute Coronary Syndromes: an Update Overview*. Stem Cell Rev Rep, 2019. **15**(1): p. 35-47.
227. Takahashi, T., et al., *Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization*. Nat Med, 1999. **5**(4): p. 434-8.
228. Samman Tahhan, A., et al., *Circulating Progenitor Cells and Racial Differences*. Circ Res, 2018. **123**(4): p. 467-476.
229. Gill, M., et al., *Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)/AC133(+) endothelial precursor cells*. Circ Res, 2001. **88**(2): p. 167-74.
230. Shintani, S., et al., *Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction*. Circulation, 2001. **103**(23): p. 2776-9.
231. Hattori, K., et al., *Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells*. J Exp Med, 2001. **193**(9): p. 1005-14.
232. Yamaguchi, J., et al., *Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization*. Circulation, 2003. **107**(9): p. 1322-8.
233. Heeschen, C., et al., *Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease*. Circulation, 2004. **109**(13): p. 1615-22.
234. Vasa, M., et al., *Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease*. Circ Res, 2001. **89**(1): p. E1-7.
235. Thum, T., et al., *Age-dependent impairment of endothelial progenitor cells is corrected by growth-hormone-mediated increase of insulin-like growth-factor-1*. Circ Res, 2007. **100**(3): p. 434-43.
236. Kang, H., et al., *High glucose-induced endothelial progenitor cell dysfunction*. Diab Vasc Dis Res, 2017. **14**(5): p. 381-394.
237. Paschalaki, K.E., et al., *Dysfunction of endothelial progenitor cells from smokers and chronic obstructive pulmonary disease patients due to increased DNA damage and senescence*. Stem Cells, 2013. **31**(12): p. 2813-26.
238. Iwaguro, H., et al., *Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration*. Circulation, 2002. **105**(6): p. 732-8.
239. Shimpo, M., et al., *AAV-mediated VEGF gene transfer into skeletal muscle stimulates angiogenesis and improves blood flow in a rat hindlimb ischemia model*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(4): p. 993-1001.
240. Jiang, M., et al., *In vivo enhancement of angiogenesis by adenoviral transfer of HIF-1alpha-modified endothelial progenitor cells (Ad-HIF-1alpha-modified EPC for angiogenesis)*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(10): p. 2284-95.

241. Kuliszewski, M.A., et al., *Vascular gene transfer of SDF-1 promotes endothelial progenitor cell engraftment and enhances angiogenesis in ischemic muscle*. Mol Ther, 2011. **19**(5): p. 895-902.
242. Hiasa, K., et al., *Gene transfer of stromal cell-derived factor-1alpha enhances ischemic vasculogenesis and angiogenesis via vascular endothelial growth factor/endothelial nitric oxide synthase-related pathway: next-generation chemokine therapy for therapeutic neovascularization*. Circulation, 2004. **109**(20): p. 2454-61.
243. Sundararaman, S., et al., *Plasmid-based transient human stromal cell-derived factor-1 gene transfer improves cardiac function in chronic heart failure*. Gene Ther, 2011. **18**(9): p. 867-73.
244. Chavakis, E., et al., *Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells*. J Exp Med, 2005. **201**(1): p. 63-72.
245. Wu, Y., et al., *Essential role of ICAM-1/CD18 in mediating EPC recruitment, angiogenesis, and repair to the infarcted myocardium*. Circ Res, 2006. **99**(3): p. 315-22.
246. Yoon, C.H., et al., *Intercellular adhesion molecule-1 is upregulated in ischemic muscle, which mediates trafficking of endothelial progenitor cells*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2006. **26**(5): p. 1066-1072.
247. Foubert, P., et al., *PSGL-1-mediated activation of EphB4 increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells*. J Clin Invest, 2007. **117**(6): p. 1527-37.
248. Heiss, C., et al., *Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction*. J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(9): p. 1441-8.
249. Jie, K.E., et al., *Circulating endothelial progenitor cell levels are higher during childhood than in adult life*. Atherosclerosis, 2009. **202**(2): p. 345-7.
250. Madonna, R., G. Novo, and C.R. Balistreri, *Cellular and molecular basis of the imbalance between vascular damage and repair in ageing and age-related diseases: As biomarkers and targets for new treatments*. Mech Ageing Dev, 2016. **159**: p. 22-30.
251. Sanada, F., et al., *Hepatocyte growth factor, but not vascular endothelial growth factor, attenuates angiotensin II-induced endothelial progenitor cell senescence*. Hypertension, 2009. **53**(1): p. 77-82.
252. Xia, W.H., et al., *BMP4/Id2 signaling pathway is a novel therapeutic target for late outgrowth endothelial progenitor cell-mediated endothelial injury repair*. Int J Cardiol, 2017. **228**: p. 796-804.
253. Li, X., et al., *MicroRNA-326-5p enhances therapeutic potential of endothelial progenitor cells for myocardial infarction*. Stem Cell Res Ther, 2019. **10**(1): p. 323.
254. Huang, H., et al., *Exosomes from SIRT1-Overexpressing ADSCs Restore Cardiac Function by Improving Angiogenic Function of EPCs*. Mol Ther Nucleic Acids, 2020. **21**: p. 737-750.

255. Masuda, H., et al., *Vasculogenic conditioning of peripheral blood mononuclear cells promotes endothelial progenitor cell expansion and phenotype transition of anti-inflammatory macrophage and T lymphocyte to cells with regenerative potential*. J Am Heart Assoc, 2014. **3**(3): p. e000743.
256. Tanaka, R., et al., *Quality-Quantity Control Culture Enhances Vasculogenesis and Wound Healing Efficacy of Human Diabetic Peripheral Blood CD34+ Cells*. Stem Cells Transl Med, 2018. **7**(5): p. 428-438.
257. Chruewkamlow, N., et al., *Novel culture media enhances mononuclear cells from patients with chronic limb-threatening ischemia to increase vasculogenesis and anti-inflammatory effect*. Stem Cell Res Ther, 2021. **12**(1): p. 520.
258. Agati, S., et al., *DIDECMO: a new polymethylpentene oxygenator for pediatric extracorporeal membrane oxygenation*. Asaio j, 2006. **52**(5): p. 509-12.
259. Gattinoni, L., E. Carlesso, and T. Langer, *Clinical review: Extracorporeal membrane oxygenation*. Crit Care, 2011. **15**(6): p. 243.
260. Karagiannidis, C., T. Bein, and T. Welte, *ECMO during the COVID-19 pandemic: moving from rescue therapy to more reasonable indications*. Eur Respir J, 2022. **59**(2).
261. Supady, A., et al., *Respiratory indications for ECMO: focus on COVID-19*. Intensive Care Med, 2022. **48**(10): p. 1326-1337.
262. Sen, A., et al., *Practical Considerations for and Outcomes of Interfacility ECMO Transfer of Patients With COVID-19 During a Pandemic: Mayo Clinic Experience*. Mayo Clin Proc Innov Qual Outcomes, 2021. **5**(2): p. 525-531.
263. Puis, L., L. Ampe, and R. Hertleer, *Case report: plasma leakage in a polymethylpentene oxygenator during extracorporeal life support*. Perfusion, 2009. **24**(1): p. 51-2.
264. Maitz, M.F., et al., *The blood compatibility challenge. Part 4: Surface modification for hemocompatible materials: Passive and active approaches to guide blood-material interactions*. Acta Biomater, 2019. **94**: p. 33-43.
265. Ye, S.H., et al., *Hollow fiber membrane modification with functional zwitterionic macromolecules for improved thromboresistance in artificial lungs*. Langmuir, 2015. **31**(8): p. 2463-71.
266. Malkin, A.D., et al., *Development of zwitterionic sulfobetaine block copolymer conjugation strategies for reduced platelet deposition in respiratory assist devices*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2018. **106**(7): p. 2681-2692.
267. Roberts, T.C., R. Langer, and M.J.A. Wood, *Advances in oligonucleotide drug delivery*. Nat Rev Drug Discov, 2020. **19**(10): p. 673-694.
268. Huang, X., et al., *Surface monofunctionalized polymethyl pentene hollow fiber membranes by plasma treatment and hemocompatibility modification for membrane oxygenators*. Applied Surface Science, 2016. **362**: p. 355-363.
269. El-Ferzli, G.T., et al., *A Nitric Oxide-Releasing Self-Assembled Peptide Amphiphile Nanomatrix for Improving the Biocompatibility of Microporous Hollow Fibers*. Asaio j, 2015. **61**(5): p. 589-95.

Literaturverzeichnis

270. Gerling, K., et al., *A Novel C1-Esterase Inhibitor Oxygenator Coating Prevents FXII Activation in Human Blood*. *Biomolecules*, 2020. **10**(7).
271. Jana, S., *Endothelialization of cardiovascular devices*. *Acta Biomater*, 2019. **99**: p. 53-71.
272. Wiegmann, B., et al., *Developing a biohybrid lung - sufficient endothelialization of poly-4-methyl-1-pentene gas exchange hollow-fiber membranes*. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2016. **60**: p. 301-11.
273. Moller, L., et al., *Towards a biocompatible artificial lung: Covalent functionalization of poly(4-methylpent-1-ene) (TPX) with cRGD pentapeptide*. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2013. **9**: p. 270-277.
274. Pflaum, M., et al., *Endothelialization and characterization of titanium dioxide-coated gas-exchange membranes for application in the bioartificial lung*. *Acta Biomater*, 2017. **50**: p. 510-521.
275. Cornelissen, C.G., et al., *Fibronectin coating of oxygenator membranes enhances endothelial cell attachment*. *Biomed Eng Online*, 2013. **12**: p. 7.
276. Pflaum, M., et al., *Towards Biohybrid Lung: Induced Pluripotent Stem Cell Derived Endothelial Cells as Clinically Relevant Cell Source for Biologization*. *Micromachines (Basel)*, 2021. **12**(8).
277. Pflaum, M., et al., *Towards Biohybrid Lung Development-Fibronectin-Coating Bestows Hemocompatibility of Gas Exchange Hollow Fiber Membranes by Improving Flow-Resistant Endothelialization*. *Membranes*, 2022. **12**(1).
278. Yau, J.W., H. Teoh, and S. Verma, *Endothelial cell control of thrombosis*. *BMC Cardiovasc Disord*, 2015. **15**: p. 130.
279. Nguyen, J., Y.Y. Lin, and S. Gerecht, *The next generation of endothelial differentiation: Tissue-specific ECs*. *Cell Stem Cell*, 2021. **28**(7): p. 1188-1204.
280. Williams, I.M. and J.C. Wu, *Generation of Endothelial Cells From Human Pluripotent Stem Cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019. **39**(7): p. 1317-1329.

7 Anhang

7.1 Eigenanteil der wissenschaftlichen Veröffentlichungen

7.1.1 Publikation I

Homing of mRNA-Modified Endothelial Progenitor Cells to Inflamed Endothelium.

Denis Canjuga:	Studien Design, Methodenetablierung, Validierung, Durchführung von Experimenten, Auswertung und Evaluierung von Daten, Visualisierung, Schreiben des Manuskripts
Heidrun Steinle:	Methodenetablierung, Validierung, Durchführung von Experimenten, Auswertung und Evaluierung von Daten, Supervision
Jana Mayer:	Methodenetablierung, Validierung, Durchführung von Experimenten, Auswertung und Evaluierung von Daten
Ann-Kristin Uhde:	Methodenetablierung, Validierung, Durchführung von Experimenten, Auswertung und Evaluierung von Daten
Gerd Klein:	Methodenetablierung, Durchführung von Experimenten Ressourcen,
Hans Peter Wendel:	Supervision der Studie, Ressourcen Korrekturlesen des Manuskripts
Christian Schlensak:	Ressourcen, Korrekturlesen des Manuskripts
Meltem Avci-Adali:	Konzeption und Supervision der Studie, Ressourcen, Daten Evaluierung, Schreiben und Korrektur des Manuskripts

7.1.2 Publikation II:

Improving hemocompatibility of artificial lungs by click conjugation of glycoengineered endothelial cells onto blood-contacting surfaces.

Denis Canjuga:	Methodenetablierung und Validierung, Durchführung von Experimenten, Auswertung und Evaluierung von Daten, Schreiben des Manuskripts
Caroline Hansen:	Methodenetablierung, Durchführung von Experimenten, Auswertung und Evaluierung von Daten
Franziska Halbrügge:	Methodenetablierung und Validierung
Ludmilla Hann:	Methodenetablierung und Validierung, Durchführung von Experimenten, Auswertung und Evaluierung von Daten, Schreiben des Manuskripts
Sarina Weiß:	Methodenetablierung und Validierung
Christian Schlensak:	Korrekturlesen des Manuskripts
Hans Peter Wendel:	Betreuung der Studie, Korrekturlesen des Manuskripts
Meltem Avci-Adali:	Konzeption und Betreuung der Studie, Daten Evaluierung, Korrekturlesen des Manuskripts

7.2 Liste aller wissenschaftlichen Veröffentlichungen im Rahmen der Dissertation

Canjuga D, Steinle H, Mayer J, Uhde AK, Klein G, Wendel HP, Schlensak C, Avci-Adali M. Homing of mRNA-Modified Endothelial Progenitor Cells to Inflamed Endothelium. **Pharmaceutics**. 2022 Jun 2;14(6):1194. doi: 10.3390/pharmaceutics14061194. PMID: 35745767; PMCID: PMC9229815.

Canjuga D, Hansen C, Halbrügge F, Hann L, Weiß S, Schlensak C, Wendel HP, Avci-Adali M. Improving hemocompatibility of artificial lungs by click conjugation of glycoengineered endothelial cells onto blood-contacting surfaces. **Biomater Adv**. 2022 Jun;137:212824. doi: 10.1016/j.bioadv.2022.212824. Epub 2022 Apr 25. PMID: 35929239.

Sahaboglu A, Miranda M, **Canjuga D**, Avci-Adali M, Savytska N, Secer E, Feria-Pliego JA, Kayık G, Durdagi S. Drug repurposing studies of PARP inhibitors as a new therapy for inherited retinal degeneration. *Cell Mol Life Sci*. 2020 Jun;77(11):2199-2216. doi: 10.1007/s00018-019-03283-2. Epub 2019 Aug 26. PMID: 31451894.

Liste aller weiterer wissenschaftlicher Veröffentlichungen

Becker H, Castaneda-Vega S, Patzwaldt K, Przystal JM, Walter B, Michelotti FC, **Canjuga D**, Tatagiba M, Pichler B, Beck SC, Holland EC, la Fougère C, Tabatabai G. Multiparametric Longitudinal Profiling of RCAS-tva-Induced PDGFB-Driven Experimental Glioma. **Brain Sci**. 2022 Oct 24;12(11):1426. doi: 10.3390/brainsci12111426. PMID: 36358353; PMCID: PMC9688186.

Rath D, Rapp V, Schwartz J, Winter S, Emschermann F, Arnold D, Rheinlaender J, Büttcher M, Strebl M, Braun MB, Altgelt K, Uribe ÁP, Schories C, **Canjuga D**, Schaeffeler E, Borst O, Schäffer TE, Langer H, Stehle T, Schwab M, Geisler T, Gawaz M, Chatterjee M. Homophilic Interaction Between Transmembrane-JAM-A and Soluble JAM-A Regulates Thrombo-Inflammation: Implications for Coronary Artery Disease. **JACC Basic Transl Sci**. 2022 May 23;7(5):445-461. doi: 10.1016/j.jac-bts.2022.03.003. PMID: 35663628; PMCID: PMC9156439.

Przystal JM, Becker H, **Canjuga D**, Tsiami F, Anderle N, Keller AL, Pohl A, Ries CH, Schmittnaegel M, Korinetska N, Koch M, Schittenhelm J, Tatagiba M, Schmees C,

Anhang

Beck SC, Tabatabai G. Targeting CSF1R Alone or in Combination with PD1 in Experimental Glioma. **Cancers** (Basel). 2021 May 15;13(10):2400. doi: 10.3390/cancers13102400. PMID: 34063518; PMCID: PMC8156558.

Koch MS, Czernemmel S, Lennartz F, Beyeler S, Rajaraman S, Przystal JM, Govindarajan P, **Canjuga D**, Neumann M, Rizzu P, Zwirner S, Hoetker MS, Zender L, Walter B, Tatagiba M, Raineteau O, Heutink P, Nahnsen S, Tabatabai G. Experimental glioma with high bHLH expression harbor increased replicative stress and are sensitive toward ATR inhibition. *Neurooncol Adv*. 2020 Sep 10;2(1):vdaa115. doi: 10.1093/no-ajnl/vdaa115. PMID: 33134924; PMCID: PMC7592426.

Rajaraman S, **Canjuga D**, Ghosh M, Codrea MC, Sieger R, Wedekink F, Tatagiba M, Koch M, Lauer UM, Nahnsen S, Rammensee HG, Mühlebach MD, Stevanovic S, Tabatabai G. Measles Virus-Based Treatments Trigger a Pro-inflammatory Cascade and a Distinctive Immunopeptidome in Glioblastoma. *Mol Ther Oncolytics*. 2018 Dec 31;12:147-161. doi: 10.1016/j.omto.2018.12.010. PMID: 30775418; PMCID: PMC6365369.

Krajewski S, Rheinlaender J, Ries P, **Canjuga D**, Mack C, Scheideler L, Schäffer TE, Geis-Gerstorfer J, Wendel HP, Rupp F. Bacterial interactions with proteins and cells relevant to the development of life-threatening endocarditis studied by use of a quartz-crystal microbalance. *Anal Bioanal Chem*. 2014 May;406(14):3395-406. doi: 10.1007/s00216-014-7769-9. Epub 2014 Apr 6. PMID: 24705960.

Anhang

7.3 Wissenschaftliche Veröffentlichungen im Original

7.3.1 Publikation I:

Homing of mRNA-Modified Endothelial Progenitor Cells to Inflamed Endothelium

Article

Homing of mRNA-Modified Endothelial Progenitor Cells to Inflamed Endothelium

Denis Canjuga¹, Heidrun Steinle¹, Jana Mayer¹, Ann-Kristin Uhde¹, Gerd Klein² , Hans Peter Wendel¹, Christian Schlensak¹ and Meltem Avci-Adali^{1,*} 

- ¹ Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, University Hospital Tuebingen, Calwerstraße 7/1, 72076 Tuebingen, Germany; denis.canjuga@uni-tuebingen.de (D.C.); heidrun.steinle@uni-tuebingen.de (H.S.); jana.mayer@alice.de (J.M.); ann-kristin.uhde@student.uni-tuebingen.de (A.-K.U.); hans-peter.wendel@med.uni-tuebingen.de (H.P.W.); christian.schlensak@med.uni-tuebingen.de (C.S.)
- ² Center for Medical Research, Department of Medicine II, University of Tuebingen, Waldhörlestraße 22, 72072 Tuebingen, Germany; gerd.klein@uni-tuebingen.de
- * Correspondence: meltem.avci-adali@uni-tuebingen.de; Tel.: +49-7071-29-86605; Fax: +49-7071-29-3617

Abstract: Endothelial progenitor cells (EPCs) are one of the most important stem cells for the neovascularization of tissues damaged by ischemic diseases such as myocardial infarction, ischemic stroke, or critical limb ischemia. However, their low homing efficiency in the treatment of ischemic tissues limits their potential clinical applications. The use of synthetic messenger RNA (mRNA) for cell engineering represents a novel and promising technology for the modulation of cell behavior and tissue regeneration. To improve the therapeutic potential of EPCs, in this study, murine EPCs were engineered with synthetic mRNAs encoding C-X-C chemokine receptor 4 (CXCR4) and P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) to increase the homing and migration efficiency of EPCs to inflamed endothelium. Flow cytometric measurements revealed that the transfection of EPCs with CXCR4 and PSGL-1 mRNA resulted in increased expressions of CXCR4 and PSGL-1 on the cell surface compared with the unmodified EPCs. The transfection of EPCs with mRNAs did not affect cell viability. CXCR4-mRNA-modified EPCs showed significantly higher migration potential than unmodified cells in a chemotactic migration assay. The binding strength of the EPCs to inflamed endothelium was determined with single-cell atomic force microscopy (AFM). This showed that the mRNA-modified EPCs required a three-fold higher detachment force to be released from the TNF- α -activated endothelium than unmodified EPCs. Furthermore, in a dynamic flow model, significantly increased binding of the mRNA-modified EPCs to inflamed endothelium was detected. This study showed that the engineering of EPCs with homing factors encoding synthetic mRNAs increases the homing and migration potentials of these stem cells to inflamed endothelium. Thus, this strategy represents a promising strategy to increase the therapeutic potential of EPCs for the treatment of ischemic tissues.

Keywords: synthetic mRNA; EPCs; homing; engineering; angiogenesis; endothelium



Citation: Canjuga, D.; Steinle, H.; Mayer, J.; Uhde, A.-K.; Klein, G.; Wendel, H.P.; Schlensak, C.; Avci-Adali, M. Homing of mRNA-Modified Endothelial Progenitor Cells to Inflamed Endothelium. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1194. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061194>

Academic Editor: Maria Teresa Cruz

Received: 30 April 2022

Accepted: 30 May 2022

Published: 2 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cardiovascular diseases and the resulting complications, such as myocardial infarction, are among the leading causes of death worldwide. Injury and inflammation of the endothelial cells lining blood vessels, as well as the occlusion of blood vessels due to atherosclerosis and thrombosis, can lead to severe organ dysfunction and irreversible damage. Prolonged ischemia of the myocardium results in the irreversible loss of cardiomyocytes and vasculature, which are essential for maintaining cardiac integrity and function [1].

Endothelial progenitor cells (EPCs) are predifferentiated adult stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells [2]. EPCs are mobilized from the bone marrow to the peripheral blood after ischemia or vascular injury [3–5]. The recruitment of EPCs occurs through the release of EPC-mobilizing cytokines, such as vascular endothelial growth

factor (VEGF) [6], stromal-cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) [7–9], or granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF) [10], to regenerate injured ECs and induce revascularization at the site of injury [11].

In recent years, numerous studies have investigated the therapeutic effects of EPCs in cardiac repair [12–14]. The homing of EPCs to sites of vascular injury or neovascularization requires a dynamic and multistep process of mobilization, chemotaxis, tethering, adhesion, and migration into subendothelial tissue [15]. In this process, the release of chemokines from ischemic tissue and the interaction of EPC surface molecules with their ligands on activated endothelium both play an important role in EPC homing. SDF-1 α is a potent chemoattractant for EPC recruitment along a gradient toward ischemic tissue [16]. Our recent study [17] demonstrated the successful migration of EPCs towards SDF-1-mRNA-engineered EPCs. The function of SDF-1 α is induced by binding to C-X-C chemokine receptor 4 (CXCR4), which is expressed on EPCs [18,19]. In addition to chemotaxis, the expression of the adhesion molecules P-selectin and E-selectin on activated endothelium plays an important role in EPC adhesion and migration [20,21]. The ligand of these adhesion molecules is P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1), which mediates the attachment of circulating EPCs to inflamed endothelium [22].

However, previous clinical studies have shown that the low homing rate and low retention of circulating EPCs significantly limit the use of EPCs to promote angiogenesis. Thus, novel strategies are required to enable efficient treatment with EPCs. Therefore, various methods can be used to enhance and improve the homing of EPCs to desired areas, such as pretreatment of the target tissue or EPCs [23].

In recent years, the use of synthetic messenger RNA (mRNA) has attracted considerable interest due to several advantages [24]. Synthetic mRNAs are not integrated into the genome, avoiding the risks associated with insertional mutagenesis [25]. Furthermore, synthetic mRNAs are only transiently present in the cells until they are naturally degraded [26]. Thus, no footprints are left, and complications associated with permanent protein overexpression are prevented [27]. Compared to plasmid transfections, synthetic mRNA does not need to be delivered into the nucleus [28]. After the release of mRNA into the cytosol, the mRNA is immediately translated into proteins by cellular translation machinery under physiological conditions.

In this study, we investigate whether EPCs can be engineered using synthetic, modified mRNAs encoding CXCR4 and PSGL-1 to increase the expression of homing ligands on EPCs, and we analyze the homing potential of mRNA-modified EPCs to inflamed endothelium.

2. Materials and Methods

2.1. *In Vitro* Synthesis of Modified mRNA

pcDNA 3.3 vector (Aldevron, Fargo, ND, USA) that contained the coding sequence of murine PSGL-1 or CXCR4 was used as a template for the synthesis of DNA. The synthesis of DNA and the *in vitro* transcription (IVT) of mRNA were performed as previously described [17,29]. Briefly, to amplify the DNA sequence, a Hotstar HiFidelity Polymerase Kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used according to the manufacturer's instructions. For the PCR, 100 ng of plasmid DNA, 0.7 μ M of the forward primer (5'-TTG GAC CCT CGT ACA GAA GCT AAT ACG-3'), and 0.7 μ M of the reverse primer (T₁₂₀-CTT CCT ACT CAG GCT TTA TTC AAA GAC CA-3') (Ella Biotech, Martinsried, Germany) were used. The PCR products were generated using the following cycling protocol: an initial activation step at 95 °C for 5 min, followed by 25 cycles of denaturation at 95 °C for 45 s, annealing at 58 °C for 1 min, extension at 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 5 min. After the DNA amplification, the PCR products were purified using a QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) and were eluted in nuclease-free water (Qiagen, Hilden, Germany). The size and purity of the DNA were analyzed using 1% agarose gel electrophoresis at 100 V for 45 min and staining with 1 \times GelRed (Biotium, Fremont, CA, USA) in Tris-borate-EDTA (TBE) buffer.

Next, the IVT of the DNA into mRNA was performed using a MEGAscript T7 Kit (Life Technologies, Darmstadt, Germany) according to the manufacturer's instructions. Therefore, 40 μL of the IVT reaction mix containing 7.5 mM adenosine triphosphate (ATP), 1.875 mM guanosine triphosphate (GTP), 7.5 mM 5-methylcytidine-5'-triphosphate (m5CTP) (TriLink BioTechnologies, San Diego, CA, USA), 7.5 mM pseudouridine-5'-triphosphate (ψ -UTP) (TriLink BioTechnologies, San Diego, CA, USA), 2.5 mM 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G RNA Cap Structure Analog (ARCA) (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany), and 40 U RiboLock RNase inhibitor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was prepared in 1 \times reaction buffer and 1 \times T7 RNA polymerase enzyme mix. The IVT reaction mix was incubated for 4 h at 37 $^{\circ}\text{C}$. Afterwards, 1 μL TURBO DNase (T7 MEGAscript kit) was added to the IVT mix and incubated for 15 min at 37 $^{\circ}\text{C}$ to remove the remaining template DNA. Then, the mRNA was purified using a RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The mRNA was dephosphorylated using 5 U/mL Antarctic phosphatase (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany) at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min. The mRNA was purified again using a RNeasy Mini Kit, and the concentration was measured with a ScanDrop spectrophotometer (Analytic Jena, Jena, Germany) and adjusted to 100 ng/ μL with nuclease-free water. The size and purity of the synthesized mRNA were analyzed using 1% agarose gel electrophoresis, as described for the DNA analysis. The mRNA was stored at -80°C until use for transfection.

2.2. Cultivation of EPCs

Murine embryonic EPCs (T17b) [30] were cultivated in DMEM with high glucose and L-glutamine, containing 20% fetal bovine serum (FBS), 1 \times minimum essential medium (MEM) non-essential amino acid (NEAA) solution, 100 μM 2-mercaptoethanol, and 1% penicillin and streptomycin. All the reagents were obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). The cells were cultivated at 37 $^{\circ}\text{C}$ with 5% CO_2 , and the medium was changed every 2 to 3 days. After reaching a confluency of 70–80%, the cells were detached using 0.04% trypsin, 0.03% EDTA, and a trypsin-neutralizing solution (TNS, 0.05% trypsin inhibitor in 0.1% BSA; PromoCell, Heidelberg, Germany). After centrifugation for 5 min at 300 $\times g$, the cells were seeded onto 0.1% gelatin (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)-coated tissue flasks or cell culture plates.

2.3. Cultivation of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs)

HUVECs (ATCC[®], Manassas, VA, USA) were seeded in T75 cell culture flasks coated with 0.1% gelatin and were cultivated at 37 $^{\circ}\text{C}$ with 5% CO_2 in Vasculife[®] EnGS EC culture medium (CellSystems, Troisdorf, Germany) containing a Vasculife EnGS Life-Factors Kit, 50 mg/mL gentamicin, and 0.05 mg/mL amphotericin B (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The medium was changed every 3 days. After reaching 80% confluency, the cells were detached using trypsin, EDTA (0.04%, 0.03%, PromoCell, Heidelberg, Germany), and TNS (PromoCell, Heidelberg, Germany).

2.4. Transfection of EPCs with Synthetic, Modified mRNA

To perform the transfection experiments, 1×10^5 EPCs were seeded per well in a 6-well plate coated with 0.1% gelatin and incubated overnight at 37 $^{\circ}\text{C}$. The next day, single mRNA transfections were performed with 1 μg PSGL-1 or 1 μg CXCR4 mRNA and 2 μL Lipofectamine[®] 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in 0.5 mL Opti-MEM I serum-reduced medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Transfections with both the mRNAs were performed using 1 μg PSGL-1 and 1 μg CXCR4 mRNA with 4 μL Lipofectamine[®] 2000 (mRNA cocktail). To generate mRNA lipoplexes, the transfection mix was incubated for 20 min at room temperature (RT) and then added dropwise to the cells. After 4 h of incubation, the transfection medium was replaced with 2 mL fresh cell culture medium per well and further incubated overnight at 37 $^{\circ}\text{C}$. The cells incubated both with Opti-MEM alone and with transfection reagent (TR) served as controls.

2.5. Viability Assay

The impact of synthetic PSGL-1 and CXCR4 mRNA transfection on cell viability was investigated using a PrestoBlue™ assay (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Therefore, 1×10^5 EPCs were transfected with 1 μ g PSGL-1 or CXCR4 single mRNAs or with the mRNA cocktail containing both mRNAs with 1 μ g each for 4 h at 37 °C and incubated for 24 h in cell culture medium. Afterwards, the cells were washed once with Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) without $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, and 500 μ L $1 \times$ PrestoBlue™ cell viability reagent was added per well. After 1 h of incubation at 37 °C, the fluorescence intensity of 100 μ L supernatant was measured in triplicate at an excitation of 530 nm and an emission of 600 nm using a multimode microplate reader (Mithras LB 940, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany).

2.6. Analysis of CXCR4 and PSGL-1 Expression by Flow Cytometry

The expressions of CXCR4 and PSGL-1 on the surfaces of the EPCs were analyzed 24 h after transfection with the synthetic mRNA. Therefore, 1×10^5 transfected EPCs were detached, washed twice with 4% BSA/DPBS, and incubated with either PE rat anti-mouse CD162 (PSGL-1) antibody (BD Pharmingen, Heidelberg, Germany) or PE rat anti-mouse CXCR4 antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) for 45 min at RT. After washing twice with 4% BSA/DPBS for 5 min at 500 \times g, flow cytometry analysis of 10,000 cells was performed using a FACScan system (BD Biosciences, Heidelberg, Germany).

2.7. Analysis of E-Selectin Expression on HUVECs

To analyze the activation of the HUVECs, 1×10^5 HUVECs were seeded and cultivated at 37 °C with 5% CO_2 . After 24 h, the cells were activated with 10 ng/mL TNF- α (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) for 4 h in culture medium. After 4 h, HUVECs with or without TNF- α treatment were stained with 5 μ L mouse anti-human CD62E (E-selectin)-PE-conjugated antibody (Invitrogen, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions, and the E-selectin expression was analyzed using flow cytometry.

2.8. Chemotactic Migration Assay

The migration of modified EPCs towards a chemokine gradient was analyzed using a chemotactic migration assay. One day after the seeding of 1×10^5 EPCs onto 0.1% gelatin-coated wells, transfection with 1 μ g CXCR4 mRNA or mRNA cocktail (1 μ g CXCR4 mRNA and 1 μ g PSGL-1 mRNA) was performed for 4 h in Opti-MEM. Then, the transfection mix was removed, and cultivation medium was added for overnight incubation. The next day, 5×10^4 mRNA-modified EPCs were seeded onto transwell insert membranes with 8 μ m pores (Bio-One, Frickenhausen, Germany) coated with 0.1% gelatin. The transwell inserts were transferred to a 12-well plate containing 1% FBS serum-reduced culture medium and 50 ng/mL recombinant stromal-cell-derived factor 1 alpha (SDF-1 α) (PeproTech, Hamburg, Germany) and incubated for 6 h at 37 °C. Subsequently, the transwell inserts were rinsed in DPBS with $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ and fixed in ice-cold methanol (AnalaR NORMAPUR, VWR, Darmstadt, Germany) for 10 min. After washing with 0.5% BSA in DPBS, the cells at the bottom of the transwell inserts were stained with 1 μ g/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma Aldrich) in DPBS for 10 min at RT. The detection of the migrated cells was performed using fluorescence microscopy (Axiovert135, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). The number of migrated cells was determined for 4 different regions of each insert using ImageJ 1.5.1 software.

2.9. Dynamic Adhesion Assay

The adhesion capacity of the mRNA-modified EPCs under flow conditions was analyzed after the mRNA transfection. Therefore, 1×10^5 EPCs were seeded per well of a 6-well plate, transfected with the mRNA cocktail, and cultivated overnight at 37 °C and 5% CO_2 . The next day, the EPCs were stained with 2 μ M PKH-26 (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) in 1.5 mL DPBS without $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ for 5 min at RT. The staining process was

stopped by adding 1.5 mL FBS for 1 min, and the cells were washed twice in EPC medium. The cell number was adjusted to 1×10^5 cells/mL and transferred to a 10 mL syringe.

A total of 1×10^5 HUVECs were seeded onto 0.1% gelatin-coated 0.4 μ slides (Ibidi, Gräfelfing, Germany) and activated with 10 ng/mL TNF- α for 4 h at 37 °C with 5% CO₂. The perfusion of the EPCs over the activated endothelium was performed at a flow rate of 0.11 mL/min with a shear force equivalent to 0.1 dyn/cm². Images and video recordings were acquired after 1, 3, 5, and 7 min of perfusion using an Axiovert 135 microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) with an excitation of 550 nm. Analyses of the dynamic adhesion of mRNA-modified and unmodified EPCs to activated and nonactivated endothelium were performed using the MTrack function of ImageJ 1.5.1 software.

2.10. Single-Cell Atomic Force Microscopy (AFM)

AFM was used to measure the detachment force of the binding of mRNA-transfected and nontransfected EPCs to activated and nonactivated endothelium by measuring the force acting on the deflection of the cantilever and providing the signature of cell adhesion. A total of 5×10^4 HUVECs were seeded per gelatin-coated plate (\varnothing 6 cm²), cultivated overnight, and activated with 10 ng/mL TNF- α for 4 h. The EPCs were transfected with a cocktail of CXCR4 and PSGL-1 mRNAs (1 μ g each). After 24 h, the EPCs were detached, and a single cell was attached using a constant contact force of 1 nN for 30 s to an adhesive-coated tipless cantilever (All-in-One-cantilever D, 40 N/m nominal spring constant, Budget Sensors, Sofia, Bulgaria). The cantilever was coated with 10 μ L Corning® Cell-Tak in 300 μ L of 0.1 μ M bicarbonate buffer by incubating for 30 min at room temperature and rinsing with water.

The testing was performed in force spectroscopy mode by recording single force–distance curves at the position of interest (over a single HUVEC with neighboring cells) without laterally scanning the sample. The cantilever of the AFM (CellHesion 200, JPK Instruments, Berlin, Germany) was calibrated on the extend curve (vertical deflection), and its spring constant was determined using the thermal noise method of the data-processing software (JPK Instruments). The samples were measured at a maximum force of 800 nN with a pulling length of 90 μ m and an extend speed of 5 μ m/s in quadruplicate at four locations for each group. The deflection–detachment force curve was calculated using the data-processing software.

2.11. Statistical Analysis

The data are shown as mean + standard deviation (SD) or standard error of the mean (SEM). One- or two-way analysis of variance (ANOVA) was performed, followed by Bonferroni's multiple comparisons test. To compare the means of two groups, a *t*-test was performed. All the analyses were performed using GraphPad Prism version 9.0.1. Differences of *p* < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Analysis of CXCR4 and PSGL-1 Expression after the Transfection of EPCs with Synthetic, Modified mRNAs Encoding CXCR4 and PSGL-1

After the successful synthesis of the synthetic mRNAs, the expressions of CXCR4 and PSGL-1 on the EPCs were determined. Therefore, single mRNA transfections with 1 μ g CXCR4 or PSGL-1 or transfections with an mRNA cocktail consisting of 1 μ g each of both the mRNAs were performed. The expressions of CXCR4 and PSGL-1 were measured using flow cytometry 24 h after transfection (Figure 1). After transfection with CXCR4 mRNA, 52% of the analyzed EPCs expressed CXCR4 on their cell surfaces, and transfection with PSGL-1 mRNA resulted in the expression of PSGL-1 on the surfaces of 64% of the EPCs. The cells transfected with the mRNA cocktail (CXCR4 and PSGL-1 mRNA) also showed elevated expressions of CXCR4 (56%) and PSGL-1 (76%).

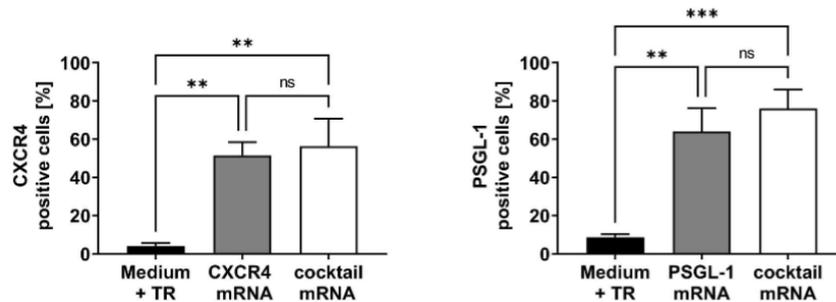


Figure 1. Analysis of CXCR4 and PSGL-1 expressions on the surfaces of EPCs after transfection with CXCR4 and PSGL-1 mRNA. A total of 1×10^5 EPCs were seeded and transfected after 24 h with either 1 μ g CXCR4, 1 μ g PSGL-1 mRNA, or both mRNAs (mRNA cocktail). The CXCR4 and PSGL-1 expressions on the cell surfaces were analyzed 24 h post-transfection using flow cytometry. Cells treated only with medium and transfection reagent (TR) were used as negative control. Results are shown as mean + SD ($n = 3$). Statistical differences were determined using one-way ANOVA multiple comparisons, followed by Bonferroni's multiple comparisons test (** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$; ns: nonsignificant).

3.2. Analysis of Cell Viability of EPCs after Transfection with Synthetic, Modified CXCR4 or PSGL-1 mRNAs

To investigate the effect of mRNA transfection on the viability of EPCs, a PrestoBlue™ cell viability assay was performed 24 h after the mRNA transfection. The viability of cells incubated with medium was set to 100%, and the viability of the transfected cells was determined relative to the control. As shown in Figure 2, the transfection of EPCs with synthetic mRNA did not influence the cell viability.

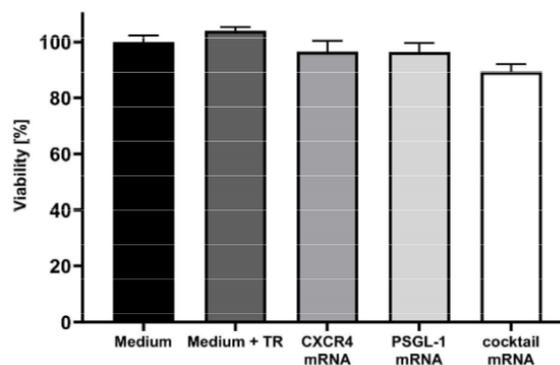


Figure 2. Analysis of cell viability of EPCs after transfection with CXCR4 and PSGL-1 mRNA. A total of 1×10^5 cells were seeded and transfected after 24 h with 1 μ g of CXCR4, PSGL-1 mRNA, or both mRNAs (mRNA cocktail). The viability was analyzed 24 h post-transfection using a PrestoBlue™ cell viability assay. The viability of cells incubated only with the medium was set to 100%. Results are shown as mean + SEM ($n = 3$).

3.3. Chemotactic Migration Assay of EPCs toward Chemoattractant SDF1- α

An important chemoattractant for the homing of EPCs to a site of injury is SDF-1 α , which directs EPC migration by binding to CXCR4. Therefore, the chemotactic migration potential of mRNA-modified EPCs was determined using a transwell migration assay.

After transfection with 1 μg CXCR4 mRNA or the mRNA cocktail (1 μg CXCR4 and 1 μg PSGL-1 mRNA) and further overnight incubation, 5×10^4 cells were seeded into transwell inserts and analyzed after 6 h of incubation. The migrated cells were stained with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI and automatically counted using Image J software (Figure 3).

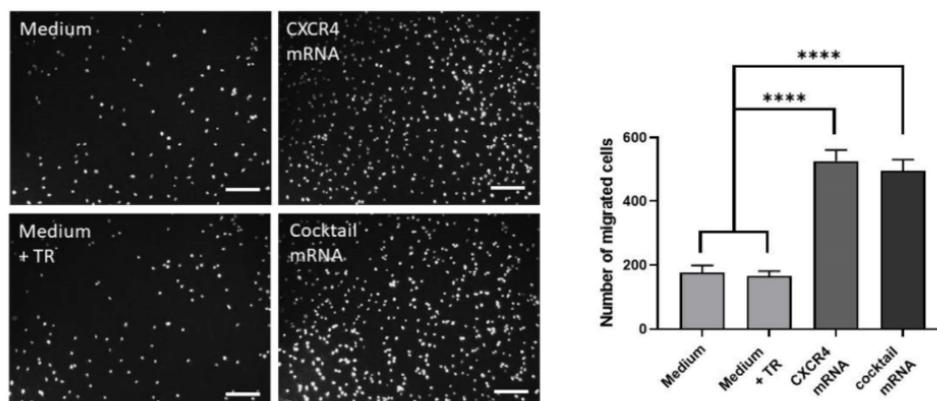


Figure 3. Chemotactic migration of mRNA-modified EPCs. A total of 1×10^5 EPCs were transfected with either 1 μg CXCR4 mRNA or with an mRNA cocktail containing 1 μg CXCR4 and 1 μg PSGL-1 mRNA. After overnight cultivation, 5×10^4 EPCs were seeded in 8 μm transwell inserts to analyze their migration capacity towards 50 ng/mL SDF-1 α in a serum-reduced medium. Chemotactic migration was analyzed after 6 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ by counting DAPI-stained migrated cells using ImageJ software. As controls, EPCs incubated with medium and medium containing transfection reagent (TR) were used. Scale bars represent 200 μm . Results are shown as mean + SD ($n = 4$). Statistical differences were determined using one-way ANOVA multiple comparisons, followed by Bonferroni's multiple comparisons test (**** $p < 0.0001$).

EPCs transfected with CXCR4 mRNA (525 ± 10 cells) or the mRNA cocktail (CXCR4 and PSGL-1 mRNA; 495 ± 7 cells) resulted in a significantly increased migration rate compared with EPCs without mRNA transfection (medium: 168 ± 18 cells; medium + TR: 165 ± 12). This revealed enhanced and directed migration of the CXCR4-modified EPCs towards chemoattractant SDF1- α , indicating improved homing potential compared with cells expressing CXCR4 at basal levels.

3.4. Single-Cell AFM Analysis of the Adhesion of mRNA-Modified EPCs to TNF- α -Activated Endothelium

The adhesion of mRNA-transfected and nontransfected EPCs to TNF- α -activated and nonactivated HUVECs was further analyzed to determine the binding strength of EPCs to the endothelium using single-cell AFM. EPCs modified with the mRNA cocktail encoding for CXCR4 and PSGL-1 were able to bind three-fold stronger to activated endothelium than unmodified EPCs, as demonstrated by the higher detachment force required to release the cell–cell interaction of a single EPC from activated HUVECs (Figure 4). In addition, mRNA-modified EPCs showed 1.8-fold stronger binding to activated endothelium than nonactivated endothelium.

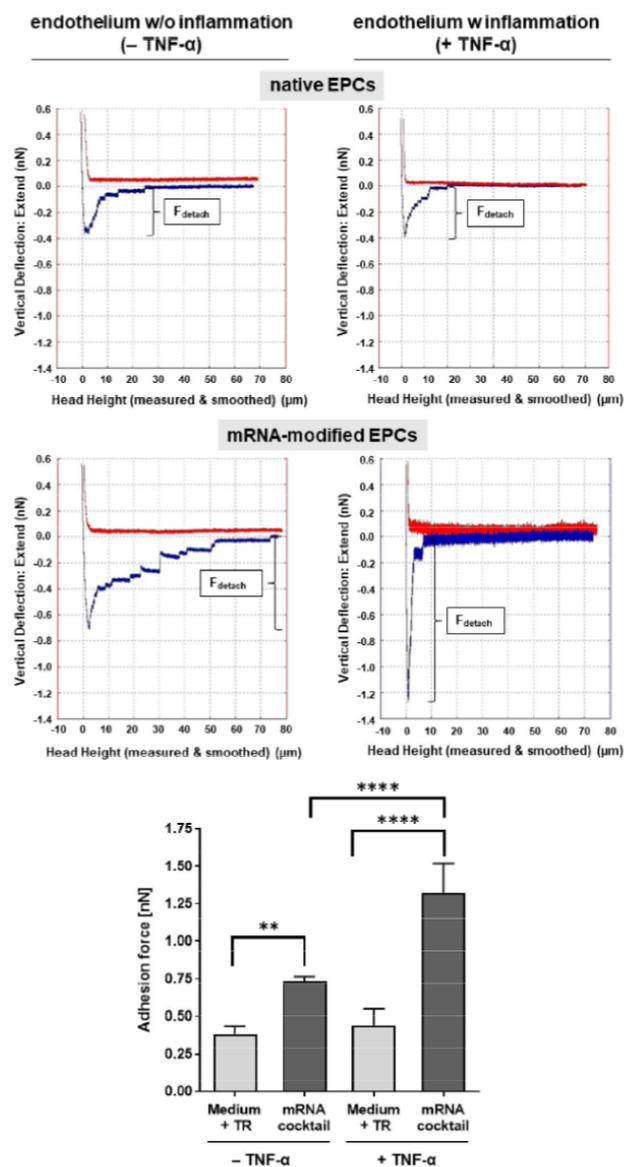


Figure 4. Analysis of the adhesion strength of EPCs to activated endothelium using single-cell atomic force microscopy (AFM). Representative histograms of the adhesion signature of CXCR4 and PSGL-1 mRNA (mRNA cocktail) modified and native EPCs to TNF- α -activated and nonactivated endothelium and the quantification of adhesion forces are shown. Bonds formed between the cell surface ligands (PSGL-1) and molecules on HUVECs (E-selectin) broke slightly with increasing force until the cell completely detached from the HUVEC. The maximum downward force of the cantilever's tip is referred to as detachment force (F_{detach}). ($n = 4$). Statistical analysis was performed using two-way ANOVA, followed by Bonferroni's multiple comparisons test (** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$).

3.5. Adhesion of mRNA-Modified EPCs on TNF- α -Activated Endothelium in a Dynamic Flow Model

The homing of mRNA-modified EPCs on inflamed endothelium was analyzed in a dynamic flow model. To stimulate inflamed conditions in vitro, the HUVECs were treated with 10 ng/mL TNF- α , which is a strong activator of the endothelium. As shown in Figure 5A, the treatment of HUVECs with TNF- α resulted in a significant upregulation of E-selectin expression compared with untreated cells, demonstrating the inflammatory response of the endothelial cells to TNF- α .

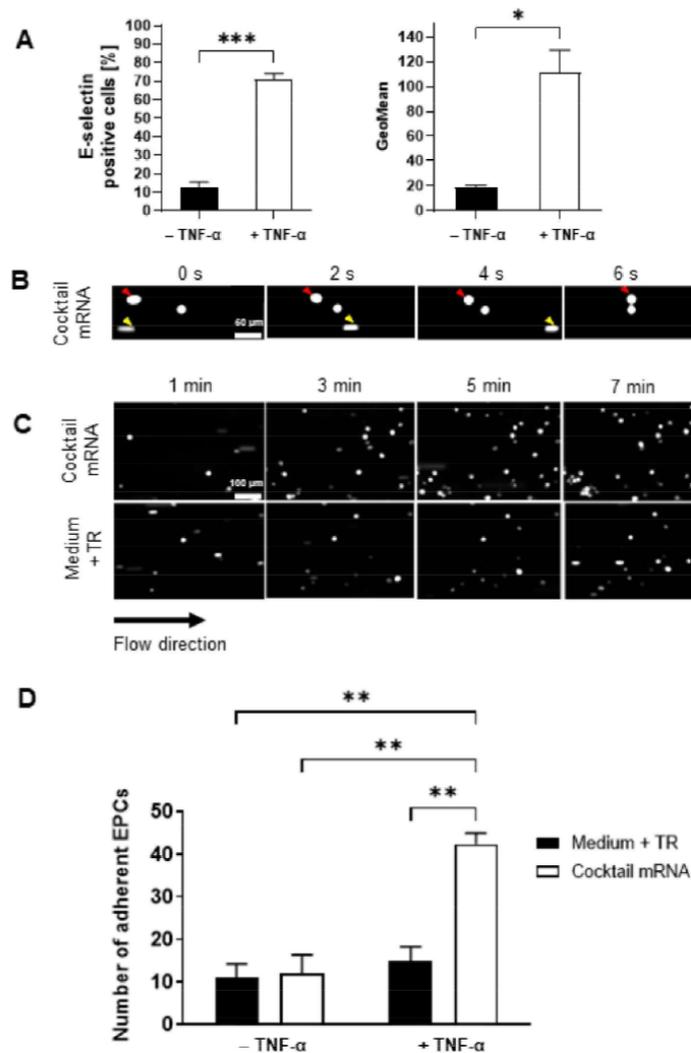


Figure 5. Dynamic adhesion of mRNA-modified EPCs to activated endothelium. (A) HUVECs were treated with 10 ng/mL TNF- α , and E-selectin expression was analyzed by flow cytometry to analyze

the successful activation of the cells. ($n = 3$). Statistical analysis was performed using a *t*-test ($* p < 0.05$ and $*** p < 0.001$). (B) EPCs were transfected with an mRNA cocktail of CXCR4 and PSGL-1 mRNA (1 μg each). After 24 h, the cells were stained with PKH26 and perfused over TNF- α -activated HUVECs in a flow chamber at 0.11 mL/min and a shear stress of 0.1 dyn/m². (B) Representative images of rolling EPCs are shown every 2 s. Red arrows indicate a slowly rolling cell, and yellow arrows point to a fast-moving cell not interacting with the activated HUVECs. (C) Representative images of recordings at 1, 3, 5, and 7 min after starting the flow. (D) The number of EPCs adhered to HUVECs after 7 min was quantified ($n = 3$). Statistical analysis was performed using two-way ANOVA, followed by Bonferroni's multiple comparisons test ($** p < 0.01$).

Next, mRNA-cocktail (CXCR4 and PSGL-1 mRNA, 1 μg each)-transfected and untransfected EPCs were perfused over the activated HUVECs at a constant flow rate of 0.11 mL/min with a defined shear force of 0.1 dyn/m² to simulate the process of EPC adhesion. As highlighted in Figure 5B, the EPCs rolled on the activated endothelium and permanently adhered to it (red arrow). A fast-moving and non-adhering EPC in Figure 5B is indicated by the yellow arrows in the time course (0, 2, 4, and 6 s). Representative images of recordings (Supplementary Videos S1 and S2) at 1, 3, 5, and 7 min after starting the flow (Figure 5C) showed that mRNA-engineered EPCs interacted more strongly with the activated endothelium and attached to the inflamed endothelial cell surface in increased numbers, suggesting that adhesion molecules improved the rolling and adhesion of EPCs to the inflamed endothelium. In contrast, the unmodified EPCs adhered less to the activated endothelium. The quantification of adhered EPCs on the endothelium revealed that a significantly higher number of mRNA-transfected EPCs adhered to the activated endothelium within 7 min (cocktail mRNA: 42 ± 5 cells) compared with unmodified EPCs (Medium + TR: 15 ± 6 cells) (Figure 5D).

4. Discussion

The combined approach of cell therapy with synthetic, modified mRNAs represents a promising strategy to improve the revascularization and regeneration of ischemic tissues. In this study, we demonstrated the efficient modification of EPCs with synthetic mRNAs to express CXCR4 and PSGL-1 on cell surfaces to enhance their homing potentials to inflamed endothelium. The mRNA modification allowed EPCs to migrate and adhere more efficiently to the activated endothelium. Thus, this approach may represent a promising strategy for the treatment and regeneration of ischemic tissues.

EPCs play an essential role in postnatal vascular repair and remodeling through vasculogenesis and angiogenesis and offer a promising therapeutic option for vascular diseases [31]. Their mobilization from bone marrow and efficient homing to ischemic areas is, therefore, crucial for successful tissue regeneration and the limitation of tissue damage. Both the influence of tissue ischemia as an endogenous stimulus and the exogenous administration of cytokines (e.g., granulocyte macrophage-colony-stimulating factor, GM-CSF) were previously studied for the mobilization of EPCs [32]. The induction of ischemia in rabbit and mouse models resulted in an increased frequency of circulating EPCs [32]. In patients with acute myocardial infarction or coronary artery disease (CAD), increased numbers of EPCs have been mobilized and detected in circulation, as well as high VEGF levels, which have correlated with EPC levels [33,34].

The homing of EPCs is mainly mediated by various cytokines and chemokines. VEGF has been shown to promote mobilization and contribute to neovascularization [6,11,35]. Other growth factors or chemokines, such as angiopoietin-1 (ANG-1) or SDF-1 α , have also been shown to stimulate EPC recruitment [35,36]. However, previous studies have shown that the functionality of EPCs derived from patients with CAD is impaired [37,38], indicating an insufficient ability to home to the ischemic regions even after mobilization from the bone marrow. To overcome these limitations and to improve angiogenesis, various methods, such as pretreatment of the target tissue or EPCs, have been investigated in the past using viral vectors encoding VEGF-A [39,40], HIF-1 α [41], or plasmid-DNA-encoding

SDF-1 [42]. SDF-1 is released from ischemic tissues and contributes to EPC homing by interacting with CXCR4 on the surface of EPCs [36]. Thus, in previous studies, induced mobilization of EPCs and enhanced angiogenesis have been observed after applications of SDF-1-encoding plasmid to the ischemic hind limbs of mice [43] or the ischemic myocardium of rats [44]. Although the use of cytokines is a promising approach to treat ischemia, side effects can occur due to the permanent expression of angiogenesis-inducing factors. Thus, a promising approach to circumvent the potential side effects of continuous exogenous protein expression is the use of transiently present, synthetic mRNA. In our recent study, synthetic mRNAs encoding the angiogenic factors ANG-1, SDF-1 α , and VEGF-A were used to modify EPCs [17], and enhanced chemotactic migration and angiogenic potential were demonstrated *in vitro* and *in vivo* in a chicken chorioallantoic membrane (CAM) assay, particularly by using ANG-1-encoding, mRNA-modified EPCs.

In this study, the transfection of EPCs with synthetic mRNAs encoding CXCR4 or PSGL-1 resulted in an increased expression of the CXCR4 homing factor and the PSGL-1 adhesion molecule after single and combined (cocktail) applications of the mRNAs without detecting any negative effects on cell viability.

The chemokine SDF-1 α binds to the CXCR4 chemokine receptor, which promotes homing towards damaged tissue [18,19]. Thus, significantly increased migration of the EPCs transfected with single or cocktail CXCR4 and PSGL-1 mRNA was observed compared with native EPCs, demonstrating the importance of CXCR4 in the homing process. In addition, single-cell AFM measurements showed that CXCR4- and PSGL-1-mRNA-modified EPCs adhered significantly more strongly to the inflamed endothelium than the unmodified EPCs, leading to higher forces required for the detachment of the EPCs from TNF- α -activated and nonactivated endothelium. The activation of the endothelium with TNF- α resulted in increased E-selectin expression, which led to a stronger binding of mRNA-modified EPCs to the activated endothelium than to the nonactivated endothelium.

A dynamic adhesion assay was used to simulate the homing and adherence of circulating EPCs to inflamed or injured vascular endothelium *in vitro*. EPCs transfected with the mRNA cocktail adhered and accumulated more on TNF- α -activated endothelium than on non-activated endothelium. Furthermore, no differences were observed on the nonactivated endothelium between mRNA-modified and unmodified EPCs, suggesting that modified EPCs efficiently homed only to the injured and inflamed endothelium. In contrast, on activated endothelium, EPCs modified with mRNA showed increased binding compared with unmodified EPCs.

In addition to chemokines guiding the cells to tissue injury sites, the adhesion molecules and their ligands also play a crucial role in the tethering of mobilized EPCs to the injured endothelium. EPCs express β_2 -integrins that can interact with the main ligand intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on the surface of the injured endothelium [45]. Thus, several studies have shown that increased ICAM-1 expression in ischemic muscle tissue leads to the increased recruitment of EPCs, angiogenesis, and the repair of damaged tissue [46,47]. These studies have indicated that stimulating the expression of molecules involved in the tethering of EPCs to inflamed endothelium can increase the binding and, thereby, improve the homing of EPCs at required sites. The transfection of EPCs with CXCR4 and PSGL-1 mRNA increased the adhesion forces and homing to activated endothelium in the dynamic adhesion assay, confirming the potency of this strategy. The enhanced binding of EPCs to E-selectin and P-selectin as a result of increased PSGL-1 expression was also demonstrated by Foubert et al. after the activation of EphB4 with an ephrin-B2-Fc chimeric protein [22].

Previous studies have shown that the number, function, and survival of EPCs are impaired in the elderly [48,49]. Thus, due to the impaired functionality and engraftment of EPCs, the clinical application of EPCs for cardiovascular cell repair therapies faces some obstacles in elderly patients [50]. To improve the function of EPCs and their repair capacity, they can be treated with growth factors, such as hepatocyte growth factor (HGF) [51], insulin-like growth factor (IGF-1) [52], or bone morphogenetic protein 4 (BMP4) [53]. Moreover, Li and colleagues showed that the transfection of EPCs with miR-

326-5p significantly enhanced the angiogenic capacity of EPCs [54]. The transplantation of miR-326-5p-overexpressing EPCs improved cardiac function in an acute myocardial infarction model in mice. In a recent study, the treatment of EPCs with exosomes derived from SIRT1-overexpressing adipose-derived stem cells (ADSCs) [55] led to an increased expression of C-X-C motif chemokine 12 (CXCL12) and nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) in EPCs from acute myocardial infarction patients and, thereby, improved the function of these EPCs. In another study, Masuda et al. demonstrated that the use of a new culture medium called the Quality and Quantity culture medium (QQ culture medium) for peripheral blood mononuclear cells (PBMNCs) could improve the vasculogenesis and angiogenesis functions of MNCs from healthy subjects [56]. Subsequently, this medium was also shown to increase the vasculogenic potential of diabetic human peripheral blood CD34+ cells compared with untreated cells [57]. In a recent study, Chruewkamlow et al. used this culture medium to analyze the influence on the functionality of PBMNCs derived from patients with chronic limb-threatening ischemia (CLTI) [58]. Culturing MNCs in QQ culture medium increased the percentage of CD34+/CD133+ cells (EPCs) and the anti-inflammatory cell population and resulted in improved angiogenesis compared to MNCs cultured in standard culture medium. Thus, the QQ culture medium could be used in combination with an mRNA-engineering strategy to increase the number of EPCs in the culture and compensate for the functional deficits of EPCs in clinical use. Moreover, the mRNA engineering of EPCs prior to transplantation could significantly improve the efficacy of EPC-based therapies by enhancing their homing to desired sites.

However, the synthetic-mRNA-based engineering strategy of EPCs used in this study requires the isolation and cultivation of EPCs from patients. This can be time-consuming and can hinder urgent applications. In addition, the quantities of EPCs in peripheral blood are low; thus, patients could be treated with cytokines such as G-CSF to increase the number of EPCs in the peripheral blood. However, the CD34+/CD133+ positive cells (EPCs) could also be isolated from bone marrow, adipose tissue, or peripheral blood using magnetic beads or flow cytometry to obtain higher numbers of EPCs that could be directly transfected with synthetic mRNAs and applied.

The use of synthetic mRNAs encoding adhesion molecules and their ligands, such as CXCR4 and PSGL-1, represents a novel method to increase the homing and adhesion of EPCs in ischemic tissue to overcome low retention rates after transplantation. Since exogenous protein expression is induced only transiently without the risk of genomic integration, potential side effects can be reduced, allowing the effective treatment of patients with ischemic cardiovascular diseases.

5. Conclusions

In this study, we demonstrated that the modification of EPCs with synthetic mRNAs encoding for CXCR4 and PSGL-1 improved the homing and adhesion of EPCs to inflamed endothelium. The increased expressions of CXCR4 and PSGL-1 were demonstrated after the single or combined mRNA transfection of EPCs with CXCR4- and PSGL-1-encoding mRNA. Furthermore, the improved migration and adhesion capacity of mRNA-modified EPCs was shown. Synthetic-mRNA-based cell engineering technology is a promising approach for the expression of desired receptors on stem cells to improve their homing potential to desired sites in the body and can enable the personalized treatment of various ischemic diseases such as myocardial infarction, strokes, or limb ischemia to improve the vascularization and regeneration of tissues.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics14061194/s1>, Video S1: Native EPCs; Video S2: mRNA modified EPCs.

Author Contributions: Conceptualization, M.A.-A.; methodology, D.C., H.S., J.M., A.-K.U. and G.K.; validation, D.C., H.S., J.M. and A.-K.U.; formal analysis, H.S., J.M., A.-K.U. and D.C.; investigation, D.C., H.S., J.M., A.-K.U. and M.A.-A.; resources, G.K., H.P.W., C.S. and M.A.-A.; data curation, D.C.,

H.S., J.M., A.-K.U. and G.K.; writing—original draft preparation, D.C. and M.A.-A.; writing—review and editing, H.S., H.P.W., C.S. and M.A.-A.; visualization, D.C.; supervision, H.S. and M.A.-A.; project administration, M.A.-A.; funding acquisition, H.P.W., M.A.-A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We acknowledge support by the Interdisciplinary Doctoral College of Medicine at the University of Tübingen and the Open Access Publishing Fund of the University of Tübingen. Furthermore, we thank Antonis K. Hatzopoulos for generously providing embryonal murine T17b endothelial progenitor cells.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Wu, X.; Reboll, M.R.; Korf-Klingebiel, M.; Wollert, K.C. Angiogenesis after acute myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* **2020**, *117*, 1257–1273. [\[CrossRef\]](#)
2. Avci-Adali, M.; Paul, A.; Ziemer, G.; Wendel, H.P. New strategies for in vivo tissue engineering by mimicry of homing factors for self-endothelialisation of blood contacting materials. *Biomaterials* **2008**, *29*, 3936–3945. [\[CrossRef\]](#)
3. Inoue, T.; Sata, M.; Hikichi, Y.; Sohma, R.; Fukuda, D.; Uchida, T.; Shimizu, M.; Komoda, H.; Node, K. Mobilization of CD34-positive bone marrow-derived cells after coronary stent implantation: Impact on restenosis. *Circulation* **2007**, *115*, 553–561. [\[CrossRef\]](#)
4. Massa, M.; Rosti, V.; Ferrario, M.; Campanelli, R.; Ramajoli, I.; Rosso, R.; De Ferrari, G.M.; Ferlini, M.; Goffredo, L.; Bertoletti, A.; et al. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood* **2005**, *105*, 199–206. [\[CrossRef\]](#)
5. Sobrino, T.; Hurtado, O.; Moro, M.A.; Rodríguez-Yáñez, M.; Castellanos, M.D.M.; Brea, D.; Moldes, O.; Blanco, M.; Arenillas, J.F.; Leira, R.; et al. The Increase of Circulating Endothelial Progenitor Cells After Acute Ischemic Stroke Is Associated with Good Outcome. *Stroke* **2007**, *38*, 2759. [\[CrossRef\]](#)
6. Asahara, T. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J.* **1999**, *18*, 3964–3972. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Askari, A.T.; Unzek, S.; Popovic, Z.B.; Goldman, C.K.; Forudi, F.; Kiedrowski, M.; Rovner, A.; Ellis, S.G.; Thomas, J.D.; DiCorleto, P.E.; et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* **2003**, *362*, 697–703. [\[CrossRef\]](#)
8. Ceradini, D.J.; Kulkarni, A.R.; Callaghan, M.J.; Tepper, O.M.; Bastidas, N.; Kleinman, E.M.; Capla, J.M.; Galiano, R.D.; Levine, J.P.; Gurtner, G.C. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 858–864. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Li, J.-H.; Li, Y.; Huang, D.; Yao, M. Role of Stromal Cell-Derived Factor-1 in Endothelial Progenitor Cell-Mediated Vascular Repair and Regeneration. *Tissue Eng. Regen. Med.* **2021**, *18*, 747–758. [\[CrossRef\]](#)
10. Orlic, D.; Kajstura, J.; Chimenti, S.; Limana, F.; Jakoniuk, I.; Quaini, F.; Nadal-Ginard, B.; Bodine, D.M.; Leri, A.; Anversa, P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 10344–10349. [\[CrossRef\]](#)
11. Asahara, T.; Masuda, H.; Takahashi, T.; Kalka, C.; Pastore, C.; Silver, M.; Kearne, M.; Magner, M.; Isner, J.M. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ. Res.* **1999**, *85*, 221–228. [\[CrossRef\]](#)
12. Sun, R.; Wang, X.; Nie, Y.; Hu, A.; Liu, H.; Zhang, K.; Zhang, L.; Wu, Q.; Li, K.; Liu, C.; et al. Targeted trapping of endogenous endothelial progenitor cells for myocardial ischemic injury repair through neutrophil-mediated SPIO nanoparticle-conjugated CD34 antibody delivery and imaging. *Acta Biomater.* **2022**. [\[CrossRef\]](#)
13. Deutsch, M.-A.; Brunner, S.; Grabmaier, U.; David, R.; Ott, I.; Huber, B.C. Cardioprotective potential of human endothelial-colony forming cells from diabetic and nondiabetic donors. *Cells* **2020**, *9*, 588. [\[CrossRef\]](#)
14. Brunt, K.R.; Wu, J.; Chen, Z.; PoECKel, D.; Dercho, R.A.; Melo, L.G.; Funk, C.D.; Ward, C.A.; Li, R.-K. Ex Vivo Akt/HO-1 Gene Therapy to Human Endothelial Progenitor Cells Enhances Myocardial Infarction Recovery. *Cell Transplant.* **2012**, *21*, 1443–1461. [\[CrossRef\]](#)
15. Langer, H.; May, A.E.; Daub, K.; Heinzmann, U.; Lang, P.; Schumm, M.; Vestweber, D.; Massberg, S.; Schönberger, T.; Pfisterer, I.; et al. Adherent Platelets Recruit and Induce Differentiation of Murine Embryonic Endothelial Progenitor Cells to Mature Endothelial Cells In Vitro. *Circ. Res.* **2006**, *98*, e2–e10. [\[CrossRef\]](#)
16. Chavakis, E.; Urbich, C.; Dimmeler, S. Homing and engraftment of progenitor cells: A prerequisite for cell therapy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2008**, *45*, 514–522. [\[CrossRef\]](#)

17. Steinle, H.; Golombek, S.; Behring, A.; Schlensak, C.; Wendel, H.P.; Avci-Adali, M. Improving the Angiogenic Potential of EPCs via Engineering with Synthetic Modified mRNAs. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2018**, *13*, 387–398. [\[CrossRef\]](#)
18. Hoenig, M.R.; Bianchi, C.; Sellke, F.W. Hypoxia inducible factor-1 alpha, endothelial progenitor cells, monocytes, cardiovascular risk, wound healing, cobalt and hydralazine: A unifying hypothesis. *Curr. Drug Targets* **2008**, *9*, 422–435. [\[CrossRef\]](#)
19. Kawakami, Y.; Li, M.; Matsumoto, T.; Kuroda, R.; Kuroda, T.; Kwon, S.M.; Kawamoto, A.; Akimaru, H.; Mifune, Y.; Shoji, T.; et al. SDF-1/CXCR4 axis in Tie2-lineage cells including endothelial progenitor cells contributes to bone fracture healing. *J. Bone Miner. Res.* **2015**, *30*, 95–105. [\[CrossRef\]](#)
20. Liu, Z.J.; Tian, R.; An, W.; Zhuge, Y.; Li, Y.; Shao, H.; Habib, B.; Livingstone, A.S.; Velazquez, O.C. Identification of E-selectin as a novel target for the regulation of postnatal neovascularization: Implications for diabetic wound healing. *Ann. Surg.* **2010**, *252*, 625–634. [\[CrossRef\]](#)
21. Oh, I.-Y.; Yoon, C.-H.; Hur, J.; Kim, J.-H.; Kim, T.-Y.; Lee, C.-S.; Park, K.-W.; Chae, I.-H.; Oh, B.-H.; Park, Y.-B.; et al. Involvement of E-selectin in recruitment of endothelial progenitor cells and angiogenesis in ischemic muscle. *Blood* **2007**, *110*, 3891–3899. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Foubert, P.; Silvestre, J.-S.; Souttou, B.; Barateau, V.; Martin, C.; Ebrahimian, T.G.; Leré-Déan, C.; Contreres, J.O.; Sulpice, E.; Levy, B.I.; et al. PSGL-1-mediated activation of EphB4 increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 1527–1537. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Avci-Adali, M.; Perle, N.; Ziemer, G.; Wendel, H.P. Current concepts and new developments for autologous in vivo endothelialisation of biomaterials for intravascular applications. *Eur. Cells Mater.* **2011**, *21*, 157–176. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Steinle, H.; Weber, J.; Stoppelkamp, S.; Große-Berkenbusch, K.; Golombek, S.; Weber, M.; Canak-Ipek, T.; Trenz, S.-M.; Schlensak, C.; Avci-Adali, M. Delivery of synthetic mRNAs for tissue regeneration. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2021**, *179*, 114007. [\[CrossRef\]](#)
25. Sahin, U.; Karikó, K.; Türeci, Ö. mRNA-based therapeutics—developing a new class of drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 759–780. [\[CrossRef\]](#)
26. Hajj, K.A.; Whitehead, K.A. Tools for translation: Non-viral materials for therapeutic mRNA delivery. *Nat. Rev. Mater.* **2017**, *2*, 1–17. [\[CrossRef\]](#)
27. Wadhwa, A.; Aljabbari, A.; Lokras, A.; Foged, C.; Thakur, A. Opportunities and challenges in the delivery of mRNA-based vaccines. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 102. [\[CrossRef\]](#)
28. Zhong, Z.; Mc Cafferty, S.; Combes, F.; Huysmans, H.; De Temmerman, J.; Gitsels, A.; Vanrompay, D.; Catani, J.P.; Sanders, N.N. mRNA therapeutics deliver a hopeful message. *Nano Today* **2018**, *23*, 16–39. [\[CrossRef\]](#)
29. Avci-Adali, M.; Behring, A.; Steinle, H.; Keller, T.; Krajewski, S.; Schlensak, C.; Wendel, H.P. In Vitro Synthesis of Modified mRNA for Induction of Protein Expression in Human Cells. *J. Vis. Exp.* **2014**, *93*, e51943. [\[CrossRef\]](#)
30. Hatzopoulos, A.K.; Folkman, J.; Vasile, E.; Eiselen, G.K.; Rosenberg, R.D. Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from mouse embryos. *Development* **1998**, *125*, 1457–1468. [\[CrossRef\]](#)
31. Leal, V.; Ribeiro, C.F.; Oliveiros, B.; António, N.; Silva, S. Intrinsic Vascular Repair by Endothelial Progenitor Cells in Acute Coronary Syndromes: An Update Overview. *Stem Cell Rev. Rep.* **2018**, *15*, 35–47. [\[CrossRef\]](#)
32. Takahashi, T.; Kalka, C.; Masuda, H.; Chen, D.; Silver, M.; Kearney, M.; Magner, M.; Isner, J.M.; Asahara, T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 434–438. [\[CrossRef\]](#)
33. Gill, M.; Dias, S.; Hattori, K.; Rivera, M.L.; Ilicklin, D.; Witte, L.; Girardi, L.; Yurt, R.; Ilimel, I.; Rafii, S. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ. Res.* **2001**, *88*, 167–174. [\[CrossRef\]](#)
34. Shintani, S.; Murohara, T.; Ikeda, H.; Ueno, T.; Honma, T.; Katoh, A.; Sasaki, K.-I.; Shimada, T.; Oike, Y.; Imaizumi, T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* **2001**, *103*, 2776–2779. [\[CrossRef\]](#)
35. Hattori, K.; Dias, S.; Heissig, B.; Hackett, N.R.; Lyden, D.; Tateno, M.; Hicklin, D.J.; Zhu, Z.; Witte, L.; Crystal, R.G.; et al. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* **2001**, *193*, 1005–1014. [\[CrossRef\]](#)
36. Yamaguchi, J.-I.; Kusano, K.F.; Masuo, O.; Kawamoto, A.; Silver, M.; Murasawa, S.; Bosch-Marce, M.; Masuda, H.; Losordo, D.W.; Isner, J.M.; et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* **2003**, *107*, 1322–1328. [\[CrossRef\]](#)
37. Heeschen, C.; Lehmann, R.; Honold, J.; Assmus, B.; Aicher, A.; Walter, D.H.; Martin, H.; Zeiher, A.M.; Dimmeler, S. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation* **2004**, *109*, 1615–1622. [\[CrossRef\]](#)
38. Vasa, M.; Fichtlscherer, S.; Aicher, A.; Adler, K.; Urbich, C.; Martin, H.; Zeiher, A.M.; Dimmeler, S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ. Res.* **2001**, *89*, E1–E7. [\[CrossRef\]](#)
39. Iwaguro, H.; Yamaguchi, J.-I.; Kalka, C.; Murasawa, S.; Masuda, H.; Hayashi, S.-I.; Silver, M.; Li, T.; Isner, J.M.; Asahara, T. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation* **2002**, *105*, 732–738. [\[CrossRef\]](#)

40. Shimpo, M.; Ikeda, U.; Maeda, Y.; Takahashi, M.; Miyashita, H.; Mizukami, H.; Urabe, M.; Kume, A.; Takizawa, T.; Shibuya, M.; et al. AAV-mediated VEGF gene transfer into skeletal muscle stimulates angiogenesis and improves blood flow in a rat hindlimb ischemia model. *Cardiovasc. Res.* **2002**, *53*, 993–1001. [\[CrossRef\]](#)
41. Jiang, M.; Wang, B.; Wang, C.; He, B.; Fan, H.; Shao, Q.; Gao, L.; Liu, Y.; Yan, G.; Pu, J. In vivo enhancement of angiogenesis by adenoviral transfer of III β -1 α -modified endothelial progenitor cells (Ad-III β -1 α -modified EPC for angiogenesis). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2008**, *40*, 2284–2295. [\[CrossRef\]](#)
42. Kuliszewski, M.A.; Kobulnik, J.; Lindner, J.R.; Stewart, D.J.; Leong-Poi, H. Vascular gene transfer of SDF-1 promotes endothelial progenitor cell engraftment and enhances angiogenesis in ischemic muscle. *Mol. Ther.* **2011**, *19*, 895–902. [\[CrossRef\]](#)
43. Hiasa, K.I.; Ishibashi, M.; Ohtani, K.; Inoue, S.; Zhao, Q.; Kitamoto, S.; Sata, M.; Ichiki, T.; Takeshita, A.; Egashira, K. Gene transfer of stromal cell-derived factor-1 α enhances ischemic vasculogenesis and angiogenesis via vascular endothelial growth factor/endothelial nitric oxide synthase-related pathway: Next-generation chemokine therapy for therapeutic neovascularization. *Circulation* **2004**, *109*, 2454–2461.
44. Sundararaman, S.; Miller, T.J.; Pastore, J.M.; Kiedrowski, M.; Aras, R.; Penn, M.S. Plasmid-based transient human stromal cell-derived factor-1 gene transfer improves cardiac function in chronic heart failure. *Gene Ther.* **2011**, *18*, 867–873. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Chavakis, E.; Aicher, A.; Ilicsen, C.; Sasaki, K.I.; Kaiser, R.; El Makhfi, N.; Urbich, C.; Peters, T.; Scharffetter-Kochanek, K.; Zeiher, A.M.; et al. Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J. Exp. Med.* **2005**, *201*, 63–72. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Wu, Y.; Ip, J.E.; Huang, J.; Zhang, L.; Matsushita, K.; Liew, C.C.; Pratt, R.E.; Dzau, V.J. Essential role of ICAM-1/CD18 in mediating EPC recruitment, angiogenesis, and repair to the infarcted myocardium. *Circ. Res.* **2006**, *99*, 315–322. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Yoon, C.-H.; Hur, J.; Oh, I.-Y.; Park, K.-W.; Kim, T.-Y.; Shin, J.-H.; Kim, J.-H.; Lee, C.-S.; Chung, J.-K.; Park, Y.-B.; et al. Intercellular adhesion molecule-1 is upregulated in ischemic muscle, which mediates trafficking of endothelial progenitor cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2006**, *26*, 1066–1072. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Heiss, C.; Keymel, S.; Niesler, U.; Ziemann, J.; Kelm, M.; Kalka, C. Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2005**, *45*, 1441–1448. [\[CrossRef\]](#)
49. Jie, K.E.; Goossens, M.H.; van Oostrom, O.; Lilien, M.R.; Verhaar, M.C. Circulating endothelial progenitor cell levels are higher during childhood than in adult life. *Atherosclerosis* **2009**, *202*, 345–347. [\[CrossRef\]](#)
50. Madonna, R.; Novo, G.; Balistreri, C.R. Cellular and molecular basis of the imbalance between vascular damage and repair in ageing and age-related diseases: As biomarkers and targets for new treatments. *Mech. Ageing Dev.* **2016**, *159*, 22–30. [\[CrossRef\]](#)
51. Sanada, F.; Taniyama, Y.; Azuma, J.; Iekushi, K.; Dosaka, N.; Yokoi, T.; Koibuchi, N.; Kusunoki, H.; Aizawa, Y.; Morishita, R. Hepatocyte Growth Factor, but not Vascular Endothelial Growth Factor, Attenuates Angiotensin II-Induced Endothelial Progenitor Cell Senescence. *Hypertension* **2009**, *53*, 77–82. [\[CrossRef\]](#)
52. Thum, T.; Hoerber, S.; Froese, S.; Klink, I.; Stichtenoth, D.O.; Galuppo, P.; Jakob, M.; Tsikas, D.; Anker, S.D.; Poole-Wilson, P.A.; et al. Age-dependent impairment of endothelial progenitor cells is corrected by growth hormone mediated increase of insulin-like growth factor-1. *Circ. Res.* **2007**, *100*, 434–443. [\[CrossRef\]](#)
53. Xia, W.H.; Chen, L.; Liang, J.W.; Zhang, X.Y.; Su, C.; Tong, X.; He, J.; Li, Y.; Cao, Z.; Lin, X.F.; et al. BMP4/Id2 signaling pathway is a novel therapeutic target for late outgrowth endothelial progenitor cell-mediated endothelial injury repair. *Int. J. Cardiol.* **2017**, *228*, 796–804. [\[CrossRef\]](#)
54. Li, X.; Xue, X.; Sun, Y.; Chen, L.; Zhao, T.; Yang, W.; Chen, Y.; Zhang, Z. MicroRNA-326-5p enhances therapeutic potential of endothelial progenitor cells for myocardial infarction. *Stem Cell Res. Ther.* **2019**, *10*, 1–12. [\[CrossRef\]](#)
55. Huang, H.; Xu, Z.; Qi, Y.; Zhang, W.; Zhang, C.; Jiang, M.; Deng, S.; Wang, H. Exosomes from SIRT1-overexpressing ADSCs restore cardiac function by improving angiogenic function of EPCs. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2020**, *21*, 737–750. [\[CrossRef\]](#)
56. Masuda, H.; Tanaka, R.; Fujimura, S.; Ishikawa, M.; Akimaru, H.; Shizuno, T.; Sato, A.; Okada, Y.; Iida, Y.; Itoh, J.; et al. Vasculogenic Conditioning of Peripheral Blood Mononuclear Cells Promotes Endothelial Progenitor Cell Expansion and Phenotype Transition of Anti-Inflammatory Macrophage and T Lymphocyte to Cells With Regenerative Potential. *J. Am. Heart Assoc.* **2014**, *3*, e000743. [\[CrossRef\]](#)
57. Tanaka, R.; Masuda, H.; Fujimura, S.; Ito-Hirano, R.; Arita, K.; Kakinuma, Y.; Hagiwara, H.; Kado, M.; Hayashi, A.; Mita, T.; et al. Quality-quantity control culture enhances vasculogenesis and wound healing efficacy of human diabetic peripheral blood CD34+ cells. *Stem Cells Transl. Med.* **2018**, *7*, 428–438. [\[CrossRef\]](#)
58. Chruwkwamlow, N.; Pruekprasert, K.; Phutthakunphithak, P.; Acharayothin, O.; Prapassaro, T.; Hongku, K.; Hahtapomsawan, S.; Puangpunngam, N.; Chinsakchai, K.; Wongwanit, C.; et al. Novel culture media enhances mononuclear cells from patients with chronic limb-threatening ischemia to increase vasculogenesis and anti-inflammatory effect. *Stem Cell Res. Ther.* **2021**, *12*, 1–8. [\[CrossRef\]](#)

7.3.2 Publikation II:

Improving hemocompatibility of artificial lungs by click conjugation of glycoengineered endothelial cells onto blood-contacting surfaces.



Contents lists available at ScienceDirect

Biomaterials Advances

journal homepage: www.journals.elsevier.com/materials-science-and-engineering-c

Improving hemocompatibility of artificial lungs by click conjugation of glycoengineered endothelial cells onto blood-contacting surfaces

Denis Canjuga, Caroline Hansen, Franziska Halbrügge, Ludmilla Hann, Sarina Weiß, Christian Schlensak, Hans-Peter Wendel, Meltem Avci-Adali*

University Hospital Tuebingen, Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Calwerstraße 7/1, 72076 Tuebingen, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:
Extracorporeal membrane oxygenation
Hollow fiber membrane
Oxygenator
Endothelialization
Copper free click chemistry

ABSTRACT

Artificial lungs, also known as oxygenators, allow adequate oxygenation of the blood in patients with severe respiratory failure and enable patient survival. However, the insufficient hemocompatibility of the current of artificial lungs hampers their long-term use. Therefore, in this study, a novel strategy was developed to efficiently endothelialize blood-contacting surfaces to improve their hemocompatibility. Hollow fiber membranes (HFMs) were functionalized with dibenzylcyclooctyne (DBCO), and endothelial cells were glycoengineered for covalent conjugation to DBCO by a copper-free click reaction. Metabolic glycoengineering using azidoacetylmannosamine-tetraacetylated (Ac₄ManNAz) resulted in highly efficient functionalization of endothelial cells with azide (N₃) molecules on the cell surface without negative impact on cell viability. After 48 h, significantly improved endothelialization was detected on the HFM surfaces functionalized with DBCO compared to unmodified HFMs. Endothelial cells were responsive to inflammatory stimulus and expressed adhesion-promoting molecules (E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1). Furthermore, the hemocompatibility of HFMs was analyzed by dynamic incubation with fresh human blood. DBCO-coated and uncoated HFMs showed a comparable hemocompatibility, but the endothelialization of HFMs significantly reduced the activation of blood coagulation and platelets. Interestingly, the incubation of endothelialized HFMs with human blood further reduced the expression of E-selectin and VCAM-1 in endothelial cells. In this study, a highly efficient, cell-compatible method for endothelialization of artificial lungs was established. This click chemistry-based method can be also applied for the endothelialization of other artificial surfaces for tissue engineering and regenerative medicine applications.

1. Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is the 3rd leading cause of death worldwide and lung transplantation is the only curative treatment option for patients with end-stage lung disease, such as COPD, interstitial lung disease, cystic fibrosis, and pulmonary edema. Unfortunately, the shortage of donor lungs results in considerable numbers of patients dying on the waiting list for lung transplantation. Thus, there is an urgent need for artificial lungs, which can take over the function of the lung for an extended period to bridge the time until the transplantation. Moreover, the ongoing worldwide pandemic of coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has also demonstrated the importance of artificial lungs [1] and their application in enabling the survival of critically ill patients with lung failure.

In severe respiratory failure, extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) is performed as bridge-to-transplant solution [2] by continuously pumping the patient's blood through a gas-permeable membrane oxygenator (artificial lung) that mimics the lung's gas exchange process. Standard blood oxygenators consist of bundles of microporous hollow fiber membranes (HFMs) mostly made of polypropylene (PP) or polymethylpentene (PMP) that have a large surface area (~2 m²) to achieve the clinically required transport rates for O₂ and CO₂. In most artificial lungs, oxygen flows through the lumina of the hollow fibers and blood flows through the interstitial spaces in the hollow fiber bundle.

Despite the treatment of patients during ECMO with anticoagulant drugs, mostly heparin, the foreign material surface of artificial lungs still leads to activation of the coagulation and complement system and hampers their long-term use, so that they can currently only be used for a very limited period of days to a few weeks [3].

* Corresponding author at: Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, University Hospital Tuebingen, Calwerstr. 7/1, 72076 Tuebingen, Germany.
E-mail address: meltem.avci-adali@uni-tuebingen.de (M. Avci-Adali).

<https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.212824>

Received 25 January 2022; Received in revised form 1 April 2022; Accepted 20 April 2022

Available online 25 April 2022

2772-9508/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

Intensive research has been conducted for decades to improve the hemocompatibility of blood-contacting artificial devices [4,5]. So far, a variety of commercial surface coatings have been developed for the use of blood-contacting oxygenator surfaces in the clinic [6], including the bioactive coating of Cortiva (surface-bound heparin) [7], the biopassive coatings of Safeline (recombinant human albumin) [8], Phisio (phosphorylcholine) [9], X-coating (poly(2-methoxyethyl acrylate), PMEA) [10], and the multilayer coating of Bioline with heparin (active) and recombinant human albumin (passive) [11]. The most common approach is to coat the surfaces with heparin. However, heparin coating alone is not sufficient to eliminate the need for systemic anticoagulation. Over time, heparin can detach from the surface and lead to thrombus formation. Furthermore, in addition to the complications, such as bleeding, the long-term exposure to heparin carries the risk that the patient develops heparin-induced thrombocytopenia (HIT). Here, antibodies are generated against the complex heparin and platelet factor 4 (PF4), which can lead to severe thromboembolic complications by strong activation of platelets, increased thrombin generation and activation.

Thus, despite extensive progress in the development of new materials and surface coatings, the hemocompatibility of oxygenators is still not satisfactory. The search for more effective hemocompatible coatings is, therefore, ongoing [12,13]. The optimal surface for blood contact remains the endothelium, which naturally lines the luminal side of blood vessels and consists of a thin monolayer of endothelial cells. Under physiological conditions, the endothelium provides a non-thrombogenic surface and has an anticoagulant and antithrombotic activity. Thus, the complete endothelialization of artificial surfaces is a promising strategy to prevent the foreign body reaction [14,15] to blood-contacting implants and, in turn, improve the hemocompatibility of implants.

In this study, a clickable coating was generated on the surface of HFMs for the efficient binding of metabolically labeled endothelial cells. The binding of endothelial cells and the creation of endothelium on blood-contacting HFM surfaces was analyzed. Furthermore, extensive hemocompatibility analyses were performed according to GLP (ISO-10993-4) guidelines to evaluate the effect on hemostasis in comparison to uncoated HFM surfaces.

2. Materials and methods

2.1. Cultivation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)

HUVECs (ATCC®, Manassas, USA) were seeded in T75 cell culture flasks coated with 0.1% gelatin and cultivated at 37 °C with 5% CO₂ in Vasculife® EnGS EC culture medium (CellSystems, Troisdorf, Germany) containing Vasculife EnGS LifeFactors Kit, 50 mg/ml gentamicin, and 0.05 mg/ml amphotericin B (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). The medium was changed every 3 days. After reaching 80% confluency, the cells were detached using trypsin/EDTA (0.04%/0.03%, PromoCell, Heidelberg, Germany).

2.2. Functionalization of hollow fiber membranes (HFMs) with DBCO

The surface of PMP HFMs (OXYPLUS, 3M Membrana, Wuppertal, Germany) was coated in a 3 step procedure (Fig. 1). First, the surface was treated with O₂ plasma and in the second step, the silanization was performed. In the third step, dibenzylcyclooctyne-PEG₄-NHS ester (DBCO-PEG₄-NHS ester) was conjugated to the silanized surface. Therefore, PMP membranes were cut to a size of 3 × 3 cm, and hydroxyl groups were generated by treatment with O₂ plasma using (Denta Plas®, Diener electronic, Ebhausen, Germany) for 30 min with a pressure of 0.3 mbar (±0.20 mbar), and a power of 80% (±5%). Subsequently, HFMs were incubated for 30 min in toluene (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) with 2% (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES, Sigma-Aldrich) on a shaker at 20 rpm. The membranes were then sonicated in 100% toluene, 50% toluene/50% methanol, and 100% methanol for 2 min each to remove unbound or weakly bound APTES. After drying, membranes were incubated for 30 min in 400 μM DBCO-PEG₄-NHS ester (Jena Bioscience, Jena, Germany) containing Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), (Invitrogen, Carlsbad, USA) to introduce cyclooctyne groups and washed three times with fresh DPBS.

2.3. Quantification of functional groups generated on HFM coating

2.3.1. Detection of amino groups after APTES treatment

To detect the amino groups on the surface of HFMs, membranes were incubated for 5 h in 0.5 mM methyl orange (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) at 37 °C on a shaker followed by three times washing with 1 mM HCl solution. The desorption of bound methyl orange from HFM

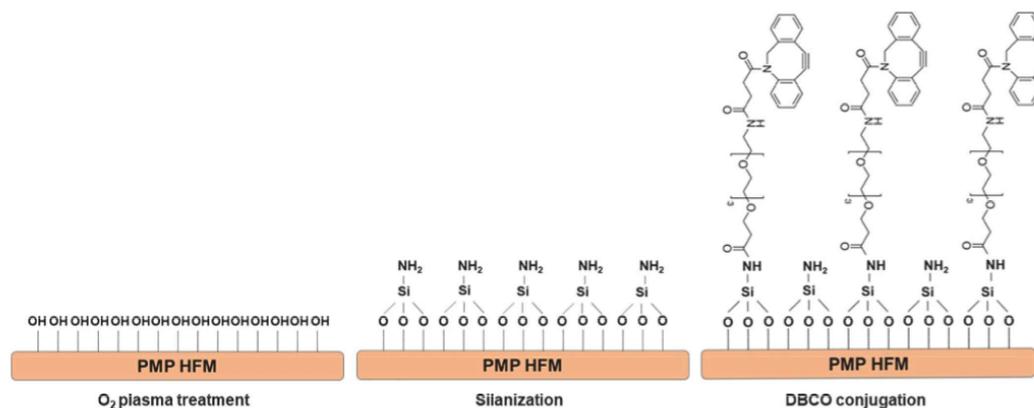


Fig. 1. Schematic representation of the functionalization of the PMP hollow fiber membranes (HFMs). Hydroxyl groups on HFMs were generated O₂ plasma treatment. The subsequent silanization with APTES leads to the generation of NH₂ groups. Afterwards, DBCO groups were introduced by covalent conjugation of DBCO-PEG₄-NHS ester.

surface was performed using 0.4 ml of 1 mM NaOH solution overnight at 37 °C on a shaker. To detect methyl orange, 100 µl desorption solution was transferred in triplicates in a 96-well plate. The absorption was measured at 465 nm using a microplate reader (Eon Synergy 2, Bio Tek Instruments Inc., Winooski USA).

2.3.2. Detection of DBCO groups after the conjugation of DBCO-PEG₄-NHS ester

After the incubation with DBCO-PEG₄-NHS ester, HFMs were incubated in DPBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ for 1 h with 80 µg/ml Cy3-azide (Sigma-Aldrich) to click Cy3-azide to the DBCO functionalized HFM surface. The HFMs were then washed five times with 100% ethanol and the staining of the membranes was detected using fluorescence microscopy (Axiovert 135, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany). Furthermore, the fluorescence intensity on the membranes was quantified using a microplate reader (Mithras 940, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) at an excitation wavelength of 500 nm and an emission wavelength of 600 nm. HFMs without treatment and only APTES treatment were used as controls.

2.4. Metabolic labeling of HUVECs with azide groups and detection of azide labeling

To functionalize the cell surface of HUVECs with azide groups, 2 × 10⁵ HUVECs were seeded per well of a 6-well plate and treated with or without 50 µM *N*-azidoacetylmannosamine-tetraacylated (Ac₄ManNAz, Sigma Aldrich) in 2 ml medium for 48 h at 37 °C with 5% CO₂. To detect the generated azido groups, cells were washed with DPBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ and incubated with 5 µM DBCO-Sulfo-Cy3 (Jena Bioscience, Germany) in DPBS w Ca²⁺/Mg²⁺ for 1 h at 37 °C with 5% CO₂. Cells were washed three times with 1 ml DPBS, detached with trypsin/EDTA (0.04%/0.03%), and centrifuged at 300 ×g for 5 min. The cell pellet was resuspended in 0.5 ml DPBS and the Cy3 labeling of 10,000 cells was analyzed using flow cytometry (FACS SCAN, BD, Heidelberg, Germany). Additional to the flow cytometry analyses, cells were further stained for 30 min with ActinGreen™ 488 ReadyProbes® Reagent (Invitrogen) for cytoskeleton and with 0.2 µg/ml DAPI for 5 min to visualize nuclei (Sigma Aldrich).

2.5. Analysis of cell viability after metabolic labeling of HUVECs with Ac₄ManNAz

The influence of metabolic labeling on the viability of HUVECs was assessed 48 h after the labeling with 50 µM Ac₄ManNAz using PrestoBlue assay (Invitrogen, Carlsbad, USA). Therefore, 500 µl 1 × PrestoBlue cell viability reagent was added per well of a 6-well plate and incubated for 1.5 h at 37 °C. The fluorescence intensity of 100 µl supernatant was measured in triplicates at an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 600 nm using a multimode microplate reader (Mithras LB 940, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany).

2.6. Clicking of endothelial cells to HFMs via copper-free click chemistry

DBCO coated and uncoated PMP membranes (3 × 3 cm) were incubated with 5.2 × 10⁶ Ac₄ManNAz labeled HUVECs in 13 ml EGM™₂ endothelial cell growth medium BulletKit™ (Lonza, Basel, Switzerland). The incubation was performed for 24 h at 10 rpm using a rotator (Phoenix Instrument, Garbsen, Germany) in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37 °C. After the rotational incubation, membranes were placed in each well of a 6-well plate and further incubated for 24 h under static conditions.

2.7. Analysis of endothelialization

HUVECs adhered to the membranes were stained with 250 ng/ml

calcein-acetoxymethyl ester (Calcein-AM; Invitrogen) for 10 min at 37 °C. The stained cells were detected using fluorescence microscopy (Axio 135, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany). Furthermore, the fluorescence signal on the surface of HFMs was detected before and after calcein-AM staining at an excitation wavelength of 494 nm and an emission wavelength of 517 nm using a multimode microplate reader (Mithras LB 940, Berthold Technologies).

In addition, the generation of a confluent endothelial cell monolayer and the presence of cell-cell contacts were detected by staining the cells with an anti-human VE-cadherin antibody. Therefore, DBCO-PEG₄-NHS ester coated and endothelialized membranes were washed with DPBS and fixed in 4% paraformaldehyde (v/v) for 10 min at RT. After washing with DPBS, blocking was performed with Tris-buffered saline (50 mM Tris base, 150 mM sodium chloride, pH 7.5) containing 5% goat serum (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) for 30 min at RT. The membranes were washed with DPBS and incubated with the 1:100 diluted primary antibody mouse anti-human VE-cadherin (CD144 (16B1), Invitrogen, eBioscience, USA) in DPBS with 1% bovine serum albumin (BSA) for 1 h at RT. Membranes were then washed three times with DPBS and incubated with 1:400 diluted Alexa Fluor 488-labeled goat anti-mouse IgG (H + L) cross-adsorbed secondary antibody, ThermoFisher, USA) for 1 h in PBS with 1% BSA. After three times washing with DPBS, the cytoskeleton was stained for 30 min at RT using 2 drops/ml ActinRed™ 555 ReadyProbes™ Reagent (Rhodamine phalloidin) in DPBS. As a negative control, membranes were also incubated with an isotype control antibody. The stained cells were detected using fluorescence microscopy (Axio 135, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany).

2.8. Reactivity of endothelium on HFMs to the inflammatory stimulus

Endothelialized HFMs were incubated for 4 h without or with 50 ng/ml tumor necrosis factor α (TNF-α, Sigma-Aldrich) in EGM™₂ endothelial cell growth medium without hydrocortisone. After incubation, HFMs were washed twice with DPBS and total RNA was isolated. The expression of activation markers, endothelial leukocyte adhesion molecule 1 (E-selectin), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) was detected by qRT-PCR. The mRNA levels were normalized to GAPDH mRNA levels, and results were presented relative to expression levels in endothelialized HFMs without TNF-α stimulation.

2.9. qRT-PCR

The total RNA of cells was isolated using Aurum Total RNA Mini Kit (Bio-Rad, Munich, Germany) according to the manufacturer's instructions. 300 ng of RNA was reverse transcribed into copy DNA (cDNA) using iScript Kit (Bio-Rad). Amplification of the transcripts was performed with primers listed in Table 1 at a final concentration of 300 nM under the following conditions: for one cycle 3 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, and 72 °C for 10 s. After 40 cycles, melt curve analysis was performed to detect the specific amplicons. Real-time qRT-PCR reactions were performed in triplicates with a total volume of 15 µl per well in a CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) using IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). The constitutively expressed GAPDH (glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase) was used as the housekeeping gene. The detected mRNA levels in each gene were normalized to GAPDH, and the results were

Table 1
Primers used for qRT-PCR analysis.

Gene	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')
GAPDH	TCAACAGCGACACCCACTCC	TGAGGTCCACCACCCCTGTTG
E selectin	GCCAGAGCCCTTCAGTGTACC	GGATGGCTGCACCTCACAG
ICAM-1	CTTGAGGGCACCTACTCTGTC	CGGCTGCTACCACAGTGATG
VCAM 1	ACAGTTTATGTCAATGTTGCCCG	GAGGCTGTAGCTCCCGTTAG

shown relative to control mRNA levels.

2.10. Blood collection

Human whole blood was collected from the antecubital vein of non-medicated healthy volunteers ($n = 4$) using Safety-Multifly® 20 Gx3/4 TW needle (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) into 9 ml monovettes (Sarstedt) containing 1 IU/ml sodium heparin (Ratiopharm, Ulm, Germany). The Ethics Committee (287/2020BO2) of the University of Tuebingen approved the blood sampling procedures and all subjects gave written informed consent.

2.11. Performance of hemocompatibility analyses

The incubation of unmodified, DBCO-coated or endothelialized HFMs (3×3 cm) with human blood samples was performed with 9 ml heparinized human whole blood in polypropylene round-bottom tubes (14 ml, Becton Dickinson (BD) Biosciences, Heidelberg, Germany) under dynamic conditions 35 cycles/min (Heidolph Instruments, Schwabach, Germany) for 90 min at 37 °C. This method was also used in our previously published study [16]. As a negative control, the tubes were filled with the same amount of fresh heparinized blood without any material. After 90 min of dynamic incubation, blood samples were collected in tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (1.6 mg/ml, EDTA, Sarstedt) for the analysis of complement activation and detection of cell numbers. To detect PMN-elastase and TAT, tubes containing (0.3 ml of citrate solution/3 ml blood, 0.106 M $C_6H_5Na_2O_7 \times 2H_2O$, Sartstedt) were used. For β -TG analysis, blood was transferred to 2.7 ml CTAD tubes with 270 μ l of 0.109 M CTAD solution containing buffered sodium citrate, theophylline, adenosine, and dipyridamole (BD Vacutainer CTAD, Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) and stored for 15 min on ice. The EDTA and CTAD preparations were centrifuged at 2500 \times g for 20 min at 4 °C. The citrated blood preparations were centrifuged at 1800 \times g for 18 min at RT. The blood plasma of each sample was shock frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until further investigations.

2.11.1. Blood cell count analyses

The number of erythrocytes, leukocytes, and platelets was measured in collected blood samples using an automated cell count system (ABX Micros 60, HORIBA Medical, Minami-ku, Kyoto, Japan).

2.11.2. Analyses of activation markers in blood plasma

Commercially available enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) kits were used according to the manufacturer's instructions to determine alterations in coagulation (thrombin antithrombin III complex (TAT)), complement system (sC5b-9), and activation of platelets (β -thromboglobulin (β -TG)), and neutrophils. Therefore, sC5b-9 (MicroVue™ Complement, Quidel Germany GmbH & AnDiaTec Division, Kornwestheim, Germany), TAT (Enzygnost® TAT micro, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany), polymorphonuclear (PMN) elastase (Demeditec Diagnostics, Kiel, Germany), and β -TG (Asserachrom® β -TG, Diagnostica Stago S.A.S, Asnieres sur Seine, France) ELISAs were used.

2.11.3. Detection of activated platelets

Uncoated, DBCO-coated, or endothelialized HFMs were incubated with blood as described above. After the incubation of HFMs for 90 min with human blood, blood was collected and diluted 1:5 with DPBS. Samples were incubated for 30 min at RT with 10 μ l mouse anti-human CD41-FITC antibody (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) to detect platelets and 10 μ l mouse anti-human CD62P-PE antibody (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) to detect platelets expressing P-selectin (CD62P), indicating platelet activation. Samples were fixed with 0.5% paraformaldehyde and the activation of platelets was analyzed by flow cytometry.

2.11.4. Scanning electron microscopy (SEM) analyses of HFM surfaces

After the incubation of unmodified, DBCO-coated, and endothelialized HFMs with blood, the HFMs were rinsed with 0.9% saline solution (Presenius Kabi, Bad Homburg, Germany) and fixed for 24 h in 2.5% glutaraldehyde (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) in DPBS. After the fixation step, the samples were washed with DPBS for 15 min at RT followed by dehydration with an ascending ethanol series (40%–100% ethanol; Merck-Millipore, Darmstadt, Germany) in 15 min steps at RT. Thereafter, the samples were dried in a critical point drier (Polaron E3100, Quorum Technologies Ltd., East Sussex, United Kingdom) and sputtered with gold-palladium particles (Baltec SCD 050, Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein). Imaging was performed by SEM (EVO LS 10, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) with 20-, 500-, 1000-, and 5000-fold magnification.

2.11.5. Analysis of the inflammatory status of the endothelium on HFMs

After the endothelialization of HFMs, total RNA was isolated from endothelial cells without blood incubation and after 90 min of blood incubation. Therefore, HFMs were washed twice with DPBS prior to RNA isolation. As a control, RNA was also isolated from 3×10^5 HUVECs cultivated per well of a 6-well plate. The expression of activation markers, E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 was detected by qRT-PCR. The mRNA levels were normalized to GAPDH mRNA levels, and results were presented relative to expression levels in HUVECs cultivated on cell culture plates.

2.12. Statistical analysis

The data are shown as mean + standard deviation (SD) or mean + standard error of the mean (SEM). Paired *t*-test was performed for the comparison of means between two groups. One-way or two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's or Tukey's multiple comparison test was performed to compare the means of more than two groups. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 9.0.2 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, California, USA). Differences of $p \leq 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1. Detection of generated functional groups on the surface of PMP HFMs

To detect the generated amino groups on untreated, O₂-plasma, and APTES-treated HFM membranes, the membranes were stained with methyl orange (Fig. 2A). APTES-treated membranes showed approximately 126-times higher methyl orange binding (0.2523 ± 0.0175 versus 0.002 ± 0.0175) compared with O₂ plasma-treated membranes, indicating successful silanization of the surface and the presence of amino groups. These amino-functionalized surfaces were treated with DBCO-PEG₄-NHS ester and the presence of DBCO was detected by the click reaction of Cy3-azide to the surface. The fluorescence intensity of HFMs was detected with a fluorescence reader (Fig. 2B). DBCO-PEG₄-NHS ester-treated surfaces showed significantly higher fluorescence intensity than APTES-treated HFMs (RFU: 22553 ± 3564 versus 3845 ± 2155). Furthermore, Cy3 fluorescence staining was detected only on the surface of the HFMs treated with DBCO-PEG₄-NHS ester by fluorescence microscopy analysis (Fig. 2C). Moreover, the SEM analyses showed no visual differences on the surface of the HFMs treated with only APTES or APTES and DBCO-PEG₄-NHS ester compared to untreated HFMs, illustrating no negative impact of the coating procedure on the integrity of the HFMs (Supplementary Fig. 1). Furthermore, the leak tightness of the functionalized HFMs was analyzed using a leakage model by fixing the HFMs in a closed-circuit system (Supplementary Fig. 2). A constant pressure of 250 mmHg \pm 10 mmHg, comparable to the pressure used in the clinic for ECMO perfusion, was applied for 3 h and showed no membrane leakage in DBCO functionalized membranes.

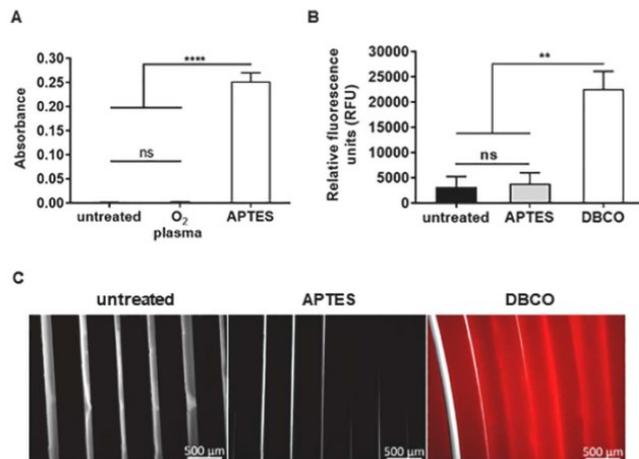


Fig. 2. Detection of the generated functional groups on PMP hollow fiber membranes (HFMs). (A) To detect the amino groups after APTES-treatment of HFMs, HFMs were stained with methyl orange and the absorption of attached and eluted methyl orange from the surface was detected using a spectrophotometer. Untreated and O₂ plasma-treated HFMs were used as negative controls. (n = 3). (B) To detect DBCO groups on the surface of untreated, APTES or DBCO-PEG-NHS ester treated HFMs; HFMs were incubated with Cy3-azide. The conjugated Cy3-azide was detected using a fluorescence reader (n = 3) or (C) fluorescence microscopy. The data are shown as mean + SEM. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. (**p < 0.01, ****p < 0.0001).

3.2. Metabolic labeling of the surface of endothelial cells with N₃ and analysis of the influence on cell viability

HUVECs were treated with 50 μM Ac₄ManNAz for 48 h. To determine whether N₃ groups are present on the cell surface, cells were then incubated with 5 μM DBCO-Sulfo-Cy3 for 1 h. The presence of N₃ on the cell surface led to the conjugation of DBCO and labeling of the cells with Cy3 (Fig. 3A). The cells without Ac₄ManNAz treatment were not stained. Furthermore, flow cytometric analyses revealed that approximately 98% of the cells analyzed were Cy3 positive (Fig. 3B). The presence of N₃ groups was also analyzed after the removal of Ac₄ManNAz from the

culture medium, and incubation for 0, 2, 4, and 24 h (Supplementary Fig. 3). After 24 h, N₃ groups were still present on the cell surface, as shown by the successful conjugation of DBCO-Sulfo-Cy3 to approximately 99% of the cells examined. The treatment of the cells with Ac₄ManNAz did not affect the viability of HUVECs (Fig. 3C).

3.3. Endothelialization of modified HFMs by copper-free click reaction of N₃-labeled HUVECs to the DBCO functionalized HFM surface

DBCO coated and uncoated HFMs were incubated with 5.2 × 10⁶ Ac₄ManNAz labeled HUVECs for 24 h under rotation and then for 24 h

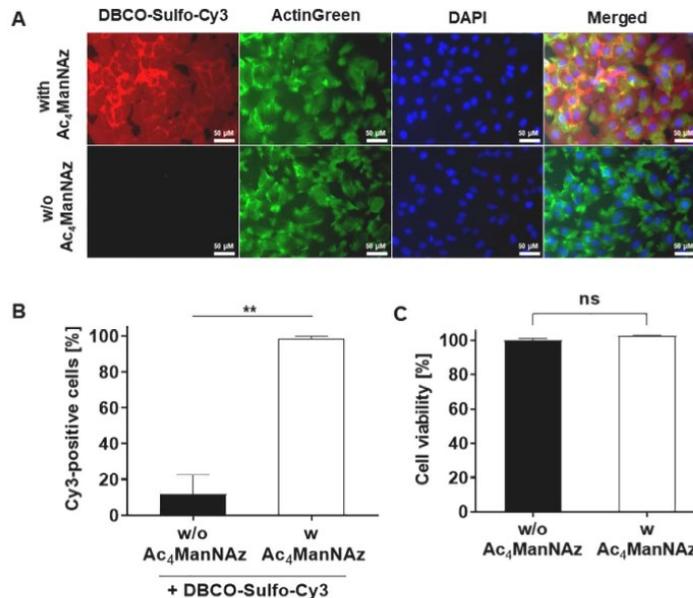


Fig. 3. Metabolic labeling of HUVECs with Ac₄ManNAz and analysis of cell viability. 2 × 10⁵ HUVECs were incubated for 48 h with and without 50 μM Ac₄ManNAz. A) Cells were incubated with 5 μM DBCO-Sulfo-Cy3 for 1 h. Fluorescence microscopic images were taken after washing the cells with DPBS and staining the cytoskeleton with ActinGreen and the nuclei with DAPI. B) Cells were incubated with 5 μM DBCO-Sulfo-Cy3 for 1 h and after washing with DPBS, flow cytometric analyses were performed. Results are presented as mean + SD (n = 3). C) Cell viability was determined using PrestoBlue assay. Results are presented as mean + SEM (n = 3). Statistical analysis was performed using a two-tailed paired t-test. (** p < 0.01, ns: non-significant).

under static conditions. The attached HUVECs were detected by staining with Calcein AM (Fig. 4A). Fluorescence microscopic analysis showed that the Ac₄ManNAz treated HUVECs efficiently bind to the DBCO functionalized HFM surface and led to almost complete endothelialization. The detection of fluorescence intensity of HFMs also demonstrated that the DBCO functionalization resulted in significantly increased adhesion of HUVECs compared with uncoated or APTES-coated HFMs (Fig. 4B). The close cell-cell contacts of HUVECs on the HFM membranes were detected by staining with an anti-VE-cadherin antibody (Fig. 4C).

3.4. Reactivity of endothelial layer on inflammatory stimulus

The expression of adhesion molecules, E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 was analyzed after the stimulation of the endothelial layer on HFMs with TNF-α and compared to unstimulated endothelial layer using qRT-PCR (Fig. 5). The stimulation of the endothelial layer with TNF-α led to significantly higher E-selectin (199-fold), VCAM-1 (328-fold), and ICAM-1 (162-fold) expression compared to the unstimulated endothelial layer. Thereby, the responsiveness of the generated endothelial layer on HFMs was demonstrated.

3.5. Hemocompatibility of DBCO coated or endothelialized HFMs

The influence of DBCO functionalized or endothelialized HFMs on hemocompatibility was analyzed by dynamic incubation with fresh human blood. Blood cell counts, activation of thrombocytes, coagulation, complement system, and inflammation were determined after incubation of blood without HFMs (negative control), with uncoated, DBCO-coated, or DBCO-coated and endothelialized HFMs. No significant differences in white blood or red blood cell counts were observed compared with blood samples without HFMs (Fig. 6). However, a significant decrease in platelet counts was detected after the incubation of blood with uncoated or DBCO-coated HFMs, whereas endothelialized membranes prevented the loss of platelets. In addition to platelet counts, P-selectin expression on platelets was analyzed as a marker of platelet activation. As shown in Fig. 6, significantly increased numbers of activated platelets were detected on uncoated and DBCO-coated HFMs compared with the blood samples without HFMs. However, the endothelialized membranes prevented the activation of platelets.

Furthermore, after the incubation of HFMs with blood, the adhesion of platelets, monocytes, and the formation of fibrin on the surface of HFMs were analyzed by SEM (Fig. 7). The endothelialization of HFM surface generated a smooth confluent endothelial cell layer. After the

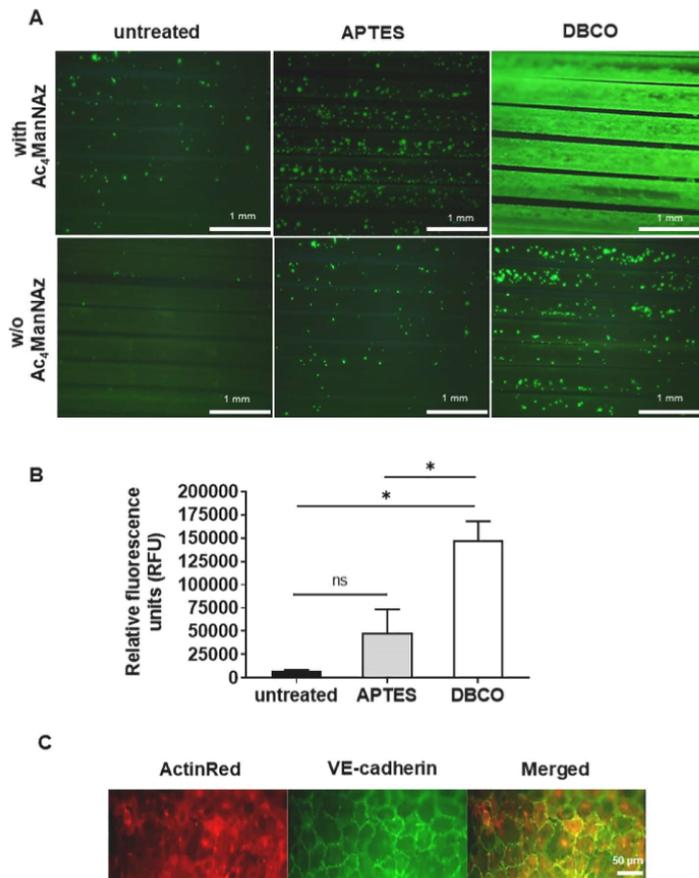


Fig. 4. Analysis of endothelialization of modified hollow fiber membranes (HFMs). Untreated, APTES-, or DBCO-functionalized HFMs were incubated with HUVECs. Therefore, 5.2×10^6 HUVECs without (w/o) or with metabolic labeling with Ac₄ManNAz were dynamically incubated for 24 h and then cultivated for 24 h under static conditions. A) Attached cells were visualized using Calcein AM staining and fluorescence microscopy. Representative images of three experiments are shown. B) Quantification of bound HUVECs on HFMs using a fluorescence reader. Results are presented as mean + SEM (n = 3). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. (*p < 0.05). C) Detection of cell-cell contacts of HUVECs bound to the DBCO-coated membranes by staining with anti-human VE-cadherin antibody (green) and ActinRed cytoskeleton staining using fluorescence microscopy.

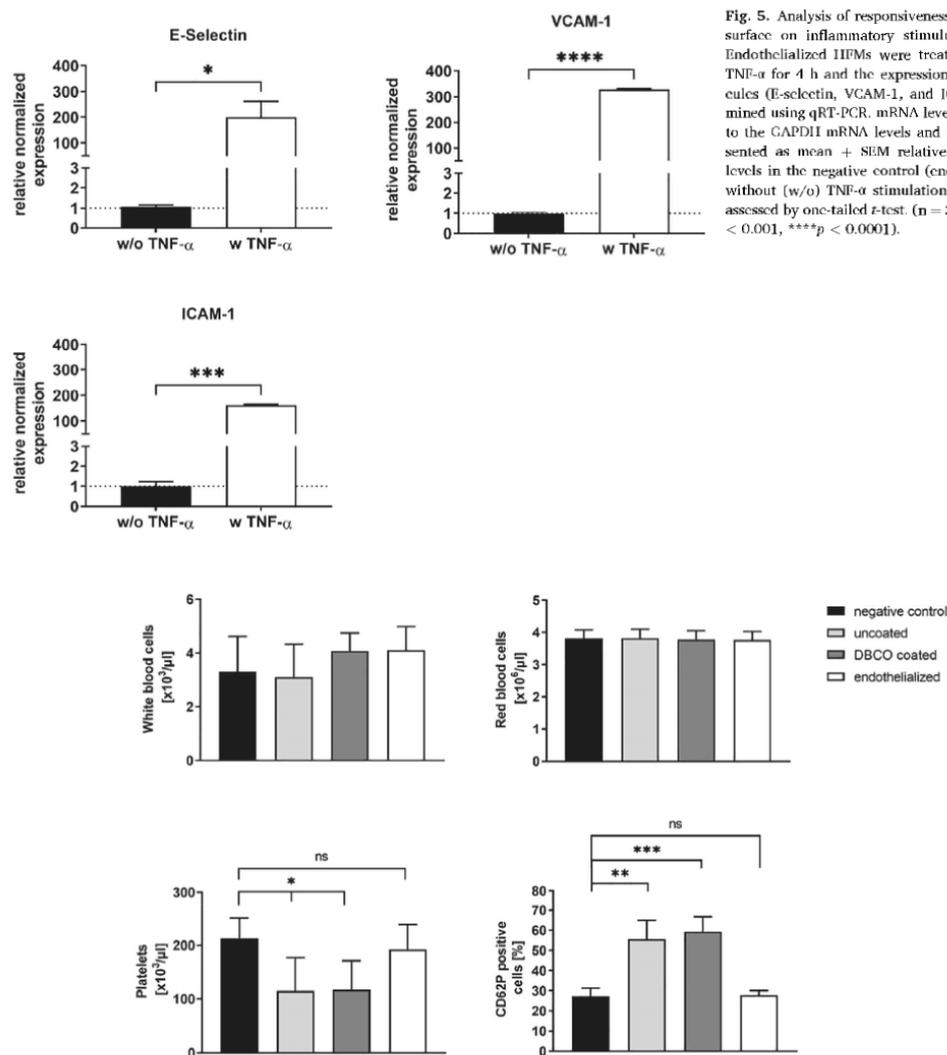


Fig. 5. Analysis of responsiveness of endothelialized surface on inflammatory stimulus using qRT-PCR. Endothelialized IIFMs were treated with 50 ng/ml TNF-α for 4 h and the expression of adhesion molecules (E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1) was determined using qRT-PCR. mRNA levels were normalized to the GAPDH mRNA levels and the results are presented as mean + SEM relative to the expression levels in the negative control (endothelialized IIFMs without (w/o) TNF-α stimulation). Differences were assessed by one-tailed *t*-test. (n = 3). (**p* < 0.05, ***p* < 0.001, *****p* < 0.0001).

Fig. 6. Detection of blood cell counts after the incubation of human blood with uncoated, DBCO-coated, or endothelialized IIFMs. Blood samples without IIFM were used as a negative control. The incubation of blood was performed for 90 min at 37 °C. The numbers of white blood cells, red blood cells, and platelets were determined using a cell counter. Furthermore, the activated platelets were detected using anti-human CD62P antibody staining and flow cytometry. Data are shown as mean + SD. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

incubation of unmodified HFMs with fresh human blood, a strong fibrin network formation with entrapped erythrocytes was detected on the surface. The DBCO-coated HFM surfaces also showed fibrin network formation. However, incubation of the endothelialized surface with human blood strongly prevented the fibrin network formation on the surface of HFMs. Cell-like structures were also detected at some sites, which could be exfoliated endothelial cells resulting from critical point drying or adherent monocytes.

After the incubation of blood with uncoated and DBCO-functionalized HFMs, significantly increased levels of thrombin-

antithrombin III complex (TAT), an indicator of coagulation activation, and β-thromboglobulin, a marker for platelet activation, was detected (Fig. 6). In contrast, endothelialized HFMs efficiently prevented the activation of coagulation and platelets. Regarding the activation of inflammation (PMN elastase) and complement system (C5b-9), no significant changes were measured between blood samples without HFMs (negative control) and different HFM modifications.

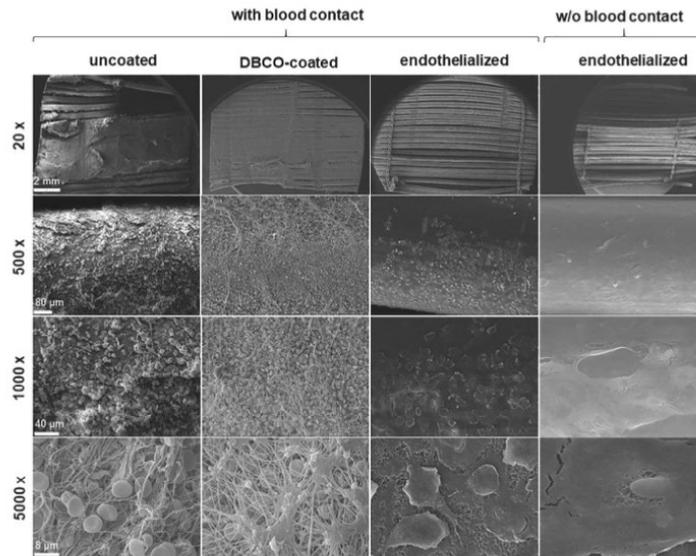


Fig. 7. Scanning electron microscopic (SEM) images of uncoated, DBCO-coated, or endothelialized HFMs 90 min after the incubation with human blood, or endothelialized HFMs without blood contact. (n = 3).

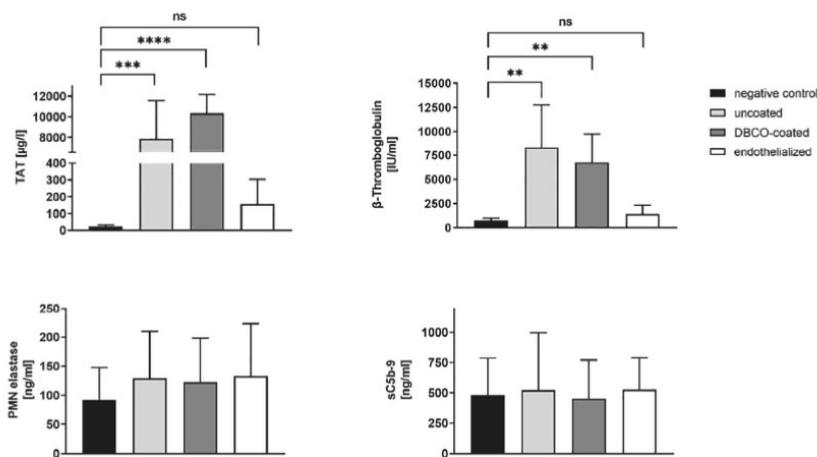


Fig. 8. Analysis of the hemocompatibility of uncoated, DBCO-coated, or endothelialized HFMs. After the incubation for 90 min with fresh human blood, the activation of coagulation (thrombin-antithrombin III complex (TAT)), platelets (β -thromboglobulin), complement system (sC5b-9), and inflammation (PMN elastase) were determined using ELISA (n = 4). Data are shown as mean + SD. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. (**p < 0.01, ***p < 0.001, and ****p < 0.0001).

3.6. Inflammatory status of the endothelium on HFMs

After the endothelialization of HFMs, the expression of adhesion molecules was analyzed before and after the incubation with blood for 90 min to determine the activation status of endothelial cells. HUVECs cultivated in a 6 well-plate served as control. Interestingly, the incubation of endothelialized HFMs with blood further reduced the expression of E-selectin and VCAM-1 compared to endothelialized HFMs without

blood contact (Fig. 9).

4. Discussion

Artificial lungs (oxygenators) are used as bridge to recovery or as bridge to transplantation devices to enable the survival of patients with advanced lung failure. However, due to insufficient hemocompatibility, their long-term use is associated with complications and is limited to a

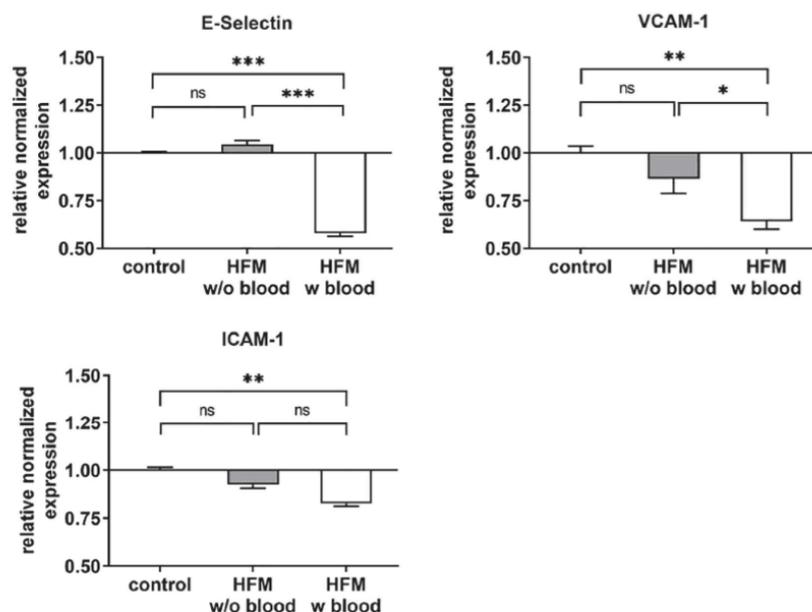


Fig. 9. Analysis of the inflammatory status of endothelialized surface on HFMs using qRT-PCR. Endothelialized HFMs were incubated with human blood for 90 min at 37 °C and the expression of adhesion molecules (E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1) was determined using qRT-PCR. mRNA levels were normalized to the GAPDH mRNA levels and the results are presented as mean + SEM relative to the expression levels in the control (HUVECs on cell culture plate). Differences were assessed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. (n = 3). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

maximum of days to a few weeks [3]. Contact of blood with artificial surfaces can initiate different mechanisms leading to coagulation, such as adsorption of plasma proteins, adhesion of cells (platelets and leukocytes), contact activation leading to thrombin generation, and complement activation [17]. Thus, several passive and active approaches have been developed in recent years to guide blood-material interactions [18]. Various novel anti-thrombogenic coatings were created for oxygenator surfaces, such as bioactive nitric oxide (NO) releasing coatings [19] or C1-esterase inhibitor (C1-INH) coatings [16], as well as biopassive coatings, such as zwitterionic polymers (e.g. sulfobetaine (SB)-co-methacrylic acid (MA) block copolymer (SBMAb-COOH) [20] or low molecular weight SB block copolymers with N-hydroxysuccinimide ester (SBNHS) or siloxane groups (SBNHSi) [21]), nonionic polymer brushes (e.g. poly N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA) brushes [22]), tethered liquid perfluorocarbon (TLP) [23], or methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) [24].

Despite these advances, the optimal surface for blood contact is still the native endothelium. Thus, various capturing molecules and strategies have been applied to endothelialize blood-contacting implants [15,25]. To date, HFMs have been coated with heparin/albumin [26], cRGD [27], titanium dioxide [28], or fibronectin [29,30] to support endothelialization. However, especially the coatings with sub-endothelial extracellular matrix components, such as fibronectin, may lead to nonspecific attachment of unwanted cells, and the non-endothelialized areas may activate thrombocytes and lead to thrombosis. The use of cRGD to bind endothelial cells is also nonspecific. Several cells, including thrombocytes, have cRGD binding integrins on their surface, which may lead to unspecific adhesion of cells to the blood-contacting surface.

In this study, to enable the efficient endothelialization of HFMs of artificial lungs, we developed a novel strategy for the colonization of

blood-contacting surfaces with endothelial cells by using copper-free click chemistry for covalent conjugation of metabolically N_3 labeled endothelial cells to the DBCO functionalized HFM surface.

The incubation of endothelial cells for two days by adding of Ac₄ManNAz into the cell culture medium allowed the metabolic engineering of endothelial cells and resulted in highly efficient metabolic glycoprotein labeling of the cell surface with N_3 without negatively influencing the cell viability. The process of Ac₄ManNAz incorporation into the cell surface described by Wang et al. [31] involves the following steps: After entry into the cells, Ac₄ManNAz is hydrolyzed by nonspecific esterase. The next step is the phosphorylation of C6-OH and isomerization from cyclic to the open-chain structure. Subsequently, the open-chain acetyl azidomannosamine undergoes an aldol reaction with intracellular phosphoenolpyruvic acid. After rearrangement and dephosphorylation reactions, azido sialic acid is formed, which is then conjugated to glycoprotein and expressed on the cell surface. In addition to Ac₄ManNAz, other azide-functionalized monosaccharides, such as Ac₄GlcNAz or Ac₄GalNAz, could be also used to functionalize the surface of endothelial cells with N_3 -groups.

The surface of HFMs was efficiently functionalized with DBCO molecules after O₂ plasma and APTES treatment. The functionalization did not change the surface structure of HFMs and no leakage was detected after the incubation of HFMs with toluidine blue-containing solution for 3 h with 250 mmHg pressure. Metabolically glyco-engineered endothelial cells were covalently conjugated to the DBCO functionalized HFM surface via strain-promoted alkyne azide cycloaddition (SPAAC). The SPAAC reaction, first developed by Bertozzi et al. [32] enables copper-free click reactions and thereby, prevents copper-induced cytotoxicity in living cells. A significantly improved attachment and endothelialization were detected after 48 h of incubation compared to unmodified HFMs. The endothelial cells generated a

confluent layer with cell-cell contacts, which was detected by staining of cells with anti-VE-cadherin antibody. In addition, the endothelial cell layer showed physiological activity and responded to an inflammatory stimulus by the cytokine TNF- α , resulting in increased expression of adhesion-promoting molecules (E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1).

In this study, fresh human whole blood was used to evaluate the hemocompatibility of HFMs according to ISO 10993-4 guidelines. This assessment allows to obtain complex information about the activation status of human blood by simultaneously determining the activation of coagulation, platelets, complement system, and inflammation. The dynamic incubation with uncoated, DBCO-functionalized, and endothelialized HFMs was performed for 90 min. The hemocompatibility of DBCO-coated HFMs was similar to the uncoated HFMs, however, the endothelialization of HFMs significantly reduced activation of coagulation (TAT levels) and platelets (β -TG levels) compared to unmodified membranes. In addition, SEM analyses showed reduced amounts of fibrin formation on endothelialized HFMs compared with unmodified HFM membranes, clearly indicating the importance of an endothelial layer in preventing thrombus formation. In addition, the analysis of activated platelets by detecting CD62P (P-selectin) expression using flow cytometry demonstrated significantly reduced amounts of activated platelets in blood samples incubated with endothelialized HFMs. Endothelial cells can actively regulate hemostasis by the expression of anti-thrombogenic and anti-inflammatory molecules [33]. Interestingly, compared to the endothelialized HFMs in the cell culture medium, the incubation of endothelialized HFMs with human blood further reduced the expression of E-selectin and VCAM-1 in endothelial cells. Thus, the presence of an in vivo-like environment (human whole blood) significantly reduced the inflammatory status of endothelial cells compared with those incubated in a cell culture medium. In conclusion, the seeded endothelial cells maintained the anti-thrombogenic and anti-inflammatory status and improved the hemocompatibility of artificial surfaces, which could prolong the usability of artificial lungs in patients.

The click reaction leads to the formation of a covalent bond between the azide group on the endothelial cells and the DBCO on the biomaterial surface. This indicates stable binding of endothelial cells. However, the stability of the endothelial layer will also be analyzed under flow conditions in our future studies. In addition, adequate gas exchange is an important performance indicator of the artificial lungs. Klein et al. investigated the long-term stability and gas exchange performance of endothelialized RGD-conjugated PDMS membranes in a model system [34] and demonstrated the long-term stability of the endothelial layer under physiological wall shear stress of 0.5 Pa for up to 33 days and a small but non-significant decrease in gas transfer rates over longer culture periods (19 and 33 days). Thus, this study demonstrates the importance of testing gas transfer after endothelialization of surfaces and long-term culture, which we will also perform in our next studies.

In this study, HUVECs were used for the endothelialization of HFMs. These cells are mostly of allogenic origin and therefore may cause rejection reactions. Thus, we aim to generate autologous endothelial cells from patient-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) in our future studies. This can prevent rejection reactions and advance artificial lungs a big step toward long-term use and generation of implantable lungs. Another advantage of iPSCs is their unlimited ability to proliferate. By differentiating these iPSCs into endothelial cells [35,36] and applying the strategy established in this study, large surfaces, such as those of artificial lungs (oxygenators), can be efficiently endothelialized.

5. Conclusions

In this study, a novel and highly efficient, cell-compatible method for the endothelialization of blood-contacting surfaces was established based on glycoengineering of endothelial cells and copper-free click reaction. The incubation of DBCO-functionalized HFMs of artificial lungs with azide-labeled endothelial cells resulted in the generation of a functional endothelial cell monolayer. In addition to improving the

long-term applicability of artificial lungs, the use of this click chemistry-based method can be extended in the future to endothelialization of other artificial surfaces for organ-on-a-chip models, tissue engineering, and regenerative medicine.

CRediT authorship contribution statement

Denis Canjuga: Methodology, Validation, Investigation, Data curation, Formal analysis, Visualization, Writing – original draft. **Caroline Hansen:** Methodology, Validation, Investigation, Data curation, Formal analysis. **Franziska Halbrügge:** Methodology, Validation. **Ludmilla Hann:** Methodology, Validation, Investigation, Data curation, Formal analysis. **Sarina Weiß:** Methodology, Validation. **Christian Schlenz:** Writing – review & editing, Resources. **Hans-Peter Wendel:** Writing – review & editing, Resources. **Meltem Avci-Adali:** Conceptualization, Project administration, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing, Resources.

Declaration of competing interest

The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.212824>.

References

- [1] R.P. Barbaro, et al., Extracorporeal membrane oxygenation support in COVID 19: an international cohort study of the extracorporeal life support organization registry, *Lancet* 396 (10257) (2020) 1071–1078.
- [2] M. Bisconti, J. Sonett, M. Bacchetta, ECMO as bridge to lung transplant, *Thorac. Surg. Clin.* 25 (1) (2015) p. 17–.
- [3] J. Arons, et al., Toward a long term artificial lung, *ASAIO J.* 66 (8) (2020) 847.
- [4] A. de Mel, B.G. Cousins, A.M. Seifalian, Surface modification of biomaterials: a quest for blood compatibility, *Int. J. Biomater.* 2012 (2012), 707863.
- [5] H.P. Wendel, G. Ziemer, Coating techniques to improve the hemocompatibility of artificial devices used for extracorporeal circulation, *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 16 (3) (1999) 342–350.
- [6] M. Zhang, et al., Anti-thrombogenic surface coatings for extracorporeal membrane oxygenation: a narrative review, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 7 (9) (2021) 4402–4419.
- [7] V. Videm, et al., Reduced complement activation with heparin coated oxygenator and tubings in coronary bypass operations, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 103 (4) (1992) 806–813.
- [8] A.K. Zimmermann, et al., Effect of biopassive and bioactive surface coatings on the hemocompatibility of membrane oxygenators, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 80 (2) (2007) 433–439.
- [9] C.J. Schulze, et al., Phosphorylcholine coated circuits improve preservation of platelet count and reduce expression of proinflammatory cytokines in CABG: a prospective randomized trial, *J. Card. Surg.* 24 (4) (2009) 363–368.
- [10] X. Mueller, et al., Poly(2-methoxyethylacrylate) (PMEA) coated oxygenator: an ex vivo study, *J. Artif. Organs* 25 (3) (2002) 223–229.
- [11] R. De Vroeghe, et al., The impact of heparin coated circuits on hemodynamics during and after cardiopulmonary bypass, *Artif. Organs* 29 (6) (2005) 490–497.
- [12] A. Evseev, et al., Membranes in extracorporeal blood oxygenation technology, *Membr. Membr. Technol.* 1 (4) (2019) 201–211.
- [13] A. Ontaneda, G.M. Anrich, Novel surfaces in extracorporeal membrane oxygenation circuits, *Front. Med.* (2018) 321.
- [14] X. Ren, et al., Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications, *Chem. Soc. Rev.* 44 (15) (2015) 5680–5742.
- [15] M. Avci Adali, et al., Current concepts and new developments for autologous in vivo endothelialisation of biomaterials for intravascular applications, *Eur. Cells Mater.* 21 (2011) 157–176.
- [16] K. Gerling, et al., A novel cI-esterase inhibitor oxygenator coating prevents FXII activation in human blood, *Biomolecules* 10 (7) (2020) 1042.
- [17] L.H. Jaffer, J.I. Weitz, The blood compatibility challenge. Part 1: blood contacting medical devices: the scope of the problem, *Acta Biomater.* 94 (2019) 2–10.
- [18] M.F. Maitz, et al., The blood compatibility challenge. Part 4: surface modification for hemocompatible materials: passive and active approaches to guide blood material interactions, *Acta Biomater.* 94 (2019) 33–43.
- [19] G.T. Li Ferzli, et al., A nitric oxide releasing self assembled peptide amphiphilic nanomatrix for improving the biocompatibility of microporous hollow fibers, *ASAIO J.* 61 (5) (2015) 589.

- [20] S.-H. Ye, et al., Hollow fiber membrane modification with functional zwitterionic macromolecules for improved thromboresistance in artificial lungs, *Langmuir* 31 (8) (2015) 2463–2471.
- [21] A.D. Malkin, et al., Development of zwitterionic sulfobetaine block copolymer conjugation strategies for reduced platelet deposition in respiratory assist devices, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 106 (7) (2018) 2681–2692.
- [22] F. Obetals, et al., Improving hemocompatibility of membranes for extracorporeal membrane oxygenators by grafting nonthrombogenic polymer brushes, *Macromol. Biosci.* 18 (3) (2018) 1700359.
- [23] T.R. Roberts, et al., Heparin free extracorporeal life support using tethered liquid perfluorocarbon: a feasibility and efficacy study, *ASAIO J.* 66 (7) (2020) 809–817.
- [24] X. Huang, et al., Surface monofunctionalized polymethyl pentene hollow fiber membranes by plasma treatment and hemocompatibility modification for membrane oxygenators, *Appl. Surf. Sci.* 362 (2016) 355–363.
- [25] S. Jana, Endothelialization of cardiovascular devices, *Acta Biomater.* 99 (2019) 53–71.
- [26] B. Wiegmann, et al., Developing a biohybrid lung – sufficient endothelialization of poly 4 methyl 1 pentene gas exchange hollow fiber membranes, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 60 (2016) 301–311.
- [27] L. Moller, et al., Towards a biocompatible artificial lung: covalent functionalization of poly(4 methylpent 1 ene) (TPX) with eRGD pentapeptide, *Biomater. J. Org. Chem.* 9 (2013) 270–277.
- [28] M. Pflaum, et al., Endothelialization and characterization of titanium dioxide coated gas exchange membranes for application in the bioartificial lung, *Acta Biomater.* 50 (2017) 510–521.
- [29] C.G. Cornelissen, et al., Fibronectin coating of oxygenator membranes enhances endothelial cell attachment, *Biomed. Eng. Online* 12 (2013) 7.
- [30] M. Pflaum, et al., Towards biohybrid lung: induced pluripotent stem cell derived endothelial cells as clinically relevant cell source for biologization, *Micromachines (Basel)* 12 (8) (2021).
- [31] H. Wang, et al., Selective in vivo metabolic cell labeling mediated cancer targeting, *Nat. Chem. Biol.* 13 (4) (2017) 415–424.
- [32] N.J. Agard, J.A. Prescher, C.R. Bertozzi, A strain promoted [3+ 2] azide–alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (46) (2004) 15046–15047.
- [33] J.W. Yau, H. Teoh, S. Verma, Endothelial cell control of thrombosis, *BMC Cardiovasc. Disord.* 15 (2015) 130.
- [34] S. Klein, et al., EndOxy: dynamic long term evaluation of endothelialized gas exchange membranes for a biohybrid lung, *Ann. Biomed. Eng.* 48 (2) (2020) 747–756.
- [35] I.M. Williams, J.C. Wu, Generation of endothelial cells from human pluripotent stem cells: methods, considerations, and applications, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 39 (7) (2019) 1317–1329.
- [36] J. Nguyen, Y. Y. Lin, S. Gerecht, The next generation of endothelial differentiation: tissue specific ECs, *Cell Stem Cell* 28 (7) (2021) 1188–1204.