

Gene-Silencing der Adhäsionsmoleküle P-Selectin
(CD 62P) und PECAM-1 (CD 31) mittels
small interfering RNA (siRNA) an humanen Endothelzellen
der Vena saphena magna (HSVEC) unter dem Aspekt der
Protektion aorto-koronarer Bypässe

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Deichelbohrer, Stephan

2016

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

Professor Dr. H.P. Wendel

Professor Dr. G. Bruchelt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Anatomie des Koronargefäßsystems	1
1.2	Die koronare Herzkrankheit	2
1.3	Epidemiologische Daten für Deutschland zur koronaren Herzkrankheit	4
1.4	Pathogenese der Arteriosklerose	5
1.5	Überblick über die Diagnostik der koronaren Herzkrankheit	8
1.6	Überblick über Therapieoptionen und Maßnahmen der Revaskularisation bei stabiler koronarer Herzkrankheit	10
1.7	Die aorto-koronare Bypasschirurgie.....	11
1.8	Gründe für ein Bypassversagen.....	15
1.8.1	Frühes oder akutes Bypassversagen (innerhalb des ersten postoperativen Monats).....	17
1.8.2	Verzögertes Bypassversagen (zwischen dem ersten Monat und dem ersten postoperativen Jahr).....	18
1.8.3	Spätes Bypassversagen (nach dem ersten postoperativen Jahr).....	19
1.9	Die Leukozyteneinwanderung über das Gefäßendothel.....	19
1.10	Die Rolle von Zytokinen in der Arteriosklerose	23
1.11	Das Adhäsionsmolekül P-Selectin (CD 62P)	24
1.11.1	Expression von P-Selectin (CD 62P) auf Thrombozyten	25
1.11.2	Expression von P-Selectin (CD 62P) auf Endothelzellen.....	26
1.12	Das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül-1 (PECAM-1).....	27
1.13	Wirkung und Funktion der RNA-Interferenz (kleine regulatorische Ribonukleinsäuren)	29
1.13.1	Mechanismus der RNA-Interferenz	30
1.13.2	Die Transfektion - das experimentelle oder therapeutische Einbringen von siRNA in die Zelle	33
1.13.3	Nebenwirkungen durch die Anwendung von siRNA	39
1.13.4	Modifizierung von siRNA-Sequenzen.....	40
1.13.5	Forschungsschwerpunkte für eine klinische Anwendung von siRNA	41
1.14	Fragestellungen und Ziele dieser Arbeit	44
2	Material und Methoden	46
2.1	Material.....	46
2.1.1	Geräte.....	46
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	47
2.1.3	Verwendete Reagenzien	48
2.1.3.1	Reagenzien zur Zellisolation und Zellanzucht.....	48
2.1.3.2	Reagenzien zur Zelltransfektion und siRNA-Sequenzen	49
2.1.3.3	Reagenzien zur durchflusszytometrischen Messung.....	50

2.1.3.4	Reagenzien zur Zellaktivierung	51
2.1.3.5	Reagenzien zur Durchführung der quantitativen real-time PCR.....	52
2.1.3.6	Reagenzien zur Toxizitätsmessung nach mehrfacher Transfektion	53
2.1.3.7	Reagenzien zur Durchführung von siRNA-Stabilitätstests.....	54
2.1.4	Gewebe und Blutkomponenten	55
2.1.4.1	Humane Endothelzellen	55
2.1.4.2	Serum und Vollblut	55
2.2	Methoden	56
2.2.1	Zellkultur	56
2.2.1.1	Isolierung von humanen Endothelzellen der Vena saphena magna.....	56
2.2.1.2	Passagierung der Zellkultur.....	58
2.2.2	Versuchsanordnung zur Darstellung des Oberflächenrezeptors P-Selectin (CD 62P) und Rezeptorhemmung mittels siRNA.....	60
2.2.2.1	Zellanzucht	60
2.2.2.2	Transfektion.....	61
2.2.2.3	Zellaktivierungen	62
2.2.2.4	Durchflusszytometrie	63
2.2.2.5	Der Nachweis der Genexpression auf mRNA-Ebene	64
2.2.3	Versuchsanordnung zur Hemmung des Oberflächenrezeptors PECAM-1 (CD 31) mittels siRNA	71
2.2.3.1	Zellanzucht	71
2.2.3.2	Transfektion.....	72
2.2.3.3	Zellaktivierungen	73
2.2.3.4	Durchflusszytometrie.....	73
2.2.3.5	Bestimmung der Zellviabilität mittels Vybrant® MTT Assay Kit	73
2.2.3.6	Der Nachweis der Genexpression auf mRNA-Ebene	74
2.2.4	Versuche zur Stabilität der verwendeten siRNA	75
2.2.4.1	Herstellung eines nativen 4,5%igen Agarosegels.....	76
2.2.4.2	Serumgewinnung.....	76
2.2.4.3	Gelbeladung	76
2.2.4.4	Versuchsreihen.....	77
2.2.5	Statistische Auswertung	78
3	Ergebnisse	79
3.1	Zellisolation	79
3.2	Zellkultivierung	81
3.3	Darstellung des Oberflächenrezeptors P-Selectin (CD 62P) und Rezeptorhemmung mittels spezifischer siRNA.....	82
3.3.1	Stimulation der kultivierten Endothelzellen.....	82
3.3.2	Versuch der Hemmung von P-Selectin (CD 62P) durch Einbringen von spezifischer siRNA in das Zytosol mittels kationischer Lipofektion.....	84

3.3.3	Nachweis der Genexpression zu P-Selectin (CD 62P) auf mRNA-Ebene.....	86
3.3.4	Gewebeaktivierung zum Nachweis der Genexpression von P-Selectin	88
3.4	Darstellung des Oberflächenrezeptors PECAM-1 (CD 31) und Rezeptorhemmung mittels spezifischer siRNA.....	91
3.4.1	Zellaktivierung.....	91
3.4.2	Hemmung von PECAM-1 (CD 31) mittels spezifischer siRNA.....	91
3.4.3	Nachweis der Genexpression zu PECAM-1 (CD31) auf mRNA-Ebene.....	93
3.4.4	Zellvitalität und Nebenwirkungen durch wiederholte Transfektionen mit siRNA. 96	
3.4.4.1	morphologische Veränderungen	96
3.4.4.2	Zellviabilität (MTT-Test).....	97
3.4.4.3	Wirkung der siRNA (PECAM-1) auf andere Genprodukte (off-target)	99
3.5	Versuche zur Stabilität von siRNA	101
3.5.1	Vergleich der nicht modifizierten siRNA gegen porcines VCAM-1 mit der modifizierten siRNA gegen humanes E-Selectin (CD 62E) bei Kontakt mit Serum über ein Zeitintervall von 0-6 Stunden.....	102
3.5.2	Vergleich der nicht stabilisierten siRNA gegen porcines VCAM-1 mit der stabilisierten siRNA gegen humanes E-Selectin bei Kontakt mit Serum verschiedener Verdünnungsstufen.....	104
3.5.3	Wirkung von Vollblut auf die modifizierte siRNA gegen humanes E-Selectin (CD 62E)	106
3.5.4	Untersuchung zur Stabilität der beiden siRNA-Sequenzen bei Zugabe von Endothelzellmedium mit 2% fetalem Kälberserum.....	107
3.5.5	Einfluss von Endothelzellmedium mit 2% fetalem Kälberserum auf siRNA mit einer Inkulationszeit bis 24 Stunden.....	108
4	Diskussion.....	110
4.1	Auswahl der Endothelzellen	113
4.2	Die siRNA-Methode.....	114
4.3	Die Transfektion	117
4.4	Das Adhäsionsmolekül P-Selectin (CD 62P)	120
4.5	Das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül PECAM-1 (CD 31).....	123
4.6	Methodenkritik	126
4.7	Zukunftsausblick.....	130
5	Zusammenfassung	134
6	Abbildungsverzeichnis	136
7	Abkürzungsverzeichnis	140
8	Literaturverzeichnis	142
9	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	157
10	Danksagung	158
11	Lebenslauf.....	159

1 Einleitung

1.1 Anatomie des Koronargefäßsystems

Die Versorgung des Herzmuskels mit Blut und Sauerstoff geschieht von außen nach innen über drei große Hauptgefäße, auch als Herzkranzgefäße bezeichnet, die am Herzen zusammen mit den rückführenden Venenstämmen weitgehend in Sulci (Furchen) eingebettet und von Fettgewebe umgeben verlaufen. (Erdmann 2011; Schiebler 2005)

Die linke Herzkranzarterie entspringt oberhalb des freien Randes der Aortenklappe aus dem Sinus aortae sinister (Ausweitung der Aorta, links) und teilt sich nach etwa 1-3 cm in den Ramus interventricularis anterior und den Ramus circumflexus.

Der Ramus interventricularis anterior verläuft in der Grube zwischen den beiden Herzkammern bis zur Herzspitze und um diese herum. Im Verlauf gibt er mehrere Diagonal- und Septaläste ab. (Schiebler 2005)

Der Ramus circumflexus verläuft nach links in der Grube zwischen Vorhof und Herzkammer und gibt im Verlauf mehrere Marginaläste ab.

Das Versorgungsgebiet der linken Herzkranzarterie umfasst den linken Vorhof, die Wand des linken Ventrikels, einschließlich eines Großteils des Septums und eines kleinen Anteils der Vorderwand der rechten Kammer. (Schiebler 2005)

Die rechte Herzkranzarterie entspringt im Sinus aortae dexter (Ausweitung der Aorta, rechts) und verläuft zunächst in der Grube rechts zwischen Vorhof und Herzkammer. Bevor er als Ramus interventricularis posterior zwischen den Herzkammern bis zur Herzspitze zieht, gibt er mehrere Äste zur Versorgung der rechten Herzkammer ab. (Erdmann 2011)

Das Versorgungsgebiet der rechten Koronararterie umfasst den rechten Vorhof, die rechte Herzkammer, den hinteren Abschnitt des Septums, sowie Sinus- und Atrioventrikular-Knoten als Schrittmacherzentren. (Schiebler 2005)

Man unterscheidet einen Normal-, Rechts- und Linksversorgungstyp.

Der Rechtstyp zeigt ein Überwiegen der rechten Koronararterie und der Linkstyp entsprechend ein Überwiegen der linken Koronararterie.

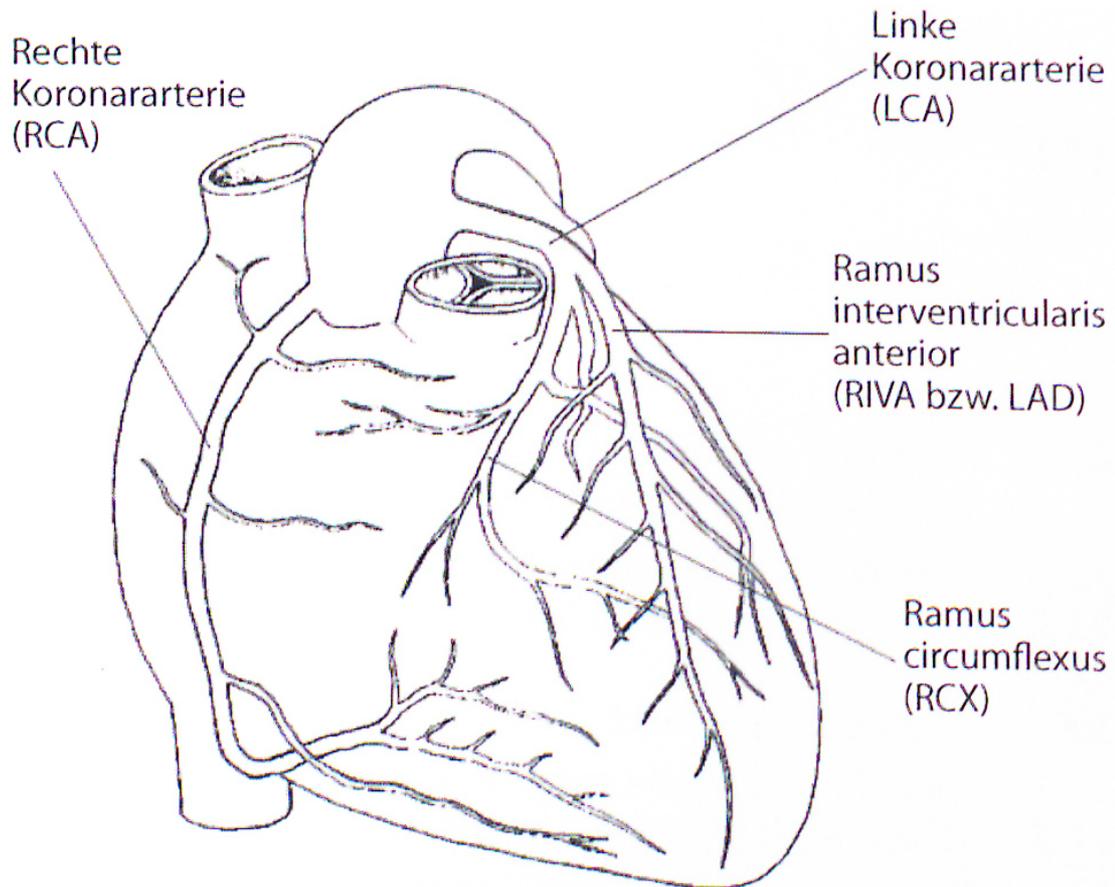


Abbildung 1-1: Anatomie des Koronargefäßsystems, Quelle: (Erdmann 2011)

1.2 Die koronare Herzkrankheit

Die Ausbildung von Arteriosklerose in den Herzkranzarterien wird als koronare Herzkrankheit bezeichnet. Bedingt durch eine Einengungen des Gefäßlumens entsteht eine Limitierung des Blutflusses, die eine Sauerstoffunterversorgung des Herzmuskelgewebes zur Folge hat. (Herold 2014)

Die dabei hervorgerufene Myokardischämie muss nicht zwangsläufig symptomatisch sein.

Als Koronarinsuffizienz wird das Missverhältnis zwischen myokardialem Sauerstoffangebot und -bedarf angesehen. (Herold 2014)

Während eine latente koronare Herzkrankheit eher mit einer stummen Ischämie einhergeht, ist das Hauptsymptom der symptomatischen koronaren Herzkrankheit die Angina pectoris, ein linksthorakaler Schmerz, der in Form eines

retrostermalen Druckgefühls mit Ausstrahlung in Arme, Kiefer und Rücken in Erscheinung tritt.

Die stabile Form der Angina pectoris tritt ab einem konstanten körperlichen oder psychischen Belastungszustand in Erscheinung und als instabile Form der Angina pectoris wird jede neue oder in ihrer Häufigkeit und Intensität zunehmende oder in Ruhe auftretende Schmerzsymptomatik bezeichnet. (Erdmann 2011)

Weitere Manifestationen der koronaren Herzkrankheit können Zeichen der Herzinsuffizienz, Dyspnoe oder Herzrhythmusstörungen sein, ebenso wie die ischämische Myokardnekrose in Form eines akuten Myokardinfarktes. (Erdmann 2011)

Zu etwa 20% ist der plötzliche Herztod die Erstmanifestation der koronaren Herzkrankheit. (Herold 2014; Renz-Polster und Aries 2004)

Das akute Koronarsyndrom fasst die instabile Angina pectoris und den akuten Myokardinfarkt zusammen, da im Anfall zunächst nicht zwischen beiden Formen unterschieden werden kann. (Renz-Polster und Aries 2004)

Ausgehend von einem Myokardinfarkt kann diagnostisch anhand einer EKG-Auswertung zwischen einem nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt (Non-ST-segment-elevation myocardial infarction, NSTEMI) mit Troponinanstieg und einem ST-Streckenhebungsinfarkt (ST-segment-elevation myocardial infarction, STEMI) mit Troponinanstieg unterschieden werden.

Ein transmurales Geschehen zeigt sich dabei als ST-Streckenhebung in der EKG-Kontrolle. (Herold 2014)

Mit der Diagnose ST-Streckenhebungsinfarkt wird der Patient umgehend einer revaskularisierenden Behandlung zugeführt, im Falle eines Nicht-ST-Streckenhebungsinfarktes kann diese nach einer Risikoabwägung ebenfalls sofort oder innerhalb eines Zeitfensters bis 72 Stunden nach Beginn einer konservativen Therapie erfolgen.

Als Goldstandard der Revaskularisierung gilt die perkutane Koronarintervention (PCI) mit Ballon-Dilatation und Stent-Implantation, eine Thrombolyse bleibt Fällen vorbehalten, die nicht innerhalb von 2 Stunden einer Herzkathetereinheit zugeführt werden können.

Die operative Myokardrevaskularisation hat im akuten Geschehen eines Myokardinfarktes als Alternativmaßnahme eine untergeordnete Bedeutung. (Erdmann 2011)

Die Klassifikation der koronaren Herzkrankheit der Canadian Cardiovascular Society wird entsprechend der Einteilung zur Herzinsuffizienz der New York Heart Association (NYHA) in 4 Stadien vorgenommen.

- I. Normale körperliche Belastung führt nicht zu Angina pectoris, erst die stärkere, schnellere oder länger anhaltende Belastung.
- II. Leichte Einschränkung der körperlichen Belastbarkeit, typische Beschwerden treten beim schnellem Gehen oder Treppensteigen, Gehen bergauf, Gehen oder Treppensteigen nach Mahlzeiten, bei Kälte oder bei emotionalem Stress sowie kurz nach dem Aufstehen auf. Angina-pectoris-Symptome zeigen sich beim Gehen von mittleren Strecken (>100m) auf ebener Erde sowie beim Treppensteigen nach mehr als einer Etage bei normaler Geschwindigkeit und unter normalen Bedingungen.
- III. Deutliche Einschränkung der körperlichen Aktivität, Angina-pectoris-Beschwerden treten beim Gehen von kurzen Strecken (<100m) auf ebener Erde, sowie beim Treppensteigen unter normalen Bedingungen nach einer Etage auf.
- IV. Unfähigkeit, irgendwelche körperliche Belastungen ohne Beschwerden auszuführen, Angina pectoris kann bereits in Ruhe vorhanden sein. (Goldman et al. 1981; Erdmann 2011)

1.3 Epidemiologische Daten für Deutschland zur koronaren Herzkrankheit

Für das Jahr 2011 liegt die stationäre Morbiditätsziffer für ischämische Herzkrankheiten in Deutschland bei 806,5 auf 100.000 Einwohner (insgesamt 660.047 stationäre Fälle). Darin enthalten ist die stationäre Morbiditätsziffer für den akuten Myokardinfarkt mit 266 auf 100.000 Einwohner. (insgesamt 217.681 stationäre Fälle). (Deutsche Herzstiftung e.V. 2014) Ein deutlicher Unterschied

besteht zwischen den Geschlechtern. Für das Jahr 2011 beträgt die stationäre Morbiditätsziffer für die ischämische Herzkrankheit für Männer 1.097 und für Frauen 526 pro 100.000 Einwohner. Ausgehend von einem Höchstwert im Jahr 2000 hat sich ein Rückgang dieser Morbiditätsziffer jedoch bis 2011 für beide Geschlechter weiter fortgesetzt.

Bei Betrachtung der Altersgruppen liegt die höchste Morbiditätsziffer sowohl für Männer, wie auch für Frauen in der Altersgruppe der 75 - 85-Jährigen.

Die Sterbeziffer für ischämische Herzkrankheiten erreichte im Jahre 1993 in Deutschland mit 266,8 pro 100.000 Einwohner einen Höchstwert. Ein stetiger Rückgang dieser Sterbeziffer konnte seither bis auf einen erneuten geringen Anstieg im Jahr 2009 verzeichnet werden. Für das Jahr 2011 wurde der bisher niedrigste Wert mit 155,3 pro 100.000 Einwohner ermittelt. (Deutsche Herzstiftung e.V. 2014)

Nach Hochrechnungen wurden in Deutschland in Jahr 2011 etwa 870.282 Linksherzkatheter-Untersuchungen und darunter 328.654 perkutane Koronarinterventionen (PCI) durchgeführt. (Deutsche Herzstiftung e.V. 2014)

Im selben Jahr wurden 55.299 aorto-koronare Bypass-Operationen durchgeführt, davon 48.743 mit Herz-Lungen-Maschine und 6.556 ohne Herz-Lungen-Maschine. Die Zahl der isolierten aorto-koronaren Bypass-Operationen betrug 41.976, alle übrigen erfolgten in Kombination mit einem weiteren herzchirurgischen Eingriff. (Deutsche Herzstiftung e.V. 2014)

1.4 Pathogenese der Arteriosklerose

Über 200 Risikofaktoren konnten bisher benannt werden, die die Entstehung der Arteriosklerose fördern. Zahlreiche Langzeitstudien dienten im Fall der koronaren Herzkrankheit der Erkennung und Klassifizierung von Risikofaktoren. Beispielsweise konnte die epidemiologische INTERHEART-Studie (Yusuf et al. 2004) die Wirkung von mehreren potentiell modifizierbaren Risikofaktoren für Herzinfarkte bestätigen.

Zu den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren gehören:

- die arterielle Hypertonie

- die Dyslipidämie
- der Diabetes mellitus
- der Nikotinabusus
- das Übergewicht und
- die genetische Disposition

(Erdmann 2011)

Während in den 70er Jahren als Ursache für die Entstehung der Arteriosklerose noch der Verlust von Gefäßendothel beschrieben und in diesem Zusammenhang diese als Antwort auf die Endothelverletzungen verstanden wurde, wandelte sich zwischenzeitlich dieses Bild. (Williams und Tabas 1995)

Auch wenn arteriosklerotische Gefäßveränderungen speziell an Gefäßbifurkationen oder Gefäßbiegungen auftreten und damit Scherkräfte eine Rolle zu spielen scheinen, sieht man mittlerweile die endotheliale Dysfunktion als Beginn der Arteriosklerose an. (Vanhoutte 2009) Insbesondere die endothelvermittelte Vasodilatation durch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) kann nicht mehr erfolgen oder Sauerstoffradikale inaktivieren das über verschiedene Stickstoffmonoxid-Synthasen gebildete Stickstoffmonoxid (NO). (Siegenthaler 2006) NO dient dabei nicht nur als Vasodilatator sondern hat durch die Hemmung der Adhäsion und Invasion von inflammatorischen Zellen, wie auch durch die Hemmung der Aggregation von Thrombozyten und Unterdrückung der Proliferation von glatten Muskelzellen eine gefäßprotektive Wirkung. (Siegenthaler 2006)

Oben angegebene Risikofaktoren führen insgesamt zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels für Lipoproteine. (Erdmann 2011) Lipoproteine geringer Dichte (*low density lipoprotein*, LDL), die Triglyceride und Cholesterin enthalten und deren Hauptproteinbestandteil Apolipoprotein B ist, werden subendothelial vermehrt eingelagert, was wiederum zu einer Aktivierung des darüber liegenden Endothels führt.

Die hierdurch einwandernden Monozyten wandeln sich in Makrophagen um, phagozytieren die subendothelialen Lipoproteine und halten durch Abgabe von Botenstoffen einen chronischen Entzündungszustand aufrecht, was im weiteren

Verlauf zu einer Proliferation und Einwanderung von glatten Muskelzellen führt. Diese glatten Muskelzellen bilden um eine zunehmende Gefäßläsion eine fibröse Kappe. (Moore und Tabas 2011) Makrophagen wiederum wandeln sich durch die Lipidaufnahme in Schaumzellen um und legen damit die Grundlage für die Entstehung von Plaque.

Aus einer zunächst stabilen arteriosklerotischen Plaque wird durch Freisetzung von Matrix-Metalloproteinasen durch Makrophagen die stabilisierend wirkende fibröse Kappe stetig ausgedünnt, so dass mit zunehmender Dickenzunahme das Plaque bricht und die einsetzende Thrombozytenkoagulation das Gefäß vollständig verschließen kann. (Newby 2005; Zaman et al. 2000)

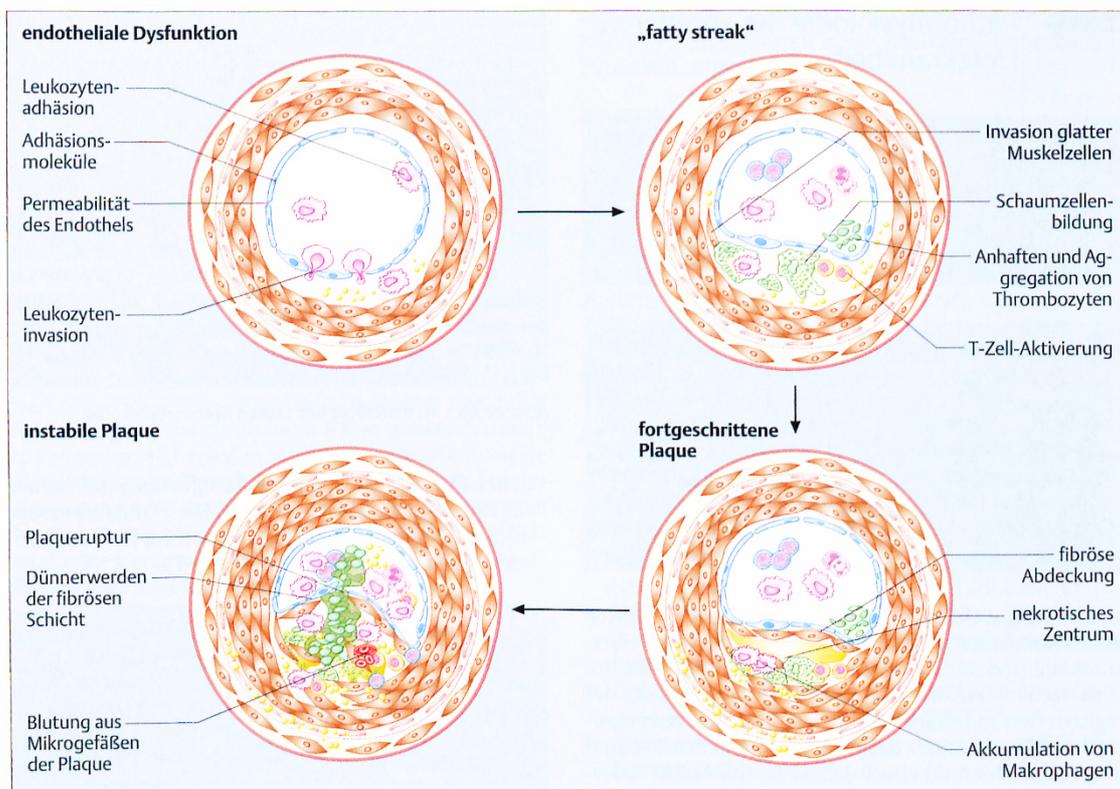


Abbildung 1-2: Stadien der Atherosklerose (Quelle: Erdmann 2011)

1.5 Überblick über die Diagnostik der koronaren Herzkrankheit

Bei Verdacht auf ein akutes Koronarsyndrom setzt sich die Notfalldiagnostik aus einem Ruhe-Elektrokardiogramm (EKG) und der Bestimmung von Markern der akuten Zellnekrose aus einer Blutprobe zusammen.

Der ST-Streckenhebungsinfarkt (STEMI) imponiert in der Frühphase mit einer überhöhten T-Welle. Bei Fortschreiten der Ischämie zeigt sich eine monophasische ST-Streckenhebung (STEMI) über mindestens 2 zusammenhängenden Extremitätenableitungen oder 2 benachbarten Brustwandableitungen, die das Ischämieareal repräsentieren. In den gegenüberliegenden Ableitungsarealen zeigt sich eine ST-Streckensenkung.

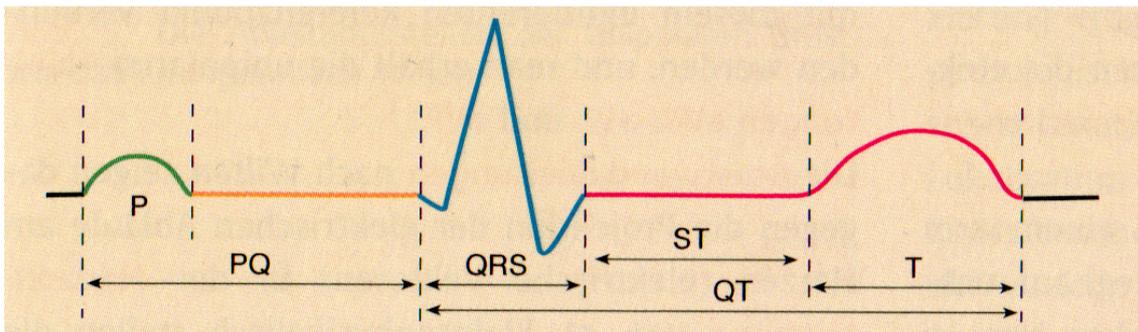


Abbildung 1-3: Bezeichnung der Zacken des Oberflächen-EKG, Quelle: (Trappe und Schuster 2013)

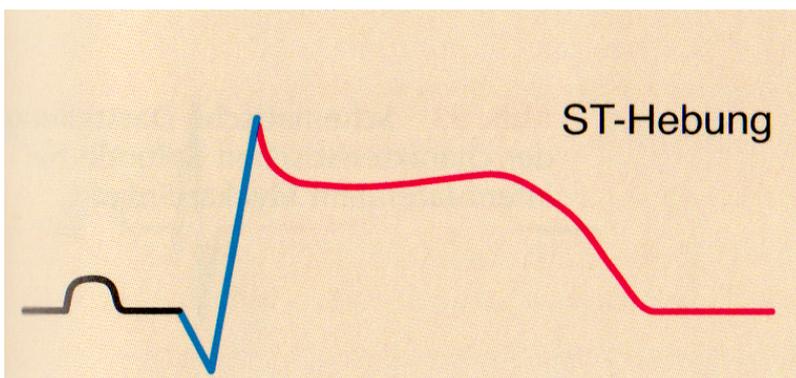


Abbildung 1-4: Elektrokardiographischer Befund im akuten Infarktstadium: Hebung der ST-Strecke, Quelle: (Trappe und Schuster 2013)

Ebenso zählt ein neu aufgetretener Linkschenkelblock im akuten Infarktgeschehen zur Gruppe des ST-Streckenhebungsinfarktes.

Ein Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt (NSTEMI) zeigt sich durch eine spitz negative T-Welle, der QRS-Komplex ist hingegen unverändert. EKG-

Veränderungen sind jedoch immer gemeinsam mit Veränderungen von biochemischen Markern zu werten.

Eine Erhöhung der Marker der akuten Zellnekrose für Myokardgewebe bestätigt eine NSTEMI oder STEMI. Troponin T und Troponin I, wie auch die Kreatinkinase, Isoenzym MB, sind hierbei ausschlaggebend.

Goldstandard der Diagnosebeurteilung der koronaren Herzkrankheit ist die Angiographie, die, erweitert durch die perkutane Koronarintervention (PCI) bei dringendem Verdacht auf einen Myokardinfarkt, den entscheidenden Baustein der Reperfusionstherapie darstellt. (Erdmann 2011) Eine fibrinolytische Behandlung als Alternative wird aufgrund des erhöhten Blutungsrisikos und der vermehrten Restenoserate vornehmlich bei fehlender Verfügbarkeit einer perkutanen Koronarintervention angewendet. Im akuten Infarktgeschehen gehören zur Erstversorgung in jedem Fall die Sauerstoffgabe, die sublinguale Nitroglycerin-Gabe zur Gefäßerweiterung und die duale Plättchenhemmung mit Acetylsalicylsäure und Heparin. Die weitere Behandlung erfolgt unter stationären, gegebenenfalls intensivmedizinischen Bedingungen. (Herold 2014; Erdmann 2011)

Für Formen der stabilen Angina pectoris stehen zunächst verschiedene diagnostische Möglichkeiten offen. Neben dem Ruhe-, Belastungs- und Langzeit-EKG, kann mit Hilfe der Myokardszintigraphie die Myokardperfusion in Ruhe und bei Belastung mittels eines Radiotracers dargestellt werden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit einer computertomographischen und magnetresonanztomographischen Darstellung der Koronararterien, wobei beide Verfahren lediglich eine genaue Darstellung der proximalen Koronarabschnitte zulassen. (Erdmann 2011)

Die Dringlichkeit einer selektiven Koronarangiographie richtet sich nach der klinischen Manifestation der koronaren Herzkrankheit (KHK) und den Ergebnissen der Voruntersuchungen.

1.6 Überblick über Therapieoptionen und Maßnahmen der Revaskularisation bei stabiler koronarer Herzkrankheit

Neben einer Lebensstiländerung mit der Reduktion der kardiovaskulären Risikofaktoren besteht von ärztlicher Seite der Therapieschwerpunkt in der Verordnung oder Optimierung einer kardio- und gefäßprotektiven Dauertherapie. Während durch die Anwendung von HMG-CoA-Reduktase-Hemmern (Statine) eine Senkung des LDL-Cholesterins erreicht wird, führt die Einnahme von β -Rezeptorenblockern zu einer Reduktion von Blutdruck, Herzfrequenz und Kontraktilität, was insgesamt mit einer Reduktion des Sauerstoffbedarfs und verbesserten Herzfunktion einhergeht. Ein ergänzender Baustein ist die Thrombozytenaggregationshemmung. Eine weitere Blutdrucksenkung kann durch die zusätzliche Gabe eines Angiotensinkonversionsenzymhemmers (ACE-Hemmer) oder AT_1 -Rezeptorantagonisten (Sartan) erreicht werden. Zur Vorlastsenkung stehen Nitrate zur Verfügung, während Kalziumantagonisten die myokardiale Kontraktilität und die Nachlast senken. (Herold 2014; Erdmann 2011)

Im Fall der stabilen Angina pectoris liegt die Indikation für eine invasive Revaskularisationsmaßnahme vor, wenn unter optimaler medikamentöser Therapie weiterhin eine belastungsabhängige typische Symptomatik besteht und/ oder eine Myokardischämie nachgewiesen werden kann. Während für Patienten mit einer koronaren Ein- bis Zwei-Gefäßerkrankung und umschriebenen Stenosen die perkutane Koronarintervention (PCI) mit Stentimplantation die geeignete Behandlungsmaßnahme darstellt, wird für Hauptstammstenosen der linken Koronararterie über 50%, komplexe Koronarstenosen im Rahmen einer koronaren Zwei- bis Drei-Gefäßerkrankung (Stenosegrad über 70%) oder koronare Zwei- und Drei-Gefäßerkrankungen mit Beteiligung des proximalen Ramus interventricularis anterior die koronare Bypassoperation empfohlen. (Herold 2014; Erdmann 2011; Haverich und Ziemer 2010)

Der Vergleich zwischen der perkutanen Koronarintervention und der aorto-koronaren Bypass-Operation zur Behandlung der koronaren Drei-Gefäßerkrankung anhand mehrerer Meta-Analysen zeigt, dass bezogen auf das Ein- und Zwei-Jahres-Ergebnis nach erfolgreichem Ersteingriff ein Überlebensvorteil durch eine geringere Rate an erforderlichen erneuten Revaskularisationsmaßnahmen nach aorto-koronaren Bypass-Operationen besteht. (Wijns et al. 2010)

Zu berücksichtigen ist allerdings das zu akzeptierende individuelle Operationsrisiko durch Begleiterkrankungen.

Für die perkutane Koronarintervention stehen unbeschichtete Stents (bare metal stent) und medikamentenbeschichtete Stents (drug eluting stents) zur Verfügung. Gängige medikamentenbeschichtete Stents sind mit antiproliferativen Wirkstoffen, wie Paclitaxel oder Sirolimus, versehen. Durch deren Einsatz konnte die Restenoserate im Vergleich zu unbeschichteten Stents erheblich gesenkt werden, jedoch besteht durch die verzögerte Reepithelialisierung ein erhöhtes Risiko für späte Stent-Thrombosen. (Erdmann 2011)

1.7 Die aorto-koronare Bypasschirurgie

Ziel der Bypasschirurgie ist die komplette Revaskularisierung, die distale Anastomose sollte dabei möglichst an einem arteriosklerosefreien Gefäßabschnitt angelegt werden und einen bidirektionalen Blutfluss in den nachfolgenden Gefäßabschnitt erlauben. (Haverich und Ziemer 2010)

Das am häufigsten angewandte Konzept ist die Anlage eines Bypasses der linken inneren Brustarterie (*Arteria thoracica interna sinistra* oder *left internal mammary artery*) auf den Ramus interventricularis anterior und autologe Venenbypässe der Vena saphena magna auf die anderen Koronargefäße. (Schmid 2013; Haverich und Ziemer 2010)

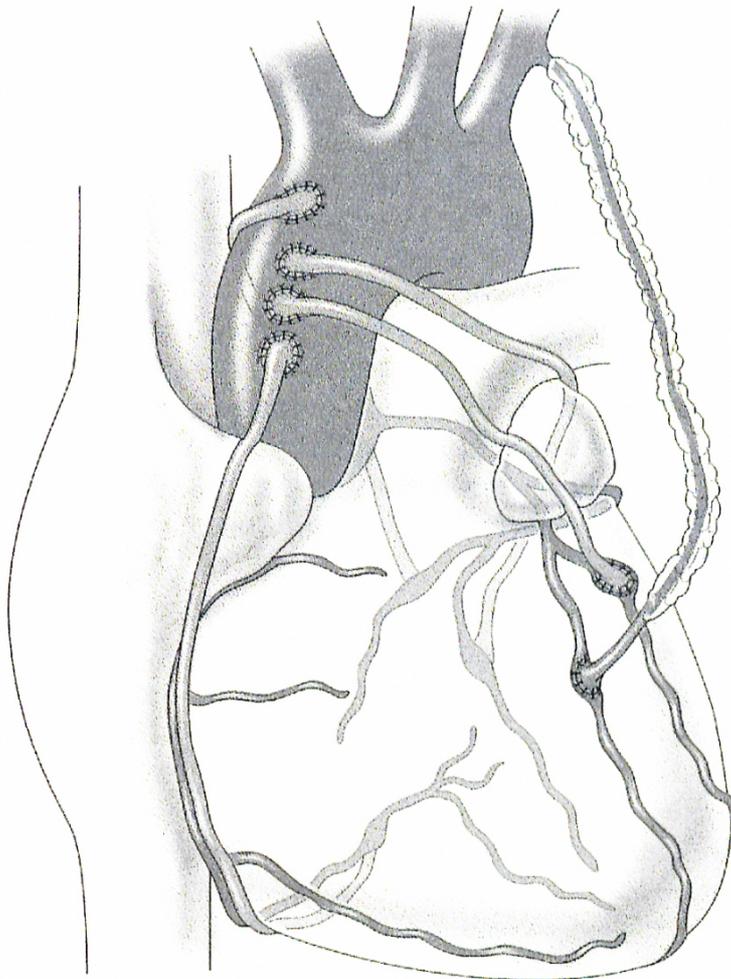


Abbildung 1-5: Standardkonzept Koronarchirurgie: linke innere Brustarterie auf Ramus interventricuaris anterior und Venenbypässe auf weitere Koronararterien Quelle: (Haverich und Ziemer 2010)

Die erste koronare Bypass-Operation unter Verwendung von aufgenähten Venenbypässen wurde 1964 durch Garrett et al. in Houston vorgenommen. Die Ergebnisse der ersten Bypass-Operationen mit einer Anastomose zwischen der inneren Brustwandarterie (Arteria thoracica interna) und dem Ramus interventricularis anterior am schlagenden Herzen wurden 1967 durch Kolesov in Leningrad (St. Petersburg) vorgestellt. Große Pionierleistung in der Etablierung der aorto-koronaren Bypass-Operation wird jedoch Favaloro (1969) zugesprochen. (Schmid 2013; Haverich und Ziemer 2010)

Nach wie vor werden die meisten aorto-koronaren Bypass-Operationen unter Verwendung der Herzlungen-Maschine am kardioplegisch stillgelegten Herzen

bei moderater Hypothermie (30-33°C) durchgeführt. Der extrakorporale Kreislauf über die Herz-Lungen-Maschine erfolgt dabei vom rechten Vorhof zur Aorta ascendens. (Haverich und Ziemer 2010)

Zusätzlich besteht die Möglichkeit der Bypass-Operation am schlagenden Herzen. Nach Durchführung der konventionellen Sternotomie lässt sich über die OPCAB-Technik (*off pump coronary artery bypass*, Koronararterien-Bypass-Operation ohne Herz-Lungen-Maschine) prinzipiell eine komplette Revaskularisation erzielen. Zur Kreislaufstabilität ist eine abgestimmte Volumen- und Pharmakotherapie erforderlich, gegebenenfalls ergänzt durch eine Änderung der Positionierung des Patienten.

Über Saug- und Druckstabilisatoren werden das Herz in Position und der entsprechende Abschnitt für die Anastomose ruhig gehalten. Zur besseren Darstellung der Schnittinzision am Koronargefäß für die Anlage der Naht kann über eine Düse angefeuchtete Luft aufgeblasen werden, wodurch austretendes Blut verdrängt wird. (Schmid 2013; Haverich und Ziemer 2010)

Erfolgt statt der Sternotomie eine laterale Thorakotomie im Bereich des fünften oder sechsten Interkostalraumes als minimal-invasiver Zugang, so kann über das MIDCAB-Verfahren (*Minimally invasive direct coronary artery bypass*, minimal-invasive direkte Koronararterien-Bypass-Operation) eine Revaskularisation des Ramus interventricularis anterior über einen Bypass der linken inneren Thoraxarterie erreicht werden. (Schmid 2013)

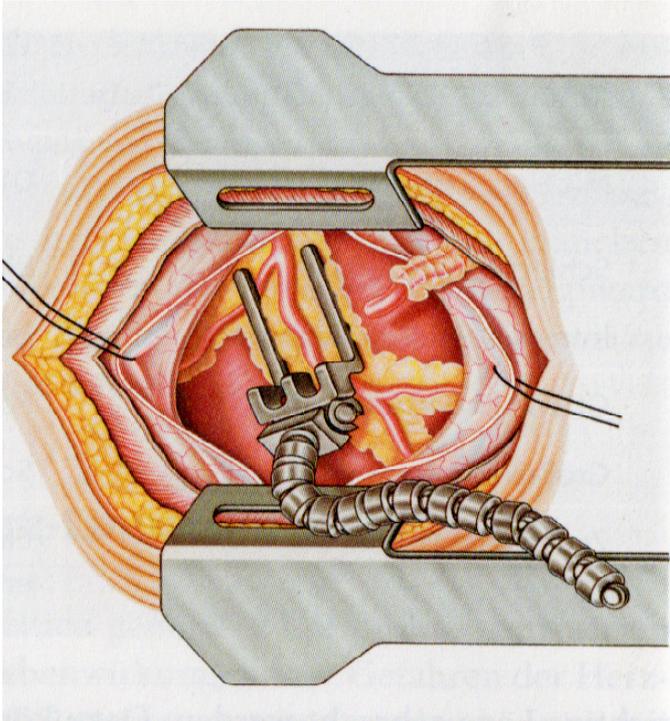


Abbildung 1-6: Minimally invasive direct coronary artery bypass (MIDCAB): Stabilisator stellt Koronargefäß im Anastomosenbereich ruhig. Quelle: (Schmid 2013)

Als Alternative zu den venösen Bypässen besteht unter zusätzlicher Verwendung der rechten inneren Thoraxarterie (Arteria thoracica interna dextra) die Möglichkeit einer kompletten arteriellen Revaskularisation durch proximale Anastomosen. Lediglich der Ramus interventricularis posterior kann häufig nicht erreicht werden. Zunehmend werden jedoch auch Abschnitte der Arteria radialis als aorto-koronare Bypässe verwendet. (Schmid 2013)

Die Entnahme der Vena saphena magna erfolgt vom Knöchel her nach Einführung und Fixierung einer Knopfkanüle. Hierüber kann nach dem Anlegen von Ligaturen die Dichtheit des Gefäßes mittels aufgesteckter Spritze geprüft werden. Am Bein erfolgt entweder eine durchgehende oder mehrfach unterbrochene Schnittführung (Brückentechnik). Zudem kann die Vena saphena magna endoskopisch präpariert werden. (Haverich und Ziemer 2010)

1.8 Gründe für ein Bypassversagen

Im Vergleich zeigen nach Ablauf von 10 Jahren Bypässe unter Verwendung der inneren Thoraxarterie zur Versorgung der Vorderwand des Herzens eine höhere Offenheitsrate als venöse Bypässe. Es besteht damit ein Überlebensvorteil. Nach den Ergebnissen von Loop et al. konnte eine Überlebensrate nach 10 Jahren für Patienten mit einer Drei-Gefäßerkrankung von 82,6% bei Verwendung der inneren Thoraxarterie als Bypass und von 71% bei Verwendung eines venösen Bypasses zur Versorgung des Ramus interventricularis anterior festgehalten werden. (Loop et al. 1986) Innerhalb des ersten Jahres nach einer aorto-koronaren Bypass-Operation versagen 10-20% der venösen Bypässe, ab dem ersten bis zum fünften Jahr sind es weitere 5-10% und vom sechsten bis zehnten Jahr verschließen abermals 20-25%, so dass 10 Jahre nach einem koronaren Eingriff noch 50% der venösen Bypässe offen sind. (Sabik 2011)

Ein Versagen des venösen Bypasses nach erfolgter Koronarchirurgie lässt sich in drei zeitliche Gruppen einteilen:

- eine frühe Bypass thrombose innerhalb der ersten 30 postoperativen Tage
- ein verzögertes Bypassversagen im Zeitraum vom ersten Monat bis zum fünften Jahr nach erfolgter Operation
- ein später Bypassverschluss nach mehr als 5 Jahren (Kim et al. 2013; Harskamp et al. 2013)

Auf der Suche nach den Ursachen für das frühe und verzögerte Bypassversagen wurde zunächst ein Zusammenhang mit einer systemischen Entzündungsreaktion nach dem Einsatz der Herz-Lungen-Maschine beschrieben. Blutbestandteile reagieren mit den Fremdmaterialien der extrakorporalen Zirkulation, es folgt eine Aktivierung des alternativen Weges des Komplementsystems. Die daraus entstehenden Anaphylatoxine C4 und C2 aktivieren Leukozyten und führen zur Freisetzung von Zytokinen. Unter diesen von Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen freigesetzten pro-inflammatorischen Zytokinen spielen der Tumornekrosefaktor α (TNF- α), als

auch die Interleukine 1 β (IL 1 β), 6 (IL 6) und 8 (IL 8) eine entscheidende Rolle. Als Gegenspieler und damit anti-inflammatorisch fungiert das von Monozyten sezernierte Interleukin 10 (IL 10). (Paparella et al. 2002; Asimakopoulos 2001; Asimakopoulos und Taylor 1998) Die normalerweise vom Gefäßendothel übernommene anti-inflammatorische Funktion fehlt im extrakorporalen Kreislauf. (Paparella et al. 2002) Pro-inflammatorische Zytokine wiederum führen zu einer vermehrten Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) über die induzierbare Form der Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) von Monozyten und der Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) von Endothelzellen, was zur unkontrollierten Gefäßerweiterung und erhöhten Gefäßpermeabilität führt. (Paparella et al. 2002; Wan et al. 1997; Butler et al. 1993)

Aktivierete Leukozyten setzen große Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies, wie Superoxid, frei, die Lipidmembranen beschädigen und damit die Gefäßpermeabilität erhöhen. (Paparella et al. 2002; Wan et al. 1997)

Ein intrazelluläres Schlüsselprotein scheint der Transkriptionsfaktor NF- κ B (*Nuclear factor κ B*) zu sein. Der zunächst intrazellulär inaktiv gebundene Faktor wird über pro-inflammatorische Zytokine freigesetzt, transloziert in den Kern und bindet an die DNA. Auf diese Weise werden neben pro-inflammatorischen Faktoren zusätzliche Adhäsionsmoleküle an der Zelloberfläche der Endothelzellen exprimiert, die für die Interaktion mit Blutbestandteilen und Extravasation von Leukozyten von Bedeutung sind. (Paparella et al. 2002; Jordan et al. 1999; Chester et al. 1998)

Weitere pro-inflammatorische Stimuli ergeben sich durch die myokardiale Hypoxie und Ischämie. Durch die Reperfusion von hypoxischem Gewebe werden aktivierte Leukozyten, pro-inflammatorische Zytokine und Sauerstoffradikale ausgeschwemmt, die ihrerseits Gewebe schädigen, die Gefäßpermeabilität erhöhen und zur Aktivierung von Endothelzellen und damit Expression von Adhäsionsmolekülen beitragen. (Paparella et al. 2002; Jordan et al. 1999) Die Endothelzellen der entnommenen Venenstücke ihrerseits werden im Zeitfenster zwischen Entnahme und der Reperfusion nach der Einnäherung am Koronargefäß direkt durch die unvermeidliche Hypoxie zur Expression von Adhäsionsmolekülen aktiviert.

Ohne den Einsatz der Herz-Lungen-Maschine entfällt zumindest die beschriebene systemische Entzündungsantwort und das Ischämie-Reperfusion-Phänomen kann zumindest theoretisch erheblich reduziert werden. Lediglich das operative Trauma scheint unabhängig vom Einsatz der Herz-Lungen-Maschine ähnlich ausgeprägt zu sein. (Asimakopoulos 2001)

Bezogen auf die postoperative Offenheitsrate der venösen Bypässe zeigt die aorto-koronare Bypass-Operation am schlagenden Herzen keinen Vorteil gegenüber der am kardioplegisch stillgelegten Herz mit Einsatz der Herz-Lungen-Maschine für den Zeitraum bis zum Ende des ersten postoperativen Jahres. (Shroyer et al. 2009; Puskas et al. 2004; Widimsky et al. 2004)

1.8.1 Frühes oder akutes Bypassversagen (innerhalb des ersten postoperativen Monats)

Neuere Überlegungen hingegen gehen davon aus, dass ein frühes Bypassversagen unmittelbar mit den Bedingungen des operativen Eingriffs zusammenhängen. (Osgood et al. 2013) In der Regel ist dies auf eine akute Thrombose zurückzuführen. Während der Venenentnahme werden die äußere Gefäßschicht, die Adventitia, verletzt und damit Kapillaren zur Gefäßwandversorgung (Vasa vasora) durchtrennt. (Kim et al. 2013) Die daraus folgende Unterversorgung führt beispielsweise dazu, dass die protektive Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin (PGI₂) reduziert wird, wodurch die gefäßdilatierende Wirkung und der hemmende Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung, -adhäsion und -aggregation verloren gehen. (Kim et al. 2013; Shukla und Jeremy 2012) Zusätzlich werden vermehrt Sauerstoffradikale freigesetzt. Des Weiteren wird durch wiederholte Prüfungen des Gefäßes auf Dichtheit mittels aufgesteckter Spritze das Gefäßendothel beschädigt. Auf den eingenähten Venenbypass wirkt fortan der arterielle Blutdruck (~100mmHg) ein. Das Gefäß wird daher rasch dilatiert und ist dem pulsierenden arteriellen Blutstrom ausgesetzt, was zusätzlich mit den noch bestehenden Venenklappenanlagen zu Blutstromturbulenzen und wechselnd starken Scherkräften führt, wodurch ebenfalls Endothelschäden entstehen. Über

Endotheldefekte lagern sich aktivierte Thrombozyten an und aggregieren. Endothelzelllücken können innerhalb von 1-2 Wochen durch Proliferation und Migration wieder verschlossen werden. (Harskamp et al. 2013)

Die druckbedingte Gefäßdilatation bewirkt über glatte Muskelzellen eine Freisetzung von Wachstumsfaktoren, wie dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor β (*fibroblast growth factor β* , β FGF) und Endothelin, die zu einer weiteren Proliferation und Einwanderung der glatten Muskelzellen in die Gefäßintima führen. Diesen Prozess unterstützen die von aktivierten Thrombozyten freigegebenen bioaktiven Substanzen, wie *Platelet-derived growth factor* (PDGF), *Transforming growth factor β* (TGF β), Interleukin-1 β und -6 (IL-1 β + IL-6), sowie Thrombin. Es bildet sich dadurch eine gefäßeinengende Neointima. (Harskamp et al. 2013; Kim et al. 2013; Shukla und Jeremy 2012; Safian 2002) Bereits die geänderten Blutdruckverhältnisse führen zu einer ausgeprägten Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen des venösen Bypasses. (Nolte et al. 2011)

Den gleichen Effekt haben pro-inflammatorische Zytokine, die im Rahmen einer postoperativen Entzündungsreaktion ebenfalls Endothelzellen aktivieren, zur Ausbildung von Adhäsionsmolekülen für Leukozyten führen und zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität beitragen. (Kim et al. 2013; Crook et al. 2000) Die in der Folge in die Gefäßwand eingewanderten Monozyten stellen den Beginn einer arteriosklerotischen Gefäßveränderung dar.

1.8.2 Verzögertes Bypassversagen (zwischen dem ersten Monat und dem ersten postoperativen Jahr)

Die Bildung einer Neointima mit Kollageneinlagerung zeigt sich im gesamten Bypassverlauf, jedoch besonders ausgeprägt im Bereich von Anastomosen. Tatsächlich führt eine zunehmende Verdickung der Neointima selten zu einem kompletten Bypassverschluss.

An einer distalen End-zu-Seit-Anastomose besteht durch einen turbulenten Blutfluss das Risiko einer Taschenbildung, in denen der Blutfluss zum Erliegen kommen kann, was an dieser Stelle durch eine Thrombosebildung

gegebenenfalls zu einem fortschreitenden Gefäßverschluss führt. (Harskamp et al. 2013)

1.8.3 Spätes Bypassversagen (nach dem ersten postoperativen Jahr)

Verantwortlich für ein spätes Bypassversagen ist die Bildung von arteriosklerotischen Plaques, die nach Ruptur eine Thrombose verursachen.

Risikofaktoren für die Entwicklung dieser Plaques in venösen Bypässen sind die gleichen wie für deren Entstehung in nativen Arterien. (Harskamp et al. 2013; Parang und Arora 2009; Conte 2007; Davies und Hagen 1995) Hierzu gehören Bluthochdruck, Diabetes mellitus und Fettstoffwechselstörungen. (Yanagawa et al. 2013; Une et al. 2013) Zusätzlich scheinen der Bypassdurchmesser und die Qualität des Zielgefäßes mit postoperativen Offenheitsraten zu korrelieren. (Une et al. 2013)

Im Gegensatz zu Arterien sind atheromatöse Plaques in venösen Bypässen mehr diffus und konzentrisch ausgebildet, weniger kalzifiziert und besitzen nur eine schwach entwickelte oder fehlende fibröse Kappe. (Harskamp et al. 2013)

Über die Dauer der Entstehung der Plaques spielen die Expression von Adhäsionsmolekülen eine entscheidende Rolle. Zuvor angereicherte Lipoproteine führen zur Einwanderung von Monozyten, die sich in Makrophagen umwandeln, Lipidbestandteile phagozytieren und zu Schaumzellen werden. (Harskamp et al. 2013; Kim et al. 2013) Schaumzellen bilden die Grundlage der atheromatösen Plaque.

1.9 Die Leukozyteneinwanderung über das Gefäßendothel

Sowohl für die Entstehung von arteriosklerotischen Veränderungen an nativen Arterien und damit auch an Herzkranzarterien, wie auch an venösen Bypässen nach aorto-koronarer Operation spielt eine sich selbst aufrechterhaltende Entzündungsreaktion mit stetiger Leukozyteneinwanderung die entscheidende Rolle. (Legein et al. 2013; Blankenberg et al. 2003; Crook et al. 2000; van der Wal, A C et al. 1992) Die Entwicklung von atheromatösen Plaques in venösen

Bypässen erscheint durch einen schnelleren Fortschritt eine schwerere Form anzunehmen, als deren Entwicklung in nativen Arterien. (van der Wal, A C et al. 1992) Sowohl Entzündungsmediatoren, wie auch der angestiegene Blutdruck unter arterieller Perfusion (~100mmHg) führen zur Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen an venösen Bypässen. (Nolte et al. 2011; Dumanski et al. 2007; Chello et al. 2003)

Die Einwanderung von Leukozyten über das Gefäßendothel erfolgt über eine Kaskade. Leukozyten können sich innerhalb des Blutflusses nicht gerichtet bewegen, so dass von einem zufälligen Kontakt mit dem Endothel auszugehen ist.

Zunächst zeigt sich ein Rollen der Leukozyten, wobei dieses 100 bis 1000-fach langsamer sein kann als der Blutstrom, bis es letztendlich zu einem Anhaften der Zelle kommt. Auf diesen Zustand folgt die Diapedese oder Transmigration durch die Endothelzellschicht und die weitere chemotaktische Bewegung im Gewebe auf den Entzündungsherd zu. (Smith 2008; Carlos und Harlan 1994) Eine Extravasation von Leukozyten erfolgt hauptsächlich über postkapilläre Venolen.

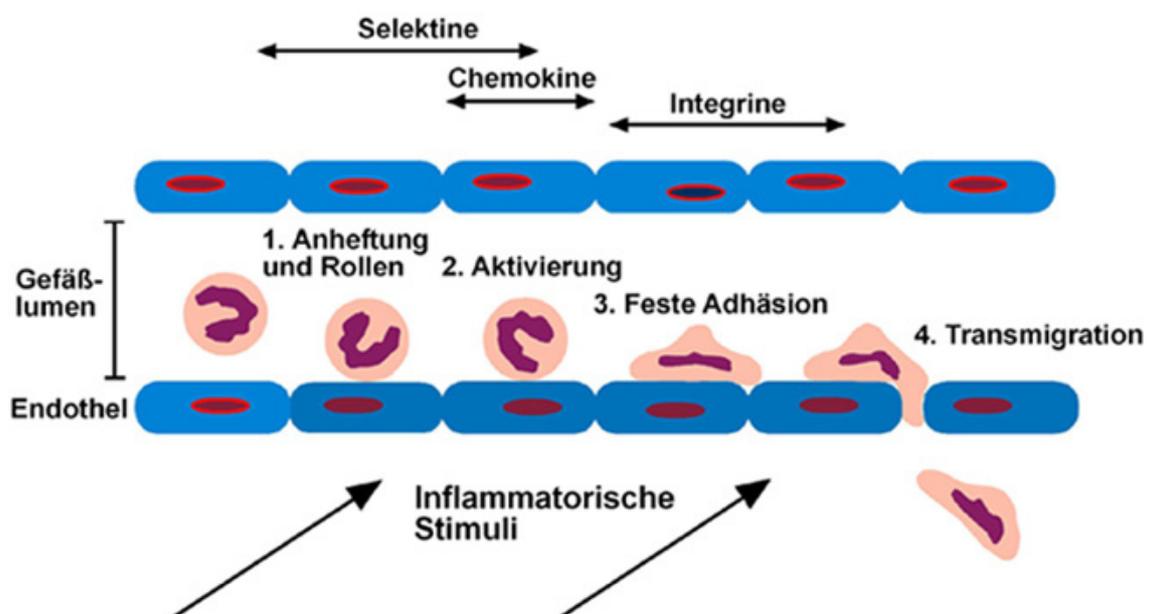


Abbildung 1-7: Die einzelnen Phasen der Diapedese von Leukozyten, Quelle: (Vestweber 2003)

Entscheidend ist in dieser Abfolge die Expression von Oberflächenmolekülen sowohl auf Leukozyten, wie auf Endothelzellen, die der Kommunikation und damit der Zellaktivierung als auch der Verankerung dienen.

Unter dem Einfluss von pro-inflammatorischen Zytokinen exprimieren Endothelzellen als erstes das Oberflächenmolekül P-Selectin (CD 62P). Intrazellulär wird es aus Speicherorganellen (Weible-Palade-Body) innerhalb von 10 min an der Oberfläche dargeboten und bereits nach 30 min wieder internalisiert. Mehrere Untersuchungen zeigten jedoch, dass bei fortbestehender Endothelzellaktivierung P-Selectin über wenige Stunden (~4 Stunden) dargeboten werden kann. P-Selectin kann auch unter höheren Scherkräften (>4 dynes/cm²) eine Bindung zu Leukozyten aufrechterhalten und ein Rollen einleiten. Bindepartner für P-Selectin auf der Leukozytenoberfläche ist P-Selectin Glykoprotein Ligand 1 (PSGL-1), neben weiteren leukozytären Oberflächenmolekülen, wie CD 44 oder dem sialyl-Lewis-X-Glycoprotein. (Smith 2008; Carlos und Harlan 1994) Ebenfalls zur Selectin-Gruppe gehört E-Selectin (CD 62E), das erst 4-6 Stunden nach Einwirken von pro-inflammatorischen Zytokinen auf der Oberfläche von Endothelzellen nachweisbar ist. Grund dafür ist die erforderliche de-novo-Synthese nach Zellaktivierung. Im Gegensatz zu P- und E-Selectin wird L-Selectin (CD 62L) ausschließlich auf der Oberfläche von Leukozyten nachgewiesen. Es dient als „*homing receptor*“ für den sekundären Wiedereintritt von Leukozyten in lymphatisches Gewebe. (Smith 2008)

Weitere Oberflächenmoleküle, die verantwortlich für den Übergang vom rollenden Zustand in die feste Anheftung sind, gehören in die Gruppe der Immunglobulin-Superfamilie. Darunter befinden sich das interzelluläre Adhäsionsmolekül (*Intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1, CD 54) und das vaskuläre Zell-Adhäsionsmolekül (*Vascular cell adhesion molecule 1*, VCAM-1, CD106)

Bei beiden erfolgt ebenfalls nach Einwirkung von pro-inflammatorischen Zytokinen eine de-novo-Synthese mit einer Expression nach 4-6 Stunden. (Walker et al. 2011)

Partnerliganden auf der Zelloberfläche von Leukozyten sind für beide eine Reihe von Integrinen. Integrine bestehen aus zwei nicht kovalent verbundenen, heterodimeren Ketten, genannt α - und β -Kette, von denen verschiedene Unterformen existieren. (Carlos und Harlan 1994)

Als direkter Bindungspartner für ICAM-1 (CD 54) und ICAM-2 (CD 102) konnte das β_2 -Integrin LFA-1 (*leukocyte function associated antigen 1*) identifiziert werden. Während VCAM-1 an das β_1 -Integrin VLA-4 (very late antigen 4) bindet. (Vestweber 2007; Carlos und Harlan 1994)

Im Vergleich zu ICAM-1 wird ICAM-2 ständig auf Endothelzellen exprimiert und nimmt ebenfalls an der Extravasation von Leukozyten teil, jedoch in einer untergeordneten Stellung. (Vestweber 2007)

Ausgehend vom adhärenen Zustand bestehen für Leukozyten zwei Möglichkeiten, die Endothelzellschicht zu durchdringen. Die Mehrheit folgt dem Weg zwischen den Zell-Zell-Kontakten. Eine Minderheit (~10%) verlässt das Gefäßlumen transzellulär. (Vestweber 2007)

Eine Theorie zum Durchtritt der Leukozyten entlang der interzellulären Kontakte beschreibt zwei Schlüsselstellen, an denen das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (*Platelet endothelial cell adhesion molecule-1*, PECAM-1, CD 31) beteiligt zu sein scheint. Hierbei handelt es sich um den Eintritt in die Endothelzellschicht und den Austritt der Leukozyten auf der basalen Seite der Endothelzellen. Es ist davon auszugehen, dass PECAM-1 dabei sowohl zur Signaltransduktion, wie auch zur Zellanhaftung dient. Neben dem Kontakt zwischen leukozytärem und endothelialelem PECAM-1 kommen Wechselwirkungen mit weiteren Oberflächenmolekülen hinzu, zum Beispiel mit dem *Single-chain type-1 glycoprotein* (CD 99, MIC2). (Vestweber 2007)

Die in interzellulären Verbindungen gefundenen Moleküle aus der Gruppe der junctionalen Adhäsionsmoleküle (*junctional adhesion molecules*, JAM) binden auch an Integrine und sind damit ebenfalls Kontaktpartner der Leukozyten während der Diapedese.

Die zwischen Zell-Zell-Kontakten vorkommenden VE-Cadherine dienen der Stabilität des Zellgefüges und stellen ein Hindernis für die Extravasation von

Leukozyten dar. Bisher ist allerdings unklar, wie dieses Hindernis von Leukozyten überwunden wird. (Vestweber 2007)

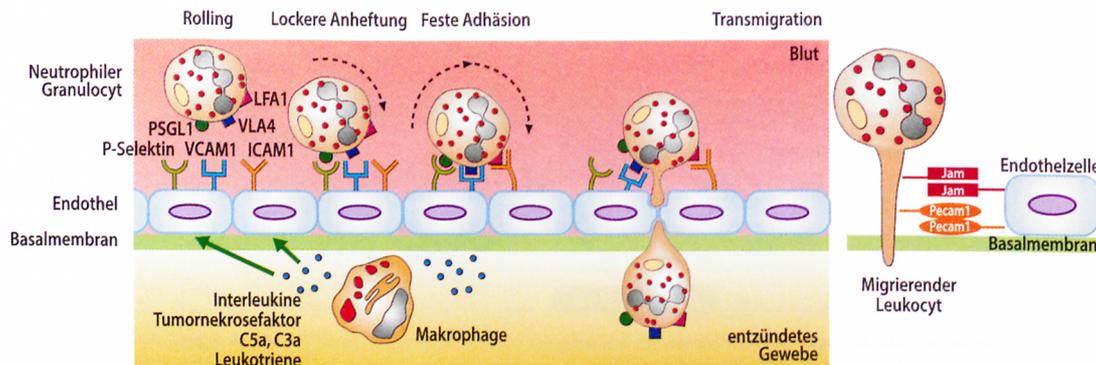


Abbildung 1-8: Die einzelnen Phasen der Diapedese von Leukozyten, Quelle: (Heinrich und Löffler 2014)

1.10 Die Rolle von Zytokinen in der Atherosklerose

Zytokine sind niedrig-molekulare Proteine, die über eine kurze Distanz zwischen benachbarten Zellen in entzündetem Gewebe wirken. Mehr als 100 verschiedene Zytokine sind mittlerweile bekannt, die verschiedenen Gruppen zugeordnet werden. Dazu zählen Interleukine, Tumornekrosefaktoren, Interferone, koloniestimulierende Faktoren, transformierende Wachstumsfaktoren und Chemokine. Alle regulieren sie inflammatorische Reaktionen und Immunantworten. (Ait-Oufella et al. 2011)

Anhand ihrer strukturellen Ähnlichkeit und des Signalweges, auf den sie wirken, werden Zytokine in 2 Klassen eingeteilt. Die meisten der Zytokine wirken über die Januskinase-Signaltransduktion (JAK) und die *Signal Transducers and Activators of Transcription*- Proteine (STAT-Proteine). Interleukin 1 β (IL-1 β) und der Tumornekrosefaktor α (TNF- α) hingegen aktivieren den Zellkernfaktor κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) und die MAP-Kinase (*mitogen-activated protein*). (Tedgui und Mallat 2006)

Proinflammatorisch wirken Tumornekrosefaktoren, Interleukin-1, Interleukin-12, Interleukin-18 und Interferon- γ (IFN- γ), während zu den anti-inflammatorischen Zytokinen Interleukin-4, Interleukin-10, Interleukin-13 und der transformierende Wachstumsfaktor β (TGF- β) zählen. (Tedgui und Mallat 2006)

Interleukin-1 β (IL-1 β) wird von Leukozyten, Monozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen sezerniert, wohingegen Interferon- γ (IFN- γ) von Typ1-T-Helferzellen und natürlichen Killer-T-Zellen gebildet wird. Der Tumornekrosefaktor α (TNF- α) wird von Makrophagen, B- und T-Lymphozyten, Natürlichen Killer T-Zellen und glatten Muskelzellen ausgeschüttet. (Tedgui und Mallat 2006)

In der Wirkung verändern TNF- α und IFN- γ die intraepithelialen Zell-Zell-Kontakte und führen damit zu einer erleichterten Leukozyteneinwanderung. Durch IL-1 β , TNF- α und IFN- γ werden Endothelzellen zur Ausbildung der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, E-Selectin und P-Selectin aktiviert. (Ait-Oufella et al. 2011; Tedgui und Mallat 2006)

Zusätzlich induziert IFN- γ die Bildung von Schaumzellen. Insgesamt verändern pro-inflammatorische Zytokine den Fettmetabolismus.

IL-1 und TNF- α fördern die Freisetzung von Matrix-Metalloproteinasen durch Makrophagen. Pro-inflammatorische Zytokine beeinflussen zudem zusammen mit weiteren Wachstumsfaktoren die Gefäßneubildung aufgrund einer proangiogenetischen Eigenschaft.

Über die Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ konnte in Kultur eine Apoptose von glatten Muskelzellen und Makrophagen eingeleitet werden. Und insbesondere durch IL-1 β , TNF- α und Endotoxin wird die antithrombotische Wirkung von Endothelzellen unterdrückt. (Tedgui und Mallat 2006)

1.11 Das Adhäsionsmolekül P-Selectin (CD 62P)

Das Adhäsionsmolekül P-Selectin findet sich sowohl auf Thrombozyten und Endothelzellen, wie auch als zirkulierendes Molekül im Blutplasma.

Nach Aktivierung kann P-Selectin im Vergleich zu Endothelzellen auf Thrombozyten in 10-fach höherer Dichte dargeboten werden, daher steht die Bezeichnung „P“ für *platelet*, übersetzt Thrombozyt.

Das Adhäsionsprotein mit einem Molekulargewicht von 140 kDa besteht aus mehreren Anteilen, der N-terminalen C-Typ Lectin-Domäne, gefolgt von einer dem Epidermalen Wachstumsfaktor ähnlichen Struktur (*epidermal-growth-*

factor-like motif), einer Serie von 9 aufeinanderfolgenden Molekülwiederholungen (*short consensus repeats*), der transmembranen Domäne und der C-terminalen zytoplasmatischen Einheit. (André 2004)
Die wichtigste Bindung für P-Selectin stellt der P-Selectin Glykoprotein Ligand 1 (PSGL-1) dar.

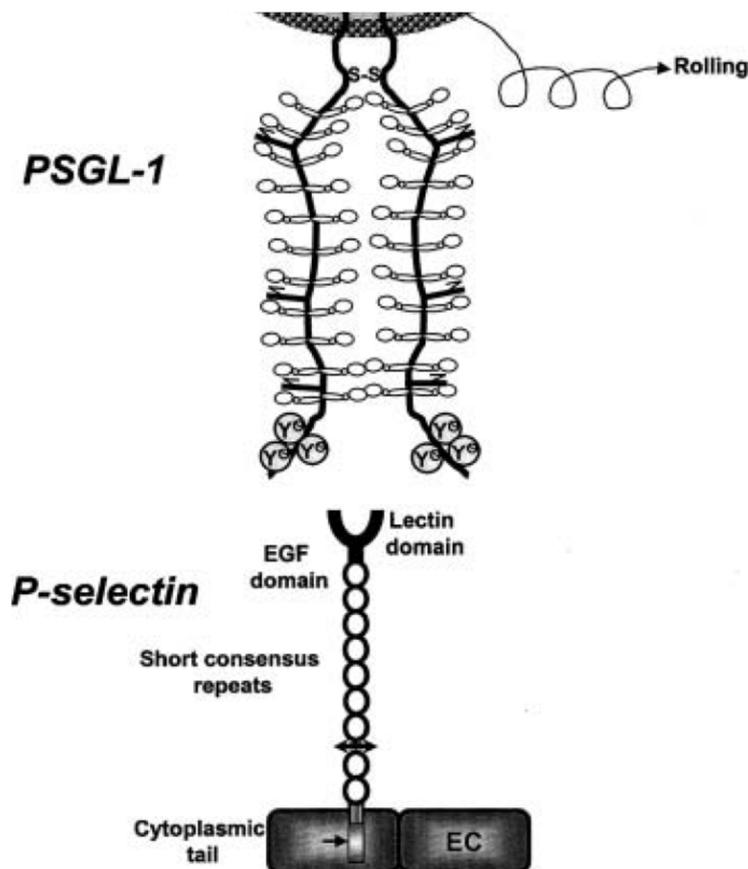


Abbildung 1-9: schematische Darstellung von P-Selectin (CD 62P) und dem P-Selectin Glykoprotein Liganden 1 (PSGL-1), Quelle: (André 2004)

1.11.1 Expression von P-Selectin (CD 62P) auf Thrombozyten

Thrombozyten verfügen über eine eigenschränkte Möglichkeit der Translation, P-Selectin (CD 62P) liegt daher vor allem gespeichert in Organellen (α -Granula) vor. Nach Aktivierung des Thrombozyten wird P-Selectin innerhalb von Minuten an der Oberfläche dargeboten, jedoch ebenso schnell wieder abgestoßen. (Gawaz 2005; André 2004) Im Plasma frei zirkulierendes P-Selectin geht hauptsächlich auf Thrombozyten zurück. Als Liganden kommen der P-Selectin

Glykoprotein Ligand 1 (PSGL-1), der auf Endothelzellen und Leukozyten exprimiert wird, als auch der GPIIb/IIIa-Komplex infrage. GPIIb/IIIa wird auch als von-Willebrand-Rezeptor-Komplex bezeichnet. Beide Liganden bilden mit P-Selectin jedoch einen reversiblen und instabilen Kontakt, weshalb erst über Integrine eine stabile Anheftung von Thrombozyten mit dem Endothel erreicht werden kann. (Gawaz 2005; André 2004) Über diesen ersten Kontakt werden Thrombozyten jedoch zur weiteren Ausschüttung von Adhäsionsproteinen (Fibrinogen, Fibronectin, von-Willebrand-Faktor, Thrombospondin, Vitronectin, P-Selectin, GPIIb/IIIa,...), Wachstumsfaktoren, Chemokinen und weiteren Botenstoffen, darunter auch Interleukin 1 β , angeregt. Sowohl über diese Zytokine, wie auch über das costimulierende Protein CD 40 (*TNF receptor superfamily member 5*) werden nach Anlagerung von Thrombozyten weitere Endothelzellen zur Expression von Adhäsionsmolekülen aktiviert. (Dole et al. 2005; Gawaz 2005)

Über bereits anhaftende Thrombozyten und deren Expression von P-Selectin wird eine Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion eingeleitet, die letztlich über den Rollvorgang und der folgenden Leukozytenaktivierung zur festen Anhaftung und Leukozyten-Diapedese führt. (Dole et al. 2005; Gawaz 2005)

1.11.2 Expression von P-Selectin (CD 62P) auf Endothelzellen

Über das Trans-Golgi-Netzwerk werden Weible-Palade-Speicherorganellen mit dem Adhäsionsmolekül P-Selectin beladen. Zusätzlich tragen diese zellkernnahen Speicherkörperchen den von-Willebrand-Faktor, der über die Glykoproteine Ib/IX-V und IIb/IIIa an der Thrombozytenanheftung beteiligt ist, sowie Interleukin 8, Angiopoetin-2, den Faktor XIIIa, den Gewebsplasminogenaktivator tPa (*Tissue plasminogen factor*), Eotaxin zur Rekrutierung von Eosinophilen, Endothelin 1, das Endothelin-konvertierende Enzym zur Gefäßkonstriktion und das CD 63-Protein, das als Cofaktor mit P-Selectin der Leukozytenrekrutierung dient. (Doyle et al. 2011; Harrison-Lavoie et al. 2006), sowie das *Calcitonin Gene-Related Peptide*, welches an der Steigerung der NO-Synthetase beteiligt ist und damit die Gefäßdilataion

beeinflussen kann. (André 2004) Eine Exozytose der Speicherkörper wird über verschiedene Zustände und Botenstoffe eingeleitet, darunter zählen einerseits Hypoxie, Trauma und der Einfluss von Scherkräften und andererseits Sauerstoffradikale, Histamin, Serotonin, Leukotriene, Thrombin, Fibrin, der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) und die Komplementfaktoren C5a und C3a, sowie Lipopolysaccharide (Lowenstein et al. 2005; Foreman et al. 1994), des weiteren der Tumornekrosefaktor α und Zytokine. (Sundd et al. 2011; Schlitt et al. 2006; Tenaglia et al. 1997) Ähnlich wie bei Thrombozyten wird der Rezeptor P-Selectin (CD 62P) innerhalb von wenigen Minuten exprimiert, jedoch ebenso schnell wieder internalisiert oder enzymatisch abgestoßen. Über eine Aktivierung der Endothelzelle wird zusätzlich die Syntheseleistung für P-Selectin erhöht. (Blann et al. 2003)

Über die Bindung mit dem P-Selectin Glykoprotein Ligand 1 (PSGL-1) wird durch P-Selectin auf Leukozyten die Ausbildung von Integrinen beeinflusst, durch die erst eine feste Zelladhäsion erfolgen kann. (André 2004; Merten und Thiagarajan 2004)

Insgesamt lässt sich festhalten, dass über P-Selectin (CD 62P) nach Aktivierung von Leukozyten sowohl eine Thrombozytenaggregation, wie auch Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion aufrechterhalten wird und zusätzlich die Leukozytenmigration eingeleitet wird. (André 2004; Merten und Thiagarajan 2004; Blann et al. 2003)

1.12 Das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül-1 (PECAM-1)

Das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül-1 (*Platelet endothelial cell adhesion molecule 1*, PECAM-1, CD 31) ist ein zellulärer Adhäsions- und Signalrezeptor mit einem Molekulargewicht von 130 kDa, der aus 6 extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen, einer kurzen transmembranen Domäne und einer langen zytoplasmatischen Domäne mit 118

Aminosäuren besteht, die nach zellulärer Aktivierung an Serin- und Tyrosin phosphoryliert wird. (Privratsky und Newman 2014) Am zytoplasmatischen Abschnitt bestehen zwei Immunrezeptor-Tyrosin-Hemmungssequenzen (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*, ITIMs), die als Kontaktstelle für Signalmoleküle dienen. Eine Rezeptorbindung mit PECAM-1 kann über Phosphorylierungen weitere Signalwege aktivieren. (Privratsky und Newman 2014; Woodfin et al. 2007; Newman 1997)

Der Hauptligand für endotheliales PECAM-1 ist leukozytäres PECAM-1, daneben gibt es weitere untergeordnete Bindungsmöglichkeiten mit Integrinen und dem CD177-Protein, sowie Glykosaminoglykanen und der ADP-Ribosyl-Zyklase (CD 38) auf Lymphozyten.

PECAM-1 wird von Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen exprimiert. (Privratsky et al. 2010)

Zunächst zeichnet sich PECAM-1 durch seine pro-inflammatorische Funktion aus. Innerhalb der Migrationskaskade von Leukozyten ist PECAM-1 am letzten Schritt, der Transmigration durch die Endothelzellschicht entscheidend beteiligt. (Privratsky und Newman 2014; Privratsky et al. 2010; Woodfin et al. 2007; Muller et al. 1993)

Neben PECAM-1 scheinen auf endothelialer Seite an diesem letzten Schritt auch das interzelluläre Adhäsionsmolekül 2 (ICAM-2), die junktionalen Adhäsionsmoleküle A und C (*junctional adhesion molecules*, JAM A und C), das endotheliale Zell-Adhäsionsmolekül (*endothelial cell adhesion molecule*, ECAM) und CD 99 (single-chain type-1 glycoprotein, MIC2) eine Rolle zu spielen. (Woodfin et al. 2007)

Durch eine adhäsive Wechselwirkung zwischen endothelialelem und leukozytärem PECAM-1, wie auch durch die Förderung der Ausbildung von Integrinen über leukozytäres PECAM-1, wird erst die weitere Leukozytenmigration über endotheliale Zellverbindungen und die subendotheliale Basalmembran ermöglicht. (Privratsky et al. 2010)

Endotheliales PECAM-1 wird insbesondere im Bereich der Interzellularkontakte ständig stark exprimiert. Eine Stimulation von Endothelzellen mit Tumornekrosefaktor- α allein oder in Kombination mit Interferon- γ führt entgegen

der übrigen Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selectin zu einer reduzierten Expression von PECAM-1. (Woodfin et al. 2007; Muller et al. 1993) Zusammen mit CD 99 und dem *junctional adhesion molecule A* (JAM-A) zirkuliert PECAM-1 über ein System aus mit der Zelloberfläche verbundenen vesikulären Membranen, das als *lateral border recycling compartment* (LBRC) bezeichnet wird. (Woodfin et al. 2007; Privratsky et al. 2010)

PECAM-1 dient darüber hinaus als Mechanosensor und kann über die Einwirkung von Scherkräften den pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren und damit an exponierten Gefäßabschnitten die Arteriosklerose fördern. (Privratsky et al. 2010)

Neben dieser pro-inflammatorischen Eigenschaft besitzt PECAM-1 auch eine ausgeprägte anti-inflammatorische Wirkung. Unter anderem kann innerhalb von Leukozyten nach Anlagerung von Phosphatasen an die Immunrezeptor-Tyrosin-Hemmungssequenzen (ITIMs) diese Zellpopulation gedämpft werden.

Endotheliales PECAM-1 wiederum kann die Aufrechterhaltung und Wiederherstellung der vaskulären Schrankenfunktion beeinflussen. (Privratsky et al. 2011; Privratsky et al. 2010)

1.13 Wirkung und Funktion der RNA-Interferenz (kleine regulatorische Ribonukleinsäuren)

Auf dem Weg, einzelne Gene auszuschalten, wurden neben der Züchtung von Knock-out-Mäusen, 1978 erstmals Ergebnisse zur Anwendung von Gegenstrang-Oligonukleotiden zur spezifischen Hemmung der Genexpression veröffentlicht. (Stephenson und Zamecnik 1978) Mit der Entdeckung, dass die Ribonukleinsäure nicht nur als Informationsträger dient, sondern in Form von Ribozymen auch eine enzymatische und damit regulierende Funktion wahrnimmt, wurde ein weiterer Schritt der Nukleinsäure-basierten gezielten Genmodifikation entschlüsselt. (Aigner 2006). Im Vergleich zur einfachen Anwendung von Gegenstrang-RNA stellten Guo und Kempfues bei Versuchen mit dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* fest, dass eine vielfache Steigerung

der gewünschten Gen-Ausschaltung durch die gleichzeitige Injektion der Sinn- und Gegenstrang-RNA erreicht werden konnte. (Guo und Kemphues 1995) Fire et al. wiesen schließlich nach, dass für diesen Effekt eine Doppelstrang-RNA verantwortlich ist. (Fire et al. 1998) Bezeichnet wurde der entdeckte intrazelluläre Mechanismus als RNA-Interferenz oder posttranskriptionelles Gene-Silencing.

1.13.1 Mechanismus der RNA-Interferenz

Innerhalb der letzten Jahre konnten noch nicht alle in tierischem wie pflanzlichem Gewebe auf doppelsträngige RNA zurückzuführenden genregulatorischen Mechanismen entschlüsselt werden, so dass die Zahl der bisher bekannten Gruppen an nicht-kodierenden Doppelstrang-Ribonucleinsäuren und die Erkenntnis über deren Funktion sicherlich weiter anwachsen wird.

Die enzymatisch verstärkte hemmende Wirkung der doppelsträngigen RNA dient einerseits dazu, den Einfluss von doppelsträngiger Viren-RNA auf die Zellfunktion abzuwehren.

Andererseits kann die Zelle selbst durch die Generierung von spezifischer doppelsträngiger RNA eine hemmende Stellgröße für den zelleigenen Genumsatz schaffen, wodurch ein regulatorischer Faktor geschaffen wird. Eine Reihe von zelleigenen doppelsträngigen RNA-Sequenzen gehören zu dieser Gruppe. Die bisher beim Menschen am besten untersuchte, wird als microRNA (miRNA) bezeichnet.

Ausgehend von einer über Viren eingebrachten, durch konvergente Transkription gebildeten oder einer experimentell zugeführten doppelsträngigen RNA, erfolgt zunächst eine enzymatische Kürzung des Stranges auf 21 bis 23 Basenpaare über ein RNaseIII-ähnliches Enzym mit dem Namen *Dicer*. (Jinek und Doudna 2009; Sledz, Williams und Bryan 2005) Charakteristisch ist dabei ein Überhang von 2 Nukleotiden am 3'-Ende und ein phosphoryliertes 5'-Ende an beiden Strängen. Die zum Zwecke der Forschung oder Therapie in eine Zelle eingegebene doppelsträngige RNA mit einer üblichen Länge von 21 bis 25 Basenpaaren wird als *small interfering RNA* (siRNA) bezeichnet. Sobald sich der endogen gebildete und im Verlauf gekürzte oder der exogen zugeführte RNA-

Doppelstrang an das Enzym *Dicer* anlagert, treten weitere Enzymbestandteile hinzu, darunter das Argonaut-Protein und ein Doppelstrang-RNA-bindendes Protein (*trans-activation response RNA-binding protein*, TRBP). Gemeinsam formen sie den *RNA-induced silencing complex* (RISC). Der am 5'-Ende weniger thermodynamisch stabile Strang der Doppelstrang RNA wird als „Fahrer“-Strang ausgewählt und verbleibt auf dem Enzymkomplex, der „Beifahrer“-Strang wird nach dem anschließenden Auftrennen beider Stränge freigegeben. Das Argonaut-Protein unterstützt hierbei lediglich diesen Vorgang. (Jinek und Doudna 2009; Sledz, Williams und Bryan 2005)

Das nun folgende post-transkriptionale Gene-Silencing kann über zwei Wege erfolgen:

- a) Lagert sich an den RISC-Komplex eine zur aufgeladenen siRNA-Sequenz exakt komplementäre messenger-RNA (mRNA) an, so wird diese enzymatisch gespalten und damit wirkungslos. (Castanotto und Rossi 2009)
- b) Besteht lediglich eine inkomplette Bindung zum „Fahrer“-Strang, insbesondere zwischen dem 2. und 8. Nukleotid am 5'-Ende (bezeichnet als *seed*-Region), erfolgt zunächst eine Hemmung der Translation, begleitet von einer nicht-sequenz-spezifischen Degradierung der mRNA in Zellorganellen namens P-Bodies (*processing bodies*). (Castanotto und Rossi 2009) Dieser Wirkmechanismus wird überwiegend von microRNA vollzogen.

Im Gegensatz zur extern zugeführten siRNA entsteht die endogene microRNA (miRNA) als Transkript einer Einzelstrang-RNA, die sich nach Bildung einer Haarnadelschleife zu einer Doppelstrang-RNA umformt. Diese von einer RNA-Polymerase II gebildete und als pri-miRNA bezeichnete Struktur enthält eine Kappe am 5'-Ende und ein Poly(A)-Ende. Durch das Enzym *Drosha* wird zunächst der etwa 30 Basenpaare umfassende unvollständig gepaarte RNA-Satz gekürzt, wodurch die prä-miRNA entsteht.

Analog zur siRNA erfolgt im Zytosol eine Prozessierung durch das Enzym *Dicer*, das die Haarnadelschleife abtrennt und den RNA-Doppelstrang auf 22 Basenpaare kürzt. Nach Bildung des RISC-Komplexes werden die Stränge

aufgetrennt und der „Beifahrer“-Strang abgestoßen. Aufgrund der überwiegend auftretenden inkompletten Bindung der im RISC-Komplex eingebetteten microRNA (miRNA) mit messenger-RNA (mRNA) erfolgt häufiger eine Hemmung der Translation als ein sequenzspezifischer mRNA-Abbau. (Kaikkonen et al. 2011; Siomi und Siomi 2009; Jinek und Doudna 2009; Castanotto und Rossi 2009)

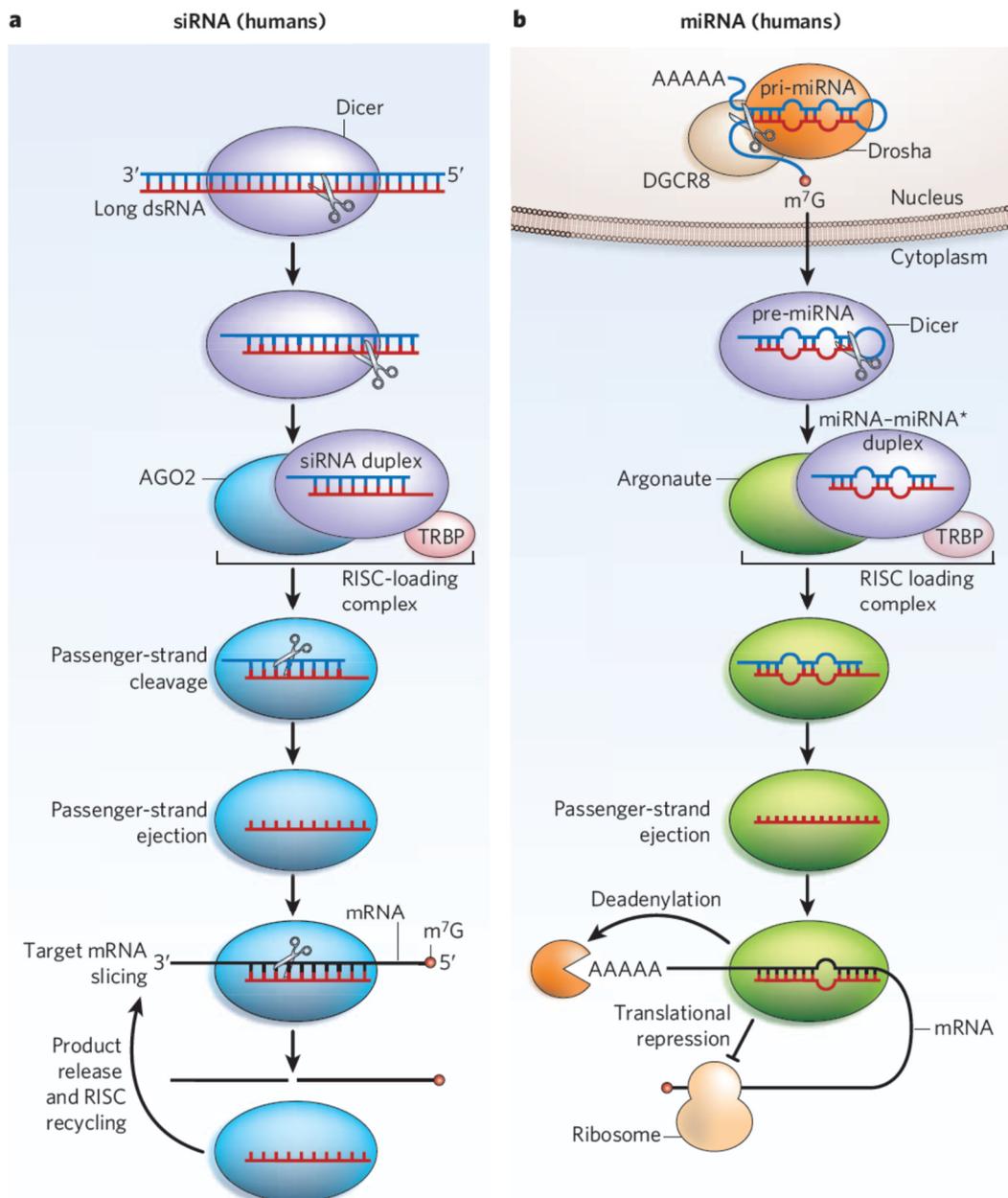


Abbildung 1-10: Prozessierung von humaner siRNA und humaner miRNA im Vergleich (a) Prozessierung von langer Doppelstrang RNA über die Proteine Dicer und den RISC-Komplex bis zur Sequenz-spezifischen mRNA-Spaltung. (b) Generierung der miRNA über das Enzym Drosha, die weitere Prozessierung über das Protein Dicer und die folgende Hemmung der Translation und die nicht Sequenz-spezifische Degradierung bei inkompletter Bindung mit mRNA. Quelle: (Jinek und Doudna 2009)

Der dritte Wirkmechanismus der microRNA ist die direkte Hemmung der Transkription. Diese Funktion der miRNA wurde zunächst an der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* beschrieben und zwischenzeitlich auch an menschlichen Zellen nachgewiesen. (Morris et al. 2004)

Neben der microRNA wurden in den letzten Jahren noch weitere endogene Doppelstrang-RNA-Gruppen entdeckt, deren Mechanismus und Funktion beim Menschen jedoch noch unvollständig bekannt sind.

Hierzu gehören die PIWI-interagierenden RNA-Sequenzen (piRNA), die innerhalb der Keimbahn die Aktivität von Transposons unterdrücken und die endo-siRNA-Sequenzen, die ebenfalls auf Transposons, sowie auf mRNA und Heterochromatin regulierend wirken.

Weitere Gruppen von kleiner zellulärer Doppelstrang-RNA wurden zwar entdeckt, jedoch ist ihre Existenz und Funktion bei Säugetieren noch nicht bestätigt. (Kaikkonen et al. 2011; Castanotto und Rossi 2009)

1.13.2 Die Transfektion - das experimentelle oder therapeutische Einbringen von siRNA in die Zelle

Experimentell oder therapeutisch angewendete siRNA steht bis zur Erreichung des Zellinneren als Wirkungsort einer Reihe von Hindernissen gegenüber. Nach intravenöser Applikation liegt die Halbwertszeit durch den enzymatischen Abbau bei weniger als 10 min. Zudem können Opsonine, das heißt Antikörper oder Komplementfaktoren, an siRNA binden und eine Immunstimulation bewirken. Darüber hinaus wird im Blutkreislauf zirkulierende siRNA schnell über die Nieren ausgeschieden. An der Zelloberfläche angekommen, ist die Molekülmasse von 13 kDa zu groß für eine Diffusion, zudem sind das siRNA-Molekül, wie auch die Zelloberfläche negativ geladen. Eine extrazelluläre Matrix erschwert das Erreichen des Zellinneren und falls doch siRNA-Moleküle über ein Endosom das Zytosol erreicht haben sollten, so besteht das letzte Hindernis in der Freigabe der siRNA aus dem Endosom. (Zhou et al. 2014)

Zahlreiche Transportsysteme für siRNA sowohl für eine in-vitro- wie in-vivo-Anwendung wurden daher in den letzten Jahren entwickelt.

Aufteilen lässt sich die nicht-virale Transfektion in chemische und physikalische Verfahren.

I) Die chemische Transfektion

Eine Methode zur Transfektion von adhärennten Zelllinien stellt die **Calcium-Phosphat-Präzipitation** dar. Die Methode, die für das Einbringen von Plasmid-DNA in die Zelle eine Rolle spielt, konnte auch für die Transfektion von siRNA angewendet werden. Oligonukleotide binden sich dabei an Calciumphosphat, das in einem Gemisch aus Calciumchlorid und Natriumphosphat ausfällt. siRNA-Calciumphosphat-Kristalle werden von der Zelle durch Endozytose aufgenommen. Aufgrund der erschwerten Transfektion ist dieses Verfahren für die Anwendung von siRNA von untergeordneter Bedeutung. (Donzé und Picard 2002)

Liposomen und Lipide schließen durch die Bildung von Micellen und Vesikeln Nukleinsäuresequenzen ein. Diese Vesikel fusionieren mit der Zellmembran, wodurch die Nukleinsäurestränge in das Zellinnere abgegeben werden.

Für eine systemische Anwendung am Tiermodell werden vornehmlich ungeladene Liposomen verwendet, die im Gegensatz zu den positiv geladenen aufgrund geringerer Stabilität eine schlechtere Transfektionsrate aufweisen. Geladene Liposomen können jedoch mit Serumproteinen, Lipoproteinen und Komponenten der extrazellulären Matrix interagieren und werden daher nur für in-vitro-Versuche angewendet.

1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DOPC) stellt neben vielen anderen ein Beispiel für ein nicht geladenes Liposom dar, das im Mausmodell erfolgreich zur Transfektion am Ovarialkarzinom eingesetzt wurde. Zu positiv geladenen Lipiden gehören die Produkte Oligofectamine™ (Fa. Invitrogen), Lipofectamine™ (Fa. Invitrogen), RNAiFect® (Fa. Qiagen) und INTERFERin™ (Fa. Polyplus-transfection). (Koenig et al. 2013)

Unter den **kationischen synthetischen Polymeren** zur Transfektion ist **Polyethylenimin** (PEI) weit verbreitet und bildet aufgrund seiner stark positiven Ladung einen nicht kovalenten Komplex mit negativ geladener siRNA oder DNA. Dieser Komplex schützt die siRNA vor enzymatischem Abbau. Nach erfolgter Endozytose kann Polyethylenimin den pH-Wert durch Protonierung von Aminogruppen abpuffern, wodurch Chlor-Anionen und in der Folge Wasser in das Endosom nachströmen. Darauf hin platzt es und die siRNA gelangt in das Zytoplasma.

Im Vergleich zu niedrig-molekularem Polyethylenimin ist hoch-molekulares Polyethylenimin toxischer. Zudem wurden verschiedene Formen der Modifikation zur Verbesserung der Transfektionseffizienz und Reduktion der Zelltoxizität generiert. PEI eignet sich auch zur systemischen Anwendung und reichert sich in der Lunge an. (Zhou et al. 2014; Koenig et al. 2013)

Dendrimere verfügen durch eine verzweigt-kettige Struktur über eine größere Zahl an Aminogruppen, wodurch die Ladungsdichte der Oberfläche erhöht wurde, was die Komplexbildung mit siRNA weiter verbesserte. Auch sie schützen im Komplex eingebundene siRNA vor enzymatischem Abbau und werden über die Endozytose in das Zellinnere aufgenommen. Die Freigabe der siRNA aus dem Endosom in das Zytoplasma erfolgt wie bei Polyethylenimin über eine Protonierung von Aminogruppen, wodurch nach Chlorid-Anionen- und Wassereinstrom das Endosom platzt. Zu den bekanntesten Vertretern gehören Poly(amidoamin) (PAMAM) und Poly(propylenimin) (PPI). (Zhou et al. 2014)

Chitosan (CS) ist ein Polysaccharid-Polymer, das aus D-Glukosamin und N-acetyl-D-Glukosamin besteht. Bei einem pH von 6,2 - 7,0 binden Aminogruppen nach Deacetylierung siRNA. Widersprüchliche Angaben finden sich hinsichtlich der Toxizität, Immunogenität und Biokompatibilität von Chitosan. Während einerseits eine gute Biokompatibilität beschrieben wird (Zhou et al. 2014; Koenig et al. 2013), die auch die Möglichkeit der Transfektion von Schleimhaut bietet (Castanotto und Rossi 2009), gibt es bereits Hinweise für eine pro-

inflammatorische Wirkung je nach Anteil von Endotoxinen im verwendeten Chitosan (Nolte et al. 2014).

Ein weiteres natürliches Polymer, das ebenfalls minimale Toxizität und Immunogenität besitzt, ist **Atelokollagen**. Das nach Aufreinigung aus Kälberblut gewonnene Typ-I-Kollagen wird hierzu einer Pepsin-Behandlung unterzogen. Aufgrund der praktisch fehlenden immunstimulierenden Wirkung eignet es sich zur systemischen Anwendung. (Koenig et al. 2013)

Ein weiterer Schritt in der Entwicklung verbesserter Transfektionsreagenzien ist die Anwendung von **positiv geladenen Nanopartikeln** mit anhängenden ungeladenen Polymer-Molekülen, auch bezeichnet als stabile Nukleinsäure-Lipid-Partikel (*stable nucleic-acid lipid particles*, SNALP). Als Polymer wurde zum Beispiel Polyethylenglycol (PEG) verwendet. Die negativ geladene Nukleinsäure wird dabei von den Nanopartikeln umlagert und die angelagerten PEG-Polymere schirmen die Ladung nach außen hin ab. Im Tiermodell zeigte diese Molekülanordnung bei einer systemischen Anwendung zur Transfektion von Lebergewebe nicht menschlicher Primaten keine Toxizität und eine gleichzeitig hohe Hemmrage. (Castanotto und Rossi 2009)

Durch die kovalente Kopplung von Oberflächenliganden, beispielsweise Transferrin, an Nanopartikel können Moleküle geschaffen werden, die selektiv über bestimmte Rezeptoren von Zielzellen aufgenommen werden. (Castanotto und Rossi 2009)

Für eine noch gezieltere Anlagerung an ausgewählte Zellen wurden **Fusionsproteine** geschaffen. An das mit einem Antikörper verknüpfte positiv geladene Molekül Protamin lagert sich die negativ geladene siRNA an. (Song et al. 2005) Bindet der Antikörper an ein Oberflächenmolekül, wird der Komplex im Rahmen des Zellzyklus internalisiert.

Ein ähnliches Beispiel sind Aptamer-siRNA-Fusionsproteine, die als Chimäre bezeichnet werden. Auch sie können an bestimmte Oberflächenmoleküle binden und damit einen Rezeptormechanismus zur Internalisierung ausnutzen. (Castanotto und Rossi 2009)

II) Physikalische Verfahren

Unter den physikalischen Verfahren zur Transfektion von angezüchteten anhängenden Zellen mit siRNA spielt einzig die **Elektroporation** eine gewisse Rolle. Hierfür wird an Gewebe ein elektrisches Feld angelegt. Durch pulsierende Entladungsströme werden Zellen permeabilisiert und eine hinzugegebene siRNA kann in das Zytoplasma aufgenommen werden. Ebenso können Zellbestandteile nach außen gelangen. Auch wenn sich eine hohe Transfektionsrate zeigt, so liegt der entscheidende Nachteil in einer ebenso hohen Rate an verfahrensbedingtem Absterben von Zellen. (Broderick et al. 2012)

Die **Mikroinjektion**, bei der über ein Mikromanipulator Zellen einzeln transfiziert werden, bedarf einer technisch aufwendigen Ausstattung und ermöglicht eine Transfektionsrate von lediglich 60 - 200 Zellen pro Stunde.

III) Die virale Transfektion – vom Plasmid zur Small hairpin RNA

SiRNA zur systemischen Anwendung hat zwei entscheidende Nachteile. Zum einen ist die Transfektionsrate für in-vivo-Versuche aufgrund des Abbaus bei Kontakt mit in Serum enthaltender RNase gering und zum anderen hält die Wirkung der siRNA je nach Zellteilungsrate nur 3-5 Tage in der Zellkultur an.

Eine Transfektion mit Viren bietet im Vergleich zur nicht-viralen Transfektion den Vorteil, dass die Virusbindung und spätere Internalisierung der viralen Nucleinsäure über spezifische Oberflächenmoleküle verläuft, was zu einer effektiveren Transfektion führt. Die Transfektion mit Viren ermöglicht die Eingabe von sich autonom replizierenden, doppelsträngigen DNA-Ring-Molekülen in die Zelle, sogenannten Plasmiden. Ebenso können über Viren natürlich auch siRNA-Sequenzen in die Zelle geschleust werden.

Der entscheidende Nachteil ist allerdings, dass Viren bei systemischer Anwendung eine Immunantwort auslösen und Zellen zerstören können.

Zur Virustransfektion werden üblicherweise Retroviren, Adenoviren, Lentiviren und Adeno-assoziierte Viren eingesetzt. (Deng et al. 2014; Koenig et al. 2013; Lambeth und Smith 2013) Der eingebrachte DNA-Ring wird über eine RNA-

Polymerase III abgelesen und in eine doppelsträngige RNA mit Haarnadelstruktur, ähnlich der miRNA, umgeschrieben. Bezeichnet wird diese Doppelstrang-RNA allerdings als *small hairpin* RNA (shRNA). Die weitere Prozessierung und Hemmwirkung erfolgt analog der bereits beschriebenen miRNA.

Der entscheidende Vorteil liegt in der Reproduzierbarkeit der shRNA-Sequenzen über eine fortlaufende Plasmid-Transkription und eine damit theoretisch fortbestehende Hemmwirkung. Im Tiermodell konnte allerdings eine durch shRNA hervorgerufene Leber- und Neurotoxizität nachgewiesen werden. (Lambeth und Smith 2013)

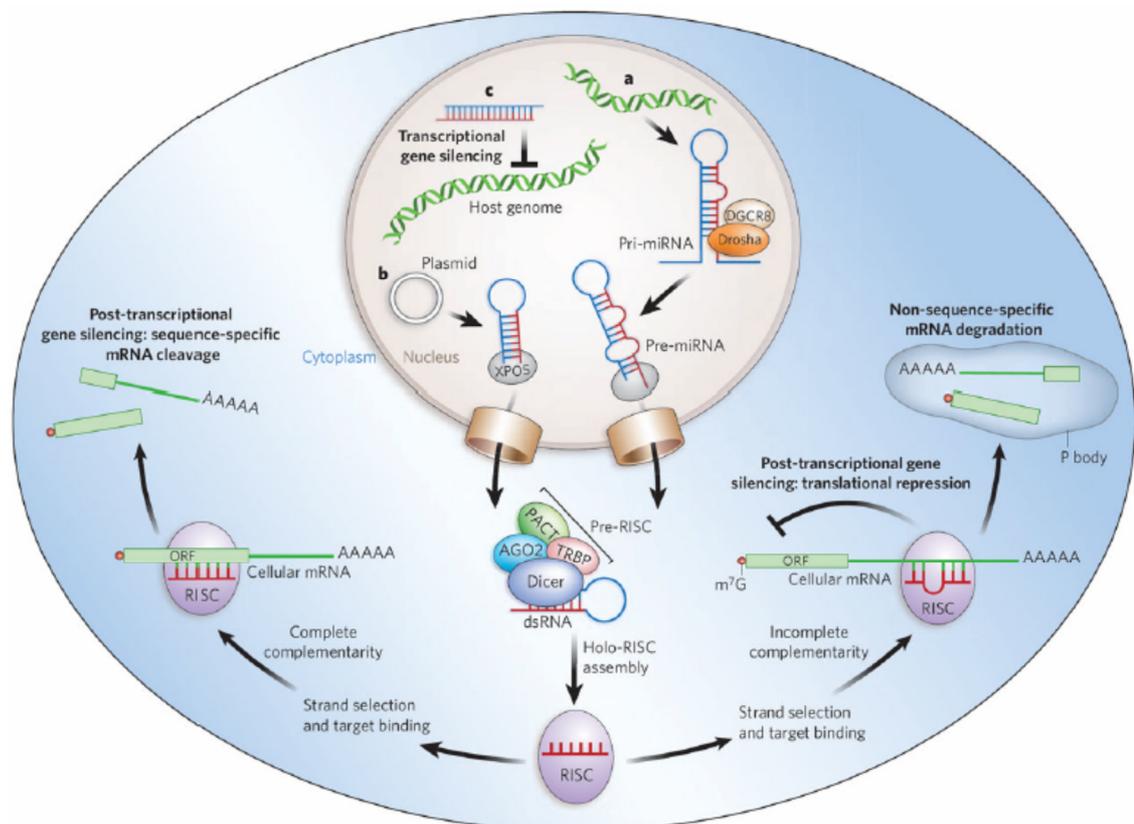


Abbildung 1-11: Mechanismen des zellulären Gene-Silencing: Gegenüberstellung von shRNA und miRNA und deren gemeinsame Wirkungsweise. Quelle: (Castanotto und Rossi 2009)

1.13.3 Nebenwirkungen durch die Anwendung von siRNA

Das Nebenwirkungsspektrum von siRNA bezieht sich vor allem auf zwei Bereiche, die Generierung einer Immunantwort und eine fehlerhafte Genregulation.

Eine Erkennung von Doppelstrang-RNA erfolgt über den Toll-like-Rezeptor 3, was über eine Interferon-Antwort zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems führt. Das Zytokin gamma-Interferon (IFN- γ) führt zu einer Aktivierung der Transkription von Genen, deren Proteine eine antivirale oder antiproliferative Funktion haben. Dazu gehören die Doppelstrang-RNA abhängige Proteinkinase R (PKR) und eine Gruppe von 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetasen (OASs).

Während PKR unter anderem den Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert, der für die Ausbildung einer Immunantwort verantwortlich ist, können 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetasen die intrazelluläre RNase L aktivieren, was zu einem unspezifischen Abbau von Einzelstrang-RNA führt. (Sledz, Williams und Bryan 2005) Insbesondere lange siRNA-Sequenzen führen zu einer Immunantwort über die Induktion von Interferon-aktivierenden Genen. Sind die siRNA-Sequenzen jedoch kürzer als 30 Basenpaare, kommt es wesentlich seltener zu dieser Aktivierung. (Sledz, Williams und Bryan 2005)

Da die post-transkriptionale Genregulierung durch siRNA nicht nur sequenzspezifisch erfolgt, sondern bei inkompletter Übereinstimmung mit einer mRNA auch eine translationale Hemmung bewirken kann, besteht bei jeder siRNA-Anwendung unweigerlich eine schwer abschätzbare Wirkung auf andere Gene. (sogenannter Off-target-Effect)

Umgangen kann dieser Effekt, indem die verwendete siRNA so gering wie möglich dosiert wird. Zusätzlich kann über entsprechende Algorithmen eine Software-gestützte Berechnung von siRNA-Sequenzen zu einem verbesserten Nebenwirkungsspektrum führen. (Sledz, Williams und Bryan 2005)

1.13.4 Modifizierung von siRNA-Sequenzen

Um die Stabilität einer siRNA-Sequenz extrazellulär, wie intrazellulär zu verbessern und um Nebenwirkung zu reduzieren, wurden chemische Modifikationen am siRNA-Doppelstrang entwickelt. Hierzu sind einige Regeln zu beachten. (Engels 2013; Rana 2007)

- Das 5'-Ende des „Fahrer“-Stranges sollte eine freie Hydroxyl- oder Phosphat-Gruppe enthalten
- Das 3'-Ende des „Fahrer“- wie „Beifahrer“-Stranges kann mit einem zusätzlichen Molekül modifiziert werden, beispielsweise einem Farbstoff.
- Das 5'-Ende des „Beifahrer“-Stranges kann mit einem Element versehen werden, das die Aufnahme des Stranges in den RISC-Komplex verhindert.
- Kleine hydrophobe Gruppen, wie O-Methyl können in beide Stränge eingefügt werden.
- Größere Gruppen, wie O-(2-Methoxyethyl), können innerhalb des „Beifahrer“-Stranges verwendet werden, jedoch werden diese im „Fahrer“-Strang nur wenig toleriert.
- Die Rückgrat-Struktur der RNA kann in beiden Strängen über Phosphothioat stabilisiert werden.
- Am heterozyklischen Ring halogenisierte Pyrimidine werden am „Fahrer“-Strang toleriert.
- Modifikationen an zentralen funktionalen Gruppen sollten vermieden werden (Rana 2007)

Häufig verwendete Modifikationen sind hierbei:

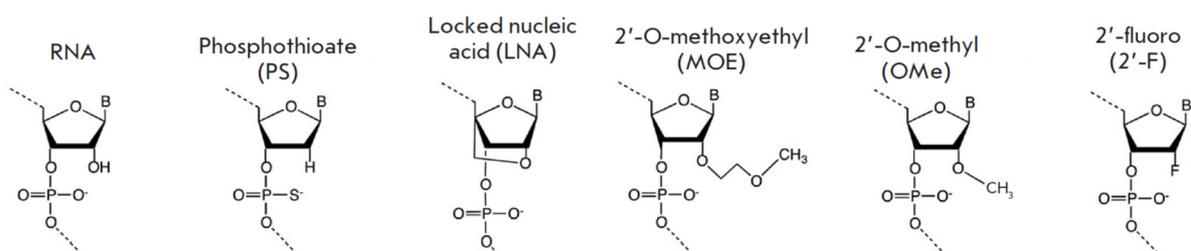


Abbildung1-12: chemische Modifikationen der siRNA, Quelle: (Nikitenko und Prassolov 2013)

Die Modifikation durch Einbringung eines Schwefelatoms anstelle eines Sauerstoffatoms an den Phosphatrest bildet das Phosphothioat. Durch diese Veränderung ist eine verbesserte Resistenz gegen Nucleasen beschrieben worden, bei gleichbleibender Effektivität der siRNA. Zudem wird hierdurch die Affinität an Blutplasma-Proteine erhöht, weshalb die renale Clearance reduziert und ein schnelles Ausscheiden verhindert werden kann. (Nikitenko und Prassolov 2013)

Die Einbringung von 2'-OMethyl an den Ribose-Ring bewirkt eine Erhöhung der Schmelztemperatur des siRNA-Duplexes um 0,5 - 0,7°C, wodurch eine verbesserte Thermostabilität erzeugt wird. Zusätzlich wird auch die Resistenz gegen Nucleasen verbessert. (Nikitenko und Prassolov 2013; Gavrillov und Saltzman 2012)

Zudem kann unter der Anwendung von 2'-O-Methyl- und 2'-Fluoro-Gruppen eine Steigerung der siRNA-Wirkung festgestellt werden. (Engels 2013)

Während die Einbindung einer 2'-O-Methoxyethyl- und 2'-Fluoro-Gruppe eine Reduktion der Immunogenität zeigen. (Engels 2013)

1.13.5 Forschungsschwerpunkte für eine klinische Anwendung von siRNA

Die größte Bedeutung in der Anwendung von siRNA besteht momentan in der Grundlagenforschung.

Die RNAi-Methodik wird das Knock-out-Tiermodell nicht ersetzen können, jedoch ist eine einfache Anwendung für Zellkulturversuche möglich. Hierdurch können verschiedene Wechselwirkungen und Funktionen von Genprodukten untersucht werden.

Über ein Screening des Genoms mit langen Doppelstrang-RNA-Sequenzen im nicht-Säugetier-Modell konnten zunächst für *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* über die RNAi-Methode Gene identifiziert werden, die an entscheidenden Prozessen, wie beispielsweise der Zellteilung, dem Aufbau der Zellmorphologie und der Apoptose, beteiligt sind. (Dorsett und Tuschl 2004)

Letztlich führte der Einsatz von kurzen Doppelstrang-RNA-Sequenzen (siRNA) auch zur Identifizierung von human-spezifischen Prozessen an verschiedenen angezüchteten Zelltypen. (Dorsett und Tuschl 2004)

In der Züchtung von Knockout-Mäusen dient die RNAi-Methode zu einer im Vergleich zur rekombinanten Methode beschleunigten Generierung entsprechender Mäuse-Stämme. Spleißvarianten innerhalb der Keimbahn können dabei mittels RNAi-Methode beeinflusst werden. Zudem besteht auf diese Weise die Möglichkeit, mehrere Gene gleichzeitig auszuschalten. (Dorsett und Tuschl 2004)

Für die klinische Anwendung gibt es durch ständig erweiterte Modifikationen und Bindungsvarianten zu siRNA-Sequenzen eine stetig zunehmende Zahl an Zielproteinen, die in der Krankheitsentstehung und deren Aufrechterhaltung eine Rolle spielen. Nach wie vor steht eine mögliche therapeutische Anwendung der RNAi-Methode im Zentrum der Forschung, jedoch konnte bisher noch kein Wirkstoff auf Basis der siRNA-Methode über das Stadium einer klinischen Studie hinaus eine Zulassung erhalten. Nachdem im Jahr 2009 die überhaupt erste Phase III Studie (COBALT-Studie) eines siRNA-Medikaments (*Bevasiranib*) abgebrochen wurde, als absehbar war, dass das Studienziel nicht erreicht werden konnte und eine geplante Folge-Phase-III-Studie (CARBON-Studie) mit veränderten Dosis-Schemata nicht verwirklicht wurde, zogen sich mehrere Pharma-Konzerne aus der weiteren Entwicklung der RNAi-Technologie wieder zurück. (Ledford 2010) Der siRNA-basierte Wirkstoff *Bevasiranib* sollte hierbei zur Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration eingesetzt werden.

Zur lokalen oder systemischen Anwendung erreichten mehr als 20 siRNA-Medikamente die Phase der klinischen Studien.

Zu den Krankheitsbildern, deren Behandlung mittels siRNA zunächst erfolgversprechend erschien und die in der Anwendung von siRNA eine klinische Studie durchliefen, zählen die altersbedingte Makuladegeneration oder das diabetische Makulaödem, die erblich bedingte Hauterkrankung *Pachyonychia congenita*, die Hepatitis C-Virusinfektion, die akute nicht-arteriitische anteriore ischämische Optikusneuropathie, das Glaukom, das trockene Auge, Infektionen

mit dem Respiratorischen-Synzytial-Virus, das akute Nierenversagen, die Hypercholesterinämie, die Transthyretin vermittelte Amyloidose und verschiedene solide Tumoren, darunter das Pankreaskarzinom. (Zhou et al. 2014)

Durch neuere Molekülkonstrukte zwischen siRNA und Antikörpern oder Aptameren, sowie zwischen siRNA und Proteinkomplexen, beispielsweise Ferritin, ergeben sich weitere spezifischere Behandlungsmöglichkeiten von Tumoren oder neurologischen Erkrankungen.

1.14 Fragestellungen und Ziele dieser Arbeit

Nach erfolgter aorto-koronarer Bypassoperation unter Verwendung von Bypassgewebe der Vena saphena magna versagen innerhalb des ersten Jahres 10-20% der venösen Bypässe und nach Ablauf von 10 Jahren sind noch 50% dieser venösen Bypässe offen. (Sabik 2011)

Eine sich aufrechterhaltene Entzündungsreaktion, die zur stetigen Einwanderung von Leukozyten in die Gefäßintima führt, beginnt mit der vermehrten Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen durch das operative Trauma und einer damit einhergehenden intra- und postoperativen Entzündungsreaktion. (Kim et al. 2013; Crook et al. 2000)

Zu den Adhäsionsmolekülen, die für die Leukozytenmigration verantwortlich sind, zählen P-Selectin (CD 62P), E-Selectin (CD 62E), ICAM-1 (CD 54) und ICAM-2 (CD 102), sowie VCAM-1 (CD106), die junktionalen Adhäsionsmoleküle (JAM) und PECAM-1 (CD 31) (Vestweber 2007; Carlos und Harlan 1994)

Während der aorto-koronaren Bypassoperation vergehen nach Entnahme der Gefäßstücke der Vena saphena magna bis zu ihrer Einnähung als Bypass bis zu 60 min. Die visionäre Grundlage dieser Arbeit stellt die Entwicklung einer Behandlungsmöglichkeit für das Endothelium dieser Venenstücke dar, wobei mittels spezifischer interferierender RNA-Sequenzen eine dauerhafte und ausschließliche Hemmung der aufgeführten Adhäsionsmoleküle erreicht werden soll. Ziel der Behandlung ist die Verbesserung der postoperativen Offenheitsrate von venösen Bypässen durch eine Reduktion der Leukozyteneinwanderung und damit verminderten Bildung von arteriosklerotischen Gefäßveränderungen.

Die Oberflächenmoleküle E-Selectin (CD 62E), ICAM-1 (CD 54) und VCAM-1 (CD 106) konnten in vitro an humanen Endothelzellen der Vena saphena magna bereits erfolgreich durch den Einsatz von siRNA gehemmt werden. (Walker et al. 2011; Walker et al. 2009; Walker et al. 2005) In gleicher Weise soll im Rahmen dieser Arbeit die siRNA-vermittelte Hemmung der Oberflächenmoleküle P-Selectin (CD 62P) und PECAM-1 (CD 31) dargestellt werden.

Die Aufgabenstellung gestaltete sich daher wie folgt:

- Zunächst bestand die laborexperimentelle Aufgabe in der Übernahme der etablierten Methoden zur Isolation, Kultivierung, Anzucht und Passagierung von humanen Endothelzellen der Vena saphena magna.
- Vor der Anwendung von spezifischer siRNA zur Hemmung des Adhäsionsmoleküls P-Selectin (CD 62P) auf angezüchteten Zellen der Vena saphena magna musste ein geeignetes Schema zur Zellaktivierung gefunden werden. Als methodische Verfahren standen die Durchflusszytometrie zum antikörperbasierten Proteinnachweis und die quantitative Real-time-PCR zum Nachweis der Genexpression auf mRNA-Ebene zur Verfügung.
- Mit den gleichen Verfahren sollte ein geeignetes Transfektionsschema zur spezifischen siRNA-vermittelten Hemmung des Obeflächenmoleküls PECAM-1 (CD 31) gefunden werden. Und nach dessen erfolgreicher Hemmung die Frage geklärt werden, inwieweit das angewendete Transfektionsschema zelltoxisch ist und ob die Expression von weiteren Molekülen durch die Anwendung der spezifischen siRNA beeinflusst werden.
- Für eine sichere Transfektion in vitro wie in vivo muss die verwendete siRNA-Sequenz auch nach Lösung in Serum, Vollblut und mit fetalem Kälberserum versetztem Endothelzellmedium stabil sein. Die Stabilität einer nicht modifizierten siRNA-Sequenz im Vergleich zu einer chemisch modifizierten sollte dabei bei Kontakt mit den drei angegebenen Substanzen untersucht werden. Als methodisches Verfahren stand die Gelelektrophorese zur Verfügung.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Brutschrank	Heraeus 6000, Fa. Heraeus GmbH, Deutschland
Durchflusszytometer	FACScan™, Fa. Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA
Gelelektrophoresekammer	Owl™ EasyCast™ B1A Mini Gel Electrophoresis Systems, Fa. Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Geldokumentationssystem	Universal Hood II gel doc, Fa. Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Hämatozytometer	Neubauer-Zählkammer, Fa. Hecht- Assistent GmbH & Co KG, Sondheim/Rhön, Deutschland
Inverses Mikroskop	Axiovert 135, Fa. Zeiss AG, Jena, Deutschland
PCR-Gerät (Cycler)	Mastercycler® Gradient, Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
PCR-Geräte (qRT-PCR)	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System, Fa. Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Photometer	BioPhotometer®, Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten	Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Spektralphotometer	Ultrospec II, Fa. LKB Biochrom Ltd., Science Park, Cambridge, Großbritannien
Tischzentrifuge	Labofuge GL, Fa. Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
Wasserbad	Ecotherm E10, Fa. Dinkelberg analytics GmbH & Co. KG, Gablingen, Deutschland
Werkbank	(Gerät 1) HeraSafe HS 12, Fa. Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland (Gerät 2) Fa. BDK Luft- und Raumtechnik GmbH, Sonnenbühl- Genkingen Deutschland
Zentrifugen	Cryofuge 5500i, Fa. Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Bulldogklemmen	
Eppendorfgefäß 0,2 ml - 2 ml	Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
FACS-Röhrchen	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Falcon-Röhrchen 15 und 50ml	Fa. Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA
Küvetten	Halb-Mikro-Küvette, 10x4 mm, Fa. SARSTEDT AG & Co. Nümbrecht, Deutschland UVette®, 220 bis 1600 nm, Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Multi-well Zellkulturplatten	Costar® 12 Well Clear TC-Treated Multiple Well Plates Costar® 6 Well Clear TC-Treated Multiple Well Plates, Fa. Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
S-Monovette® 7,5ml, braun - Serum	Fa. SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Safety-Multifly® Blutentnahmekanüle	Fa. SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
75 cm ² Zellkulturflaschen	Corning® 75cm ² Rectangular Canted Neck Cell Culture Flask, Fa. Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande

2.1.3 Verwendete Reagenzien

2.1.3.1 Reagenzien zur Zellisolation und Zellanzucht

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Amphotericin B	Fa. PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Detach-Kit® (HepesBSS (30 mM Hepes); Trypsin/ EDTA-Solution (0.04 % / 0.03 %); Trypsin Neutralisation Solution)	Fa. PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Endothelzellmedium: Endothelial Cell Basal Medium 2® + Endothelial Cell Growth Medium 2 SupplementPack® (<i>Fetal Calf Serum, Epidermal Growth Factor, Vascular Endothelial Growth Factor, basic Fibroblast Factor, Insulin-like Growth Factor (Long R3 IGF), Asorbic Acid, Heparine</i>)	Fa. PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland

Gelatine	Fa. Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, Missouri, USA
Gentamicin	Fa. PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Kollagenase II	Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Lösung zum Spülen der Venen: - 137 mM NaCl (8,006g) - 5,4 mM KCL (0,403g) - 4,2 mM NaHCO ₃ (0,353g) - 5 mM D-Glucose (0,901g) ad 500 ml Ampuwa, pH 7,3	Fa. Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, Missouri, USA Fa. Merck KGaA, Darmstadt Deutschland
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (Dulbecco's PBS)	Fa. PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturmedium: RPMI 1640	Fa. Lonza Group Ltd, Basel Schweiz

2.1.3.2 Reagenzien zur Zelltransfektion und siRNA-Sequenzen

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
INTERFERin™ siRNA transfection reagent	Fa. Polyplus-transfection Inc., New York, USA
siRNA E-Selectin 5 nmol sense: 5`-r(GGUUGAAUGCACCACUCAA)dTdT antisense: 5`-r(UUGAGUGGUGCAUUCAACC)dTdG	Fa. QIAGEN N.V., Hilden, Deutschland
siRNA PECAM-1, 5 nmol (Hs_PECAM1_1) sense: 5`-r(CAAUACACUUCACAAUUGA)dTdT antisense: 5`-r(UCAAUUGUGAAGUGUAUUG)dTdT	Fa. QIAGEN N.V., Hilden, Deutschland

siRNA P-Selectin, 5 nmol (Kit Lot: ASO00BK7) sense: (siRNA a) 5`-GGUCCUACCCUACUACAGCtt antisense: 5`-GCUGUAGUAGGGUAGGACctt	Fa. Ambion, Inc., Austin, Texas, USA
siRNA P-Selectin 5 nmol (Kit Lot: ASO00BK8) sense: (siRNA b) 5`-GGAACAACGAGGACUGCGUtt antisense: 5`-ACGCAGUCCUCGUUGUUCctt	Fa. Ambion, Inc., Austin, Texas, USA
siRNA P-Selectin 5 nmol (Kit Lot: ASO00BK9) sense: (siRNA c) 5`-GGAAGGUUUUCUCCACUUtt antisense: 5`-AAAGUGGAGAAAACCUUCctt	Fa. Ambion, Inc., Austin, Texas, USA
AllStars Negative Control siRNA siRNA (scramble), 5 nmol (non silencing) sense: 5`-UUCUCCGAACGUGUCACGudTdT-3` antisense: 5`-ACGUGACACGUUCGGAGAAAdTdT-3`	Fa. QIAGEN N.V., Hilden, Deutschland

2.1.3.3 Reagenzien zur durchflusszytometrischen Messung

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Anti-CD 31 PE-konjugierter Antikörper (PE-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody) Klon WM-59	Fa. BD Pharmingen™; Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA

Anti-CD 62E PE-konjugierter Antikörper (PE-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody) Klon 68-5H11	Fa. BD Pharmingen™; Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA
Anti-CD 62P PE-konjugierter Antikörper (PE-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody) Klon AK-4	Fa. BD Pharmingen™; Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA
0,5% fetales Kälberserum (FCS) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS)	Fa. Merck KGaA, Darmstadt Deutschland
2,5%iges Paraformaldehyd in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS)	Fa. Merck KGaA, Darmstadt Deutschland

2.1.3.4 Reagenzien zur Zellaktivierung

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
rekombinantes humanes Interferon- γ	Fa. BIOMOL GmbH, Hamburg, Deutschland
rekombinantes humanes Interleukin 1 β	Fa. PeproTech Inc., New York, USA
rekombinater humaner Tumornekrosefaktor- α	Fa. BD Pharmingen™; Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA

2.1.3.5 Reagenzien zur Durchführung der quantitativen real-time PCR

I.) Reagenzien zur RNA-Isolation

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Pack	Fa. Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Aurum™ Total RNA Mini Kit	Fa. Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA

II.) Reagenzien zur cDNA-Synthese

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Fa. Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA

III.) Farbstoff zum Nachweis von Doppelstrang-DNA im Rahmen der qRT-PCR

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
iQ™ SYBR® Green Supermix	Fa. Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA

IV.) Primer-Sequenzen zur Durchführung der quantitativen real-time PCR

Hersteller: Operon Biotechnologies GmbH, Köln, Deutschland

<i>Bezeichnung</i>	<i>Sequenzname</i>	<i>Sequenz von 5`nach 3`</i>
E-Selectin	Selectin E for.	GCCCAGAGCCTTCAGTGTACC
	Selectin E rev.	GGAATGGCTGCACCTCACAG
GAPDH	humGAPDH for.	TCAACAGCGACACCCATCC
	humGAPDH rev.	TGAGGTCCACCACCCTGTTG
ICAM-1	humICAM-1 for.	CTTGAGGGCACCTACCTCTGTC
	humICAM-1 rev.	CGGCTGCTACCACAGTGATG
PECAM-1	Pecam1 for.	GAACGGAAGGCTCCCTTGA
	Pecam1 rev.	AGGGCAGGTTCATAAATAAGTGC
P-Selectin	PSel. for.	TTGGGACAGTGGACAGCACC
	PSel. rev.	AGCACACTTGCTCCCACCAG
VCAM-1	VCAM-1 for.	CCGTCTTGGTCAGCCCTT
	VCAM-1 rev.	GAGGCTGTAGCTCCCCGTTAG

2.1.3.6 Reagenzien zur Toxizitätsmessung nach mehrfacher Transfektion

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, Missouri, USA
Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit (V-13154)	Fa. Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, USA

2.1.3.7 Reagenzien zur Durchführung von siRNA-Stabilitätstests

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Agarose Tiny LMH (low melt)	Fa. Genaxxon BioScience GmbH, Ulm, Deutschland
Gelred™ Nucleic Acid Gel Stain	Fa. Biotium, Inc., Hayward, Kalifornien, USA
6x Ladepuffer	Fa. peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
10x MEN-Puffer - 41,8 g/l (200 mM) MOPS, - 4,1 g/l (50 mM) NaAc, - 2,92 g/l (10 mM) EDTA mit destilliertem (entmineralisiertem) Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.	Fa. Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, Missouri, USA Fa. Merck KGaA, Darmstadt Deutschland
peqGold ultra low range DNA-Leiter I	Fa. peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
siRNA (human) E-Selectin, modified (+: 2'-OMethyl, s: Phosphorothioate) sense: 5`-GGUUGAAUGCACCACUCAAAs+Us+U-3` antisense: 5`-UUGAGUGGUGCAUUCAACCs+Us+U-3`	Fa. CureVac GmbH, Tübingen, Deutschland
siRNA VCAM-1 (porcin), (781) sense: 5`-r(UCCCUCCACAAGCCUACAA)dTdT antisense: 5`-r(UUGGAGGCUUGUGGAGGGA)dTdT	Fa. QIAGEN N.V., Hilden, Deutschland

2.1.4 Gewebe und Blutkomponenten

2.1.4.1 Humane Endothelzellen

Die Isolation von humanen Endothelzellen erfolgte aus Venenresten der Vena saphena magna. Entsprechende Venenstücke werden im Rahmen einer aorto-koronaren Bypass-Operation von einem Bein des Patienten entnommen und dienen anastomosiert mit Aorta und dem distalen Abschnitt des jeweiligen Koronargefäßes als Überbrückung von Koronarstenosen zur Verbesserung der Blutversorgung des nachgeschalteten Myokardareals.

Überschüssige Venenreststücke dieser Operation wurden dem Klinischen Forschungslabor übergeben. Die Patienten stimmten der Gewebespende zu, ebenso liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Tübingen vor. (Votum Nr. 416/2003)

2.1.4.2 Serum und Vollblut

Zur Durchführung der Stabilitätsversuche mit siRNA wurden kurz vor Versuchsbeginn freiwilligen Spendern (Labormitarbeiter) geringe Mengen an Vollblut mittels S-Monovette und Butterfly-Kanüle entnommen.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Arbeiten und Versuche fanden in den Räumlichkeiten des Klinischen Forschungslabors der Abteilung für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie statt.

Die Zellisolation und Zellkultivierung, Transfektionen, Stimulationen und Vorbereitungen zur durchflusszytometrischen Messung, sowie zur quantitativen Real-time PCR fanden unter Reinraumbedingungen (Laminar-Luftstrom-Werkbank) mit sterilem Instrumentarium statt. Zellkulturflaschen und nicht sterilisierbare Gegenstände wurden vor Gebrauch mit 70%igem Alkohol abgewischt. Zudem bestand in den Räumlichkeiten der Zellkultur Handschuh- und Laborkittelpflicht.

Die Zellkultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Anteil im Luftgemisch. Das zur Zellkultivierung verwendete Medium war Endothelial Cell Basal Medium 2 (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) mit Zusätzen (supplements) (FCS-10, hEGF, VEGF, hbFGF, R3 IGF, Ascorbic Acid, Heparin, Gentamicin, Amphotericin B).

2.2.1.1 Isolierung von humanen Endothelzellen der Vena saphena magna

Nach Abschluss einer aorto-coronaren Bypass-Operation (aorto-coronarer Venen-Bypass, ACVB) wurden nicht verwendete Venenreste der Vena saphena magna in einem verschlossenen Behältnis mit physiologischer Kochsalzlösung unverzüglich zur weiteren Aufarbeitung ins Labor gebracht. Zunächst wurden die Venenreste außen von anhaftendem Gewebe wie Fett oder Bindegewebsanteilen befreit, wobei gleichzeitig die beiden Enden um jeweils zwei bis drei Millimeter abgesetzt und sofort verworfen wurden. Um ein späteres Kontaminationsrisiko mit Bakterien noch weiter zu minimieren wurden die Venenstücke zunächst in Medium mit Antibiotikum (RPMI 1640 mit Gentamycin) für 20 min eingelegt und anschließend von außen mit einem in 70%igem Alkohol getränkten Tupfer abgewischt. In der Folge wurden die Gefäßreste zweimal mit einer Puffer-Spüllösung und anschließend mit 5 ml 0,05%iger Kollagenaselösung

durchspült. In erster Linie diene dieser Vorgang dem Herauslösen von Blutbestandteilen aus dem Gefäßlumen.

Zur eigentlichen Isolierung der Endothelzellen wurden die Venenstücke an beiden Enden mit Bulldogklemmen verschlossen, mittels stumpfer Kanüle mit 0,05%iger Kollagenaselösung befüllt, anschließend mit einigen Tropfen Endothelmedium befeuchtet und abgedeckt für 1,5 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank aufbewahrt.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde die in den Gefäßstücken befindliche Zellsuspension mit einem 15 ml Falcon aufgefangen und die Venenstücke anschließend mit 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) nachgespült, was ebenfalls im Falcon aufgefangen wurde. Die aufgefangene Flüssigkeit wurde 5 min bei 220 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das sich im Gefäß gebildete Pellet mit 500 µl Endothelzellmedium resuspendiert. Das dabei gewonnene Zell-Medium-Gemisch wurde in ein zuvor mit 0,1%iger Gelatine beschichtetem und mit 2 ml Endothelzellmedium befülltem Loch einer 6-Well-Platte (9,6 cm² Wachstumsfläche) pipettiert. (Nachman und Jaffe 2004; Lüders et al. 2003; Jaffe et al. 1973)

Die Kultivierung der Endothelzellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Anteil im Luftgemisch.

Der erste Mediumwechsel erfolgte am Folgetag nach Zellisolation und diene dem Auswaschen von Zelldebris und toten Zellen, danach wurde alle 3 Tage das Endothelzellmedium gewechselt. Ein Umsetzen der Zellen in eine Zellkulturflasche erfolgte bei einer Konfluenz von etwa 70-80%. Die Endothelzellen nehmen dabei ein pflastersteinartiges Aussehen an. Nach mikroskopischer Kontrolle wurden Zellbestände mit unreinem Zellbild verworfen. Unerwünschte Zellanteile sind hierbei zum Beispiel Fibroblasten.

2.2.1.2 Passagierung der Zellkultur

Zellen, die im Well einer 6-Well-Platte nach der Isolation eine Konfluenz von > 70-80% erreicht hatten, konnten in eine Zellkulturflasche überführt werden.

Zunächst erfolgte eine Beschichtung der Wachstumsfläche der Zellkulturflasche mit 0,1%iger Gelatine-Lösung. Hierbei wurde eine 175 cm²- Zellkulturflasche mit 5-10 ml 0,1%iger Gelatine-Lösung befüllt, worauf dabei geachtet wurde, dass die Wachstumsfläche der Flasche mit Flüssigkeit gleichmäßig bedeckt war. Diese wurde anschließend für 10 min bei 37°C und 5% CO₂ in den Brutschrank gestellt. (Marin et al. 2001; Relou et al. 1998)

Das Medium aus dem Well wurde entfernt, es erfolgte zunächst ein Mediumwechsel zur Abnahme von Zelldebris und anschließend eine Spülung der noch anhaftenden Endothelzellen mit 2 ml HEPES-gepufferter Salzlösung (HepesBSS).

Der Ablösevorgang erfolgte durch Zugabe von 1150 µl Trypsin/EDTA-Lösung, wobei die Zellkulturplatte unter Kontrolle des Ablösevorgangs über ein Invers-Mikroskop vorsichtig beklopft wurde. Waren alle Zellen abgelöst, konnte 1150 µl TNS (*Trypsin Neutralization Solution*) zugegeben werden. Die Zellsuspension wurde nun in ein 2 ml-Eppendorff-Cup überführt und für 5 min bei 220 g zentrifugiert.

Währenddessen wurde die zuvor mit Gelatine beschichtete Zellkulturflasche mit 15 ml auf 37°C angewärmtem Endothelzellmedium befüllt.

Der Überstand aus dem Eppendorffgefäß wurde anschließend abgesaugt und das Zellpellet mit 500 µl Kompletmedium resuspendiert. Diese gewonnene Zellsuspension konnte unverzüglich in die bereits vorbereitete Zellkulturflasche pipettiert werden.

Ausgehend von dieser ersten Passage konnte im weiteren Verlauf der Zellbestand bei einer Konfluenz von >80% auf 6 weitere Zellkulturflaschen verteilt werden. (entsprechend 2. Passage).

Analog zu dem bereits beschriebenen Vorgang werden bei der Passagierung lediglich größere Mengen der bereits erwähnten Chemikalien zur Ablösung der Endothelzellen aus einer 175 cm²-Zellkulturflasche verwendet:

- 10 ml HEPES gepufferte Salzlösung (HepesBSS)
- 7,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung und
- 7,5 ml Trypsin neutralisierende Lösung

Die aus einer 175 cm² Zellkulturflasche gewonnenen Endothelzellen werden auf 6 mit 0,1%iger Gelatine beschichteten und mit 15 ml Endothelzellmedium befüllten Zellkulturflaschen verteilt.

Der erste Mediumwechsel erfolgte auch hier am Folgetag zur Entfernung von nicht anhaftenden Zellen, anschließend alle drei Tage.

Die Anzüchtung von Endothelzellen für Einzelversuche erfolgte in gelatinebeschichteten 12-Well-Platten (3,9 cm² Wachstumsfläche pro Well), wobei nach Konzentrationsbestimmung mittels Hämatozytometer nach Neubauer eine Zelldichte von 100.000 Zellen pro Loch angestrebt wurde.

Zur Bestimmung der Zellkonzentration werden 20 µl der Zellsuspension mit 80 µl 0,5%iger Trypanblau-Lösung vermischt. Nach dem Reinigen der Zählkammer wird das leicht angefeuchtete Deckglas auf die Trägerstege aufgesetzt. Das Erscheinen von farblichen Ringen (Newtonsche-Interferenzfarben) zeigt dabei den korrekten Sitz des Deckglases mit einem Abstand von 0,1 mm an. An die Seite aufpipettierte Flüssigkeit wird über Kapillarkräfte unter das Deckglas aufgenommen. Die Auszählung erfolgte in den 4 äußeren Quadranten, wobei das Ergebnis durch 4 geteilt, um einen Durchschnittswert für einen Quadranten zu erhalten und anschließend mit 10 multipliziert wurde, da ein Eckquadrant das Volumen von 0,1 µl enthält. Zuletzt wurde das Ergebnis mit 5 multipliziert aufgrund der angewendeten Verdünnung mit der Trypanblau-Lösung.

Einzelne Wells der 12-well-Platte wurden mit 1 ml Endothelmedium befüllt und im Brutschrank bis zur Anhaftung der Zellen für einen Tag inkubiert.

2.2.2 Versuchsanordnung zur Darstellung des Oberflächenrezeptors P-Selectin (CD 62P) und Rezeptorhemmung mittels siRNA

2.2.2.1 Zellanzucht

Da der zu untersuchende Rezeptor P-Selectin (CD 62P) intrazellulär in Speicherkörpern vorliegt (Lowenstein et al. 2005), die Ausbildung dieser Zellorganellen mit fortschreitender Zellpassagierung jedoch verloren gehen kann, wurden für diesen Versuch lediglich humane Endothelzellen der Vena saphena magna der ersten Passage verwendet. (Scoumanne et al. 2002)

Die Zellen einer Zellkulturflasche wurden bei einer Konfluenz von >80% auf sieben 12-Well-Platten verteilt, wobei pro Well etwa 30000 Zellen angezchtet wurden.

Ausgehend vom ersten Tag nach Umsetzung der Zellen, an dem der erste Mediumwechsel erfolgte, wurde dieser alle 3 Tage bis zu einer Konfluenz der Zellen von etwa 80% wiederholt.

Zum Nachweis der Reinheit der Zellkultur erfolgte als zusätzliches endothelspezifisches Merkmal die Darstellung des Endothelrezeptors PECAM-1 (CD 31). (Scoumanne et al. 2002)

Die Stimulation der Endothelzellen zur Darstellung des Oberflächenrezeptors P-Selectin (CD 62P) erfolgte im Vergleich pro Well mit einer Kombination aus einerseits 100 ng/ml Gamma-Interferon (IFN- γ) + 10 ng/ml Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und andererseits 10 ng/ml Interleukin-1 β (IL-1 β) und 10 ng/ml Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Als Grundlage dienten hierbei Versuchsveröffentlichungen zur Expression von P-Selectin (CD 62P) an humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) (Daxecker et al. 2002; Raab et al. 2002)

Da der zu untersuchende Rezeptor P-Selectin (CD 62P) intrazellulär in Zellorganellen vorliegt (Weible-Palade-Bodies) und nach Zellaktivierung sehr schnell exprimiert werden kann, erfolgte für das Zeitintervall von 15 min zusätzlich ein Vergleich der Rezeptorexpression ohne Vorstimulation mit der Rezeptorexpression nachdem die Zellen bereits ein erstes Mal 12 Stunden zuvor

für 2 Stunden mit der gleichen Wirkstoffkombination aktiviert wurden. (Rondaij 2006; Lowenstein et al. 2005; Hannah et al. 2002)

Weitere Zeitintervalle zur Untersuchung der Rezeptorexpression von P-Selectin (CD 62P) waren 6 und 16 Stunden nach Aktivierung.

Für jede der beiden Stimulationswege wurde die Wirkung von drei siRNA-Sequenzen gegeneinander verglichen:

- siRNA P-Selectin 5 nmol (Kit Lot: ASO00BK7) – siRNA a
- siRNA P-Selectin 5 nmol (Kit Lot: ASO00BK8) – siRNA b
- siRNA P-Selectin 5 nmol (Kit Lot: ASO00BK9) – siRNA c

Als Negativprobe diente eine intrazellulär nicht bindende siRNA-Sequenz mit einer Nukleinsäureabfolge, die keine spezifische Proteinhemmung verursacht.

- siRNA (scramble), 5 nmol (*non silencing*) – siRNAscr

Zur Sicherstellung der Reproduzierbarkeit wurde jeder Versuch dreimal wiederholt und bestand jeweils aus drei identischen Versuchsansätzen.

Zum Nachweis einer erfolgreichen Transfektion unter dem verwendeten Transfektionsmittel INTERFERin™ wurde zusätzlich eine Transfektion gegen den Oberflächenrezeptor E-Selectin (CD 62E) anhand eines Versuches mit drei Ansätzen durchgeführt.

2.2.2.2 Transfektion

Eine Transfektion erfolgte frühestens 24 Stunden nach Aussaat der Zellen. Da in diesem Fall eine Anzucht einer geringen Zahl an Endothelzellen aus der ersten Passage erfolgte, wurde der Zeitraum bis zur Transfektion um wenige Tage bis zum Erreichen einer Konfluenz von etwa 70-80% verlängert.

Als Transfektionsmethode wurde die Lipotransfektion gewählt und als Transfektionsmittel wurde INTERFERin™ verwendet. Im Gegensatz zur viralen Transfektion ergeben sich bei der Lipotransfektion weniger Wechsel- und Nebenwirkungen, zudem ist sie einfacher durchzuführen.

Grundlage der Transfektion sind Komplexe (Lipoplexe) aus Nukleinsäure (siRNA) und kationischen Lipiden, die an die Zellmembran binden und per Endozytose in das Zellzytosol aufgenommen werden. (Ma und Diamond 2001)

Die Bildung der Lipoplexe erfolgt spontan durch elektrostatische Anziehung. Anionische Nukleinsäuren lagern sich an die in Mizellen-Formation vorliegenden kationischen Lipide an und nach Durchmischung bilden sich innerhalb weniger Minuten konzentrisch angeordnet mehrlagige Schichten aus Nukleinsäure und Lipiden. (Dan und Danino 2014)

Für diesen Vorgang dürfen keine Proteinbestandteile und kein Serum im Endothelzellmedium vorhanden sein, da Serumbestandteile, wie Albumin, die Komplexbildung mit Nukleinsäure vermindern und selbst mit den Lipiden Bindungen eingehen. (Tandia et al. 2003)

Vor der durchzuführenden Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel, wobei jeweils 1 ml Kompletmedium in jedes Well einer 12-well-Platte gegeben wurde. Nach Herstellerangaben (INTERFERin™) kann hierbei Endothelzellmedium mit Serum verwendet werden.

Zur Bildung der Transfektionskomplexe wurde pro Well 0,8 µl siRNA-Stammlösung und 2 µl Transfektionsreagenz (INTERFERin™) in 200 µl Basalmedium ohne Zusätze und ohne Antibiotikum pipettiert und der Versuchsansatz rasch durch Vortexen gemischt. Es folgte eine Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur bevor die Transfektionskomplexe zum bereits gewechselten Kompletmedium auf die Zellen pipettiert werden konnten. Die Konzentration an siRNA pro Loch betrug 13,3 nM.

Anschließend erfolgte eine Inkubation von 24 Stunden zur Transfektion im Brutschrank bevor das Medium erneut gewechselt werden musste. Nach weiteren 24 Stunden konnte die Aktivierung der Zellen vorgenommen werden.

2.2.2.3 Zellaktivierungen

Zur Darstellung des Oberflächenrezeptors P-Selectin (CD 62P) erfolgte eine Aktivierung der Zellen im Vergleich mit einerseits 100 ng Interferon-γ (IFN-γ) und 10 ng Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) und andererseits 10 ng Interleukin-1β (IL-1β) und 10 ng Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) für die Zeiteinheiten 15 min, 15 min nach Voraktivierung (12 Stunden zuvor für 2 Stunden), 6 Stunden und 16 Stunden. (Raab et al. 2002)

Zur Kontrolle der Transfektion erfolgte eine Aktivierung der Zellen mit 10 ng Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) für 6 Stunden zur Darstellung des Oberflächenrezeptor E-Selectin (CD 62E). (Nishiwaki et al. 2003)

Die Menge wurde jeweils pro Well einer 12-well-Platte zu der bereits vorhandenen Menge von 1 ml Komplettmedium gegeben.

2.2.2.4 Durchflusszytometrie

In der Vorbereitung zur Durchflusszytometrie erfolgte nach Ablauf der Aktivierung zunächst ein erneuter Wechsel des Komplettmediums, anschließend wurde 1 ml raumtemperiertes 0,5%iges fetales Kälberserum (FCS) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und 5 μ l des jeweiligen PE-konjugierten Antikörpers (anti-CD 62P oder anti-CD 62E) auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend bei 4°C für eine Stunde inkubiert. Wie bereits beschrieben, konnte dann der Ablösevorgang mit HapesBSS, Trypsin/ EDTA-Solution und Trypsin Neutralisation Solution durchgeführt werden. Die abgelösten Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen überführt, bei 220 g für 5 min zentrifugiert und nach dem Absaugen des Überstandes zur Fixierung der Zellen mit 125 μ l 2,5%igem Formaldehyd in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) resuspendiert.

Messungen wurden mit einem FACScanTM (*fluorescence-activated cell sorting*) (Firma Becton, Dickinson and Company) erhoben.

Die Zellsuspension wird zur Auswertung in eine Mikrokapillare (*flow chamber*) aufgenommen, die es ermöglicht, mehrere tausend Zellen innerhalb von Sekunden einzeln optisch zu analysieren.

Die Zellen passieren dabei einen Laserstrahl der Wellenlänge 488 nm. Im Moment der Passage wird ein in alle Richtungen divergierendes Streulicht hervorgerufen.

Die Analyse des Streulichts aus der Richtung des Laserstrahls (*forward angle light scatter*) dient dabei für Rückschlüsse auf die relative Zellgröße und die Detektion des Streulichts im Winkel von 90° (*side angle light scatter*) dient zur Einordnung der relativen Zellgranularität. Zusätzlich emittieren mit Fluorochromen

markierte Zellen oder Partikel nach Anregung durch den Laserstrahl Licht in einer spezifischen Spektralzusammensetzung.

Für diese Versuchsreihe wurde zur Darstellung des Oberflächenrezeptors P-Selectin (CD 62P) der an Antikörper gebundene fluoreszierende Farbstoff Phycoerythrin (PE) verwendet, der nach Anregung durch den Laserstrahl gelbes Licht emittiert, das über den Fluoreszenz-Kanal FL2 des Durchflusszytometers (FACScan™) detektiert wird. (Jaroszeski und Radcliff 1999)

Beispiele für weitere Fluorochrome mit der zugehörigen Lichtemission sind:

- Fluoresceinisothiocyanat (FITC) - grün, Detektion über Fluoreszenz-Kanal FL1
- Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex (PerCP) - rot, Detektion über Fluoreszenz-Kanal FL3

Für die Durchflusszytometrie wurden in diesem Fall 10.000 Zellen pro Probenröhrchen analysiert.

Die Auswertung erfolgte als Diagramm, wobei die Zellzahl gegen die relative Fluoreszenz (FL2) aufgetragen wurde.

2.2.2.5 Der Nachweis der Genexpression auf mRNA-Ebene

Zur Bestätigung der über die Durchflusszytometrie erhobenen Daten erfolgte eine relative Quantifizierung der mRNA-Menge zum Oberflächenmolekül P-Selectin (CD62P) mittels quantitativer Real-time-PCR (Polymerase-Kettenreaktion).

Da Auswertungen der Durchflusszytometrie zum Adhäsionsmolekül P-Selectin nur eine minimale Steigerung der Expression nach Aktivierung zeigten, erfolgten Untersuchungen zur Genexpression auf mRNA-Ebene lediglich anhand eines Versuches mit jeweils drei identischen Datenerhebungen. Auch hierzu wurde eine Anzucht von Zellen der ersten Passage durchgeführt und eine anschließende Zellaktivierungen mit IFN- γ + TNF- α und IL-1 β + TNF- α im Vergleich für die Zeitintervalle 15 min, 6 Stunden und 16 Stunden vorgenommen. (siehe 2.2.3.3)

Zusätzlich wurden entnommene Venenstücke der Vena saphena magna über eine Zeitreihe von 30 min bis 6 Stunden ohne weitere Zellisolation aktiviert und die Genexpression auf mRNA-Ebene der Oberflächenmoleküle P- und E-Selectin im Vergleich über die quantitative Real-time PCR erhoben.

Die zur Verfügung stehenden Venenstücke wurden hierzu zunächst mit phosphatgepufferter Salzlösung gespült und anschließend in etwa 1x1 mm große Einzelstücke mit einer Rasierklinge zerteilt. Besonderes Augenmerk wurde auf den möglichst schonenden Umgang mit der Endothelzellschicht gerichtet. Anschließend wurden die Venenstücke einzeln zu 1 ml Endothelzellmedium in die Löcher einer 12-well-Platte gelegt. Bei dieser Menge an Medium waren die Gewebestücke vollständig mit Flüssigkeit umspült. Bis zur Aktivierung wurden die Gewebestücke für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt.

Im Vergleich erfolgte eine Stimulation der Gewebestücke mit einerseits 100 ng Interferon- γ (IFN- γ) und 10 ng Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und andererseits 10 ng Interleukin-1 β (IL-1 β) und 10 ng Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) für die Zeitintervalle 30 min, 1 Stunde, 2 Stunden, 4 Stunden und 6 Stunden. Zur Sicherstellung der Reproduzierbarkeit wurde in diesem Fall jeder Versuch dreimal wiederholt und bestand jeweils aus drei identischen Versuchsansätzen. Nach Abschluss der Aktivierungszeit wurden die Gewebestücke durch das Eintauchen in flüssigen Stickstoff schockgefroren und konnten anschließen bei -80°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert werden.

I.) RNA-Isolierung

Die Bestimmung der Genexpression eines Oberflächenproteins im Rahmen der quantitativen Real-time PCR erfolgte auf Grundlage der Transkriptmenge der jeweiligen zugehörigen mRNA (messenger RNA).

Die mRNA als Informationsschlüssel für den Proteinaufbau stellt dabei einen Umschrieb einer zu einem Gen gehörenden DNA-Sequenz dar.

Die RNA-Isolierung aus Gewebestücken erfolgte mit dem AurumTM Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Pack und die RNA-Extraktion aus angezüchteten Zellen

der Zellkultur wurde mit dem Arium™ Total RNA Mini Kit durchgeführt. Beide stammen von der Firma Bio-Rad Laboratories.

Eine selektive Nukleinsäure-Bindung erfolgt dabei über Zentrifugationssäulen (*RNA binding mini column*), die eine Silikamembran enthalten, wobei abhängig vom pH-Wert und Salzgehalt der Spüllösungen Nukleinsäuren reversibel an die Membran binden. Zunächst jedoch müssen aufzuarbeitende Zellen und Gewebe homogenisiert werden. Abweichend von den Herstellerangaben erfolgte eine geringfügige Optimierung des RNA-Isolierungsprotokolls.

a) angezüchtete und aktivierte Endothelzellen

Im Falle der in 12-well-Platten angezüchteten Endothelzellen erfolgte daher zunächst eine Waschung pro Loch mit 1ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). Anschließend wurde 350 µl Lyse-Puffer zugegeben, was unter zusätzlicher Ausnutzung der Scherkräfte beim mehrmaligen starken Hoch- und Runterpipettieren zu einer schnellen Ruptur der Zellmembranen führte.

Nach Zugabe von 350 µl 70%igem Ethanol konnte die Suspension aus Zellbestandteilen auf die Trennsäulen gegeben werden.

b) aktivierte Gewebestücke

Die gefrorenen Gewebestücke hingegen wurden unter Zugabe von 100 µl PureZOL™-Lösung mit einem Mörser in einem 2 ml Eppendorfgefäß zerdrückt. Wichtig war dabei, dass die Gewebestücke vor Beginn der Prozedur nicht auftauen durften. Anschließend wurden weitere 400 µl PureZOL™-Lösung zugegeben, die Suspension für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und die verschlossenen Gefäße zwischendurch geschüttelt. Zuletzt wurde 100 µl Chloroform zugeben und nach kräftigem Schütteln erneut eine Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur eingehalten.

Das Lysat konnte nun bei 12.000 g und 4°C für 15 min zentrifugiert werden.

Als Ergebnis zeigten sich drei aufgetrennte Flüssigkeitsphasen, wobei lediglich die oberste zur weiteren Aufbereitung verwendet und der Rest verworfen wurde. Zu der abgenommenen obersten Flüssigkeitsphase wurde in etwa die gleiche

Menge 70%iger Alkohol zugegeben und nach Durchmischung auf die Trennsäulen gegeben.

Mit dem Aufbringen des Lysats auf die Trennsäulen folgte eine einheitliche Prozedur.

Die beladenen Trennsäulen wurden in ein Eppendorfgesäß gestellt und zunächst bei 12.000 g für 30 sec zentrifugiert. Das Filtrat wurde anschließend verworfen.

Zum Herauslösen der DNA-Bestandteile folgte ein Waschvorgang mit 700 µl low-stringency-wash-Puffer. Nach erneutem Zentrifugieren mit 12.000 g für 30 sec wurde das Filtrat auch dieses Mal verworfen.

Anschließend erfolgte für 25 min bei Raumtemperatur ein DNA-Verdau mit 80 µl verdünnter DNase I, die auf die Säulen pipettiert wurde.

In der Folge wurden zum Herauslösen der DNA-Bestandteile zwei Spülungen mit zunächst High-stringency-wash-Puffer und anschließend Low-stringency wash-Puffer durchgeführt.

Nach dem Verwerfen des letzten Filtrates wurde die Säule nochmals für 2 min trocken zentrifugiert.

Zum Herauslösen der RNA wurde nach einem Wechsel des Eppendorfgesäßes in die Mitte der Membran jeder Säule 80 µl auf 70°C erwärmte Elutions-Lösung pipettiert und nach einer Inkubationszeit von einer Minute zum Schluss für 2 min bei 12.000 g zentrifugiert. Das Filtrat diente nach Bestimmung der RNA-Konzentration als Grundlage für die Umschreibung in cDNA.

Die RNA-Konzentrationsbestimmung für jede Probe erfolgte spektralphotometrisch mit der Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm. Hierzu wurden zunächst 5 µl der gewonnenen RNA-Lösung abgenommen und mit 45 µl Aqua dest. verdünnt. Ausgehend vom maximalen Absorptionsspektrum für Nucleinsäuren bei 260 nm wurde die Konzentration an RNA in µg/ml vom verwendeten BioPhotometer der Firma Eppendorf nach Programmierung berechnet. Aus dem Quotienten der Messung der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteine) kann die Reinheit der Probe ermittelt werden. Der Quotient sollte dabei möglichst über 1,6 liegen.

Für die Umschreibung in cDNA wurde aus den RNA-Stammlösungen die entsprechende Menge für 200 ng RNA entnommen und das Endvolumen mit Nuklease freiem Wasser auf exakt 15 µl erhöht.

II.) cDNA-Synthese

Da die für die Amplifikation der Nukleinsäure im Rahmen der quantitativen Real-time PCR verwendete Polymerase DNA-abhängig ist, muss zuvor der gesamte gewonnene RNA-Pool in DNA umgeschrieben werden. Man spricht hierbei von komplementärer DNA (cDNA). Das hierzu verwendete Enzym ist die Reverse Transkriptase (RT), eine RNA-abhängige DNA-Polymerase viralen Ursprungs. Für diesen Vorgang sind keine spezifischen Primer als Startpunkt für die Amplifikation zwingend notwendig, um jedoch die Effizienz der cDNA-Gewinnung zu verbessern und die Amplifikation auf die Umschreibung speziell der mRNA auszurichten, werden Oligo-dT-Primer, die an die poly-A-Schwänze der mRNA binden und Random-Primer für das 5'-Ende der isolierten mRNA-Sequenzen eingesetzt. Die unerwünschte Umschreibung von Transfer-RNA (tRNA) und ribosomaler RNA (rRNA) in cDNA wird dadurch reduziert. (Kubista et al. 2006) Entsprechend den Herstellerangaben des verwendeten iScript™ cDNA Synthesis Kit der Firma Bio-Rad Laboratories wurden zu den 15 µl RNA-Lösung (200 ng RNA) 4 µl 5x iScript Reaction Mix und 1 µl iScript Reverse Transcriptase zugegeben.

Der Vorgang der Umschreibung des RNA-Pools in cDNA erfolgte durch Verwendung eines Mastercycler® gradient der Firma Eppendorf.

Das Protokoll dieses Mastercyclers sah folgende Temperaturabfolge vor:

- 1.) 5 min bei 25°C
- 2.) 30 min bei 42°C
- 3.) 5 min bei 85°C

III.) Quantitative Real-time-PCR

Die Berechnung einer Genexpression erfolgt bei der quantitativen Real-time PCR durch selektive Amplifikation der entsprechenden mRNA, beziehungsweise cDNA mittels Primern. Unter Idealbedingungen findet auf Grundlage der Polymerase-Kettenreaktion nach Anlagerung des Primers an die Ziel-cDNA eine Amplifikation und damit Verdopplung derselben nach jedem Zyklus statt.

Der zusätzlich verwendete und zunächst nicht fluoreszierende Farbstoff SYBR® Green lagert sich zwischen DNA-Doppelsträngen an, ändert dadurch seine Konfiguration und gewinnt an Fluoreszenz. (Holzapfel und Wickert 2007)

Je nach ursprünglicher Konzentration der Ziel-cDNA kann über die Zyklusabfolgen ein exponentieller Anstieg der Fluoreszenz festgehalten werden. Über den Zeitpunkt des sprunghaften Fluoreszenzanstiegs kann eine relative Quantifizierung der ursprünglich vorhandenen Ziel-cDNA erfolgen, denn je mehr Ziel-cDNA im ursprünglichen Reaktionsansatz vorhanden ist, desto früher steigt die Fluoreszenz exponentiell an. Festgehalten wird dabei die Zykluszahl, bei der ein vorher festgelegter Grenzwert überschritten wird. Diese Zyklusnummer wird als C_T -Wert bezeichnet. (Kubista et al. 2006)

Da die Fluoreszenzmessung ohne Unterbrechung der Abfolge zwischen den einzelnen Amplifikations-Zyklen erfolgt, spricht man von Echtzeit (real-time) PCR. Die Methode zeichnet sich unter Verwendung des Farbstoffs SYBR® Green durch eine hohe Sensitivität aber geringe Spezifität aus.

Über einen Reinheitsnachweis kann jedoch die geringe Spezifität relativiert werden, hierzu wird die erzeugte Template-Menge nach Abschluss der Amplifikationszyklen mit der Schmelzpunktanalyse untersucht.

Mit langsamem Temperaturanstieg wird die DNA aufgeschmolzen, entsteht dabei nur ein Fluoreszenz-Peak entsprechend des Zielgens, spricht dies für die Reinheit des Produkts. (Holzapfel und Wickert 2007; Kubista et al. 2006; Wilhelm und Pingoud 2003)

Für den Reaktionsansatz wurde die zuvor gewonnene cDNA 1:25 mit Aqua dest. verdünnt. Für jeden Ansatz wurden 3 µl Primer-Mix, 9 µl iQ™ SYBR® Green

Supermix und 6 µl cDNA-Lösung in ein Loch einer 96-well-Platte gegeben. Pro Loch betrug damit die Menge an cDNA 2 ng.

Die 96-well-Platte wurde mit einer durchsichtigen Plastikfolie verschweißt, über die von oben während der Amplifikations-Zyklen die Fluoreszenz-Messung erfolgte.

Die Primer wurden vorher über die Software „Primer3“ (Rozen und Skalentsky, 2000) und „Primer Premier 5“ (PREMIER Biosoft International) so ausgewählt, dass, bezogen auf die genomische DNA-Sequenz, eine Intron-überspannende Abfolge gegeben war. Auf diese Weise sollte verhindert werden, dass die Primer an gegebenenfalls noch intakte genomische DNA binden. (Wiedemann et al. 2004).

Zur Amplifikation und Fluoreszenzmessung wurde ein iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System der Firma Bio-Rad Laboratories verwendet.

Das gewählte PCR-Protokoll sah folgende Temperaturschritte vor:

Zyklus 1 (1x)	Schritt 1: 95,0°C für 3:00 min
Zyklus 2 (40x)	Schritt 1: 95,0°C für 0:15 min
	Schritt 2: 60,0°C für 0:30 min
	Datenerfassung
	Schritt 3: 72,0°C für 0:10 min
Zyklus 3 (50x)	Schritt 1: 70,0°C für 0:10 min
	Schrittweise Temperaturanhebung um 0,5°C
	Schmelzkurvanalyse

IV.) Datenauswertung zur quantitativen Real-time PCR

Zur Quantifizierung eines Zielgens wird die Zykluszahl (C_T -Wert) genutzt, in der die Messung der Fluoreszenz signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt und somit die Amplifikation einer Zielsequenz (unter optimalen Bedingungen mit einer Verdopplung bei jedem Zyklus) in die exponentielle Phase eintritt. (Holzapfel und Wickert 2007)

Zu Beginn der Amplifikation ist die Anzahl an Templates zu gering, so dass Substrat, Enzym und Nukleinsäuren mit verminderter Wahrscheinlichkeit

zusammentreffen und nach Überschreiten der exponentiellen Phase folgt die Plateauphase in der Produktfragmente miteinander hybridisieren und die Reaktion hemmen. (Holzapfel und Wickert 2007)

Zusätzlich wird das Ergebnis zum Zielgen über ein Referenzgen normalisiert. Das Referenzgen (Houskeeping-Gen) sollte dabei während der zu untersuchenden experimentellen Behandlung über eine gleichbleibende Expression verfügen.

$$1.) \Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen (Pfaffl 2004)}$$

Nach dieser Berechnung wird vom ΔC_T -Wert der experimentell behandelten Proben der ΔC_T -Wert der Kontrolle abgezogen. (Pfaffl 2004)

$$2.) \Delta \Delta C_T = \Delta C_T \text{ Behandlung} - \Delta C_T \text{ Kontrolle (Pfaffl 2004)}$$

Setzt man eine Verdopplung der DNA-Menge in jedem Zyklus voraus, ergibt sich daraus der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle (Ratio), normalisiert zum Referenzgen, wie folgt:

$$3.) \text{Ratio} = 2^{-\Delta \Delta C_T} \text{ (Pfaffl 2004; Livak und Schmittgen 2001)}$$

Zur Darstellung der Genexpression von P-Selectin (CD 62P) wurde als Referenzgen PECAM-1 (*Platelet endothelial cell adhesion molecule-1*, CD 31) und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) verwendet.

Das zur Auswertung zur Verfügung gestellte Programm der Firma Bio-Rad Laboratories gibt zudem die Möglichkeit, die zuvor bestimmte Effizienz für jeden Primer mit zu berücksichtigen.

2.2.3 Versuchsanordnung zur Hemmung des Oberflächenrezeptors

PECAM-1 (*Platelet endothelial cell adhesion molecule 1*, CD 31) mittels siRNA

2.2.3.1 Zellanzucht

Versuche zur Darstellung und Hemmung des Oberflächenrezeptors PECAM-1 (CD 31) erfolgten mit isolierten und angezüchteten humanen Endothelzellen der Vena saphena magna der 3. Passage.

Pro Loch einer 12-well-Platte wurden 100.000 Zellen angezüchtet.

Zur Zellisolation und Kultivierung siehe 2.2.1 und 2.2.2.

2.2.3.2 Transfektion

24 Stunden nach Anzucht der Endothelzellen konnte eine Transfektion durchgeführt werden. Entsprechend den Versuchen zur Hemmung des Rezeptors P-Selectin wurde INTERFERIN™ als Transfektionsmittel verwendet. Allerdings erfolgte die Transfektion unter optimierten Bedingungen um einerseits die Effizienz der Transfektion zu erhöhen und um andererseits die Toxizität der einzelnen Transfektion zu reduzieren. (Nolte et al. 2009)

Zur Hemmung des Oberflächenrezeptors PECAM-1 (CD 31) wurde folgende siRNA verwendet:

- siRNA PECAM-1 5 nmol (Hs_PECAM1_1) – siRNA PECAM

Als Negativprobe wurde auch hier eine intrazellulär nicht bindende siRNA-Sequenz mit nicht sinnvoller Nukleinsäureabfolge verwendet.

- siRNA (scramble), 5 nmol (*non silencing*) - siRNAscr

Zur Bildung von Transfektionskomplexen (Lipoplexe) wurden pro angezüchtetem Loch einer 12-well-Platte 0,7 µl der siRNA Stammlösung und 2 µl des Transfektionsreagenz INTERFERIN™ in 300 µl Basalmedium ohne Zusätze und ohne Antibiotikum pipettiert. Nachdem zuvor das Medium aus den angezüchteten Kulturplatten abgesaugt wurde, konnten nach einem Durchmischen mittels Vortex und einer Inkubationszeit von 10 min 300 µl der Lösung mit den Transfektionskomplexen auf die Zellen pipettiert werden. Die Konzentration an siRNA pro Loch betrug damit 50 nM.

Es folgte eine Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank, bevor erneut ein Mediumwechsel stattfand. (Nolte et al. 2009)

Aufgrund von Vorversuchen wurde die Transfektion alle 24 Stunden bis zur vierten Transfektion wiederholt, wobei die Ergebnisse 24 Stunden nach der ersten, zweiten, dritten und vierten Transfektion gegeneinander verglichen wurden.

Zur Darstellung der Reproduzierbarkeit erfolgte eine dreimalige Wiederholung der Versuche mit jeweils drei Ansätzen pro Versuch.

2.2.3.3 Zellaktivierungen

Im Vergleich zu anderen Adhäsionsmolekülen, die ebenfalls an der Leukozytenmigration beteiligt sind, ist zur Darstellung des Rezeptors PECAM-1 keine Zellaktivierung mit Entzündungsfaktoren erforderlich.

2.2.3.4 Durchflusszytometrie

Analog zum Versuchsansatz zur Darstellung des Oberflächenrezeptors P-Selectin erfolgte eine durchflusszytometrische Messung mit einem FACScan™ der Firma Becton, Dickinson and Company. Siehe hierzu 2.2.3.4

5 µl des folgenden Antikörpers wurden pro Loch einer 12-well-Platte verwendet:

- Anti-CD 31 PE-konjugierter Antikörper (*PE-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody*) gegen humanes PECAM-1

2.2.3.5 Bestimmung der Zellviabilität mittels Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit

Zur Überprüfung der Toxizität und Darstellung der Zellebensfähigkeit erfolgte bei gleichem Versuchsansatz parallel zu einem der drei Versuche zur durchflusszytometrischen Messung des Oberflächenrezeptors PECAM-1 eine colorimetrische Messung nach Anwendung des Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kits.

Hierbei wird der zur Zellkultur zugegebene Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan reduziert.

Verantwortlich sind hierfür intrazelluläres NADH (Nicotinamidadenindinukleotid) und NADPH (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat). Gemessen wird also am ehesten die Glykolyserate einer Zellkultur. Inaktive Zellen reduzieren wenig MTT, während metabolisch aktive Zellen viel MTT umsetzen.

Sind im Rahmen des Versuchsablaufs Zellen zugrunde gegangen, wird der Farbstoff MTT im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls reduziert umgesetzt. (Berridge et al. 2005; Nikš und Otto 1990)

Gegeneinander verglichen wurden Zellen ohne Behandlung mit Zellen, die im Abstand von 24 Stunden ein, zwei, drei oder vier Mal mit siRNA gegen PECAM-1 (CD 31) oder siRNA(scr) transfiziert wurden.

Zunächst erfolgte ein Mediumwechsel, wobei anschließend lediglich 300 µl RPMI-Medium ohne Phenolrot und ohne Zusätze auf die Zellen gegeben wurde. Zu diesem Medium wurden 30 µl der 1 mg/ml MTT-Stammlösung in PBS pipettiert. Eine Negativkontrolle mit 30 µl MTT-Stammlösung und 300 µl RPMI-Medium ohne Zellen wurde ebenfalls angesetzt.

In der Folge wurden die Zellen für 4 Stunden bei 37°C inkubiert.

Zur Herstellung der Komponente B wurden 10 ml einer 0,01 M HCl-Lösung (Salzsäure) zu 1 mg SDS (Natriumdodecylsulfat) pipettiert.

300 µl der Komponente B wurden nach Abschluss der ersten Inkubationszeit auf die Zellen pipettiert. Durch kräftiges Hoch- und Runterpipettieren wurde die Suspension durchmischt. Es folgte nun eine zweite Inkubationszeit von 14 Stunden bei 37°C im Brutschrank.

Die stark gefärbte Suspension wurde nach Ablauf der zweiten Inkubationszeit 1:4 mit Aqua dest. verdünnt und in Messküvetten pipettiert. Anschließend konnte die Absorption bei 570 nm mit dem Spektralphotometer Ultrospect II der Firma LKB Biochrom gemessen werden.

2.2.3.6 Der Nachweis der Genexpression auf mRNA-Ebene

Analog zum Versuchsaufbau zur Darstellung des Oberflächenrezeptors P-Selectin (CD 62P) erfolgte auch in diesem Fall zur Bestätigung der über die Durchflusszytometrie erhobenen Daten ein Nachweis der Genexpression auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Real-time PCR.

Jeweils 100.000 Zellen pro Loch einer 12-well-Platte wurden angezchtet.

Zur Reduktion des Oberflächenrezeptors PECAM-1 erfolgten Transfektionen mit siRNA gegen PECAM-1 (Hs_PECAM1_1), wobei die Wirkung auf die mRNA nach einer, zwei, drei und vier Transfektionen gegeneinander verglichen wurden. Transfektionen wurden hier alle 24 Stunden wiederholt, die Transfektionsdauer betrug entsprechend dem Versuchsaufbau zur Durchflusszytometrie 2 Stunden mit einer siRNA-Konzentration von 50 nM pro Loch einer 12-well-Platte unter der Verwendung von 2 µl INTERFERin™ pro Loch als Transfektionsreagenz.

Als Kontrolle diente siRNAscr. (scramble).

Auch hierbei wurden zur Darstellung der Reproduzierbarkeit drei Versuche mit jeweils drei Ansätzen durchgeführt.

Da die wiederholte Transfektion mit spezifischer siRNA nicht nur die Expression des Zielgens reduziert (Caffrey et al. 2011), erfolgte zur Abschätzung der Wirkung auf andere Zellproteine ein Versuch, bei dem erneut die Wirkung von 4 Transfektionen auf PECAM-1 gegeneinander verglichen, jedoch zusätzlich die Genexpression der Adhäsionsmoleküle E-Selectin (CD 62P), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) und ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) bestimmt wurden. Als Negativkontrolle diente auch hier siRNAscr. (scramble).

24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 6 Stunden mit 10 ng pro Loch TNF-α (Tumornekrosefaktor-α) zur Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1 aktiviert. Anschließend erfolgte die Isolierung der RNA.

Für diese Versuchsreihe wurde als Referenzgen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) festgelegt.

Zur weiteren Versuchsdurchführung siehe 2.2.3.5.

2.2.4 Versuche zur Stabilität der verwendeten siRNA

Mit den im Rahmen der bisherigen Versuchsreihen verwendeten siRNA-Sequenzen gelingt eine Hemmung des Zielgens nur unter in-vitro-Bedingungen. (Jiang et al. 2013)

Um jedoch zu ermitteln, wie schnell die verwendete siRNA bei Kontakt mit Serum abgebaut und damit wirkungslos wird, erfolgte abschließend eine Messreihe zur siRNA-Stabilität unter Anwendung der Gelelektrophorese.

Verantwortlich für den Abbau der siRNA bei Kontakt mit Serum scheint RNase A zu sein. (Haupenthal et al. 2007) RNasen sind jedoch ubiquitär vorhanden und außer unter sehr sauberen Laborbedingungen immer vorhanden.

2.2.4.1 Herstellung eines nativen 4,5%igen Agarosegels

Zur Herstellung eines nativen 4,5%igen Agarosegels für eine 50 ml Gelkammer wurden 2,25 g Pulver einer low melting Agarose mit 45 ml destilliertem Wasser (Ampuva), 5 ml 10xMEN-Puffer und 5 µl des Farbstoffs Gel Red gut vermischt. Die Lösung wurde in der Mikrowelle bis kurz vor den Siedepunkt erhitzt, wobei zwischendurch kurzzeitiges Schwenken eine Klumpenbildung vermeiden sollte. Ebenso musste eine Blasenbildung durch Überkochen in jedem Fall verhindert werden.

Das klare, dickflüssige Gel konnte anschließend in einer Form ausgegossen werden, zusätzlich wurden durch das Einsetzen eines Kamms Ladetaschen geschaffen.

2.2.4.2 Serumgewinnung

Freiwilligen Probanden wurde mittels Butterfly-Kanüle und S-Monovette 7,5ml Blut abgenommen, das nach einer Standzeit von 30 min bei Raumtemperatur für 10 min bei 2000 g zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde als Serum weiter verwendet.

2.2.4.3 Gelbeladung

Die trockene Gelplatte wurde in die Gelkammer gelegt, in die zusätzlich 1x MEN-Puffer gegossen wurde, bis die Platte vollständig von Flüssigkeit bedeckt war. Verwendet wurde als Markierung für die äußeren Ladetaschen der Ultra Low

Range DNA-Leiter I, von dem nach Verdünnung mit 6xLadepuffer und destilliertem Wasser im Verhältnis 1:1:4 10 µl in jede Ladetasche gegeben wurden.

Zu jedem Versuchsansatz aus 10 µl siRNA und 100 µl Serum, Vollblut oder Endothelzellmedium wurden vor dem Beladen des Gels 22 µl 6xLadepuffer zugegeben und anschließend 20 - 50 µl des Gemisches in jede Geltasche pipettiert.

Die Spannung an den Elektroden zur Auftrennung der Nukleinsäuren betrug 80 - 100 V, die Laufzeit etwa 30 - 45 min bis zum Abschalten.

2.2.4.4 Versuchsreihen

- a) Gegeneinander verglichen wurde eine nicht stabilisierte siRNA mit 21 Basenpaaren (porcine siRNA gegen VCAM-1) mit einer chemisch stabilisierten siRNA (humane siRNA gegen E-Selectin), deren Länge ebenfalls 21 Basenpaare betrug. Die Stabilisierung erfolgte hierbei durch Anbringung einer 2'-O-Methyl-Gruppe an den Zuckerring und eine Phosphothioatbildung am 3'-Ende über die drittletzte und vorletzte Nukleotidbindung des „Fahrer“- und „Beifahrer“-Stranges.

sense:

5'-GGUUGAAUGCACCACUCAA(Phosphothioat)(2'-OMethyl)U(Phosphothioat)(2'-OMethyl)U-3'

antisense:

5'-UUGAGUGGUGCAUUCAACC(Phosphothioat)(2'-OMethyl)U(Phosphothioat)(2'-OMethyl)U-3'

(Engels 2013; Deleavey et al. 2001)

Als Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde ein abgestuftes Intervall von 0-6 Stunden gewählt, wobei 10 µl siRNA mit 100 µl Serum vermengt wurden.

- b) Erneut wurde die nicht stabilisierte siRNA (porcine siRNA gegen VCAM-1) gegen die stabilisierte siRNA (humane siRNA gegen E-Selectin) unter Verwendung von verdünntem Serum (100%, 50%, 10%, 1%) verglichen.
- c) Wirkung von Vollblut auf die modifizierte siRNA gegen humanes E-Selectin (CD 62E) mit einer Inkubationszeit von 0-20 min. Verglichen wurde dabei zusätzlich die Wirkung von Vollblut ohne Verdünnung mit im Verhältnis 1:2 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünntem Vollblut.
- d) Zusätzlich wurden beide siRNA-Sequenzen mit Endothelzellmedium versetzt und auf einen möglichen Abbau hin untersucht. Das Endothelzellmedium enthielt alle Zusätze, einschließlich 2% fetales Kälberserum. Die Inkubationszeit bei 37°C betrug 0-60 min.
- e) Die Inkubationszeit aus Versuch d) wurde zusätzlich auf 2-24 Stunden ausgedehnt.

2.2.5 Statistische Auswertung

Im Falle der Durchflusszytometrie wurde zur weiteren Analyse der geometrische Mittelwert (geoMean) einer jeden Messung verwendet.

Zusammenfassende Tabellen werden als Mittelwert +/- Standardabweichung (M +/-SD) angegeben.

Für mehrfach wiederholte Versuche wurde zur statistischen Auswertung das Programm „BiAS“ verwendet. (epsilon-Verlag GbR, Hochheim, Deutschland) Es erfolgte eine unifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) zur Erhebung der statistischen Signifikanz zwischen den Proben untereinander bei mehrfach wiederholter Transfektion. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Zellisolation

Anhand bereits veröffentlichter Verfahren zur Isolation von Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (Nachman und Jaffe 2004; Lüders et al. 2003; Jaffe et al. 1973) erfolgte eine Modifizierung zur Gewinnung von Endothelzellen der Vena saphena magna, indem die Konzentration der verwendeten Kollagenase auf 0,05% reduziert und im Gegenzug die Inkubationszeit von 15 min auf 1,5 Stunden erhöht wurde. Mit dieser Änderung zeigte sich nach dem Ausspülen lediglich eine geringe Ausbeute an Endothelzellen, jedoch konnte durch die Reduktion der Konzentration der Kollagenaselösung eine Beimengung von Fremdzellen weitgehend verhindert werden. (siehe 2.2.1.1)

Zelllinien mit mikroskopisch dennoch unreinem Zellbild wurden verworfen. Endothelzellen zeigten im Verbund nach mehrtägiger Anzucht in der Kultur ein pflastersteinartiges oder kolbenförmiges Aussehen, während Fremdzellen, zum Beispiel Fibroblasten, mikroskopisch länglicher oder stärker gezackt erscheinen.

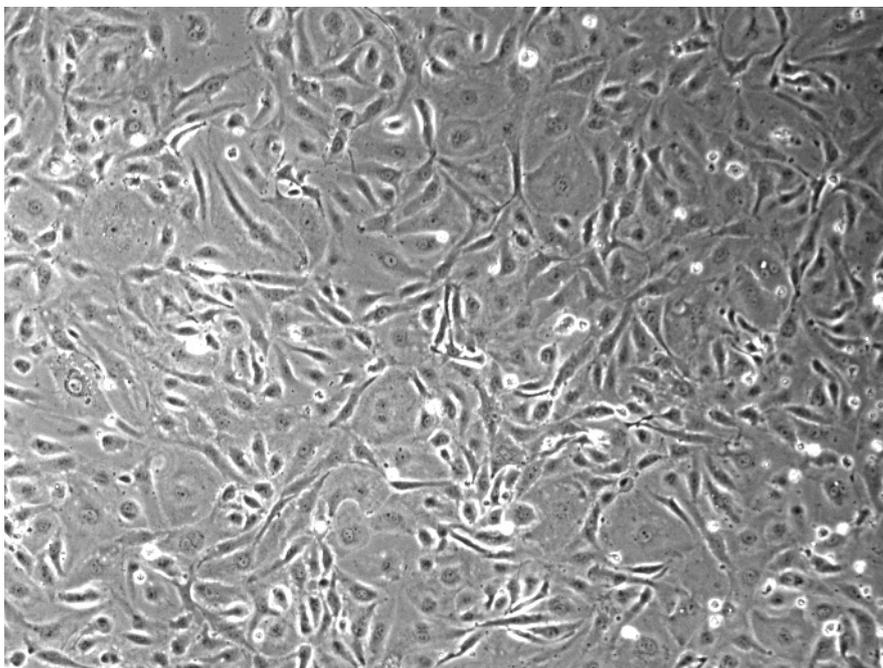


Abbildung 3-1: Endothelzellkultur, Konfluenz 80%, 10-fache Vergrößerung

Die Überprüfung der Reinheit der angezüchteten Zellkultur erfolgte über eine durchflusszytometrische Darstellung.

Als Marker für Endothelzellen kann entweder auf den Oberflächenrezeptor *Platelet endothelial cell adhesion molecule 1* (PECAM-1, CD31) oder das Adhäsionsprotein *Vascular endothelial cadherin* (VE-cadherin) zurückgegriffen werden. (Scoumanne et al. 2002)

Für die folgenden Versuche diente eine Antikörperfärbung (PE-konjugierter Antikörper) gegen PECAM-1 als Nachweis der Reinheit.

Die Durchflusszytometrie wurde in diesem Fall über eine Gate-Auswertung analysiert.

Im Auswertungsdiagramm wurden das relative Zellvolumen (FSC-H) (x-Achse) gegen die relative Fluoreszenz (FL2-H) (y-Achse) aufgetragen und ein 4-Felder-Gate so gesetzt, dass die Zellpopulation der gemessenen Nullprobe ohne Antikörper zu möglichst 100% innerhalb eines Quadranten lag. Das gesetzte Gate wurde für die Messreihe nicht mehr verändert. Die Fluoreszenzerhöhung durch die Messungen mit Antikörper zeichnet sich durch eine Verschiebung der Punktwolke nach rechts ab. Bei einer Reinheit von annähernd 100% verzeichnet im Idealfall der ursprünglich einschließende Quadrant der Nullprobe in der Messung mit Antikörper keine Zellen mehr. Pro Versuch erfolgten drei Einzelmessungen.

Für die weiteren Analysen wurden nur Zellkulturen mit einer Reinheit von über 90% verwendet.

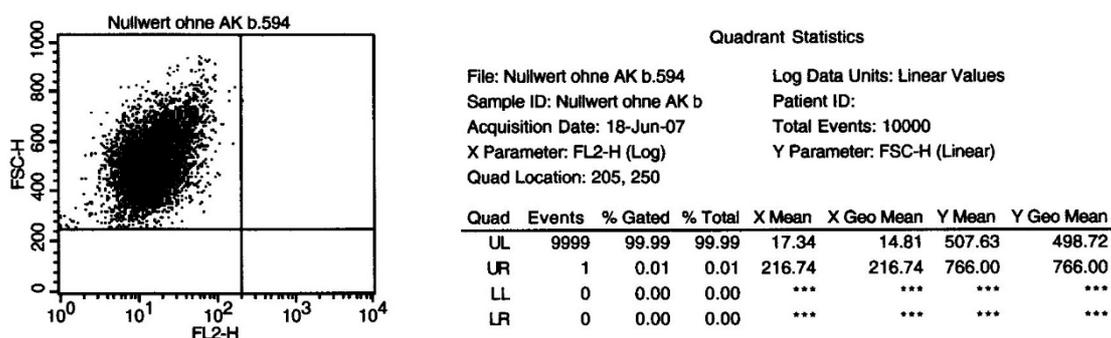


Abbildung 3-2: Einzelmessung von Endothelzellen (HSVEC) mittels Durchflusszytometrie ohne Antikörper

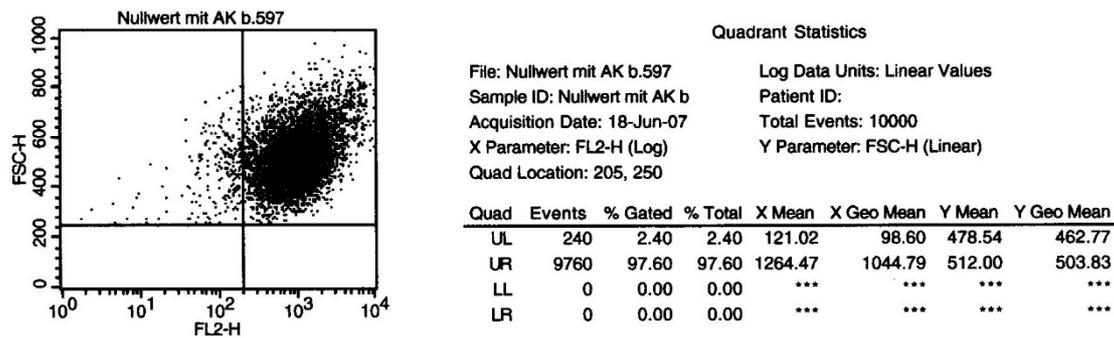


Abbildung 3-3: Einzelmessung von Endothelzellen (HSVEC) mittels Durchflusszytometrie mit Antikörper (Anti-CD 31 PE-konjugierter Antikörper)

In diesem Beispiel wurden durch die Gatesetzung zunächst 99,99% von 10.000 gemessenen Zellen innerhalb des oberen linken Feldes erfasst. Die Messung der Probe mit Antikörper ergab durch die damit einhergehende Fluoreszenzerhöhung eine Reduktion der erfassten Zellzahl für dieses Feld auf 2,4% von 10.000 gemessenen Zellen. Mehr als 90% der Zellen exprimierten damit das Oberflächenmolekül PECAM-1.

3.2 Zellkultivierung

Zur Endothelzellanzucht wurde das Endothelial Cell Basal Medium 2® unter Zusatz des Endothelial Cell Growth Medium 2 SupplementPack® (*Fetal Calf Serum, Epidermal Growth Factor, Vascular Endothelial Growth Factor, basic Fibroblast Factor, Insulin-like Growth Factor (Long R3 IGF), Asorbic Acid, Heparine*) der Firma PromoCell verwendet. Hierunter zeigte sich eine Verdopplungszeit innerhalb von etwa 24 Stunden. Jedoch konnten in Anhängigkeit vom Alter und Gesundheitszustand des Patienten erhebliche Schwankungen festgestellt werden. Zudem verlangsamte sich die Verdopplungszeit mit fortschreitender Passagierung. Zelllinien mit sehr langsamer Zellteilung oder vermeintlichem Wachstumsstillstand wurden ebenfalls verworfen. Bis zur dritten Passage konnten die gewonnenen Endothelzellen für Analysen verwendet werden. Bereits ab der dritten bis vierten Passage sind Dedifferenzierungen an humanen Endothelzellen der Vena saphena magna beschrieben worden. (Scoumanne et al. 2002)

Immortalisierte Endothelzellen kommen für Versuche zur Darstellung von Oberflächenproteinen nicht in Frage, da auch hierunter morphologische und funktionelle Unterschiede zu primären Endothelzelllinien beschrieben wurden. (Tan et al. 2004)

3.3 Darstellung des Oberflächenrezeptors P-Selectin (CD 62P) und Rezeptorhemmung mittels spezifischer siRNA

3.3.1 Stimulation der kultivierten Endothelzellen

Zur Expression des Oberflächenrezeptors P-Selectin (CD 62P) auf humanen Endothelzellen der Vena saphena magna (HSVEC) bedarf es einer Stimulation. Bisher erfolgreiche Stimulationen zur Expression von P-Selectin erfolgten mit humanen Endothelzellen der Vena umbilicalis (HUVEC) unter Verwendung von Histamin (Setiadi und McEver 2003; Jones et al. 1993; Geng et al. 1990) und Thrombin (Lowenstein et al. 2005; Setiadi und McEver 2003; Takano et al. 2002; Collins et al. 1993; Jones et al. 1993; Sugama et al. 1992; Geng et al. 1990), sowie der Kombination aus Gamma-Interferon (IFN- γ) mit Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) mit Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Daxecker et al. 2002; Raab et al. 2002).

Mehrfach wurde hierbei beschrieben, dass P-Selectin (CD 62P), untersucht an Endothelzellen der Nabenschnurvene, bereits 10-30 min nach Stimulation mit Histamin verstärkt exprimiert wird. Unter einer kombinierten Aktivierung konnte eine maximale Expression nach 16 Stunden beobachtet werden.

Vorversuche mit einer geringen Zellzahl zeigten unter Verwendung von humanen Endothelzellen der Vena saphena magna und den oben genannten Stimulantien insgesamt eine lediglich geringe Steigerung der Expression von P-Selectin (CD 62P). Da die kombinierte Stimulation einerseits mit Gamma-Interferon (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und andererseits mit Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) jedoch den höchsten Ausschlag zeigte, wurden die folgenden Versuche unter dieser Kombination durchgeführt. Als zu

vergleichende Stimulationsintervalle wurden 15 min, 6 Stunden und 16 Stunden gewählt.

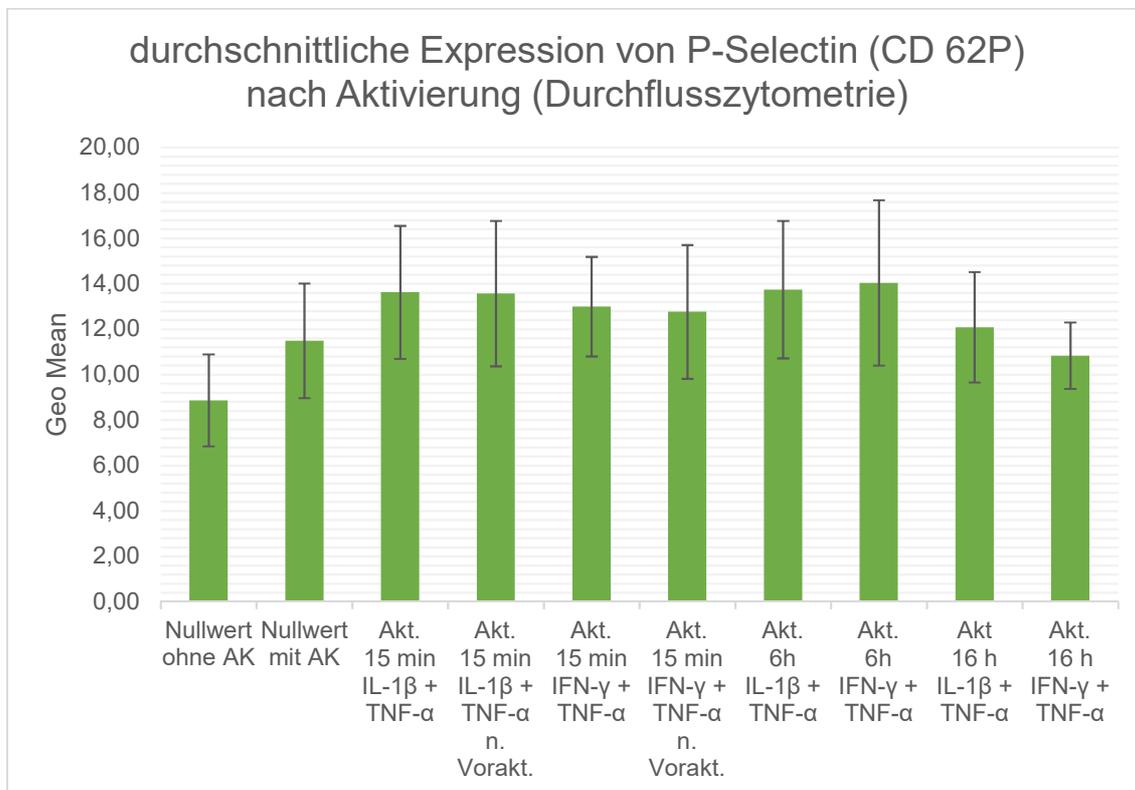


Diagramm 3-1: relative Expression (Geo Mean) und Standardabweichung aus durchflusszytometrischer Messung des Rezeptors P-Selectin (CD 62P) nach Stimulation mit IL-1β + TNF-α und IFN-γ + TNF-α im Vergleich. Angegebene Werte sind Mittelwerte aus drei Versuchen mit jeweils drei identischen Ansätzen.

	Nullwert mit AK	Akt. 15 min IL-1β + TNF-α	Akt. 15 min IL-1β + TNF-α nach Voraktivierung	Akt. 15 min IFN-γ + TNF-α	Akt. 15 min IFN-γ + TNF-α nach Voraktivierung	Akt. 6 h IL-1β + TNF-α	Akt. 6 h IFN-γ + TNF-α	Akt. 16 h IL-1β + TNF-α	Akt. 16 h IFN-γ + TNF-α
Geo Mean	11,49	13,62	13,56	12,99	12,76	13,74	14,04	12,08	10,83
Durchschn. Aktivierung in Prozent	0%	18,58%	18,06%	13,07%	11,07%	19,60%	22,19%	5,18%	-5,70%

Tabelle 3-1: Gegenüberstellung von relativer Expression des Rezeptors P-Selectin (CD 62P) nach Aktivierung und prozentualen Wertzuwachs, bezogen auf den Nullwert mit Antikörper.

Ausgehend vom Nullwert mit Antikörper zeigt sich über alle Zeitintervalle eine insgesamt schwache Aktivierung unter finaler Konzentration von 10 ng/ml Interleukin-1β (IL-1β) mit 10 ng/ml Tumornekrosefaktor-α (TNF-α), beziehungsweise 100 ng/ml gamma-Interferon (IFN-γ) mit 10 ng/ml

Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Unter der Aktivierung mit IFN- γ und TNF- α über 6 Stunden zeigte sich der größte Wertzuwachs mit 22,19%, ausgehend vom Nullwert mit Antikörper (siehe Diagramm 3-1, beziehungsweise Tabelle 3-1)

Eine Voraktivierung für 2 Stunden 12 Stunden vor der eigentlichen Stimulation mit der gleichen Wirkstoffkombination für das Zeitintervall 15 min zeigte keinen Unterschied zum Wert ohne diese Vorgehensweise.

Statistisch kann der Wertzuwachs durch Aktivierung nicht als signifikant eingestuft werden.

3.3.2 Versuch der Hemmung von P-Selectin (CD 62P) durch Einbringen von spezifischer siRNA in das Zytosol mittels kationischer Lipofektion

Zur Transfektion und damit Einbringung der spezifischen siRNA in das Zytosol wurde das Transfektionsreagenz INTERFERin™ verwendet.

Lediglich zur Bildung der Lipoplexe wurden kein Serum und kein Antibiotikum zugegeben. Während der anschließenden Transfektion über 24 Stunden kann bei der Verwendung von INTERFERin™ allerdings Serum und Antibiotikum im Endothelzellmedium enthalten sein.

Gegeneinander verglichen wurden drei siRNA-Sequenzen, bezeichnet als a, b und c. Als Negativ-Kontrolle diente eine nicht spezifische siRNA-Sequenz, genannt siRNA scramble (siRNAsc.). Die siRNA-Konzentration betrug pro Loch einer 12-well-Platte 13,3 nM.

In allen Versuchen konnte keine Reduktion der Rezeptorexpression des Oberflächenmoleküls P-Selectin (CD 62P) durch den Einsatz von spezifischer siRNA nachgewiesen werden.

Exemplarisch wird hier lediglich das Ergebnis der siRNA-Anwendung für das Zeitintervall von 6 Stunden unter der Stimulation mit 10 ng/ml Interleukin-1 β (IL-1 β) und 10 ng/ml Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) aufgeführt.

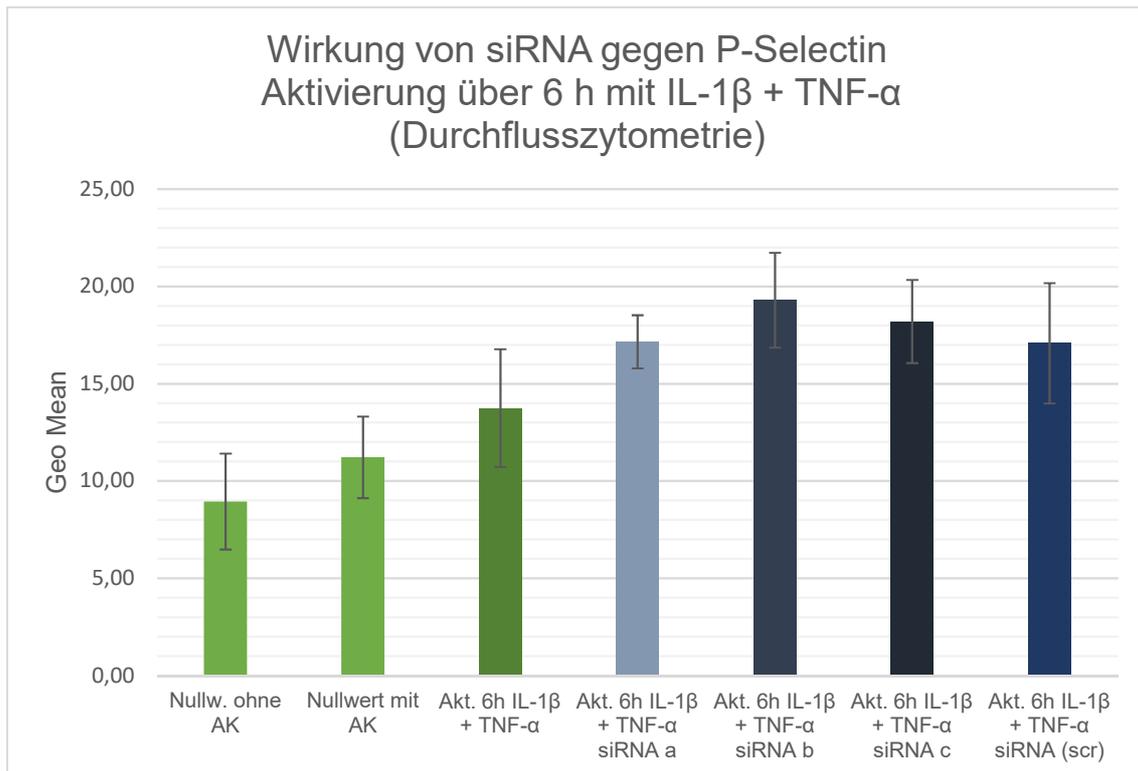


Diagramm 3-2: Vergleich von drei spezifischen siRNA-Sequenzen gegen P-Selectin zur Aktivierungsstufe 6 Stunden mit IL-1 β + TNF- α mittels FACS. Angegebene Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Versuchen mit jeweils drei identischen Ansätzen.

Zum Nachweis einer erfolgreichen Transfektion unter Verwendung von 2 μ l INTERFERinTM pro Loch einer 12-well-Platte als Transfektionsreagenz und einer siRNA-Konzentration von 13,3 nM erfolgte anhand eines zusätzlichen Versuches bei dem die Rezeptorexpression von E-Selectin (CD 62E) nach 6-stündiger Zellaktivierung mit 10 ng/ml Tumornektosefaktor- α (TNF- α) erfolgreich durch spezifische siRNA gehemmt werden konnte. Unter Verwendung des gleichen Transfektionsprotokolls konnte mittels spezifischer siRNA der Rezeptor E-Selectin um 84,55% bezogen auf den Wert der Expression nach Stimulation herunterreguliert werden und bezogen auf die Kontroll-siRNA (siRNA_{scr.}) gelang eine Hemmung um 80,85%.

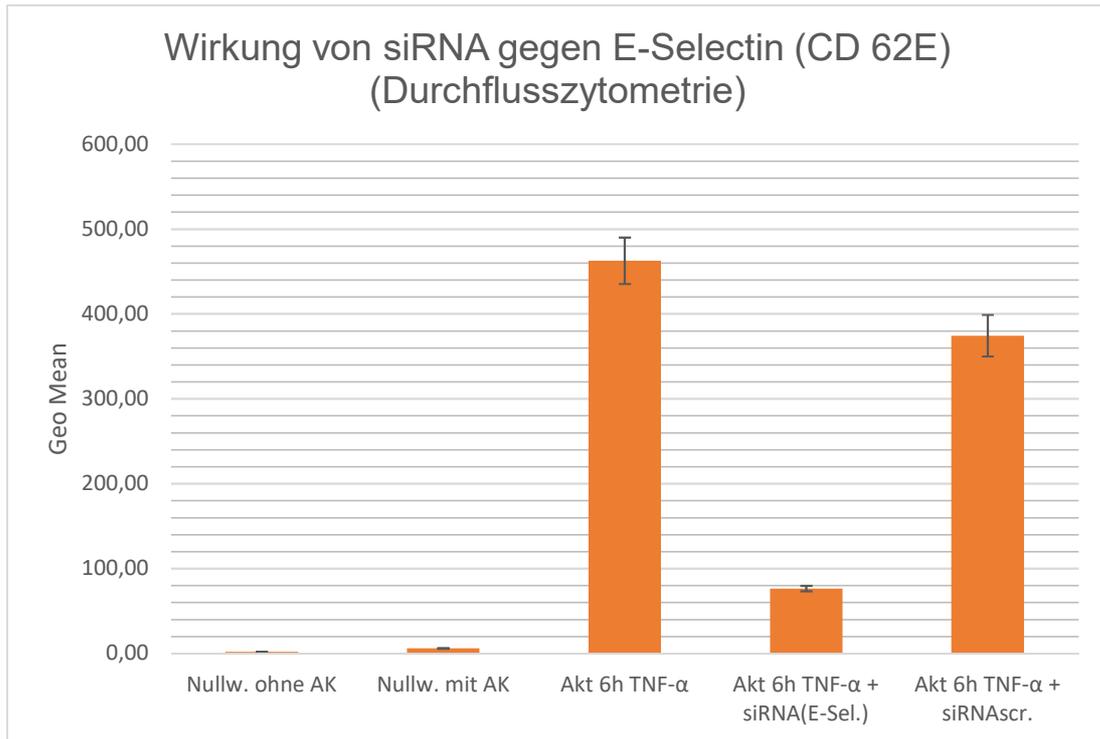


Diagramm 3-3: Durchflusszytometrische Messung, Stimulation mit 10 ng/ml TNF- α über 6 Stunden und Wirkung der spezifischen siRNA auf den Rezeptor E-Selectin (CD 62E). Der Mittelwert und die Standardabweichung beziehen sich auf einen Versuch mit drei Ansätzen

3.3.3 Nachweis der Genexpression zu P-Selectin (CD 62P) auf mRNA-Ebene

Unter gleichen Bedingungen (Aktivierungsstufen 15 min, 6 Stunden, 16 Stunden, gegeneinander verglichene Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β + 10 ng/ml TNF- α und 100 ng/ml IFN- γ + 10 ng/ml TNF- α) erfolgte zur Bestätigung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie eine Messung der mRNA-Menge von P-Selectin (CD 62P) mittels quantitativer Real-time PCR über einen Versuch mit drei Ansätzen.

Aufgrund der in der Durchflusszytometrie festgehaltenen schwachen Expression von P-Selectin (CD 62P), wurde auf die Verwendung von spezifischer siRNA in diesem Teil jedoch verzichtet. Als Referenzgene für die quantitative Real-time PCR wurden die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und das *Platelet endothelial cell adhesion molecule* (PECAM-1) ausgewählt.

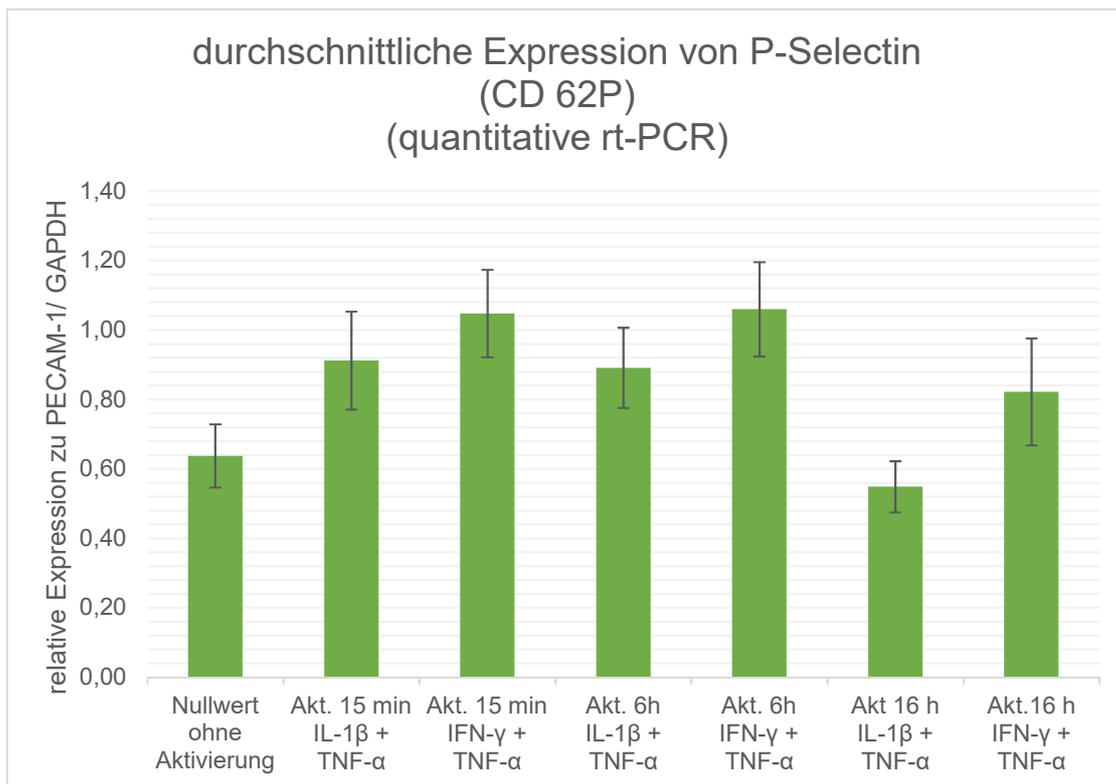


Diagramm 3-4: relative Expression (quant. rt-PCR) des Rezeptors P-Selectin (CD 62P) nach Stimulation mit IL-1β + TNF-α und IFN-γ + TNF-α im Vergleich. Angegebene Werte sind Mittelwerte aus einem Versuch mit drei Ansätzen.

	Nullwert ohne Aktivierung	Akt. 15 min IL-1β + TNF-α	Akt. 15 min IFN-γ + TNF-α	Akt. 6 h IL-1β + TNF-α	Akt. 6 h IFN-γ + TNF-α	Akt. 16 h IL-1β + TNF-α	Akt. 16 h IFN-γ + TNF-α
Mittelwert (relative Expression)	0,64	0,91	1,05	0,89	1,06	0,55	0,82
Durchschn. Aktivierung in Prozent	0%	43%	64%	40%	66%	-14%	29%

Tabelle 3-2: Gegenüberstellung von relativer Expression des Rezeptors P-Selectin (CD 62P) nach Aktivierung und prozentualem Wertzuwachs, bezogen auf den Nullwert ohne Aktivierung.

Auch in diesem Fall zeigte sich nach Aktivierung von P-Selectin (CD 62P) nur eine geringe Anhebung der Genexpression. Auffällig ist jedoch, dass im Gegensatz zu E-Selectin (CD 62E), VCAM-1 (CD106) und ICAM-1 (CD 54), auch bei fehlender Stimulation mRNA zu P-Selectin (CD 62P) nachweisbar ist. Während die Auswertung der quantitativen Real-time PCR zu diesem Versuch (Diagramm 3-4) für P-Selectin einen Nullwert ohne Aktivierung von 0,64 ergab, konnte ein späterer Versuch (Diagramm 3-10) für die Adhäsionsmoleküle E-

Selectin, VCAM-1 und ICAM-1 ein Nullwert ohne Aktivierung von 0,01, 0,01, beziehungsweise 0,02 ermittelt werden. Ein gewisser Grundumsatz und eine stetige Bildung und Speicherung des Adhäsionsmoleküls muss daher gegeben sein.

3.3.4 Gewebeaktivierung zum Nachweis der Genexpression von P-Selectin (CD 62P)

Auch wenn die bisherigen Versuche mit Endothelzellen der ersten Passage durchgeführt wurden, so besteht doch das Risiko, dass durch die Kultivierung und Anzucht bereits eine De-Differenzierung stattgefunden hat. (Scoumanne et al. 2002)

Insbesondere die Ausbildung von Weible-Pablade-Bodies, die für die intrazelluläre Speicherung von bioaktiven Substanzen wie P-Selectin (CD 62P) und des von-Willebrand-Faktors (vWF) unabhkmmlich sind, scheinen nach längerer Kultivierung der Endothelzellen zu fehlen. (Scoumanne et al. 2002)

Vor diesem Hintergrund wurde die Genexpression von P-Selectin (CD 62P) direkt an Gewebe der Vena saphna magna mittels quantitativer Real-time PCR untersucht.

Hierzu wurde ein Venenstück am Tage der Entnahme nach Durchspülung und Ablösung von Bindegewebe in etwa 1x1 mm große Gebestücke zerteilt und für 24 Stunden in Endothelzellmedium eingelegt. Am Folgetag wurde eine Aktivierung mit 10 ng/ml IL-1 β + 10 ng/ml TNF- α und 100 ng/ml IFN- γ + 10 ng/ml TNF- α im Vergleich vorgenommen. Die verwendeten Zeitintervalle zur Stimulation betragen 30 min, 1 Stunde, 2 Stunden, 4 Stunden und 6 Stunden. Zusätzlich wurde unter dieser Stimulation die Expression von E-Selectin (CD 62E) bestimmt.

Die erhobenen Daten beziehen sich hierbei auf drei unabhängige Versuche mit jeweils drei Versuchsansätzen.

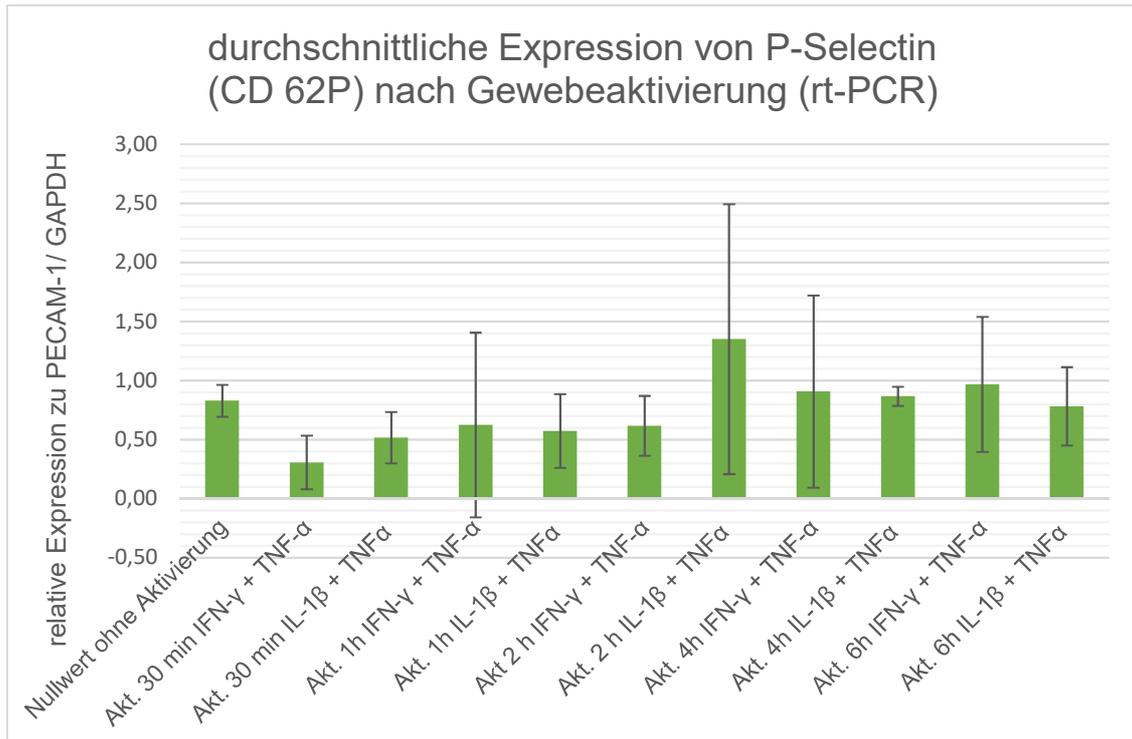


Diagramm 3-5: relative Expression (quant. rt-PCR) des Rezeptors P-Selectin (CD 62P) nach Stimulation von Gewebe mit IL-1 β + TNF- α und IFN- γ + TNF- α im Vergleich. Angegebene Mittelwerte und Standardabweichungen beziehen sich auf drei Versuche mit jeweils drei Ansätzen.

Für keines der Zeitintervalle konnte hierbei eine deutliche und statistisch signifikante Steigerung der Expression für P-Selectin (CD 62P) ermittelt werden. Anhand des Nullwertes ohne Aktivierung ist auch hier eine erhöhte Grundexpression von P-Selectin feststellbar.

Zum Nachweis einer verwertbaren Gewebeaktivierung wurde zusätzlich die Expression des Adhäsionsmoleküls E-Selectin (CD 62E) überprüft.

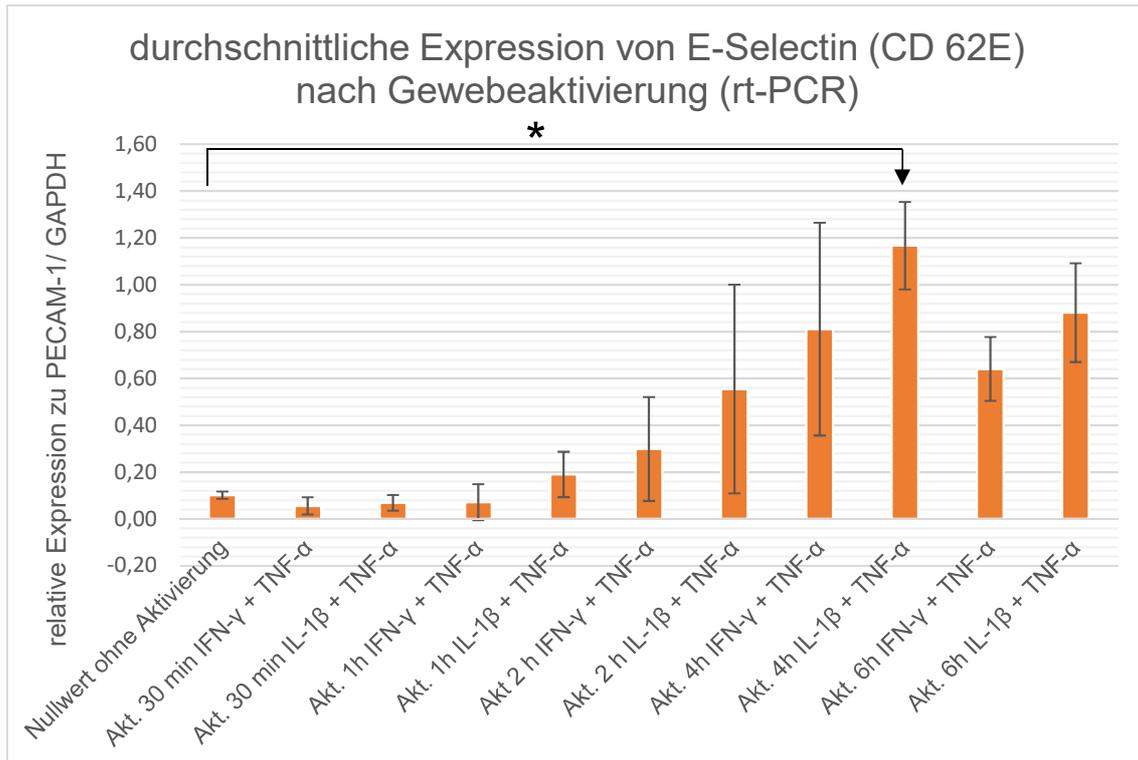


Diagramm 3-6: relative Expression (quant. rt-PCR) des Rezeptors E-Selectin (CD 62E) nach Stimulation von Gewebe mit IL-1β + TNF-α und IFN-γ + TNF-α im Vergleich. Angegebene Mittelwerte und Standardabweichungen beziehen sich auf drei Versuche mit jeweils drei Ansätzen. Zum Ausgangswert (Nullwert ohne Aktivierung) signifikante Veränderungen der Genexpression sind durch * markiert ($p < 0,05$).

Im Gegensatz zu P-Selectin (CD 62P) konnte die Expression des Oberflächenrezeptors E-Selectin (CD 62E) im Zeitverlauf durch Stimulation mit IL-1β + TNF-α, beziehungsweise IFN-γ + TNF-α erheblich gesteigert werden. Ausgehend von Nullwert konnte eine Zunahme der Expression bei einer Stimulationsdauer von 4 Stunden mit IL-1β + TNF-α im Durchschnitt um etwa das Zehnfache festgehalten werden.

Dieser Wert kann zudem als statistisch signifikant eingestuft werden ($p < 0,05$).

3.4 Darstellung des Oberflächenrezeptors PECAM-1 (CD 31) und Rezeptorhemmung mittels spezifischer siRNA

3.4.1 Zellaktivierung

Im Gegensatz zu den Adhäsionsmolekülen E-Selectin (CD 62E), VCAM-1 (CD 106) oder ICAM-1 (CD 54) wird PECAM-1 (CD 31) bereits ohne Stimulation von Endothelzellen exprimiert. (Woodfin et al. 2007)

3.4.2 Hemmung von PECAM-1 (CD 31) mittels spezifischer siRNA

Wie bereits beschrieben, wurden für die Versuche zum Rezeptor PECAM-1 (CD 31) 100.000 Endothelzellen pro Loch einer 12-well-Platte angezüchtet.

Für die Durchführung der Transfektion wurde das bisherige Versuchsschema modifiziert, da Vorversuche zeigten, dass eine signifikante Rezeptorhemmung mit einer einzigen Transfektion nicht erreicht werden konnte. Um die toxische Wirkung der eingesetzten Transfektionsreagenz und der siRNA zu reduzieren, wurde die Transfektionsdauer von 24 Stunden auf 2 Stunden verkürzt, dafür aber die Konzentration an siRNA von 13,3 nM auf 50 nM erhöht. Die Transfektionslösung wurde nach Bildung der Lipoplexe mit Endothelzellmedium ohne Serum und ohne Antibiotikum auf die Zellen gegeben, das Volumen pro Loch einer 12-well-Platte betrug dabei 300 µl. Nach Ablauf von 2 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel gegen 1 ml Kompletmedium mit Serum und Antibiotikum. (Nolte et al. 2009) Gegeneinander verglichen wurde die Transfektionswirkung nach einem, zwei, drei und vier Tagen, wobei alle 24 Stunden die Transfektion wiederholt wurde. Eine gestaffelte Versuchsanordnung führte zu einem gemeinsamen Endpunkt. Alle Zelllinien wurden gemeinsam angezüchtet, zum Zeitpunkt der Transfektion erfolgte an allen Zellen, einschließlich der Kontrollen, ein Mediumwechsel. Es wurde eine siRNA-Sequenz gegen PECAM-1 (CD 31) verwendet, bezeichnet als siRNA (PECAM). Als Negativ-Kontrolle diente auch hier eine siRNA mit unspezifischer Nukleotidsequenz, genannt siRNA scramble, (siRNAscr.).

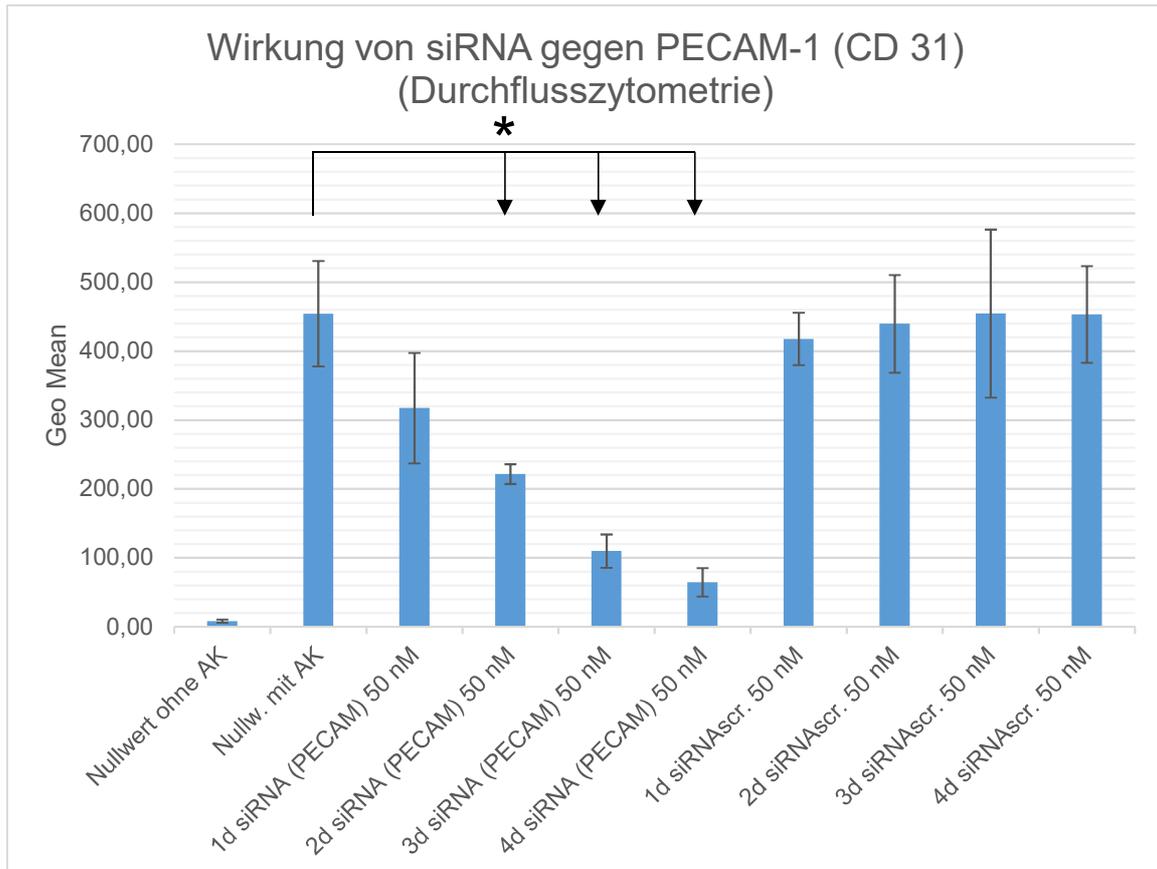


Diagramm 3-7: relative Expression (Geo Mean, durchflusszytometrische Messung) des Rezeptors PECAM-1 (CD 31) mit Darstellung der Rezeptorhemmung nach mehrfacher Transfektion im Vergleich über 1-4 Tage (d). Wiederholung der Transfektion alle 24 Stunden. Die Werte beziehen sich auf 4 Versuche mit jeweils 3 Ansätzen. Zum Ausgangswert (Nullwert mit Antikörper) signifikante Veränderungen der Genexpression sind durch * markiert ($p < 0,05$).

	Nullwert mit AK	1d siRNA (PECAM) 50 nM	2d siRNA (PECAM) 50 nM	3d siRNA (PECAM) 50 nM	4d siRNA (PECAM) 50 nM
Mittelwert (Geo Mean)	454,09	317,18	221,50	109,83	64,53
Rezeptorhemmung in Prozent	0,0%	-30,70%	-52,16%	-77,20%	-87,36%
	Nullwert mit AK	1d siRNA scr. 50 nM	2d siRNA scr. 50 nM	3d siRNA scr. 50 nM	4d siRNA scr. 50 nM
Mittelwert (Geo Mean)	454,09	417,53	439,45	454,25	453,04
Rezeptorhemmung in Prozent	0,0%	-8,20%	-3,28%	0,04%	-0,23%

Tabelle 3-3: Gegenüberstellung der relativen Expression (Geo Mean) des Rezeptors PECAM-1 (CD 31) nach erfolgten Transfektionen mit der prozentualen siRNA-vermittelten Rezeptorhemmung, bezogen auf den Nullwert mit Antikörper.

Anhand der Ergebnisse der Durchflusszytometrie zeigte sich eine deutliche Hemmung des Rezeptors PECAM-1 (CD 31) erst am vierten Tag nach der vierten Transfektion.

Hierbei konnte im Verhältnis zum Ausgangswert (Nullwert mit Antikörper) eine Reduktion von maximal 87,36% nach der vierten Transfektion erreicht werden. Die Ergebnisse vom zweiten, dritten und vierten Tag mit zwei, drei, beziehungsweise vier erfolgten Transfektionen können sowohl im Verhältnis zum Ausgangswert (Nullwert mit Antikörper), wie auch zur jeweiligen Kontrollgruppe (siRNA scramble) als statistisch signifikant eingestuft werden ($p < 0,05$). Nach einer erfolgten Transfektion besteht auf Proteinebene noch keine statistisch signifikante Rezeptorhemmung. Eine mehrmalige Transfektion der Kontrollgruppe mit non-sense-siRNA (siRNA scramble) zeigte keine signifikante Änderung der Expression von PECAM-1.

3.4.3 Nachweis der Genexpression zu PECAM-1 (CD31) auf mRNA-Ebene

Entsprechend zu den bisherigen Versuchen zu P-Selectin (CD 62P) wurde auch bei der Untersuchung des Rezeptors PECAM-1 zur Bestätigung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie eine Isolation der mRNA mit anschließender semi-quantitativer Messung der mRNA (PECAM-1) mittels Real-time PCR durchgeführt.

Entsprechend dem Versuchsaufbau zur Durchflusszytometrie zu diesem Rezeptor wurden auch hier 100.000 Zellen pro Loch einer 12-well-Platte angezchtet. Das Schema der Transfektion wurde beibehalten. Die Transfektionsdauer betrug 2 Stunden mit einer siRNA-Konzentration von 50 nM pro Loch einer 12-well-Platte in 300 μ l Endothelzellmedium ohne Antibiotikum und ohne Serum und 2 μ l INTERFERinTM als Transfektionsreagenz. Die Rezeptorhemmung der spezifischen siRNA gegen PECAM-1 (siRNA PECAM) nach einer, zwei, drei und vier Transfektionen im Abstand von 24 Stunden wurden gegeneinander verglichen. Als Negativ-Kontrolle diente auch hier eine non-sense siRNA (siRNAscr.).

Als Referenzgen für die quantitative Real-time PCR wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ausgewählt.

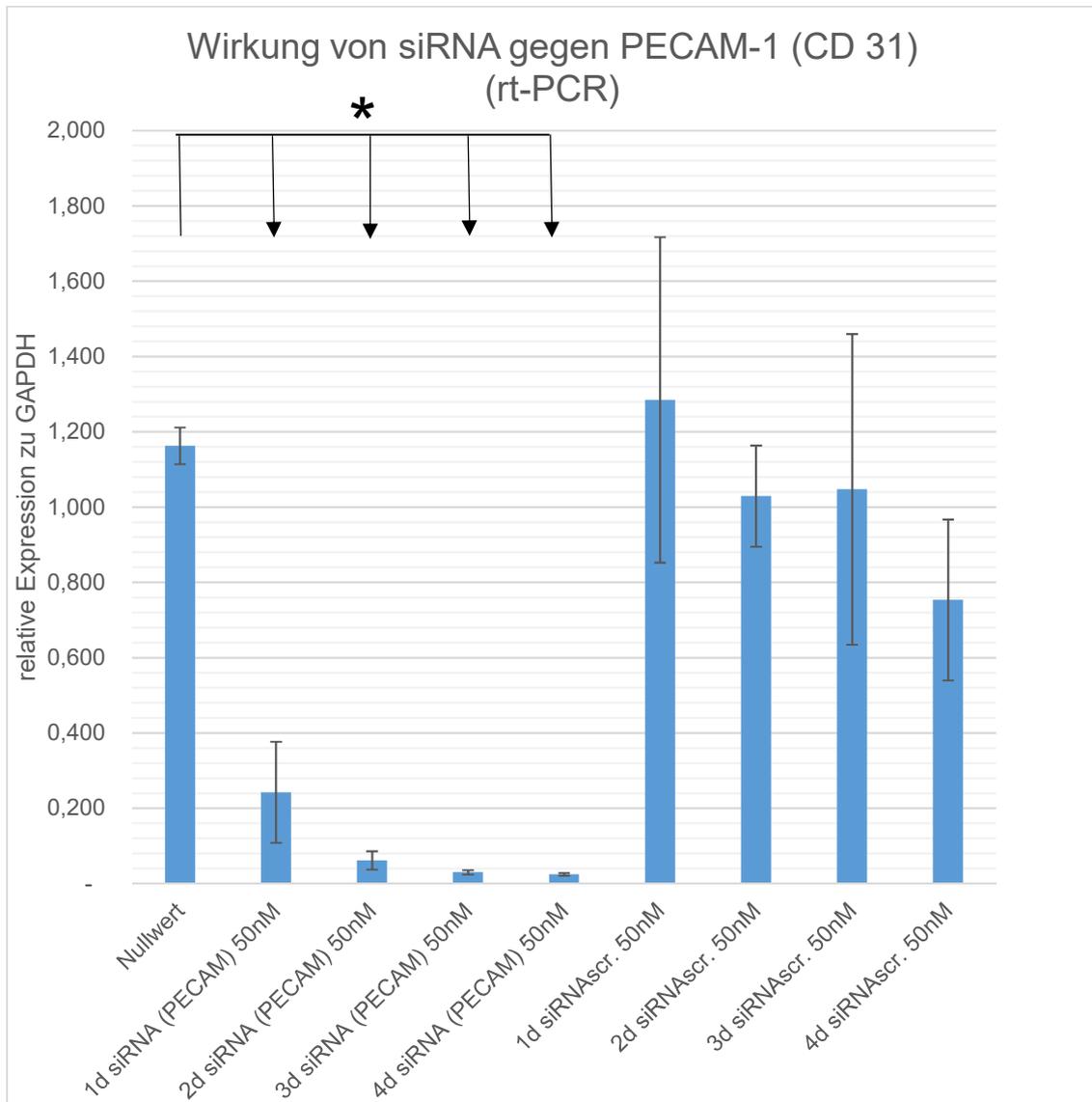


Diagramm 3-8: relative Expression (rt-PCR) des Rezeptors PECAM-1 (CD 31) mit Darstellung der Rezeptorhemmung nach mehrfacher Transfektion im Vergleich über 1-4 Tage (d). Wiederholung der Transfektion alle 24 Stunden. Die Werte beziehen sich auf 3 Versuche mit jeweils 3 Ansätzen. Zum Ausgangswert (Nullwert) signifikante Veränderungen der Genexpression sind durch * markiert ($p < 0,05$)

	Nullwert	1d siRNA (PECAM) 50 nM	2d siRNA (PECAM) 50 nM	3d siRNA (PECAM) 50 nM	4d siRNA (PECAM) 50 nM
Mittelwert (relative Expression)	1,163	0,242	0,061	0,030	0,025
Rezeptor- hemmung in Prozent	0,0%	-79,16%	-94,72%	-97,44%	-97,89%
	Nullwert	1d siRNA scr. 50 nM	2d siRNA scr. 50 nM	3d siRNA scr. 50 nM	4d siRNA scr. 50 nM
Mittelwert (relative Expression)	1,163	1,285	1,029	1,047	0,753
Rezeptor- hemmung in Prozent	0,0%	+10,48%	-11,49%	-9,96%	-35,21%

Tabelle 3-4: Gegenüberstellung der relativen Expression des Rezeptors PECAM-1 (CD 31) nach erfolgten Transfektionen mit der prozentualen siRNA-vermittelten Rezeptorhemmung, bezogen auf den Nullwert.

Der Versuch zeigt, dass bereits nach einer Transfektion die Menge an Boten-RNA (mRNA) zu PECAM-1 (CD 31), bezogen auf den Nullwert, um durchschnittlich 79,16% gesenkt wurde. Im weiteren Verlauf konnte diese mRNA-Menge nach der vierten Transfektion im Durchschnitt um 97,89% des Ausgangswertes gesenkt werden.

Ausgehend von der PECAM-Expression in unbehandelten Zellen, können diese Messwerte über vier Transfektionen als statistisch signifikant ($p < 0,05$) bewertet werden. Auffällig ist hierbei, dass eine tatsächliche Rezeptorhemmung auf Proteinebene erst am vierten Tag nach vier Transfektionen um mehr als 80% deutlich gesenkt werden konnte, was auf mRNA-Ebene schon nach 2 Transfektionen erreicht werden konnte.

Anhand der Anwendung der non-sense siRNA (siRNAscr.) als Negativ-Kontrolle zeigt sich bei der Untersuchung der Genexpression zu PECAM-1 auf mRNA-Ebene ebenfalls im Verlauf nach 4 Transfektionen eine Abnahme der relativen Expression für PECAM-1. Insgesamt kann dies als Indiz dafür gewertet werden, dass die Abfolge von mehreren Transfektionen die Zellfunktion erheblich einschränken. Von einem sicheren Vorhandensein von Nebenwirkungen durch Transfektionen und die Anwendung von siRNA muss daher ausgegangen werden. Um dies genauer zu untersuchen, erfolgte ein Test zur Zellviabilität und

ein Versuch zur Wirkung der spezifischen siRNA für PECAM-1 auf weitere Adhäsionsmoleküle.

3.4.4 Zellvitalität und Nebenwirkungen durch wiederholte Transfektionen mit siRNA

3.4.4.1 morphologische Veränderungen

Betrachtet man die Zellkulturen nach einer, zwei, drei und vier in Folge im Abstand von 24 Stunden durchgeführten Transfektionen, so zeigen sich bereits Zellveränderungen.

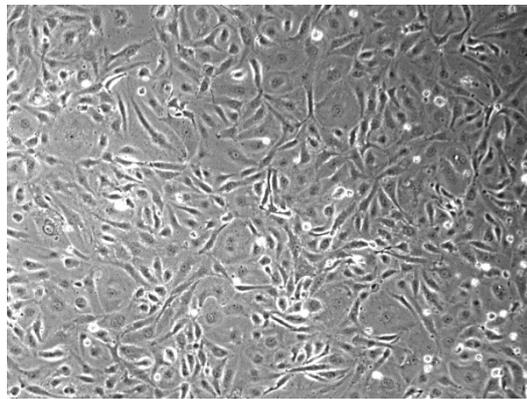


Abbildung 3-1: Endothelzellkultur ohne erfolgte Transfektion, 10-fache Vergrößerung

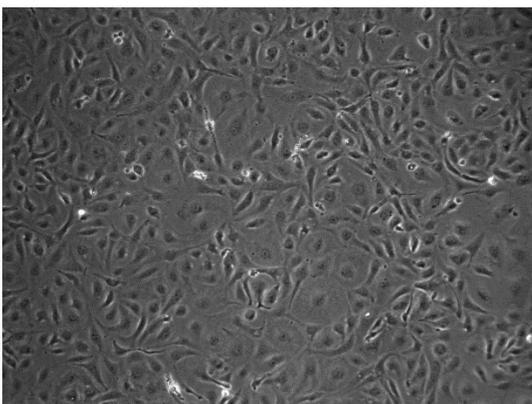


Abbildung 3-4: nach einer Transfektion (siRNA PECAM), 10-fache Vergrößerung

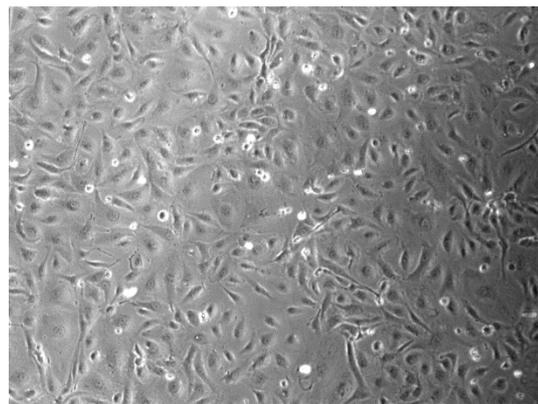


Abbildung 3-5: nach zwei Transfektionen (siRNA PECAM), 10-fache Vergrößerung

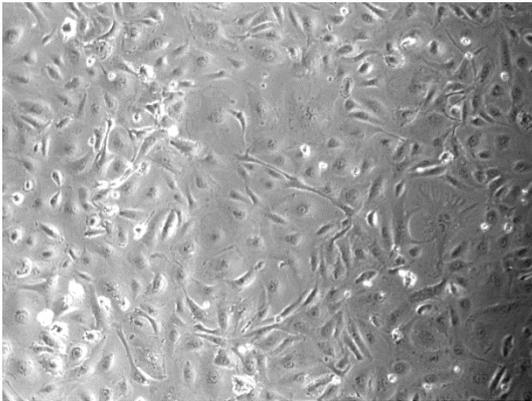


Abbildung 3-6: nach drei Transfektionen (siRNA PECAM), 10-fache Vergrößerung

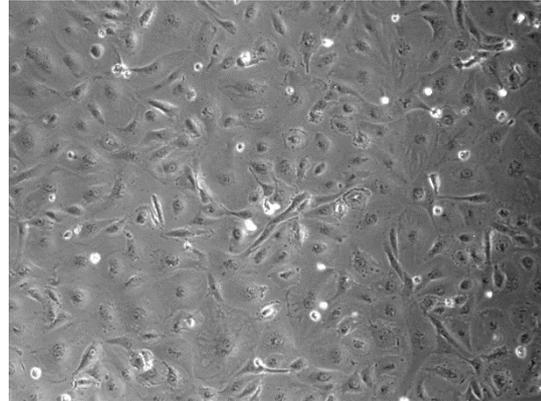


Abbildung 3-7: nach vier Transfektionen (siRNA PECAM), 10-fache Vergrößerung

Nach vier Transfektionen ist neben einer deutlichen Abnahme der Zelldichte eine Vergrößerung der verbliebenen Zellen feststellbar.

3.4.4.2 Zellviabilität (MTT-Test)

Um die Lebensfähigkeit, beziehungsweise den Anteil an lebenden Zellen der einzelnen Proben im Verhältnis zur Nullprobe erfassen zu können, wurde parallel zu einem Transfektionsversuch ein MTT-Test durchgeführt. Hierbei wird der Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) NADP- und NADPH-abhängig in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan reduziert. Der Reaktionsablauf spiegelt die Glykolyserate der Zellkultur wieder. Die für die Versuche verwendeten Endothelzellen der Vena saphena magna (HVSEC) haften auf Gelatine-beschichteten Zellkulturflaschen. Sterben die Zellen ab, so lösen sie sich vom Untergrund und werden mit dem nächsten Mediumwechsel ausgespült.

Vor Versuchsbeginn erfolgte eine Zellanzucht mit 100.000 Zellen pro Loch einer 12-well-Platte. Wie bereits beschrieben, erfolgten Transfektionen über 4 Tage mit spezifischer und non-sense-siRNA als Negativ-Kontrolle. Nach Abschluss der Transfektionen und Herstellung der MTT-Stammlösung wurden 30 µl davon zu 300 µl frischem Medium auf die Zellen gegeben und diese für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran konnten 100 µl 0,01 M HCl-Lösung mit 10 µg gelöstem Natriumdodecylsulfat auf die Zellen pipettiert werden. Es folgte eine

zweite Inkubationszeit von 14 Stunden bei 37°C im Brutschrank zur Lyse der Zellen. Nach einer darauf folgenden Verdünnung von 1:4 mit Aqua dest. konnte die Absorptionsbestimmung bei 570 nm durchgeführt werden. Zusätzlich wurde eine Negativ-Probe ohne Zellen angesetzt.

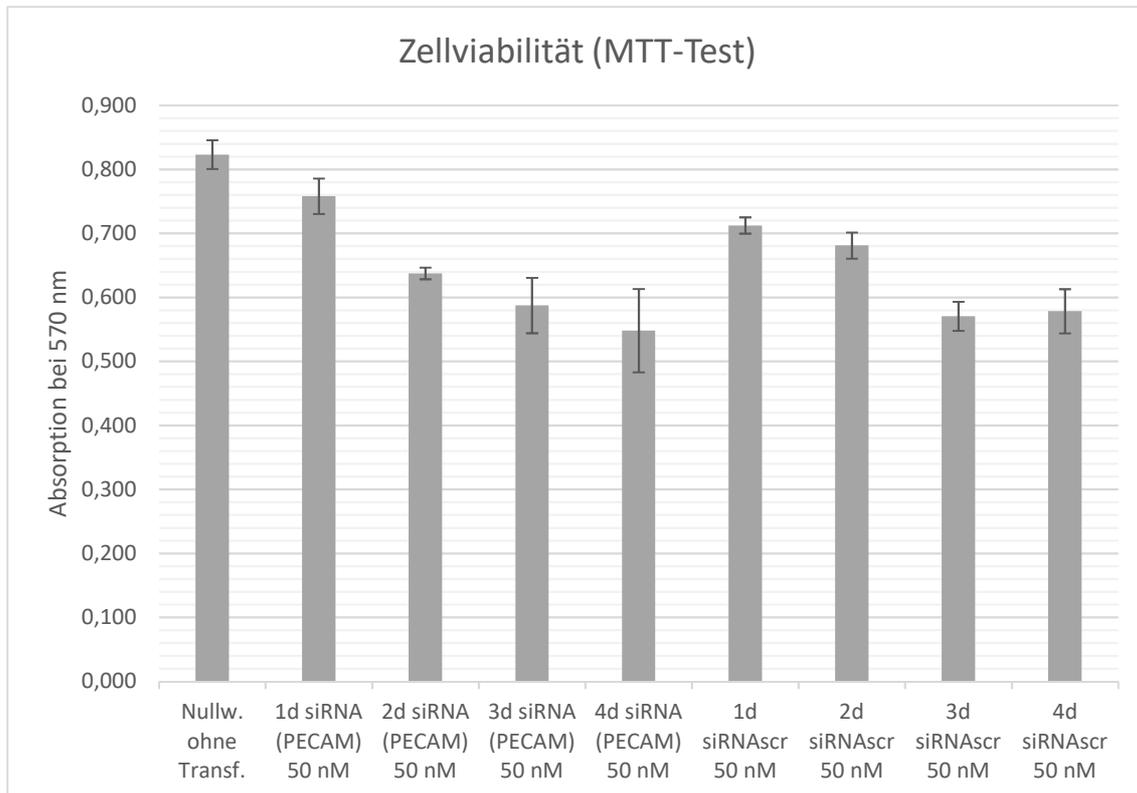


Diagramm 3-9: Vergleich der Zellviabilität (MTT-Test) über 4 Transfektionen. Die Ergebnisse beziehen sich auf einen Versuch mit drei Ansätzen

	Nullwert ohne Transfektion	1d siRNA (PECAM) 50 nM	2d siRNA (PECAM) 50 nM	3d siRNA (PECAM) 50 nM	4d siRNA (PECAM) 50 nM
Absorption bei 570 nm	0,823	0,758	0,637	0,587	0,548
Viabilitätseinbuße in Prozent	0,0%	-7,90%	-22,56%	-28,64%	-33,41%
	Nullwert ohne Transfektion	1d siRNA scr. 50 nM	2d siRNA scr. 50 nM	3d siRNA scr. 50 nM	4d siRNA scr. 50 nM
Absorption bei 570 nm	0,823	0,712	0,681	0,570	0,578
Viabilitätseinbuße in Prozent	0,0%	-13,45%	-17,25%	-30,70%	-29,73%

Tabelle 3-5: Gegenüberstellung der Absorption bei 570 nm (MTT-Test) über 4 Transfektionen mit der prozentualen Viabilitätseinbuße in Prozent, bezogen auf den Nullwert ohne Transfektion.

Anhand des MTT-Tests zur Zellviabilität ist erkennbar, dass mit der Anzahl der aufeinanderfolgenden Transfektionen die Endothelzellen geschädigt werden. Die Reduktion der Absorption ergibt sich hierbei aus einer bereits mikroskopisch erkennbaren Verringerung der Zellzahl infolge vermehrtem Zelluntergang nach mehrfacher Transfektion, wie auch aus einer Einschränkung der Zellfunktion infolge der Wirkung der eingesetzten siRNA.

3.4.4.3 Wirkung der siRNA (PECAM-1) auf andere Genprodukte (off-target)

Um abzuschätzen, wie spezifisch die eingesetzte siRNA gegen PECAM-1 wirkt, wurden anhand eines Versuches weitere Proteinexpressionen untersucht. Als Beispiele wurden hierzu die Adhäsionsmoleküle E-Selectin (CD 62P), *Vascular cell adhesion protein 1* (VCAM-1, CD 106) und *Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1, CD 54) ausgewählt.

Die Transfektion gegen PECAM-1 (CD 31) erfolgte nach dem bisherigen Schema. Wie bereits beschrieben wurde die siRNA-Wirkung nach einer, zwei, drei und vier Transfektionen gegeneinander verglichen, wobei diese alle 24 Stunden wiederholt wurden.

Zur Expression der Rezeptoren E-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1 erfolgte 24 Stunden nach Abschluss der Transfektionen eine Aktivierung der Zellen mit 10 ng/ml Tumornektorsfaktor- α (TNF- α) für 8 Stunden.

Eine Auswertung der Genexpression erfolgte auf mRNA-Ebene über die quantitative Real-time PCR. Als Referenzgen wurde GAPDH gewählt.

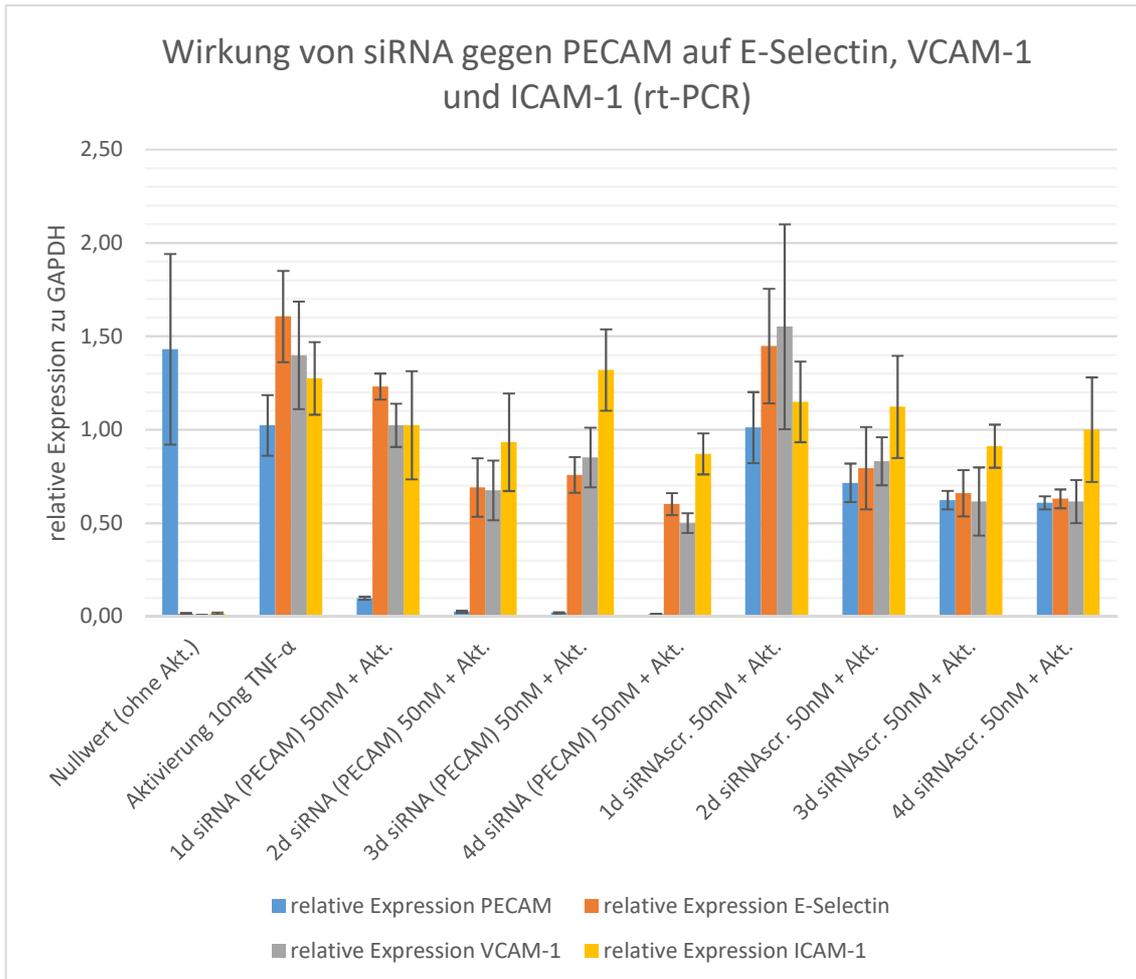


Diagramm 3-10: Wirkung (off-target) der spezifischen siRNA (PECAM) auf die Endothelzellrezeptoren E-Selectin (CD 62E), VCAM-1 (CD 106) und ICAM-1 (CD 54) nach 1-4 Transfektionen im Vergleich. Die Werte beziehen sich auf einen Versuch mit drei Ansätzen

	Aktivierung 10 ng TNF- α	1d siRNA (PECAM) 50 nM + Akt.	2d siRNA (PECAM) 50 nM + Akt.	3d siRNA (PECAM) 50 nM + Akt.	4d siRNA (PECAM) 50 nM + Akt.	1d siRNAscr. 50 nM + Akt.	2d siRNAscr. 50 nM + Akt.	3d siRNAscr. 50 nM + Akt.	4d siRNAscr. 50 nM + Akt.
Reduktion von PECAM im Verhältnis zum Nullwert (nach Akt.)	0%	-90%	-97%	-98%	-99%	-12%	-30%	-39%	-41%
Reduktion von E-Sel. im Verhältnis zum Nullwert (nach Akt.)	0%	-23%	-57%	-53%	-63%	-10%	-51%	-59%	-61%
Reduktion von VCAM-1 im Verhältnis zum Nullwert (nach Akt.)	0%	-27%	-52%	-39%	-64%	11%	-41%	-56%	-56%
Reduktion von ICAM-1 im Verhältnis zum Nullwert (nach Akt.)	0%	-20%	-27%	4%	-32%	-10%	-12%	-28%	-22%

Tabelle 3-1: Prozentuale Hemmung (off-target) der Endothelzellrezeptoren E-Selectin (CD 62E), VCAM-1 (CD 106) und ICAM-1 (CD 54) nach 1-4 Transfektionen mit spezifischer siRNA (PECAM) im Vergleich. Die Werte beziehen sich auf einen Versuch mit drei Ansätzen.

Ersichtlich ist aus diesem Versuch, dass allein schon eine Transfektion mit spezifischer siRNA gegen PECAM-1 die Endothelzellrezeptoren E-Selectin (CD 62E), VCAM-1 (CD 106) und ICAM-1 (CD 54) ebenfalls hemmt und das bereits um 20 - 27%. Wiederholt man diese Transfektionen alle 24 Stunden über 4 Tage, so steigert sich diese unbeabsichtigte Hemmung auf die drei Adhäsionsmoleküle auf über 60% sowohl in der Wirkgruppe, wie auch in der Kontrollgruppe (siRNAscr.).

Die Transfektion und die Wirkungsweise der siRNA stellen hier Stressfaktoren dar und führen zu einem veränderten Zellstoffwechsel.

3.5 Versuche zur Stabilität von siRNA

Für eine Anwendung von siRNA in vivo am Tiermodell wie auch für die Überlegung der Behandlung von Patienten im Rahmen einer Bypass-Operation muss deren Stabilität bei Kontakt mit Blutbestandteilen gewährleistet sein. Zur Überprüfung der Stabilität von siRNA bei Kontakt mit Serum, Vollblut und serumhaltigem Endothelzellmedium diente eine Versuchsreihe bei der die

Nukleotidstränge mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt wurden. Sobald hierbei ein Verlust der 21 Basenpaare dargestellt werden kann, muss von einem Abbau ausgegangen werden. Verwendet wurde ein natives 4,5%iges low-melting Agarose-Gel mit dem Fluoreszenzfarbstoff GelRed zur Darstellung von Nucleinsäuren. In vorgeformte Taschen wurde die siRNA nach entsprechender Inkubation mit Serum, Vollblut oder Endothelzellmedium und zusätzlich 6xLadepuffer eingegeben. Die Gelelektrophoresekammer war zusätzlich mit 1x MEN-Puffer befüllt. Zur Auftrennung der Nucleinsäuren wurde eine Spannung von 80 -100 V für 30 – 45 min an die Gelelektrophoresekammer angelegt, eine Auswertung der Gele erfolgte anschließend über eine Fluoreszenzaufnahme. Als DNA-Marker diente der peqGold ultra low range DNA-Leiter I der Firma peqlab Biotechnologie GmbH und als Kontrolle wurde siRNA mit physiologischer Kochsalzlösung inkubiert. Gegeneinander verglichen wurde eine nicht modifizierte siRNA gegen porcines VCAM-1 mit einer chemisch stabilisierten siRNA gegen humanes E-Selectin (CD 62E). Die Länge beider doppelsträngiger siRNA-Sequenzen betrug 21 Basenpaare.

3.5.1 Vergleich der nicht modifizierten siRNA gegen porcines VCAM-1 mit der modifizierten siRNA gegen humanes E-Selectin (CD 62E) bei Kontakt mit Serum über ein Zeitintervall von 0-6 Stunden

10 µl siRNA einer 20 µM Stammlösung wurden mit 100 µl kurz zuvor abzentrifugiertem Serum versetzt und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe für 0 Stunden wurde sofort auf das Gel aufgetragen.

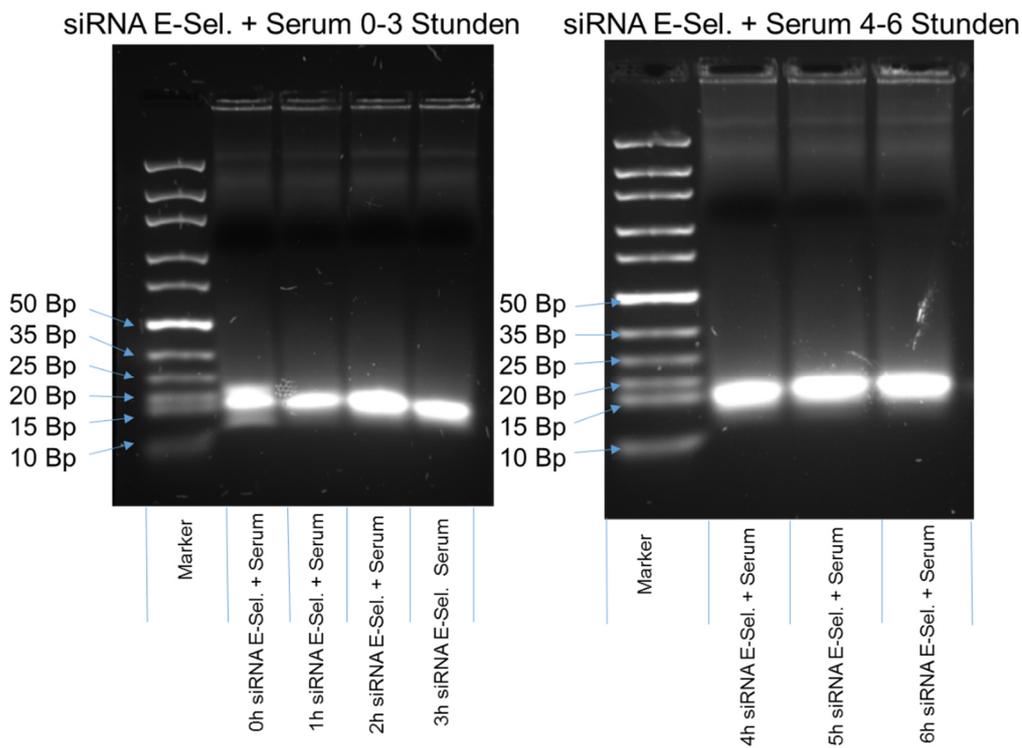


Abbildung 3-8: Fluoreszenzaufnahme Agarosegel, modifizierte siRNA gegen humanes E-Selectin (CD 62E) mit Serum, Inkubationszeit 0-6 Stunden

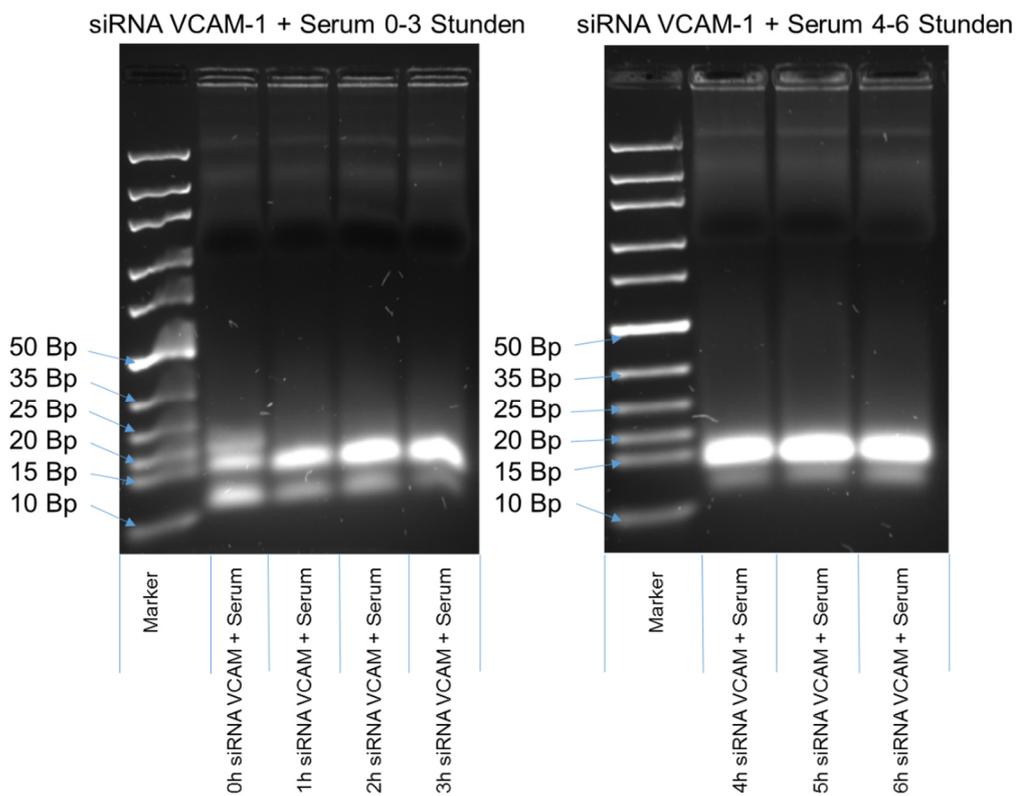


Abbildung 3-9: Fluoreszenzaufnahme Agarosegel, nicht modifizierte siRNA gegen porcines VCAM-1 (CD 106) mit Serum, Inkubationszeit 0-6 Stunden

Während sowohl die chemisch modifizierte siRNA gegen humanes E-Selectin wie auch die nicht modifizierte siRNA gegen porcines VCAM-1 nach sofortiger Auftragung (Zeitintervall 0 Stunden) mit Serum auf das Gel noch teilweise intakte siRNA-Sequenzen mit einer Länge von 21 Basenpaaren aufweisen, zeigte sich über alle übrigen Zeitintervalle ein Doppelband unterhalb der Markierung für 20 Basenpaare und damit eine eindeutige Degradierung.

3.5.2 Vergleich der nicht stabilisierten siRNA gegen porcines VCAM-1 mit der stabilisierten siRNA gegen humanes E-Selectin bei Kontakt mit Serum verschiedener Verdünnungsstufen und sofortiger Auftragung auf das Gel

Serum wurde mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, verglichen wurde die Wirkung auf siRNA von 1%igem (1:100) Serum, 10%igem (1:10) Serum, 50%igem (1:2) Serum und unverdünntem Serum. Aufgrund des im Vorversuch festgestellten raschen Abbaus, wurde die siRNA nach Durchmischung mit Serum sofort auf das Gel aufgetragen.

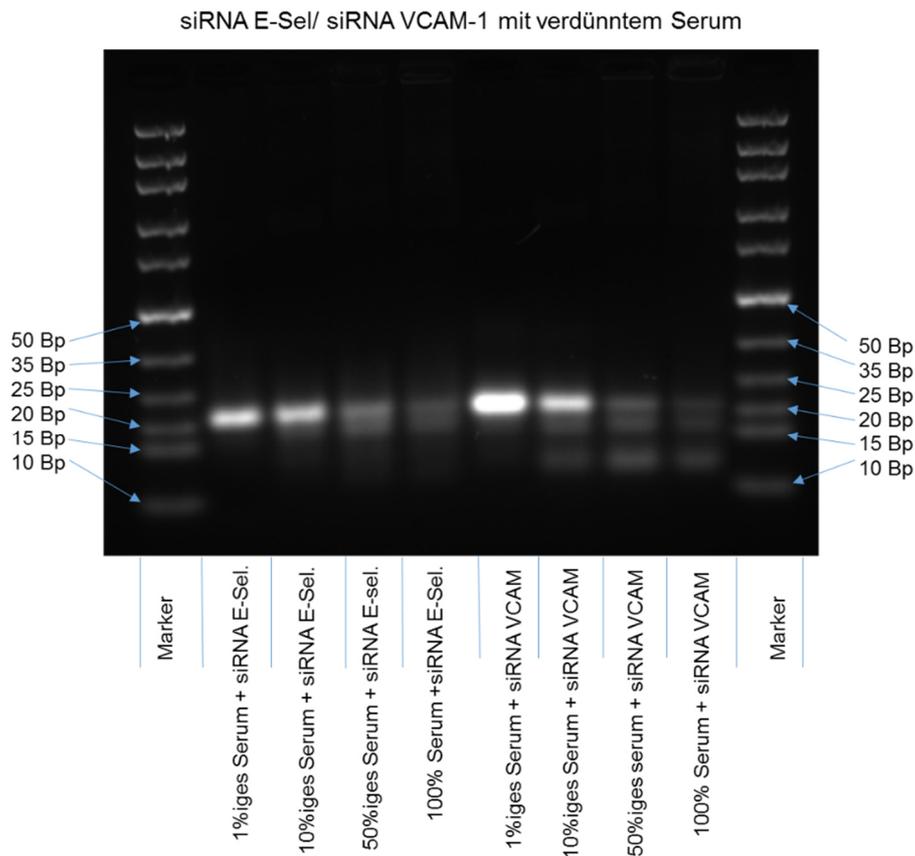


Abbildung 3-10: Fluoreszenzaufnahme Agarosegel, Wirkung von verdünntem Serum auf siRNA E-Sel. (hum.) und siRNA VCAM-1 (porcin)

Sowohl die nicht modifizierte (VCAM-1), wie auch die modifizierte (E-Sel.) siRNA-Sequenz weisen bei Kontakt mit Serum ab einer Verdünnungsstufe von 1:10 nach sofortiger Auftragung auf das Gel Anzeichen für einen beginnenden Abbau auf. Im Falle der modifizierten siRNA ist dieser beginnende Abbau jedoch geringer ausgeprägt, als der der chemisch nicht modifizierten siRNA. Ein minimaler Abbau zeigte sich bereits bei Kontakt der nicht modifizierten siRNA mit 1%igem Serum, während die chemisch modifizierte siRNA für diese Verdünnungsstufe noch keinen Abbau aufweist.

Versuchsweise wurde der RNase-Inhibitor Superase*In™ der Firma Ambion angewendet, der jedoch zur effektiven Hemmung des siRNA-Abbaus bei Kontakt mit Serum eine zu schwache Wirkung zeigte. Ergebnisse zur Anwendung der Superase*In™ werden daher nicht aufgeführt.

3.5.3 Wirkung von Vollblut auf die modifizierte siRNA gegen humanes E-Selectin (CD 62E)

Verglichen wurde hier die Wirkung von unverdünntem und mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:2 verdünntem Vollblut auf die chemisch stabilisierte siRNA-Sequenz (siRNA gegen humanes E-Selectin) über die Inkubationszeit 0-20 min bei Raumtemperatur.

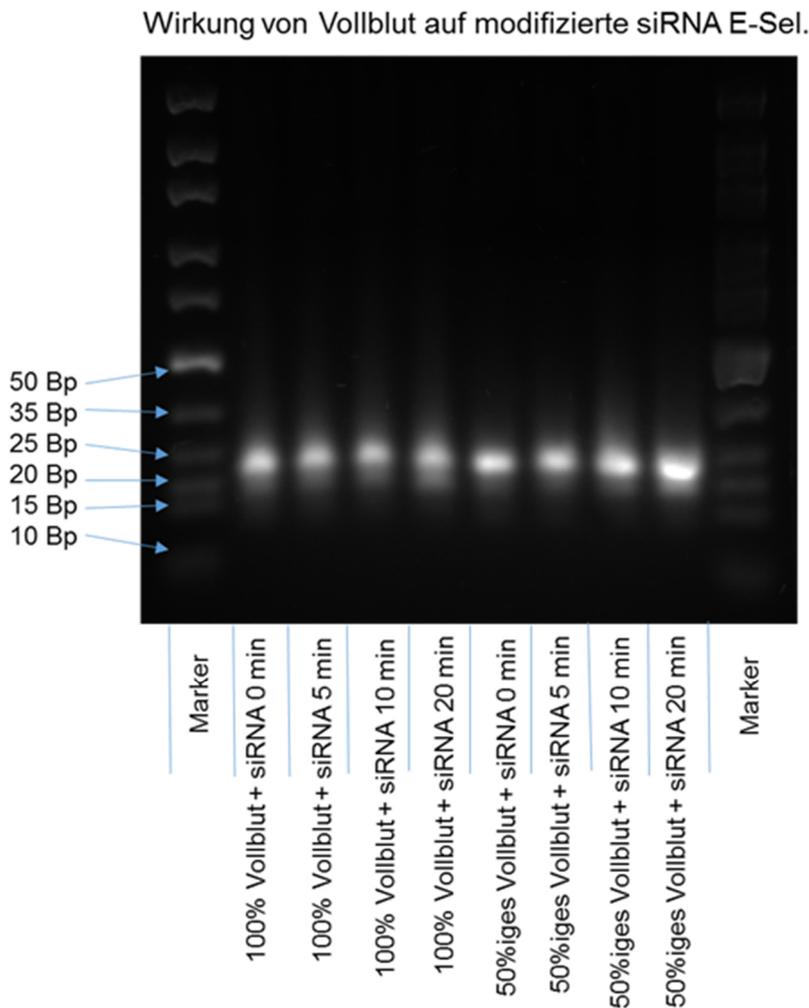


Abbildung 3-11: Fluoreszenzaufnahme Gelelektrophorese
Vergleich der Wirkung von Vollblut und mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:2 verdünntem Vollblut auf die modifizierte siRNA gegen humanes E-Selectin (CD 62E).
Inkubationszeit 0-20 min bei Raumtemperatur

Auch wenn noch eine deutliche Bande über der Marke für 20 Basenpaare liegt, was für den Erhalt der siRNA spricht, so zeigt sich anhand der Banden darunter bereits ein beginnender Abbau und das über alle Zeitintervalle.

3.5.4 Untersuchung zur Stabilität der beiden siRNA-Sequenzen bei Zugabe von Endothelzellmedium mit 2% fetalem Kälberserum

Das für alle Versuche verwendete Endothelzellmedium 2 der Firma Promocell mit allen Zusätzen, einschließlich 2%igem fetalem Kälberserum, wurde auf seine Wirkung auf siRNA-Sequenzen hin untersucht.

Verwendet wurden auch hier die modifizierte siRNA gegen humanes E-Selectin (CD 62E) und die nicht modifizierte siRNA gegen porcines VCAM-1. Die Inkubationszeit bei 37°C betrug 0-1½ h Stunden.

Wirkung von Endothelzellmedium mit 2% fetalem Kälberserum auf siRNA

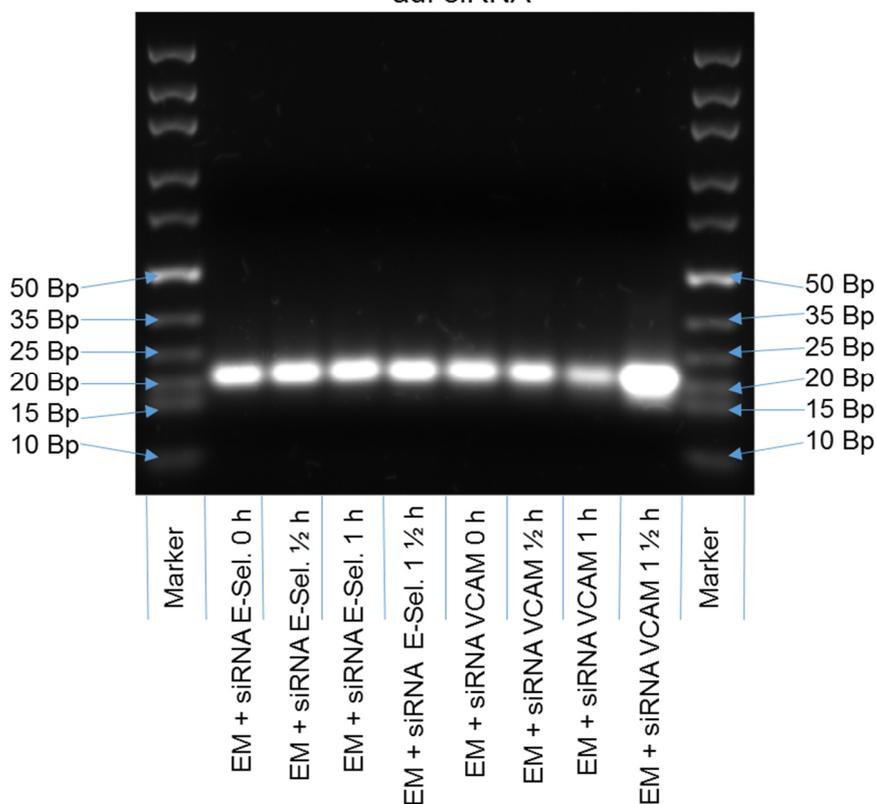


Abbildung 3-12: Fluoreszenzaufnahme Gelelektrophorese. Wirkung von Endothelmedium mit 2% fetalem Kälberserum auf modifizierte siRNA gegen hum. E-Sel. und nicht modifizierte siRNA gegen porcines VCAM-1. Inkubationszeit 0-1½ Stunden bei 37°C.

Die nicht modifizierte siRNA gegen porcines VCAM-1 zeigt nach einer und nach eineinhalb Stunden Anzeichen für einen beginnenden Abbau. Die modifizierte siRNA gegen humanes E-Selectin zeigt keinen Abbau bei Kontakt mit fetalem Kälberserum.

3.5.5 Einfluss von Endothelzellmedium mit 2% fetalem Kälberserum auf siRNA mit einer Inkubationszeit bis 24 Stunden

Der Versuch aus 3.5.4 wurde auf eine Zeitspanne von 2-24 Stunden ausgedehnt. Inkubiert wurde ebenfalls bei 37°C.

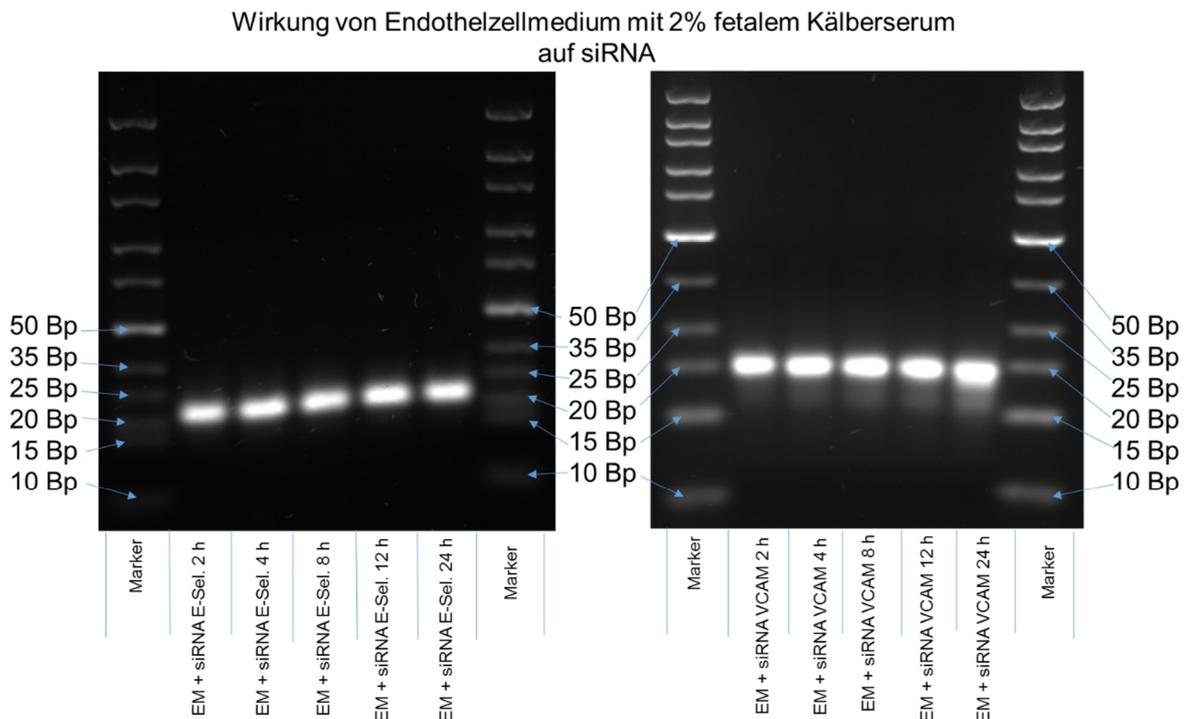


Abbildung 3-13: Fluoreszenzaufnahme Gelelektrophorese. Wirkung von Endothelmedium mit 2% fetalem Kälberserum auf modifizierte siRNA gegen hum. E-Sel. und nicht modifizierte siRNA gegen porcines VCAM-1. Inkubationszeit 2-24 Stunden bei 37°C.

Während die modifizierte siRNA gegen humanes E-Selectin über 24 Stunden nach Durchmischung in Endothelzellmedium mit 2% fetalem Kälberserum praktisch keinen Abbau zeigt, wurde die nicht modifizierte siRNA gegen porcines VCAM-1 über die gesamte Zeitspanne unter gleichen Bedingungen bereits deutlich abgebaut. Im Gegensatz zu den übrigen Versuchen zeigt sich hier ein

klarer Vorteil der modifizierten siRNA gegenüber der nicht modifizierten siRNA. Für in-vitro-Versuche bei Zugabe eines geringen Anteils an fetalem Kälberserum im Zellmedium zeigt sich eine verbesserte Stabilität gegenüber Nukleasen. Als Kontrolle zu diesem Versuch wurde die jeweilige siRNA-Sequenz anstelle Endothelzellmedium in physiologische Kochsalzlösung gegeben. Es zeigte sich hierbei an beiden siRNA-Sequenzen über alle Inkubationsintervalle bis 24 Stunden bei 37°C keinerlei Abbau. Siehe hierzu Abbildung 3-14.

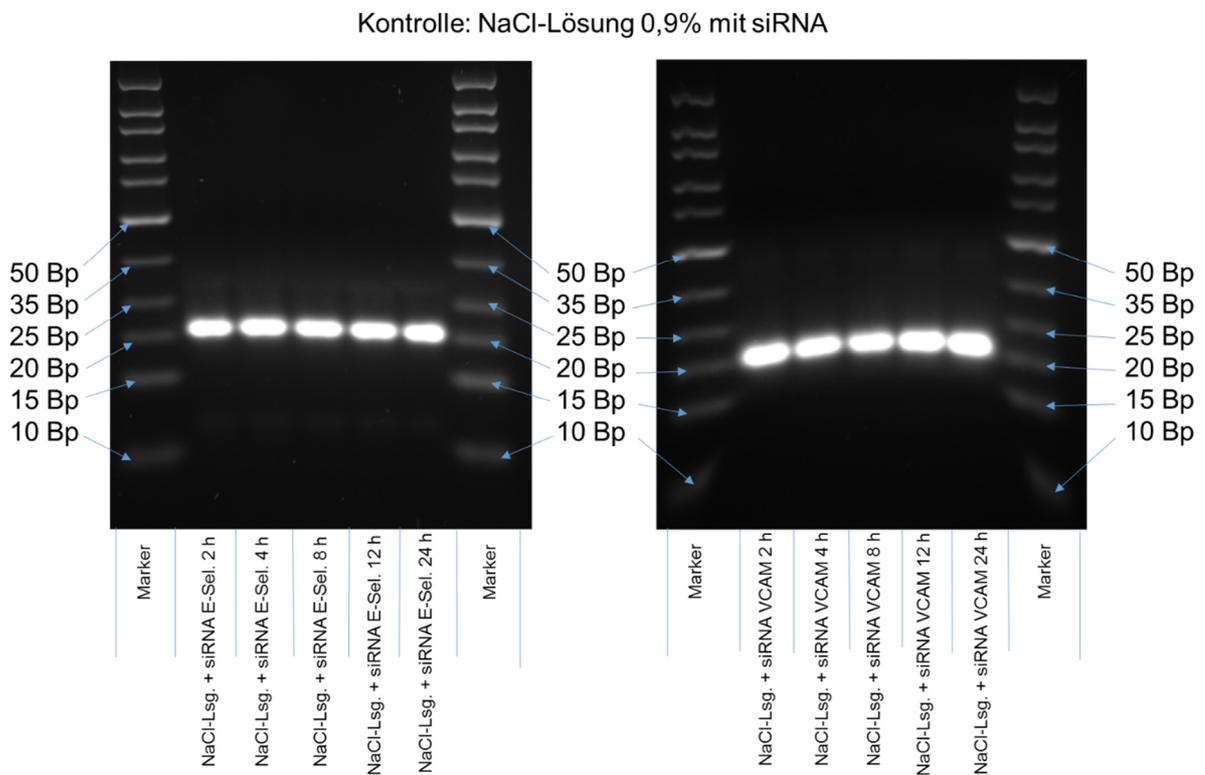


Abbildung 3-14: Fluoreszenzaufnahme Gelelektrophorese. Kontrolle: NaCl-Lösung 0,9% mit modifizierter siRNA gegen hum. E-Sel. und mit nicht modifizierter siRNA gegen porcines VCAM-1. Inkubationszeit 2-24 Stunden bei 37°C.

4 Diskussion

Die stationäre Morbiditätsziffer (Erkrankte je 100.000 Einwohner) für ischämische Herzkrankheiten lag in Deutschland im Jahr 2011 bei 1.069,5 für Männer und 526,4 für Frauen, daneben betrug die Sterbeziffer (Verstorbene je 100.000 Einwohner) für diese Erkrankungsgruppe im selben Jahr 161,2 für Männer und 149,6 für Frauen. Nicht zuletzt durch ein verbessertes medizinisches Behandlungsspektrum unterliegen beide Werte seit Jahren einem stetigen Rückgang. (Deutsche Herzstiftung e.V. 2014)

Bezogen auf die interventionellen Therapieverfahren zeigte sich im Vergleich mit anderen Ländern, dass Deutschland innerhalb Europas mit 67,4 (im Jahr 2011) koronarchirurgischen Eingriffen pro 100.000 Einwohner einen Mittelwert einnimmt und dieser Wert geringer ausfällt als die aus den Vereinigten Staaten bekannte Zahl von etwa 80 pro 100.000 Einwohner. Postuliert werden für Deutschland in der Behandlung von 3-Gefäßerkrankungen relativ zu viele Stent-Implantationen. (Deutsche Herzstiftung e.V. 2014) Im Vergleich zur perkutanen Koronarintervention (PCI) mit Stentimplantation wurden für die aorto-koronare Bypassoperation (CABG) zur Behandlung von 2- und 3-Gefäßerkrankungen im Langzeitverlauf über 3 Jahre (Hannan et al. 2005) wie zur Behandlung von 3-Gefäßerkrankungen über 5 Jahre (Mohr et al. 2012) höhere Offenreitsraten und damit ein Überlebensvorteil nachgewiesen.

Nichtsdestotrotz versagen 10-20% der venösen aorto-koronaren Bypässe innerhalb des ersten Jahres, gefolgt von weiteren 5-10% vom ersten bis fünften Jahr und abermals 20-25% zwischen dem sechsten und zehnten Jahr, so dass 10 Jahre nach einem koronaren Eingriff noch 50% der venösen Bypässe offen sind. (Sabik 2011)

Entscheidend ist zunächst die Qualität der durchgeführten Operation. Je mehr Anastomosen für einen Bypass angelegt wurden, desto höher ist das Risiko eines Bypassverschlusses innerhalb des ersten Jahres. (Mehta et al. 2011)

Bereits vor fast 30 Jahren wurde erkannt, dass die linke innere Brustwandarterie (Arteria thoracica interna) als Bypass für den Ramus interventricularis anterior

aufgrund des geringeren Risikos eines Bypassverschlusses im Vergleich zu einem venösen Bypass im Langzeitverlauf geeigneter ist. (Loop et al. 1986)

Weitere Untersuchungen zeigten, dass auch die beidseitige Verwendung der inneren Brustwandarterie gegenüber eines venösen Bypasses an gleicher Stelle überlegen ist. (Burfeind et al. 2004)

Metaanalysen wiesen darauf hin, dass bei Verwendung der Radialarterien anstelle eines Venenstücks als Bypass ebenfalls eine verbesserte Offenheitsrate im Langzeitverlauf und damit ein Überlebensvorteil besteht. (Cao et al. 2013)

Trotzdem wird auch in Zukunft für die Bypassanlage der Herz hinterwand auf autologe venöse Gefäße zurückgegriffen werden, da nur so langstreckige Stenosen überbrückt werden können und zudem geeignete venöse Gefäße in größerem Umfang zur Verfügung stehen. Eine Entnahme einer der Radialarterien ist nicht bei jedem Patienten möglich und mit mehr Komplikationen verbunden, als die Entnahme der Vena saphena magna.

Ohne den Einsatz der Herz-Lungen-Maschine ist zwar das Risiko einer systemischen Entzündungsreaktion erheblich reduziert (Asimakopoulos 2001), jedoch zeigt sich im Vergleich zwischen einer aorto-koronaren Bypassoperation am schlagenden Herzen mit der Operation am kardioplegisch stillgelegten Herzen kein Unterschied hinsichtlich der Offenheitsrate von venösen Bypassen innerhalb des ersten postoperativen Jahres. (Shroyer et al. 2009; Puskas et al. 2004; Widimsky et al. 2004)

Eine Aktivierung von Thrombozyten durch den Einsatz der Herz-Lungen-Maschine lässt sich durch eine bereits präoperative oder rasche postoperative Gabe von Thrombozytenaggregationshemmern abfangen. Eine frühe postoperative Gabe (innerhalb der ersten Stunde bis 48 Stunden postoperativ) von 100 mg Acetylsalicylsäure konnte trotz der Befürchtung eines erhöhten Blutungsrisikos als sicher bewertet werden. Eine dadurch bedingte Reduktion an postoperativen ischämischen Ereignissen und verbesserte Offenheitsrate der Bypässe konnte mehrfach nachgewiesen werden. (Mangano 2002; Goldman et al. 1989; Chesebro et al. 1984; Chesebro et al. 1982)

Falls es innerhalb des ersten postoperativen Jahres zu einem Bypassverschluss kommt, so ist dies innerhalb dieses Zeitraumes auf eine akute Thrombose zurückzuführen. (Kim et al. 2013)

Durch Entzündungsmediatoren, die durch den Einsatz der Herz-Lungen-Maschine ausgeschwemmt werden, kommt es zwar zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität und auch Expression von Adhäsionsmolekülen, die Hauptschädigung des Bypassendothels ist jedoch auf die perioperative Manipulation, den hypoxischen Einfluss und den postoperativ arteriellen Blutdruck auf das venöse Gefäß zurückzuführen. Neben Endothelverletzungen und einem Endothelzellverlust zeigt sich eine ausgeprägte Endotheldysfunktion, das heißt die Fähigkeit des Endothels, regulatorisch auf Einflüsse zu reagieren (Kilian et al. 2008), ist verloren gegangen. Hierzu gehört insbesondere die fehlende von Endothelzellen generierte antikoagulative Wirkung auf Thrombozyten durch Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin (PGI₂).

Die Grundlage einer sich stetig aufrechterhaltenen inflammatorischen Antwort, die einerseits über die Migration von glatten Muskelzellen zu einer Intimahyperplasie und durch die Leukozyteneinwanderung die Bildung von arteriosklerotischen Veränderungen fördert, wird jedoch bereits mit der Operation gelegt.

Im Vergleich der verschiedenen Möglichkeiten der Gewinnung eines venösen Gefäßabschnittes der Vena saphena magna zeige die schonende Venenentnahme mittels „No-touch“-Technik unter Erhalt von umgebendem Gewebe gegenüber einem Herauslösen aus dem Gefäßbett eine verbesserte Offenheitsrate. (Souza, Domingos S R et al. 2006; Tsui, Janice C S et al. 2002; Souza et al. 2001)

Die Gabe von Statinen zur aggressiven Lipidsenkung zeigte im Langzeitverlauf einen verzögerten Fortschritt von arteriosklerotischen Veränderungen an venösen Bypässen. (Knatterud et al. 2000)

Welchen Einfluss hat die Anwendung von siRNA unter diesem bereits etablierten therapeutischen Gefüge?

4.1 Auswahl der Endothelzellen

Die für alle Versuche verwendeten Endothelzellen stammten aus kurzen überschüssigen Gefäßstücken der Vena saphena magna von Patienten, die sich einer aorto-koronaren Bypassoperation unterzogen hatten. Über die gesamte Dauer der Kultivierung wurden die angezüchteten Endothelzellen intensiv mit Wachstumsfaktoren (*Epidermal Growth Factor*, *Vascular Endothelial Growth Factor*, *basic Fibroblast Factor*, *Insulin-like Growth Factor (Long R3 IGF)*) behandelt. Mit einer angenommenen Verdopplungszeit von 24 Stunden stieg einerseits rasch die Zellzahl an, doch muss andererseits hierunter mit veränderten Zelleigenschaften und einer unter Umständen geringeren Zahl an Zellorganellen oder mit generell unreifen Formen gerechnet werden. Eine Abnahme der Weible-Palade-Bodies über mehrere Passagierungs-Zyklen wurde bereits beschrieben (Scoumanne et al. 2002), weshalb für die Versuche zum Oberflächenmolekül P-Selectin (CD 62P), das gemeinsam mit dem von-Willebrand-Faktor in diesen Speicherorganellen vorliegt, ausschließlich Endothelzellen der ersten Passage verwendet wurden.

Versuche an Gewebestücken der Vena saphena magna wurden zwar ebenfalls durchgeführt, jedoch muss auch hier aufgrund der einwirkenden Hypoxie über die Dauer der Kultivierung von einer endothelialen Dysfunktion ausgegangen werden. Die Untersuchung der Genexpression von Gewebe ist lediglich auf mRNA-Ebene möglich. Für Versuche zum Oberflächenprotein PECAM-1 wurden kultivierte Zellen bis zur dritten Passage verwendet. Eine De-Differenzierung von kultivierten Endothelzellen der Vena saphena magna wurde ab der dritten bis vierten Passage beschrieben. (Scoumanne et al. 2002)

Auch wenn humane Endothelzellen der Nabelschnurvene über mehrere Passagen hinweg ein besseres Wachstumsverhalten zeigen, so eignen sich für in-vitro-Versuche zur Pathogenese arteriosklerotischer Veränderungen Endothelzellen der Vena saphena magna wesentlich besser. (Tan et al. 2004)

Immortalisierte Endothelzellen weisen signifikante morphologische und funktionale Unterschiede zu primären Endothelzelllinien auf und stellen daher keine Alternative dar. (Tan et al. 2004)

4.2 Die siRNA-Methode

Eine ebenfalls spezifische Wirkung zeigt die Therapie mit monoklonalen Antikörpern, indem beispielsweise durch eine Antikörperanlagerung an Rezeptoren oder bioreaktive Substanzen diese blockiert und Signalwege unterbrochen werden. Die Einflussmöglichkeit beschränkt sich jedoch auf bereits ausgebildete Proteinmoleküle.

Über die interferierende RNA-Technologie besteht hingegen die Möglichkeit überwiegend post-transkriptional eine spezifische Genmodifikation zu erzielen, so dass Oberflächenproteine oder Botenstoffe erst gar nicht ausgebildet werden. Die zunächst auf der siRNA-Methode basierenden und bis in die Phase der klinischen Studien vorangebrachten Wirkstoffe zeigten bisher keinen Behandlungsvorteil. Aufgrund des Fehlens eines Transfektionsmittels oder schützender Hüllproteine zeigten die lokal oder systemisch applizierten siRNA-Wirkstoffe in klinischen Studien eine unzureichende Wirkung, auch wenn diese zuvor bei Verwendung von „nackter“ siRNA im Tiermodell erfolgreich nachgewiesen werden konnte. (Bruno 2011)

Es ist davon auszugehen, dass eine siRNA-Applikation ohne die zusätzliche Gabe einer Transfektionsreagenz oder die Kopplung mit einem Antikörper in der Anwendung am Menschen wirkungslos bleibt.

Neben der raschen Ausscheidung über die Niere nach systemischer Gabe ist von einem schnellen Abbau der ungeschützten siRNA auszugehen. Versuche zur Stabilität der siRNA im Rahmen dieser Arbeit zeigten einen Abbau innerhalb von Minuten durch RNasen bei Kontakt mit Serum oder Vollblut. Selbst eine durch die Anlagerung von Phosphothioat und 2'-OMethyl chemisch stabilisierte siRNA wurde bei Kontakt mit Vollblut oder Serum ähnlich rasch abgebaut wie die nicht modifizierte Form. Lediglich bei Kontakt mit Endothelzellmedium, das unter anderem 2% fetales Kälberserum enthält, zeigte sich ein Vorteil der chemisch modifizierten siRNA gegenüber der nicht-modifizierten Form.

Der Abbau von chemisch nicht modifizierter siRNA innerhalb von wenigen Minuten bei Kontakt mit Serum wird auch anhand weiterer Veröffentlichungen beschrieben, allerdings unterscheiden sich die Angaben zur chemisch

modifizierten siRNA. Während die hier angewendete siRNA bei Kontakt mit Serum ebenfalls innerhalb kürzester Zeit einen Abbau zeigte, wird bei systemischer Anwendung eine Verlängerung der Halbwertszeit auf 2 bis 49 min beschrieben. (Bruno 2011)

Modifikationen, wie die Bildung eines Phosphothioat-Rückgrates können zwar den Abbau durch RNasen verlangsamen, wirken jedoch zelltoxisch. (Deng et al. 2014; Engels 2013) Das Anhängen der 2'-OMethyl-Gruppe hingegen führt neben einer Verbesserung der Stabilität zu einer gewissen Unterdrückung des Immunsystems, da es sich um einen kompetitiven Inhibitor des Toll-like-Rezeptors 7 (*toll-like receptor 7*, TLR 7) handelt. Eine Anlagerung von 2'-OMethyl an den „Beifahrer“-Strang kann die über diesen Rezeptor generierte inflammatorische Immunantwort reduzieren. Insgesamt werden jedoch nur 2-4 dieser 2'-OMethyl-Modifikationen pro Strang toleriert, andernfalls geht die regulierende Eigenschaft der siRNA-Sequenz verloren. (Deng et al. 2014; Bruno 2011)

Die über Toll-like-Rezeptoren vermittelte Immunantwort, die unter anderem zur Ausschüttung von Zytokinen führt, kann durch den Einsatz von siRNA-Sequenzen, die kürzer als 30 Basenpaare sind, merklich reduziert werden. Auch kationische Transfektionsmoleküle können unabhängig von der Länge der verwendeten siRNA-Sequenzen diese Immunantwort auslösen.

Auch wenn über die translationale Repression bei nicht perfekter Basenpaarung der siRNA-Sequenz mit einer mRNA außer der Ziel-mRNA weitere mRNA-Sequenzen degradiert werden (Zhou et al. 2014; Castanotto und Rossi 2009), so ist doch die unter 3.4.4.3 beschriebene Wirkung einer siRNA gegen PECAM-1 auf andere Adhäsionsmoleküle als das Zielmolekül nach mehrmaliger Transfektion im Abstand von 24 Stunden in erster Linie auf die Auslösung von Zellstress zurückzuführen. Eine nach kurzer Zeit (24 Stunden) wiederholte Transfektion und Anwendung von siRNA stört damit in erheblichem Maße den Zellstoffwechsel.

Nach viermaliger Transfektion im Abstand von 24 Stunden zeigte sich neben der beabsichtigten Wirkung auf PECAM-1 eine ungewollte Hemmung der Oberflächenproteine E-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1 von bis zu 64%.

Umgangen werden kann diese gravierende Nebenwirkung, indem mehrere zum Zielgen spezifische siRNA-Sequenzen in niedriger Konzentration eingesetzt und diese zusätzlich mit der chemischen 2'-OMethyl-Modifikation an Position 2 des „Fahrer“-Stranges versehen werden. (Zhou et al. 2014)

Weitere Versuche zur Immunantwort, insbesondere der Aktivierung des Interferon-Weges wurden innerhalb dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Anzunehmen ist jedoch nach viermaliger Transfektion eine entsprechend nachweisbare Aktivierung, unter Umständen auch durch das Transfektionsmittel. (Nolte et al. 2009)

Eine Alternative zur interferierenden RNA ist die Antisense-Methode, bei der statt einer kurzen Doppelstrang-RNA eine zur Ziel-mRNA komplementäre Einzelstrang-RNA angewendet wird.

Unter Einfluss der RNase H erfolgt im Zellkern ein spezifischer mRNA-Abbau. Auf dieser Grundlage basiert das zur intravitrealen Anwendung von der FDA (Food and Drug Administration, USA) zugelassene Medikament *Fomivirsen* zur Behandlung der HIV-assoziierten Zytomegalovirus-Retinitis. (Achenbach et al. 2003)

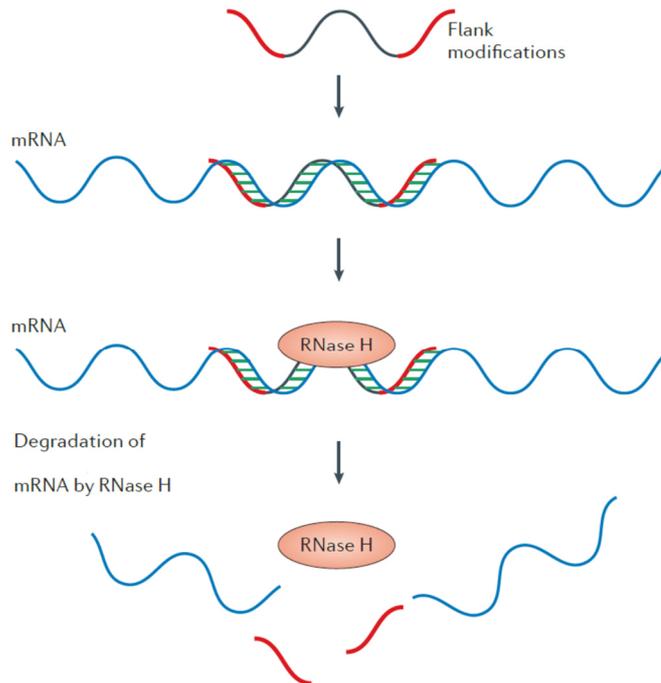


Abbildung 4-1: Antisense-Mechanismus, Quelle: (modifiziert) (Kole et al. 2012)

Im Vergleich zur Doppelstrang-RNA der siRNA-Methode ist die Einzelstrang-RNA der Antisense-Methode noch instabiler und erfordert chemische Modifikationen. In-Vitro-Versuche zeigten zudem, dass zur Erreichung der gleichen Hemmwirkung wie durch siRNA eine 10-fach höhere Dosis an Antisense-RNA erforderlich ist.

Diese höhere Dosis führt zu einem verstärkten Auftreten von Nebenwirkungen. (Achenbach et al. 2003)

4.3 Die Transfektion

Auch wenn im Tiermodell die Wirkung nicht modifizierter siRNA ohne die Zugabe einer Transfektionschemikalie unter besonderen Umständen als erfolgreich beschrieben wurde, kam für alle siRNA-Anwendungen im Rahmen dieser Arbeit INTERFERin™ als Transfektionsreagenz zum Einsatz. Innerhalb einer aorto-koronaren Bypassoperation beträgt das Zeitfenster für eine mögliche medikamentöse Behandlung von entnommenen Venengefäßen höchstens 60 min. Um zunächst anhand eines Modells diese Zeitvorgabe zu erfüllen, erschien die Anwendung einer Reagenz zur Erreichung einer möglichst hoch effektiven

Transfektion unumgänglich. Die Wahl fiel dabei auf das Transfektionsreagenz INTERFERin™ bei dem es sich um ein kationisches Lipid handelt, das im Vergleich mit anderen Wirkstoffen der gleichen Gruppe weniger Nebenwirkungen auslöst, in der Anwendung mit Zellkulturen die erforderliche Effizienz zeigt und sowohl in Lösung mit Antibiotika als auch mit Serum anwendbar ist. (Nolte et al. 2009) Ein geändertes Transfektionsprotokoll mit einer Transfektionszeit von lediglich 2 Stunden stellt am ehesten eine Annäherung an die Zeitvorgabe der aorto-koronaren Bypassoperation dar. Auch wenn eine Transfektionsdauer von 2 Stunden zu einem verbesserten Ergebnis führte, so konnte auch schon bei einer Transfektionsdauer von 30 min eine ausreichende Effizienz nachgewiesen werden. (Nolte et al. 2009)

Aufgrund der Ladung binden kationische Lipide an Plasmaproteine, was zu hämodynamischen Wechselwirkungen führen kann. Daneben können sie konzentrationsabhängig lebertoxisch wirken. (Bruno 2011)

Ungeladene Lipide hingegen sind weniger effizient, binden dafür aber auch weniger an Plasmaproteine als positiv geladene Lipide.

Beiden Gruppen gemein ist ein toxischer Effekt über die Beeinflussung von reaktiven Sauerstoffspezies. (Deng et al. 2014; Bruno 2011)

Für eine in-vitro-Anwendung eignen sich kationische Lipide sehr gut, für eine therapeutische Anwendung scheinen jedoch geladene wie ungeladene Lipide eher ungeeignet zu sein.

Auf der Suche nach der idealen Transfektionsmethode wurden zwischenzeitlich mehr als 1000 chemische Verbindungen erprobt, doch nach wie vor gilt, dass jede zusätzliche Substanz, die für die Anwendung der siRNA benötigt wird, auch das Nebenwirkungsspektrum beeinflusst.

Zu den neueren Transfektionskomplexen zählen *stable nucleic acid particles* (SNALPs), die aus Polyethylenglycolmolekülen (PEG) und Liposomen bestehen.

Die Lipidanteile bestehen aus kationischen und fusogenen Lipiden.

Das außen angelagerte Polyethylenglycol ist selbst ungeladen, wodurch die Ladung des Liposoms abgeschirmt werden kann, daneben kann die unspezifische Anlagerung von Antikörpern oder Komplement-Faktoren reduziert und eine Erkennung durch Makrophagen verhindert werden.

Insgesamt konnte diese Form der Nanopartikel die Halbwertszeit der siRNA bei systemischer Gabe verbessern. Im Vergleich zu anderen Transfektionsreagenzien konnte zudem die Zelltoxizität reduziert werden. (Zhou et al. 2014) Gegenwärtig stellen SNALPs mit die fortschrittlichsten siRNA-Träger dar. Die ersten siRNA-Wirkstoffe unter Verwendung dieses Trägersystems erreichten auf dem Weg zur klinischen Anwendung mittlerweile die Phase I der klinischen Erprobung. (Zhou et al. 2014)

Eine Alternative zur lokalen Anwendung stellen biodegradierbare Nanopartikel dar, die nach dem Beladen mit siRNA diese nach Aufnahme in die Endothelzellen langsam freisetzen und so eine Verlängerung der Wirkdauer erzielen. Ein weiterer Vorteil dieser Polymer-Nanopartikel ist, im Vergleich zu siRNA-Trägermolekülen auf Lipidbasis, eine geringere Toxizität und die Möglichkeit des intrazellulären Abbaus. (Woodrow et al. 2009)

Eine weitere erfolgversprechende Methode ist die ligandengestützte Transfektion von siRNA über Antikörper, Antikörper-Fragmente und kleine Moleküle, wie Folsäure oder Aptamere. Ausgenutzt wird dabei die Überexpression von Rezeptorproteinen auf Zelloberflächen von erkranktem Gewebe oder krankheitsspezifische Oberflächenproteine über die gebundene siRNA aufgenommen werden kann.

Als Beispiel konzipierten Song et al. verschiedene Fusionsmoleküle aus einem Antikörperfragment, einem Protamin-Molekül und einer spezifischen siRNA. (Song et al. 2005) Am Mäusemodell konnte hierdurch beispielsweise die gezielte Transfektion von siRNA in HIV-1 infizierte Zellen nachgewiesen werden. Auf ähnliche Weise erfolgte am Tiermodell die Transfektion von siRNA in Mammakarzinomzellen, die den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor 2 (EGF 2) exprimieren.

Transferrin-Rezeptoren werden von einigen schnell wachsenden endogenen Karzinomarten überexprimiert. Erfolgreich am Mäusemodell konnten Yhee et al. eine Quervernetzung aus Transferrin und siRNA zur systemischen Behandlung dieser Tumoren einsetzen. (Yhee et al. 2013)

Ebenfalls zur Transfektion über eine proteinspezifische Bindung kann ein Aptamer-siRNA Chimär eingesetzt werden. Ein Aptamer ist eine Einzelstrang-

DNA, die aufgrund der Ladung und Struktur wie ein Antikörper oberflächenspezifische Bindungen eingehen kann. Koppelt man an dieses Molekül eine siRNA-Sequenz, so gelingt eine Zell-spezifische Transfektion nach systemischer Gabe. Über diesen Wirkmechanismus konnten Dassie et al. am Mausmodell über das Prostata-spezifische Membran-Antigen eine Aufnahme von siRNA in Prostata-tumoren nachweisen und einen Tumorrückgang bewirken. (Dassie et al. 2009)

Die zwei entscheidenden Nachteile der bisher beschriebenen Anwendungen sind eine ineffiziente siRNA-Übertragung in vivo und eine lediglich vorübergehende Genregulierung. (Deng et al. 2014)

Viren bieten unter anderem die Möglichkeit, Plasmide in die Zelle einzubringen, wodurch ähnlich der microRNA (miRNA) kurze Haarnadelstruktur-RNA (shRNA) kontinuierlich nachgebildet wird und darüber eine langanhaltende Wirkung theoretisch aufrecht erhalten werden kann. Als Vektoren werden vornehmlich Retroviren, Lentiviren, Adenoviren und Adeno-assoziierte Viren eingesetzt. Bedacht werden muss allerdings, dass Viren bei systemischer Anwendung potentiell immunogen wirken, wie auch innerhalb der viralen Sequenzen Mutationen entstehen oder irrtümliche Genexpressionen ausgelöst werden können. (Castanotto und Rossi 2009)

Am Tiermodell wurde bei systemischer Anwendung mit Adeno-assoziierten Viren eine Neuro- und Hepatotoxizität nachgewiesen. (Lambeth und Smith 2013)

4.4 Das Adhäsionsmolekül P-Selectin (CD 62P)

Während die Adhäsionsmoleküle E-Selectin (CD 62E), *Intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1, CD 54) und *Vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1, CD106) zunächst auf Endothelzellen (HSVEC) nur sehr schwach exprimiert werden und erst nach Stimulation mit Tumornekrosefaktor α (TNF- α) neu synthetisiert werden, liegt P-Selectin (CD 62P) sowohl in Thrombozyten, wie auch in Endothelzellen in gespeicherter Form in Zellorganellen vor. Die Expression auf der Oberfläche nach Stimulation ist auf Thrombozyten 10-fach höher als auf Endothelzellen. (André 2004)

Falls es zu einem Endotheldefekt oder der Freisetzung von Entzündungsmediatoren kommt, so scheint von Thrombozyten, wie auch Endothelzellen exprimiertes P-Selectin (CD 62P) nicht nur an der Leukozytenrekrutierung, sondern auch an der Thrombozytenkoagulation beteiligt zu sein. P-Selectin interagiert hierbei mit dem P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1) und dem von-Willebrand-Komplex (GPIb/IX/V) (Gawaz 2005; André 2004) Diese Verbindungen sind jedoch instabil. (Gawaz 2005)

Eine feste Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsion wird erst durch β_3 -Integrine (GPIIb/IIIa) erreicht. (Gawaz 2005)

Der Entstehung der Arteriosklerose geht nicht nur ein inflammatorisch-endotheliales Geschehen voraus, ein weiterer wichtiger Baustein für die Einwanderung von Leukozyten ist die Thrombozytenaktivierung und -anhaftung an beschädigtem Endothel. Auch über das von Thrombozyten an der Oberfläche dargebotene P-Selectin erfolgt eine Leukozytenrekrutierung. Gleichzeitig sind Thrombozyten aufgrund der stark reduzierten Translation gegenüber der in dieser Arbeit angewendeten siRNA-Methode unempfindlich.

Es ist daher nach einer siRNA-abhängigen Herunterregulierung von endothelialelem P-Selectin wahrscheinlich von einem nur geringen Effekt auf die Leukozytenrekrutierung auszugehen, sobald eine Thrombozytenadhäsion und -aggregation über einem Endotheldefekt eintritt.

Eine Expression von P-Selectin (CD 62P) innerhalb von 5-10 min nach Stimulation mit Histamin an humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) wurde bereits von Hattori, Hamilton et al. im Jahre 1989 beschrieben. (Hattori et al. 1989) Die meisten Untersuchungen beziehen sich auf die Darstellung des Adhäsionsmoleküls P-Selectin auf humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC). Häufig konnte unter Verwendung dieser Endothelzellen zwar eine Stimulation von P-Selectin durch Entzündungsmediatoren nachgewiesen werden, diese fiel aber meist gering aus. (Setiadi und McEver 2003; Hailer et al. 2000; Collins et al. 1993) Während durch die alleinige Anwendung von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder Interleukin-1 β (IL-1 β) keine Steigerung der Expression von P-Selectin auf humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene erreicht werden konnte, gelang Raab,

Daxecker et al. an diesen Zellen durch eine Kombination verschiedener Entzündungsmediatoren eine erhebliche Steigerung dieser Expression mit einer Inkubationszeit von 16 Stunden. (Raab et al. 2002)

Da diese Zytokine auch während und nach der Bypass-Operation erhöht und bei der Entstehung von arteriosklerotischen Gefäßveränderungen beteiligt sind, wurde dieses Stimulationsschema für die Versuche zur Darstellung von P-Selectin (CD 62P) an Endothelzellen der Vena saphena magna übernommen.

Jones et al. veröffentlichten 1993 eine Arbeit über den gesteigerten Rollvorgang von neutrophilen Granulozyten auf Endothelzellen der Nabenschwurvene nach Stimulation mit Histamin. Nach Antikörpergabe konnte dies auf das Adhäsionsmolekül P-Selectin zurückgeführt werden. (Jones et al. 1993)

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten jedoch, dass es auf Proteinebene weder durch die kombinierte Stimulation mit 10 ng/ml TNF- α und 10 ng/ml IL-1 β noch durch 10 ng/ml TNF- α und 100 ng/ml IFN- γ zu einer signifikanten Steigerung der Expression von P-Selectin auf humanen Endothelzellen der Vena saphena magna kommt. 6 Stunden Inkubationszeit unter der kombinierten Stimulation mit 10 ng/ml TNF- α und 100 ng/ml IFN- γ zeigten eine Steigerung im Vergleich zum Ausgangswert von 22,19%. Alle übrigen Werte für beide Stimulationswege zu den Zeitintervallen 15 min, 6 Stunden und 16 Stunden lagen darunter.

Engmaschigere Zeitintervalle unter Verwendung weiterer Stimulantien (Histamin, Thrombin, Tumornekrosefaktor- α) zeigten in der Auswertung von Vorversuchen mit wenigen Versuchsansätzen kein besseres Ergebnis.

Auch auf mRNA-Ebene konnte nach einer Aktivierung mit 10 ng/ml TNF- α und 100 ng/ml IFN- γ über 6 Stunden lediglich eine Steigerung von 66% der Ausgangs-mRNA-Menge zu P-Selectin festgehalten werden.

Auffällig ist jedoch eine hohe nachweisbare Menge an spezifischer mRNA zu P-Selectin im Versuchsansatz ohne Stimulation. Die Endothelzellen zeigen also einen aktivierungsunabhängigen Grundumsatz des zunächst in Speicherkörpern (Weible-Palade-Bodies) eingelagerten Adhäsionsmoleküls P-Selectin.

Auch die direkte Aktivierung von Gewebestücken der Vena saphena magna zeigte keine deutliche Steigerung der spezifischen mRNA zu P-Selectin, wohl aber ebenfalls einen Grundumsatz an P-Selectin ohne Stimulation.

Die geringe Darstellung von P-Selectin auf Proteinebene kann einerseits mit der Kultivierung und Passagierung der Endothelzellen zusammenhängen, wodurch Zellorganellen und insbesondere die Speicherkörper *Weible-Palade-Bodies* verloren gehen, andererseits besteht auch die Möglichkeit, dass das Adhäsionsmolekül P-Selectin neben anderen Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen der Vena saphena magna eine untergeordnete Rolle spielt, da im Entzündungsfall die Diapedese von Leukozyten nicht hauptsächlich über diesen Gefäßtyp, sondern über postkapilläre Venolen erfolgt.

Auch wenn das Adhäsionsmolekül P-Selectin auf Endothelzellen der Vena saphena magna eine entscheidende Rolle in der Adhäsion von Leukozyten tragen sollte, so ist es jedoch aufgrund der Speicherung in *Weible-Palade-Bodies* und der damit verbundenen Expression nach Stimulation, sowie der anschließenden erneuten Internalisierung und Wiederverwertung (Subramaniam et al. 1993) zunächst unempfindlicher gegenüber einer Behandlung mit spezifischer siRNA. Erst eine langanhaltende Einwirkung von siRNA oder eine mehrmalige Transfektion könnte den tatsächlichen Nachweis einer Hemmung auf Proteinebene erbringen.

4.5 Das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül PECAM-1 (CD 31)

PECAM-1 ist ein endotheliales Adäsionsmolekül mit mehreren Funktionen.

Im Vordergrund steht natürlich zunächst die pro-inflammatorische Wirkung durch die erleichterte Transmigration von Leukozyten. (Woodfin et al. 2007)

Dieses transmembranöse Glykoprotein wird auf Endothelzellen kontinuierlich im Bereich der Zell-Zell-Kontakte exprimiert. (Murakami et al. 2001)

Im Tierversuch konnte durch eine Antikörper-vermittelte Hemmung verschiedener Oberflächendomänen von PECAM-1 gezeigt werden, dass das Adhäsionsmolekül einerseits an der Transmigration der Leukozyten auf der Ebene der Interzellkontakte und andererseits an deren Durchtritt durch die Basalmembran beteiligt ist. (Garrido-Urbani et al. 2008)

Eine PECAM-1-vermittelte Transmigration von Leukozyten erfolgt unter dem Einfluss des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β , jedoch nicht TNF- α . (Privratsky und Newman 2014) In Kombination mit IFN- γ scheint TNF α sogar die Synthese von PECAM-1 zu hemmen. (Rival et al. 1996)

Eine höhere Dichte von PECAM-1 entlang der endothelialen Zell-Zell-Kontakte führt insgesamt zu einer verbesserten Leukozyten-Transmigration. (Privratsky und Newman 2014)

Homophile PECAM-1/ PECAM-1-Bindungen zwischen Endothelzellen und Leukozyten spielen nicht nur eine adhäsive Rolle, über diesen Kontakt werden auf leukozytärer Seite verschiedene Integrine aktiviert. Darunter befindet sich zum Beispiel das Integrin $\alpha 6\beta 1$, ein Rezeptor für Laminin, das für den Durchtritt der Leukozyten durch die Basalmembran von entscheidender Bedeutung ist. (Privratsky et al. 2010)

Neben dieser Funktion in der Leukozytenmigration dient PECAM-1 als Mechanosensor für Scherkräfte. Abhängig von mechanischen Kräften kann der Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert werden, was zu einer pro-inflammatorischen Geninduktion führt. (Privratsky et al. 2010)

Neben dieser ausgeprägt pro-inflammatorischen Funktion werden PECAM-1 auch anti-inflammatorische Eigenschaften zugesprochen.

Wird PECAM-1 über eine Antikörperbindung blockiert, so steigt gleichzeitig die Permeabilität der Endothelzellschicht. Es kann davon ausgegangen werden, dass PECAM-1 die endotheliale Barrierefunktion aufrecht erhält und an der Restauration der vaskulären Integrität beteiligt ist, auch wenn die genauen Wechselwirkungen hierzu noch nicht vollständig bekannt sind. (Privratsky und Newman 2014; Privratsky et al. 2010)

Des Weiteren können Leukozyten durch den PECAM-1/ PECAM-1-Kontakt über Immunrezeptor-Tyrosin-Hemmungssequenzen (ITIMs) in ihrer Funktion gedämpft werden. Im Tiermodell konnte eine ebenfalls anti-inflammatorische Eigenschaft von Endothelzellen über eine PECAM-1-vermittelte Unterdrückung der Zytokinproduktion und Hemmung pro-inflammatorischer Signalwege nachgewiesen werden. (Privratsky et al. 2010)

Wird nun PECAM-1 mittels siRNA gehemmt, so kann zwar einerseits der Durchtritt von Leukozyten durch die Endothelzellschicht reduziert und deren Überschreitung der Basalmembran verhindert werden, doch auf der anderen Seite muss aufgrund abnehmender endothelialer Zellintegrität mit einer deutlichen Steigerung der Gefäßpermeabilität gerechnet werden, weshalb PECAM-1 ein eher fragwürdiges Ziel für eine siRNA-Behandlung zur Bypassprotektion darstellt.

Eine erfolgreiche Transfektion und Anwendung von spezifischer siRNA gegen PECAM-1 an humanen Endothelzellen beschreiben Privratsky et al. und Fleming et al. (Privratsky et al. 2011; Fleming et al. 2005)

Privratsky konnte nach einer Transfektion mit drei verschiedenen spezifischen siRNA-Sequenzen an humanen Endothelzellen der Pulmonalarterie (HPAEC) und humanen Endothelzellen der Aorta (HAEC) eine Hemmung des Oberflächenmoleküls PECAM-1 von 65-80% beziehungsweise 65-85% erreichen.

Eigene Versuche zeigen, dass bereits nach einer Transfektion die mRNA-Menge zu PECAM-1 um annähernd 80% gesenkt werden konnte, auf Proteinebene jedoch lediglich eine Reduktion von etwa 30% erreicht wurde. Erst nachdem über vier Tage hinweg alle 24 Stunden eine Transfektion über zwei Stunden mit einer siRNA-Konzentration von 50 nM durchgeführt wurde, konnte am vierten Tag eine Hemmung auf Proteinebene von über 80% festgehalten werden. Auf weitere Zelladhäsionsmoleküle, die bei der Leukozytenmigration eine Rolle spielen (E-Selectin, *VCAM-1* und *ICAM-1*), trifft dies so nicht zu. (Walker et al. 2007) Allerdings werden diese Rezeptoren im Gegensatz zum *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1* (PECAM-1) auch nicht permanent exprimiert.

Das Membranprotein PECAM-1 scheint wesentlich zwischen Zell-Zell-Kontakten ausgebildet zu sein. Die Besonderheit spielt dabei ein unterhalb der Plasmamembran befindliches Netzwerk über das PECAM-1 ständig recycelt wird. Internalisiertes PECAM-1 rezirkuliert dabei bei 37°C innerhalb von 30 min zur interzellulären Grenze. Dieses Netzwerk trägt rund 1/3 der Gesamtmenge an PECAM-1 einer Endothelzelle und hat weder Vesikeleigenschaften, noch trägt es die typischen Marker eines Endosoms.

Vielmehr besteht ein übergehender Kontakt des Netzwerks zur Zelloberfläche. Antikörper werden folglich bei Färbungen an vitalen Zellen über den rezyklierenden Mechanismus internalisiert. Während der Transmigration von Leukozyten wird PECAM-1 gezielt zu Segmenten der Zwischenzellkontakte verlagert, über die die Migration erfolgt. (Mamdouh et al. 2003)

Erklärt werden kann die erschwerte siRNA-vermittelte Hemmung von PECAM-1 anhand dieser Strukturen mit einem erweiterten Pool für dieses Molekül, das die Möglichkeit des Recyclings bietet. Bezeichnet wird dieses Netzwerk als *lateral border recycling compartment*. (Privratsky et al. 2010; Mamdouh et al. 2003)

Vorversuche unter Verwendung der Durchflusszytometrie zeigten, dass eine Transfektion alle 48 Stunden nicht ausreicht, um eine im Verlauf kontinuierliche Molekülreduktion zu erreichen.

4.6 Methodenkritik

Mit Blick auf zukünftige Versuche sollen an dieser Stelle einige Aspekte der verwendeten Methoden kritisch betrachtet werden.

Um das Überleben der Endothelzellen und deren rasche Vermehrung in Kultur sicherzustellen, erfolgte eine Zugabe mehrerer Wachstumsfaktoren in hoher Konzentration (*Epidermal Growth Factor, Vascular Endothelial Growth Factor, basic Fibroblast Factor, Insulin-like Growth Factor (Long R3 IGF)*) zum Endothelzellmedium. Zellorganellen werden über die Passagen hinweg nicht mehr vollständig ausgebildet. Das Auftreten von De-Differenzierungen an humanen Endothelzellen der Vena saphena magna in Kultur wurde bereits nach der dritten bis vierten Passage beschrieben. Sie verändern sich zu einem fibroblastischen Phänotyp. (Scoumanne et al. 2002) Aus diesem Grund erfolgten die Versuche zum Adhäsionsmolekül P-Selectin (CD 62P) ausschließlich an Endothelzellen der ersten Passage. Raab et al. veröffentlichten im Jahr 2002 Ergebnisse zur Stimulation von P-Selectin (CD 62P) an humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) ebenfalls unter Verwendung von Zellen der ersten Passage mit einer erstaunlichen Steigerung der Expression des Adhäsionsmoleküls. (Raab et al. 2002) Generell werden Adhäsionsmoleküle von

humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) nach Stimulation stärker exprimiert als von humanen Endothelzellen der Vena saphena magna (HSVEC). (Tan et al. 2004) Doch unter Umständen liegt die in dieser Versuchsreihe festgehaltene schwache Expression von P-Selectin (CD 62P) auch an Zellveränderungen, die mit den Bedingungen der Zellkultur und der forcierten Wachstumsstimulation zusammenhängen, so dass Zellorganellen (zum Beispiel *Weible-Palade-Bodies*) nur unvollständig ausgebildet werden.

Zur Transfektion der Zellen wurde das Reagenz INTERFERin™ eingesetzt, das zwar im Vergleich zu anderen Transfektionsreagenzien während der Komplexbildung unempfindlich gegenüber Serum und Antibiotika ist und länger im Endothelzellmedium auf Zellen belassen werden kann, jedoch handelt es sich auch hierbei um eine kationische Lipidstruktur, die für eine in-vivo-Anwendung aufgrund von Wechselwirkungen mit Proteinbestandteilen ungeeignet ist.

Eigene Versuche, wie auch zahlreiche Veröffentlichungen zeigen eine sehr kurze Wirkdauer der siRNA-vermittelten Proteinhemmung. Zur siRNA-vermittelten Hemmung der Expression des Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1 an humanen Nabelschnur-Endothelzellen wurde eine Wirkdauer der siRNA von 72 Stunden beschrieben. (Hecke et al. 2006) Auch wenn Endothelzellen eines venösen Bypasses einer weitaus geringeren Zellteilungsrate unterliegen als Endothelzellen in Kultur, so muss diese Wirkdauer mit Blick auf eine mögliche Bypassprotektion als zu gering eingestuft werden.

Eine erheblich verlängerte Wirkdauer ist beispielsweise durch die Transfektion mit einem DNA-Plasmid gewährleistet. Durch Transkription des DNA-Plasmid-Rings erfolgt kontinuierlich die Bildung spezifischer small-hairpin-RNA (shRNA), deren Wirkungsweise analog zur siRNA abläuft. Allerdings ist die ständige Neubildung von shRNA, wie auch eine gegebenenfalls erforderliche virale Transfektion mit einem ungünstigeren Nebenwirkungsspektrum verbunden.

Ein Ansatz zur Verlängerung der siRNA-Wirkung bieten derzeit die bereits beschriebenen biodegradierbaren Nanopartikel durch eine langsame intrazelluläre Abgabe der siRNA.

Die Versuche zu P-Selectin (CD 62P) zeigten in der FACS-Analyse nach einer Aktivierung und Transfektion eine Erhöhung der Fluoreszenz, vergleichbar mit einer scheinbaren Zellaktivierung. Siehe hierzu Diagramm 3-2. Diese Wertänderung ist statistisch nicht signifikant und zeigt sich lediglich bei Untersuchungen auf Proteinebene unter sehr schwacher Steigerung der Rezeptorexpression nach Aktivierung.

Für die Versuche zum Oberflächenmolekül PECAM-1 (CD 31) waren mehrere Transfektionen in Abstand von 24 Stunden erforderlich. Eine siRNA-Anwendung allein führte im Vergleich zur Kontrollgruppe lediglich zu einer Reduktion von etwa 30% auf Proteinebene, während auf mRNA-Ebene bereits nach der ersten Transfektion eine Reduktion von annähernd 80% festgestellt werden konnte. Vorversuche zeigten, dass eine Transfektion alle 48 Stunden aufgrund der geringen Wirkdauer nicht ausreichte, um eine kontinuierliche Reduktion des Adhäsionsmoleküls PECAM-1 zu erreichen.

Die verwendete Konzentration an spezifischer siRNA von 50 nM erscheint jedoch im Nachhinein erheblich zu hoch zu sein. Nach vier erfolgten Transfektionen im Abstand von 24 Stunden zeigte sich zwar eine annehmbare Reduktion des Adhäsionsmoleküls auf Proteinebene von über 80%, jedoch wird auch die mRNA anderer Moleküle um teilweise über 60% herunterreguliert. Unter Umständen ist eine siRNA-Konzentration von 25 oder 10 nM ausreichend, um einerseits eine spezifische und signifikante Hemmung des Oberflächenmoleküls PECAM-1 zu erreichen und andererseits die unbeabsichtigte Wirkung auf die übrige Syntheseleistung der Zelle zu reduzieren.

Unter mikroskopischer Kontrolle zeigte sich nach 4 Transfektionen eine Ausdünnung des Zellrasens, gleichzeitig konnte über einen Versuch zur Zellviabilität (MTT-Test) eine Einbuße um etwa 33% nach vier Transfektionen erhoben werden. Weitere Versuche zu Nebenwirkungen, beispielsweise der Nachweis einer Aktivierung der Interferon-Signalantwort, wurden nicht durchgeführt.

Um insbesondere die Wirkung auf andere Molekülprodukte zu reduzieren, hätte die siRNA-Konzentration für jede Transfektion erheblich gesenkt werden

müssen, idealerweise erfolgt eine Anwendung von mehreren spezifischen siRNA-Sequenzen in geringer Konzentration statt einer einzigen. (Zhou et al. 2014)

Sobald eine siRNA-Sequenz mehrere Genprodukte beeinflusst, kann über eine Versuchsreihe die kontinuierliche und gleichbleibende Expression des für die Auswertung einer quantitativen Real-time PCR wichtigen Referenzgens nicht mehr gewährleistet werden. Es kann daher angenommen werden, dass die quantitative Berechnung der mRNA zu PECAM-1 mit einem über die Transfektionen zunehmenden, unbekanntem Fehlerquotienten erfolgte.

Zur Darstellung der Stabilität der siRNA-Sequenzen wurde die Gelelektrophorese angewendet. Nach einer bestimmten Inkubationszeit der Oligonukleotidstränge in Serum, Vollblut oder Endothelzellmedium wurde dieses Gemisch auf ein Ladegel zur Auftrennung aufgetragen. Nicht berücksichtigt wurde dabei die Zeitdauer der Auftrennung der siRNA-Sequenzen. siRNA wurde sofort nach Durchmischung mit Serum auf das Gel aufgetragen, da jedoch bis zur Beendigung der Auftrennung etwa 30 min verstrichen, in dieser Zeit der Abbauprozess der siRNA durch RNasen jedoch nicht gestoppt wurde, kann nicht unbedingt von einem sofortigen Abbau gesprochen werden, wohl aber von einem Abbau innerhalb der Inkubationszeit und ergänzt durch die Dauer der Sequenzauftrennung.

Beschrieben wurde eine Halbwertszeit unmodifizierter siRNA in Serum von wenigen Minuten und nach systemischer Gabe von etwa 2 min. (Bruno 2011)

4.7 Zukunftsausblick

Wenn auch über die vergangenen Jahre zahlreiche neue, spezifische Behandlungsstrategien durch die siRNA-Methode entwickelt wurden, zeigten bisherige Studien, dass die kurze Doppelstrang-RNA-Sequenz extrem instabil ist, durch die negative Ladung eine Zellgrenze nur schwer überwindet und selbst intrazellulär nur eine kurze Wirkdauer hat. Nach systemischer Gabe erfolgt eine rasche Ausscheidung über die Niere und aufgrund der Ladung mit Serumproteinen oder Antikörpern markierte siRNA-Komplexe werden im Retikuloendothelialen System von Leber und Milz durch Makrophagen abgebaut. (Zhou et al. 2014)

Der erhoffte rasche Technologietransfer „...*from bench to bedside*...“ (...aus dem Forschungslabor ans Krankenbett...) konnte bisher nicht erreicht werden. Aufgrund der aufgetretenen Schwierigkeiten zogen sich mehrere Pharmafirmen ab 2009 aus der weiteren Entwicklung von Wirkstoffen auf Basis der siRNA-Methode wieder zurück. (Ledford 2010)

Aufgrund der verhältnismäßig einfachen Transfektion von Zellkulturen mit siRNA, wird diese Methode in jedem Fall auch weiterhin einen festen Stellenwert in der Grundlagenforschung einnehmen.

Zur Verbesserung der Stabilität, Reduktion der Immunantwort und erleichterten Transfektion sind mit dem Ziel einer zukünftigen therapeutischen Anwendung mehrere Neuentwicklungen auf den Weg gebracht worden. Um die bisherigen Schwierigkeiten jedoch vollständig zu beseitigen, ist für zukünftige Jahre weitere Forschungsleistung erforderlich.

Chemische Modifikationen an den beiden RNA-Strängen stellen eine Möglichkeit dar, um die Stabilität der siRNA-Sequenz zu erhöhen, die Immunogenität zu reduzieren und die siRNA-Wirkung zu potenzieren. Die am häufigsten untersuchten Modifikationen sind ein Überhang von 2 Basenpaaren am 3'-Ende des „Fahrer“-Stranges, das Einfügen von zwei bis vier 2'-OMethyl-Gruppen an beiden Strängen und die mit Phosphotioat stabilisierte Helixstruktur. Durch Soutschek et al. erfolgte 2004 eine erste Veröffentlichung zur erfolgreichen

systemischen Anwendung dieser Modifikationen am Tiermodell. (Soutschek et al. 2004)

Aufgrund des nicht abschätzbaren Nebenwirkungsspektrums ist ein virales Trägersystem bisher einer nicht-viralen Transfektion unterlegen.

Stable nucleic acid lipid particles (SNALPs) stellen gegenwärtig mit das fortschrittlichste siRNA-Trägersystem dar. Es handelt sich dabei um eine Lipiddoppelschicht aus kationischen und fusogenischen Lipiden, die von Polyethylenglycol-Molekülen umhüllt ist. (Zhou et al. 2014)

Diese siRNA-Trägermöglichkeit wurde für eine systemische Anwendung konzipiert und wird gegenwärtig in klinischen Studien erprobt.

Zur lokalen Anwendung eignen sich biodegradierbare Polymer-Nanopartikel, die im Tiermodell eine nach Transfektion von vaginaler Schleimhaut der Maus verlängerte Wirkdauer durch langsame Freisetzung der angelagerten siRNA zeigten. Diese Nanopartikel verursachen weniger Zellirritationen und generieren weniger Immunantworten als Transfektionsmittel auf Lipidbasis und können zudem intrazellulär besser abgebaut werden. (Woodrow et al. 2009)

Zu den Erkrankungen, für deren Behandlung zur Zeit die siRNA-Methode Gegenstand intensiver Forschung ist, gehören verschiedene Krebserkrankungen. Ziel der siRNA-Behandlung ist dabei die Herunterregulierung von Onkogenen und tumorspezifischen Wachstumsfaktoren. Beispiele hierfür sind das Onkogen Bcl-2 oder der Endothelwachstumsfaktor VEGF. (Deng et al. 2014)

In der Unterdrückung von krankheitsauslösenden Genen wird der siRNA-Methode auch ein Potential in der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Huntington-, der Alzheimer- und der Parkinson-Krankheit, zugesprochen. (Deng et al. 2014)

Aufgrund der Resistenzentwicklung durch die hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) in der Behandlung von HIV-Infizierten erfolgten Untersuchungen zur siRNA-vermittelten Hemmung von HIV-kodierender RNA und Hemmung von zelleigenen Rezeptoren, die als Eintrittspforte des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) gelten. (Deng et al. 2014) In diesem Zusammenhang gelang Song et al. eine gezielte antikörpervermittelte Transfektion über ein Fusionsprotein aus

einem Antikörper, einem Protamin-Molekül und einer spezifischen siRNA-Sequenz. (Song et al. 2005)

Auf ähnliche Weise gelang die Generierung von siRNA-Sequenzen gegen Hepatitis-C-Virus-RNA.

Eine siRNA-Sequenz gegen die miRNA miR-122 zur Behandlung der chronischen Hepatitis-C-Infektion durchläuft gegenwärtig eine Phase-II-Studie. (Deng et al. 2014)

Erst vor wenigen Jahren konnten Czech et al. am Tiermodell zeigen, dass eine siRNA-vermittelte Herunterregulierung von Apolipoprotein B zu einer Senkung des LDL-Cholesterin-Wertes im Serum führt. (Czech et al. 2011)

Eine erst kürzlich veröffentlichte Phase-I-Studie zur siRNA-vermittelten Hemmung der Proprotein Konvertase *subtilisin/kexin Typ 9* (PCSK) zeigte eine erfolgreiche Reduktion des Serum-LDL-Cholesterols am Menschen. (Fitzgerald et al. 2014)

Da das Auge und insbesondere der ausfüllende Glaskörper ein isoliertes Gewebekompartiment darstellt, wurden zur Behandlung verschiedener Augenerkrankungen bisher wenigstens 10 Studien generiert.

Dieser Rückblick zeigt, dass zur Verbesserung bisheriger Therapieansätze die Forschungsarbeit zur siRNA-Methode noch nicht abgeschlossen ist.

Zur siRNA-vermittelten Behandlung der Arteriosklerose wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Rezeptoren und Enzymsysteme als mögliches Ziel ausfindig gemacht.

Eine Variante stellt dabei die bereits beschriebene Hemmung der an der Leukozytenmigration beteiligten Adhäsionsmoleküle P-Selectin (CD 62P), E-Selectin (CD 62E), VCAM-1 (CD 106), ICAM-1 (CD 54) und PECAM-1 (CD 31) dar. Weitere Ziele für eine siRNA-vermittelte Beeinflussung des arteriosklerotischen Prozesses stellen Immunmediatoren dar, wie beispielsweise einige der von Zellen des angeborenen Immunsystems dargebotenen Toll-like-Rezeptoren (TLR). Hierzu gehört insbesondere TLR4, welcher über die Aktivierung durch Lipopolysaccharide an der Bildung von Schaumzellen und der Schaffung eines entzündlichen Umgebungsmilieus beteiligt ist. (Pradhan-Nabzdyk et al. 2014)

Insbesondere am Tiermodell konnten zahlreiche Proteine entlang des Lipidmetabolismus bisher mittels siRNA erfolgreich gehemmt werden, wodurch eine verlangsamte Entstehung arteriosklerotischer Gefäßveränderungen erreicht werden soll.

Dazu zählt beispielsweise das bereits erwähnte Apolipoprotein B. (Mäkinen und Ylä-Herttuala 2013)

Eine zentrale Rolle in der Behandlung der Arteriosklerose könnte für eine zukünftige siRNA-Therapie der mit der Aufrechterhaltung von Entzündungsreaktionen in Zusammenhang stehende Transkriptionsfaktor NFκB spielen. Am Ratten-Model gelang Meng et al. hierzu eine Reduktion von Entzündungsfaktoren nach Hemmung von NFκB durch siRNA. (Meng et al. 2013)

Des Weiteren stellen Matrix-Metalloproteinasen (MMP), die für eine Modulierung der Extrazellulärmatrix und damit erleichterten Einwanderung von glatten Muskelzellen verantwortlich sind, (Pradhan-Nabzdyk et al. 2014) wie auch verschiedenste Proteinkinasen und deren Einfluss auf die Arteriosklerose eine fast unerschöpfliche Quelle für mögliche siRNA-Anwendungen dar. (Pradhan-Nabzdyk et al. 2014)

5 Zusammenfassung

Aorto-koronare Bypässe unterliegen dem Risiko des Bypassversagens. Im Vergleich zu arteriellen zeigen sich an venösen Bypässen arteriosklerotische Veränderungen früher und umfassender, so dass im Durchschnitt 10 Jahre nach einer aorto-koronaren Bypassoperation nur noch etwa 50% der venösen Bypässe durchgängig sind. Am venösen Bypass beginnt bereits mit der Operation unter dem Einfluss von zirkulierenden Entzündungsmediatoren, Hypoxie und einer operationsbedingten Endothelschädigung, sowie aufgrund des Blutdruckanstieges auf ein arterielles Niveau eine sich stetig aufrechterhaltende Entzündungsreaktion. Diese führt zur Erhöhung der Gefäßpermeabilität und Einwanderung von Leukozyten über Adhäsionsmoleküle. Insbesondere sind Monozyten an der Entstehung von Plaques beteiligt. Unter den Adhäsionsmolekülen sind P-Selectin (CD 62P), E-Selectin (CD 62E), VCAM-1 (CD 106), ICAM-1 (CD 54) und PECAM-1 (CD 31) von Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte unter dem Aspekt der Bypassprotektion eine isolierte Hemmung der Oberflächenmoleküle P-Selectin (CD 62P) und PECAM-1 (CD 31) mittels interferierender RNA (siRNA) an humanen Endothelzellen der Vena saphena magna dargestellt werden. Mittels Durchflusszytometrie zeigte sich auf Proteinebene eine lediglich geringe Expression von P-Selectin auf Endothelzellen der Vena saphena magna, die auch nach Aktivierung der Endothelzellen mit pro-inflammatorischen Zytokinen nicht signifikant gesteigert werden konnte. Auf mRNA-Ebene bestätigte sich anhand einer quantitativen Real Time-PCR diese geringe Steigerung der Genexpression nach Aktivierung, so dass eine Anwendung spezifischer siRNA ergebnislos verlief.

Da das Oberflächenmolekül PECAM-1 (CD 31) insbesondere entlang der Zell-Zell-Kontakte ständig stark exprimiert wird, konnte ohne Stimulation die Wirkung einer spezifischen siRNA untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass nach einer Transfektion die zu PECAM-1 (CD 31) gehörige mRNA-Menge bereits signifikant um etwa 80% gesenkt werden konnte, während auf Proteinebene ein vergleichbarer Wert erst nach vier Transfektionen im Abstand von 24 Stunden

erreicht wurde. Zurückzuführen ist dies vermutlich auf ein Netzwerk aus vesikulären Membranen unterhalb der Plasmamembran, das als Speicher für PECAM-1 dient und als lateral border recycling compartment (LBRC) bezeichnet wird.

Eine letzte Versuchsreihe diente dem Vergleich der Stabilität einer nicht modifizierten siRNA-Sequenz mit einer chemisch modifizierten siRNA-Sequenz bei Kontakt mit Serum, Vollblut und Endothelzellmedium mit 2% Kälberserum. Ergebnisse aus der Gelelektrophorese zeigten eine Degradierung innerhalb von Minuten beider siRNA-Sequenzen bei Kontakt mit Serum und Vollblut und einen lediglich bei Kontakt mit Endothelzellmedium nachweisbaren Vorteil der chemisch modifizierten siRNA.

Ausgehend von den Ergebnissen zur Hemmung von PECAM-1 bedarf es für zukünftige Versuche sowohl einer Anpassung der siRNA-Konzentration, wie auch einer Anwendung mehrerer siRNA-Sequenzen zur Reduktion von Nebenwirkungen. Ebenso ist zu untersuchen, inwieweit andere Transfektionsmittel oder Molekülmodifikationen die siRNA-vermittelte Wirkung verlängern können.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:	Anatomie des Koronargefäßsystems, Quelle: (Erdmann 2011).....	2
Abbildung 1-2:	Stadien der Atherosklerose, Quelle: (Erdmann 2011).....	7
Abbildung 1-3:	Bezeichnung der Zacken des Oberflächen -EKG, Quelle: (Trappe und Schuster 2013).....	8
Abbildung 1-4:	Elektrokardiographischer Befund im akuten Infarktstadium: Hebung der ST-Strecke, Quelle: (Trappe und Schuster 2013).....	8
Abbildung 1-5:	Standardkonzept Koronarchirurgie: linke innere Brustarterie auf Ramus interventricuaris anterior und Venenbypässe auf weitere Koronararterien Quelle: (Haverich und Ziemer 2010).....	12
Abbildung 1-6:	Minimally invasive direct coronary artery bypass (MIDCAP): Stabilisator stellt Koronargefäß im Anastomosenbereich ruhig. Quelle: (Schmid 2013).....	14
Abbildung 1-7:	Die einzelnen Phasen der Diapedese von Leukozyten, Quelle: (Vestweber 2003).....	20
Abbildung 1-8:	Die einzelnen Phasen der Diapedese von Leukozyten, Quelle: (Heinrich und Löffler 2014).....	23
Abbildung 1-9:	schematische Darstellung von P-Selectin (CD 62P) und dem P-Selectin Glykoprotein Liganden 1 (PSGL-1), Quelle: (André 2004).....	25
Abbildung 1-10:	Prozessierung von humaner siRNA und humaner miRNA im Vergleich, Quelle: (Jinek und Doudna 2009).....	32
Abbildung 1-11:	Mechanismen des zellulären Gene-Silencing, Quelle: (Castanotto und Rossi 2009).....	38
Abbildung 1-12:	chemische Modifikationen der siRNA, Quelle: (Nikitenko und Prassolov 2013).....	40
Abbildung 3-1:	Endothelzellkultur, Konfluenz 80%, 10-fache Vergrößerung	79 + 96

Abbildung 3-2:	Einzelmessung von Endothelzellen (HVSEC) mittels Durchflusszytometrie ohne Antikörper.....	80
Abbildung 3-3:	Einzelmessung von Endothelzellen (HVSEC) mittels Durchflusszytometrie mit Antikörper (Anti-CD 31 PE-konjugierter Antikörper).....	81
Diagramm 3-1:	relative Expression (Durchflusszytmetrie) des Rezeptors P-Selectin (CD 62P) nach Stimulation mit IL-1 β + TNF- α und IFN- γ + TNF- α im Vergleich.....	83
Tabelle 3-1:	Gegenüberstellung von relativer Expression des Rezeptors P-Selectin (CD 62P) nach Aktivierung und prozentualem Wertzuwachs.....	83
Diagramm 3-2:	Vergleich von drei spezifischen siRNA-Sequenzen gegen P-Selectin zum Aktivierungsintervall von 6 Stunden mit IL-1- β + TNF- α mittels FACS.....	85
Diagramm 3-3:	Durchflusszytometrische Messung, Stimulation mit 10 ng/ml TNF- α über 6 Stunden und Wirkung der spezifischen siRNA auf den Rezeptor E-Selectin (CD 62E).....	86
Diagramm 3-4:	relative Expression (quant. rt-PCR) des Rezeptors P-Selectin (CD 62P) nach Stimulation mit IL-1 β + TNF- α und IFN- γ + TNF- α im Vergleich.....	87
Tabelle 3-2:	Gegenüberstellung von relativer Expression des Rezeptors P-Selectin (CD 62P) nach Aktivierung und prozentualem Wertzuwachs.....	87
Diagramm 3-5:	relative Expression (quant. rt-PCR) des Rezeptors P-Selectin (CD 62P) nach Stimulation von Gewebe mit IL-1 β + TNF- α und IFN- γ + TNF- α im Vergleich.....	89
Diagramm 3-6:	relative Expression (quant. rt-PCR) des Rezeptors E-Selectin (CD 62E) nach Stimulation von Gewebe mit IL-1 β + TNF- α und IFN- γ + TNF- α im Vergleich.....	90
Diagramm 3-7:	relative Expression (FACS) des Rezeptors PECAM-1 (CD 31) mit Darstellung der Rezeptorhemmung nach mehrfacher Transfektion im Vergleich über 1-4 Tage.....	92

Tabelle 3-3:	Gegenüberstellung der relativen Expression (Geo Mean) des Rezeptors PECAM-1 (CD 31) nach erfolgten Transfektionen mit der prozentualen siRNA-vermittelten Rezeptorhemmung.....	92
Diagramm 3-8:	relative Expression (rt-PCR) des Rezeptors PECAM-1 (CD 31) mit Darstellung der Rezeptorhemmung in Prozent nach mehrfacher Transfektion im Vergleich über 1-4 Tage.....	94
Tabelle 3-4:	Gegenüberstellung der relativen Expression des Rezeptors PECAM-1 (CD 31) nach erfolgten Transfektionen mit der prozentualen siRNA-vermittelten Rezeptorhemmung.....	95
Abbildung 3-4:	Endothelzellkultur nach einer Transfektion (siRNA PECAM).....	96
Abbildung 3-5:	Endothelzellkultur nach zwei Transfektionen (siRNA PECAM).....	96
Abbildung 3-6:	Endothelzellkultur nach drei Transfektionen (siRNA PECAM).....	97
Abbildung 3-7:	Endothelzellkultur nach drei Transfektionen (siRNA PECAM).....	97
Diagramm 3-9:	Vergleich der Zellviabilität (MTT-Test) über 4 Transfektionen.....	98
Tabelle 3-5:	Gegenüberstellung der Absorption bei 570 nm (MTT-Test) über 4 Transfektionen Transfektionen mit der prozentualen Viabilitätsabnahme in Prozent.....	98
Diagramm 3-10:	Wirkung (off-target) der spezifischen siRNA (PECAM) auf die Endothelzellrezeptoren E-Selectin (CD 62E), VCAM-1 (CD 106) und ICAM-1 (CD 54) nach 1-4 Transfektionen im Vergleich.....	100
Tabelle 3-1:	Prozentuale Hemmung (off-target) der Rezeptoren Endothelzellrezeptoren E-Selectin (CD 62E), VCAM-1 (CD 106) und ICAM-1 (CD 54) nach 1-4 Transfektionen mit spezifischer siRNA (PECAM) im Vergleich.....	101

Abbildung 3-8:	Fluoreszenzaufnahme Agarosegel, modifizierte siRNA gegen humanes E-Selectin (CD 62E) mit Serum, Inkubationszeit 0-6 Stunden.....	103
Abbildung 3-9:	Fluoreszenzaufnahme Agarosegel, nicht modifizierte siRNA gegen porcines VCAM-1 (CD 106) mit Serum, Inkubationszeit 0-6 Stunden.....	103
Abbildung 3-10:	Fluoreszenzaufnahme Agarosegel, Wirkung von verdünntem Serum auf siRNA E-Sel. (hum.) und siRNA VCAM-1 (porcin).....	105
Abbildung 3-11:	Fluoreszenzaufnahme Gelelektrophorese, Vergleich der Wirkung von Vollblut und mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:2 verdünntem Vollblut auf die modifizierte siRNA gegen humanes E-Selectin (CD 62E).....	106
Abbildung 3-12:	Fluoreszenzaufnahme Gelelektrophorese. Wirkung von Endothelmedium mit 2% fetalem Kälberserum auf modifizierte siRNA gegen hum. E-Sel. und nicht modifizierte siRNA gegen porcines VCAM-1. Inkubationszeit 0-1½ Stunden bei 37°C.....	107
Abbildung 3-13:	Fluoreszenzaufnahme Gelelektrophorese. Wirkung von Endothelmedium mit 2% fetalem Kälberserum auf modifizierte siRNA gegen hum. E-Sel. und nicht modifizierte siRNA gegen porcines VCAM-1. Inkubationszeit 2-24 Stunden bei 37°C.....	108
Abbildung 3-14:	Fluoreszenzaufnahme Gelelektrophorese. Kontrolle: NaCl-Lösung 0,9% mit modifizierter siRNA gegen hum. E-Sel. und mit nicht modifizierter siRNA gegen porcines VCAM-1. Inkubationszeit 2-24 Stunden bei 37°C.....	109
Abbildung 4-1:	Antisense-Mechanismus, Quelle: (modifiziert) (Kole et al. 2012).....	116

7 Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym (Angiotensin Converting Enzyme)
CD	(Cluster of Differentiation), internationales System für die Bezeichnung von Differenzierungsantigenen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary DNA)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
E-Selectin	Adhäsionsmolekül, „E“ steht für „endothelium“ (Endothel)
EKG	Elektrokardiogramm
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting)
g	g-Kraft, Vielfaches der Erdbeschleunigung ($g = 9,80665 \text{ m/s}^2$)
HUVEC	humane Endothelzellen der Nabelschnurvene (Human umbilical vein endothelial cells)
HSVEC	Humane Endothelzellen der Vena saphena magna (Human saphenous vein endothelial cells)
ICAM-1	Adhäsionsmolekül (intercellular adhesion molecule 1)
IL-1 β	Interleukin-1 β
KHK	koronare Herzkrankheit
L-Selectin	Adhäsionsmolekül, „L“ steht für „lymphocyte“ (Leukozyt)
MIDCAB	minimalinvasive direkte Koronararterien-Bypass-Operation (Minimally Invasive Direct Coronary Artery Bypass)
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
miRNA	microRNA
NF- κ B	Transkriptionsfaktor (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells)
NO	Stickstoffmonoxid
NSTEMI	Nicht-ST-Hebungsinfarkt (Non-ST-segment elevation myocardial infarction)
OPCAB	Koronararterien-Bypass-Operation ohne Herzlungenmaschine (Off-Pump Coronary Artery Bypass)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)

PECAM-1	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül endothelial cell adhesion molecule)	(Platelet
PEI	Polyethylenimin	
PCI	perkutane Koronarintervention intervention	(Percutaneous coronary
PGI ₂	Prostazyklin (Prostaglandin I ₂)	
P-Selectin	Adhäsionsmolekül, "P" steht für "platelet" (Thrombozyt)	
PSGL-1	Ligand auf der Leukozytenoberfläche zur Bindung an P-Selectin (P-selectin glycoprotein ligand-1)	
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)	
q rt-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion quantitative-PCR)	(Real-Time-
siRNA	kurze, doppelsträngige Ribonukleinsäure-Moleküle interfering RNA)	(small
siRNAscr.	siRNA-Sequenz ohne spezifische Hemmwirkung (scrambled = durchmischt)	=
SIRS	systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (systemic inflammatory response syndrome)	
SNALPs	Nukleinsäure stabilisierende Lipidpartikel (Stable nucleic acid lipid particles)	
STEMI	ST-Streckenhebungsinfarkt (ST-segment elevation myocardial infarction)	
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α	
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor β (Transforming Growth Factor β)	

8 Literaturverzeichnis

- Achenbach, Tatjana V.; Brunner, Bodo; Heermeier, Kathrin (2003): Oligonucleotide-based knockdown technologies: antisense versus RNA interference. In: *Chembiochem* 4 (10), S. 928–935.
- Aigner, Achim (2006): Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: strategies based on the direct application of siRNAs. In: *J. Biotechnol.* 124 (1), S. 12–25.
- Ait-Oufella, H.; Taleb, S.; Mallat, Z.; Tedgui, A. (2011): Recent Advances on the Role of Cytokines in Atherosclerosis. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31 (5), S. 969–979.
- André, Patrick (2004): P-selectin in haemostasis. In: *Br. J. Haematol.* 126 (3), S. 298–306.
- Asimakopoulos, G. (2001): Systemic inflammation and cardiac surgery: an update. In: *Perfusion* 16 (5), S. 353–360.
- Asimakopoulos, G.; Taylor, K. M. (1998): Effects of cardiopulmonary bypass on leukocyte and endothelial adhesion molecules. In: *Ann. Thorac. Surg.* 66 (6), S. 2135–2144.
- Berridge, Michael V.; Herst, Patries M.; Tan, An S. (2005): Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. In: *Biotechnol Annu Rev* 11, S. 127–152.
- Blankenberg, Stefan; Barboux, Sandrine; Tiret, Laurence (2003): Adhesion molecules and atherosclerosis. In: *Atherosclerosis* 170 (2), S. 191–203.
- Blann, Andrew D.; Nadar, Sunil K.; Lip, Gregory Y H (2003): The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. In: *Eur. Heart J.* 24 (24), S. 2166–2179.
- Bruno, Katharina (2011): Using drug-excipient interactions for siRNA delivery. In: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (13), S. 1210–1226.
- Burfeind, William R.; Glower, Donald D.; Wechsler, Andrew S.; Tuttle, Robert H.; Shaw, Linda K.; Harrell, Frank E.; Rankin, J. Scott (2004): Single versus multiple internal mammary artery grafting for coronary artery bypass: 15-year follow-up of a clinical practice trial. In: *Circulation* 110 (11 Suppl 1), S. II27-35.
- Butler, J.; Rocker, G. M.; Westaby, S. (1993): Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. In: *Ann. Thorac. Surg.* 55 (2), S. 552–559.

- Caffrey, Daniel R.; Zhao, Juan; Song, Zhili; Schaffer, Michael E.; Haney, Steven A.; Subramanian, Romesh R. et al. (2011): siRNA Off-Target Effects Can Be Reduced at Concentrations That Match Their Individual Potency. In: *PLoS ONE* 6 (7), S. e21503.
- Cao, Christopher; Ang, Su C.; Wolak, Kevin; Peeceeyen, Sheen; Bannon, Paul; Yan, Tristan D. (2013): A meta-analysis of randomized controlled trials on mid-term angiographic outcomes for radial artery versus saphenous vein in coronary artery bypass graft surgery. In: *Ann Cardiothorac Surg* 2 (4), S. 401–407.
- Carlos, T. M.; Harlan, J. M. (1994): Leukocyte-endothelial adhesion molecules. In: *Blood* 84 (7), S. 2068–2101.
- Castanotto, Daniela; Rossi, John J. (2009): The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. In: *Nature* 457 (7228), S. 426–433.
- Chello, Massimo; Mastroberto, Pasquale; Frati, Giacomo; Patti, Giuseppe; D'Ambrosio, Andrea; Di Sciascio, Germano; Covino, Elvio (2003): Pressure distension stimulates the expression of endothelial adhesion molecules in the human saphenous vein graft. In: *Ann. Thorac. Surg.* 76 (2), S. 453-8; discussion 458.
- Chesebro, J. H.; Clements, I. P.; Fuster, V.; Elveback, L. R.; Smith, H. C.; Bardsley, W. T. et al. (1982): A platelet-inhibitor-drug trial in coronary-artery bypass operations: benefit of perioperative dipyridamole and aspirin therapy on early postoperative vein-graft patency. In: *N. Engl. J. Med.* 307 (2), S. 73–78.
- Chesebro, J. H.; Fuster, V.; Elveback, L. R.; Clements, I. P.; Smith, H. C.; Holmes, D. R. et al. (1984): Effect of dipyridamole and aspirin on late vein-graft patency after coronary bypass operations. In: *N. Engl. J. Med.* 310 (4), S. 209–214.
- Chester, A. H.; Morrison, K. J.; Yacoub, M. H. (1998): Expression of vascular adhesion molecules in saphenous vein coronary bypass grafts. In: *Ann. Thorac. Surg.* 65 (6), S. 1685–1689.
- Collins, P. W.; Macey, M. G.; Cahill, M. R.; Newland, A. C. (1993): von Willebrand factor release and P-selectin expression is stimulated by thrombin and trypsin but not IL-1 in cultured human endothelial cells. In: *Thromb. Haemost.* 70 (2), S. 346–350.
- Conte, Michael S. (2007): Molecular engineering of vein bypass grafts. In: *J. Vasc. Surg.* 45 Suppl A, S. A74-81.
- Crook, M. F.; Newby, A. C.; Southgate, K. M. (2000): Expression of intercellular adhesion molecules in human saphenous veins: effects of inflammatory

- cytokines and neointima formation in culture. In: *Atherosclerosis* 150 (1), S. 33–41.
- Czech, Michael P.; Aouadi, Myriam; Tesz, Gregory J. (2011): RNAi-based therapeutic strategies for metabolic disease. In: *Nat Rev Endocrinol* 7 (8), S. 473–484.
- Dan, Nily; Danino, Dganit (2014): Structure and kinetics of lipid–nucleic acid complexes. In: *Advances in Colloid and Interface Science* 205, S. 230–239.
- Dassie, Justin P.; Liu, Xiu-Ying; Thomas, Gregory S.; Whitaker, Ryan M.; Thiel, Kristina W.; Stockdale, Katie R. et al. (2009): Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors. In: *Nat. Biotechnol.* 27 (9), S. 839–849.
- Davies, M. G.; Hagen, P. O. (1995): Pathophysiology of vein graft failure: a review. In: *Eur J Vasc Endovasc Surg* 9 (1), S. 7–18.
- Daxecker, Heide; Raab, Markus; Markovic, Snezana; Karimi, Alireza; Griesmacher, Andrea; Mueller, Mathias M. (2002): Endothelial adhesion molecule expression in an in vitro model of inflammation. In: *Clin. Chim. Acta* 325 (1-2), S. 171–175.
- Deleavey, Glen F.; Watts, Jonathan K.; Damha, Masad J. (2001): Chemical Modification of siRNA. In: Serge L. Beaucage, Donald E. Bergstrom, Piet Herdewijn und Akira Matsuda (Hg.): *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Deng, Yan; Wang, Chi Chiu; Choy, Kwong Wai; Du, Quan; Chen, Jiao; Wang, Qin et al. (2014): Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: principles, challenges, and new strategies. In: *Gene* 538 (2), S. 217–227.
- Deutsche Herzstiftung e.V. (Hg.) (2014): *Deutscher Herzbericht 2013*. 25. Bericht/Sektorenübergreifende Versorgungsanalyse zur Kardiologie und Herzchirurgie in Deutschland. Unter Mitarbeit von Thomas Meinertz, Christian Hamm, Konstantinos Papoutsis, Eckart Fleck, K. Besthorn, M. Besthorn et al. 2500., 1. Auflage, neue Ausg. Frankfurt am Main: Deutsche Herzstiftung.
- Dole, Vandana S.; Bergmeier, Wolfgang; Mitchell, Heather A.; Eichenberger, Sarah C.; Wagner, Denisa D. (2005): Activated platelets induce Weibel-Palade-body secretion and leukocyte rolling in vivo: role of P-selectin. In: *Blood* 106 (7), S. 2334–2339.
- Donzé, Olivier; Picard, Didier (2002): RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. In: *Nucleic Acids Res.* 30 (10), S. e46.

- Dorsett, Yair; Tuschl, Thomas (2004): siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. In: *Nat Rev Drug Discov* 3 (4), S. 318–329.
- Doyle, Emily L.; Ridger, Victoria; Ferraro, Francesco; Turmaine, Mark; Saftig, Paul; Cutler, Daniel F. (2011): CD63 is an essential cofactor to leukocyte recruitment by endothelial P-selectin. In: *Blood* 118 (15), S. 4265–4273.
- Dumanski, Andrzej; Sopol, Miroslaw; Pelczar, Marek; Szłapka, Michał; Kustrzycki, Wojciech; Zabel, Maciej (2007): Influence of pressure on the endothelium of the saphenous vein coronary artery bypass graft. In: *In Vivo* 21 (5), S. 785–789.
- Engels, Joachim W. (2013): Gene silencing by chemically modified siRNAs. In: *New Biotechnology* 30 (3), S. 302–307.
- Erdmann, Erland (2011): Klinische Kardiologie. Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße. 8., vollständig überarbeitete und aktualisierte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. In: *Nature* 391 (6669), S. 806–811.
- Fitzgerald, Kevin; Frank-Kamenetsky, Maria; Shulga-Morskaya, Svetlana; Liebow, Abigail; Bettencourt, Brian R.; Sutherland, Jessica E. et al. (2014): Effect of an RNA interference drug on the synthesis of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and the concentration of serum LDL cholesterol in healthy volunteers: a randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. In: *Lancet* 383 (9911), S. 60–68.
- Fleming, Ingrid; Fisslthaler, Beate; Dixit, Madhulika; Busse, Rudi (2005): Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. In: *J. Cell. Sci.* 118 (Pt 18), S. 4103–4111.
- Foreman, K. E.; Vaporciyan, A. A.; Bonish, B. K.; Jones, M. L.; Johnson, K. J.; Glovsky, M. M. et al. (1994): C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. In: *J. Clin. Invest.* 94 (3), S. 1147–1155.
- Garrido-Urbani, Sarah; Bradfield, Paul F.; Lee, Boris P-L; Imhof, Beat A. (2008): Vascular and epithelial junctions: a barrier for leucocyte migration. In: *Biochem. Soc. Trans.* 36 (Pt 2), S. 203–211.
- Gawaz, M. (2005): Platelets in inflammation and atherogenesis. In: *Journal of Clinical Investigation* 115 (12), S. 3378–3384.

- Geng, J. G.; Bevilacqua, M. P.; Moore, K. L.; McIntyre, T. M.; Prescott, S. M.; Kim, J. M. et al. (1990): Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. In: *Nature* 343 (6260), S. 757–760.
- Goldman, L.; Hashimoto, B.; Cook, E. F.; Loscalzo, A. (1981): Comparative reproducibility and validity of systems for assessing cardiovascular functional class: advantages of a new specific activity scale. In: *Circulation* 64 (6), S. 1227–1234.
- Goldman, S.; Copeland, J.; Moritz, T.; Henderson, W.; Zadina, K.; Ovitt, T. et al. (1989): Saphenous vein graft patency 1 year after coronary artery bypass surgery and effects of antiplatelet therapy. Results of a Veterans Administration Cooperative Study. In: *Circulation* 80 (5), S. 1190–1197.
- Guo, S.; Kempfues, K. J. (1995): par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. In: *Cell* 81 (4), S. 611–620.
- Hailer, N. P.; Oppermann, E.; Leckel, K.; Cinatl, J.; Markus, B. H.; Blaheta, R. A. (2000): Prostaglandin E2 induces expression of P-selectin (CD62P) on cultured human umbilical vein endothelial cells and enhances endothelial binding of CD4-T-cells. In: *Transplantation* 70 (1), S. 236–240.
- Hannan, Edward L.; Racz, Michael J.; Walford, Gary; Jones, Robert H.; Ryan, Thomas J.; Bennett, Edward et al. (2005): Long-term outcomes of coronary-artery bypass grafting versus stent implantation. In: *N. Engl. J. Med.* 352 (21), S. 2174–2183.
- Harrison-Lavoie, Kimberly J.; Michaux, Grégoire; Hewlett, Lindsay; Kaur, Jasber; Hannah, Matthew J.; Lui-Roberts, Winnie W. Y. et al. (2006): P-Selectin and CD63 Use Different Mechanisms for Delivery to Weibel-Palade Bodies. In: *Traffic* 7 (6), S. 647–662.
- Harskamp, Ralf E.; Lopes, Renato D.; Baisden, Clinton E.; de Winter, Robert J.; Alexander, John H. (2013): Saphenous Vein Graft Failure After Coronary Artery Bypass Surgery. In: *Annals of Surgery* 257 (5), S. 824–833.
- Hattori, R.; Hamilton, K. K.; Fugate, R. D.; McEver, R. P.; Sims, P. J. (1989): Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. In: *J. Biol. Chem.* 264 (14), S. 7768–7771.
- Hauptenthal, Jörg; Baehr, Christina; Zeuzem, Stefan; Piiper, Albrecht (2007): RNase A-like enzymes in serum inhibit the anti-neoplastic activity of siRNA targeting polo-like kinase 1. In: *Int. J. Cancer* 121 (1), S. 206–210.
- Haverich, Axel; Ziemer, Gerhard (2010): Herzchirurgie. Die Eingriffe am Herzen und an den herznahen Gefäßen. 3., völlig neu bearb. Aufl. Berlin [u.a.]: Springer.

- Heinrich, Peter C.; Löffler, Georg (2014): Biochemie und Pathobiochemie. 9., vollst. überarb. Aufl. Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch).
- Herold, Gerd (2014): Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD-10 Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Herold.
- Holzapfel, Bianca; Wickert, Lucia (2007): Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. In: *Biol. Unserer Zeit* 37 (2), S. 120–126.
- Jaffe, E. A.; Nachman, R. L.; Becker, C. G.; Minick, C. R. (1973): Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. In: *J. Clin. Invest.* 52 (11), S. 2745–2756.
- Jarozeski, M. J.; Radcliff, G. (1999): Fundamentals of flow cytometry. In: *Mol. Biotechnol.* 11 (1), S. 37–53.
- Jiang, Xinglu; Wang, Guobao; Liu, Ru; Wang, Yaling; Wang, Yongkui; Qiu, Xiaozhong; Gao, Xueyun (2013): RNase non-sensitive and endocytosis independent siRNA delivery system: delivery of siRNA into tumor cells and high efficiency induction of apoptosis. In: *Nanoscale* 5 (16), S. 7256.
- Jinek, Martin; Doudna, Jennifer A. (2009): A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. In: *Nature* 457 (7228), S. 405–412.
- Jones, D. A.; Abbassi, O.; McIntire, L. V.; McEver, R. P.; Smith, C. W. (1993): P-selectin mediates neutrophil rolling on histamine-stimulated endothelial cells. In: *Biophys. J.* 65 (4), S. 1560–1569.
- Jordan, J. E.; Zhao, Z. Q.; Vinten-Johansen, J. (1999): The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. In: *Cardiovasc. Res.* 43 (4), S. 860–878.
- Kaikkonen, Minna U.; Lam, Michael T Y; Glass, Christopher K. (2011): Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. In: *Cardiovasc. Res.* 90 (3), S. 430–440.
- Kilian, Jens G.; Thanyasiri, P.; Celermajer, David S.; Adams, Mark R. (2008): Saphenous vein grafts display poor endothelium-dependent and endothelium-independent dilation--implications for the pathogenesis of vein graft atherosclerosis. In: *Heart Lung Circ* 17 (2), S. 96–99.
- Kim, Francis Y.; Marhefka, Gregory; Ruggiero, Nicholas J.; Adams, Suzanne; Whellan, David J. (2013): Saphenous Vein Graft Disease. In: *Cardiology in Review* 21 (2), S. 101–109.

- Knatterud, G. L.; Rosenberg, Y.; Campeau, L.; Geller, N. L.; Hunninghake, D. B.; Forman, S. A. et al. (2000): Long-term effects on clinical outcomes of aggressive lowering of low-density lipoprotein cholesterol levels and low-dose anticoagulation in the post coronary artery bypass graft trial. Post CABG Investigators. In: *Circulation* 102 (2), S. 157–165.
- Koenig, Olivia; Walker, Tobias; Perle, Nadja; Zech, Almuth; Neumann, Bernd; Schlensak, Christian et al. (2013): New aspects of gene-silencing for the treatment of cardiovascular diseases. In: *Pharmaceuticals (Basel)* 6 (7), S. 881–914.
- Kole, Ryszard; Krainer, Adrian R.; Altman, Sidney (2012): RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. In: *Nat Rev Drug Discov* 11 (2), S. 125–140.
- Kubista, Mikael; Andrade, José Manuel; Bengtsson, Martin; Forootan, Amin; Jonák, Jiri; Lind, Kristina et al. (2006): The real-time polymerase chain reaction. In: *Molecular Aspects of Medicine* 27 (2-3), S. 95–125.
- Lambeth, Luke S.; Smith, Craig A. (2013): Short hairpin RNA-mediated gene silencing. In: *Methods Mol. Biol.* 942, S. 205–232.
- Ledford, Heidi (2010): Drug giants turn their backs on RNA interference. In: *Nature* 468 (7323), S. 487.
- Legein, Bart; Temmerman, Lieve; Biessen, Erik A L; Lutgens, Esther (2013): Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 70 (20), S. 3847–3869.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. In: *Methods* 25 (4), S. 402–408.
- Loop, F. D.; Lytle, B. W.; Cosgrove, D. M.; Stewart, R. W.; Goormastic, M.; Williams, G. W. et al. (1986): Influence of the internal-mammary-artery graft on 10-year survival and other cardiac events. In: *N. Engl. J. Med.* 314 (1), S. 1–6.
- Lowenstein, Charles J.; Morrell, Craig N.; Yamakuchi, Munekazu (2005): Regulation of Weibel-Palade body exocytosis. In: *Trends Cardiovasc. Med.* 15 (8), S. 302–308.
- Lüders, C.; Sodian, R.; Krämer, L.; Hetzer, R. (2003): Anwendung von frisch isolierten und kryokonservierten Nabelschnurzellen für das Tissue Engineering von kardiovaskulären Geweben. In: *Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie* 17 (5), S. 198–204.
- Ma, H.; Diamond, S. L. (2001): Nonviral gene therapy and its delivery systems. In: *Curr Pharm Biotechnol* 2 (1), S. 1–17.

- Mäkinen, Petri I.; Ylä-Herttuala, Seppo (2013): Therapeutic gene targeting approaches for the treatment of dyslipidemias and atherosclerosis. In: *Current opinion in lipidology* 24 (2), S. 116–122.
- Mangano, Dennis T. (2002): Aspirin and mortality from coronary bypass surgery. In: *N. Engl. J. Med.* 347 (17), S. 1309–1317.
- Marin, Valérie; Kaplanski, Gilles; Grès, Sandra; Farnarier, Catherine; Bongrand, Pierre (2001): Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. In: *Journal of Immunological Methods* 254 (1-2), S. 183–190.
- Mehta, Rajendra H.; Ferguson, T. Bruce; Lopes, Renato D.; Hafley, Gail E.; Mack, Michael J.; Kouchoukos, Nicholas T. et al. (2011): Saphenous vein grafts with multiple versus single distal targets in patients undergoing coronary artery bypass surgery: one-year graft failure and five-year outcomes from the Project of Ex-Vivo Vein Graft Engineering via Transfection (PREVENT) IV trial. In: *Circulation* 124 (3), S. 280–288. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.991299.
- Meng, X. B.; Bi, X. L.; Zhao, H. L.; Feng, J. B.; Zhang, J. P.; Song, G. M. et al. (2013): Small interfering RNA targeting nuclear factor kappa B to prevent vein graft stenosis in rat models. In: *Transplantation proceedings* 45 (6), S. 2553–2558.
- Merten, M.; Thiagarajan, P. (2004): P-selectin in arterial thrombosis. In: *Z Kardiol* 93 (11), S. 855–863.
- Mohr, Friedrich; Redwood, Simon; Venn, Graham; Colombo, Antonio; Mack, Michael; Kappetein, A. Pieter et al. (2012): TCT-43 Final Five-year Follow-up of the SYNTAX Trial: Optimal Revascularization Strategy in Patients with Three-vessel Disease. In: *Journal of the American College of Cardiology* 60 (17), S. B13.
- Moore, Kathryn J.; Tabas, Ira (2011): Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. In: *Cell* 145 (3), S. 341–355.
- Morris, Kevin V.; Chan, Simon W-L; Jacobsen, Steven E.; Looney, David J. (2004): Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. In: *Science* 305 (5688), S. 1289–1292.
- Muller, W. A.; Weigl, S. A.; Deng, X.; Phillips, D. M. (1993): PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. In: *J. Exp. Med.* 178 (2), S. 449–460.
- Murakami, S.; Morioka, T.; Nakagawa, Y.; Suzuki, Y.; Arakawa, M.; Oite, T. (2001): Expression of adhesion molecules by cultured human glomerular endothelial cells in response to cytokines: comparison to human umbilical

- vein and dermal microvascular endothelial cells. In: *Microvasc. Res.* 62 (3), S. 383–391.
- Nachman, Ralph L.; Jaffe, Eric A. (2004): Endothelial cell culture: beginnings of modern vascular biology. In: *J. Clin. Invest.* 114 (8), S. 1037–1040.
- Newby, Andrew C. (2005): Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. In: *Physiol. Rev.* 85 (1), S. 1–31.
- Newman, P. J. (1997): The biology of PECAM-1. In: *J. Clin. Invest.* 100 (11 Suppl), S. S25-9.
- Nikitenko, N. A.; Prassolov, V. S. (2013): Non-Viral Delivery and Therapeutic Application of Small Interfering RNAs. In: *Acta Naturae* 5 (3), S. 35–53.
- Nikš, M.; Otto, M. (1990): Towards an optimized MTT assay. In: *Journal of Immunological Methods* 130 (1), S. 149–151.
- Nishiwaki, Yasunobu; Yokota, Takanori; Hiraoka, Megumi; Miyagishi, Makoto; Taira, Kazunari; Isobe, Mitsuaki et al. (2003): Introduction of short interfering RNA to silence endogenous E-selectin in vascular endothelium leads to successful inhibition of leukocyte adhesion. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 310 (4), S. 1062–1066.
- Nolte, A.; Secker, S.; Walker, T.; Greiner, T. O.; Neumann, B.; Simon, P. et al. (2011): Veins are no arteries: even moderate arterial pressure induces significant adhesion molecule expression of vein grafts in an ex vivo circulation model. In: *J Cardiovasc Surg (Torino)* 52 (2), S. 251–259.
- Nolte, Andrea; Hossfeld, Susanne; Post, Marcell; Niederlaender, Jan; Walker, Tobias; Schlensak, Christian; Wendel, Hans Peter (2014): Endotoxins affect diverse biological activity of chitosans in matters of hemocompatibility and cytocompatibility. In: *J Mater Sci Mater Med* 25 (9), S. 2121–2130.
- Nolte, Andrea; Raabe, Claudia; Walker, Tobias; Simon, Perikles; Ziemer, Gerhard; Wendel, Hans Peter (2009): Optimized Basic Conditions Are Essential for Successful siRNA Transfection into Primary Endothelial Cells. In: *Oligonucleotides* 19 (2), S. 141–150.
- Osgood, Michael J.; Hocking, Kyle M.; Voskresensky, Igor V.; Li, Fan Dong; Komalavilas, Padmini; Cheung-Flynn, Joyce; Brophy, Colleen M. (2013): Surgical vein graft preparation promotes cellular dysfunction, oxidative stress, and intimal hyperplasia in human saphenous vein. In: *Journal of Vascular Surgery*.

- Paparella, D.; Yau, T. M.; Young, E. (2002): Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. In: *Eur J Cardiothorac Surg* 21 (2), S. 232–244.
- Parang, Pirouz; Arora, Rohit (2009): Coronary vein graft disease: pathogenesis and prevention. In: *Can J Cardiol* 25 (2), S. e57-62.
- Pfaffl, Michael Walter (2004): Real-Time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. In: *BIOspectrum* 10. Jahrgang (01/2004), S. 92–95.
- Pradhan-Nabzdyk, Leena; Huang, Chenyu; LoGerfo, Frank W.; Nabzdyk, Christoph S. (2014): Current siRNA targets in atherosclerosis and aortic aneurysm. In: *Discov Med* 17 (95), S. 233–246.
- Privratsky, Jamie R.; Newman, Debra K.; Newman, Peter J. (2010): PECAM-1: conflicts of interest in inflammation. In: *Life Sci.* 87 (3-4), S. 69–82.
- Privratsky, Jamie R.; Newman, Peter J. (2014): PECAM-1: regulator of endothelial junctional integrity. In: *Cell Tissue Res.* 355 (3), S. 607–619.
- Privratsky, Jamie R.; Paddock, Cathy M.; Florey, Oliver; Newman, Debra K.; Muller, William A.; Newman, Peter J. (2011): Relative contribution of PECAM-1 adhesion and signaling to the maintenance of vascular integrity. In: *J. Cell. Sci.* 124 (Pt 9), S. 1477–1485.
- Puskas, John D.; Williams, Willis H.; Mahoney, Elizabeth M.; Huber, Philip R.; Block, Peter C.; Duke, Peggy G. et al. (2004): Off-pump vs conventional coronary artery bypass grafting: early and 1-year graft patency, cost, and quality-of-life outcomes: a randomized trial. In: *JAMA* 291 (15), S. 1841–1849.
- Raab, Markus; Daxecker, Heide; Markovic, Snezana; Karimi, Alireza; Griesmacher, Andrea; Mueller, Mathias M. (2002): Variation of adhesion molecule expression on human umbilical vein endothelial cells upon multiple cytokine application. In: *Clin. Chim. Acta* 321 (1-2), S. 11–16.
- Rana, Tariq M. (2007): Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (1), S. 23–36.
- Relou, Ingrid A.M.; Damen, Cora A.; van der Schaft, Daisy W.J.; Groenewegen, Gerard; Griffioen, Arjan W. (1998): Effect of culture conditions on endothelial cell growth and responsiveness. In: *Tissue and Cell* 30 (5), S. 525–530.
- Renz-Polster, Herbert; Aries, Sven (2004): Basislehrbuch innere Medizin. Kompakt - greifbar - verständlich. 3. Aufl. München, Jena: Elsevier, Urban und Fischer.

- Rival, Y.; Del Maschio, A.; Rabiet, M. J.; Dejana, E.; Duperray, A. (1996): Inhibition of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 synthesis and leukocyte transmigration in endothelial cells by the combined action of TNF-alpha and IFN-gamma. In: *J. Immunol.* 157 (3), S. 1233–1241.
- Sabik, Joseph F. (2011): Understanding saphenous vein graft patency. In: *Circulation* 124 (3), S. 273–275.
- Safian, Robert D. (2002): Accelerated atherosclerosis in saphenous vein bypass grafts: A spectrum of diffuse plaque instability. In: *Progress in Cardiovascular Diseases* 44 (6), S. 437–448.
- Schiebler, Theodor H. (2005): Anatomie. Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs. 9., vollst. überarb. Aufl. Heidelberg: Springer.
- Schlitt, Axel; Pruefer, Diethard; Buerke, Ute; Russ, Martin; Dahm, Manfred; Oelert, Hellmut et al. (2006): Neutrophil adherence to activated saphenous vein and mammary endothelium after graft preparation. In: *Ann. Thorac. Surg.* 81 (4), S. 1262–1268.
- Schmid, Christof (2013): Leitfaden Erwachsenenherzchirurgie. 3. Aufl., [aktualisiert]. Heidelberg: Springer
- Scoumanne, Ariane; Kalamati, Tahereh; Moss, Jill; Powell, Janet T.; Gosling, Martin; Carey, Nessa (2002): Generation and characterisation of human saphenous vein endothelial cell lines. In: *Atherosclerosis* 160 (1), S. 59–67.
- Setiadi, Hendra; McEver, Rodger P. (2003): Signal-dependent distribution of cell surface P-selectin in clathrin-coated pits affects leukocyte rolling under flow. In: *J. Cell Biol.* 163 (6), S. 1385–1395.
- Shroyer, A. Laurie; Grover, Frederick L.; Hattler, Brack; Collins, Joseph F.; McDonald, Gerald O.; Kozora, Elizabeth et al. (2009): On-pump versus off-pump coronary-artery bypass surgery. In: *N. Engl. J. Med.* 361 (19), S. 1827–1837.
- Shukla, Nilima; Jeremy, Jamie Y. (2012): Pathophysiology of saphenous vein graft failure: a brief overview of interventions. In: *Current Opinion in Pharmacology* 12 (2), S. 114–120.
- Siegenthaler, Blum (2006): Klinische Pathophysiologie. 9., völlig neu bearb. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Siomi, Haruhiko; Siomi, Mikiko C. (2009): On the road to reading the RNA-interference code. In: *Nature* 457 (7228), S. 396–404.

- Sledz, Carol A.; Williams, Bryan R G (2005): RNA interference in biology and disease. In: *Blood* 106 (3), S. 787–794.
- SMITH, C. (2008): 3. Adhesion molecules and receptors. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121 (2), S. S375.
- Song, Erwei; Zhu, Pengcheng; Lee, Sang-Kyung; Chowdhury, Dipanjan; Kussman, Steven; Dykxhoorn, Derek M. et al. (2005): Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. In: *Nat. Biotechnol.* 23 (6), S. 709–717.
- Soutschek, Jürgen; Akinc, Akin; Bramlage, Birgit; Charisse, Klaus; Constien, Rainer; Donoghue, Mary et al. (2004): Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. In: *Nature* 432 (7014), S. 173–178.
- Souza, D. S.; Bomfim, V.; Skoglund, H.; Dashwood, M. R.; Borowiec, J. W.; Bodin, L.; Filbey, D. (2001): High early patency of saphenous vein graft for coronary artery bypass harvested with surrounding tissue. In: *Ann. Thorac. Surg.* 71 (3), S. 797–800.
- Souza, Domingos S R; Johansson, Benny; Bojö, Leif; Karlsson, Roland; Geijer, Håkan; Filbey, Derek et al. (2006): Harvesting the saphenous vein with surrounding tissue for CABG provides long-term graft patency comparable to the left internal thoracic artery: results of a randomized longitudinal trial. In: *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 132 (2), S. 373–378.
- Stephenson, M. L.; Zamecnik, P. C. (1978): Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75 (1), S. 285–288.
- Subramaniam, M.; Koedam, J. A.; Wagner, D. D. (1993): Divergent fates of P- and E-selectins after their expression on the plasma membrane. In: *Mol. Biol. Cell* 4 (8), S. 791–801.
- Sugama, Y.; Tiruppathi, C.; offakidevi, K.; Andersen, T. T.; Fenton, J. W.; Malik, A. B. (1992): Thrombin-induced expression of endothelial P-selectin and intercellular adhesion molecule-1: a mechanism for stabilizing neutrophil adhesion. In: *J. Cell Biol.* 119 (4), S. 935–944.
- Sundd, Prithu; Pospieszalska, Maria K.; Cheung, Luthur Siu-Lun; Konstantopoulos, Konstantinos; Ley, Klaus (2011): Biomechanics of leukocyte rolling. In: *Biorheology* 48 (1), S. 1–35.
- Takano, Manabu; Meneshian, Avedis; Sheikh, Emran; Yamakawa, Yasuhiko; Wilkins, Kirsten Bass; Hopkins, Elise A.; Bulkley, Gregory B. (2002): Rapid upregulation of endothelial P-selectin expression via reactive oxygen species generation. In: *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283 (5), S. H2054-61.

- Tan, P.H; Chan, C.; Xue, S.A; Dong, R.; Ananthesayanan, B.; Manunta, M. et al. (2004): Phenotypic and functional differences between human saphenous vein (HSVEC) and umbilical vein (HUVEC) endothelial cells. In: *Atherosclerosis* 173 (2), S. 171–183.
- Tandia, Bouna-Moussa; Vandenbranden, Michel; Wattiez, Ruddy; Lakhdar, Zohir; Ruyschaert, Jean-Marie; Elouahabi, Abdelatif (2003): Identification of human plasma proteins that bind to cationic lipid/DNA complex and analysis of their effects on transfection efficiency: implications for intravenous gene transfer. In: *Mol. Ther.* 8 (2), S. 264–273.
- Tedgui, Alain; Mallat, Ziad (2006): Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. In: *Physiol. Rev.* 86 (2), S. 515–581.
- Tenaglia, A. N.; Buda, A. J.; Wilkins, R. G.; Barron, M. K.; Jeffords, P. R.; Vo, K. et al. (1997): Levels of expression of P-selectin, E-selectin, and intercellular adhesion molecule-1 in coronary atherectomy specimens from patients with stable and unstable angina pectoris. In: *Am. J. Cardiol.* 79 (6), S. 742–747.
- Trappe, Hans-Joachim; Schuster, Hans-Peter (2013): EKG-Kurs für Isabel. [mit EKG-Lineal und Online-Lernprogramm mit 100 EKGs]. 6., überarb. und erw. Aufl. Stuttgart, New York, NY: Thieme.
- Tsui, Janice C S; Souza, Domingos S R; Filbey, Derek; Karlsson, Mats G.; Dashwood, Michael R. (2002): Localization of nitric oxide synthase in saphenous vein grafts harvested with a novel "no-touch" technique: potential role of nitric oxide contribution to improved early graft patency rates. In: *J. Vasc. Surg.* 35 (2), S. 356–362.
- Une, D.; Kulik, A.; Voisine, P.; Le May, M.; Ruel, M. (2013): Correlates of Saphenous Vein Graft Hyperplasia and Occlusion 1 Year After Coronary Artery Bypass Grafting: Analysis From the CASCADE Randomized Trial. In: *Circulation* 128 (11_suppl_1), S. S213.
- van der Wal, A C; Becker, A. E.; Elbers, J. R.; Das, P. K. (1992): An immunocytochemical analysis of rapidly progressive atherosclerosis in human vein grafts. In: *Eur J Cardiothorac Surg* 6 (9), S. 469-73; discussion 474.
- Vanhoutte, Paul M. (2009): Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. In: *Circ. J.* 73 (4), S. 595–601.
- Vestweber, Dietmar (2003): Regulation der Einwanderung von Leukozyten in Gewebe. Tätigkeitsbericht 2003, Max-Planck-Institut für vaskuläre Biologie

- Vestweber, Dietmar (2007): Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. In: *Immunol. Rev.* 218, S. 178–196.
- Walker, Tobias; Müller, Isabelle; Raabe, Claudia; Nohe, Boris; Zanke, Christof; Ziemer, Gerhard; Wendel, Hans-Peter (2011): Effective silencing of adhesion molecules on venous endothelial cells for protection of venous bypass grafts. In: *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery.*
- Walker, Tobias; Wendel, Hans Peter; Raabe, Claudia; Wiechnik, Patrycja; Spranger, Liane; Heidenreich, Olaf et al. (2009): Graft protection in bypass surgery: siRNA-mediated silencing of adhesion molecules. In: *Oligonucleotides* 19 (1), S. 15–21..
- Walker, Tobias; Wendel, Hans Peter; Tetzloff, Liane; Heidenreich, Olaf; Ziemer, Gerhard (2005): Suppression of ICAM-1 in human venous endothelial cells by small interfering RNAs. In: *Eur J Cardiothorac Surg* 28 (6), S. 816–820..
- Wan, S.; LeClerc, J. L.; Vincent, J. L. (1997): Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies. In: *Chest* 112 (3), S. 676–692.
- Widimsky, Petr; Straka, Zbynek; Stros, Petr; Jirasek, Karel; Dvorak, Jaroslav; Votava, Jan et al. (2004): One-year coronary bypass graft patency: a randomized comparison between off-pump and on-pump surgery angiographic results of the PRAGUE-4 trial. In: *Circulation* 110 (22), S. 3418–3423.
- Wiedemann, Christine; Schulz, Heidi L.; Weber, Bernhard H.F. (2004): Quantitative Real-Time PCR - Eine Frage der Normalisierung. In: *BIOspectrum* 10. Jahrgang (1/2004), S. 99–102.
- Wijns, W.; Kolh, P.; Danchin, N.; Di Mario, C.; Falk, V.; Folliguet, T. et al. (2010): Guidelines on myocardial revascularization: The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). In: *European Heart Journal* 31 (20), S. 2501–2555.
- Wilhelm, Jochen; Pingoud, Alfred (2003): Real-Time Polymerase Chain Reaction. In: *ChemBioChem* 4 (11), S. 1120–1128.
- Williams, K. J.; Tabas, I. (1995): The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15 (5), S. 551–561.
- Woodfin, Abigail; Voisin, Mathieu-Benoit; Nourshargh, Sussan (2007): PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27 (12), S. 2514–2523.

- Woodrow, Kim A.; Cu, Yen; Booth, Carmen J.; Saucier-Sawyer, Jennifer K.; Wood, Monica J.; Mark Saltzman, W. (2009): Intravaginal gene silencing using biodegradable polymer nanoparticles densely loaded with small-interfering RNA. In: *Nat Mater* 8 (6), S. 526–533.
- Yanagawa, Bobby; Algarni, Khaled D.; Singh, Steve K.; Deb, Saswata; Vincent, Jessica; Elituv, Randi et al. (2013): Clinical, biochemical, and genetic predictors of coronary artery bypass graft failure. In: *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*.
- Yhee, Ji Young; Lee, So Jin; Lee, Sangmin; Song, Seungyong; Min, Hyun Su; Kang, Sun-Woong et al. (2013): Tumor-targeting transferrin nanoparticles for systemic polymerized siRNA delivery in tumor-bearing mice. In: *Bioconjug. Chem.* 24 (11), S. 1850–1860.
- Yusuf, Salim; Hawken, Steven; Ounpuu, Stephanie; Dans, Tony; Avezum, Alvaro; Lanas, Fernando et al. (2004): Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. In: *Lancet* 364 (9438), S. 937–952.
- Zaman, A. G.; Helft, G.; Worthley, S. G.; Badimon, J. J. (2000): The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery disease. In: *Atherosclerosis* 149 (2), S. 251–266.
- Zhou, Yinjian; Zhang, Chunling; Liang, Wei (2014): Development of RNAi technology for targeted therapy - A track of siRNA based agents to RNAi therapeutics. In: *J Control Release*.

9 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Konzeption der Versuche erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. rer. nat. Hans Peter Wendel, Leiter des klinischen Forschungslabors der Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie Tübingen; Herrn Prof. Dr. med. Tobias Walker, Geschäftsführender Oberarzt der Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie Tübingen und Frau Dr. rer. nat. Andrea Nolte-Karayel, Leiterin der Arbeitsgruppe experimentelle RNAi des klinischen Forschungslabors der Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie Tübingen

Die Isolation, Anzucht und Passagierung der Endothelzellen aus menschlichen Venenstücken der Vena saphena magna erfolgte als gemeinschaftliche Aufgabe mit allen zu dieser Zeit an Versuchen mit menschlichen Endothelzellen beteiligten medizinischen und biologischen Doktoranden.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Frau Dr. rer. nat. Andrea Nolte-Karayel, Frau Dipl. Biol. Claudia Raabe und Frau Dr. med. Liane Dreibholz-Spranger von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

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

10 Danksagung

Bedanken möchte ich mich beim gesamten Team der Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. G. Ziemer, beziehungsweise Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Chr. Schlensak für die zur Verfügung gestellten Mittel und Möglichkeiten um dieses Thema bearbeiten zu können. Insbesondere gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. rer. nat. H.P. Wendel und Herrn Prof. Dr. med. T. Walker für eine sehr gute Beratung und Betreuung während meiner Arbeit, so dass ich die Möglichkeit hatte, Schwierigkeiten wie auch eigene Ideen schnell anzusprechen. Dankbar bin ich Frau Dr. med. Liane Dreiholz-Spranger für eine sehr gute Einführung in den Umgang mit Zellkulturen und in die Methodik der Durchflusszytometrie.

Für ständige Anregungen, Verbesserungsvorschläge und die Einarbeitung in die Gelelektrophorese und PCR-Analyse möchte ich Frau Dr. rer. nat. Andrea Nolte-Karayel und Frau Dipl.-Biol. Claudia Raabe ganz besonders danken. Ich erhielt durch eine sehr gute Begleitung die Chance, über alle Versuche, von der Endothelzellisolation bis zur FACS-Analyse, quantitativen Real-time PCR und Gelelektrophorese, selbständig zu arbeiten und eigene Wünsche einzubringen, was mir große Freude bereitet hat. Herzlich bedanken möchte ich mich insbesondere bei Frau Dr. rer. nat. Andrea Nolte-Karayel für die Durchsicht und Korrektur dieses Manuskriptis.

Mein weiterer Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. med. Perikles Simon für die Hilfe bei der Auswahl von PCR-Primern
- den Operateuren der THG-Chirurgie Tübingen für die Bereitstellung von Venenresten nach Abschluss von aorto-koronaren Bypassoperationen
- allen Mitarbeitern des klinischen Forschungslabors der THG-Chirurgie für ein schönes Miteinander und eine tolle Zeit, an die ich mich gerne zurückerinnere.

Mein tiefer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder Martin, die mich nach wie vor in allen Lebenslagen unterstützen und mir dieses Studium ermöglichten.

11 Lebenslauf

Internet-Version ohne Angaben zum Lebenslauf.