

**Aus der Universitätsklinik  
für Thorax-, Herz- und Gefäß- Chirurgie Tübingen  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Dr. h.c. G. Ziemer**

**Reduzierung der Leukozytenadhäsion an humanen  
venösen Endothelzellen mittels spezifischer siRNA  
Sequenzen im Flusskammermodell**

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

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

**vorgelegt von  
Isabelle Marie Müller  
aus  
Albstadt  
2008**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1.Berichterstatter: Professor Dr. Dr. h.c. G. Ziemer

2.Berichterstatter: Professor Dr. M. Gawaz

Für meine Eltern

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>Seite</b>
I. Einleitung.....	1
II. Hintergrund und Zielsetzung der Arbeit.....	14
III. Material und Methodik.....	17
III.1 Material.....	17
III.1.1 Antikörper.....	17
III.1.2 Transfektionsreagenzien und siRNA.....	17
III.1.3 Reagenzien.....	18
III.1.4 Geräte.....	20
III.2 Methodik.....	21
III.2.1 Endothelzellkultur.....	21
III.2.1.1 Isolierung der Endothelzellen aus der Vena saphena magna.....	21
III.2.1.2 Anzucht einer Zellkultur.....	22
III.2.1.3 Beschichtung der $\mu$ -Slide I, Collagen IV und Mediumswechsel.....	23
III.2.2 Visualisierung der Adhäsionsmoleküle.....	24
III.2.3 Charakterisierung der Oberflächenmoleküle durch FACS.....	25
III.2.4 siRNA Transfektion.....	26
III.2.5 Granulozytenisolierung.....	28
III.2.6 Flusskammermodell und hydrodynamische Grundlagen.....	29
III.2.7 Analyse der Adhäsionsexperimente.....	31
III.2.8 Statistische Auswertung.....	31
IV. Ergebnisse.....	33
IV.1 Immunhistochemischer Nachweis der Transfektionseffizienz.....	33
IV.1.1 Die Effizienz der ICAM-1 siRNA.....	33
IV.1.2 Visualisierung des E-Selektin Rezeptors nach Transfektion.....	38
IV.1.3 Quantifizierung des VCAM-1 Rezeptors nach der Transfektion mit VCAM-1 siRNA.....	42
IV.2 Nachweis der Transfektionseffizienz mittels quantitativer Erfassung der Leukozytenadhäsion.....	46

IV.2.1	Transfektion der Endothelzellen mit ICAM-1 siRNA.....	49
IV.2.2	Leukozytenadhäsion nach Transfektion mit E-Selektin siRNA.....	49
IV.2.3	VCAM-1 vermittelte Leukozytenadhäsion und die Auswirkung einer Transfektion mit VCAM-1 siRNA.....	52
IV.2.4	Auswirkung der Transfektion mit drei spezifischen siRNAs auf die Leukozytenadhäsion.....	55
V	Diskussion.....	59
V.1	Der therapeutischer Charakter der siRNA und alternative Methoden zur RNA-Interferenz.....	60
V.2.	Diskussion der Methodik und des Versuchsaufbaus.....	66
V.2.1	Methoden der Messung der Leukozyten-Endothel-Interaktionen.....	66
V.2.2	Messung der Leukozyten-Endothel-Interaktionen in $\mu$ -Slide I.....	67
V.2.3	Transfektion mit spezifischer siRNA.....	70
V.3	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	72
V.4	Diskussion der Ergebnisse.....	73
VI.	Zusammenfassung.....	80
VII.	Literaturverzeichnis.....	84
VIII.	Abkürzungsverzeichnis.....	101
IX.	Danksagung.....	103
X.	Lebenslauf.....	104

## I Einleitung

In den industrialisierten Ländern gehören die Herz- Kreislauferkrankungen zu den häufigsten Todesursachen. Ätiologisch gesehen ist hierfür die Arteriosklerose verantwortlich.<sup>20,21,145</sup> Die Manifestation der Arteriosklerose an den Koronararterien wird als koronare Herzkrankheit (KHK) bezeichnet.

Früher wurde die Arteriosklerose als degenerative Alterserkrankung verstanden, welche sich in einer Lipidablagerung der Gefäße mit anschließender Gefäßverkalkung abbildet. Heute spricht man von einer chronisch entzündlichen Erkrankung der Gefäße,<sup>50,139,140,141,170</sup> der eine endotheliale Dysfunktion<sup>85,138</sup> zu Grunde liegt. Nach Definition der WHO ist die Arteriosklerose eine „variable Kombination von Veränderungen in der Intima, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen verbunden mit Veränderungen in der Mediaschicht der Gefäße“. <sup>18</sup> Zu einer Störung der funktionellen Integrität des Gefäßendothels können zahlreiche Bedingungen beitragen, so unter anderem die arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, Hypercholesterinämie,<sup>90</sup> Adipositas,<sup>40,100</sup> das Alter, männliches Geschlecht, genetische Faktoren, systemische Entzündungsreaktionen und Stress.<sup>54,116</sup>

Die Bedeutung der Arteriosklerose wird für die Medizin immer essentieller, da aus ihr viele kardiologische, angiologische und neurologische Krankheitsbilder resultieren. Deren Auswirkungen reichen über das Gesundheitsspektrum hinaus in die Volkswirtschaft hinein, sodass eine suffiziente Therapiemöglichkeit allgemein erstrebenswert ist.

Es existieren verschiedene Therapieansätze zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit basierend auf pharmakologischen, kardiologisch-interventionellen oder chirurgischen Maßnahmen. Pharmakologisch wird

versucht, die myokardiale Sauerstoffversorgung zu verbessern und den Gefäßtonus zu senken. Ein weiterer Teil der Langzeittherapie besteht aus Verminderung des Sauerstoffsbedarfs des Herzens, Risikominimierung des thrombotischen Koronarverschlusses und Senkung des LDL-Cholesterins. Es wird versucht diese Ziele mit Hilfe einer Kombination von Thrombozytenaggregationshemmern, ACE-Hemmern,  $\beta$ -Blockern, Nitraten oder Statinen zu erreichen. Ebenso von Bedeutung ist die Reduktion der bestehenden Risikofaktoren sowie die Realisierung eines, dem Krankheitsbild angepassten Lebensstils.

Bei isolierten Stenosen der Koronargefäße wird interventionell eine Revaskularisation des stenosierenden Koronargefäßes angestrebt. Dies geschieht mittels der perkutanen transluminalen koronaren Angioplastie (PTCA). Dabei wird intravasal versucht durch Einbringen von Ballonkathetern, welche in deflatiertem Zustand im Bereich der Gefäßstenose platziert werden, die Verengungen unter Druck wiederaufzudehnen. Dadurch wird das Gefäßlumen erweitert und die Gefäßinnenwand geglättet. Nach dieser Ballonkatheterintervention kann im Folgenden ein Stent implantiert werden, welcher drei Ziele verfolgt. Zum einen wird die Gefahr eines (drohenden) Akutverschlusses nach einer PTCA beseitigt und zum anderen wird die Gefäßdurchgängigkeit nach einem unzureichendem PTCA-Ergebnis verbessert. Eine Stentimplantation geht ebenso mit einer verringerten Rezidivrate einer Stenose einher im Vergleich zur alleinigen PTCA.

Die chirurgische Therapie einer KHK besteht in einer koronaren Bypass-Operation, bei der die Vena saphena magna als autologes aorto-koronares Venen-Bypass-Gefäß (ACVB) den stenosierenden Gefäßabschnitt überbrückt. Weiterhin kann die linksseitige Arteria mammaria links als Bypass zum Ramus interventricularis anterior der linken Arteria coronaria genutzt werden.

Eine definitive Therapie ist bisher nicht möglich. Um eine bessere Primärprophylaxe und eine Therapieoptimierung erreichen zu können, ist das Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen in der Gefäßwand von grundlegender Bedeutung, da diese als Antwort der beteiligten Gewebszellen auf proarteriosklerotische Stimuli gesehen werden.

Die arteriosklerotische Läsion ist charakterisiert durch eine inflammatorisch-fibroproliferative Antwort<sup>53</sup> der zellulären Komponenten auf eine Schädigung. Aktuell ist die response-to-injury-Hypothese (Verletzungstheorie)<sup>18</sup> die am meisten akzeptierte Theorie. Sie beruht auf der Vorstellung, dass die Endothelzellen der Intima und eventuell auch, die in der Media gelegenen, glatten Muskelzellen kontinuierlichen Schädigungen ausgesetzt sind, welche auf chemische, mechanische, immunologische oder toxische Einflüsse zurückzuführen sind.<sup>53</sup> Als Folge dieser Schädigung werden Mediatorenstoffe (unter anderem Histamin und Prostaglandin) freigesetzt. Diese induzieren eine Vasodilatation, die eine Verlangsamung des Blutstroms in dem betroffenen Gebiet nach sich zieht. Der wichtigste Vorgang der Entzündungsreaktion ist jedoch die (zelluläre) Immunabwehr, welche eine geregelte Leukozytenwanderung aus dem vaskulären System in das Gewebe kennzeichnet. Leukozyten werden chemotaktisch zum Ort der Schädigung gelockt und wandern ins umliegende Gewebe ein. Bei diesem Vorgang spielt die Adhäsionskaskade<sup>159</sup> eine entscheidende Rolle. Dieser liegt ein mehrstufiger Prozess zu Grunde, der sich in einem Entlangrollen (Rolling) und einem lockeren Festhalten (Tethering) der Leukozyten über die Endothelzellen der Gefäßwand äußert und in eine feste Adhäsion (Sticking) übergeht und schließlich in einer Transmigration ins subendotheliale Gewebe endet.<sup>83,121</sup> Diesem ersten Kontakt zwischen den Leukozyten und den Endothelzellen wirken jedoch die Scherkräfte des Blutstroms entgegen.<sup>96,99,150</sup> Erst die Expression von Adhäsionsmolekülen ermöglichen den Leukozyten die initiale Kontakte. Hierfür sind verschiedene Klassen von Adhäsionsmolekülen, die sowohl von Leukozyten als auch von Endothelzellen auf der Zelloberfläche exprimiert werden, verantwortlich. Sie lassen sich den verschiedenen Familien der Selektine, den Immunglobulinen oder den Integrinen zuordnen. Darüber hinaus existieren noch die Familie der Cadherine und andere Rezeptoren, die für die hier vorliegende Arbeit jedoch nicht relevant waren.

Einen der initialen Schritte dieser Adhäsionskaskade, das Rolling der Leukozyten auf den Endothelzellen, vermittelt die Klasse der Selektine.<sup>97,99,104</sup> Bisher sind drei Selektine bekannt,<sup>14</sup> eingeteilt in L-, P-, und E-Selektin, wobei



L Leukozyten, P Platelet und E endothelial definiert. Das L-Selektin befindet sich auf den Leukozyten und dessen Liganden auf den Endothelzellen.<sup>100</sup> Die beiden vaskulären Selektine, E-Selektin und P-Selektin, werden von den Endothelzellen exprimiert und ihre Liganden befinden sich auf den Leukozyten<sup>1,89</sup> wobei derjenige für P-Selektin vor allem auf Thrombozyten lokalisiert ist.<sup>17</sup> Diese Selektine werden erst als Folge des Entzündungsprozesses ausgebildet. E-Selektin ist für das langsame Rolling der Leukozyten verantwortlich und leitet in einer späteren Phase der Kaskade in die feste Adhäsion über.<sup>92,128</sup> Durch die erhöhte Expression bereits bei erster Inflammation und auch später in arteriosklerotischen Plaques spielt E-Selektin eine wichtige Rolle bei der Arterioskleroseentstehung.<sup>2</sup> Das Rolling der Leukozyten wird durch Chemokine gesteuert und durch die daraus resultierende Verlangsamung der Leukozyten in dem betroffenen Gebiet, kommt es zu einer lokalen Konzentrierung an der Oberfläche der Endothelzellen, welches die Ausbildung von leukozytären Rezeptoren der Integrinfamilie auslöst.<sup>107</sup>

Diese nun aktivierten Integrine interagieren mit Adhäsionsmolekülen der Immunglobulin-Familie, welche von Endothelzellen ubiquitär ausgebildet werden, und führen schließlich zu einer festen Adhäsion und transendothelialen Migration der Leukozyten.<sup>28,58</sup> Zu dieser Familie gehören unter anderem die Rezeptoren ICAM-1 (Intercellular Cell Adhesion Molecule-1), VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) und PECAM (Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule). Alle drei Rezeptoren werden von den Endothelzellen exprimiert und binden an Liganden, die sich auf der Leukozyten- oder der Thrombozytenoberfläche befinden. Das Zusammenspiel von ICAM-1 und VCAM-1 ist für die Bindung der Leukozyten an die Endothelzellen von großer Bedeutung.<sup>83</sup> Im Anschluss an die feste Adhäsion folgt in einem weiteren Schritt die Transmigration der Leukozyten durch das Endothel.<sup>155</sup>

Die Familie der Integrine ist für die Adhäsion der Zellen untereinander oder mit der extrazellulären Matrix zuständig. Sie treten in diesem Fall vor allem als Liganden der Immunglobulin-Familie auf, besonders für ICAM-1.<sup>17</sup>

Selbst unter physiologischen Bedingungen findet eine geringe transendotheliale Migration von Leukozyten durch das Endothel statt. Liegt nun, wie bei der Arteriosklerose eine Entzündungsreaktion vor, so wird neben anderen inflammatorischen Stimuli wie Interleukin-1/ -4/ -8 und Interferon  $\gamma$ , der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) vermehrt freigesetzt. Dieser induziert eine vermehrte Expression der genannten Adhäsionsmoleküle, die die Rekrutierung von Leukozyten in der arteriosklerotischen Läsion verstärken und somit zum Fortschreiten der Läsion beiträgt.

Allgemein liegt der Expression der Adhäsionsmolekülrezeptoren eine differentielle Genexpression zu Grunde. Hierfür sind die molekularen Zusammenhänge der Genexpression von Bedeutung. Die Information eines Gens, codiert in doppelsträngiger DNA im Zellkern, wird während der Transkription auf eine mRNA übertragen. Anschließend wird in der Translation die in mRNA codierte Information in die Aminosäuresequenz des Genproduktes (Protein) anhand des genetischen Codes übersetzt. Das dabei entstehende Protein entspricht hier den Adhäsionsmolekülen. Dieses Wissen über die Grundlagen der Genexpression ermöglicht prinzipiell neue Behandlungsmethoden auf den Ebenen des Genoms (Gesamtheit der genetischen Information einer Zelle), des Transkriptom (Gesamtheit der transkribierten mRNA) und des Proteoms (Gesamtheit aller exprimierten Proteine).

Die Genexpression kann sequenzabhängig inhibiert werden mit molekularen Werkzeugen wie zum Beispiel Nukleinsäure-Wirkstoffen. Hierfür gibt es verschiedene Ansätze, die alle in einer sequenzabhängigen Degradation der mRNA enden. Drei Technologien werden derzeit intensiv untersucht:

1. die Antisense-Technologie, bei der ein komplementäres Oligonukleotid zur Target- mRNA verwendet wird und schließlich durch RNase H zur Spaltung der mRNA führt. <sup>12</sup>
2. die Ribozym-Technologie, die katalytisch wirksame RNA einsetzt um die Ziel-mRNA zu spalten. <sup>78</sup>
3. die RNAi-Technologie, bei der doppelsträngige mRNA zur Spaltung von komplementärer Ziel-mRNA führt. <sup>46</sup>

Die Antisense-Oligonukleotide (AS-ONs) haben meist eine Länge von 15-25 Nukleotiden und werden für die spezifische Gensuppression hergestellt. Der Vorteil dieser Basenlänge ist, dass Nebeneffekte kaum zu erwarten sind, da Sequenzübereinstimmungen mit anderen Genen unwahrscheinlich sind. Es werden zwei Wirkmechanismen beschrieben. Zum einen wird durch die Bindung der AS-ON an die Ziel-mRNA im Zellkern eine RNase H aktiviert, die die Spaltung des RNA-Stranges katalysiert. Dieser wird anschließend durch Exonukleasen abgebaut.<sup>37</sup> Der Antisense-Strang wird freigesetzt und kann an weitere Zielmoleküle binden. Der zweite Wirkmechanismus der AS-ON führt über eine sterische Blockade zur Inhibition der Translation der entsprechenden Zielsequenz.

Ribozyme sind RNA-Moleküle, die intramolekulare Spaltungs- und Splicing-Reaktionen katalysieren. Ein Vorteil der Ribozyme gegenüber den AS-ON liegt darin, dass die Spaltung des Zielmoleküls unabhängig von RNase H geschieht. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass diese nicht nur exogen in die Zellen eingeführt werden können, sondern mittels Vektoren endogen in den Zellen exprimiert werden können. Dies bedeutet zugleich eine längere Inhibition der Zielsequenz, da die Wirkdauer nicht durch den Abbau der Ribozyme durch die Nukleasen begrenzt wird. Somit können Zellen, die das Transgen aufgenommen haben proliferiert werden.

Ähnlich wie Ribozyme können auch siRNAs, die der RNAi-Technologie angehören, sowohl exogen als auch endogen von Vektoren exprimiert werden. Endogen werden die siRNAs dabei meistens von Polymerasen-III-Promotoren des U6 oder H1-Typs aus transkribiert, welche in allen Zelltypen aktiv sind und die Synthese kleiner nukleärer RNAs (U6) oder RNA-Anteile der RNase P (H) steuern. Nach deren Transkription nimmt die short hairpin RNA (shRNA) durch interne Basenpaarungen eine Haarnadelkonformation an. In dem Dicer entsteht eine reife siRNA. Mit Hilfe dieses Verfahrens der Plasmidvektoren können die transfizierten Zellen selektiert werden und weisen nach zwei Monaten noch immer ein effizientes Gene Silencing auf.<sup>24</sup>

Für das exogene Delivery werden die siRNAs durch die Verwendung modifizierter Nukleotide gegen Nukleasen geschützt und mittels nicht toxischer

Lipide in die Zellen geschleust. Dieses Verfahren wird in einem späteren Abschnitt genauer erläutert.

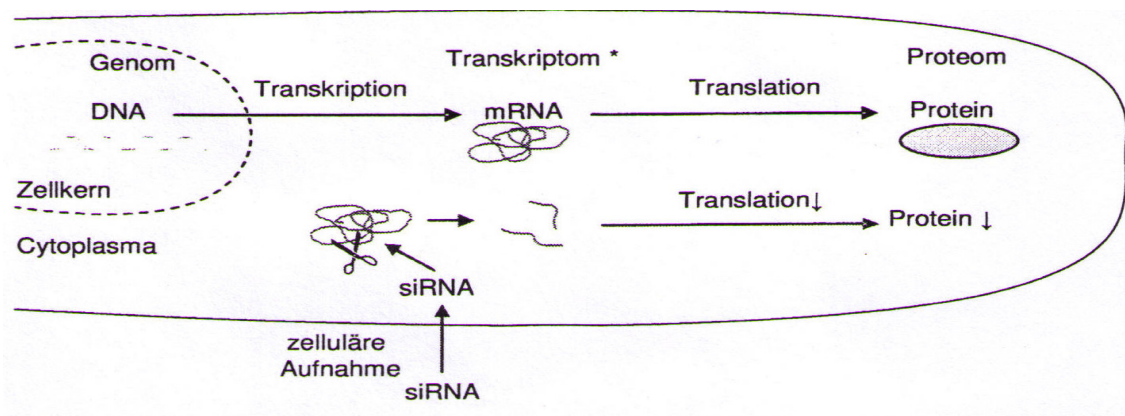
Bevor genauer auf die RNAi-Technologie eingegangen wird, wird noch eine weitere Form der Behandlungsmethoden, die Gentherapie, erläutert. Diese Methode befindet sich noch in der experimentellen Phase der Therapieform. Häufig wird diese definiert als eine Kombination verschiedener Ansätze zur Behandlung von Erkrankungen, die auf dem Transfer von DNA basierendem genetischen Material beruht. Der Gentransfer kann entweder in vivo oder in vitro unter Verwendung verschiedener Techniken erfolgen. Eine Möglichkeit besteht darin das genetische Material über Viren in die Zielzelle zu schleusen.<sup>136</sup> Die unterschiedlichen viralen Transfersysteme differenzieren sich in der Effizienz und Selektivität der infizierten Zielzellen, der Stabilität und Größe des transferierbaren genetischen Materials und der Immunantwort des Wirtsorganismus. Es wird versucht durch die Verwendung von gewebsspezifischen Promotoren die Expression auf eine bestimmte Zellpopulation zu beschränken. Ein Problem besteht in der fehlenden Kontrolle der Genexpression in den infizierten Zellen. Außerdem kann ein weiterer Nachteil dieses Gentransfers mittels Viren darin bestehen, dass sich diese in Onkogene einlagern und so zu deren Aktivierung beitragen. Neben dieser direkten Methode gibt es indirekte gentherapeutische Ansätze, die versuchen durch die Expression von Proteinen in Mechanismen einzugreifen, die dem Krankheitsverlauf entgegenwirken. So wird versucht mittels Gentransfer eine antitumorale Immunantwort zu provozieren. Durch die Expression von VCAM-1, B7.1, B7.2 und CD40L, die normalerweise aus dendritischen Zellen exprimiert werden, erlangen neoplastische Zellen die Fähigkeit mit zytotoxischen T-Zellen in Kontakt zu treten und können so zu einer Induktion antitumoraler T-Zellen beitragen.<sup>81</sup> Eine weitere Möglichkeit antigen-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten zu stimulieren besteht in der Transfektion von humanen peripheren Monozyten mit messenger RNA mittels Elektroporation. Dieses wurde erfolgreich von der Firma CureVac GmbH (Tübingen, Deutschland) erforscht, im Rahmen von natürlichen oder durch Impfung induzierten Immunreaktionen.<sup>163</sup>

Die RNAi-Technologie ist ein viel versprechendes Konzept, die auf der Ebene des Transkriptoms entwickelt worden ist. Es beruht auf der Nutzung der sequenzspezifischen Degradation einer Ziel-mRNA mit Hilfe kleiner nicht-codierender doppelsträngiger RNAs, welche „small interfering“ RNAs (siRNA) bezeichnet werden.<sup>47</sup> Bei diesem Prozess der RNA-Interferenz (RNAi)<sup>51</sup> handelt es sich um ein relativ neues Forschungsgebiet.

1998 wurde diese RNAi von Andrew Z. Fire und Craig C. Mello entdeckt, indem sie sowohl sense als auch antisense RNA in *C. elegans* parallel injizierten und feststellten, dass diese kombinierte Gabe potenter wirkt als eine Einzelgabe, aufgrund der dabei entstehenden Doppelstrangbildung.<sup>51</sup> Die Grundlage dieses Versuches bestand aus der Beobachtung von Guo und Kemphues, die versuchten das *par-1*-Gen an dem Fadenwurm *C.elegans* mit Antisense-RNA auszuschalten. Nach Einbringen von Sense-RNA konnte die gleiche Wirkung erzielt werden, obwohl diese keine Auswirkung auf die Proteintranslation haben sollte.<sup>64</sup> Als Ursache stellte sich heraus, dass die Sense-RNA mit Antisense-RNA Molekülen kontaminiert worden war. Dies führte zu Bildung einer homologen Doppelstrang-RNA (dsRNA). Heute weiß man, dass Guo und Kemphues ihre Untersuchungsergebnisse fehlerhaft interpretierten. Drei Jahre später fanden die beiden Amerikaner Andrew Z. Fire und Craig C. Mello heraus, dass dsRNA viel effektiver für das Gene Silencing ist als Antisense-RNA. Für diese Entdeckung gewannen sie den Nobelpreis in Medizin/Physiologie 2006, da sie einen neuen Weg entdeckt haben um die Transkriptionsmenge von bestimmten Genen zu regulieren. Als 2001 Tuschl, Elbashir und Kollegen<sup>46</sup> entdeckten, dass die RNAi nicht nur in Rhabditiden sondern auch in Säugerzellen zur Hemmung der Genexpression genutzt werden kann, war eine neue Behandlungsmethode in der funktionellen Genomforschung mittels RNA-Interferenz frei gegeben worden.

Die Methode der liposomalen Transfektion hat den Vorteil gegenüber der viralen Transfektion, dass die siRNA chemisch synthetisiert werden kann und nur ein geringes Gefahrenpotenzial in sich birgt, da sie einerseits bei der Einschleusung nicht auf virale Systeme angewiesen ist, welche eventuell eine Immunantwort auslösen können und andererseits nicht ins das Genom

integriert wird. Somit wird der transiente Charakter der siRNA deutlich. Im Gegensatz dazu steht die Gentherapie, die sich auf den gesamten Organismus auswirkt. Ein weiterer Vorteil der siRNA ist die sehr selektive und hochspezifische Abschaltung von bestimmten Genen bzw. deren Genprodukten. Die daraus resultierende gezielte Intervention in die fundamentalen zellulären Prozesse der Genregulation wird einer neuen Komplexitätsstufe auf molekularer Ebene zugeordnet. Die RNAi wird als neuer vielversprechender therapeutischer Ansatz eingeschätzt und wird in der klinischen Forschung eine wichtige Rolle einnehmen.

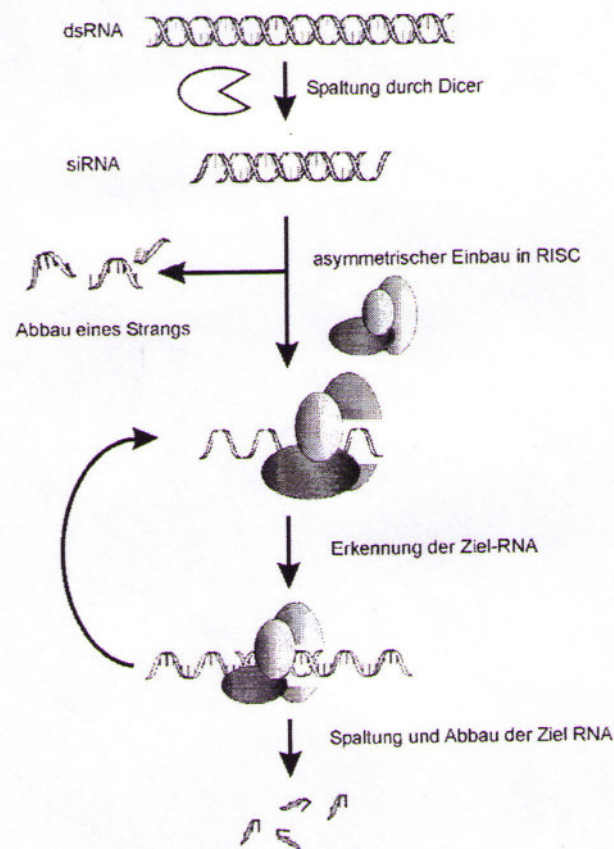


**Abb. I.1: Schematische Darstellung der Genexpression und der RNAi in der Zelle.** Die Information der DNA wird durch Transkription auf die mRNA und nachfolgend durch Translation in ein Protein übertragen. Die siRNAs entfalten ihre Wirkung nach der zellulären Aufnahme im Zytoplasma. Die mRNA wird sequenzspezifisch geschnitten und degradiert. Dadurch kann die mRNA nicht mehr translatiert werden und keine neue Proteinsynthese mehr stattfinden.

Diese Entdeckung der regulatorischen Funktion kleiner siRNAs bezeichnete das Magazin *Science* 2002 als den „Durchbruch des Jahres“. Diese Aussage bezieht sich sowohl auf die Entdeckung neuer zellulärer Grundkenntnisse, als auch auf die neuen Interventionsmöglichkeiten mittels der RNAi bei der Genexpression. Bisher wurde RNA lediglich als ein transportfähiges Zwischenprodukt auf dem Weg vom Gen zum Protein wahrgenommen. Doch nun erlangt die RNA einen neuen Stellenwert in der klinischen Forschung, der

auf ihre wichtigen katalytischen und strukturellen Funktionen zurückzuführen ist. Diese Methode ermöglicht mit der Expressionsinhibition von spezifischen Gensequenzen neue Wege der Genregulation. Mit dieser neuen Erkenntnis wurde der Forschung eine wichtige Aufgabe zugeteilt: die Entwicklung neuer Therapiewege bei bisher nicht behandelbaren Erkrankungen.

Die doppelsträngige RNA (dsRNA) initiiert den ersten Schritt der RNA-Interferenz. Diese dsRNA wird durch das Protein *Dicer*, eine Endonuklease des RNase III-Typs, in kleine doppelsträngige small interfering RNAs (siRNA) von 21-26 Nukleotiden Länge gespalten.<sup>67,68,168,178</sup> Diese Dicer sind bei der Überführung der siRNA in den proteinhaltigen *RNA induced silencing complex* (RISC)<sup>166</sup> essentiell. Der zentrale Schritt bei der Zusammenlagerung des RISC-Komplexes ist der Einbau der siRNA. Diese besteht aus einem „guide-strand“, der komplementär zur Ziel-mRNA ist, und einem „passenger-strand“, welcher bei der RISC-Zusammensetzung entfernt werden muss. Die genaue Zusammensetzung des RISC-Komplexes ist noch nicht geklärt. Es werden mehrere Beschreibungen in der Literatur angegeben.<sup>110,29,135,61</sup> Grundsätzlich können jedoch beide Stränge in den Komplex eingebaut werden.<sup>48</sup> Der sense-Strang ist für die Degradation eines antisense-Targets und der antisense-Strang für die eines sense-Targets, meistens mRNA, verantwortlich. Es hängt von der Stabilität der RNA Einzelstränge ab, welcher der beiden Stränge in den RISC Komplex eingebaut wird.<sup>86,144,165</sup> Der stabilere Strang wird eingebaut und der andere wird durch Nukleasen abgebaut. Durch den im RISC-Komplex gebundenen Strang wird eine Interaktion mit einer spezifischen mRNA, die eine homologe Sequenz zu dem gebundenen Strang aufweist, gestartet. Die entsprechende mRNA wird gespalten.<sup>102,156</sup> Die nun zerstörte Ziel-mRNA wird durch zelluläre Nukleasen abgebaut, während der RISC-Komplex weitere Spaltungsreaktionen durchführen kann.<sup>66</sup> Durch diese spezifische Elimination einer mRNA kann kein Protein mehr, trotz Genstimulation, synthetisiert werden.



**Abb. I.2: Mechanismus der RNA Interferenz.** Für Erläuterungen siehe Text.

RNA-Interferenz kann auch für die Charakterisierung von Proteinfunktionen genutzt werden, indem das zu untersuchende Protein durch den Prozess der RNAi posttranskriptionell herunterreguliert wird. Die Wirksamkeit der hierfür benötigten spezifischen siRNAs hängt von unterschiedlichen Parametern ab. Biochemische Eigenschaften<sup>134,144</sup> zum einen und lokale Struktureigenschaften der Zielregion<sup>71,143,172</sup> zum anderen spielen eine Rolle. Um die siRNA effektiv einsetzen zu können, muss diese zuerst mittels Transfektion in die Zielzelle aufgenommen werden. Hierfür gibt es verschiedene Mechanismen.

Die Plasmamembran, welche das Zytoplasma von der extrazellulären Matrix trennt, besitzt eine dynamische Struktur. Für die Ernährung der Zelle müssen Moleküle die Plasmamembran passieren können. Dies geschieht auf unterschiedliche Weise, je nach Größe und Zusammensetzung der Moleküle. Es existieren Kanäle, Membran- und spezifische Pumpen für Ionen, kleinere



Moleküle und membrangebundene Vesikel für größere Moleküle. Dieser letztere Vorgang wird als Endozytose bezeichnet und schließt sowohl die Phagozytose als auch die Pinozytose mit ein. Es bestehen weitere Untergruppen der Endozytose, auf die in dieser Arbeit nicht eingegangen wird. Die Einschleusung der siRNA in die Zelle kann mit Hilfe von liposomalen Transfektionsreagenzien erfolgen.<sup>176</sup> Diese Liposomen verbinden sich mit der siRNA zu Komplexen und werden zum Großteil durch Endozytose in die Zelle aufgenommen, ein kleiner Teil hingegen fusioniert mit der Plasmamembran. Dementsprechend wird auf diese Weise die siRNA in die Zelle geschleust, um ihre Wirkung dort im Zytoplasma ausführen zu können. Unmodifizierte siRNA ist in Zellkulturexperimenten etwa vier Tage lang wirksam. Diese Stabilität reicht zwar für viele Anwendungen in Zellkulturen aus, um jedoch längerfristige Wirkungen zu erreichen, müssen stabilisierende Modifikationen in die siRNA eingebaut werden, die deren Abbau, durch ubiquitär vorhandene Ribonukleasen, verhindern. Zur ersten Generation dieser Modifikationen gehören die Phosphorothioat-Modifikationen,<sup>41,44</sup> welche die Halbwertszeit der Oligonukleotide in humanen Seren erhöhen.<sup>27,93,131</sup> Der Nachteil dieser Modifikationen ist die unspezifische Bindungsaffinität mit einigen Proteinen.<sup>23,65</sup> Um dieses Problem zu umgehen, wurden zusätzlich Modifikationen am 2'-OH der Ribose eingefügt, genauer gesagt wurde eine 2'-O-Methyl-Gruppe an die besagte Stelle eingebaut. Diese modifizierten Nukleotide der siRNA beeinflussen mehrere Prozesse, unter anderem den Einbau der siRNA in den RISC-Komplex und die Entspiralisierung der RNA-Duplex. Die unspezifischen Proteinbindungsaffinitäten wurden dadurch zwar verringert, jedoch ist durch diese Modifikation eine RNase H Aktivierung nicht mehr möglich,<sup>177</sup> welche RNA-DNA-Hybride erkennt und den RNA-Strang zerschneidet. Mehrere Gruppen haben erfolgreich untersucht an welchen Stellen Modifikationen möglich sind, ohne einen negativen Einfluss auf das Gene Silencing zu erzeugen.<sup>7,19,38,49</sup>

Es wird deutlich dass siRNA-Moleküle Werkzeuge darstellen, die hochspezifisch wirken. Ihre Sensibilität gegenüber Basenfehlpaarungen scheint sequenz- und positionsabhängig zu sein. Es gibt mehrere Studien über die

unspezifischen Nebenwirkungen der siRNA, so unter anderem die Induktion von Stress- und Apoptosegenen und die Auslösung einer Interferon-Antwort.<sup>22,75,147,154</sup> Unter den sogenannten off-target-Effekten werden unspezifische Genexpressionsveränderungen innerhalb der Zelle verstanden, die auf die Applikation der siRNA beruht, aber nicht spezifisch mit der zu supprimierenden Zielstruktur zusammenhängen.<sup>157</sup> Hierzu zählt die durch die siRNA induzierten Interferonantworten. Es gibt Arbeiten, die zeigen, dass siRNAs auch eine Interferonantwort der transfizierten Zelle auslösen können. Sledz et al.<sup>154</sup> zeigten dass transfizierte siRNA neben einer Induktion der spezifischen Gene auch eine interferonvermittelte Aktivierung des JAK/ STAT-Signalweges hervorrufen kann. Des Weiteren ist bekannt geworden, dass siRNAs, die komplementär zu verschiedenen Sequenzen des Transkriptes sind, unterschiedliche mRNA-Expressionen hervorrufen können.<sup>86</sup> Auch Persengiev et al.<sup>130</sup> verdeutlichten die unspezifischen Expressionsänderungen der chemisch synthetisierten siRNAs bei über 1000 Genen. Hieraus resultieren sowohl Induktionen als auch Repressionen von Genen, die in verschiedene Zellfunktionen integriert sind, unter anderem auch in die Interferonantwort. Eine mögliche Erklärung hierfür sind Hybridisierungen zwischen mRNAs und siRNAs trotz Fehlbasenpaarungen. Es resultieren Translationshemmungen oder Degradationen von Nicht-Zielgenen.<sup>76</sup>

## II Hintergrund und Zielsetzung der Arbeit

Die arteriosklerotisch bedingte koronare Herzkrankheit (KHK) zählt zu den führenden Todesursachen in der westlichen Welt.<sup>145,111</sup> Neben kardiologisch-interventionellen Therapiestrategien ist die chirurgische Behandlung der KHK durch Anlage autologer venöser Gefäßtransplantate zur Überbrückung des stenosierenden Gefäßabschnittes zum weltweiten Standard geworden.<sup>62</sup> Jedoch konnte entgegen den Fortschritten der operativen Technik und der Optimierung der postoperativen Medikation die Langzeitprognose infolge der Restenoserate der venösen Bypässe nicht wesentlich verbessert werden.<sup>118</sup> Grund der zunehmenden Transplantatstenosierung der implantierten Gefäße ist die Entwicklung einer Transplantatarteriosklerose, die sich innerhalb von Monaten ausbilden kann.<sup>118</sup>

Als eine Ursache für diese „beschleunigte Arteriosklerose“ der Bypass-Gefäße wird zum einen die Integration des venösen Bypass-Gefäßes in das arterielle Drucksystem angesehen („Arterialisierung“),<sup>26</sup> da die Venentransplantate folglich einem erhöhten arteriellen Druck ausgesetzt werden. Eine weitere Ursache ist neben den kausalpathologischen Risikofaktoren der Arteriosklerose in der multifaktoriellen Ätiologie<sup>10</sup> zu suchen, die durch präoperative (pathomorphologische Veränderungen der Venentransplantate), perioperative (Venenpräparation) sowie postoperative Verletzungen (Implantation in den arteriellen Kreislauf) ergänzt wird.<sup>39,115</sup> Durch den Einsatz der Herz-Lungen-Maschine bei den Bypass-Operationen werden zusätzlich vermehrt Zytokine gebildet, die zu einer systemischen Immunreaktion führen. Infolge der hochregulierten Expression der Adhäsionsmolekülrezeptoren adhären vermehrt Leukozyten an die venösen Endothelzellen. Den Granulozyten folgend adhären Monozyten an die Rezeptoren, welche in der Lage sind nach deren Adhärenz durch das Endothel zu transmigrieren und sich im subendothelialen Gewebe abzulagern und schließlich zu Schaumzellen zu reifen. Dieses

Phänomen spiegelt sich in einer Intimahyperplasie wieder, die sich zu einem späteren Zeitpunkt zu einer Stenose entwickeln kann.

Die zugrunde liegende Arbeitshypothese beruht darauf, dass der Pathomechanismus der zunehmenden Transplantatstenosierung mit Hilfe der RNA-Interferenz hinausgezögert werden kann. Dieser Prozess des Gene Silencing beruht auf der posttranskriptionellen Inhibition von bestimmten Gensequenzen, die für die Adhäsionsmolekülrezeptoren codieren, mittels Transfektion mit spezifischen siRNAs. Die daraus resultierende fehlende Expression der inhibierten Gensequenzen auf den humanen venösen Endothelzellen wirkt sich effizient auf die Leukozytenadhäsion aus. Durch diesen Prozess der RNA-Interferenz kann somit die Restenoserate reguliert werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte durch die Transfektion spezifischer siRNAs die Expression von bestimmten Adhäsionsmolekülen, die in der Adhäsionskaskade der Entzündungsreaktion eine entscheidende Rolle spielen, inhibiert werden. Bei den untersuchten endothelialen leukozytären Rezeptoren handelte es sich um E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1. Dieser inhibierende Effekt, ausgelöst durch die transfizierten siRNAs, auf die Leukozytenadhäsion an die Endothelzellen, könnten zukünftig neue gentechnologische Möglichkeiten in der Inhibition chronisch entzündlicher Prozesse und der Restenoserate nach Bypass-Operationen eröffnen.

Die Transfektionseffizienz der kultivierten Endothelzellen wurden durch Fluoreszenzfärbung qualitativ und durch die FACS®-Analyse quantitativ validiert. Diese Ergebnisse stellten die Grundlage für weitere Untersuchungen am Flusskammermodell dar, in der die Transfektionseffizienz anhand der fest adhärierenden Granulozyten (Sticker) nachzuweisen war. Durch den Vergleich der Resultate der ermittelten Stickerzahl zwischen den einzelnen inhibierten Rezeptoren sollte die Frage beantworten, inwieweit sich die verschiedenen Rezeptoren inhibieren lassen und ob quantitative Unterschiede bestehen. Die sich daraus ergebende Frage, ob die Transfektionseffizienz bei einer

Kombination von allen drei hier untersuchten spezifischen siRNAs gesteigert werden kann und in einer weiteren Reduzierung der Leukozytenadhäsion an die Endothelzellen resultiert, sollte in einem weiteren Versuchsansatz ermittelt werden.

### III Material und Methodik

#### 1. Materialien

##### 1.1 Antikörper

Für die Markierung der Adhäsionsmoleküle wurden verschiedene monoklonale Antikörper verwendet.

**Tabelle III.1:Antikörper**

<i>Antikörper</i>	<i>Abkürzung/ Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Anti-E-Selektin, PE-Cy5-Konjugat (IgG1 Mouse, Klon 68-5H11)	Anti-CD62E	BD-Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Anti-human CD31, FITC-Konjugat (IgG1 Mouse, Klon HEC/75)	Anti CD31	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
Anti-ICAM-1, PE-Konjugat (IgG1 Mouse, Klon HA 58)	Anti-CD54	BD-Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Anti-VCAM, FITC-Konjugat (IgG1 Mouse, Klon 51-10C9)	Anti-CD106	BD-Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

##### 1.2 Transfektionsreagenzien

Für die Transfektion wurden die verschiedenen siRNA Sequenzen, welche jeweils gegen einen anderen Rezeptor spezifisch sind, mit Hilfe von Cellfectin® in die Zellen transfiziert. Es wurden spezifische Sequenzen sowohl gegen die

Rezeptoren E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 sowie Kontrollsequenzen (scrambled siRNA), welche für keinen Rezeptor spezifisch sind, eingesetzt.

**Tabelle III.3: Transfektionsreagenzien und siRNA**

<i>Reagenzien</i>	<i>Hersteller</i>
Cellfectin Reagent® 1ng/ml	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
siRNA SelectinE, 5nmol sense: 5`-GGUUGAAUGCACCACUCAAdTdT-3` antisense: 5`-UUGAGUGGUGCAUUCAACcdTdT-3`	Qiagen, Hilden, Deutschland
siRNA ICAM, 5nmol sense: 5`-GCCUCAGCACGUACCUCUAdTdT-3` antisense: 5`-UAGAGGUACGUGCUGAGGCdTdT-3`	Qiagen, Hilden, Deutschland
siRNA VCAM, 5nmol sense: 5`-AAUGCAACUCUCACCUUAAAdTdT-3` antisense: 5`-UUAAGGUGAGAGUUGCAUudTdT-3`	Qiagen, Hilden, Deutschland
siRNA (scramble), 5nmol (non silencing) sense: 5`-UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT-3` antisense: 5`-ACGUGACACGUUCGGAGAAAdTdT-3`	Qiagen, Hilden, Deutschland

### 1.3 Reagenzien

**Tabelle III.4: Reagenzien**

<i>Reagenzien</i>	<i>Abkürzung/ Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Collagenase		PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Collagen G	Kollagen	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Detachment Kit Incl. -Hepes BSS® -Trypsin/EDTA® -TNS®	Detachment Kit	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Gelatine		Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Gentamicin		PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Lösung A incl.-137mM NaCl (8,006g) -5,4mM KCL (0,403g) -4,2mM NaHCO <sub>3</sub> (0,353g) -5mM D-Glucose (0,901g) -500ml Ampuwa - pH 7,3 sterilfiltriert		
Lysing Buffing incl.-8,29g Ammoniumchlorid -1,00g Natriumbicarbonat - 0,037 EDTA® - 500 ml sterilfiltriert	Ery-Lyse	Universitäts-Apotheke, Tübingen, Deutschland
Medium 199 “with Earle`s balanced salt solution, with glutamin and HEPES®”	Medium 199	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Percoll® (1,128 g/ml)	Percoll	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ohne Calcium und Magnesium („Dulbecco`s phosphat buffered saline w/o calcium,	PBS <sup>-</sup>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland



magnesium, sodium bicarbonate")		
RPMI 1640		Cambrex, Verviers, Belgien
Trypanblau-Lösung 0,4% flüssig	Trypanblau	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tumornekrosefaktor- $\alpha$ 10 $\mu$ g IgG1Mouse, Klon MAb11	TNF- $\alpha$	BD-Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

## 1.4 Geräte

Tabelle III.4:Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Bezeichnung/Hersteller</i>
CO <sub>2</sub> –Inkubator	Heraeus; Rottenburg, Deutschland
Eppendorfgefäß 1ml	Eppendorf, Stuttgart, Deutschland
FACS-Röhrchen	Firma Greiner, Frickenhausen, Deutschland
FACScan <sup>TM</sup>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Falcon (15 ml, 50 ml)	Invitrogen, Heidelberg, Deutschland
Fluoreszenzlicht	BP 546, FT 580, LP 590
Kryroröhrchen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
$\mu$ -Slide I, Collagen IV	Ibidi, München, Deutschland
Mikroskop	Axiovert 135, Zeiss Germany
Neubauer-Kammer	Assistent, Sondheim/Rhön, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Stuttgart, Deutschland
Präzisionspumpe PHD 2000, Harvard Apparatus	FMI GmbH Seeheim/Oberbeerbach, Deutschland
Sicherheitswerkbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen Deutschland
6- und 12-well-Platte	BD-Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

Wasserbad	Dinkelberg analytics E 10, Gablingen, Deutschland
Zentrifuge: Typ: Varifuge RF Inert Typ: Varifuge 3.2RS	Heraeus Sepatech, Wehrheim, Deutschland

## 2. Methodik

### 2.1 Endothelzellkultur

#### 2.1.1 Isolierung von Endothelzellen aus der Vena saphena magna

Vor der Isolierung der venösen Endothelzellen wurde eine 6-well-platte wie folgt mit Gelatine beschichtet. Nach der Zugabe von 10 ml Gelatinelösung (0,1%) wurde diese nach 30 Minuten im Brutschrank wieder abgesaugt.

Den Empfehlungen der Ethik-Kommission entsprechend, wurden die für die verschiedenen Versuchsreihen verwendeten venösen Endothelzellen von freiwilligen Patienten entnommen, die zuvor aufgeklärt und eingewilligt hatten. Die venösen Endothelzellen stammten aus Venae saphena magna, die bei Bypass-Operationen als Transplantat verwendet werden. Diese Venen wurden, nach Literatur von Jaffe,<sup>77</sup> zuvor 20 Minuten in RPMI 1640 mit 0,5 % (50 µg/ml) Gentamicin gelegt. Nach der Reinigung der Vene mittels einem sterilen Wattetupfer mit 70 % Ethanol von außen, wurde diese mit Hilfe einer stumpfen Kanüle und einer Klemme, in Richtung der Venenklappen zweimal mit 25 ml der Lösung A durchgespült und anschließend mit 5 ml Collagenaselösung 0,1 % nachgespült. Nach Abklemmen der Vene mit einer Bulldogklemme, wurde diese prall gefüllt mit Collagenaselösung 0,1 % .Die

Befeuchtung der Vene erfolgte mit einigen Tropfen Komplettmedium. Es folgte die Inkubation im Brutschrank bei 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C für 1,5 Stunden. Das Eluat wurde nach dieser Zeit in einem 10 ml Falcon aufgefangen, ebenso die Nachspülung mit 10 ml PBS<sup>-</sup>. Die Suspension wurde 5 Minuten bei 220 g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in 500 µl Komplettmedium resuspendiert und in ein Loch der 6-well-Platte gegeben. Zusätzlich wurde 2 ml 37 °C warmes Medium in das Loch gegeben.

Nach 24 Stunden wurde mit 3 ml Medium gespült, um Zelltrümmer und Erythrozyten zu entfernen. Nach der Zugabe von 2,5 ml Medium, wurde dieses jeden zweiten bis dritten Tag gewechselt. Bei einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen in eine Zellkulturflasche umgesetzt.

Zur Überprüfung der Endothelzellen auf deren Reinheit wurde ein Antikörper gegen CD31 verwendet. Hierfür wurden  $3 \times 10^5$  Zellen in ein Loch einer 12-well-Platte angezüchtet. Vor der Zugabe des CD31-Antikörpers wurden die Zellen zuerst mit FCS 0,5 % (5 ml FCS 5 % mit 50 ml Puffer 1:10 verdünnen) zweimal gewaschen. Nach der Inkubationszeit von 45 Minuten bei 4 °C wurden die Zellen mit FCS 5% gewaschen und von der Platte mit Hilfe von Trypsin<sup>®</sup> abgelöst. Das Pellet nach der Zentrifugation bei 0,2 rcf 5 Minuten wird in 250 µl FACS-Lösung (250 µl PBS<sup>-</sup>/ 2,5 % Formaldehyd) resuspendiert und in FACS-Röhrchen gegeben. Die FACS<sup>®</sup>-Analyse ermöglichte eine Bestimmung der Reinheit der Endothelzellen. Für die Versuche wurden nur Endothelzellen verwendet die eine Reinheit von über 90 % aufwiesen.

### 2.1.2 Anzucht einer Zellkultur

Nach dem Absaugen des Medium aus der 6-well-Platte wurde mit 2 ml Hepes BSS<sup>®</sup> gespült, 1150 µl Trypsin<sup>®</sup> hinzugeben und für 5 Minuten in den Brutschrank gestellt. Durch leichtes Beklopfen der Platte wurden die Endothelzellen von dem Plattenboden gelöst. Die Neutralisation des Trypsins<sup>®</sup> erfolgte mit TNS<sup>®</sup>. Die Suspension wurde in ein 15 ml Falcon 5 Minuten bei 220 g zentrifugiert und das Pellet in 500 µl Medium resuspendiert. Bevor die

Zellsuspension in eine, zuvor mit Gelatine beschichtete Zellkulturflasche, pipettiert wurde, wurde in diese 14 ml 37 °C warmes Medium gefüllt.

Am nächsten Tag erfolgte der Mediumswechsel, welcher von nun an in einem 2 tägigen Rhythmus erfolgte.

Bei einer Konfluenz der Endothelzellen von 80 % wurden diese gesplittet. Das Detachment Kit, bestehend aus Hepes BSS<sup>®</sup>, Trypsin/EDTA<sup>®</sup> und TNS<sup>®</sup> wurde vorgewärmt auf 37 °C. Neue gelatinisierte Zellkulturflaschen wurden mit 14 ml Medium befüllt und mindestens 30 Minuten bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigt inkubiert.

Das Medium in der zu splittenden Zellkulturflasche wurde abgesaugt und mit 5 ml Hepes BSS<sup>®</sup> nachgespült. Durch 7,5 ml Trypsin/EDTA<sup>®</sup> und 5 Minuten im Brutschrank lösten sich die Zellen von dem Zellkulturflaschenboden, welches unter dem Mikroskop überprüft werden konnte und durch zusätzlich leichtes Beklopfen der Flasche unterstützt wurde. Nach der Neutralisation mit TNS<sup>®</sup> konnte die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon überführt werden. Die Zentrifugation erfolgte bei 220 g über 5 Minuten. Das Pellet wurde in 500 µl Medium resuspendiert und auf 1 ml Medium aufgefüllt. Zur Zellzahlbestimmung wurden 80 µl einer 0,5 % igen Trypanblaulösung und 20 µl aus der Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß gegeben. In die Neubauerkammer wurden mit 20 µl aus der angefärbten Suspension gegeben und unter dem Mikroskop bei 100 facher Vergrößerung ausgewertet. Es wurden dabei die Zellen in den 4x16 Quadraten ausgezählt und mit 5 (für die Verdünnung mit der Trypanblaulösung) und 2,5 (der Faktor) multipliziert.

Die Zellsuspension wurde auf die neuen Kulturflasche (jeweils 5 Stück) verteilt. Am darauf folgenden Tag erfolgte der Mediumswechsel.

### 2.1.3 Beschichtung der µ-Slide I, Collagen IV und Mediumswechsel

Vor der Beschichtung der µ-Slides I wurden die Zellen, nach obiger Beschreibung für das Splitten, von der Zellkulturflasche abgelöst und gezählt. Nach der Zählung wurde die Suspension auf  $7 \times 10^5$  Zellen/ml verdünnt.

Hiervon wurden nun je 100  $\mu\text{l}$  in den Kanal der  $\mu\text{-Slides I}$  pipettiert. Es entstand ein Sog der die Suspension bis an das andere Ende zog bzw. durch leichte Schrägstellung der  $\mu\text{-Slides I}$  konnte die Suspension leichter bis zum anderen Ende diffundieren. Anschließend wurden in die zwei Kammern je 500  $\mu\text{l}$  Medium pipettiert und mit den Käppchen fest verschlossen. Die  $\mu\text{-Slides I}$  wurden daraufhin in den Brutschrank bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  gestellt.

Nach ungefähr 4 Stunden waren die Zellen als kontinuierlicher Layer mit einer Konfluenz von 60 – 80 % mit Hilfe des Mikroskops bei 100 facher Vergrößerung sichtbar.

Am nächsten Tag erfolgte der Mediumswechsel. Die 500  $\mu\text{l}$  Medium wurden abpipettiert und durch neues Medium ersetzt.

## 2.2 Visualisierung der Adhäsionsmoleküle

Um die Expression von ICAM-1 (CD54) sichtbar zu machen, wurden die beschichteten  $\mu\text{-Slides I}$  zuerst mit 1,25 ng/ml TNF- $\alpha$  12 Stunden lang inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die  $\mu\text{-Slides I}$  mit 500  $\mu\text{l}$  auf 37 °C vorgewärmtem Medium gewaschen. In jede Kammer wurden 500  $\mu\text{l}$  FCS 5 % in PBS<sup>-</sup> pipettiert. Auf der einen Seite wurde dieses wieder abpipettiert und in den Kanal 3,33  $\mu\text{l/ml}$  ICAM-1 Antikörper gegeben und die Kammer wieder mit FCS 5 % aufgefüllt. Nun wurden die  $\mu\text{-Slides I}$  für eine Stunde bei 4 °C gehalten. Anschließend wurde das FCS wieder abpipettiert und die  $\mu\text{-Slides I}$  zweimal mit HEPES BSS® gewaschen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte nun die ICAM-1 Expression betrachtet werden.

Für die Darstellung von E-Selektin (CD62E) wurden die  $\mu\text{-Slides I}$  mit 2,5 ng/ml TNF- $\alpha$  Konzentration 6 Stunden lang inkubiert. Die Darstellung des Adhäsionsmoleküls erfolgte ebenso mit dem Fluoreszenzmikroskop.

Um VCAM-1 (CD106) auf den Endothelzellen nachzuweisen wurde mit einer TNF- $\alpha$  Konzentration von 5 ng/ml stimuliert. Ansonsten wurde die gleiche Vorgehensweise wie bei ICAM-1 und E-Selektin angewendet. Für den Antikörpernachweis gegen CD 106 wurden 5  $\mu$ l/ml des Antikörpers verwendet und unter dem Fluoreszenzmikroskop mit FITC betrachtet.

### 2.3 Charakterisierung der Oberflächenmerkmale durch FACS

Mittels der Durchflusszytometrie oder FACS<sup>®</sup> (fluorescence activated cell sorting) können Oberflächenmoleküle von Endothelzellen analysiert werden, um die immunologischen Konsequenzen zu untersuchen.

Dazu wurden 150.000 Zellen pro Loch einer 12- well-Platte angezchtet. Je nach Rezeptor wurden die Endothelzellen mit einer unterschiedlichen Konzentration von TNF- $\alpha$  stimuliert. In Vorversuchen war zuvor ermittelt worden nach welchem Zeitpunkt der Rezeptor am höchsten exprimiert ist. An dem besagten Zeitpunkt wurde 1 ml FCS 5 % in PBS<sup>-</sup> auf die Zellen gegeben. Zusätzlich wurde ein Antikörper gegen den zu untersuchenden Rezeptor hinzugefügt. Die Endothelzellen wurden eine Stunde bei 4 °C gehalten und daraufhin zuerst mit FCS 5 % und im Anschluss nochmals mit Hapes BSS<sup>®</sup> gewaschen. Mit Hilfe von Trypsin<sup>®</sup> konnten die Zellen von der Platte abgelöst werden. Nach Zugabe von TNS<sup>®</sup> wurden die Zellen in ein Eppendorfgefäß überführt und 5 Minuten bei 220 g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen mit PBS<sup>-</sup>/ 2,5 % Formaldehyd fixiert.

Die fixierten Endothelzellen konnten nun der FACS<sup>®</sup>-Analyse zugeführt werden.

Bestimmt wurden die Oberflächenmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin, welche für die leukozytäre Adhäsion relevant sind. Diese Rezeptoren sind sowohl für das Rolling, als auch für das Sticking entscheidend und nach Aktivierung verstärkt exprimiert.

Fluoreszenzkonjugierte Antikörper gegen die genannten Oberflächenmoleküle wurden mit dem FACScan<sup>™</sup> gemessen und mit der CellQuestPro Software (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) ausgewertet.

## 2.4 siRNA Transfektion

Für die Transfektion musste RNase-frei gearbeitet werden. Es wurden mit in zuvor bei 200 °C für 15 Stunden im Backofen gebackene Pasteur-Pipetten gearbeitet und ebenso mussten alle anderen Materialien RNase-frei sein. Das Medium für die Endothelzellen durfte keine Antibiotika enthalten. Außerdem wurde nicht nur mit 70 % igem Alkohol desinfiziert sondern zusätzlich mit RNase Zap.

Für die Hybridisierung der siRNA wurden 250 µl des Puffers zu der siRNA hinzugefügt, sodass eine 100 nmolare Lösung entstand. Diese wurde eine Minute bei 90 °C erhitzt und anschließend für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nun wurden die zuvor hergestellten Alliquots bei -20 °C eingefroren.

Um die Effizienz der Transfektion nachzuweisen wurden 4 µ-Slides I benötigt; gemäß den vier Gruppen in jedem Versuchsansatz. Gruppe 1 stellt eine Leerprobe dar und Gruppe 2 ein µ-Slide I, welcher nur mit TNF-α stimuliert wurde. Gruppe 3 und 4 wurden sowohl mit TNF-α aktiviert als auch transfiziert. Gruppe 3 wurde mit scrambled siRNA transfiziert und der µ-Slide I der Gruppe 4 mit einer spezifischen siRNA transfiziert.

**Tabelle III.5:Darstellung der Versuchsansätze**

Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
Unbehandelte Endothelzellen	TNF-α aktiviert	TNF-α aktiviert Scrambled siRNA transfiziert	TNF-α aktiviert Spezifische siRNA transfiziert

Auf diesen  $\mu$ -Slides I wurde, wie zuvor beschrieben, RNase-frei angezüchtet. Für die Transfektion wurden in vier Kryroröhrchen (RNase-frei) jeweils 20  $\mu$ l Basalmedium (EGM-2 ohne Bulletkits) pipettiert. In zwei der vier Röhrchen wurden jeweils 2,01  $\mu$ l Cellfectin<sup>®</sup> (unspezifisch) gegeben. In ein weiteres Röhrchen wurde 100 nM scrambled (nonsense) siRNA Lösung und in das andere 100 nM rezeptorspezifische siRNA gegeben. Nun wurde das gelöste Cellfectin<sup>®</sup> der ersten zwei Röhrchen zu den zwei Kryroröhrchen, die die jeweilige siRNA enthielten, pipettiert. Die Kryroröhrchen wurden 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, in denen sich die Transfektionskomplexe ausgebildet haben. Nach dieser Inkubationszeit wurden jeweils 260  $\mu$ l Basalmedium zu den Transfektionskomplexen gegeben. Nachdem die  $\mu$ -Slides I mit 37 °C warmen Basalmedium gewaschen worden waren, wurden in die ersten zwei  $\mu$ -Slides I je 155  $\mu$ l Basalmedium in jede Kammer hinzugegeben, für die Leer- bzw. TNF- $\alpha$ - Probe, und in die anderen zwei  $\mu$ -Slides I je 155  $\mu$ l der Transfektionskomplexe in jede Kammer - so konnte der eine  $\mu$ -Slide I mit der scrambled siRNA und der andere mit der rezeptorspezifische siRNA transfiziert werden. Nach zwei Stunden wurde das Basalmedium sowie die Transfektionskomplexe abpipettiert und durch je 500  $\mu$ l antibiotikafreies Medium ersetzt.

Nach 4 Stunden konnten die Zellen mit der für die verschiedenen Rezeptoren benötigten TNF- $\alpha$  Konzentration aktiviert werden.

Die Auswertung erfolgte zuerst durch Fluoreszenzmarkierung, wie sie unter 2. beschrieben wurde, um die Expression der Rezeptoren nachzuweisen. In einem zweiten Versuchsansatz wurden über die transfizierten  $\mu$ -Slides I Granulozyten perfundiert, um die Effizienz der siRNA, mit Hilfe der fest adhärirten Granulozyten, zu überprüfen.



## 2.5 Granulozytenisolation

Für die nachfolgenden Perfusionsversuche wurden polymorphkernige neutrophile Granulozyten, von freiwilligen Spendern, eingesetzt. Diese wurden durch Dichtegradientenzentrifugation über einen diskontinuierlichen Percoll-Gradienten (Dichte 1,128 g/ml) gewonnen.

Am Abend vor dem Versuchstag wurden in ein Percollröhrchen 4 ml einer 63,11 % Percolllösung (63 ml Percoll in 7 ml 10xPBS<sup>-</sup> + 30 ml PBS<sup>-</sup>) und 4 ml einer 72,13 % Percolllösung (72 ml Percoll in 8 ml 10xPBS<sup>-</sup> + 20 ml PBS<sup>-</sup>) pipettiert. Am Versuchstag selbst wurden 4 ml Citrat-antikoaguliertes Vollblut (S-Monovette<sup>®</sup> Gerinnung 0,106 M Citrat 1:10 in Blut; Sarstedt AG, Nürnberg) auf den Gradienten gegeben. Die Röhrchen wurden 29 Minuten bei 750 g und 22 °C ohne Bremse zentrifugiert. Im Anschluss konnte die Granulozytenbande abpipettiert werden und die Erythrozytenkontamination wurde mit Hilfe einer Erythrozytenlyse (8,29 NH<sub>4</sub> Cl + KHCO<sub>3</sub> + 0,037 EDTA in 500ml H<sub>2</sub>O) und erneuter 10-minütiger Zentrifugation bei 300 g und 4 °C mit Bremse entfernt. Es folgten zwei Waschschriffe mit kaltem PBS<sup>-</sup>, die durch eine jeweilige 10-minütiger Zentrifugation bei 300 g und 4 °C mit Bremse getrennt wurden. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20 µl der hochkonzentrierten Granulozytensuspension in eine Neubauerkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden bei 100 facher Vergrößerung 4 der 16 großen Quadrate ausgezählt und zuerst mit 16, dann mit 2,5 multipliziert. Bis kurz vor Versuchsbeginn wurden die isolierten Granulozyten hochkonzentriert auf Eis gehalten.

Für die Perfusionsversuche wurden die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in Medium 199 verdünnt. Innerhalb der 10 Minuten Perfusionsdauer wurden insgesamt 6 ml der Granulozytensuspension über die µ-Slides I perfundiert.

## 2.6 Flusskammermodell und hydrodynamische Grundlagen

Die Adhäsionsexperimente erfolgten in den  $\mu$ -Slides I. Diese stellen ein biomimetisches System dar, mit dem der Fluss in einem Blutgefäß simuliert werden kann. Die  $\mu$ -Slides I wurden an eine Präzisions-spritzenpumpe auf der einen Seite mittels eines Schlauchs angeschlossen und auf der anderen Seite wurde das Perfusat in einem Auffanggefäß gesammelt. Die Leukozytensuspension wurde ohne Rezirkulation über die  $\mu$ -Slides I geleitet. Mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops (Axiovert 135, Zeiss Germany, 10x Okular) konnten die Interaktionen zwischen den Endothelzellen und den polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten beobachtet und zur späteren Auswertung mit Hilfe einer Digitalkamera in Videosequenzen aufgenommen werden.

Für die hydrodynamische Grundlage ist die Schubspannung („shear stress“ [dyn/cm<sup>2</sup>]) von entscheidender Bedeutung, da diese der Adhäsion der Leukozyten im Gefäßsystem entgegenwirkt. Sie ist definiert als das Produkt der Scherung am Gefäßrand (shear rate [1/s]) und der Viskosität [poise].

$$(1) \quad \tau = \gamma \cdot \mu$$

$\tau = \text{Schubspannung [dyn / cm}^2\text{]}$   
 $\gamma = \text{Scherung [1 / s]}$   
 $\mu = \text{Viskosität [poise]}$

Der Simulation des Gefäßes liegt die laminare Strömung (Reynolds Zahl <2) zugrunde. Hierbei ist von entscheidender Bedeutung, dass die Flüssigkeit im Zentrum des Kanals am schnellsten fließt, während die der Wand anliegende Flüssigkeit am meisten gebremst wird. Es entsteht somit ein parabolisches Geschwindigkeitsprofil. Für die Berechnung der Scherung benötigt man neben der Höhe  $h$  [cm] und der Breite  $b$  [cm] die Flussrate des Perfusats [cm<sup>3</sup>/s] und für die Schubspannung die Viskosität [poise].

$$\begin{aligned} \gamma &= \text{Scherung} \quad [1/s] \\ (2) \quad \gamma &= \frac{3Q}{2ba^2} & \tau &= \text{Schubspannung} \quad [\text{dyn/cm}^2] \\ & & \mu &= \text{Viskosität} \quad [\text{poise}] \\ (3) \quad \tau &= \frac{3\mu Q}{2ba^2} & Q &= \text{Flussrate} \quad [\text{cm}^3/s] \\ & & a &= \text{halbe Höhe des Flusskanals} \quad [\text{cm}] \\ & & b &= \text{Breite des Flusskanals} \quad [\text{cm}] \end{aligned}$$

Mit Hilfe dieser Gleichungen konnten die Scherung und die Flussrate, die in den  $\mu$ -Slides I bestehen, errechnet und für die Versuche so gewählt werden, dass sie annähernd mit denen im Organismus übereinstimmten. Nach dem Einsetzen der jeweiligen Werte für die  $\mu$ -Slides I galt:

$$\begin{aligned} (2) \quad \gamma \quad [1/s] &= 125 \cdot \phi \quad [ml/min] \\ (3) \quad \tau \quad [dyn/cm^2] &= 1.25 \cdot \phi \quad [ml/min] \end{aligned}$$

Der Gleichung für die Schubspannung konnte entnommen werden, dass für eine Schubspannung von  $\tau = 0,75 \text{ dyn/cm}^2$  eine Flussrate von  $Q = 0,6 \text{ ml/min}$  benötigt wurde. Diese Schubspannung wurde deshalb gewählt, da die Vena saphena magna einer mittleren Vene im Organismus entspricht und diese eine solche Schubspannung aufweist. Im Gegensatz dazu stehen die Schubspannungen in Arterien, bei denen Werte zwischen  $\tau = 5 \text{ dyn/cm}^2$  und  $\tau = 10 \text{ dyn/cm}^2$  gemessen werden können; in der Aorta werden Werte von bis zu  $\tau = 15 \text{ dyn/cm}^2$  erreicht. Diese hohen Schubspannungen konnten aus technischen Gründen nicht in den  $\mu$ -Slides I erzielt werden.

## 2.7 Analyse der Adhäsionsexperimente

Die Perfusionsdauer bei den Versuchen betrug jeweils 10 Minuten bei einer Schubspannung von  $\tau = 0,75 \text{ dyn/cm}^2$ . Am Ende der Perfusion wurden die Endothel-Leukozyten-Interaktionen für jeweils 10 Sekunden aufgenommen. Der Bildausschnitt wurde so gewählt, dass dieser in der Mitte der Flusskammer lag. Diese Sequenzen konnten mit Hilfe einer programmierten Software (CellTracker, C. Zanke, Universitätsklinikum Tübingen, Klinik für Anästhesiologie) ausgewertet werden. Das Programm erkannte die Interaktionen von den Leukozyten mit dem Endothel durch deren Größe und Helligkeit, wobei ein manueller Korrekturmodus möglich war. Als fest adhärenente Granulozyten, so genannte Sticker, bezeichnet man diejenigen, die sich innerhalb dieser 10 Sekunden um weniger als einen halben Zelldurchmesser auf dem Endothel bewegten. So konnten die Sticker ermittelt werden und Vergleiche zwischen den verschiedenen behandelten  $\mu$ -Slides I gezogen werden.

## 2.8 Statistische Auswertung

Alle Experimente, mit Ausnahme der Versuche mit VCAM-1, wurden viermal in jeweils vier Parallelversuchen durchgeführt. Die Versuche mit VCAM-1 wurden zweimal in jeweils vier Parallelversuchen wiederholt. So konnte die Reproduzierbarkeit der Versuche sichergestellt werden.

Es wurden die feste Adhäsion der Granulozyten an den humanen venösen Endothelzellen dargestellt, nachdem die  $\mu$ -Slides I zehn Minuten mit einer Wandschubspannung von  $\tau = 0,75 \text{ dyn/cm}^2$  perfundiert worden waren. Den fest adhärierenden Granulozyten an den unbehandelten, aber mit TNF- $\alpha$  stimulierten Endothelzellen, wurde der Wert 1 zugeordnet. Dieser entspricht 100 Prozent. Die Sticker, die sich auf den mit scrambled siRNA transfizierten Endothelzellen befanden, wurden als Quotient zu den fest adhärierenden

Granulozyten aus der TNF- $\alpha$  aktivierten Probe dargestellt. Ebenso als Quotient wurde die Anzahl der fest adhärierenden Granulozyten auf dem  $\mu$ -Slide I, der mit einer spezifischen siRNA transfiziert wurde, zu der Anzahl der Sticker auf den mit TNF- $\alpha$  stimulierten Endothelzellen dargestellt.

Die Signifikanz der Daten für die feste Adhäsion wurde mit Hilfe des Ein-Stichproben-t-Tests überprüft. Als Signifikanzniveau wurde  $p \leq 0,05$  festgelegt.

## IV Ergebnisse

### 1. Immunhistochemischer Nachweis der Transfektionseffizienz

#### 1.1 Die Effizienz der ICAM-1 siRNA

Zum Nachweis der Effizienz der siRNA Transfektion gegen ICAM-1 wurde ein Antikörper gegen den Rezeptor CD54 verwendet. Dieser Rezeptor ist 12 Stunden nach der Aktivierung mit 1,25 ng/ml TNF- $\alpha$  maximal auf den Endothelzellen exprimiert. Dieses konnte durch Zeitreihen mit Hilfe der FACS<sup>®</sup>-Analyse nachgewiesen werden.

Die Expression von ICAM-1 auf den Endothelzellen in den  $\mu$ -Slides I wurde mit einem PE-gelabelten Antikörper, wie unter 2.2 beschrieben, nachgewiesen. Um die Transfektionseffizienz der siRNA gegen den ICAM-1 Rezeptor darzustellen wurden vier  $\mu$ -Slides I angezüchtet und im Anschluss daran unterschiedliche Vorgehensweisen ausgesetzt. Grundsätzlich bestand ein Versuch jeweils aus vier  $\mu$ -Slides I; einer Leerprobe auf dem unbehandelte humane venöse Endothelzellen angezüchtet wurden und nicht mit TNF- $\alpha$  stimuliert wurden. Der zweite  $\mu$ -Slide I wurde mit TNF- $\alpha$  aktiviert, ebenso der dritte und der vierte  $\mu$ -Slide I, bei denen zusätzlich eine Transfektion, einmal mit scrambled siRNA und einmal mit ICAM-1 siRNA, durchgeführt wurde. So konnte ein direkter Vergleich zwischen den verschieden behandelten  $\mu$ -Slides I mittels Fluoreszenzmarkierung vorgenommen werden. Dieser Versuch wurde viermal wiederholt, um das Ergebnis zu festigen und mögliche falsch positive Ergebnisse zu verhindern.

Bei allen vier Versuchen zeigte sich, dass die Leerprobe keine der untersuchten Rezeptoren exprimierte, beziehungsweise es konnte nur eine sehr schwache basale Grundexpression nachgewiesen werden, welche dadurch zu erklären

war, dass die Zellen eine gewisse Grundstimulation aufzuweisen hatten (Abb. IV.1A). Da die Fluoreszenzmarkierung eine subjektive Nachweismethode ist, wurde zusätzlich eine FACS<sup>®</sup>-Analyse durchgeführt. Aufgrund der hohen Grundstimulation wies die Leerprobe selbst eine relativ breite Fluoreszierung der Endothelzellen auf (Abb. IV.2A).

Im Gegensatz dazu zeigte sich unter dem Mikroskop bei der alleinigen TNF- $\alpha$  Stimulation eine deutliche Fluoreszenz der Zellen (Abb. IV.1B), die über den ganzen  $\mu$ -Slide I zu beobachten war. In der FACS<sup>®</sup>-Analyse konnte 12 Stunden nach der Aktivierung der Endothelzellen eine dreifache Steigerung der Fluoreszenz gemessen werden (Abb. IV.2B).

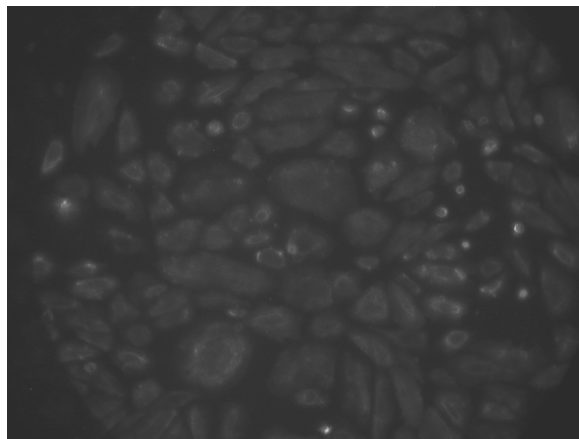
Die Endothelzellen des  $\mu$ -Slides I, welcher mit der scrambled siRNA transfiziert wurde, also mit einer siRNA die für keinen Rezeptor spezifisch ist, zeigten unter dem Mikroskop eine etwas stärkere Fluoreszenz als bei den Endothelzellen auf dem TNF- $\alpha$  stimulierten  $\mu$ -Slide I. Dies beweist, dass die Sequenz der scrambled siRNA zu keinem der Rezeptoren komplementär ist und aus diesem Grund eine Transfektion keinen Einfluss auf eine mögliche Expressionshemmung eines Rezeptors hat. Daraus ergibt sich, auf die Fluoreszenzmarkierung bezogen, dass die mit scrambled siRNA transfizierten Endothelzellen denen mit TNF- $\alpha$  stimulierten (Abb. IV.1C) entsprachen. Genauso wie bei der TNF- $\alpha$  Aktivierung konnte für die stimulierten scrambled siRNA transfizierten Endothelzellen ein dreifacher Anstieg der Fluoreszenz in der FACS<sup>®</sup>-Analyse gemessen werden (Abb. IV.2C).

Die ICAM-1 siRNA ist komplementär zu einem Sequenzabschnitt, welche für den ICAM-1 Rezeptor auf der mRNA codiert. Daher wurde dieser Rezeptor, obwohl eine Genstimulation stattfand, weniger exprimiert und der Antikörper gegen CD54 konnte nicht mehr an den Rezeptor binden. Verdeutlicht wurde dies zum einen durch eine schwächere Fluoreszenzmarkierung im Mikroskop (Abb. IV.1D) und zum anderen quantitativ mit der Durchflusszytometrie, bei der eine Reduktion der fluoreszierenden Endothelzellen zu beobachten war (Abb. IV.2D).

**Abb. IV.1A:** Fluoreszenzfärbung des ICAM-1 Rezeptors auf unstimulierten Endothelzellen in einem  $\mu$ -Slide I. Es konnte keine Expression des Rezeptors nachgewiesen werden.

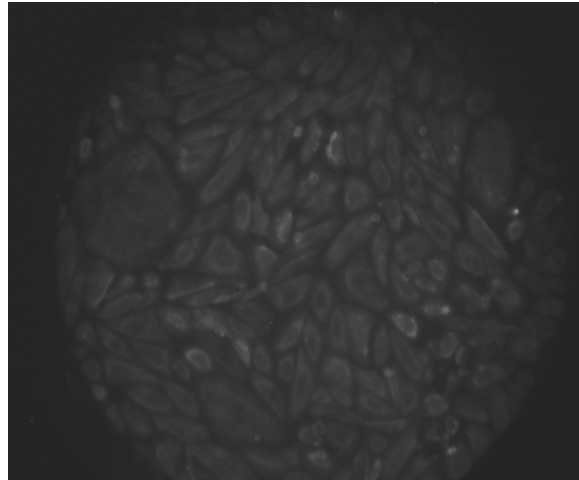


**Abb. IV.1B:** Stimulation der Endothelzellen in einem  $\mu$ -Slide I mit TNF- $\alpha$  und Anfärbung des ICAM-1 Rezeptors nach 12 Stunden Inkubationszeit. Deutliche Expression des ICAM-1 Rezeptors konnte gezeigt werden.

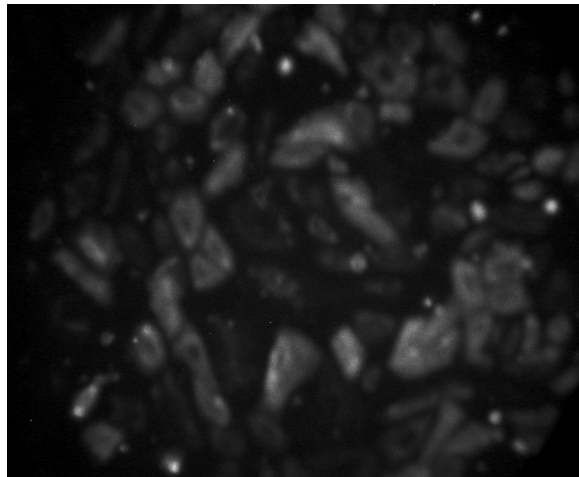




**Abb. IV.1C:** Transfektion von Endothelzellen mit der scrambled siRNA, die für keinen Rezeptor spezifisch ist und Aktivierung mit TNF- $\alpha$ . Anschließend Fluoreszenzfärbung nach 12 Stunden Inkubationszeit. Der ICAM-1 Rezeptor wurde auf den Endothelzellen deutlich exprimiert, sodass kein Unterschied zu den nicht transfizierten Endothelzellen bestand.



**Abb. IV.1D:** Fluoreszenzfärbung des ICAM-1 Rezeptors nach der Transfektion der Endothelzellen mit ICAM-1 siRNA und Aktivierung mit TNF- $\alpha$ . Es zeigte sich eine Reduktion des ICAM-1 Rezeptors auf den Endothelzellen, welche auf die spezifische siRNA zurückzuführen war.



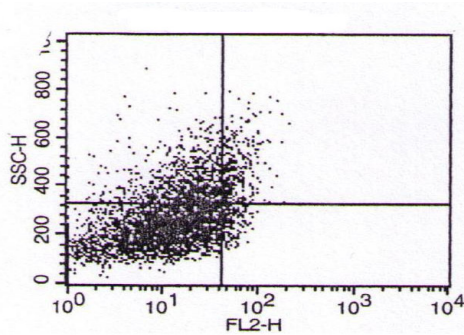


Fig.A

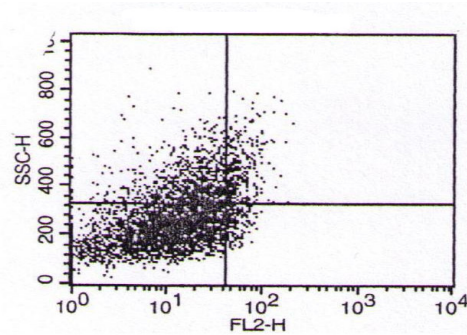


Fig.B

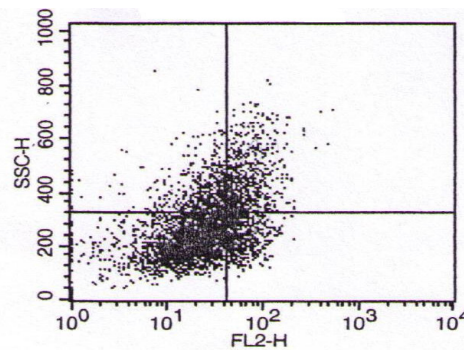


Fig.C

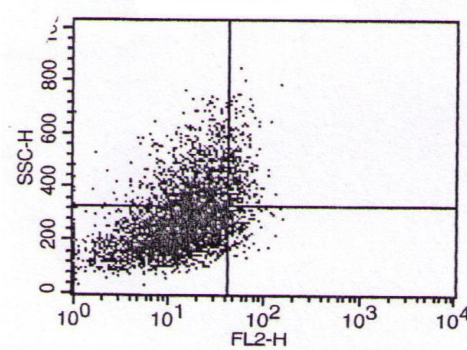


Fig.D

**Abb.IV.2A-D:** Die Endothelzellen wurden nach der Anzucht auf den  $\mu$ -Slides I zum einen transfiziert mit spezifischer ICAM-1 siRNA und zum anderen mit scrambled siRNA. Ein weiterer  $\mu$ -Slide I wurde wie die zwei transfizierten  $\mu$ -Slides I mit TNF- $\alpha$  aktiviert und ein weiterer wurde unbehandelt der Durchflusszytometrie zugeführt. Es zeigte sich eine entsprechende Fluoreszenz bei den aktivierten (B) und den mit scrambled siRNA transfizierten Endothelzellen (C), die die Expression des ICAM-1 Rezeptors widerspiegelt. Auf den Endothelzellen, welche mit ICAM-1 siRNA transfiziert wurden konnte eine geringere Expression des Rezeptors ermittelt werden (D). Die Leerprobe wies nur eine geringe Fluoreszenz auf (A).

## 1.2 Visualisierung des E-Selektin Rezeptors nach Transfektion

Die Transfektion wurde mit den gleichen Versuchsmethoden nachgewiesen wie bei der ICAM-1 siRNA. Es wurde lediglich anstatt der ICAM-1 siRNA die E-Selektin siRNA verwendet. Der Antikörper gegen CD62E war ebenfalls PE-gelabelt.

Die Leerprobe bei diesem Versuchsaufbau wies keine Fluoreszenz auf (Abb.IV.3A).

Der  $\mu$ -Slide I, welcher mit TNF- $\alpha$  stimuliert wurde, zeigte nach sechs Stunden Inkubationszeit unter dem Fluoreszenzmikroskop eine deutliche Färbung der Zellen (Abb. IV.3B). Dies verdeutlichte die Ausprägung des E-Selektin Rezeptors unter TNF- $\alpha$  Stimulation. GleichermäÙen konnte in der FACS<sup>®</sup>-Analyse eine siebenfache Steigerung der E-Selektin positiven Endothelzellen (Abb. IV.4B) gezeigt werden im Vergleich zu der Leerprobe (Abb.IV.4A).

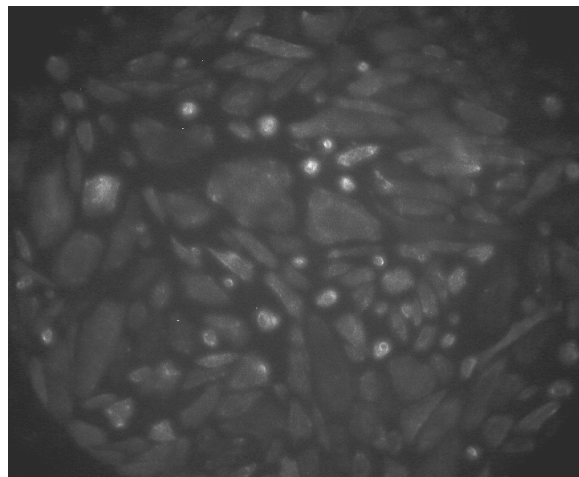
Auch der  $\mu$ -Slide I, der zuerst mit scrambled siRNA behandelt wurde und anschließend mit TNF- $\alpha$  aktiviert wurde, wies eine deutliche Färbung der Endothelzellen auf, die der des TNF- $\alpha$  stimulierten  $\mu$ -Slides I in etwa entsprach (Abb. IV.3C).

Nach der Transfektion mit der E-Selektin siRNA und anschließender Färbung mit dem entsprechenden Antikörper konnte, im Vergleich zu den beiden letzten  $\mu$ -Slides I, eine deutliche Abschwächung der Färbung beobachtet werden (Abb. IV.3D). Diese Ergebnisse entsprachen denen der FACS<sup>®</sup>-Analyse, bei der nach Transfektion mit E-Selektin siRNA nur ein zweifacher Anstieg der fluoreszierenden Endothelzellen nachgewiesen werden konnte (Abb.IV.4D). Im Vergleich dazu die Transfektion mit der scrambled siRNA, welche einen sechsfachen Anstieg der Fluoreszenz bewirkte (Abb. IV.4C), jeweils von der Leerprobe ausgehend.

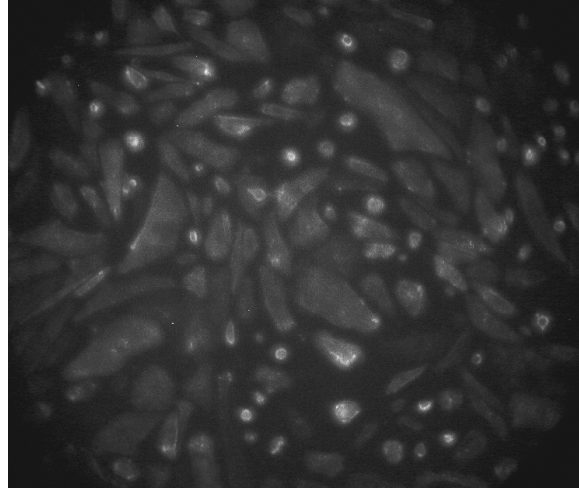
**Abb. IV.3A:** Endothelzellen auf einem  $\mu$ -Slide I nach der Fluoreszenzmarkierung gegen den E-Selektin Rezeptor. Es war keine Anfärbung möglich da der Rezeptor nicht exprimiert worden ist.



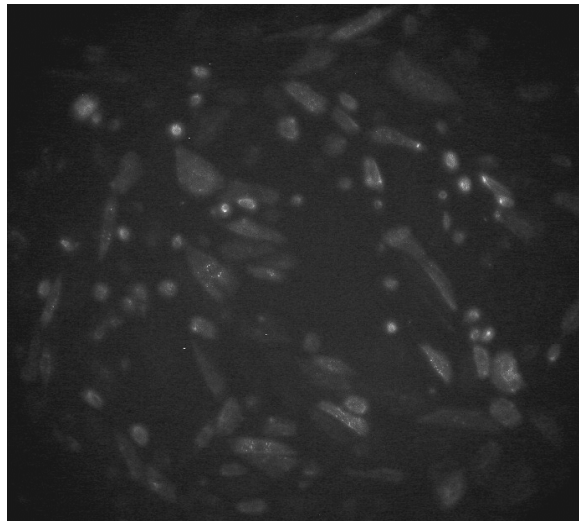
**Abb.: IV.3B:** Darstellung des E-Selektin Rezeptors auf TNF- $\alpha$  stimulierten Endothelzellen nach 6 h Inkubationszeit. Es zeigte sich eine starke Expression des E-Selektin Rezeptors.



**Abb. IV.3C:** Fluoreszenzfärbung des E-Selektin Rezeptors auf Endothelzellen, die mit unspezifischer siRNA transfiziert und aktiviert worden waren. Nach 6 Stunden Inkubationszeit zeigte sich die gleiche Expression des Rezeptors wie bei den nur mit TNF- $\alpha$  stimulierten Endothelzellen.



**Abb. IV.3D:** Nach der Transfektion mit E-Selektin siRNA wurden die Endothelzellen auf dem  $\mu$ -Slide I aktiviert mit TNF- $\alpha$ . Es zeigte sich nach 6 Stunden Inkubationszeit eine deutliche schwächere Expression des Rezeptors als bei den TNF- $\alpha$  stimulierten Endothelzellen des anderen  $\mu$ -Slides I. Dies resultiert aus der fehlenden Expression des Rezeptors nach der Transfektion.



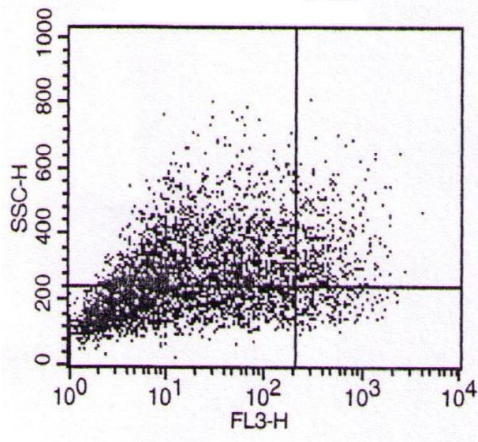


Fig.A

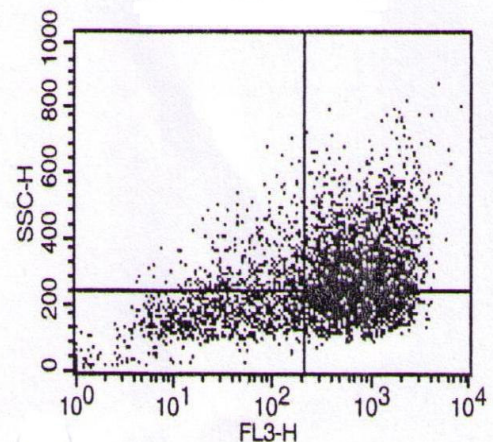


Fig.B

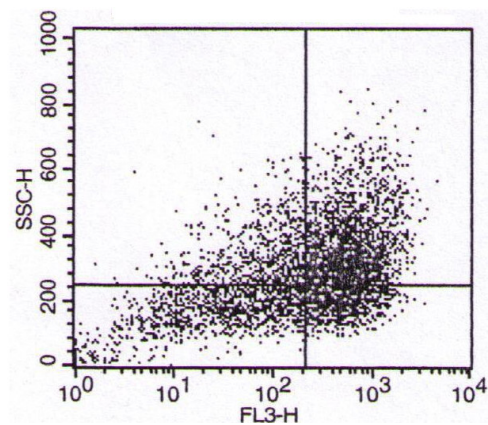


Fig.C

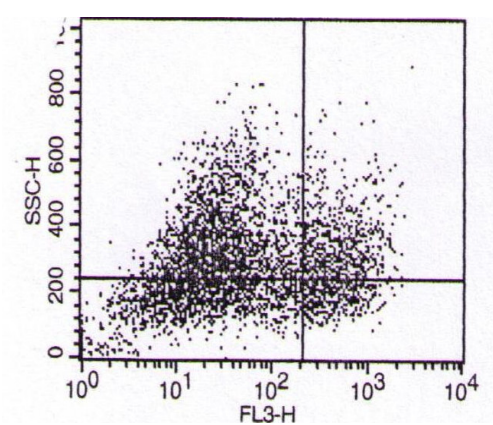


Fig.D

**Abb.IV.4A-D:** In der FACS<sup>®</sup>-Analyse wurden die Expression des E-Selektin Rezeptors anhand der zuvor durchgeführten Fluoreszenzfärbung ermittelt. Bei der Leerprobe (A) war die geringste Expression des Rezeptors nachzuweisen. Bei den Endothelzellen, welche mit TNF- $\alpha$  stimuliert wurden (B) und bei denen, die vor der Aktivierung mit einer scrambled siRNA transfiziert worden waren (C), konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu die mit E-Selektin siRNA transfizierten Endothelzellen (D), welche nach der Aktivierung einen signifikanten Unterschied in der Expression des Rezeptors aufzuweisen hatten. Somit konnte die Effizienz der Transfektion bewiesen werden.

### 1.3 Quantifizierung des VCAM-1 Rezeptors nach der Transfektion mit VCAM-1 siRNA

Zur Darstellung des VCAM-1 Rezeptors wurde ein FITC-gelabelter Antikörper zu den Endothelzellen in den Kanal der  $\mu$ - Slides I pipettiert. Nach einer Stunde bei 4 °C konnten die  $\mu$ -Slides I ausgewertet werden. Wiederum bestand ein Versuchsansatz aus vier  $\mu$ -Slides I und jeder Versuchsansatz wurde zur Sicherung der Ergebnisse viermal wiederholt. Alle Versuche wiesen mit geringen Unterschieden die gleichen Ergebnisse auf.

Erneut zeigte sich bei der Leerprobe eine Grundfluoreszenz, die darauf hinwies dass eine Grundstimulation der Endothelzellen bestand (Abb. IV.5A). In der FACS<sup>®</sup>-Analyse war jedoch nur eine geringe Fluoreszenz nachweisbar (Abb. IV.6A).

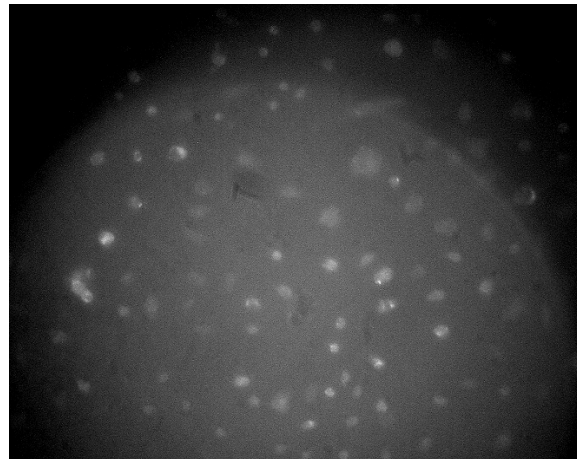
Bei allen drei  $\mu$ -Slides I, die mit TNF- $\alpha$  stimuliert wurden zeigten sich keine bedeutenden Unterschiede in Bezug auf die Intensität der Fluoreszenz. So zeigte der mit VCAM-1 siRNA transfizierte  $\mu$ -Slide I (Abb. IV.5D) eine genauso starke Fluoreszenzmarkierung wie der mit scrambled siRNA transfizierte  $\mu$ -Slide I (Abb. IV.5C) oder der nur mit TNF- $\alpha$  aktivierte  $\mu$ -Slide I (Abb. IV.5B). Bei näherer Betrachtung der Bilder konnte eine geringe Abschwächung der Fluoreszenz bei der VCAM-1 siRNA gesehen werden. Die scrambled siRNA war eher stärker fluoreszierend als der mit nur TNF- $\alpha$  aktivierte  $\mu$ -Slide I.

Die FACS<sup>®</sup>-Analyse zeigte für die aktivierten scrambled transfizierten und die nur mit TNF- $\alpha$  aktivierten Endothelzellen eine fünffache Steigerung der Fluoreszenz (Abb. IV.6C, Abb. IV.6B). Hingegen wiesen die venösen Endothelzellen, welche mit VCAM-1 siRNA transfiziert worden waren nur eine zweifache Zunahme der fluoreszierenden Endothelzellen auf (Abb. IV.6D).

**Abb. IV.5A:** Darstellung des VCAM-1 Rezeptors auf unstimulierten Endothelzellen in einem  $\mu$ -Slide I. Es zeigte sich eine Grundstimulation der Endothelzellen, woraufhin der Rezeptor schon deutlich exprimiert worden ist.

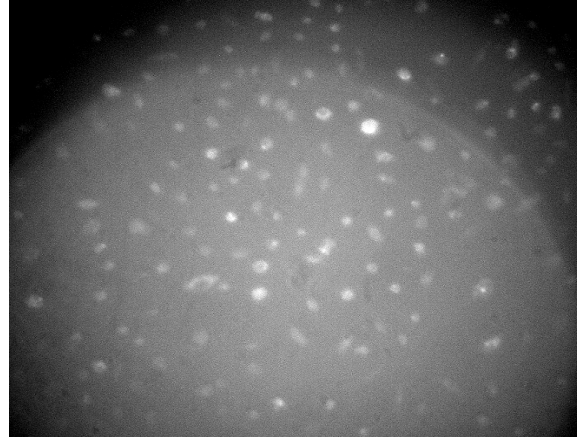


**Abb. IV.5B:** Nach der Aktivierung der Endothelzellen mit TNF- $\alpha$  zeigte sich nach 14 Stunden Inkubationszeit eine Anfärbung des VCAM-1 Rezeptors. Diese zeigte eine etwas stärkere Expression als bei der Leerprobe.





**Abb. IV.5C:** Die Fluoreszenzmarkierung des VCAM-1 Rezeptors auf scrambled transfizierten und aktivierten Endothelzellen entsprach der bei den untransfizierten aber stimulierten Endothelzellen. Somit kann gezeigt werden, dass die scrambled siRNA nicht spezifisch gegen den VCAM-1 Rezeptor regiert.



**Abb. IV.5D:** Nachweis des VCAM-1 Rezeptors auf Endothelzellen, die mit der spezifischen VCAM-1 siRNA transfiziert und mit TNF- $\alpha$  aktiviert wurden. Es zeigte sich keine deutliche Reduktion der Expression des Rezeptors verglichen mit den mit TNF- $\alpha$  aktivierten Endothelzellen.



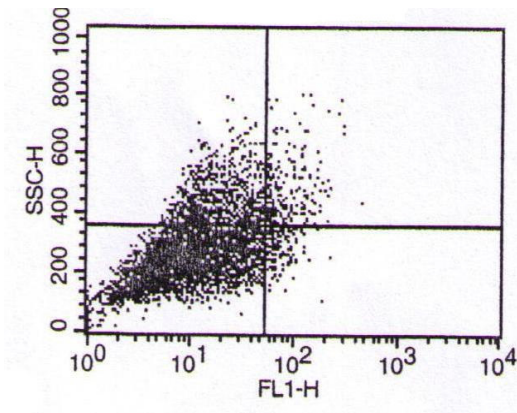


Fig.A

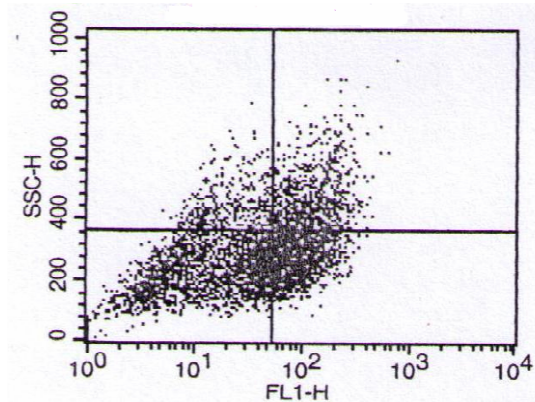


Fig.B

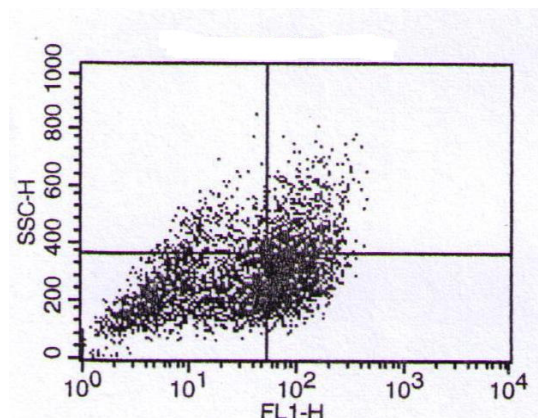


Fig.C

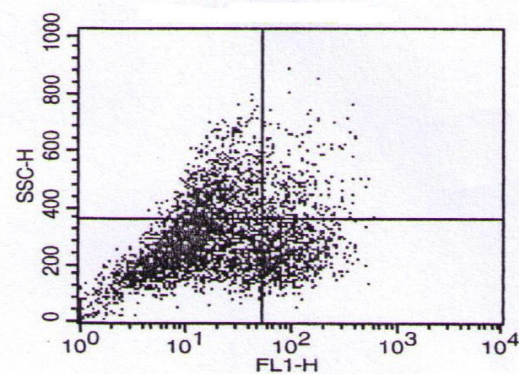


Fig.D

**Abb.IV.6A-D:** Die Endothelzellen wurden auf den  $\mu$ -Slides I kultiviert und im Anschluss unterschiedlichen Methoden ausgesetzt. So wurde ein  $\mu$ -Slide nicht weiter behandelt (A). Ein weiterer wurde, mit der für die VCAM-1 Expression notwendigen TNF- $\alpha$  Konzentration (B), stimuliert. Zwei weitere wurden ebenfalls stimuliert, aber zuvor transfiziert. Die Transfektion wurde zum einen mit der spezifischen VCAM-1 siRNA (D) durchgeführt und zum anderen mit der scrambled siRNA (C), welche für keinen Rezeptor spezifisch ist. Die Expression auf den Endothelzellen, die stimuliert (B) und die sowohl mit scrambled siRNA transfizierten, als auch aktivierten worden waren (C), war identisch. Hingegen zeigte sich eine deutlich geringere Expression des Rezeptors auf den Endothelzellen, die mit spezifischer siRNA transfiziert worden waren (D). Die Leerprobe (A) wies nur eine schwache Fluoreszenzfärbung auf.

## 2. Nachweis der Transfektionseffizienz mittels quantitativer Erfassung der Leukozytenadhäsion

### 2.1 Leukozytenadhäsion nach Transfektion mit E-Selektin siRNA

Die Adhäsion der Leukozyten konnte nach einer Einstellungszeit von zehn Minuten bei einer Schubspannung von  $\tau = 0,75 \text{ dyn/cm}^2$  mit Hilfe einer computerunterstützten Auswertung (entwickelt in dem Universitätsklinikum Tübingen, Klinik für Anästhesiologie) bestimmt werden. Nach dieser Zeit konnte eine fast gänzliche Adhäsion der Granulozyten auf den Endothelzellen nachgewiesen werden. Von Bedeutung waren lediglich die fest adhärierenden Granulozyten, die dadurch definiert wurden, dass sie sich innerhalb von zehn Sekunden um weniger als einen halben Zelldurchmesser fort bewegten. Hiervon abzugrenzen sind Roller, langsam fließende Leukozyten nahe dem Endothel, die nicht fest adhäreren.

Erneut wurden vier Versuchsansätze durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Versuche aufzuzeigen. Jeder Versuchsansatz bestand aus vier  $\mu$ -Slides I. Die Leerprobe, bestehend aus venösen Endothelzellen, die weder transfiziert noch stimuliert wurden, wies keine nennenswerte Adhäsion von Granulozyten auf, daher wird auf diese nicht weiter eingegangen. Die Sticker, fest haftende Granulozyten nach obiger Definition, auf den TNF- $\alpha$  aktivierten Endothelzellen wurden als Vergleichswert zu den anderen  $\mu$ -Slides I als Wert 1 definiert.

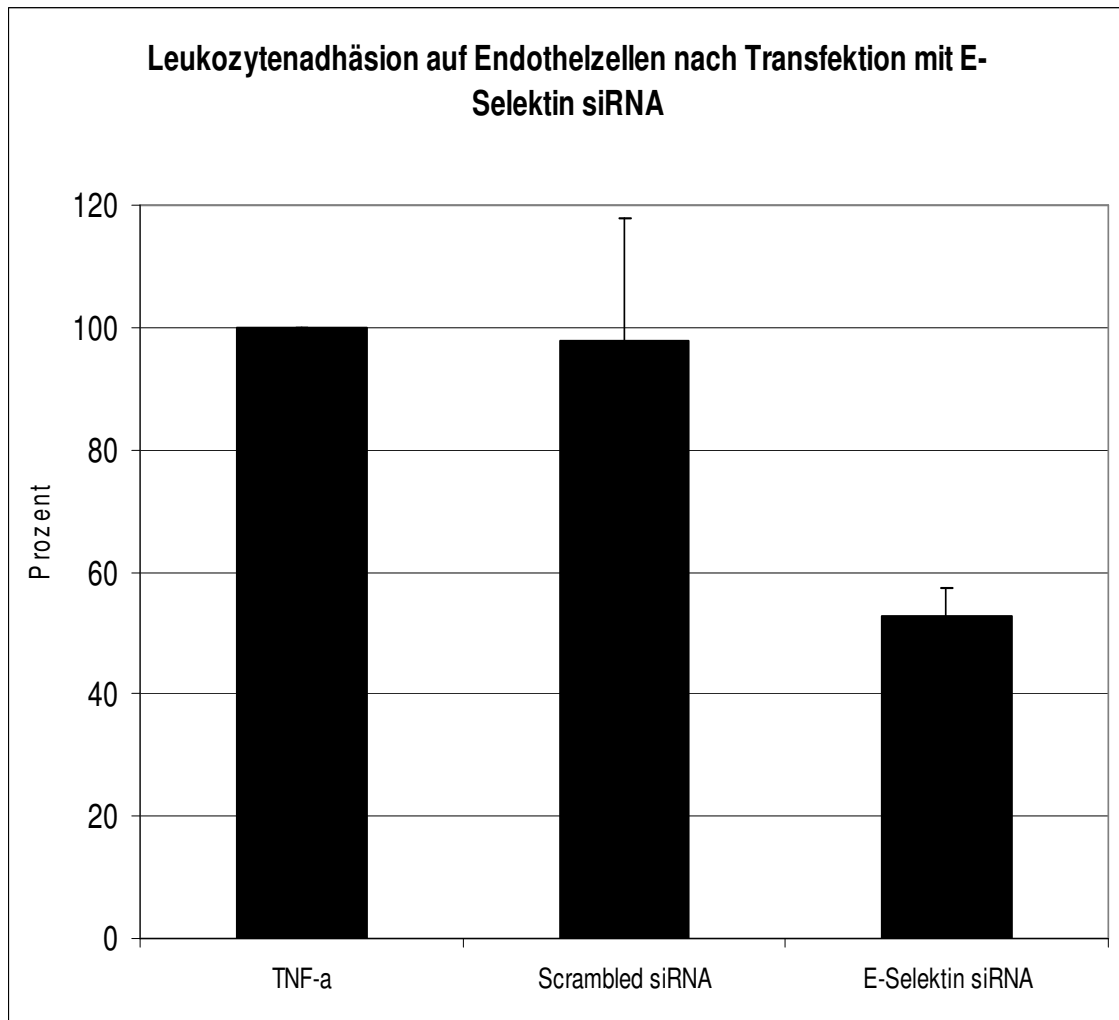
Nach der Transfektion mit scrambled siRNA und Aktivierung mit TNF- $\alpha$ , konnte nach 6 Stunden Inkubationszeit die Perfusion mit den Granulozyten durchgeführt werden.

Es zeigte sich bei den scrambled siRNA transfizierten Endothelzellen eine Adhäsion, die einen Mittelwert von  $0,98 \pm 0,20$  ergab, in Bezug auf den TNF- $\alpha$  aktivierten Versuchsansatz. Folglich konnte, auf den mit scrambled siRNA transfizierten Endothelzellen, eine Granulozytenadhärenz von 98 Prozent

nachgewiesen werden (Abb. IV.8). Das Signifikanzniveau lag bei  $p = 0,86$  und war somit nicht signifikant unterschiedlich zu dem Wert 1.

Im Vergleich zu diesen zwei, sich nicht signifikant unterscheidenden  $\mu$ -Slides I, konnte eine Verringerung der Granulozytenadhäsion auf 52,7 Prozent (Abb. IV.8) bei den Endothelzellen beobachtet werden, bei denen zuvor eine Transfektion mit spezifischer siRNA gegen E-Selektin siRNA durchgeführt worden war. Die Stimulation war erneut 6 Stunden zuvor mit TNF- $\alpha$  erfolgt. Dieses Ergebnis war mit  $p = 0.0003$  hoch signifikant.

Durch die Transfektion mit E-Selektin siRNA konnte eine Reduktion der Adhäsionsfähigkeit der in der Zellsuspension fließenden Granulozyten um 47,3 Prozent, in Bezug auf unbehandelte Endothelzellen, welche ebenfalls zuvor aktiviert worden waren, erreicht werden. Dies entspricht im Mittel einer Stickerzahl von  $n = 212$  auf mit E-Selektin siRNA transfizierten Endothelzellen, im Vergleich dazu die aktivierten nicht transfizierten Endothelzellen mit einer Stickerzahl von  $n = 395$ . Diese entspricht ebenso den mit scrambled siRNA transfizierten Endothelzellen. Aufgrund dieser Ergebnisse ist der Nachweis der Effizienz einer Transfektion, in diesem Fall mit der spezifischen E-Selektin siRNA, erbracht.



**Abb. IV.8: Transfektion mit E-Selektin siRNA.** Die Endothelzellen wurden mit einer spezifischen E-Selektin siRNA und mit einer scrambled siRNA transfiziert. Im Vergleich dazu TNF- $\alpha$  stimulierte Endothelzellen ohne vorherige Transfektion. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den TNF- $\alpha$  aktivierten und den aktivierten scrambled siRNA transfizierten Endothelzellen. Hingegen konnten bei den mit spezifischer siRNA transfizierten Endothelzellen eine deutliche Reduktion der Sticker nachgewiesen werden.

## 2.2 Transfektion der Endothelzellen mit ICAM-1 siRNA

Es wurden  $n=4$  Versuchsansätze mit je vier  $\mu$ -Slides I durchgeführt. Untersucht wurde die Granulozytenadhäsion sowohl auf unstimulierten, stimulierten und stimulierten mit scrambled siRNA oder ICAM-1 siRNA transfizierten Endothelzellen. Auf den unstimulierten Endothelzellen war nahezu bei allen Versuchsansätzen keine Adhäsion der perfundierten Leukozyten zu beobachten, aus diesem Grund werden im Folgenden nur die Ergebnisse der TNF- $\alpha$  stimulierten und der stimulierten transfizierten Endothelzellen dargestellt. Die verschiedenen transfizierten  $\mu$ -Slides I wurden jeweils in Bezug zu den stimulierten unbehandelten Endothelzellen betrachtet.

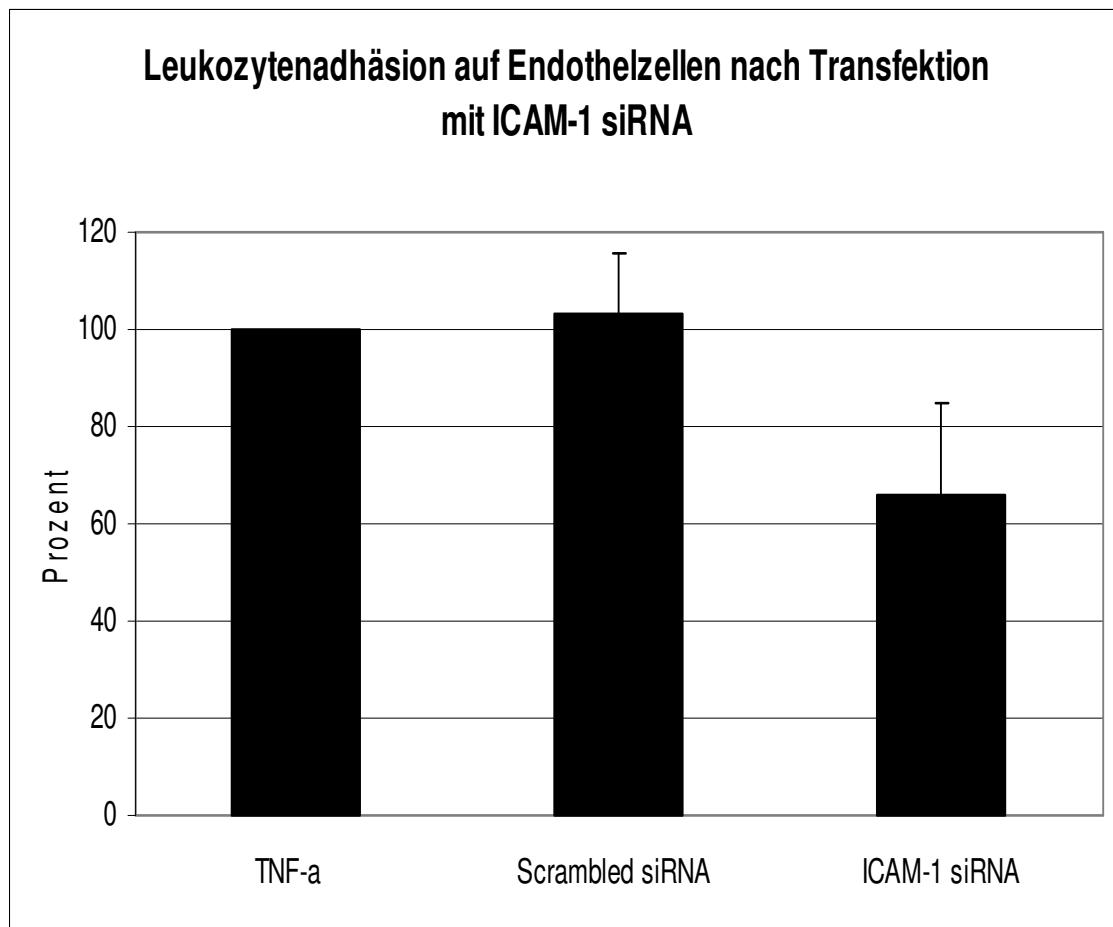
In der Flusskammer wurden die Endothelzellen bei einer Schubspannung von  $\tau = 0,75 \text{ dyn/cm}^2$  perfundiert. Zwölf Stunden zuvor waren diese mit TNF- $\alpha$  stimuliert worden.

Zwischen den Endothelzellen, bei denen eine Transfektion mit scrambled siRNA durchgeführt worden war, war kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Granulozytenadhäsion im Vergleich zu TNF- $\alpha$  aktivierten Endothelzellen (ohne Transfektion) zu erkennen.

Ein deutlicher Unterschied war jedoch bei den ICAM-1 transfizierten Endothelzellen, welche ebenfalls stimuliert worden waren, zu beobachten. Da die Versuche jeweils im Vergleich zu den TNF- $\alpha$  aktivierten Endothelzellen gesehen wurden, wurden die Anzahl der fest haftenden Granulozyten auf diesen  $\mu$ -Slides I als 100 Prozent festgesetzt und erhielten den Wert 1. In den weiteren Versuchsansätzen wurde dann der Quotient zwischen den  $\mu$ -Slides I ermittelt und untersucht ob dieser signifikant unterschiedlich von dem Wert 1 war.

Es stellte sich heraus, dass der Mittelwert der scrambled transfizierten Endothelzellen bei  $1,03 \pm 0,13$  lag, welcher 103 Prozent entspricht. Es war somit eine nahezu identische Adhäsion der Granulozyten festzustellen wie bei den Endothelzellen, die nicht transfiziert, aber stimuliert worden waren (Abb. IV.7). Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

Hingegen war die Anzahl der fest adhärierenden Granulozyten auf den ICAM-1 siRNA behandelten Endothelzellen signifikant erniedrigt ( $p < 0,001$ ). Für den Mittelwert der vier Versuchsansätze wurde  $0,66 \pm 0,02$  berechnet. Mit Hilfe der ICAM-1 siRNA konnte dementsprechend eine Reduktion der Leukozytenadhäsion um 34 Prozent erreicht werden (Abb. IV.7), dies entspricht einem Mittelwert der Stickerzahl von  $n = 259$ . Bei den mit  $\text{TNF-}\alpha$  aktivierten und stimulierten mit scrambled siRNA transfizierten Endothelzellen adhärerten im Mittel  $n = 394$ .



**Abb. IV.7: Transfektion mit ICAM-1 siRNA.** Die Anzahl der Sticker auf den Endothelzellen in dem TNF- $\alpha$  aktivierten  $\mu$ -Slide I wurde 100 Prozent festgestellt. Die Transfektion mit einer spezifischen ICAM-1 siRNA erbrachte eine Reduktion der fest adhärierenden Granulozyten um 34 Prozent. Im Vergleich dazu die aktivierten scrambled siRNA transfizierten Endothelzellen, die sich kaum von den aktivierten Endothelzellen unterschieden haben. Die Effizienz der Transfektion mit ICAM-1 siRNA konnte gezeigt werden.



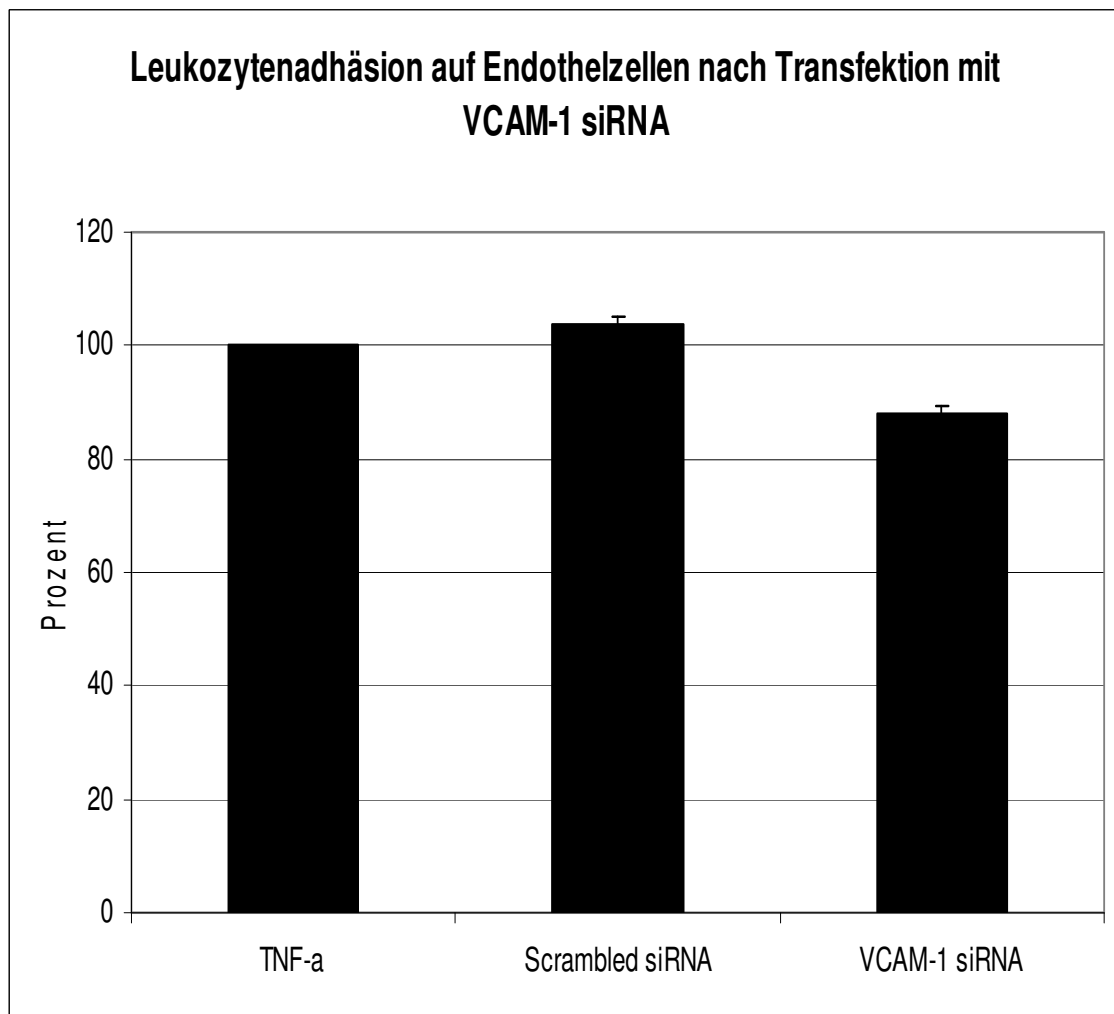
### 2.3 VCAM-1 vermittelte Leukozytenadhäsion und die Auswirkung einer Transfektion mit VCAM-1 siRNA

Im folgenden Versuchsansatz wurde die Auswirkung einer Transfektion mit der VCAM-1 siRNA untersucht. Ein Versuchsansatz enthielt eine Leerprobe, das heißt unbehandelte und unstimulierte Endothelzellen, eine TNF- $\alpha$  aktivierte Probe und zwei  $\mu$ -Slides I, welche transfiziert und stimuliert worden waren. Die Transfektion erfolgte zum einen mit einer scrambled siRNA und zum anderen mit einer spezifischen siRNA gegen den VCAM-1 Rezeptor. Nach der Aktivierung folgte eine Inkubationszeit von 14 Stunden, in der der VCAM-1 Rezeptor auf den Endothelzellen exprimiert worden war.

Auf den Endothelzellen der Leerprobe waren kaum fest adhärierende Granulozyten zu beobachten, daher wird diese in den Ergebnissen nicht weiters beschrieben. Als 100 Prozent oder als Wert 1, wurden erneut die Anzahl der Sticker auf den mit TNF- $\alpha$  stimulierten Endothelzellen angesehen, welche einer Stickerzahl von  $n = 266$  entsprach. Bei der scrambled siRNA wurde erwartet, dass kein signifikanter Unterschied zu der TNF- $\alpha$  Probe bestand. Diese Annahme wurde bestätigt, da sich auf diesen  $\mu$ -Slides I, transfiziert mit scrambled siRNA, im Mittel  $1,04 \pm 0,01$  Granulozyten befanden. Entsprechend in Prozent entspricht dies 104 Prozent. Dieser minimale Unterschied mit einem Signifikanzniveau von  $p = 0,16$  war nicht signifikant, daher konnten die beiden  $\mu$ -Slides I als gleichwertig angesehen werden (Abb. IV.9).

Ein signifikanter Unterschied lies sich jedoch bei den Endothelzellen feststellen, die mit VCAM-1 siRNA behandelt worden waren. Es konnte ein Mittelwert für die fest haftenden Granulozyten von  $0,88 \pm 0,01$  ermittelt werden, welcher 88 Prozent des Vergleichswerts entsprach (Abb. IV.9) und in Absolutzahlen ausgedrückt einem Mittelwert von  $n = 222$  entsprach. Der dargestellte Unterschied konnte mit  $p = 0,04$  noch als signifikant beschrieben werden. Folglich konnte eine Reduktion in der Anzahl der Sticker von 12 Prozent nachgewiesen werden, nachdem bei den Endothelzellen eine Transfektion mit VCAM-1 siRNA durchgeführt worden war.

Im Unterschied zu den zwei anderen hier untersuchten Rezeptoren, ICAM-1 und E-Selektin war die Transfektionseffizienz jedoch viel geringer ausgeprägt. Daraus ergibt sich, dass der Rezeptor in der Anfangsphase der Entzündungsreaktion geringer exprimiert ist als die anderen. Aus diesem Grund wird auf den VCAM-1 Rezeptor in der vorliegenden Arbeit weniger eingegangen.



**Abb. IV.9: Transfektion mit VCAM-1 siRNA.** Nach einer Inkubationszeit von 14 Stunden mit TNF- $\alpha$  konnten die hier dargestellten Werte nach der Perfusion mit den Granulozyten über die Endothelzellen ermittelt werden. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der TNF- $\alpha$  aktivierten Probe und der scrambled siRNA transfizierten und stimulierten Probe. Die VCAM-1 siRNA behandelten Endothelzellen wiesen hingegen eine Reduktion der Granulozytenadhäsion um 12 Prozent auf im Vergleich zu den beiden anderen  $\mu$ -Slides I.

## 2.4 Auswirkung der Transfektion mit drei spezifischen siRNAs auf die Leukozytenadhäsion

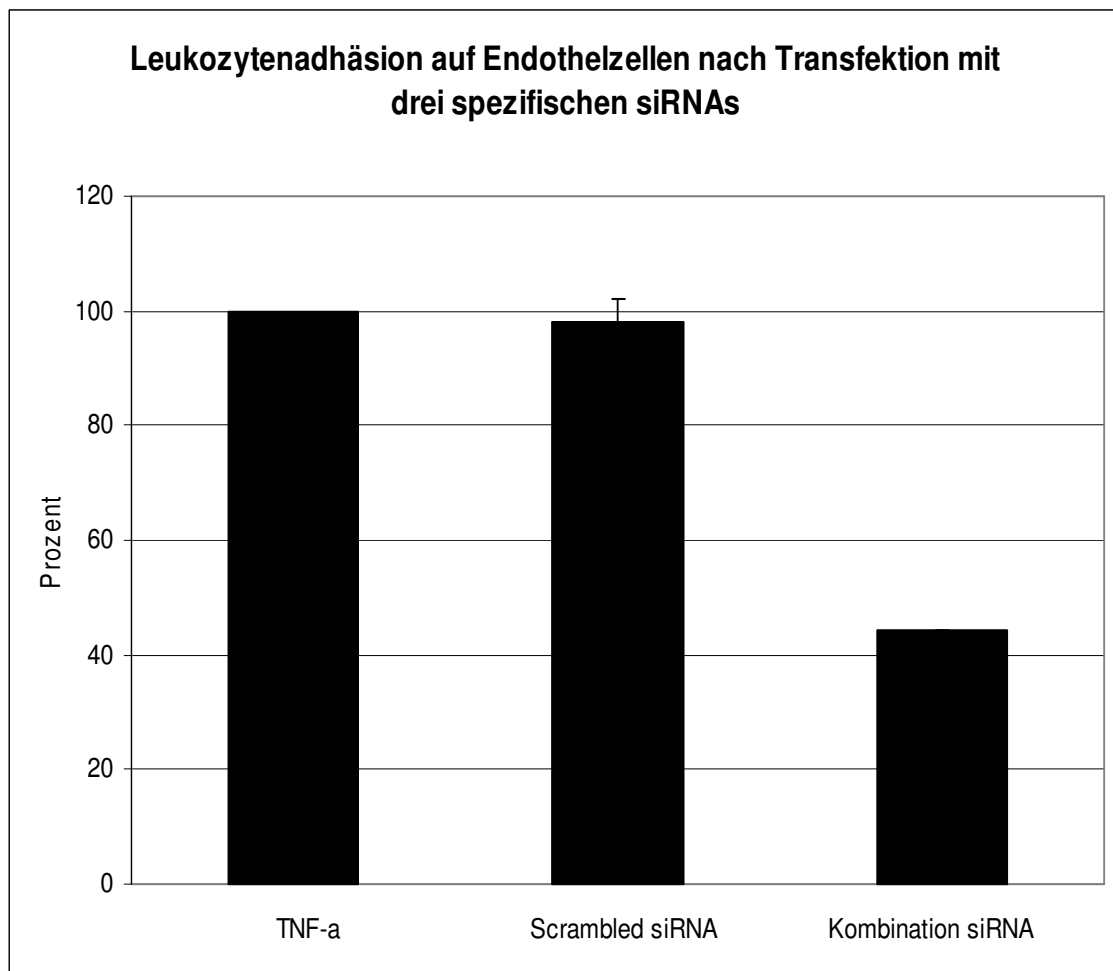
Die Wirkung der RNAi auf die Leukozytenadhäsion wurde bisher für die Rezeptoren ICAM-1, E-Selektin und VCAM-1 getrennt bewiesen. Diese Rezeptoren sind bei der Adhäsionskaskade, welcher die Granulozyten unter physiologischen Bedingungen unterworfen sind, mitbeteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass VCAM-1 eine untergeordnete Rolle in der Frühphase spielt, hingegen E-Selektin und ICAM-1 von großer Bedeutung sind. Eine gleichzeitige Transfektion aller drei spezifischen siRNAs sollte die Expression aller drei Rezeptoren verringern und so eine stärkere Reduktion der Granulozytenadhärenz bewirken.

Die Methodik dieses Ansatzes schloss im Wesentlichen an die Vorarbeiten an. Erneut wurden die Versuche viermal wiederholt um das Ergebnis statistisch abzusichern. Die jeweiligen Leerproben wurden nicht in die Ergebnisse mit aufgenommen, da keine relevante Adhäsion zu beobachten war.

Es zeigte sich nach der Perfusion der Granulozyten eine Adhäsion auf den TNF- $\alpha$  aktivierten Endothelzellen, die in jedem Versuch als 100 Prozent oder als Wert 1 für die Abweichung von dem Mittelwert angesehen wurde. In Absolutzahlen ausgedrückt entsprach dies einem Mittelwert von 415 fest adhärenzten Granulozyten auf den mit TNF- $\alpha$  stimulierten  $\mu$ -Slide I. Ein Mittelwert von  $0,98 \pm 0,04$  war bei den scrambled transfizierten Endothelzellen nach Stimulation festzustellen. Dies entspricht einer Prozentzahl von 98. Da das Signifikanzniveau bei  $p = 0,43$  lag ist der hier untersuchte Unterschied nicht von wesentlicher Bedeutung (Abb. IV.10).

Jedoch konnte eine deutliche Reduktion der Adhäsionsfähigkeit der Granulozyten auf den Endothelzellen der  $\mu$ -Slides I beobachtet werden, welche zuvor mit den drei spezifischen siRNAs transfiziert worden waren. Die Reduktion betrug 55,8 Prozent, nachdem ein Mittelwert von  $0,442 \pm 0,00$  errechnet worden war. Dies entsprach einer Stickerzahl von 183. Dieser Unterschied ist hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) (Abb. IV.10).

Demzufolge konnte mit dieser Kombination von 3 spezifischen siRNAs eine weitere Reduktion der Adhäsion der Granulozyten erreicht werden. Somit wurde nachgewiesen, dass bei der Adhäsionskaskade mehrere Rezeptoren beteiligt sind und durch die Inhibition mehrerer Rezeptoren eine größere und additive Wirkung erzielt werden konnte als bei der Inhibition nur eines einzelnen Rezeptors.



**Abb. IV.10: Transfektion mit drei spezifischen siRNAs.** Durch die Transfektion der Endothelzellen mit drei verschiedenen spezifischen siRNAs konnte eine Reduktion der Granulozytenadhäsion von 56 Prozent erreicht werden im Vergleich zu den aktivierten und zu den aktivierten scrambled siRNA transfizierten Endothelzellen, die keinen signifikanten Unterschied zueinander aufwiesen.

Um einen Gesamtüberblick über die Adhäsionsfähigkeit bei den einzelnen Rezeptoren zu erhalten wurde in der nachfolgenden Tabelle ein Vergleich der absoluten Stickerzahlen dargestellt.

**Tab.III.6:Vergleich der absoluten Stickerzahl bei den verschiedenen siRNAs**

Rezeptor	TNF- $\alpha$ aktivierte Endothelzellen	Aktivierte und scrambled siRNA transfizierte Endothelzellen	Aktivierte und spezifisch siRNA transfizierte Endothelzellen
E-Selektin	395	402	212
ICAM-1	394	403	259
VCAM-1	266	276	234
Kombination aller drei Rezeptoren	415	406	183

Es zeigte sich, dass bei den Rezeptoren E-Selektin und ICAM-1 gleiche Stickerzahlen zu beobachten waren. Bei den transfizierten Endothelzellen mit der jeweiligen spezifischen siRNA zeigten sich jedoch Unterschiede. So war eine niedrigere Adhäsionsfähigkeit an dem E-Selektin Rezeptor zu beobachten. Da der VCAM-1 Rezeptor erst in einer späteren Phase der Adhäsionskaskade eine Rolle spielt,<sup>72,137</sup> konnte nach der Perfusionsdauer von 10 Minuten eine geringere absolute Stickerzahl nachgewiesen werden als es bei den anderen Rezeptoren, E-Selektin und ICAM-1, im gleichen Versuch zu beobachten war. Bei der Perfusion, bei der alle drei Rezeptoren exprimiert waren, konnte eine etwas höhere Gesamtstickerzahl bei der TNF- $\alpha$  Probe beobachtet werden. Dies ist auf die überlappenden Funktionen der Rezeptoren zurückzuführen. Zugleich war die höchste Reduktionsrate bei den Endothelzellen, die mit allen drei spezifischen siRNAs transfiziert worden waren, festzustellen. Es existiert dementsprechend eine additive Wirkung bei der Transfektion mehrerer spezifischer siRNAs.

## V Diskussion

Aktuell basiert die Therapie der koronaren Herzkrankheit auf mehreren Säulen. Neben Allgemeinmaßnahmen (Reduktion der Risikofaktoren, Sport, gesunde Ernährung) sind die antiischämische und die gerinnungshemmende Therapie ebenso wie die Gabe von Thrombozytenaggregationshemmern von wesentlicher Bedeutung.

Eine weitere Säule liegt in der interventionellen Therapie, bei der mittels PTCA versucht wird das stenosierende Gefäß wieder aufzudehnen. Hierbei kann die Implantation eines Stents die Rezidivrate der Restenose senken.

Bei der chirurgischen Therapie, als letzte Säule, wird derzeit am häufigsten die Implantation von autologen venösen Bypass-Gefäßen durchgeführt. Jedoch unterliegen diese venösen Bypasstransplantate einer Restenoserate, welche auf erneut eintretende und beschleunigte arteriosklerotische Prozesse zurückzuführen ist. Eine Ursache dieser Entwicklung liegt in der systemischen Entzündungsreaktion und dem Ausmaß ihrer Konsequenzen. Diese spiegelt sich in einer erhöhten Rekrutierung von Leukozyten in dem betroffenen Gefäßabschnitt wider, welche aus einer verstärkten Expression der leukozytären Rezeptoren resultiert.

Die der Genexpression zugrunde liegenden Mechanismen finden unter anderem auf Ebene des Transkriptoms statt. Die bekannten Interventionsmöglichkeiten auf dieser Ebene beruhen auf der Degradation der mRNA. Die von Andrew Z. Fire und Craig C. Mello etablierte Methode basiert auf der Applikation von „small interfering“ RNAs (siRNA).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob durch eine Transfektion mit spezifischen siRNAs, die chronische Rekrutierung von Leukozyten an venöse Endothelzellen reduziert werden kann, basierend auf der Methode der RNA-Interferenz, mit der in dieser Arbeit die Expression von Rezeptoren posttranskriptionell inhibiert wird.



## 1. Der therapeutischer Charakter der siRNA und alternative Methoden zur RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz ist derzeit die am meisten angewandte Technik in der funktionellen Genforschung, an die große Erwartungen gestellt werden. Der von Cejka et al.<sup>30</sup> verfasste Artikel verdeutlicht den Stellenwert der RNA-Interferenz und gibt eine Übersicht über die potentiellen Anwendungsmöglichkeiten der siRNA, sowohl in vitro als auch in vivo, an. In vitro konnten Erfolge mit siRNA unter anderem auf den Gebieten der viralen Replikation, der neurodegenerativen Erkrankungen und auf dem Gebiet der Onkogene und der chemoresistenten Faktoren erzielt werden. In gleicher Weise konnten positive Resultate am Tiermodell beobachtet werden, so bei der Therapie der fulminanten Hepatitis,<sup>80,88</sup> des septischen Schocks und der viralen Atemwegsinfektionen.<sup>16,87,179</sup> Dies verdeutlicht zum einen den enormen Einfluss den die RNA-Interferenz auf die Genregulation ausübt und zum anderen den überragenden Stellenwert dieser Methode in der medizinischen Forschung, bezüglich des therapeutischen Nutzens.<sup>4,84</sup>

Im Folgenden werden Einsatzgebiete der siRNA mit einem therapeutischen Nutzen erläutert. RNA-Interferenz stellt vermutlich einen natürlichen Abwehrmechanismus gegen Viren dar, dadurch dass diese die Produktion viraler Proteine und die Replikation der Pathogene verhindert. Bisher gibt es keine geeignete kausale Therapie gegen die meisten Viren, dies könnte sich allerdings mit Hilfe der RNA-Interferenz ändern. So ist es Kronke und Kollegen gelungen, die Replikation von Hepatitis-C-Viren mittels siRNA zu inhibieren,<sup>88</sup> in gleicher Weise taten dies Kanda et al.<sup>80</sup> Weitere positive Ergebnisse gibt es unter anderem bei den respiratorischen syncytialen Viren (RSV).<sup>16,87,179</sup> Durch eine intranasale Gabe von effizienter siRNA gegen RSV, konnte der Virustiter in den Lungen der Versuchstiere um bis zu drei Größenordnungen reduziert werden.

In gleicher Weise verfolgen verschiedene Forschergruppen weltweit mehrere Therapieansätze gegen das HI-Virus.<sup>69,126,162</sup>

Bereits in der klinischen Entwicklung befindet sich ein RNAi-Therapeutikum, das sich gegen die altersbedingte Makuladegeneration<sup>84</sup> richtet. Diese Erkrankung eignet sich besonders gut für eine RNAi-Therapie, da der Wirkstoff direkt ins Auge injiziert werden kann und somit einen lokalen Charakter besitzt. Die Gefahr von systemischen Reaktionen des Organismus kann dadurch umgangen werden. Durch diese direkte lokale Applikation kann siRNA unverpackt und ungeschützt verabreicht werden. Ursache der feuchten Makuladegeneration ist, dass der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Blutgefäße in die Macula, ein Teil der Retina, einwandern lässt und somit einen Visusverlust nach sich zieht.<sup>63</sup> Singh und Kollegen fanden heraus, dass die durch Hypoxie bedingte Induktion von VEGF mit Hilfe von RNA-Interferenz reduziert werden kann. In vivo führte die intrastromale Injektion eines Plasmids, welches siRNA gegen die Sequenz des VEGF enthielt, zu einer Verringerung der VEGF-Expression, Leukozyteninfiltration und Angiogenese. So konnte eine korneale Neovaskularisation unterdrückt werden.<sup>153</sup> Ähnliche Studien bestätigen dieses Ergebnis.<sup>113,152</sup>

Die Firma Sirna Therapeutics Inc. (New York, USA) hat ihren Wirkstoff Sirna-027<sup>149</sup> bereits in einer Phase-I-Studie an Patienten mit altersbedingter Makuladegeneration getestet. Bei 19 Prozent der Patienten hat sich die Sehschärfe 8 Wochen nach der Injektion sogar verbessert. Laut Hersteller trat bei den anderen Patienten keine Verschlechterung der Sehschärfe ein. Nach diesen positiven Resultaten mit Sirna-027 leiteten die Hersteller eine Phase-II-Studie mit Patienten, die an schwerer fortgeschrittener altersbedingter Makuladegeneration leiden, ein. Die Ergebnisse stehen noch aus. Ein siRNA-haltiger Wirkstoff könnte vielleicht schon 2009 auf den Markt kommen.

Neben RNA-Interferenz gibt es noch andere Alternativen einen floriden Entzündungsprozess zu beeinflussen, die im Folgenden kurz erläutert werden. In der Vergangenheit sind verschiedene Methoden entwickelt worden, um die unerwünschte chronisch-inflammatorische Leukozytenrekrutierung zu

verhindern. Einige Medikamente, die heute in der Klinik eingesetzt werden, haben die Eigenschaft die Expression von Adhäsionsmolekülen zu verändern. So kann die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 durch antioxidativ wirksame Medikamente reduziert werden.<sup>32,33</sup> Indirekt wird die Rekrutierung von Leukozyten dadurch reduziert, dass entweder die Aktivierung der Leukozyten oder die proinflammatorischen Zytokine verhindert werden. Dies bewirkt sekundär eine geringere Aktivierung der zellulären Adhäsionsmoleküle oder deren Funktionen.<sup>45,119,146</sup>

Der Einsatz von nichtsteroidalen anti-inflammatorischen Arzneimitteln wie zum Beispiel Acetylsalicylsäure, Indometacin oder Aceclofenac regulieren die Expression der zellulären Adhäsionsmoleküle direkt. Sie verhindern das Rolling der Leukozyten am Endothel ebenso wie die Aktivierung der  $\beta_2$ -Untereinheiten von LFA-1 oder MAC-1 und greifen somit in alle Vorgänge der Leukozytenrekrutierung ein.<sup>57,60</sup>

Eine weitere Möglichkeit der Interferenz besteht in der direkten Blockade der Adhäsionsmoleküle. Durch monoklonale Antikörper oder Peptide können einige Integrine effektiv gehemmt werden.<sup>9,25</sup> Die Familie der Selektine können durch synthetische Sialyl-Lewis<sup>x</sup> (sLe<sup>x</sup>) oder sLe<sup>x</sup> - Analoga die Rekrutierung von Neutrophilen bei Okklusion/Reperfuionsversuchen an koronaren Arterien verringern, oder das Ausmaß eines Infarktes eindämmen. Dies wurde an mehreren in vivo Studien nachgewiesen.<sup>15,52,98</sup> Des Weiteren lassen sich ähnliche Beobachtungen für ICAM-1 beschreiben, welcher im Hinblick auf Gewebeschäden, assoziiert mit Ischämie-Reperfusion untersucht wurde.<sup>106,180</sup> Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Möglichkeit erforscht wurde, die erfolgsversprechend erscheint, um bestimmte Adhäsionsmoleküle zu blockieren.

In Tierstudien konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe von antisense-Oligonukleotiden die Translation von mRNA verhindert werden kann und somit eine spezifische Inhibition der Proteinexpression möglich war,<sup>3</sup> ebenso wie die Reduktion von inflammatorischen Erkrankungen. So konnte durch die Inhibition der Translation von ICAM-1 in Ratten die Abstoßung von transplantierten Herzen<sup>160</sup> und bei Mäusen die Entwicklung einer Kolitis<sup>13</sup> und eines

postoperativen Ileus<sup>164</sup> verringert werden. Mit der Entwicklung synthetischer dsDNA-Moleküle, die spezifische Konsensus-Sequenzen enthalten und um die Bindung von Transkriptionsfaktoren konkurrieren, konnten sowohl in vitro als auch in vivo positive Effekte erzielt werden.<sup>117</sup>

Bislang gibt es mehrere gentherapeutische Ansätze in der Forschung kardiovaskulärer Krankheiten, welche in der ersten klinischen Phase Ergebnisse erzielt haben, die hoffnungsvoll erscheinen. So konnten bei Patienten mit einer ischämischen peripheren Neuropathie sensorische Defizite beseitigt werden<sup>151</sup> und bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit sowohl die Angina pectoris reduziert<sup>103</sup> als auch die myokardiale Durchblutung erhöht werden.<sup>169</sup>

Die Gentherapie ist jedoch ein umstrittenes Thema. Es existieren nicht nur viele moralisch-ethische Bedenken, zumal mit Hilfe der Gentherapie ein Ressort eröffnet wurde mit dem eugenische Versuche unternommen werden könnten. Um dies zu verhindern wurden jedoch gesetzliche Richtlinien festgelegt; zum einen das Verbot der verbrauchenden Forschung an Embryonen und zum anderen das Verbot des reproduktiven Klonens. Darüber hinaus ist die Gentherapie mit authentischen Risiken verbunden, da unter anderem die Gefahr besteht einen Tumor zu indizieren.<sup>73,109,158</sup> Diese Bedenken der Gentherapie bestehen bei der RNA-Interferenz mit Hilfe der siRNA nicht, da es sich bei dieser Methode nicht um Gentherapie handelt. Die siRNA, und damit die RNAi ist eine gentechnologische Methode, die lokal appliziert werden kann und eine transiente Wirkung aufweist und sich somit nicht auf den ganzen Organismus auswirkt. Dies ist ein wesentlicher Unterschied zu der Gentherapie, was noch einmal betont werden sollte.

Die Methode der RNA-Interferenz in Bezug auf die Rezeptoren E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 kann in Zukunft bei der Therapie der venösen Bypass-Operationen eine wichtige Rolle spielen. Durch die Reduktion der Expression der Rezeptoren kann das Risiko einer Restenose verringert werden. Dieses Risiko der erneuten Verschlussrate liegt bei bis zu 50 Prozent innerhalb von 10

Jahren.<sup>8</sup> Weitere statistische Untersuchungen bezüglich des Restenose- bzw. Okklusionsverhaltens der aortokoronaren venösen Umgehungsplastiken zeigten, dass bereits im ersten Jahr nach der Anlage eines Bypasses bis zu 15 % eine Okklusion aufweisen. Bei postoperativen Kontrolluntersuchungen nach 10 Jahren konnten nur bei 60 % der implantierten Venen eine Durchgängigkeit festgestellt werden und nur 50 % waren frei von signifikanten Stenosen.<sup>118</sup> Daher ist der Wunsch einer länger bestehenden Therapie groß. Es existierte auf diesem Forschungsgebiet bereits eine Phase-III-Studie, in der das Venentransplantat bei Bypass-Operationen entweder in einer nicht-viralen Transfektion mit Edifoligide, kurze doppelsträngige Oligonukleotide, die an den E2F Transkriptionsfaktor binden, oder mit einem Placebo behandelt wurde. Nach 12 bis 18 Monaten erfolgte die Nachuntersuchung, bei der sich herausstellte, dass Edifoligide keine positive Auswirkung auf die Prophylaxe einer neointimalen Restenose besitzt.<sup>5</sup> So handelt es sich bei E2F um einen zentraler Transkriptionsfaktor, der eine Vielzahl von Genen aktiviert, die für Zellzyklus regulierende Proteine codieren. Durch das Einbringen eines die E2F-Funktion hemmenden Oligonukleotides wird daher auch verhindert, dass essentielle Reparaturmechanismen stattfinden können. Die Patienten werden folglich unter anderem einem erhöhten Herzinfarkttrisiko ausgesetzt.

Eine therapeutisch wirkende siRNA könnte zukünftig wesentlicher Bestandteil von Bypass-Operationen werden. Es bestehen mehrere Forschungsansätze auf verschiedenen Gebieten, für die bisher noch keine Daten vorliegen. Trotzdem sollen im Folgenden die Grundgedanken unserer Tübinger Arbeitsgruppe prägnant erläutert werden.

Ein Ansatz auf dem Gebiet der Stentimplantation befasst sich mit so genannten Drug Eluting Stents (DES). Dabei wird der zu implantierende Stent mit einer Kombination von mehreren spezifischen siRNAs gegen endotheliale Adhäsionsmoleküle von außen beschichtet. Nach der Ballondilatation des stenosierenden Gefäßabschnittes wird der behandelte Stent in den dilatierten Gefäßabschnitt eingesetzt. Durch die Dilatation werden die Endothelzellen geschädigt und lösen eine Entzündungsreaktion aus. Dieser Prozess, der

die Adhäsionskaskade der Leukozyten indiziert, soll mit Hilfe der Stentbeschichtung inhibiert werden. Diese spezielle Beschichtung mit einem Polymer soll kontinuierlich die spezifischen siRNAs abgeben, sodass die Endothelzellen transfiziert werden und in der Expression von bestimmten Rezeptoren inhibiert werden. So können die Leukozyten während der Adhäsionskaskade nicht mehr an die Endothelzellen binden und es findet folglich keine Leukozytentransmigration ins subendotheliale Gewebe statt. Die Entzündungsreaktion nach einer Ballondilatation hält bis zu 4 Wochen an, sodass nun mittels stabilerer siRNA versucht wird in dieser Periode die Entzündungsreaktion zu regulieren. Erhofft wird eine sinkende Restenoserate. Ein Problem dieses Ansatzes besteht in der Suche nach einem geeigneten Polymer, welches ein langsames Release der siRNA gewährleistet.

In einem weiteren Versuchsansatz, der ebenso auf dem Gebiet der Bypass-Operationen ansetzt, wird am Tiermodell versucht das autologe Bypassstransplantat als Ganzes zu transfizieren. So könnte das Transplantat ex vivo transfiziert werden und im Anschluss an die Transfektion in den koronaren Kreislauf implantiert werden. Somit könnte eine systemische Applikation der siRNA mit den daraus resultierenden Nebenwirkungen, wie Toxizität, Zellschädigung und Immunogenität, umgangen werden. Ergebnisse stehen gegenwärtig noch aus.

Ein weiterführender Versuchsansatz auf dem Gebiet der Stentimplantation wird in der Kopplung der Transfektion mit Aptameren erforscht. Der Grundsatz dieses Ansatzes liegt darin, dass der Stent zum einen von außen mit dem besagten Polymer beschichtet wird, sodass die Endothelzellen kontinuierlich transfiziert und die Expression von bestimmten Rezeptoren inhibiert werden. Und zum anderen darin, dass der Stent von innen mit einem Aptamer beschichtet wird, der endotheliale Vorläuferzellen aus dem Blut extrahiert. Somit können kontinuierlich neue Endothelzellen aus den Vorläuferzellen gebildet werden, welche keiner Entzündungsreaktion unterlagen.

## 2. Diskussion der Methodik und des Versuchsaufbaus

### 2.1 Methoden der Messung von Leukozyten-Endothel-Interaktionen

Um die Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothelzellen, untersuchen zu können, sind mehrere Versuchsansätze bekannt. Auf der einen Seite steht die intravitale Mikroskopie, bei der die Vorgänge direkt in vivo beobachtet werden können und auf der anderen Seite stehen Versuche mit Zellkulturen. Der letztere Versuchsansatz wurde bevorzugt, da es bisher kein etabliertes System für die Untersuchung von humanen Endothelzellen in vivo gibt. Die Isolierung der humanen venösen Endothelzellen aus der Vena saphena magna erfolgte gemäß fest etablierter Techniken.<sup>77,122</sup> Es wurden venöse Endothelzellen für die Versuche verwendet, da bei den Bypass-Operationen die Vena saphena magna als Bypass-Transplantat eingesetzt wird. Ein Unterschied zu arteriellen Endothelzellen ist neben den Strömungsverhältnissen, die unterschiedliche Oberflächendichte ihrer Adhäsionsmoleküle.<sup>94,120,129</sup> Des Weiteren sind die Leukozyten-Endothel-Interaktionen differenzial ausgeprägt. So finden in vivo vor allem in postkapillären Gefäßen Interaktionen statt.<sup>100,129</sup>

Die verwendeten Granulozyten wurden aus dem Blut von freiwilligen Spendern isoliert. Die Zahl der Spender wurde auf zwei begrenzt, um interindividuelle Unterschiede zu kompensieren. Die Versuche wurden unter standardisierten identischen Bedingungen durchgeführt, sodass Vergleiche zwischen den einzelnen Versuchsansätzen gezogen werden konnten. Die statistische Auswertung erfolgte, nach Beratung durch einen Statistiker, mit Hilfe des Einstichproben-t-Tests.

## 2.2 Messung der Leukozyten-Endothel-Interaktionen in $\mu$ -Slide I

Bei diesem Versuchsansatz des *in vitro* Modells besteht der Nachteil, dass sich, im Gegensatz zu *in vivo* Systemen, die Endothelzellen während der Isolierung und der Anzucht verändern können. Um möglichst physiologische Bedingungen zu erreichen, muss versucht werden, dass diese Störgröße so gering wie möglich gehalten wird. Daher sind in dieser Arbeit nur Endothelzellen verwendet worden, die sich maximal in der dritten oder vierten Passage befunden haben.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit  $\mu$ -Slides I der Firma Ibidi, München, Deutschland, gearbeitet, da mit diesen dynamische Untersuchungen durchgeführt werden konnten. Durch die Möglichkeit die  $\mu$ -Slides I an eine Zirkulation anzuschließen, konnten Versuche unter Flussbedingungen durchgeführt werden. Da ein pulsatile Blutfluss, wie er im Organismus besteht, nicht simuliert werden konnte, wurde mit Hilfe einer Präzisionspritzenpumpe eine laminare Strömung in den  $\mu$ -Slides I erzeugt. Ein kontinuierlicher Leukozytenfluss über die Endothelzellen konnte dadurch gesichert werden, indem sich die Granulozyten in der Perfusionsspritze befanden und nicht als Bolus über einen Dreiwegehahn hinzugegeben worden waren. Nachteilig ist, dass ein laminarer Blutfluss unter physiologischen Bedingungen eine vermehrte Expression von bestimmten Genen (eNOS, COX-2 und Mn-SOD) bewirkt, welche eine vasoprotektive Wirkung auf das Endothel besitzen.<sup>59,167</sup> In Hinsicht auf die hier durchgeführten Versuche ist dieses Faktum nicht relevant, zumal die Endothelzellen zuvor, durch den Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , einem inflammatorischen Prozess ausgesetzt worden waren.

Der Kanal der  $\mu$ -Slides I ist sowohl für Sauerstoff als auch für Kohlendioxid durchlässig. Er entspricht insofern nicht den physiologischen Bedingungen im Organismus, da der Querschnitt des Kanals ein Rechteck ergibt und nur von einer Seite mit Endothelzellen angezüchtet werden kann. Diese Störgröße



wurde dadurch gering gehalten, indem bei den Perfusionsversuchen ein Bildausschnitt in der Mitte des Kanals gewählt wurde. Dort ist die Geschwindigkeit der Leukozyten am höchsten, da an dem Kanalrand Scherkräfte wirken, wie unter III. 2.6 Flusskammermodell und hydrodynamische Grundlagen bereits beschrieben wurde, und so die Leukozyten eine geringe Geschwindigkeit aufweisen. Dieser Sachverhalt konnte in den  $\mu$ -Slides I dadurch beobachtet werden, da am Rande des Kanals mehr Leukozyten adhärten als in der Mitte des Kanals. Um eine solche Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden, wurden die Videosequenzen stets in der Kanalmitte aufgezeichnet.

Die Interaktionen, die in den Versuchen mit den  $\mu$ -Slides I zwischen den Leukozyten und den Endothelzellen festgestellt wurden, können nicht als gleichwertig angesehen werden, da im Organismus andere Bedingungen herrschen. Da für diese Arbeit lediglich der Unterschied zwischen den einzelnen  $\mu$ -Slides I, genauer gesagt unstimuliert, stimuliert und stimuliert mit und ohne spezifischer siRNA, von Bedeutung sind, ist die absolute Anzahl der Interaktionen von untergeordneter Bedeutung.

In den Versuchsansätzen wurden die Endothelzellen in den  $\mu$ -Slides I mit Leukozyten perfundiert. Diese können in Zellen der unspezifischen und spezifischen Abwehr unterteilt werden. Zu der unspezifischen Abwehr gehören Granulozyten und die Zellen des mononukleären Phagozytosesystems. Für die Perfusion in den Versuchsansätzen wurden Granulozyten ausgewählt, da diese für die erste Immunabwehr verantwortlich sind<sup>105</sup> und zu den häufigsten Abwehrzellen im Blut zählen. Nach deren Adhäsion über Adhäsionsmoleküle auf den Endothelzellen sind Granulozyten in der Lage aktiv den Blutfluss zu verlassen (Diapedese) und einem chemischen Gradienten folgend in das Entzündungsgebiet einzuwandern (Chemotaxis). Monozyten, die sowohl zu den Zellen der unspezifischen Abwehr als auch zu der spezifischen Abwehr gehören, sind in der Lage sich im subendothelialen Gewebe zu Gewebsmakrophagen oder zu dendritischen Zellen zu differenzieren.<sup>105</sup> Diese greifen erst später in die Adhäsionskaskade ein und verstärken die Entzündungsreaktion. Des Weiteren besitzen Monozyten, die quantitativ eine

geringere Fraktion darstellt, eine größere Relevanz für die Bildung von Schaumzellen, welche sich aus den Makrophagen durch Einlagerung von oxidierten LDLs bilden und schließlich einen Bestandteil von fatty streaks in der Gefäßwand bilden.<sup>18,50,161</sup> Diese stellen eine inobligate Vorstufe einer Arteriosklerose dar. Da für die hier vorliegende Arbeit die ersten Schritte der Adhäsionskaskade eine wesentliche Rolle spielen wurde die Perfusion mit Granulozyten durchgeführt.

Das Modell der Flusskammer ist ein etabliertes System<sup>133</sup> und es wurden bereits mehrere Studien mit diesem in vitro Modell durchgeführt. Diese Studien haben gezeigt, dass Scherkräfte einen Einfluss auf die Interaktionen zwischen den Leukozyten und dem Endothel besitzen.<sup>97,104</sup>

Lawrence und Kollegen fanden heraus, dass die verschiedenen Parameter, genauer gesagt die Flussrate, „shear stress“ und „shear rate“ einen großen Einfluss auf die Interaktionen in der Adhäsionskaskade besitzen. Ihr Resultat ist, dass bei allen von ihnen durchgeführten Versuchen, mit sinkenden Scherkräften die Adhäsion der polymorphkernigen Granulozyten ansteigt.<sup>95,96,97</sup> So kann unter einer Reduktion der Strömungsbedingung auf  $\tau = 0,25 \text{ dyn/cm}^2$ , eine Steigerung der Adhäsion um das 5 – 20 fache beobachtet werden.<sup>124</sup> Auch die Stabilität der Bindungen und die Expression der Liganden für die Adhäsionsmoleküle zeigen Unterschiede bei spezifischen Scherkraftverhältnissen.<sup>70,142</sup> Diese Strömungsbedingungen, bezogen auf die Schubspannung, die in diesen Beobachtungen angewendet wurden, konnten in den  $\mu$ -Slides I nicht erzielt werden, da sich die Endothelzellen ab einer Strömungsgeschwindigkeit von über  $\tau = 0,75 \text{ dyn/cm}^2$  von der Oberfläche der  $\mu$ -Slides I abgelöst haben. Eine Erklärung für die Ablösung könnte darin bestehen, dass die Endothelzellen während der Anzucht, Transfektion und der Aktivierung, einer Stressreaktion ausgesetzt worden sind, die sich in einer geringeren Haftbarkeit an der Grundfläche der  $\mu$ -Slides I äußert. Das bei der Transfektion benutzte Cellfectin<sup>®</sup> hat ebenso geringe toxische Eigenschaften, die in die Erklärung der Ablösung mit einbezogen werden sollte. So wählten wir

eine Strömungsgeschwindigkeit von  $\tau = 0,75 \text{ dyn/cm}^2$ , die bereits in anderen Arbeiten evaluiert wurde.<sup>101</sup>

### 2.3 Transfektion mit spezifischer siRNA

In früheren Studien wurde gezeigt, dass die Zelladhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 im Rahmen von Arteriosklerose, Vaskulitiden oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vermehrt exprimiert werden.<sup>79,91,108,132</sup> E-Selektin ist ein wichtiger Rezeptor für das Rolling der Leukozyten und leitet von der Übergangsphase in die feste Adhäsion über, in der dann ICAM-1 eine wesentliche Rolle spielt. Beide Rezeptoren sind bei der koronaren Herzerkrankung vermehrt exprimiert.<sup>72</sup> Daher wurde der Schwerpunkt dieser Arbeit auf diese beiden Rezeptoren gelegt.

E-Selektin wird, wie in mehreren Untersuchungen festgestellt wurde, auf aktivierten Endothelzellen exprimiert<sup>114,171</sup> und hat seine Liganden auf den Leukozyten. Bei inflammatorischen Prozessen, so auch bei der Arteriosklerose, steigt die Expression von E-Selektin auf der Zelloberfläche an. Dieser Entzündungsprozess kann in in vitro Modellen unter anderen mit Hilfe des Tumornekrosefaktors  $\alpha$  induziert werden.

Im Gegensatz dazu steht ICAM-1, welcher ubiquitär ausgebildet wird.<sup>36</sup> ICAM-1 kann bei der Entwicklung von Arteriosklerose in Venentransplantaten nach Bypass-Operationen eine wichtige Rolle zugeschrieben werden. So wurde von Zou und Kollegen<sup>181</sup> eine Reduktion der neointimalen Hyperplasie von 30 bis 50 Prozent in Mäusen beobachtet, die eine geringe ICAM-1 Expression hatten, im Vergleich zu Mäusen vom Wildtyp. Die geringe Expressionsfähigkeit von ICAM-1 basierte auf „gene targeting“; das heißt es werden bestimmte Genen in ihrer Expression inhibiert. Bei aortalen glatten Muskelzellen von Mäusen des Wildtyps konnte als Antwort auf den Tumornekrosefaktor- $\alpha$  eine erhöhte ICAM-1 Expression nachgewiesen werden. Nach Inkubation der Mäuse mit Leukozyten dieser Spezies, welche für ICAM-1 und für glatte Muskelzellen

negativ waren, konnte eine geringere Adhäsion beobachtet werden als bei den Wildtypmäusen. Diese sowohl für ICAM-1, als auch für die glatten Muskelzellen positiven Wildtypmäuse, waren aber zuvor mit einem anti-MAC-1 Antikörper behandelt worden. Dies expliziert einen Zusammenhang zwischen ICAM-1 und der Entwicklung von Arteriosklerose in Venentransplantaten nach Bypass-Operationen.

VCAM-1 hingegen spielt in der frühen Adhäsionskaskade eine untergeordnete Rolle und ist vermutlich erst bei der weiteren Transmigration ins subendotheliale Gewebe von Relevanz. Shih-Jen et al. zeigte, dass VCAM-1 keinen signifikanten Unterschied aufweist zwischen Patienten mit koronarer Herzerkrankung, und einer Kontrollgruppe.<sup>72</sup> Diese Aussage, dass der VCAM-1-Rezeptor im Anfangsprozess der Entstehung der Arteriosklerose, im Vergleich zu E-Selektin und ICAM-1 Rezeptor, eine untergeordnete Rolle spielt, spiegelt sich in den Ergebnissen dieser Arbeit wieder. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf dem Sticking der Leukozyten an den Endothelzellen liegt, wird auf die Phase der Transmigration und somit des VCAM-1 Rezeptors in dieser Arbeit nicht näher eingegangen.

Stellvertretend für die vielen verschiedenen proinflammatorischen Stimuli, die bei einer Entzündungsreaktion im Organismus gebildet werden<sup>42,43,96</sup> und zu einer Aktivierung der Endothelzellen führen, welche daraufhin endotheliale Adhäsionsmoleküle ausbilden, wurde TNF- $\alpha$  gewählt. Dieses ist ein äußerst vielseitiges Zytokin mit sehr vielen Funktionen. Unter anderem wird über verschiedene Zwischenschritte der nukleäre Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktiviert, welcher Zellaktivierung, Zelldifferenzierung, Zytokinproduktion und Hemmung der Apoptose nach sich zieht. Durch die Stimulation der Endothelzellen tritt, infolge der verstärkt exprimierten Adhäsionsmoleküle, eine vermehrte Zelladhäsion<sup>11</sup> auf. TNF- $\alpha$  war für die Versuche essentiell, da bei dem unstimulierten  $\mu$ -Slide I nur eine geringe Adhäsion zu beobachten war. Zum Teil war eine erhöhte Grundstimulation der Endothelzellen zu beobachten, welche der gering toxischen Eigenschaft des Cellfectins<sup>®</sup> zugeschrieben werden konnte. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit besteht in der Tatsache,

dass in der Phase der extrakorporalen Zirkulation während der Bypass-Operation, verschiedene entzündungsfördernde Stimuli freigesetzt werden, die eine verstärkte Expression der Adhäsionsmoleküle nach sich ziehen. Ebenso von großer Bedeutung für die Grundstimulation der Endothelzellen ist die Druckausübung auf die Vena saphena magna bei deren Freipräparation und Entnahme aus dem Bein.

Es existieren mehrere Untersuchungen, bei denen TNF- $\alpha$  als Aktivierungssubstanz eingesetzt wurde.<sup>104,127</sup> Die Stimulation der Endothelzellen erfolgte je nach Rezeptor 6, 12 oder 14 Stunden vor der Perfusion. Diese Zeitangaben wurden durch Vorversuche belegt. Zu diesen Zeitpunkten war der jeweilige Rezeptor am höchsten exprimiert. Da unter den in Zellkulturbedingungen eingesetzten TNF- $\alpha$  Konzentration während der Inkubationsdauer eine Ablösung der Zellen zu beobachten war, wurde die Konzentration in diesen Versuchen mit den  $\mu$ -Slides I verringert. Für die Expression der Rezeptoren hatte die Verringerung der Konzentration keine Relevanz. Mit Hilfe von Konzentrationskurven mit TNF- $\alpha$  war zuvor die für die Expression der Rezeptoren erforderliche Mindestdosis und die optimale Aktivierungsdosis untersucht worden. Mit dieser Mindestkonzentration wurde in den Versuchen gearbeitet. Die Ablösung der humanen Endothelzellen auf den  $\mu$ -Slides I, im Gegensatz zu den Endothelzellen in der Zellkulturflasche, lässt sich dadurch erklären, dass die Endothelzellen neben einem erhöhten Stressfaktor auch anderen Bedingungen als in der Zellkulturflasche ausgesetzt sind. Allgemein waren für die Versuche in den  $\mu$ -Slides I geringere Konzentrationen erforderlich als bei den Untersuchungen in einer 12-well-Platte, mit denen die Effizienz der Transfektion in früheren Versuchsreihen nachgewiesen worden war.

### 3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Versuche mit humanen venösen Endothelzellen auf den  $\mu$ -Slides I zeigten, dass eine Transfektion von venösen Endothelzellen mit spezifischen siRNAs möglich ist. Für die Transfektion mit spezifischen siRNAs wurden die drei Rezeptoren ICAM-1, E-Selektin und VCAM-1 ausgewählt. Die Effizienz dieser Transfektion wurde sowohl mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes, als auch mit der FACS<sup>®</sup>-Analyse bewiesen.

In einem zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden funktionelle Tests über die Wirksamkeit der Transfektion mit siRNA anhand der fest adhärierenden Granulozyten nach Perfusion untersucht. Es zeigte sich, dass nach der Transfektion mit ICAM-1 siRNA 34 Prozent weniger Granulozyten fest adhärten als bei der TNF- $\alpha$  Probe und der scrambled siRNA. Die E-Selektin siRNA bewirkte eine Reduktion der Granulozyten um 47 Prozent und die VCAM-1 siRNA um 12 Prozent, immer in Bezug auf die fest adhären Granulozyten auf unbehandelten TNF- $\alpha$  aktivierten Endothelzellen. Eine Kombination dieser drei spezifischen siRNAs bewirkte eine noch größere Reduktion der Adhäsionsfähigkeit um 56 Prozent.

### 4. Diskussion der Ergebnisse

Unsere Arbeitsgruppe <sup>173</sup> untersuchte die Effizienz von spezifischer ICAM-1 siRNA an humanen venösen Endothelzellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie. In der FACS<sup>®</sup>-Analyse konnte für die ICAM-1 Expression auf untransfizierten Endothelzellen nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  eine Steigerung der Expression auf 93 Prozent gezeigt werden. Im Vergleich dazu zeigten unstimulierte Zellen eine Expression von nur 1,7 Prozent. Nach Applikation von ICAM-1 siRNA war eine Expression auf 13 Prozent beobachtet worden. Die scrambled siRNA wies eine ICAM-1 Expression von 79 Prozent auf. Dies lässt sich auf die toxische Wirkung

der liposomalen Transfektionsreagenzien zurückführen. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch TNF- $\alpha$  Aktivierung die Expression des ICAM-1 Rezeptors hervorgerufen werden kann und dass durch die Transfektion mit spezifischer ICAM-1 siRNA diese Hochregulation effektiv reduziert werden kann. Bei der Transfektion mit scrambled siRNA, einer nonsense siRNA, ist diese Inhibition nur marginal.

In einer vor kurzem veröffentlichten Publikation von Walker und Kollegen<sup>174</sup> über die Inhibition von Adhäsionsmolekülen von humanen venösen Endothelzellen mit Hilfe von nicht-viraler Transfektion, ist an Hand von mehreren Nachweismethoden die Effizienz der ICAM-1, E-Selektin und VCAM-1 siRNA verdeutlicht worden. In der FACS<sup>®</sup>-Analyse konnte mit der VCAM-1 siRNA eine zweifache Reduktion der VCAM-1 positiven Zellen erreicht werden und die Expression der E-Selektin positiven Endothelzellen wurde um das zehnfache reduziert. Die scrambled siRNA wies kaum einen Unterschied zu den für die jeweils spezifischen Rezeptoren positiven Endothelzellen, nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$ , auf. Gefestigt wurden diese Ergebnisse durch Western Blot und Real-Time PCR, welche deutlich weniger spezifisches Rezeptorprotein und mRNA bei den stimulierten spezifisch transfizierten Endothelzellen aufwiesen als bei den aktivierten untransfizierten Endothelzellen.

Es zeigt sich, dass durch die RNA-Interferenz eine neue Therapie etabliert werden kann, um bestimmte Rezeptoren in ihrer Expression, trotz Genstimulation, zu inhibieren. Diese Methode eröffnet neue Behandlungsmöglichkeiten für viele verschiedene Erkrankungen.

Parallel dazu wurden statische Versuche mit polymorphkernigen Granulozyten durchgeführt. Es zeigte sich, dass bei den stimulierten transfizierten Zellen weniger Granulozyten adhärten als bei den untransfizierten, aber stimulierten Zellen (bislang nicht publiziertes Material).

Der „Knock-down“ bei den statischen Experimenten mittels Granulozyten war weniger ausgeprägt, als bei den anderen Nachweismethoden, FACS<sup>®</sup>, Western Blot und Real Time PCR. Da es sich um zwei verschiedene Versuchsansätze, handelt, können diese nur bedingt miteinander verglichen werden. Von Bedeutung ist hauptsächlich die Grundessenz, genauer gesagt die Tatsache,

dass mit Hilfe von spezifischen siRNAs bestimmte Rezeptoren in ihrer Expression inhibiert werden können. Dies wurde in beiden Versuchen verdeutlicht. Auf diesen Grundlagen basierend, wurden die in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche aufgebaut.

Direkte Vergleiche zwischen den verschiedenen Untersuchungen können nur relativ gezogen werden, da unter annähernd physiologischen Bedingungen andere Gesichtspunkte betrachtet werden müssen als bei statischen oder bei Zellkulturbedingungen.

In dem Flussmodell steht am Anfang der Adhäsionskaskade das Abfangen der frei fließenden Leukozyten (Capture) aus der Zellsuspension. Ebenso müssen vor der festen Adhäsion der Granulozyten an den Endothelzellen, initiale Bindungen zwischen den Selektinen und den interagierenden Liganden vermittelt werden (Tethering). Diese Bindungen führen zu einem Abbremsen und Rollen der noch frei fließenden Granulozyten auf dem Endothel (Rolling), so dass sich deren Flussgeschwindigkeit um den Faktor 100 reduziert. Durch eine sehr hohe Dissoziationsrate der Bindungen, können die Bindungen nur kurze Zeit aufrechterhalten werden, bevor diese wieder gelöst werden. Diese Interaktionen wiederholen sich stromabwärts stetig und ergeben somit das Bild des Rollings.<sup>6,82,112</sup> Die hierbei freigesetzten Chemokine bewirken eine Aktivierung der Granulozyten,<sup>125,146</sup> welche bei den exprimierten Adhäsionsmolekülen eine Konformationsänderung hervorrufen, die daraufhin eine feste Adhäsion der Granulozyten an den Endothelzellen erlauben.<sup>34,56,74</sup>

Der Verlauf der Adhäsionskaskade lässt sich weder in den statischen noch in den Zellkulturversuchen nachweisen. Folglich werden die oben aufgeführten Experimente von Walker et al. ausschließlich unter dem Gesichtspunkt eines Beweises für die Effizienz der Transfektion betrachtet und nicht um Vergleiche zu den hier durchgeführten Experimenten zu ziehen beziehungsweise sind als Weiterführung zu betrachten in Richtung einer besseren Simulation der Vorgänge in vivo.

Nishiwaki und Kollegen<sup>123</sup> untersuchten in ihrer Studie die Reduktion der Expression von E-Selektin nach einer nicht-viralen liposomalen Transfektion



mittels einer spezifischen siRNA gegen den E-Selektin Rezeptor und die daraus resultierende Verringerung der Adhäsionsfähigkeit von Leukozyten an den humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVEC). Die Aktivierung der Endothelzellen erfolgte mit TNF- $\alpha$ . Für die Perfusion wurde ein shear stress von  $\tau = 1,0 \text{ dyn/cm}^2$  gewählt und für die Dauer der Perfusion eine Zeit von zehn Minuten. Sie beobachteten eine viel stärkere Adhäsion bei den aktivierten untransfizierten Zellen, als bei den transfizierten und stimulierten Zellen. So konnte eine Reduktion von etwa 40 Prozent der adhärenen Leukozyten nach der Transfektion erreicht werden. Die scrambled siRNA transfizierten Zellen wiesen keinen Unterschied zu den TNF- $\alpha$  stimulierten Endothelzellen auf.

HUVECs sind in der Literatur eine häufig verwendete humane Endothelzellart. Als Leukozyten wählten Nishiwaki et al. HL60 Zellen, dies sind Promyelozyten mit starker Expression für E-Selektin Liganden und eignen sich daher gut für die Untersuchung der E-Selektin vermittelten Interaktion zwischen Leukozyten und den Endothelzellen.<sup>31,55</sup> Die Stimulation der Endothelzellen mit TNF- $\alpha$  führte zu E-Selektin abhängigen Interaktionen zwischen HL 60 Zellen und den HUVECs. Durch die fehlende Expression von E-Selektin, infolge der Transfektion mit der spezifischen siRNA, können weniger HL 60 Zellen an die Endothelzellen adhären. Dies erklärt den Unterschied zwischen den stimulierten untransfizierten Endothelzellen und den stimulierten transfizierten Zellen. Da die Sequenz der scrambled siRNA für keinen Rezeptor spezifisch ist, lässt sich somit kein Unterschied zu den stimulierten untransfizierten Zellen aufweisen. So haben Nishiwaki und Kollegen gezeigt, dass unter Flussbedingungen eine erfolgreiche Inhibition von E-Selektin, mittels RNAi in humanen umbilikalen Endothelzellen, in einer geringeren Adhäsion der HL 60 Zellen resultiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese Hypothesen auf humane venöse Endothelzellen übertragen. So konnte unter Flussbedingungen eine Inhibition der Adhäsion der Granulozyten an den E-Selektin Rezeptor von 47 Prozent beobachtet werden, bezogen auf die Anzahl der Sticker, die auf den TNF- $\alpha$  aktivierten Endothelzellen ermittelt werden konnten. Dieser Versuchsansatz wurde auf weitere Rezeptoren ausgeweitet. Für alle drei Sequenzen waren die

Ergebnisse signifikant. So konnte die Adhäsion der Granulozyten an den ICAM-1 Rezeptor um 34 Prozent reduziert werden und an den VCAM-1 Rezeptor um 12 Prozent, nach der Transfektion mit den jeweiligen spezifischen siRNAs. Unter Betrachtung der Ergebnisse für die einzelnen Rezeptoren und im Hinblick auf die Tatsache, dass bei der Adhäsionskaskade alle hier aufgeführten Rezeptoren beteiligt sind, wurde in einer weiteren Versuchsreihe eine Transfektion mit allen drei spezifischen siRNAs durchgeführt, genauer gesagt mit E-Selektin siRNA, ICAM-1 siRNA und mit VCAM-1 siRNA. Erwartet wurde mit dieser Kombination der drei spezifischen siRNAs eine geringere Adhäsion der Granulozyten an den Rezeptoren als mit nur einer spezifischen siRNA. In Anbetracht dessen, dass jeder der Rezeptoren zu einem anderen Zeitpunkt seine maximale Expression erreicht hat, wurde die Perfusion der  $\mu$ -Slides I nach 14 Stunden Inkubationszeit mit TNF- $\alpha$  festgelegt. Zu diesem Zeitpunkt ist VCAM-1 am höchsten exprimiert. Die Expressionskurve von ICAM-1 ist sigmoid mit einem Maximum nach 12 Stunden und geht daraufhin in eine Plateauphase über, sodass der Rezeptor nach 14 Stunden noch immer maximal exprimiert ist. E-Selektin hingegen ist nach 6 Stunden maximal exprimiert. Nishiwaki und Kollegen konnten 36 Stunden nach der Transfektion mit E-Selektin siRNA noch eine Inhibition des E-Selektin Rezeptors nachweisen.<sup>123</sup> In den Vorversuchen konnte 24 Stunden nach der Aktivierung und der Transfektion mit E-Selektin siRNA noch eine Expressionshemmung des Rezeptors nachgewiesen werden. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde die Expression nicht mehr ermittelt. Demnach sind nach 14 Stunden alle drei Rezeptoren exprimiert, sodass eine Perfusion zu diesem Zeitpunkt opportun erscheint. Bei dieser Versuchsreihe zeigte sich, dass die feste Adhäsion der Leukozyten um 56 Prozent reduziert werden konnte. Dieses Untersuchungsergebnis muss unter Beachtung der vorherigen Versuchsergebnisse betrachtet werden. So wurde durch die Transfektion mit E-Selektin siRNA eine Reduktion von 47 Prozent nachgewiesen. Dieser Rezeptor ist in der Adhäsionskaskade zum Großteil für die Phase des Rollings und des Tetherings verantwortlich. Folglich ein Initiator des Entzündungsprozesses. Der ICAM-1 Rezeptor spielt in der späteren Phase des Stickings eine wichtige Rolle und es konnte nach der Transfektion mit der

ICAM-1 siRNA eine Reduktion der adhärierenden Granulozyten auf 34 Prozent beobachtet werden. Anzumerken ist, dass die verschiedenen Funktionen der Rezeptoren nicht exakt voneinander getrennt werden können, sondern dass sich diese in ihren Aufgaben überlappen. Gemäß den untersuchten Werten der Granulozytenadhärenz ist bei der Kombination mehrerer spezifischer siRNAs die Transfektionseffizienz höher. Es war eine Reduktion von 56 Prozent nachzuweisen. Eine mögliche Erklärung für die geringere Adhäsionsfähigkeit der Granulozyten nach einer Transfektion mit mehreren spezifischen siRNAs könnte darin bestehen, dass ein Großteil der Granulozyten durch fehlende E-Selektin Rezeptoren im Rollen, der zweite Schritt in der Adhäsionskaskade, über die Endothelzellen gehemmt werden. Die Granulozyten, die in ihrem Rolling nicht inhibiert werden, können nun durch die fehlende ICAM-1 Expression nicht fest an die Endothelzellen adhären, lösen sich wieder vom Endothel ab und gelangen so wieder als frei fließende Granulozyten in die Zellsuspension. Infolge dessen befinden sich am Ende der Perfusionszeit weniger fest adhärierende Granulozyten in den transfizierten  $\mu$ -Slide I. Diese Beobachtung trägt entscheidend für weitere folgende Versuchsansätze bei. VCAM-1 trägt zu dieser Steigerung nur bedingt bei. So konnte durch eine Transfektion mit VCAM-1 siRNA zwar gerade noch ein signifikanter Unterschied zu den untransfizierten stimulierten Endothelzellen festgestellt werden, aber insgesamt spielt VCAM-1 in der Frühphase der Adhäsionsfähigkeit nur eine untergeordnete Rolle. In Versuchen, welche die Interaktionen von VLA-4 und VCAM-1 an HUVECs analysierten, konnte gezeigt werden, dass durch VCAM-1 eine laterale Migration von Monozyten möglich war.<sup>175</sup> Shang et al konnten durch Blockade des Rezeptors mit anti-VCAM-1 in HUVECs die transendotheliale Migration von Monozyten komplett blocken.<sup>148</sup> Die Migration kann in diesem hier vorliegenden in vitro Modell nicht untersucht werden, daher ist der Rezeptor von untergeordneter Bedeutung. Von entscheidender Bedeutung sind, wie in dieser Arbeit gezeigt wird, die Rezeptoren E-Selektin und ICAM-1.

Durch diesen erbrachten Nachweis, dass eine Kombination von mehreren spezifischen siRNAs eine größere Wirkung erzielen, als die Transfektion mit nur

einer spezifischen siRNA, werden neue Wege für die Zukunft eröffnet mit denen größere Erfolgsaussichten möglich sind vor allem auf dem Gebiet des autologen venösen Bypasses. So kann während einer Bypass-Operation das entnommene Venenpräparat sofort transfiziert werden und im Anschluss an die Transfektion in den koronaren Kreislauf implantiert werden. Dadurch dass es sich um eine lokale Anwendung der siRNA handelt, kann das Risiko einer systemischen Komplikation verringert werden. Für den Patienten bedeutet dies, dass eine erneute Operation infolge einer auftretenden Restenose verzögert, eventuell auch verhindert werden kann. Eine erneute Operation, die in der heutigen Zeit infolge der hohen Okklusionsrate nach Implantateinsetzung besteht, könnte umgehen werden; somit auch die bei einer Operation bestehenden Risiken.

Die dargestellten Gesichtspunkte wirken sich positiv auf die Lebensqualität des Patienten aus, da die Konfrontation mit der Angst sich innerhalb von 10 Jahren einer weiteren Operation unterziehen zu müssen, abgeschwächt werden konnte.

## VI Zusammenfassung

Die koronare Herzkrankheit ist nach wie vor die am häufigsten zum Tode führende Organerkrankung.<sup>20,21,145</sup> Die aorto-koronare Bypass-Operation stellt heute eine etablierte Methode zur Therapie der stenosierenden Koronararteriosklerose dar. Ein Nachteil hierbei ist die vorhandene Restenoserate der venösen Bypassgefäße. Auf die betroffenen Patienten kommen gehäuft notwendig werdende Bypass-Operationen zu und letztendlich haben Patienten mit Restenose eine höhere Mortalität.

Ein Beitrag zur Reduzierung der Restenose konnte in letzter Zeit die Erforschung der molekularen Zusammenhänge der Genexpression mit der Entwicklung von Nukleinsäure-Wirkstoffen beitragen. So rückte im Rahmen der RNA-Interferenz die siRNA in den Focus der modernen Medizin als zukünftiger potentieller Wirkstoff für die Behandlung von bisher nicht kausal therapierbaren Erkrankungen.

Durch den Mechanismus der RNA-Interferenz können spezifische Gensequenzen, die auch für Adhäsionsrezeptormoleküle codieren, in ihrer Expression auf den Endothelzellen inhibiert werden. Die sich daraus ergebenden Resultate haben Konsequenzen auf die Leukozyten-Endothel-Interaktionen. Im Verlauf der hier vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der RNA-Interferenz auf die Expression von Rezeptoren und die damit verbundene Leukozytenadhärenz auf venösen Endothelzellen nachgewiesen werden. Eine mögliche additive Wirkung der Transfektionseffizienz von mehreren spezifischen siRNAs sollte im Flusskammermodell untersucht werden.

Um die Transfektionseffizienz der spezifischen siRNAs zu überprüfen, wurden die different behandelten Endothelzellen zum einen der Durchflusszytometrie und dem Fluoreszenzmikroskop zugeführt und zum anderen wurde in der

Flusskammer die Anzahl der Sticker ermittelt. Die Adhäsionsfähigkeit der Leukozyten an die Oberflächenrezeptoren ICAM-1, E-Selektin und VCAM-1 wurden als Zielgrößen zum Nachweis der Effizienz der Transfektion mit den einzelnen spezifischen siRNAs sowie einer Kombination aller drei spezifischen siRNAs bestimmt. Diesen, hier untersuchten Oberflächenrezeptoren wurde eine Bedeutung in der Leukozyten-Endothel-Interaktion zugeschrieben.

Zur Untersuchung der Leukozytenadhäsion wurden die Endothelzellen auf den  $\mu$ -Slides I unter Flussbedingungen mit  $\tau = 0,75 \text{ dyn/cm}^2$  mit einer Granulozytensuspension perfundiert. Zuvor wurden die Endothelzellen mit spezifischer siRNA transfiziert und im Anschluss daran aktiviert mit TNF- $\alpha$ , in einer Konzentration, die für den zu untersuchenden Rezeptor für dessen Expression erforderlich ist. Nach einer Perfusionsdauer von zehn Minuten wurde eine Videosequenz von zehn Sekunden aufgenommen, anhand welcher die Anzahl der fest adhärierenden Granulozyten, sogenannte Sticker, mit Hilfe einer Software ermittelt werden konnte. Die statistische Auswertung erfolgte mit Ein-Stichproben t-Test.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zeigten bei den Endothelzellen, die mit einer spezifischen siRNA behandelt worden waren, eine deutlich verringerte Oberflächenexpression des jeweiligen Rezeptors. Unterschiede konnten in der Transfektionseffizienz der einzelnen Rezeptoren festgestellt werden, so war die Inhibition bei E-Selektin und ICAM-1 stärker ausgeprägt als bei VCAM-1. Diese Resultate sind bezüglich den TNF- $\alpha$  aktivierten und aktivierten spezifischen siRNA transfizierten Endothelzellen zu betrachten. Die FACS<sup>®</sup>-Analyse wurde unterstützend zu der Fluoreszenzfärbung durchgeführt um quantitative Werte zu erhalten. In der Literatur war eine erfolgreiche Transfektionseffizienz mit diesen spezifischen siRNAs bereits beschrieben worden.

In den Flusskammerversuchen zeigten die Granulozyten ein geringeres Sticking (feste Adhärenz) auf den aktivierten mit spezifischer siRNA transfizierten Endothelzellen gegenüber aktivierten untransfizierten bzw. mit scrambled siRNA transfizierten Endothelzellen. Die Unterschiede in der Anzahl der Sticker waren signifikant für jeden der untersuchten Rezeptoren. Dieses Resultat kann

durch die inhibierte posttranskriptionelle Expression der Rezeptoren erklärt werden. Die geringere Adhärenz an die Rezeptoren E-Selektin und ICAM-1 als bei VCAM-1 ist durch die unterschiedlichen Funktionen der einzelnen Rezeptoren in der Adhäsionskaskade zu erklären. Nach Transfektion einer Kombination der drei spezifischen siRNAs konnte die Adhärenz der Granulozyten noch weiter inhibiert werden, sodass ein additives Resultat aufzuzeigen war.

Abschließend bewertet ergibt sich aus der Transfektion mit einer spezifischen siRNA eine deutliche Reduktion der Adhäsionsfähigkeit der Granulozyten an die Endothelzellen. Den Oberflächenrezeptoren ICAM-1 und E-Selektin wurde in der Literatur eine wichtige Rolle in der Frühphase der Entzündungsreaktion bei Arteriosklerose zugeschrieben, sodass bei diesen Rezeptoren, nach erfolgreicher Transfektion, ein geringeres Sticking zu erwarten war. Diese Hypothese konnte in den durchgeführten Untersuchungen bewiesen werden. Das Ergebnis nach Transfektion mit den drei spezifischen siRNAs weist auf eine weitere Beeinträchtigung in der Adhärenz der Granulozyten an die Endothelzellen hin. Dieses Faktum verdeutlicht den Zusammenhang zwischen den einzelnen Rezeptoren in der Adhäsionskaskade.

Die Relevanz des Dargestellten, welche in der Literatur unter Flussbedingungen auf diese Weise noch nicht beschrieben worden ist, beweist die Notwendigkeit für weitere Untersuchungen auf dem Gebiet der RNA-Interferenz mit der Pathogenese der Arteriosklerose nach Bypass-Operationen. Die Adhärenz der Granulozyten ließ sich unter inflammatorischen Bedingungen durch die Transfektion von spezifischen siRNAs regulieren, sodass eine Weiterentwicklung dieses gentechnologischen Ansatzes durchaus positive Resultate bei der Verhinderung chronisch entzündlicher Prozesse erzielen könnte.

Die RNA-Interferenz ermöglicht folglich nicht nur völlig neue Alternativen, um die Funktion von Genen zu analysieren, sondern stellt auch ein großes therapeutisch nutzbares Potential dar. Vorteil dieser Methode ist die starke und

spezifische Abschaltung von Genen bzw. deren Produkte und durch die Möglichkeit der lokalen Applikation können systemische Reaktionen umgangen werden. Dies lässt eine Weiterentwicklung der Methode der siRNA unumgänglich erscheinen.



**VII Literaturverzeichnis**

1. Abbassi, O., Kishimoto, T. K., McIntire, L. V., Anderson, D. C., and Smith, C. W. E-Selectin Supports Neutrophil Rolling in Vitro Under Conditions of Flow. *J.Clin.Invest* 1993;92(6):2719-30.
2. Abe, Y., El Masri, B., Kimball, K. T., Pownall, H., Reilly, C. F., Osmundsen, K., Smith, C. W., and Ballantyne, C. M. Soluble Cell Adhesion Molecules in Hypertriglyceridemia and Potential Significance on Monocyte Adhesion. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1998;18(5):723-31.
3. Agrawal, S. Antisense Oligonucleotides: Towards Clinical Trials. *Trends Biotechnol.* 1996;14(10):376-87.
4. Aigner, A. Gene Silencing Through RNA Interference (RNAi) in Vivo: Strategies Based on the Direct Application of SiRNAs. *J.Biotechnol.* 25-6-2006;124(1):12-25.
5. Alexander, J. H., Hafley, G., Harrington, R. A., Peterson, E. D., Ferguson, T. B., Jr., Lorenz, T. J., Goyal, A., Gibson, M., Mack, M. J., Gennevois, D., Califf, R. M., and Kouchoukos, N. T. Efficacy and Safety of Edifoligide, an E2F Transcription Factor Decoy, for Prevention of Vein Graft Failure Following Coronary Artery Bypass Graft Surgery: PREVENT IV: a Randomized Controlled Trial. *JAMA* 16-11-2005;294(19):2446-54.
6. Alon, R., Hammer, D. A., and Springer, T. A. Lifetime of the P-Selectin-Carbohydrate Bond and Its Response to Tensile Force in Hydrodynamic Flow. *Nature* 6-4-1995;374(6522):539-42.
7. Amarzguioui, M., Holen, T., Babaie, E., and Prydz, H. Tolerance for Mutations and Chemical Modifications in a SiRNA. *Nucleic Acids Res.* 15-1-2003;31(2):589-95.
8. Angelini, G. D. and Jeremy, J. Y. Towards the Treatment of Saphenous Vein Bypass Graft Failure--a Perspective of the Bristol Heart Institute. *Biorheology* 2002;39(3-4):491-9.
9. Archelos, J. J. and Hartung, H. P. The Role of Adhesion Molecules in Multiple Sclerosis: Biology, Pathogenesis and Therapeutic Implications. *Mol.Med.Today* 1997;3(7):310-21.
10. Badimon, J. J., Fuster, V., Chesebro, J. H., and Badimon, L. Coronary Atherosclerosis. A Multifactorial Disease. *Circulation* 1993;87(3 Suppl):II3-16.

11. Bahra, P., Rainger, G. E., Wautier, J. L., Nguyet-Thin, L., and Nash, G. B. Each Step During Transendothelial Migration of Flowing Neutrophils Is Regulated by the Stimulatory Concentration of Tumour Necrosis Factor-Alpha. *Cell Adhes.Commun.* 1998;6(6):491-501.
12. Bennett, C. F. and Cowser, L. M. Application of Antisense Oligonucleotides for Gene Functionalization and Target Validation. *Curr.Opin.Mol.Ther.* 1999;1(3):359-71.
13. Bennett, C. F., Kornbrust, D., Henry, S., Stecker, K., Howard, R., Cooper, S., Dutson, S., Hall, W., and Jacoby, H. I. An ICAM-1 Antisense Oligonucleotide Prevents and Reverses Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1997;280(2):988-1000.
14. Bevilacqua, M. P. and Nelson, R. M. Selectins. *J.Clin.Invest* 1993;91(2):379-87.
15. Birnbaum, Y., Patterson, M., and Kloner, R. A. The Effect of CY1503, a Sialyl Lewisx Analog Blocker of the Selectin Adhesion Molecules, on Infarct Size and "No-Reflow" in the Rabbit Model of Acute Myocardial Infarction/Reperfusion. *J.Mol.Cell Cardiol.* 1997;29(8):2013-25.
16. Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O., and Barik, S. Inhibition of Respiratory Viruses by Nasally Administered siRNA. *Nat.Med.* 2005;11(1):50-5.
17. Blankenberg, S., Barboux, S., and Tiret, L. Adhesion Molecules and Atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003;170(2):191-203.
18. Böcker, W., Denk, H., and Heitz, Ph. *Pathologie München Jena*, Urban and Fischer Verlag;2001.
19. Braasch, D. A., Jensen, S., Liu, Y., Kaur, K., Arar, K., White, M. A., and Corey, D. R. RNA Interference in Mammalian Cells by Chemically-Modified RNA. *Biochemistry* 8-7-2003;42(26):7967-75.
20. Braunwald, E. Shattuck Lecture--Cardiovascular Medicine at the Turn of the Millennium: Triumphs, Concerns, and Opportunities. *N.Engl.J.Med.* 6-11-1997;337(19):1360-9.
21. Breslow, J. L. Cardiovascular Disease Burden Increases, NIH Funding Decreases. *Nat.Med.* 1997;3(6):600-1.
22. Bridge, A. J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A. L., and Iggo, R. Induction of an Interferon Response by RNAi Vectors in Mammalian Cells. *Nat.Genet.* 2003;34(3):263-4.

23. Brown, D. A., Kang, S. H., Gryaznov, S. M., DeDionisio, L., Heidenreich, O., Sullivan, S., Xu, X., and Nerenberg, M. I. Effect of Phosphorothioate Modification of Oligodeoxynucleotides on Specific Protein Binding. *J.Biol.Chem.* 28-10-1994;269(43):26801-5.
24. Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells. *Science* 19-4-2002;296(5567):550-3.
25. Buckley, C. D. and Simmons, D. L. Cell Adhesion: a New Target for Therapy. *Mol.Med.Today* 1997;3(10):449-56.
26. Bulkley, B. H. and Hutchins, G. M. Accelerated "Atherosclerosis". A Morphologic Study of 97 Saphenous Vein Coronary Artery Bypass Grafts. *Circulation* 1977;55(1):163-9.
27. Campbell, J. M., Bacon, T. A., and Wickstrom, E. Oligodeoxynucleoside Phosphorothioate Stability in Subcellular Extracts, Culture Media, Sera and Cerebrospinal Fluid. *J.Biochem.Biophys.Methods* 1990;20(3):259-67.
28. Carlos, T. M. and Harlan, J. M. Leukocyte-Endothelial Adhesion Molecules. *Blood* 1-10-1994;84(7):2068-101.
29. Caudy, A. A., Ketting, R. F., Hammond, S. M., Denli, A. M., Bathorn, A. M., Tops, B. B., Silva, J. M., Myers, M. M., Hannon, G. J., and Plasterk, R. H. A Micrococcal Nuclease Homologue in RNAi Effector Complexes. *Nature* 25-9-2003;425(6956):411-4.
30. Cejka, D., Losert, D., and Wacheck, V. Short Interfering RNA (SiRNA): Tool or Therapeutic? *Clin.Sci.(Lond)* 2006;110(1):47-58.
31. Collins, S. J., Ruscetti, F. W., Gallagher, R. E., and Gallo, R. C. Terminal Differentiation of Human Promyelocytic Leukemia Cells Induced by Dimethyl Sulfoxide and Other Polar Compounds. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1978;75(5):2458-62.
32. Cominacini, L., Garbin, U., Pasini, A. F., Davoli, A., Campagnola, M., Contessi, G. B., Pastorino, A. M., and Lo, Cascio, V. Antioxidants Inhibit the Expression of Intercellular Cell Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Induced by Oxidized LDL on Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Free Radic.Biol.Med.* 1997;22(1-2):117-27.
33. Cominacini, L., Garbin, U., Pasini, A. F., Davoli, A., Campagnola, M., Rigoni, A., Tosetti, L., and Lo, Cascio, V. The Expression of Adhesion Molecules on Endothelial Cells Is Inhibited by

- Troglitazone Through Its Antioxidant Activity. *Cell Adhes.Commun.* 1999;7(3):223-31.
34. Cooper, D., Butcher, C. M., Berndt, M. C., and Vadas, M. A. P-Selectin Interacts With a Beta 2-Integrin to Enhance Phagocytosis. *J.Immunol.* 1-10-1994;153(7):3199-209.
35. Cronstein, B. N. and Weissmann, G. The Adhesion Molecules of Inflammation. *Arthritis Rheum.* 1993;36(2):147-57.
36. Crook, M. F., Newby, A. C., and Southgate, K. M. Expression of Intercellular Adhesion Molecules in Human Saphenous Veins: Effects of Inflammatory Cytokines and Neointima Formation in Culture. *Atherosclerosis* 2000;150(1):33-41.
37. Crooke, S. T. Molecular Mechanisms of Antisense Drugs: RNase H. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 1998;8(2):133-4.
38. Czauderna, F., Fechtner, M., Dames, S., Aygun, H., Klippel, A., Pronk, G. J., Giese, K., and Kaufmann, J. Structural Variations and Stabilising Modifications of Synthetic siRNAs in Mammalian Cells. *Nucleic Acids Res.* 1-6-2003;31(11):2705-16.
39. Davies, M. G. and Hagen, P. O. Pathophysiology of Vein Graft Failure: a Review. *Eur.J.Vasc.Endovasc.Surg.* 1995;9(1):7-18.
40. Dawber, T. R. and Kannel, W. B. The Framingham Study. An Epidemiological Approach to Coronary Heart Disease. *Circulation* 1966;34(4):553-5.
41. De Clercq, E., Eckstein, F., Sternbach, H., and Merigan, T. C. Interferon Induction by and Ribonuclease Sensitivity of Thiophosphate-Substituted Polyribonucleotides. *Antimicrobial.Agents Chemother.(Bethesda.)* 1969;9:187-91.
42. Dunne, J. L., Ballantyne, C. M., Beaudet, A. L., and Ley, K. Control of Leukocyte Rolling Velocity in TNF-Alpha-Induced Inflammation by LFA-1 and Mac-1. *Blood* 1-1-2002;99(1):336-41.
43. Ebnet, K. and Vestweber, D. Molecular Mechanisms That Control Leukocyte Extravasation: the Selectins and the Chemokines. *Histochem.Cell Biol.* 1999;112(1):1-23.
44. Eckstein, F. Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides: What Is Their Origin and What Is Unique About Them? *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2000;10(2):117-21.
45. Eigler, A., Sinha, B., Hartmann, G., and Endres, S. Taming TNF: Strategies to Restrain This Proinflammatory Cytokine. *Immunol.Today* 1997;18(10):487-92.

46. Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. Duplexes of 21-Nucleotide RNAs Mediate RNA Interference in Cultured Mammalian Cells. *Nature* 24-5-2001;411(6836):494-8.
47. Elbashir, S. M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. RNA Interference Is Mediated by 21- and 22-Nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15-1-2001;15(2):188-200.
48. Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., and Tuschl, T. Functional Anatomy of siRNAs for Mediating Efficient RNAi in *Drosophila Melanogaster* Embryo Lysate. *EMBO J.* 3-12-2001;20(23):6877-88.
49. Elmen, J., Thonberg, H., Ljungberg, K., Frieden, M., Westergaard, M., Xu, Y., Wahren, B., Liang, Z., Orum, H., Koch, T., and Wahlestedt, C. Locked Nucleic Acid (LNA) Mediated Improvements in siRNA Stability and Functionality. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(1):439-47.
50. Fan, J. and Watanabe, T. Inflammatory Reactions in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *J.Atheroscler.Thromb.* 2003;10(2):63-71.
51. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans*. *Nature* 19-2-1998;391(6669):806-11.
52. Flynn, D. M., Buda, A. J., Jeffords, P. R., and Lefer, D. J. A Sialyl Lewis(x)-Containing Carbohydrate Reduces Infarct Size: Role of Selectins in Myocardial Reperfusion Injury. *Am.J.Physiol* 1996;271(5 Pt 2):H2086-H2096.
53. Fuster, V., Badimon, J., Chesebro, J. H., and Fallon, J. T. Plaque Rupture, Thrombosis, and Therapeutic Implications. *Haemostasis* 1996;26 Suppl 4:269-84.
54. Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J. J., and Chesebro, J. H. The Pathogenesis of Coronary Artery Disease and the Acute Coronary Syndromes (1). *N.Engl.J.Med.* 23-1-1992;326(4):242-50.
55. Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F., and Gallo, R. Characterization of the Continuous, Differentiating Myeloid Cell Line (HL-60) From a Patient With Acute Promyelocytic Leukemia. *Blood* 1979;54(3):713-33.

56. Gamble, J. R., Skinner, M. P., Berndt, M. C., and Vadas, M. A. Prevention of Activated Neutrophil Adhesion to Endothelium by Soluble Adhesion Protein GMP140. *Science* 27-7-1990;249(4967):414-7.
57. Garcia-Vicuna, R., Diaz-Gonzalez, F., Gonzalez-Alvaro, I., del Pozo, M. A., Mollinedo, F., Cabanas, C., Gonzalez-Amaro, R., and Sanchez-Madrid, F. Prevention of Cytokine-Induced Changes in Leukocyte Adhesion Receptors by Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs From the Oxicam Family. *Arthritis Rheum.* 1997;40(1):143-53.
58. Gearing, A. J. and Newman, W. Circulating Adhesion Molecules in Disease. *Immunol.Today* 1993;14(10):506-12.
59. Gimbrone, M. A., Jr., Topper, J. N., Nagel, T., Anderson, K. R., and Garcia-Cardena, G. Endothelial Dysfunction, Hemodynamic Forces, and Atherogenesis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2000;902:230-9.
60. Gonzalez-Alvaro, I., Carmona, L., Diaz-Gonzalez, F., Gonzalez-Amaro, R., Mollinedo, F., Sanchez-Madrid, F., Laffon, A., and Garcia-Vicuna, R. Aceclofenac, a New Nonsteroidal Antiinflammatory Drug, Decreases the Expression and Function of Some Adhesion Molecules on Human Neutrophils. *J.Rheumatol.* 1996;23(4):723-9.
61. Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N., and Shiekhattar, R. Human RISC Couples MicroRNA Biogenesis and Posttranscriptional Gene Silencing. *Cell* 18-11-2005;123(4):631-40.
62. Grondin, C. M., Campeau, L., Thornton, J. C., Engle, J. C., Cross, F. S., and Schreiber, H. Coronary Artery Bypass Grafting With Saphenous Vein. *Circulation* 1989;79(6 Pt 2):I24-I29.
63. Gryziewicz, L. Regulatory Aspects of Drug Approval for Macular Degeneration. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 13-12-2005;57(14):2092-8.
64. Guo, S. and Kemphues, K. J. Par-1, a Gene Required for Establishing Polarity in *C. Elegans* Embryos, Encodes a Putative Ser/Thr Kinase That Is Asymmetrically Distributed. *Cell* 19-5-1995;81(4):611-20.
65. Guvakova, M. A., Yakubov, L. A., Vlodaysky, I., Tonkinson, J. L., and Stein, C. A. Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides Bind to Basic Fibroblast Growth Factor, Inhibit Its Binding to Cell Surface Receptors, and Remove It From Low Affinity Binding Sites on Extracellular Matrix. *J.Biol.Chem.* 10-2-1995;270(6):2620-7.

66. Haley, B. and Zamore, P. D. Kinetic Analysis of the RNAi Enzyme Complex. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 2004;11(7):599-606.
67. Hamilton, A. J. and Baulcombe, D. C. A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science* 29-10-1999;286(5441):950-2.
68. Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G. J. An RNA-Directed Nuclease Mediates Post-Transcriptional Gene Silencing in *Drosophila* Cells. *Nature* 16-3-2000;404(6775):293-6.
69. Hayafune, M., Miyano-Kurosaki, N., Takaku, H., and Park, W. S. Silencing of HIV-1 Gene Expression by siRNAs in Transduced Cells. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2006;25(7):795-9.
70. Hentzen, E. R., Neelamegham, S., Kansas, G. S., Benanti, J. A., McIntire, L. V., Smith, C. W., and Simon, S. I. Sequential Binding of CD11a/CD18 and CD11b/CD18 Defines Neutrophil Capture and Stable Adhesion to Intercellular Adhesion Molecule-1. *Blood* 1-2-2000;95(3):911-20.
71. Holen, T., Amarzguioui, M., Wiiger, M. T., Babaie, E., and Prydz, H. Positional Effects of Short Interfering RNAs Targeting the Human Coagulation Trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res.* 15-4-2002;30(8):1757-66.
72. Hwang, S. J., Ballantyne, C. M., Sharrett, A. R., Smith, L. C., Davis, C. E., Gotto, A. M., Jr., and Boerwinkle, E. Circulating Adhesion Molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-Selectin in Carotid Atherosclerosis and Incident Coronary Heart Disease Cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) Study. *Circulation* 16-12-1997;96(12):4219-25.
73. Isner, J. M., Vale, P. R., Symes, J. F., and Losordo, D. W. Assessment of Risks Associated With Cardiovascular Gene Therapy in Human Subjects. *Circ.Res.* 31-8-2001;89(5):389-400.
74. Issekutz, A. C., Rowter, D., and Springer, T. A. Role of ICAM-1 and ICAM-2 and Alternate CD11/CD18 Ligands in Neutrophil Transendothelial Migration. *J.Leukoc.Biol.* 1999;65(1):117-26.
75. Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelter, J., Kobayashi, S. V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., and Linsley, P. S. Expression Profiling Reveals Off-Target Gene Regulation by RNAi. *Nat.Biotechnol.* 2003;21(6):635-7.
76. Jackson, A. L. and Linsley, P. S. Noise Amidst the Silence: Off-Target Effects of siRNAs? *Trends Genet.* 2004;20(11):521-4.

77. Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., and Minick, C. R. Culture of Human Endothelial Cells Derived From Umbilical Veins. Identification by Morphologic and Immunologic Criteria. *J.Clin.Invest* 1973;52(11):2745-56.
78. James, H. A. and Gibson, I. The Therapeutic Potential of Ribozymes. *Blood* 15-1-1998;91(2):371-82.
79. Jones, S. C., Banks, R. E., Haidar, A., Gearing, A. J., Hemingway, I. K., Ibbotson, S. H., Dixon, M. F., and Axon, A. T. Adhesion Molecules in Inflammatory Bowel Disease. *Gut* 1995;36(5):724-30.
80. Kanda, T., Steele, R., Ray, R., and Ray, R. B. Small Interfering RNA Targeted to Hepatitis C Virus 5' Nontranslated Region Exerts Potent Antiviral Effect. *J.Virol.* 2007;81(2):669-76.
81. Kanwar, J., Berg, R., Lehnert, K., and Krissansen, G. Taking Lessons From Dendritic Cells: Multiple Xenogeneic Ligands for Leukocyte Integrins Have the Potential to Stimulate Anti-Tumor Immunity. *Gene Ther.* 1999;6(11):1835-44.
82. Kaplanski, G., Farnarier, C., Tissot, O., Pierres, A., Benliel, A. M., Alessi, M. C., Kaplanski, S., and Bongrand, P. Granulocyte-Endothelium Initial Adhesion. Analysis of Transient Binding Events Mediated by E-Selectin in a Laminar Shear Flow. *Biophys.J.* 1993;64(6):1922-33.
83. Kaplanski, G., Marin, V., Fabrigoule, M., Boulay, V., Benliel, A. M., Bongrand, P., Kaplanski, S., and Farnarier, C. Thrombin-Activated Human Endothelial Cells Support Monocyte Adhesion in Vitro Following Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1; CD54) and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1; CD106). *Blood* 15-8-1998;92(4):1259-67.
84. Karagiannis, T. C. and El Osta, A. RNA Interference and Potential Therapeutic Applications of Short Interfering RNAs. *Cancer Gene Ther.* 2005;12(10):787-95.
85. Keaney, J. F., Jr. Atherosclerosis: From Lesion Formation to Plaque Activation and Endothelial Dysfunction. *Mol.Aspects Med.* 2000;21(4-5):99-166.
86. Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S. D. Functional SiRNAs and MiRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell* 17-10-2003;115(2):209-16.
87. Kong, X., Zhang, W., Lockey, R. F., Auais, A., Piedimonte, G., and Mohapatra, S. S. Respiratory Syncytial Virus Infection in Fischer



- 344 Rats Is Attenuated by Short Interfering RNA Against the RSV-NS1 Gene. *Genet.Vaccines.Ther.* 2007;5:4.
88. Kronke, J., Kittler, R., Buchholz, F., Windisch, M. P., Pietschmann, T., Bartenschlager, R., and Frese, M. Alternative Approaches for Efficient Inhibition of Hepatitis C Virus RNA Replication by Small Interfering RNAs. *J.Virol.* 2004;78(7):3436-46.
89. Kubes, P. and Kanwar, S. Histamine Induces Leukocyte Rolling in Post-Capillary Venules. A P-Selectin-Mediated Event. *J.Immunol.* 1-4-1994;152(7):3570-7.
90. Kullo, I. J., Gau, G. T., and Tajik, A. J. Novel Risk Factors for Atherosclerosis. *Mayo Clin.Proc.* 2000;75(4):369-80.
91. Kume, N., Cybulsky, M. I., and Gimbrone, M. A., Jr. Lysophosphatidylcholine, a Component of Atherogenic Lipoproteins, Induces Mononuclear Leukocyte Adhesion Molecules in Cultured Human and Rabbit Arterial Endothelial Cells. *J.Clin.Invest* 1992;90(3):1138-44.
92. Kunkel, E. J. and Ley, K. Distinct Phenotype of E-Selectin-Deficient Mice. E-Selectin Is Required for Slow Leukocyte Rolling in Vivo. *Circ.Res.* 1996;79(6):1196-204.
93. Kurreck, J., Wyszko, E., Gillen, C., and Erdmann, V. A. Design of Antisense Oligonucleotides Stabilized by Locked Nucleic Acids. *Nucleic Acids Res.* 1-5-2002;30(9):1911-8.
94. Kvietys, P. R. and Granger, D. N. Endothelial Cell Monolayers As a Tool for Studying Microvascular Pathophysiology. *Am.J.Physiol* 1997;273(6 Pt 1):G1189-G1199.
95. Lawrence, M. B., McIntire, L. V., and Eskin, S. G. Effect of Flow on Polymorphonuclear Leukocyte/Endothelial Cell Adhesion. *Blood* 1987;70(5):1284-90.
96. Lawrence, M. B., Smith, C. W., Eskin, S. G., and McIntire, L. V. Effect of Venous Shear Stress on CD18-Mediated Neutrophil Adhesion to Cultured Endothelium. *Blood* 1-1-1990;75(1):227-37.
97. Lawrence, M. B. and Springer, T. A. Leukocytes Roll on a Selectin at Physiologic Flow Rates: Distinction From and Prerequisite for Adhesion Through Integrins. *Cell* 31-5-1991;65(5):859-73.
98. Lefer, D. J., Flynn, D. M., Phillips, M. L., Ratcliffe, M., and Buda, A. J. A Novel Sialyl LewisX Analog Attenuates Neutrophil Accumulation and Myocardial Necrosis After Ischemia and Reperfusion. *Circulation* 1994;90(5):2390-401.

99. Ley, K. Molecular Mechanisms of Leukocyte Recruitment in the Inflammatory Process. *Cardiovasc.Res.* 1996;32(4):733-42.
100. Ley, K., Gaehtgens, P., Fennie, C., Singer, M. S., Lasky, L. A., and Rosen, S. D. Lectin-Like Cell Adhesion Molecule 1 Mediates Leukocyte Rolling in Mesenteric Venules in Vivo. *Blood* 15-6-1991;77(12):2553-5.
101. Ling, X., Ye, J. F., and Zheng, X. X. Dynamic Investigation of Leukocyte-Endothelial Cell Adhesion Interaction Under Fluid Shear Stress in Vitro. *Sheng Wu Hua Xue.Yu Sheng Wu Wu Li Xue.Bao.(Shanghai)* 2003;35(6):567-72.
102. Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J. J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G. J. Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi. *Science* 3-9-2004;305(5689):1437-41.
103. Losordo, D. W., Vale, P. R., Symes, J. F., Dunnington, C. H., Esakof, D. D., Maysky, M., Ashare, A. B., Lathi, K., and Isner, J. M. Gene Therapy for Myocardial Angiogenesis: Initial Clinical Results With Direct Myocardial Injection of PhVEGF165 As Sole Therapy for Myocardial Ischemia. *Circulation* 22-12-1998;98(25):2800-4.
104. Lusinskas, F. W., Ding, H., Tan, P., Cumming, D., Tedder, T. F., and Gerritsen, M. E. L- and P-Selectins, but Not CD49d (VLA-4) Integrins, Mediate Monocyte Initial Attachment to TNF-Alpha-Activated Vascular Endothelium Under Flow in Vitro. *J.Immunol.* 1-7-1996;157(1):326-35.
105. Luster, A. D., Alon, R., and von Andrian, U. H. Immune Cell Migration in Inflammation: Present and Future Therapeutic Targets. *Nat.Immunol.* 2005;6(12):1182-90.
106. Ma, X. L., Lefer, D. J., Lefer, A. M., and Rothlein, R. Coronary Endothelial and Cardiac Protective Effects of a Monoclonal Antibody to Intercellular Adhesion Molecule-1 in Myocardial Ischemia and Reperfusion. *Circulation* 1992;86(3):937-46.
107. Mackay, C. R. Chemokines: Immunology's High Impact Factors. *Nat.Immunol.* 2001;2(2):95-101.
108. Majewski, S., Hunzelmann, N., Johnson, J. P., Jung, C., Mauch, C., Ziegler-Heitbrock, H. W., Riethmuller, G., and Krieg, T. Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) in the Skin of Patients With Systemic Scleroderma. *J.Invest Dermatol.* 1991;97(4):667-71.

109. Marshall, E. Gene Therapy Death Prompts Review of Adenovirus Vector. *Science* 17-12-1999;286(5448):2244-5.
110. Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R., and Tuschl, T. Single-Stranded Antisense siRNAs Guide Target RNA Cleavage in RNAi. *Cell* 6-9-2002;110(5):563-74.
111. Massberg, S., Schulz, C., and Gawaz, M. Role of Platelets in the Pathophysiology of Acute Coronary Syndrome. *Semin.Vasc.Med.* 2003;3(2):147-62.
112. McEver, R. P., Moore, K. L., and Cummings, R. D. Leukocyte Trafficking Mediated by Selectin-Carbohydrate Interactions. *J.Biol.Chem.* 12-5-1995;270(19):11025-8.
113. Michels, S., Schmidt-Erfurth, U., and Rosenfeld, P. J. Promising New Treatments for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Expert.Opin.Investig.Drugs* 2006;15(7):779-93.
114. Miki, I., Kusano, A., Ohta, S., Hanai, N., Otoshi, M., Masaki, S., Sato, S., and Ohmori, K. Histamine Enhanced the TNF-Alpha-Induced Expression of E-Selectin and ICAM-1 on Vascular Endothelial Cells. *Cell Immunol.* 1-8-1996;171(2):285-8.
115. Mills, N. L. and Everson, C. T. Vein Graft Failure. *Curr.Opin.Cardiol.* 1995;10(6):562-8.
116. Miserez, A. R. and Braun, J. R. [Application of Genetic Principles to the Causal Assessment of Atherosclerosis]. *Ther.Umsch.* 1995;52(12):835-43.
117. Morishita, R., Sugimoto, T., Aoki, M., Kida, I., Tomita, N., Moriguchi, A., Maeda, K., Sawa, Y., Kaneda, Y., Higaki, J., and Ogihara, T. In Vivo Transfection of Cis Element "Decoy" Against Nuclear Factor-KappaB Binding Site Prevents Myocardial Infarction. *Nat.Med.* 1997;3(8):894-9.
118. Motwani, J. G. and Topol, E. J. Aortocoronary Saphenous Vein Graft Disease: Pathogenesis, Predisposition, and Prevention. *Circulation* 10-3-1998;97(9):916-31.
119. Mukaida, N., Matsumoto, T., Yokoi, K., Harada, A., and Matsushima, K. Inhibition of Neutrophil-Mediated Acute Inflammation Injury by an Antibody Against Interleukin-8 (IL-8). *Inflamm.Res.* 1998;47 Suppl 3:S151-S157.
120. Muller, A. M., Cronen, C., Muller, K. M., and Kirkpatrick, C. J. Heterogeneous Expression of Cell Adhesion Molecules by Endothelial Cells in ARDS. *J.Pathol.* 2002;198(2):270-5.

121. Muller, W. A. The Role of PECAM-1 (CD31) in Leukocyte Emigration: Studies in Vitro and in Vivo. *J.Leukoc.Biol.* 1995;57(4):523-8.
122. Nachman, R. L. and Jaffe, E. A. Endothelial Cell Culture: Beginnings of Modern Vascular Biology. *J.Clin.Invest* 2004;114(8):1037-40.
123. Nishiwaki, Y., Yokota, T., Hiraoka, M., Miyagishi, M., Taira, K., Isobe, M., Mizusawa, H., and Yoshida, M. Introduction of Short Interfering RNA to Silence Endogenous E-Selectin in Vascular Endothelium Leads to Successful Inhibition of Leukocyte Adhesion. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 31-10-2003;310(4):1062-6.
124. Nohe, B., Johannes, T., Schmidt, V., Schroeder, T. H., Kiefer, R. T., Unertl, K., and Dieterich, H. J. [Effects of Reduced Shear Stress on Inflammatory Reactions in Vitro. Effects of Pathological Flow Conditions on Leukocyte-Endothelial Interactions and Monocyte Tissue Factor Expression in Human Cell Cultures]. *Anaesthesist* 2005;54(8):773-80.
125. Nourshargh, S. and Williams, T. J. Evidence That a Receptor-Operated Event on the Neutrophil Mediates Neutrophil Accumulation in Vivo. Pretreatment of <sup>111</sup>In-Neutrophils With Pertussis Toxin in Vitro Inhibits Their Accumulation in Vivo. *J.Immunol.* 15-10-1990;145(8):2633-8.
126. Park, W. S., Hayafune, M., Miyano-Kurosaki, N., and Takaku, H. Specific HIV-1 Env Gene Silencing by Small Interfering RNAs in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Gene Ther.* 2003;10(24):2046-50.
127. Patel, K. D. Mechanisms of Selective Leukocyte Recruitment From Whole Blood on Cytokine-Activated Endothelial Cells Under Flow Conditions. *J.Immunol.* 15-5-1999;162(10):6209-16.
128. Patel, K. D., Moore, K. L., Nollert, M. U., and McEver, R. P. Neutrophils Use Both Shared and Distinct Mechanisms to Adhere to Selectins Under Static and Flow Conditions. *J.Clin.Invest* 1995;96(4):1887-96.
129. Perry, M. A. and Granger, D. N. Role of CD11/CD18 in Shear Rate-Dependent Leukocyte-Endothelial Cell Interactions in Cat Mesenteric Venules. *J.Clin.Invest* 1991;87(5):1798-804.
130. Persengiev, S. P., Zhu, X., and Green, M. R. Nonspecific, Concentration-Dependent Stimulation and Repression of

- Mammalian Gene Expression by Small Interfering RNAs (SiRNAs). *RNA*. 2004;10(1):12-8.
131. Phillips, M. I. and Zhang, Y. C. Basic Principles of Using Antisense Oligonucleotides in Vivo. *Methods Enzymol.* 2000;313:46-56.
132. Pooley, N., Ghosh, L., and Sharon, P. Up-Regulation of E-Selectin and Intercellular Adhesion Molecule-1 Differs Between Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Dig.Dis.Sci.* 1995;40(1):219-25.
133. Rainger, G. E., Stone, P., Morland, C. M., and Nash, G. B. A Novel System for Investigating the Ability of Smooth Muscle Cells and Fibroblasts to Regulate Adhesion of Flowing Leukocytes to Endothelial Cells. *J.Immunol.Methods* 1-9-2001;255(1-2):73-82.
134. Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W. S., and Khvorova, A. Rational SiRNA Design for RNA Interference. *Nat.Biotechnol.* 2004;22(3):326-30.
135. Rivas, F. V., Tolia, N. H., Song, J. J., Aragon, J. P., Liu, J., Hannon, G. J., and Joshua-Tor, L. Purified Argonaute2 and an SiRNA Form Recombinant Human RISC. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 2005;12(4):340-9.
136. Romano, G., Michell, P., Pacilio, C., and Giordano, A. Latest Developments in Gene Transfer Technology: Achievements, Perspectives, and Controversies Over Therapeutic Applications. *Stem Cells* 2000;18(1):19-39.
137. Ronald, J. A., Ionescu, C. V., Rogers, K. A., and Sandig, M. Differential Regulation of Transendothelial Migration of THP-1 Cells by ICAM-1/LFA-1 and VCAM-1/VLA-4. *J.Leukoc.Biol.* 2001;70(4):601-9.
138. Ross, J., Jr. Regional Myocardial Function and Microvascular Dysfunction. Does the Alternate Cascade Represent Ischemia? *Cardiologia* 1999;44(9):797-9.
139. Ross, R. The Pathogenesis of Atherosclerosis. *Mech.Ageing Dev.* 1979;9(5-6):435-40.
140. Ross, R. The Pathogenesis of Atherosclerosis--an Update. *N.Engl.J.Med.* 20-2-1986;314(8):488-500.
141. Ross, R. The Pathogenesis of Atherosclerosis: a Perspective for the 1990s. *Nature* 29-4-1993;362(6423):801-9.
142. Sampath, R., Kukielka, G. L., Smith, C. W., Eskin, S. G., and McIntire, L. V. Shear Stress-Mediated Changes in the Expression

- of Leukocyte Adhesion Receptors on Human Umbilical Vein Endothelial Cells in Vitro. *Ann.Biomed.Eng* 1995;23(3):247-56.
143. Schubert, S., Grunweller, A., Erdmann, V. A., and Kurreck, J. Local RNA Target Structure Influences SiRNA Efficacy: Systematic Analysis of Intentionally Designed Binding Regions. *J.Mol.Biol.* 13-5-2005;348(4):883-93.
144. Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P. D. Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell* 17-10-2003;115(2):199-208.
145. Scott, J. Pathophysiology and Biochemistry of Cardiovascular Disease. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 2004;14(3):271-9.
146. Sekido, N., Mukaida, N., Harada, A., Nakanishi, I., Watanabe, Y., and Matsushima, K. Prevention of Lung Reperfusion Injury in Rabbits by a Monoclonal Antibody Against Interleukin-8. *Nature* 14-10-1993;365(6447):654-7.
147. Semizarov, D., Frost, L., Sarthy, A., Kroeger, P., Halbert, D. N., and Fesik, S. W. Specificity of Short Interfering RNA Determined Through Gene Expression Signatures. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 27-5-2003;100(11):6347-52.
148. Shang, X. Z., Lang, B. J., and Issekutz, A. C. Adhesion Molecule Mechanisms Mediating Monocyte Migration Through Synovial Fibroblast and Endothelium Barriers: Role for CD11/CD18, Very Late Antigen-4 (CD49d/CD29), Very Late Antigen-5 (CD49e/CD29), and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (CD106). *J.Immunol.* 1-1-1998;160(1):467-74.
149. Shen, J., Samul, R., Silva, R. L., Akiyama, H., Liu, H., Saishin, Y., Hackett, S. F., Zinnen, S., Kossen, K., Fosnaugh, K., Vargeese, C., Gomez, A., Bouhana, K., Aitchison, R., Pavco, P., and Campochiaro, P. A. Suppression of Ocular Neovascularization With SiRNA Targeting VEGF Receptor 1. *Gene Ther.* 2006;13(3):225-34.
150. Simon, S. I., Neelamegham, S., Taylor, A., and Smith, C. W. The Multistep Process of Homotypic Neutrophil Aggregation: a Review of the Molecules and Effects of Hydrodynamics. *Cell Adhes.Commun.* 1998;6(2-3):263-76.
151. Simovic, D., Isner, J. M., Ropper, A. H., Pieczek, A., and Weinberg, D. H. Improvement in Chronic Ischemic Neuropathy After Intramuscular PhVEGF165 Gene Transfer in Patients With Critical Limb Ischemia. *Arch.Neurol.* 2001;58(5):761-8.

152. Singh, N., Amin, S., Richter, E., Rashid, S., Scoglietti, V., Jani, P. D., Wang, J., Kaur, R., Ambati, J., Dong, Z., and Ambati, B. K. Flt-1 Intracellular Receptors Inhibit Hypoxia-Induced VEGF Expression in Vitro and Corneal Neovascularization in Vivo. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005;46(5):1647-52.
153. Singh, N., Higgins, E., Amin, S., Jani, P., Richter, E., Patel, A., Kaur, R., Wang, J., Ambati, J., Dong, Z., and Ambati, B. K. Unique Homologous siRNA Blocks Hypoxia-Induced VEGF Upregulation in Human Corneal Cells and Inhibits and Regresses Murine Corneal Neovascularization. *Cornea* 2007;26(1):65-72.
154. Sledz, C. A., Holko, M., de Veer, M. J., Silverman, R. H., and Williams, B. R. Activation of the Interferon System by Short-Interfering RNAs. *Nat. Cell Biol.* 2003;5(9):834-9.
155. Smith, C. W., Marlin, S. D., Rothlein, R., Toman, C., and Anderson, D. C. Cooperative Interactions of LFA-1 and Mac-1 With Intercellular Adhesion Molecule-1 in Facilitating Adherence and Transendothelial Migration of Human Neutrophils in Vitro. *J. Clin. Invest* 1989;83(6):2008-17.
156. Song, J. J., Smith, S. K., Hannon, G. J., and Joshua-Tor, L. Crystal Structure of Argonaute and Its Implications for RISC Slicer Activity. *Science* 3-9-2004;305(5689):1434-7.
157. Sontheimer, E. J. Assembly and Function of RNA Silencing Complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005;6(2):127-38.
158. SoRelle, R. Human Gene Therapy: Science Under Fire. *Circulation* 28-3-2000;101(12):E9023-E9024.
159. Springer, T. A. Traffic Signals on Endothelium for Lymphocyte Recirculation and Leukocyte Emigration. *Annu. Rev. Physiol* 1995;57:827-72.
160. Stepkowski, S. M., Tu, Y., Condon, T. P., and Bennett, C. F. Blocking of Heart Allograft Rejection by Intercellular Adhesion Molecule-1 Antisense Oligonucleotides Alone or in Combination With Other Immunosuppressive Modalities. *J. Immunol.* 1-12-1994;153(11):5336-46.
161. Tedgui, A. and Mallat, Z. Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. *Physiol Rev.* 2006;86(2):515-81.
162. ter Brake, O., Konstantinova, P., Ceylan, M., and Berkhout, B. Silencing of HIV-1 With RNA Interference: a Multiple shRNA Approach. *Mol. Ther.* 2006;14(6):883-92.

163. Teufel, R., Carralot, J. P., Scheel, B., Probst, J., Walter, S., Jung, G., Hoerr, I., Rammensee, H. G., and Pascolo, S. Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Transfected With Messenger RNA Stimulate Antigen-Specific Cytotoxic T-Lymphocytes in Vitro. *Cell Mol.Life Sci.* 2005;62(15):1755-62.
164. The, F. O., de Jonge, W. J., Bennink, R. J., van den Wijngaard, R. M., and Boeckxstaens, G. E. The ICAM-1 Antisense Oligonucleotide ISIS-3082 Prevents the Development of Postoperative Ileus in Mice. *Br.J.Pharmacol.* 2005;146(2):252-8.
165. Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N., and Zamore, P. D. A Protein Sensor for siRNA Asymmetry. *Science* 19-11-2004;306(5700):1377-80.
166. Tomari, Y. and Zamore, P. D. Perspective: Machines for RNAi. *Genes Dev.* 1-3-2005;19(5):517-29.
167. Traub, O. and Berk, B. C. Laminar Shear Stress: Mechanisms by Which Endothelial Cells Transduce an Atheroprotective Force. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1998;18(5):677-85.
168. Tuschl, T. RNA Interference and Small Interfering RNAs. *Chembiochem.* 2-4-2001;2(4):239-45.
169. Vale, P. R., Losordo, D. W., Milliken, C. E., Maysky, M., Esakof, D. D., Symes, J. F., and Isner, J. M. Left Ventricular Electromechanical Mapping to Assess Efficacy of PhVEGF(165) Gene Transfer for Therapeutic Angiogenesis in Chronic Myocardial Ischemia. *Circulation* 29-8-2000;102(9):965-74.
170. van der Wal, A. C., Becker, A. E., van der Loos, C. M., and Das, P. K. Site of Intimal Rupture or Erosion of Thrombosed Coronary Atherosclerotic Plaques Is Characterized by an Inflammatory Process Irrespective of the Dominant Plaque Morphology. *Circulation* 1994;89(1):36-44.
171. Vestweber, D. and Blanks, J. E. Mechanisms That Regulate the Function of the Selectins and Their Ligands. *Physiol Rev.* 1999;79(1):181-213.
172. Vickers, T. A., Koo, S., Bennett, C. F., Crooke, S. T., Dean, N. M., and Baker, B. F. Efficient Reduction of Target RNAs by Small Interfering RNA and RNase H-Dependent Antisense Agents. A Comparative Analysis. *J.Biol.Chem.* 28-2-2003;278(9):7108-18.
173. Walker, T., Wendel, H. P., Tetzloff, L., Heidenreich, O., and Ziemer, G. Suppression of ICAM-1 in Human Venous Endothelial



- Cells by Small Interfering RNAs. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 2005;28(6):816-20.
174. Walker, T., Wendel, H. P., Tetzloff, L., Raabe, C., Heidenreich, O., Simon, P., Scheule, A. M., and Ziemer, G. Inhibition of Adhesion Molecule Expression on Human Venous Endothelial Cells by Non-Viral SiRNA Transfection. *J.Cell Mol.Med.* 2007;11(1):139-47.
175. Weber, C. and Springer, T. A. Interaction of Very Late Antigen-4 With VCAM-1 Supports Transendothelial Chemotaxis of Monocytes by Facilitating Lateral Migration. *J.Immunol.* 15-12-1998;161(12):6825-34.
176. Yi, S. W., Yune, T. Y., Kim, T. W., Chung, H., Choi, Y. W., Kwon, I. C., Lee, E. B., and Jeong, S. Y. A Cationic Lipid Emulsion/DNA Complex As a Physically Stable and Serum-Resistant Gene Delivery System. *Pharm.Res.* 2000;17(3):314-20.
177. Zamaratski, E., Pradeepkumar, P. I., and Chattopadhyaya, J. A Critical Survey of the Structure-Function of the Antisense Oligo/RNA Heteroduplex As Substrate for RNase H. *J.Biochem.Biophys.Methods* 28-5-2001;48(3):189-208.
178. Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., and Bartel, D. P. RNAi: Double-Stranded RNA Directs the ATP-Dependent Cleavage of mRNA at 21 to 23 Nucleotide Intervals. *Cell* 31-3-2000;101(1):25-33.
179. Zhang, W., Yang, H., Kong, X., Mohapatra, S., Juan-Vergara, H., Hellermann, G., Behera, S., Singam, R., Lockey, R. F., and Mohapatra, S. S. Inhibition of Respiratory Syncytial Virus Infection With Intranasal SiRNA Nanoparticles Targeting the Viral NS1 Gene. *Nat.Med.* 2005;11(1):56-62.
180. Zhao, Z. Q., Lefer, D. J., Sato, H., Hart, K. K., Jefforda, P. R., and Vinten-Johansen, J. Monoclonal Antibody to ICAM-1 Preserves Postischemic Blood Flow and Reduces Infarct Size After Ischemia-Reperfusion in Rabbit. *J.Leukoc.Biol.* 1997;62(3):292-300.
181. Zou, Y., Hu, Y., Mayr, M., Dietrich, H., Wick, G., and Xu, Q. Reduced Neointima Hyperplasia of Vein Bypass Grafts in Intercellular Adhesion Molecule-1-Deficient Mice. *Circ.Res.* 3-3-2000;86(4):434-40.

**VIII Abkürzungsverzeichnis**

C. elegans	Caenorhabditis elegans
DMS	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig ( <u>d</u> ouble <u>s</u> tranded)
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
et al.	und andere
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescence iso thio cyanat
HI-Virus	Human immunodeficiency virus
HL60	Granulozyten mit hoher Expression für E-Selectin Ligand-1
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
KCl	Kaliumchlorid
LDL	Low density Lipoprotein
LFA-1	$\beta_2$ -Integrin
Mac-1	$\beta_2$ -Integrin
mM	Millimol pro Liter
mRNA	Messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumbicarbonat
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PE-Cy5	Tandemkonjugat aus R-Phycoerythrin mit Cyanin-5
RISC	RNA-induced-silencing complex
RMPI	Zellkulturmedium
RNA	Ribonukleinsäure

---

RNAi	RNA- Interferenz
RNAse	Ribonuklease
RSV	Respiratory Syncytial Virus
PMN	Polymorphonuclear leukocyte
siRNA	Small interfering RNA
sLe <sup>x</sup>	Sialyl-Lewis <sup>x</sup>
TNF- $\alpha$	Tumor nekrose factor $\alpha$
TNS	Trypsin neutralizing solution
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLA-4	$\alpha_4$ -Integrin

## IX Danksagung

Bei meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. G. Ziemer, ärztlicher Direktor der Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie am Universitätsklinikum Tübingen möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Besonders möchte ich mich auch bei meinen Betreuern, Herrn Dr. rer. nat. Hans-Peter Wendel und Dr. med Tobias Walker bedanken. Sie begleiteten mich während der Dissertation und standen mir jederzeit mit fachlichem Rat zur Seite.

Einen großen Dank an Herrn Christoph Zanke, der mir in allen technischen Fragen bei der Bild- und Datenverarbeitung stets mit Rat und Tat zur Hilfe stand. Für die statistische Auswertung danke ich Herrn Dr. rer. nat. Martin Eichner.

Bei dem ganzen Team des Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie Labors für die freundliche Unterstützung und das nette Arbeitsklima. Und Liane Spranger für die Betreuung und Unterstützung in allen Phasen der experimentellen Versuche.

Ein herzliches Danke geht an meine Eltern, Geschwister und Freunde für die Unterstützung in allen Lebensphasen.

## X Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Isabelle Müller
Geburtstag	12.06.1983
Geburtsort	Albstadt-Ebingen

### Schulbildung

1989 - 1993	Grundschule Balingen-Schmidlen
1993 - 2002	Gymnasium Balingen
2002	Allgemeine Hochschulreife

### Medizinische Ausbildung

2002 - 2004	Medizinstudium (Vorklinik) an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
2004	Ärztliche Vorprüfung
2004 -	Medizinstudium (Klinik) an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
21.11.2008	Ärztliche Prüfung (2.Staatsexamen)

### Promotion

2005 - 2007	„Reduzierung der Leukozytenadhäsion an humanen venösen Endothelzellen mittels spezifischer siRNA Sequenzen im Flusskammermodell“, Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie am Universitätsklinikum Tübingen
-------------	---

**Famulaturen**

2005	Chirurgie/Unfallchirurgie, Sonthofen
2005	Chirurgie/Unfallchirurgie, BG Unfallklinik Tübingen
2006	Innere Medizin, Städt. Krankenhaus Friedrichshafen
2007	Chirurgie/Unfallchirurgie, Praxis Dr. Müller, Albstadt-Ebingen
2007	Pädiatrie, Universitätsklinikum Tübingen