

Aus der Klinik für Herzchirurgie,  
Forschungsgruppe Experimentelle Chirurgie,  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg



Etablierung eines siRNA-basierten Systems  
zur Untersuchung von verschiedenen an der  
Aortenklappendegeneration beteiligten Genen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Britta Blume

2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg

Zweitgutachterin: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Margitta Elvers

Für meine Eltern,  
die mir diesen Lebensweg ermöglichen.  
In ewiger Liebe und Dankbarkeit.

## I Zusammenfassung

Die degenerative Aortenklappenerkrankung (*degenerative aortic valve disease*, DAVD) ist eine der häufigsten kardiovaskulären Diagnosen. Die valvulären Interstitialzellen (VICs) sowie einige Komponenten der valvulären Extrazellulärmatrix scheinen bei den pathologischen Veränderungen der nativen Klappestruktur im Rahmen der DAVD eine entscheidende Rolle zu spielen. Im besonderen Fokus stehen vier Moleküle: das Proteoglykan Biglykan (BGN), das Glykoprotein Osteopontin (OPN) sowie die membranständigen Enzyme Hyaluronsäure-Synthase-2 (HAS2) und Ekto-5'-Nukleotidase (CD73). Während man BGN und OPN pro-degenerative Eigenschaften zuschreibt, scheinen HAS2 und CD73 einen protektiven Effekt in Bezug auf Kalzifizierungsprozesse auszuüben. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung eines siRNA-basierten Systems, das in ovinen VICs zu einer suffizienten Herunterregulierung der vier o. g. Gene auf Nukleinsäure-Ebene führt. Dieser sog. experimentelle Gen-*knockdown* beruht auf dem Prinzip der RNA-Interferenz (RNAi), bei der spezifische *small interfering RNA*-(siRNA-)Moleküle einen Abbau der komplementären Ziel-mRNA und eine Hemmung der entsprechenden Genexpression vermitteln.

Methodisch wurden dazu ovine VICs aus den Aortenklappen von Schafen isoliert und im Rahmen der siRNA-Transfektion mit synthetischen, *custom*-designten siRNA-Sequenzen und einem Lipid-basierten Transfektionsreagenz behandelt. Es wurden RNAi-Experimente mit verschiedenen Transfektionsreagenzien durchgeführt, wobei jeweils die Menge an siRNA und Transfektionsreagenz sowie auch die Sequenzen der siRNA-Doppelstränge an sich variiert wurden. Der Erfolg des Gen-*knockdowns* wurde anhand von Genexpressionsanalysen überprüft und die Daten per *Kruskal-Wallis-Test* ausgewertet. Da in der qRT-PCR die Wahl eines reliablen Kalibrators essenziell ist, wurde zunächst ein geeignetes ovines Referenzgen ermittelt, um die erhobenen Daten zu normalisieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es erstmals, Protokolle zu etablieren, die in ovinen VICs zu einer signifikanten Herunterregulierung der relativen Genexpression von *BGN*, *OPN* und *CD73* führen. Für *HAS2* konnte kein signifikanter Gen-*knockdown* erreicht werden. Darüber hinaus wurden weiterführende Experimente durchgeführt, um funktionelle Auswirkungen des Gen-*knockdowns* von *BGN* und *OPN* unter degenerierenden und nicht-degenerierenden Bedingungen *in vitro* zu untersuchen. qRT-PCR-Analysen ergaben, dass ein *knockdown* von *BGN* bzw. *OPN* die mRNA-Expression von ausgewählten, ebenfalls mit der DAVD assoziierten Genen (u. a. *TLR2/4* bzw. *MMP2/9*) nicht signifikant beeinflusst. Weiterhin konnten Kalzium-Assay-Analysen zeigen, dass ein Gen-*knockdown* von *OPN*, nicht aber von *BGN*, einen Einfluss auf die Kalziumakkumulation in ovinen VICs unter degenerierenden Bedingungen zu haben scheint. In Übereinstimmung mit anderen Studienergebnissen scheint *OPN* die Kalziumakkumulation unter degenerierenden Bedingungen *in vitro* zu hemmen und somit der zellulären Degeneration entgegenzuwirken.

Die genaue Rolle der vier o. g. Moleküle bei den pathologischen Prozessen im Rahmen der DAVD ist noch nicht im Detail verstanden. Der in dieser Arbeit etablierte Gen-*knockdown* von *BGN*, *OPN* und *CD73* stellt ein *in vitro*-Verfahren dar, auf dessen Grundlage diese Zusammenhänge in Zukunft vertieft untersucht werden können. Im Zentrum weiterführender Analysen sollte die Fragestellung stehen, ob und inwiefern die veränderte Expression dieser Moleküle in kalzifizierten Herzklappen Ursache oder Konsequenz der degenerativen Veränderungen ist.

## II Abstract

Degenerative aortic valve disease (DAVD) is one of the most prevalent cardiovascular diagnoses. Valvular interstitial cells (VICs) as well as several components of the valvular extracellular matrix seem to play a decisive role regarding the pathological changes of the native valve structure during DAVD. Four molecules are of special interest: the proteoglycan biglycan (BGN), the glycoprotein osteopontin (OPN) as well as the membrane-bound enzymes hyaluronan synthase 2 (HAS2) and ecto-5'-nucleotidase (CD73). Whereas BGN and OPN are associated with pro-degenerative effects, HAS2 and CD73 seem to have a protective impact concerning calcification processes. The primary objective of the present study is to establish a siRNA-mediated system resulting in a sufficient down-regulation of the mRNA expression of these four genes in ovine VICs. This gene knockdown is based on the principle of RNA interference (RNAi), which depends on specific small interfering RNA-(siRNA-)molecules triggering a cleavage of the complementary target mRNA resulting in a suppressed gene expression.

For that purpose, ovine VICs were isolated from sheep aortic valves and treated with synthetic, custom-designed siRNA sequences and a liposomal-based transfection reagent. RNAi experiments were performed using different transfection reagents, respectively modifying the amount of siRNA and transfection reagent as well as the sequences of the siRNA duplexes. The depletion of the targeted mRNA and therefore the success of gene silencing were detected by gene expression analysis, while data were analysed via Kruskal-Wallis test. Since a reliable calibrator is an essential requirement for qRT-PCR, at first a suitable ovine reference or housekeeping gene was determined to normalize data. The main result of the present study was the first-time establishment of transfection protocols leading to a significant downregulation of the relative gene expression of *BGN*, *OPN* and *CD73* in ovine VICs. A significant gene knockdown of *HAS2* could not be achieved. Moreover, additional qRT-PCRs and Calcium Assays were performed to investigate functional effects of the siRNA-mediated gene knockdown of *BGN* and *OPN* under degenerating and not-degenerating conditions *in vitro*. It was shown that a decreased gene expression of *BGN* or *OPN* does not significantly influence the mRNA expression of further genes (e. g. *TLR2/4* or *MMP2/9*) also being involved in the pathophysiology of DAVD. A gene knockdown of *BGN* did not lead to changes of the calcium concentration, whereas the gene knockdown of *OPN* appears to have an effect on the calcium accumulation in ovine VICs under degenerating conditions. In accordance with other studies, *OPN* seems to inhibit calcium accumulation under degenerating conditions *in vitro* and thus prevent cellular degeneration.

The exact pathogenesis of DAVD has not been elucidated in detail yet, especially concerning the regulatory mechanisms of the four molecules mentioned above. In the present study, an *in vitro* method for efficient gene silencing of *BGN*, *OPN* and *CD73* was successfully established allowing to further investigate these correlations. Following studies should focus on the issue whether and to what extent the degenerative changes during DAVD cause or are caused by the altered expression of these molecules in calcified aortic valves.

### III Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>AllStars</i>	<i>AllStars Negative Control siRNA</i>
Ago2	Argonaute 2
bzw.	beziehungsweise
BGN (Gen), BGN (Genprodukt)	Biglykan
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>complementary deoxyribonucleic acid</i> )
CD73 (Gen), CD73 (Genprodukt)	Ekto-5'-Nukleotidase
C <sub>T</sub> -Wert	<i>cycle threshold</i>
DAVD	Degenerative Aortenklappenerkrankung (engl. <i>degenerative aortic valve disease</i> )
deg.	degenerierend
DEG	degenerierendes Zellkulturmedium, angereichert mit β-Glycerolphosphat (10 mM) und Kalziumchlorid (1,5 mM)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
ECM	Extrazellulärmatrix (engl. <i>extracellular matrix</i> )
engl.	englisch
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
HA	Hyaluronsäure (engl. <i>hyaluronic acid</i> )
HAS2 (Gen), HAS2 (Genprodukt)	Hyaluronsäure-Synthase-2
<i>HiPerFect</i>	<i>HiPerFect Transfection Reagent</i>
<i>Lipofectamine</i>	<i>Lipofectamine<sup>R</sup> 2000 Transfection Reagent</i>
<i>MAPK1</i>	<i>mitogen-activated protein kinase 1</i>
max.	maximal
Max.	Maximum
min	Minute
Min.	Minimum
mind.	mindestens
MMP	Matrix-Metalloproteinase (engl. <i>matrix metalloproteinase</i> )

---

mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i> )
ns	nicht signifikant
o. g.	oben genannt
OPN (Gen), OPN (Genprodukt)	Osteopontin
p	p-Wert
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i> )
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung (engl. <i>relative centrifugal force</i> ), Vielfaches des g-Werts
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i> )
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
shRNA	<i>short hairpin</i> Ribonukleinsäure
siRNA	<i>small/short interfering</i> Ribonukleinsäure
sog.	sogenannt
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
TLR	Toll-like-Rezeptor (engl. <i>toll like receptor</i> )
u. a.	unter anderem
unbeh.	Kontrolle „unbehandelt“
VICs	valvuläre Interstitialzellen (engl. <i>valvular interstitial cells</i> )
°C	Grad Celsius

## IV Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	RNA-Interferenz .....	1
1.1.1	Das Prinzip der RNA-Interferenz.....	1
1.1.2	Design von ovinen siRNA-Sequenzen.....	3
1.1.3	Notwendigkeit eines Referenzgens für RNA-Interferenz-Analysen.....	3
1.2	Die valvulären Interstitialzellen.....	4
1.3	Die degenerative Aortenklappenerkrankung .....	4
1.4	Charakterisierung der zu regulierenden Gene.....	5
1.4.1	Relevanz für aktuelle Forschungsprojekte .....	5
1.4.2	Biglykan.....	5
1.4.3	Osteopontin .....	5
1.4.4	Hyaluronsäure-Synthase-2 .....	6
1.4.5	Ekto-5'-Nukleotidase .....	6
1.5	Ziele der Arbeit.....	7
2	Methoden .....	8
2.1	Isolation und Kultivierung von valvulären Interstitialzellen .....	8
2.1.1	Präparation und Zellisolation .....	8
2.1.2	Mediumwechsel .....	8
2.1.3	Subkultivierung.....	9
2.1.4	Einfrieren von Zellen (Kryokonservierung).....	9
2.1.5	Auftauen von Zellen.....	9
2.1.6	Zellzahlbestimmung.....	10
2.1.7	Zellstimulation mit $\beta$ -Glycerolphosphat und Kalziumchlorid .....	10
2.2	Transfektion mit <i>custom</i> -designten siRNA-Sequenzen .....	10
2.2.1	siRNA-Design.....	10
2.2.2	Lipidvermittelte siRNA-Transfektion von ovinen valvulären Interstitialzellen .....	12
2.3	Genexpressionsanalyse .....	14
2.3.1	Primerdesign .....	14
2.3.2	RNA-Isolation.....	15
2.3.3	Konzentrationsmessung von RNA .....	16
2.3.4	cDNA-Synthese mittels reverser Transkription .....	16
2.3.5	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion .....	17
2.4	Kalzium-Assay.....	19
2.5	Bicinchoninsäure-Protein-Assay.....	20
2.6	Statistische Auswertung.....	21
3	Material.....	22
3.1	Laborgeräte .....	22



---

3.2	Verbrauchsmaterial .....	22
3.3	Chemikalien .....	24
3.4	Puffer, Lösungen, Medien .....	26
3.5	Kits .....	26
3.6	siRNA .....	27
3.7	Primer .....	27
4	Ergebnisse .....	30
4.1	Etablierung eines ovinen Referenzgens für qRT-PCR-Analysen .....	30
4.2	Etablierungsarbeiten zu einem siRNA-basierten Gen- <i>knockdown</i> von <i>BGN</i> , <i>OPN</i> , <i>HAS2</i> und <i>CD73</i> in ovinen VICs .....	34
4.2.1	Einfluss der Menge an siRNA auf den Gen- <i>knockdown</i> .....	38
4.2.2	Einfluss der Menge an <i>Lipofectamine</i> auf den Gen- <i>knockdown</i> .....	41
4.2.3	Einfluss des Transfektionsreagenzes <i>HiPerFect</i> auf den Gen- <i>knockdown</i> .....	42
4.2.4	Einfluss neu designter siRNA-Sequenzen auf den Gen- <i>knockdown</i> .....	45
4.3	Auswirkung des Gen- <i>knockdowns</i> von <i>BGN</i> bzw. <i>OPN</i> auf die mRNA-Expression von weiteren, mit der DAVD assoziierten Genen .....	48
4.4	Auswirkung des Gen- <i>knockdowns</i> von <i>BGN</i> bzw. <i>OPN</i> auf die Kalziumakkumulation in ovinen VICs .....	50
5	Diskussion .....	53
5.1	Bewertung der angewandten Methoden .....	53
5.1.1	Zellen und Probenanzahl .....	53
5.1.2	<i>Custom-Design</i> von chemisch synthetisierten siRNA-Sequenzen .....	53
5.1.3	Auswahl des Transfektionsreagenzes .....	56
5.1.4	Klassische Transfektion vs. <i>Fast-Forward</i> - und <i>Reverse</i> -Transfektion .....	57
5.1.5	Methoden zum Nachweis des Gen- <i>knockdowns</i> .....	58
5.2	Bewertung der erzielten Ergebnisse .....	59
5.2.1	Etablierung eines ovinen Referenzgens für qRT-PCR-Analysen .....	59
5.2.2	Etablierungsarbeiten zu einem siRNA-basierten Gen- <i>knockdown</i> von <i>BGN</i> , <i>OPN</i> , <i>HAS2</i> und <i>CD73</i> in ovinen VICs .....	60
5.2.3	Auswirkung des Gen- <i>knockdowns</i> von <i>BGN</i> bzw. <i>OPN</i> auf die mRNA-Expression von weiteren, mit der DAVD assoziierten Genen .....	62
5.2.4	Auswirkung des Gen- <i>knockdowns</i> von <i>BGN</i> bzw. <i>OPN</i> auf die Kalziumakkumulation in ovinen VICs .....	63
5.3	Schlussfolgerungen .....	64
6	Literaturverzeichnis .....	66
7	Tabellenverzeichnis .....	71
8	Abbildungsverzeichnis .....	72

# 1 Einleitung

## 1.1 RNA-Interferenz

### 1.1.1 Das Prinzip der RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi), von lateinisch *inter* = zwischen und *ferre* = tragen, bringen, ist ein komplexer und vielseitiger Mechanismus, der von eukaryotischen Zellen zur Herunterregulierung (sog. Gen-*knockdown*) oder kompletten Abschaltung (sog. Gen-*knockout*) von Genen angewandt wird (1, 2). Das zugrundeliegende Prinzip wurde erstmals 1990 im Zusammenhang mit Petunien entdeckt, als Wissenschaftler um C. Napoli versuchten, in die Blütenfärbung einzugreifen (1, 2). Einige Jahre später führten genetische Untersuchungen am Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* zu der endgültigen Erkenntnis, dass kleine, doppelsträngige Ribonukleinsäure-(RNA-)Sequenzen für die Stummschaltung von Genen verantwortlich sind, woraufhin sich die Bezeichnung der RNAi etablierte (1, 3, 4). Inzwischen ist bekannt, dass eukaryotische Zellen den RNAi-Mechanismus zur Regulation der eigenen Genexpression und als Werkzeug zur Verteidigung gegen fremde (Virus-)RNA nutzen (1, 5). In Abb. 1 ist der molekulare Mechanismus der RNAi vereinfacht dargestellt.

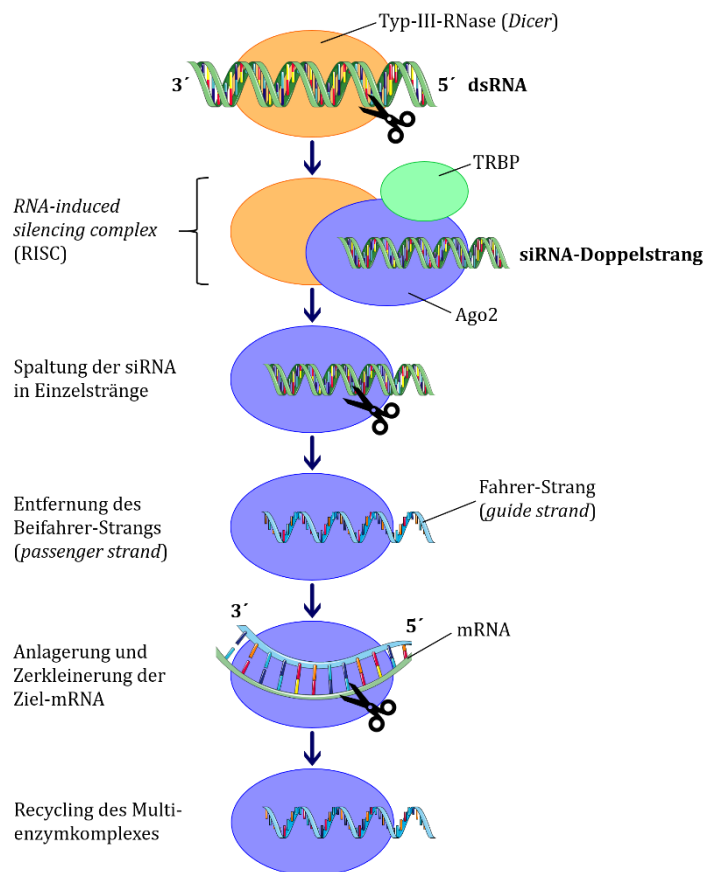


Abb. 1: **Prinzip der RNAi in vivo**, in Anlehnung an Graw J. (2). *dsRNA*: doppelsträngige Ribonukleinsäure, *TRBP*: trans-activation-responsive RNA-binding protein, *siRNA*: small/short interfering Ribonukleinsäure, *Ago2*: Argonaute-2, *mRNA*: Boten-Ribonukleinsäure.

Hauptakteure sind große, doppelsträngige RNA-Moleküle, die hunderte bis tausende Basenpaare lang sein können (2). Dabei handelt es sich entweder um exogene Nukleinsäuren, die bei der Replikation von viraler RNA anfallen, oder um endogene Nukleinsäuren, die durch die Transkription zellulärer Gene

entstehen (2). In einem ersten Schritt wird diese doppelsträngige RNA durch eine Typ-III-RNase (*Dicer*) in kleine, 21 bis 23 Basenpaare große, doppelsträngige *small* bzw. *short interfering* RNA-(siRNA-)Moleküle gespalten (6). Diese codieren für kein Genprodukt und sind letztlich für die Gen-Abschaltung verantwortlich (1). Der auf diese Weise entstandene siRNA-Doppelstrang verbindet sich mit zellulären Proteinen, Argonaute-2 (Ago2) und *trans-activation-responsive RNA-binding protein*, zum sog. *RNA-induced silencing complex*, welcher schließlich durch die Entwindung der siRNA eine Aktivierung erfährt (1, 2). Innerhalb dieses Multienzymkomplexes wird die doppelsträngige siRNA durch Ago2 und unter Verbrauch von Adenosintriphosphat in ihre Einzelstränge gespalten (2). Der sog. Beifahrer-Strang wird abgestoßen, der Fahrer-Strang bleibt an Ago2 gebunden und lagert sich über Watson-Crick-Basenpaarung an die komplementäre Boten-RNA (mRNA) (2). Im Anschluss wird die mRNA durch den *RNA-induced silencing complex* bzw. die Endonukleaseaktivität von Ago2 zerkleinert, die entstandenen Gen-Sequenzen werden freigesetzt und der Komplex steht für einen neuen Zyklus zur Verfügung (2, 5). Durch diese posttranskriptionelle Zerstörung der zellulären Ziel-mRNA wird die Expression des entsprechenden Gens inhibiert und somit die Proteinbiosynthese effektiv gehemmt (1).

Das Prinzip der RNAi hat sich im letzten Jahrzehnt zu einer vielversprechenden *in vitro*-Methode etabliert, die nicht nur die sequenzspezifische Ausschaltung von Genen ermöglicht, sondern auch eine hohe Anwendungsbreite bietet (1). Was auf den ersten Blick paradox erscheint, nämlich die Funktion eines Gens zu erforschen, indem dieses ausgeschaltet wird, gehört mittlerweile zu einer modernen und häufig angewandten Zellkulturtechnik (1). Während bis vor einiger Zeit Tiermodelle mit sog. *knockout*-Tieren standardmäßig für funktionelle Genanalysen eingesetzt wurden, geht die RNAi-Methode mit einem deutlich geringeren methodischen Aufwand und ohne tierschutzrechtliche Bedenken einher (1).

Für die Durchführung eines RNAi-Experiments, das *in vitro* zu einem suffizienten Gen-*knockdown* führt, werden zunächst spezifische, zur zellulären Ziel-mRNA komplementäre siRNA-Sequenzen benötigt, die in einem zweiten Schritt in die Zellen hineingeschleust werden. Dabei macht man sich den konservierten, zelleigenen RNAi-Apparat (s. o.) zunutze, der je nach verwendeter doppelsträngiger RNA zu verschiedenen Zeitpunkten des Prozesses eingreift (7). Die erste Möglichkeit besteht in dem Einsatz von chemisch synthetisierten siRNA-Sequenzen, die für die meisten Zielgene kommerziell erhältlich (*pre-designt*) sind oder aber selbstständig kreiert (*custom-designt*) werden müssen (1, 5). Synthetische siRNA wird zumeist lipidvermittelt mithilfe eines Transfektionsreagenzes in die Zellen eingeschleust (sog. siRNA-Transfektion) (1). Da es sich bereits um kleine, doppelsträngige RNA-Moleküle handelt, beginnt die intrazelluläre Prozessierung mit der Bildung des *RNA-induced silencing complex* (s. Abb. 1) (1, 7). Die zweite Möglichkeit, siRNA in Zielzellen einzubringen, basiert auf dem Einsatz von Expressionsvektoren (1). Diese codieren für haarnadelförmige, doppelsträngige sog. *short hairpin* RNA-(shRNA-)Moleküle, welche nach ihrem Transport ins Zytoplasma durch die Typ-III-RNase *Dicer* in funktionsfähige siRNA-Sequenzen gespalten werden (1). Die Überprüfung des *knockdown*-Erfolges auf Nukleinsäure-Ebene erfolgt standardmäßig mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (engl. *quantitative real-time polymerase chain reaction*, qRT-PCR), wobei eine signifikante Gen-suppression ca. 24 bis 96 Stunden nach Transfektion mit synthetischer siRNA zu erwarten ist (1, 5).

### 1.1.2 Design von ovinen siRNA-Sequenzen

Es stehen nicht für alle existierenden Gene, beispielsweise der Spezies *Ovis aries*, vorkonfigurierte synthetische siRNA-Sequenzen kommerziell zur Verfügung. Diese müssen selbstständig kreiert und anschließend sowohl auf Spezifität als auch auf Funktionalität überprüft werden (1). Grundsätzlich kann jeder mRNA-Abschnitt des zu regulierenden Gens als Vorlage für eine komplementäre siRNA-Sequenz ausgewählt werden, allerdings gilt es einige Richtlinien zu beachten, um den Erfolg des anschließenden RNAi-Experiments zu erhöhen (s. 2.2.1) (1). In den vergangenen Jahrzehnten haben sich bereits unzählige Studien mit der Definition von einheitlichen Algorithmen für das Designen von siRNA-Sequenzen beschäftigt, um deren Spezifität und Effizienz zu maximieren sowie gleichzeitig unspezifischen Bindungen zu minimieren (8). Im Folgenden seien einige essenzielle Parameter genannt, die in nahezu allen Algorithmen Berücksichtigung finden: ein asymmetrischer Nukleotidgehalt der siRNA-Duplex, Vermeidung von Wiederholungen oder Einzelnukleotid-Polymorphismus, ein optimaler Guanin-Cytosin-Gehalt, ein ausreichender Abstand zwischen Zielsequenz und Stopcodon sowie eine zugängliche Sekundärstruktur von siRNA und mRNA (8-11).

Nach der Auswahl einer zur zellulären Ziel-mRNA komplementären siRNA-Sequenz muss deren Spezifität mithilfe der Software BLAST (*basic local alignment search tool*) überprüft werden (1). Dabei wird die designte siRNA-Sequenz mit dem gesamten Genom der Spezies *Ovis aries* aus Datenbanken verglichen, um unspezifische Bindungen und damit unerwünschte Gensuppressionen auszuschließen (1). Abschließend erfolgt die Beurteilung von Funktionalität und Effektivität der designten siRNA-Sequenz im experimentellen Ansatz (1).

### 1.1.3 Notwendigkeit eines Referenzgens für RNA-Interferenz-Analysen

Die Standardmethode zur Überprüfung des *knockdown*-Erfolges auf Genebene im Rahmen eines RNAi-Experiments ist die Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR (1). Vorteile dieses Verfahrens sind u. a. eine schnelle und einfache Durchführbarkeit, ein hoher Durchsatz sowie viele Möglichkeiten der Standardisierung und eine dementsprechend hohe Reproduzierbarkeit (12). Nach allgemeiner Auffassung ist eine stabile endogene Kontrolle im Sinne eines Referenzgens zur Normalisierung von erhobenen PCR-Daten unabdingbar, um letztlich verlässliche und valide Aussagen bezüglich der Genexpression treffen zu können (12). Eine solche Normalisierung dient dem Ausgleich von Probenunterschieden sowie der Identifizierung von Gen-spezifischen Unterschieden der Expressionslevel (12). Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass die mRNA-Expression von Referenzgenen zwischen Zellen verschiedenen Gewebes und sogar zwischen verschiedenen experimentellen Bedingungen innerhalb eines Zelltyps erhebliche Schwankungen aufweisen kann (12-15). Ein RNAi-Experiment, das zum Nachweis des *knockdown*-Erfolges eine Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR vorsieht, erfordert daher zunächst die Ermittlung eines optimalen Referenzgens (14). Optimal bedeutet, dass sich trotz der verschiedenen Behandlungsbedingungen innerhalb des geplanten experimentellen Ansatzes ein stabiles Genexpressionslevel nachweisen lässt (15). Von der Auswahl der endogenen Kontrolle hängen letztendlich Gültigkeit und Aussagekraft der Ergebnisse ab (12).

## 1.2 Die valvulären Interstitialzellen

Histologisch betrachtet besteht die Aortenklappe aus den valvulären Endothelzellen auf der mit Blut in Kontakt stehenden Oberfläche, den valvulären Interstitialzellen (VICs) und der valvulären Extrazellulärmatrix (ECM) (16). Die valvuläre ECM lässt sich wiederum in Fibrosa, Spongiosa und Ventricularis aufteilen (17), deren detaillierter Aufbau in Abb. 2 dargestellt ist.

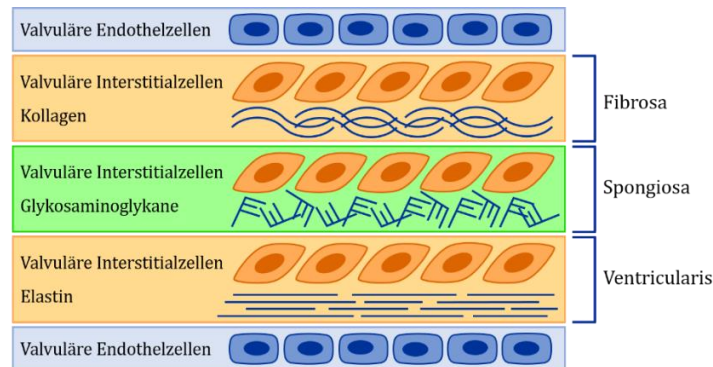


Abb. 2: **Zellulärer und molekularer Aufbau einer gesunden Aortenklappe**, in Anlehnung an Rajamannan NM et al. (16).

Die spezifische Zusammensetzung der valvulären ECM, die eine empfindliche Balance zwischen Stabilität und Flexibilität ermöglichen muss, hängt letztendlich von der synthetischen Aktivität der VICs ab (17). Diese speziellen Fibroblasten sind die häufigste in Herzklappen vorkommende Zellart und für die Aufrechterhaltung ihrer strukturellen Integrität verantwortlich (18). VICs kommen in allen Klappenschichten vor und synthetisieren neben den Komponenten der valvulären ECM auch Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und deren Inhibitoren, die den Umbau der Matrix regulieren (16). Insgesamt werden fünf Phänotypen von VICs beschrieben: embryonale Vorläuferzellen, ruhende VICs, aktivierte VICs, Vorläufer-VICs und osteoblastische VICs (18). In gesunden, adulten Aortenklappen ähneln VICs ruhenden Fibroblasten (16). Diese *in vivo* nahezu teilungsinaktiven VICs besitzen eine geringe Proliferationsrate und eine konstante für die Aufrechterhaltung der Klappenhomöostase notwendige Genexpression (19). Zudem reparieren sie kontinuierlich kleinere Schäden der valvulären ECM, die im Rahmen des physiologischen Gewebeumbaus entstehen (19). Schwankungen der mechanischen Stressbelastung sowie krankhafte Veränderungen oder Verletzungen der Aortenklappe führen zu einer reaktiven Differenzierung der VICs (19). Diese aktivierten VICs besitzen als Antwort auf pathologische Klappenprozesse eine erhöhte Aktivität bezüglich Proliferation, Migration und Umbau der valvulären ECM (18). Osteoblastische VICs sind in Chondro- und Osteogenese involviert und sezernieren unter anderem die Matrixproteine Osteopontin (OPN), Osteocalcin (auch *bone gamma-carboxyglutamate protein*, BGLAP genannt) und alkalische Phosphatase (18).

## 1.3 Die degenerative Aortenklappenerkrankung

Die degenerative Aortenklappenerkrankung (*degenerative aortic valve disease*, DAVD) ist eine langsam fortschreitende, irreversible Störung von Aortenklappenstruktur und -funktion (16). Sie umfasst sowohl die Aortenklappensklerose als auch die Aortenklappenstenose, wobei ausschließlich letztere mit

einer Kalzifizierung des Gewebes und damit einer messbaren Behinderung des Blutflusses sowie einem signifikanten Druckgradienten zwischen linkem Ventrikel und Aorta einhergeht (16, 17, 20).

Die Aortenklappenstenose als Endstadium der DAVD ist die häufigste Herzklappenerkrankung und die dritthäufigste kardiovaskuläre Erkrankung (nach der arteriellen Hypertonie und der koronaren Herzkrankheit) in den westlichen Industrienationen (21, 22). Die erworbene, auf Degeneration und Kalzifizierung beruhende Aortenklappenstenose stellt dabei mit 81,9 % die mit Abstand häufigste Krankheitsform dar (21-23). Zurzeit existiert keine effektive medikamentöse Therapie, sodass eine operative Intervention mit Klappenersatz die einzige verfügbare Behandlungsform darstellt (22). Ohne derartigen operativen Eingriff beträgt das 5-Jahres-Überleben von Patienten mit hochgradiger Aortenklappenstenose nur 15-50 % (24).

## 1.4 Charakterisierung der zu regulierenden Gene

### 1.4.1 Relevanz für aktuelle Forschungsprojekte

In der vorliegenden Arbeit stehen vier Moleküle im Fokus, die mit der Entstehung bzw. dem Fortschreiten der DAVD assoziiert sind: das Proteoglykan Biglykan (BGN), das Glykoprotein OPN sowie die membrangebundenen Enzyme Hyaluronsäure-Synthase-2 (HAS2) und Ekto-5'-Nukleotidase (CD73). Die Arbeitsgruppe, in welcher die vorliegende Arbeit angefertigt wurde, untersucht den Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und der Entwicklung bzw. dem Fortschreiten der DAVD, wobei BGN und HAS2 eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. OPN und CD73 sind wiederum Gegenstand eines Forschungsprojektes, bei dem die osteogene Transformation der VICs im Rahmen von degenerativen Veränderungen im Zentrum des Interesses steht.

### 1.4.2 Biglykan

BGN gehört zu den kleinen Proteoglykanen (Klasse 1 der *small leucine-rich proteoglycans*) und ist in nahezu allen Geweben ein fester Bestandteil der ECM (25). Der molekulare Aufbau setzt sich aus einem Leucin-reichen Kernprotein und zwei Glykosaminoglykan-Ketten zusammen, die entweder aus Chondroitinsulfat oder aus Dermatansulfat bestehen (25). BGN besitzt pro-inflammatorische Eigenschaften und fungiert als endogener Ligand für die Toll-like-Rezeptoren (TLR) 2 und 4 von Makrophagen (25). In kalzifizierten, stenosierten Arealen von humanen Aortenklappen ist eine verstärkte Akkumulation von BGN nachgewiesen worden (26, 27). Song *et al.* konnten zeigen, dass die VICs von stenosierten Aortenklappen deutlich höhere Mengen an BGN exprimieren als die VICs von gesunden Aortenklappen (28). Nichtsdestotrotz ist die genaue Rolle von BGN im Rahmen der DAVD nach wie vor unklar. Es stellt sich die Frage, ob die VICs von erkrankten Aortenklappen reaktiv erhöhte Mengen an BGN exprimieren oder ob BGN an sich eine Aktivierung der VICs und damit eine erhöhte Expression von osteogenen Biomarkern auslöst (28).

### 1.4.3 Osteopontin

Das glykolysierte Phosphoprotein OPN zählt zur Familie der *small integrin binding ligand N-linked glycoproteins* und ist als integraler Bestandteil der Knochenmatrix u. a. an der Biomineralisation und

Aufrechterhaltung der Homöostase des Knochengewebes beteiligt (29-31). Darüber hinaus wurde OPN sowohl in arteriosklerotischen Plaques als auch in humanen kalzifizierten Aortenklappen nachgewiesen, wodurch ihm eine regulatorische Funktion im Rahmen von ektope Kalzifizierungsprozessen des kardiovaskulären Systems zugeschrieben wird (30, 32). Yu *et al.* gelang der Nachweis, dass Patienten mit einer mittleren bis schweren Kalzifizierung der Aortenklappe einen höheren OPN-Plasmaspiegel aufweisen als Patienten mit keiner oder nur milder Aortenklappensklerose, wobei die Menge an zirkulierendem OPN mit der Schwere der Erkrankung korreliert (33). Auf der anderen Seite scheint OPN anti-kalzifizierende Eigenschaften zu besitzen, indem es gemeinsam mit anorganischem Pyrophosphat die Ablagerung von Hydroxyapatit inhibiert und somit der Entstehung von Kalzifizierungsherden entgegenwirkt sowie deren Resorption fördert (31, 34, 35). Diese scheinbar widersprüchlichen Effekte hängen vermutlich von posttranslationalen Modifizierungsprozessen des OPN-Moleküls ab (33).

#### 1.4.4 Hyaluronsäure-Synthase-2

HAS2 ist die häufigste von drei membrangebundenen Isoformen in mesenchymalem Gewebe und synthetisiert das Glykosaminoglykan Hyaluronsäure (HA) (36). HA als wichtiger Bestandteil der zentralen Aortenklappenschicht (Spongiosa) vermittelt dort u. a. Viskoelastizität und Flexibilität durch ihre wasserbindenden Eigenschaften (37). Neue Daten weisen zudem auf eine Beteiligung der Glykosaminoglykane an degenerativen Prozessen der Aortenklappe hin. So konnten *in vitro*-Experimente von Rodriguez *et al.* zeigen, dass mit pro-kalzifizierendem Medium behandelte VICs weniger HA synthetisieren als unter normalen Kultivierungsbedingungen (38). Gleichzeitig führte die exogene Zugabe von HA zu einer Hemmung der chondro-osteogenen Transformation von kultivierten VICs (38). Diese Befunde deuten auf einen potenziell protektiven Effekt der HA im Rahmen der Biomineralisation von VICs hin, welcher möglicherweise ebenfalls im Zusammenhang mit der Entwicklung und dem Fortschreiten der DAVD zum Tragen kommt.

#### 1.4.5 Ekto-5'-Nukleotidase

Das membranständige Enzym CD73 katalysiert die Dephosphorylierung von extrazellulärem Adenosinmonophosphat zu Adenosin, dem Endprodukt des Adenosintriphosphat-Abbaus (39). Extrazelluläres Adenosintriphosphat induziert als pro-inflammatorisches Signalmolekül die Differenzierung von ruhenden VICs in einen Osteoblasten-ähnlichen Phänotyp und scheint somit im Rahmen der DAVD pro-degenerative Prozesse zu fördern (40-42). Im Gegensatz dazu besitzt extrazelluläres Adenosin protektive Eigenschaften hinsichtlich einer solchen osteoblastischen Transformation von VICs und vermittelt sowohl antithrombotische als auch antiinflammatorische Effekte im Zusammenhang mit atherosklerotischen Gefäßläsionen (41, 43). Interessanterweise wurde bei Patienten mit einer *CD73*-Genmutation eine gesteigerte vaskuläre Kalzifizierung beobachtet und Zukowska *et al.* konnten entsprechend nachweisen, dass eine *CD73*-Deletion in Mäusen zur Entwicklung einer Aortenklappendysfunktion führt (44, 45). Zusammengefasst deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass die Adenosin-generierende Phosphatase CD73 und ihr Produkt Adenosin bei der Hemmung von ektope Kalzifizierungsprozessen eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen (44).

## 1.5 Ziele der Arbeit

Die Moleküle BGN, OPN, HAS2 und CD73 scheinen eine entscheidende Rolle bei den pathophysiologischen Vorgängen im Rahmen der Entstehung sowie dem Fortschreiten der DAVD zu spielen. Allerdings sind die vermuteten Zusammenhänge und deren zugrundeliegenden molekularen Mechanismen noch nicht im Detail verstanden. Neue Erkenntnisse sollen mithilfe einer ausreichend starken Herunterregulierung der o. g. Moleküle auf Nukleinsäure-Ebene *in vitro*, einem sog. experimentellen Gen-*knockdown*, gewonnen werden. Das methodische Verfahren, mit dem diese Herunterregulierung erreicht werden soll, beruht auf dem Prinzip der RNAi.

Zu diesem Zweck sollen ovine VICs aus den Aortenklappen von verschiedenen Spenderschafen isoliert und in ausreichender Menge kultiviert werden. Anschließend sollen die Zielzellen im Rahmen einer sog. siRNA-Transfektion mit synthetischen, *custom*-designten siRNA-Sequenzen und einem Transfektionsreagenz behandelt werden. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung von Protokollen mit dem Ergebnis einer effizienten siRNA-Transfektion und einem signifikanten siRNA-basierten Gen-*knockdown* von *BGN*, *OPN*, *HAS2* und *CD73* in ovinen VICs. Der *knockdown*-Erfolg soll anhand von Genexpressionsanalysen überprüft werden, wobei durch die mRNA-Quantifizierung des Zielgens vergleichende Rückschlüsse zu Kontrollbedingungen möglich werden. Um die erhobenen Daten zu normalisieren und verlässliche Aussagen bezüglich der Genexpression treffen zu können, ist zudem die Etablierung eines stabil exprimierten ovinen Referenzgens notwendig. Für den Fall, dass ein signifikanter Gen-*knockdown* der o. g. Moleküle gelingt, sollen weiterführende Untersuchungen auf Grundlage dieser Protokolle vorgenommen werden.



## 2 Methoden

### 2.1 Isolation und Kultivierung von valvulären Interstitialzellen

#### 2.1.1 Präparation und Zellisolation

Die Schafsherzen, aus denen die Aortenklappen präpariert und VICs isoliert wurden, stammten von dem Schlacht- und Zerlegbetrieb Laame GmbH in Wuppertal.

Sowohl die Präparation der Schafsherzen als auch die Vorbereitung der Aortenklappen und die Isolation der VICs erfolgten unter sterilen Bedingungen in der Zellkulturbank (Fotodokumentation der einzelnen Arbeitsschritte s. Abb. 3), um das Risiko einer Kontaminierung so gering wie möglich zu halten. Die Präparation der Schafsherzen begann mit dem Absetzen des *Apex cordis*, gefolgt von einem dorsalen Längsschnitt durch den linken Ventrikel ohne Verletzung der Aortenklappe. Nach dem Sichtbarwerden der Mitralklappe wurde die dorsal davon liegende Ausstrombahn, die über die Aortenklappe in die Aorta führt, mit einer Sonde verfolgt und auf diese Weise die Aortenklappe ausfindig gemacht. Die Aorta wurde nun auf Höhe einer der drei Kommissuren zwischen den Klappentaschen mit einer Schere eingeschnitten. Anschließend wurden die drei Taschen der Aortenklappe vorsichtig mit Pinzette und Skalpell, möglichst ohne die Mitnahme von Myokard, abgesetzt und in eine mit *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (DPBS) gefüllte Petrischale abgelegt. Die auf diese Weise abgetrennten Klappentaschen wurden daraufhin zu etwa 1 mm<sup>2</sup> großen Fragmenten zerkleinert. Nach Austausch des DPBS durch Nährmedium für VICs (s. 2.1.2) wurde das Gemisch aus Klappenfragmenten und Medium mit einer Pipette aufgenommen und in eine mit Gelatine beschichtete T25er-Zellkulturflasche überführt. Die fertig befüllten Kulturflaschen wurden zur gleichmäßigen Verteilung der Klappenfragmente leicht geschwenkt und im Anschluss bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

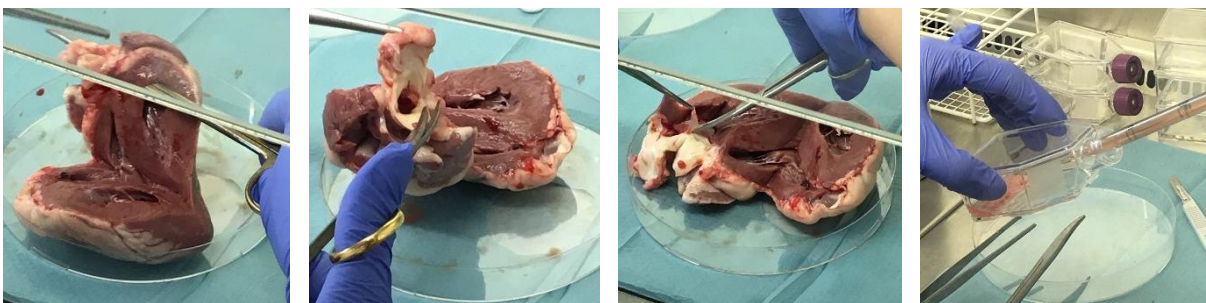


Abb. 3: **Präparation der Schafsherzen mit Entnahme der Aortenklappen.** Nach einem dorsalen Längsschnitt wurde die Ausstrombahn des linken Ventrikels bis zur Aortenklappe verfolgt und die Klappentaschen abgetrennt.

#### 2.1.2 Mediumwechsel

Sämtliche Zellkulturarbeiten fanden ausschließlich unter sterilen Bedingungen in der Zellkulturbank *HERASAFE KS* statt. Das Nährmedium für VICs (im Folgenden vereinfacht Medium genannt) bestand aus 500 ml *Dulbeccos's Modified Eagle's Medium* (DMEM, 4,5 g/l Glukose), einem standardisierten Nährmedium für Zellkulturen, 50 ml *Fetal Bovine Serum* (FBS, 10 %), 5 ml Penicillin/Streptomycin (1 %) und 5 ml *Non-Essential Amino Acid-Lösung* (1 %). Das angefertigte Medium wurde für den weiteren Gebrauch bei 4 °C gelagert.

Ein Wechsel des Mediums wurde alle zwei bis maximal drei Tage durchgeführt. Hierzu wurde das alte Medium vorsichtig abgenommen und durch frisches ersetzt (ca. 6 ml pro T25er-Zellkulturflasche, ca. 12 ml pro T75er-Zellkulturflasche).

### 2.1.3 Subkultivierung

Bei einer Konfluenz von etwa 70-80 % wurden die VICs subkultiviert bzw. passagiert. Dabei wurde stets ein Teilungsverhältnis von 1:3 eingehalten. Als Erstes wurde das verbrauchte Medium abgenommen und der Zellrasen mit DPBS gewaschen. Anschließend wurde Trypsin-Ethylendiamintetraacetat zu den Zellen gegeben, durch leichtes Schwenken der Kulturflasche gleichmäßig auf dem Zellrasen verteilt und das Ganze für max. 7 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Der Erfolg des enzymatischen Ablösungsprozesses wurde mikroskopisch kontrolliert und zügig durch die Zugabe von Medium (Verhältnis von Medium zu Trypsin mind. 2:1) inhibiert. Anschließend wurde die entstandene Zellsuspension in ein 15 ml großes Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 352 rcf zentrifugiert, sodass sich die VICs in Form eines Pellets am Boden absetzten. Nach der vorsichtigen Abnahme des Mediumüberstandes erfolgte die Resuspension des Zellpellets mit jeweils 10 ml Medium. Im Folgenden wurden die Zellen entweder zur weiteren Kultivierung in eine mit Gelatine beschichtete Zellkulturflasche überführt oder mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt und für anschließende Versuche auf 6-Well-Platten ausgesät (s. 2.1.6). Für sämtliche Experimente wurden ausschließlich Zellen der vierten und fünften Passage verwendet.

### 2.1.4 Einfrieren von Zellen (Kryokonservierung)

Überschüssige Zellen wurden eingefroren (kryokonserviert) und bis zum weiteren Gebrauch zunächst im Gefrierschrank bei -80 °C, langfristig in Flüssigstickstoff bei ca. -196 °C aufbewahrt. Analog zum Vorgehen bei der Subkultivierung von Zellen wurde das nach Zentrifugation entstandene Zellpellet in Einfriermedium resuspendiert (ca. 1 ml pro 1 Mio. Zellen bzw. pro Kryoröhrchen). Das Einfriermedium wurde aus 10 % Dimethylsulfoxid (Gefrierschutzmittel, Kryoprotektivum) in FBS hergestellt und bis zum Gebrauch auf Eis gelegt bzw. bei -20 °C gelagert.

### 2.1.5 Auftauen von Zellen

Das Auftauen von Zellen erfolgte aufgrund der Zytotoxizität des Gefrierschutzmittels Dimethylsulfoxid bei Raumtemperatur stets so zügig wie möglich. Dabei wurde zunächst alles für die anschließende Zellkultivierung vorbereitet: die benötigten Zellkulturflaschen wurden mit Gelatine beschichtet und für jedes aufzutauende Kryoröhrchen wurden 5 ml erwärmtes Medium in einem 15 ml großen Reaktionsgefäß vorgelegt. Nun wurde mehrmals ein halber Milliliter des vorgelegten Mediums auf die gefrorene Zellsuspension gegeben und blasenfrei auf- und abpipettiert, bis sich schließlich der aufgetaute Inhalt vollständig in das Reaktionsgefäß überführen ließ. Das weitere Vorgehen erfolgte analog zur Subkultivierung von VICs.

### 2.1.6 Zellzahlbestimmung

Vor jedem Versuchsansatz wurde die exakte Zellzahl mittels Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer (Hämocytometer) ermittelt. Dazu wurden die zu zählenden Zellen zunächst mithilfe von Trypsin-Ethylendiamintetraacetat vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, zentrifugiert und in 10 ml Medium resuspendiert (s. 2.1.3). Im Anschluss wurde ein Aliquot von 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl einer 0,4 %igen Trypanblau-Lösung in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vermischt (Verdünnungsfaktor 2). Ausgezählt wurden die Zellen in der Neubauer-Zählkammer, einer flachen Glaskammer mit einer Tiefe von 0,1 mm und zwei in die Grundfläche eingravierten Zählgittern aus 3 × 3 Großquadraten von je 1 mm<sup>2</sup> Fläche. Nach Anbringen des Deckglases auf die befeuchtete Kammer wurden jeweils 10 µl der gefärbten und durchmischten Zellsuspension auf beide Seiten der Zählkammer pipettiert, wobei Kapillarkräfte eine gleichmäßige Verteilung in dem Raum zwischen Grundplatte und Deckglas bewirken. Nach mikroskopischer Auszählung der insgesamt acht Eckquadrate bei 10-facher Vergrößerung wurde mithilfe des bekannten Kammervolumens von 0,1 µl und des bekannten Verdünnungsfaktors die Zellzahl pro Volumeneinheit (ml) bestimmt. Ausgehend von diesem Wert ließen sich nun sämtliche Volumina berechnen, in der sich eine gewünschte Zellzahl befand. Das entsprechende Volumen der Zellsuspension wurde anschließend für weitere Versuche in eine vorbereitete 6-Well-Platte pipettiert.

Berechnung der Gesamtzellzahl:

Summe der Zellen aller 8 Eckquadrate ÷ 8 = Mittelwert der Zellzahl/Eckquadrat

Mittelwert der Zellzahl/Eckquadrat × 10<sup>4</sup> × 2 (Verdünnungsfaktor) = Zellzahl/ml

gewünschte Zellzahl ÷ Zellzahl/ml = Volumen in ml, in dem die gewünschte Zellzahl gelöst ist

### 2.1.7 Zellstimulation mit β-Glycerolphosphat und Kalziumchlorid

Zur Simulierung von kalzifizierenden Bedingungen *in vitro* wurden die auf 6-Well-Platten ausgesäten und für 30 Stunden kultivierten VICs mit β-Glycerolphosphat und Kalziumchlorid behandelt. Sechs Stunden zuvor erfolgte die Transfektion der Zellen mit siRNA-Sequenzen für *BGN* bzw. *OPN* gemäß dem entsprechenden Protokoll (s. 2.2.2). Es wurden 3,061 g β-Glycerolphosphat (1 M) und 1,665 g Kalziumchlorid (1,5 M) in jeweils 10 ml sterilem Wasser gelöst und in einer 1:100- bzw. 1:1.000-Verdünnung mit Medium eingesetzt (s. 3.4). Zur Zellstimulation wurde das Transfektionsmedium jeweils in den Wells belassen und das mit β-Glycerolphosphat (Endkonzentration 10 mM) und Kalziumchlorid (Endkonzentration 1,5 mM) angereicherte Medium im Verhältnis 1:1 dazugegeben.

## 2.2 Transfektion mit *custom*-designten siRNA-Sequenzen

### 2.2.1 siRNA-Design

Der erste Schritt des experimentellen *Gen-knockdowns* von *BGN*, *OPN*, *HAS2* und *CD73* bestand in der Herstellung von spezifischen, zur Ziel-mRNA komplementären siRNA-Sequenzen. Da ovine siRNA-Sequenzen der vier o. g. Gene nicht kommerziell erhältlich waren, mussten diese zunächst *custom*-designt werden. Für das Zielgen *HAS2* war zu Beginn der experimentellen Arbeit keine ovine Sequenz verfügbar, sodass stattdessen zunächst auf eine bovine Sequenz ausgewichen werden musste.

Der Designprozess erfolgte durch die Firma *Qiagen*<sup>R</sup> mithilfe der Software „*Configure & Order HP Custom siRNA*“. Anhand der benötigten Informationen „Name der siRNA“ und „Ziel-DNA-Sequenz“ wurden die entsprechenden siRNA-Doppelstränge von *Qiagen*<sup>R</sup> konfiguriert, synthetisiert und als 20 nmol-Lypholisat mit *High-Performance-Purity* (HPP) geliefert (siRNA-Sequenzen s. 3.6). Die Design-Software von *Qiagen*<sup>R</sup> nutzt den „*HiPerformance siRNA Design Algorithm*“, der von *Novartis Pharma AG* entwickelt wurde. Der Algorithmus basiert auf den allgemein anerkannten Richtlinien für optimales siRNA-Design und den als sog. „Tuschl-Regeln“ bekannten, von Elbashir *et al.* erarbeiteten Kriterien (10, 46, 47). Darüber hinaus werden zusätzliche Parameter wie Schmelztemperatur und bevorzugte Basenpositionen innerhalb der siRNA-Sequenz berücksichtigt. Der Anbieter weist jedoch explizit darauf hin, dass keine Garantie für die Funktionalität der auf diese Weise *custom*-designten siRNA-Sequenzen besteht. Im Folgenden sind die „Tuschl-Regeln“ (10, 46, 47) sowie einige der Standard-Kriterien für siRNA-Design (9) zusammenfassend aufgeführt:

- Die Nukleotidsequenz des zu regulierenden Gens muss zwingend bekannt sein.
- Man sucht nach einer Sequenz, die 23 Nukleotide lang ist und das Motiv 5'-AA(N<sub>19</sub>)UU enthält. Alternativ sind auch die Motive 5'-AA(N<sub>21</sub>) oder 5'-NA(N<sub>21</sub>) möglich (A: Adenin, U: Uracil, N: Nukleotid).
- Die mRNA-Zielsequenz sollte frühestens 50-100 Nukleotide nach dem Startcodon beginnen und spätestens 50-100 Nukleotide vor dem Stopcodon enden.
- Die siRNA-Sequenz sollte eine Länge von ca. 21 Nukleotiden besitzen.
- Intron-Regionen, Exon-Exon-Grenzen sowie Abfolgen von vier oder mehr gleichen Basen, insbesondere GGGG oder CCCC, sind zu vermeiden (G: Guanin, C: Cytosin).
- Wiederholungen, Sequenzen von geringer Komplexität sowie Einzelnukleotid-Polymorphismus sind zu vermeiden.
- Der Guanin-Cytosin-Gehalt der Zielsequenz sollte zwischen 30-60 % (im Idealfall etwa 50 %) betragen.
- Eine Negativkontrolle im Sinne von unspezifisch bindenden siRNA-Sequenzen ist zwingend erforderlich. Diese sollte in etwa die gleiche Länge und Nukleotid-Zusammensetzung wie die siRNA-Sequenzen bei mind. vier bis fünf Basen-Abweichungen besitzen.

Im Anschluss an den Designprozess der siRNA-Sequenzen erfolgte die Überprüfung der Spezifität für das jeweilige Ziel-Gen mithilfe der Software von „*NCBI BLAST – Global Alignment*“ (BLAST = engl. *Basic Local Alignment Search Tool*). Die von *Qiagen*<sup>R</sup> designten siRNA-Sequenzen wurden mittels BLAST-Algorithmus mit der gesamten genomischen Sequenz der Spezies *Ovis aries* aus Datenbanken verglichen. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass die einzelnen siRNA-Sequenzen ihre jeweilige Ziel-mRNA so spezifisch wie möglich erkennen würden, ohne an weitere Nukleotid-Sequenzen zu binden und dementsprechend unerwünschte Gene herunterzuregulieren.

Neben den *custom*-designten siRNA-Sequenzen wurden validierte Positiv- und Negativkontrollen benötigt. *MAPK1* (*mitogen-activated protein kinase 1*) wurde von *Qiagen*<sup>R</sup> als Positivkontrolle empfohlen,

da diese laut Anbieter mittlerweile standardmäßig bei Transfektionen mit nicht *custom*-designten siRNA-Sequenzen verwendet wird. Eine Positivkontrolle diene als interne Absicherung, um den experimentellen Ablauf als fehlerfrei und die Ergebnisse als verlässlich einschätzen zu können. Als Negativkontrolle wurde *AllStars Negative Control siRNA* (im Folgenden vereinfacht *AllStars* genannt) von *Qiagen*<sup>R</sup> verwendet, ein Gemisch aus unspezifischen siRNA-Sequenzen, die im Idealfall an keinen mRNA-Abschnitt binden (1). Laut *Qiagen*<sup>R</sup> handelt es sich dabei um die am gründlichsten getestete und validierteste Negativkontrolle für siRNA-Transfektionen. Eine Negativkontrolle wurde benötigt, um unspezifische Veränderungen in der Genexpression aufzudecken.

### 2.2.2 Lipidvermittelte siRNA-Transfektion von ovinen valvulären Interstitialzellen

Die *custom*-designten und synthetisch hergestellten siRNA-Sequenzen wurden in einem zweiten Schritt in die VICs eingebracht (s. Abb. 4). In der vorliegenden Arbeit wurde das Prinzip der lipidvermittelten siRNA-Transfektion angewandt, bei der ein Transfektionsreagenz zur Einschleusung der siRNA in die Zielzellen dient (1). Die siRNA-Sequenzen für *BGN*, *OPN*, *HAS2*, *CD73* und *MAPK1* wurden von *Qiagen*<sup>R</sup> hergestellt, als 20 nmol-Lypholisat (*AllStars* 5 nmol) geliefert und auf eine 20 µM-Stocklösung ( $\cong 0,25 \mu\text{g}$  siRNA pro µl) gebracht.

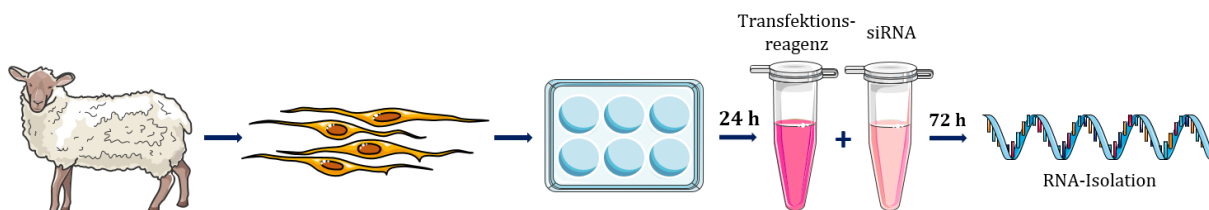


Abb. 4: **Schematische Darstellung eines Versuchsablaufs zur siRNA-Transfektion von ovinen VICs.** Ovine VICs wurden isoliert, auf 6-Well-Platten ausgesät und für 24 Stunden in Zellkulturmedium (4,5 g/l DMEM, 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit *custom*-designten siRNA-Sequenzen und einem Transfektionsreagenz behandelt. Nach 72 Stunden Inkubation erfolgte die Überprüfung des knockdown-Erfolges mittels qRT-PCR.

#### *Lipofectamine*<sup>R</sup> 2000 Transfection Reagent

Für die ersten Versuchsdurchläufe wurde das Transfektionsreagenz *Lipofectamine*<sup>R</sup> 2000 Transfection Reagent (im Folgenden vereinfacht *Lipofectamine* genannt) von *ThermoFisher Scientific Inc.* verwendet. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden in Orientierung an das „*Lipofectamine*<sup>R</sup> 2000 DNA Transfection Reagent Protocol“ des Herstellers ausgeführt. Am Tag vor der Transfektion wurden jeweils 250.000 VICs pro Well auf 6-Well-Platten ausgesät und für 24 Stunden in 2 ml Medium bis zu einer ca. 80 %igen Konfluenz inkubiert. Vor der eigentlichen Transfektion wurden vorbereitend sowohl das Transfektionsreagenz *Lipofectamine* als auch die jeweiligen siRNA-Sequenzen in Serum- und Antibiotika-freiem Medium gelöst. Der *Lipofectamine*-Lösungsansatz wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das verbrauchte Medium der am Vortag auf 6-Well-Platten ausgesäten VICs abgenommen und durch 1 ml frisches Medium (Serum- und Antibiotika-haltig) ersetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden der *Lipofectamine*- und der siRNA-Lösungsansatz im Verhältnis 1:1 zusammengebracht und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde der siRNA-

Liposom-Komplexansatz direkt zu den entsprechenden Wells pipettiert. Für die Wells „Kontrolle *Lipofectamine*“ und „unbehandelt“ wurden die entsprechenden Volumina der siRNA- und *Lipofectamine*-Lösungsansätze durch Medium ersetzt. Auf diese Weise befand sich am Ende der Transfektion in allen Wells dasselbe Volumen. Die transfizierten Zellen wurden bis zur RNA-Isolation für 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Abb. 5 zeigt beispielhaft eine Plattenbelegung mit den unterschiedlichen Behandlungsbedingungen.

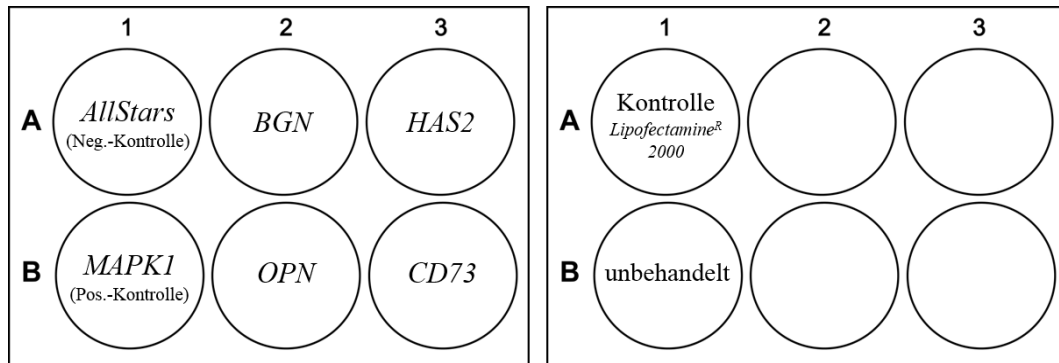


Abb. 5: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Behandlungsbedingungen bei einer siRNA-Transfektion mit *Lipofectamine* in 6-Well-Platten. *AllStars*: *AllStars Negative Control siRNA*, *MAPK1*: *mitogen-activated protein kinase 1*, *BGN*: *Biglykan*, *OPN*: *Osteopontin*, *HAS2*: *Hyaluronsäure-Synthase-2*, *CD73*: *Ekto-5'-Nukleotidase*.

Analog zu diesem Vorgehen wurden insgesamt vier verschiedene Protokolle mit dem Transfektionsreagenz *Lipofectamine* durchgeführt, wobei die jeweils verwendeten Mengen an siRNA und Transfektionsreagenz der untenstehenden Tabelle 1 zu entnehmen sind. Laut Hersteller variiert die empfohlene siRNA-Menge zwischen 2,5 µg und 3 µg pro Well; die empfohlene Menge an *Lipofectamine* wird mit 5 µl bis 12,5 µl pro Well (bei Verwendung von 6-Well-Platten) angegeben.

	1. Protokoll	2. Protokoll	3. Protokoll	4. Protokoll
<b>Zellzahl</b>	250.000 (in 1 ml Voll-Medium)	250.000 (in 1 ml Voll-Medium)	250.000 (in 1 ml Voll-Medium)	250.000 (in 1 ml Voll-Medium)
<b>Serum-freies Medium (Lösung <i>Lipofectamine</i>)</b>	125 µl	125 µl	125 µl	119 µl
<b><i>Lipofectamine</i></b>	6 µl	6 µl	6 µl	12 µl
<b>Serum-freies Medium (Lösung siRNA)</b>	125 µl	125 µl	119 µl	119 µl
<b>siRNA</b>	0,375 µg (6 µl aus 5 µM-Stock)	1,5 µg (6 µl aus 20 µM-Stock)	3 µg (12 µl aus 20 µM-Stock)	3 µg (12 µl aus 20 µM-Stock)
<b>Ansatz</b>	262 µl	262 µl	262 µl	262 µl

Tabelle 1: Versuchsansätze mit *Lipofectamine*. Alle Mengenangaben pro Well.

### *HiPerFect Transfection Reagent*

In weiteren RNAi-Experimenten wurde mit dem Transfektionsreagenz *HiPerFect Transfection Reagent* (im Folgenden vereinfacht *HiPerFect* genannt) von *Qiagen*<sup>R</sup> gearbeitet. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden in Orientierung an das „*HiPerFect Transfection Reagent Handbook*“ von *Qiagen*<sup>R</sup> ausgeführt, mit Berücksichtigung sowohl des Protokolls für adhärenente Zellen als auch für primäre Fibroblasten. Am Tag vor der Transfektion wurden jeweils 250.000 Zellen pro Well auf 6-Well-Platten ausgesät und für 24 Stunden in 2 ml Medium bis zu einer ca. 80 %igen Konfluenz inkubiert. Kurz vor der Transfektion wurden die siRNA-Sequenzen in Serum- und Antibiotika-freiem Medium gelöst. Anschließend wurde das Transfektionsreagenz *HiPerFect* direkt zu den einzelnen siRNA-Lösungsansätzen pipettiert und die Ansätze für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das verbrauchte Medium der zu transfizierenden, am Vortag auf 6-Well-Platten ausgesäten Zellen abgenommen und durch 2 ml Medium (Serum- und Antibiotika-haltig) ersetzt. Im Anschluss wurde der siRNA-Liposom-Komplexansatz direkt zu den entsprechenden Wells pipettiert. Für die Wells „Kontrolle *HiPerFect*“ und „unbehandelt“ wurden die Volumina der siRNA und *HiPerFect*-Lösungsansätze durch Medium ersetzt, um das Gesamtvolumen in allen Wells identisch zu halten. Nach 72 Stunden Inkubation im Brutschrank erfolgte die RNA-Isolation für anschließende qRT-PCR-Analysen.

Insgesamt wurden drei Protokolle mit dem Transfektionsreagenz *HiPerFect* analog zu dem oben beschriebenen Vorgehen durchgeführt. Die jeweils verwendeten Mengen an siRNA und *HiPerFect* sind in Tabelle 2 aufgeführt. Laut Hersteller variiert die empfohlene siRNA-Menge zwischen 0,03 µg (1 nM) und 0,9 µg (30 nM) pro Well; die empfohlene Menge an *HiPerFect* wird mit 6 µl bis 18 µl pro Well (bei Verwendung von 6-Well-Platten) angegeben.

	<b>5. Protokoll</b>	<b>6. Protokoll</b>	<b>7. Protokoll</b>
<b>Zellzahl</b>	250.000 (in 2 ml Voll-Medium)	250.000 (in 2 ml Voll-Medium)	250.000 (in 2 ml Voll-Medium)
<b>Serum-freies Medium (Lösung siRNA)</b>	100 µl	100 µl	100 µl
<b>siRNA</b>	0,3 µg (10 nM) (1,2 µl aus 20 µM-Stock)	0,9 µg (30 nM) (3,6 µl aus 20 µM-Stock)	2,5 µg (83,3 nM) (10 µl aus 20 µM-Stock)
<b><i>HiPerFect</i></b>	12 µl	12 µl	12 µl
<b>Ansatz</b>	113,2 µl	115,6 µl	122 µl

Tabelle 2: *Versuchsansätze mit HiPerFect*. Alle Mengenangaben pro Well.

## 2.3 Genexpressionsanalyse

### 2.3.1 Primerdesign

Der Designprozess von Primerpaaren für qRT-PCR-Analysen wurde in Anlehnung an ein laboreigenes Protokoll durchgeführt. Die Primer wurden benötigt, um auf den beiden Einzelsträngen des zu amplifizierenden Gen-Abschnitts jeweils den Startpunkt für die Synthese der komplementären Desoxyribonukleinsäure (cDNA) festzulegen. In der vorliegenden Arbeit wurden Primersequenzen für *BGN*, *OPN*,

*HAS2*, *CD73* und *MAPK1* sowie für zwölf potenzielle Referenzgene designt und im Anschluss bei *Eurofins Genomics* bestellt (Primersequenzen s. 3.7).

Zunächst wurden dazu auf der Website des „*National Center for Biotechnology Information*“ (NCBI) die genomische und die mRNA-Sequenz des gewünschten Gens herausgesucht, wobei auf die Speziesbezeichnung „*ovis*“ zu achten war. Nun wurde mithilfe der Software von „*NCBI BLAST – Global Alignment*“ die entsprechende mRNA-Sequenz mit Sequenzen aus Datenbanken verglichen, um Ähnlichkeiten zu ermitteln (6). Das Ziel dieses Abgleichs war die Identifikation der Exongrenzen, da die mRNA im Gegensatz zur genomischen DNA nach dem posttranskriptionalen Splicing keine Introns mehr enthält. Dabei wurde die Position des letzten gemeinsamen Nukleotids jedes Exons notiert. Die Kenntnis der Exongrenzen war deshalb von Bedeutung, damit das Primerpaar Exon-übergreifend (d. h. mindestens ein Intron flankierend) erstellt werden konnte. Auf diese Weise sollte eine versehentliche Amplifikation von genomischer DNA, die oft durch Verunreinigung in die Probe gelangt, während der qRT-PCR verhindert werden. Im Anschluss daran wurden die Primersequenzen mit der *Primer3Plus-Software* (benötigte Informationen waren „mRNA-Sequenz“ und „Exongrenze 2“) erstellt, wobei die Rahmenbedingungen wie folgt aussahen:

- Produktgröße: 70-120 Basenpaare
- Primergröße: mind. 18, optimal 60, max. 27 Basenpaare
- Schmelztemperatur: mind. 59, optimal 60, max. 61 °C
- Guanin-Cytosin-Gehalt: mind. 20, optimal 55, max. 80 %

Von der Software wurden nun pro Exongrenze mehrere Primerpaare ermittelt, die hinsichtlich ihrer Qualität in Bezug auf die o. g. Rahmenbedingungen und Bewertungen überprüft werden mussten. Zunächst galt es zu beachten, dass die Primersequenzen nicht mehr als vier Einzelbasen- bzw. Dinukleotid-Wiederholungen enthielten sowie dass die Nukleinbasen Guanin und Cytosin nicht öfter als dreimal in den letzten fünf Basen vorkamen. Weiterhin wurde sichergestellt, dass *forward*- und *reverse*-Primer eine ähnliche Schmelztemperatur und eine geringe Tendenz zur Paarung besaßen. Nachdem schließlich ein geeignetes Primerpaar ausgewählt wurde, erfolgte in einem nächsten Schritt die Überprüfung der Spezifität durch die *Primer-Blast-Software* von NCBI. Hierbei wurde das entsprechende Primerpaar mit dem gesamten Genom der Spezies *Ovis aries* aus Datenbanken verglichen, um eine unspezifische Bindung an andere Nukleotid-Sequenzen als die des Zielgens und damit eine Amplifikation unerwünschter Genprodukte auszuschließen. Fehlprodukte mit mehr als 1.000 Basenpaaren wurden aufgrund der begrenzten Polymeraseaktivität vernachlässigt, während bei potenziell amplifizierten Fehlprodukten unter 1.000 Basenpaaren die Primersuche wiederholt werden musste. Letztendlich wurden die tatsächliche Spezifität und Effizienz der ausgewählten Primer im Rahmen einer Test-qRT-PCR eingeschätzt.

### 2.3.2 RNA-Isolation

Das Ziel der im Folgenden beschriebenen RNA-Isolation war es, aus den zuvor auf 6-Well-Platten kultivierten und transfizierten VICs die enthaltene RNA zu gewinnen, um anschließend den potenziellen Erfolg des siRNA-basierten Gen-*knockdowns* mittels qRT-PCR-Analysen überprüfen zu können. Dazu



wurden vorbereitend *DNA Digest Buffer* (70 µl pro Well) und *RNase-Free DNase* (10 µl pro Well) vermischt und bis zum weiteren Gebrauch auf Eis gestellt. Die Zentrifuge wurde auf 21 °C, 1 min und 10.621 rcf eingestellt. Alle darüber hinaus benötigten Puffer und Verbrauchsmaterialien entstammten dem *RNeasy<sup>R</sup> Mini Kit* von *Qiagen<sup>R</sup>*, das den Herstellerangaben entsprechend verwendet wurde. Als Erstes wurden die Wells vom Überstand befreit und zweimal mit DPBS gewaschen, bevor in jedes Well 350 µl *RLT Lysis Buffer* (versetzt mit 20 µl DL-Dithiothreitol pro ml) pipettiert wurden. Die entstandene dickflüssige Masse wurde mit einem Zellschaber vom Boden der Wells gekratzt, gesammelt und auf jeweils einen *QIAshredder* pipettiert. Die *QIAshredder* wurden zentrifugiert, die Einsätze verworfen und dem Durchfluss jeweils 350 µl 70 %iges Ethanol hinzugefügt. Das durch Auf- und Abpipettieren homogenisierte Gemisch wurde anschließend auf jeweils eine *RNeasy Mini Spin Column* gegeben und erneut zentrifugiert. Der Durchfluss wurde nach den im Folgenden aufgeführten Zentrifugationsvorgängen stets verworfen. In einem nächsten Schritt wurden auf jede Säule 350 µl *RWI Wash Buffer* pipettiert und das Ganze ein weiteres Mal zentrifugiert. Zur DNA-Eliminierung wurden 75 µl des im Vorfeld hergestellten Gemischs aus *DNA Digest Buffer* und *RNase-Free DNase* direkt auf die Membran jeder Säule pipettiert und die Ansätze für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden nacheinander jeweils 350 µl des *RWI Wash Buffers* und zweimal jeweils 350 µl des *RPE Wash Buffers* hinzupipettiert und die Säulen wie gewohnt nach jeder Puffer-Zugabe zentrifugiert. Im letzten Schritt wurden die Einsätze der *RNeasy Mini Spin Columns* in 2 ml-*Collection Tubes* überführt und die Membran durch eine weitere Zentrifugation getrocknet. Daraufhin wurden dieselben Einsätze in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße eingesetzt und direkt auf jede Membran 30 µl RNase-freies Wasser pipettiert, um die RNA von der Säule zu eluieren. Nach einem letzten Zentrifugationsvorgang wurde der Durchfluss bei -80 °C eingefroren.

### 2.3.3 Konzentrationsmessung von RNA

Bevor die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben werden konnte, musste diese zunächst in ng/µl quantifiziert werden. Dies wurde am *Tecan Reader, infinite M1000 PRO*, durchgeführt. Der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm diente als Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren und beträgt für RNA in der Regel  $\geq 2$ .

### 2.3.4 cDNA-Synthese mittels reverser Transkription

Sämtliche für die Transkription von RNA in cDNA benötigte Materialien stammten aus dem *Quantitect<sup>R</sup> Reverse Transcription Kit* von *Qiagen<sup>R</sup>*, das den Herstellerangaben entsprechend verwendet wurde. Zunächst wurde mithilfe der im Voraus durchgeführten RNA-Quantifizierung das Probenvolumen mit der gewünschten Menge an umzuschreibender RNA bestimmt (je nach gemessener RNA-Konzentration 100 ng, 250 ng, 500 ng oder 1.000 ng). Zu dem entsprechenden Probenvolumen wurden jeweils 2 µl *gDNA Wipeout Buffer* gegeben, das Gesamtvolumen mit RNase-freiem Wasser auf 14 µl ergänzt und der Ansatz für 2 min bei 42 °C im Thermocycler inkubiert. Im Anschluss wurden jeweils 4 µl *Quantiscript<sup>R</sup> RT Buffer*, 1 µl *RT Primer Mix* und 1 µl *Quantiscript<sup>R</sup> Reverse Transcriptase* zu jeder

Probe hinzugefügt, sodass sich schließlich in jedem Ansatz ein Endvolumen von 20  $\mu\text{l}$  befand (s. Tabelle 3). Das Ganze wurde erneut im Thermocycler für 30 min bei 42 °C und für weitere 3 min bei 95 °C inkubiert, bevor das fertige cDNA-Produkt bei -20 °C eingefroren wurde.

Reagenz	Volumen pro Probe [ $\mu\text{l}$ ]
Probe	x
RNase-freies Wasser	12 - x
<i>gDNA Wipeout Buffer</i>	2
<i>RT Buffer</i>	4
<i>RT Primer Mix</i>	1
Reverse Transkriptase	1
Endvolumen	20

Tabelle 3: Zusammenstellung der Volumina zur Synthese von cDNA. Volumen in  $\mu\text{l}$  pro Probe.

### 2.3.5 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Die qRT-PCR dient der Vervielfältigung von DNA-Sequenzen und damit der Analyse der Genexpressionslevel. Zusätzlich zur Standard-PCR-Methode ermöglicht die qRT-PCR eine Quantifizierung der amplifizierten DNA nach jedem Zyklus. Dies geschieht durch Messung der Fluoreszenzintensität des im *GoTaq<sup>R</sup> qPCR Master Mix* enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffes *SYBR-Green*, welcher mit den gebildeten DNA-Doppelsträngen unspezifisch interkaliert. Da sich die gemessene Fluoreszenz proportional zur Produktmenge verhält, kann rückschließend eine Aussage über die ursprüngliche DNA-Menge in der Probe getroffen werden.

Zunächst wurde jeweils 1 ml des *GoTaq<sup>R</sup> qPCR Master Mix* von *Promega* mit 10  $\mu\text{l}$  *CXR Reference Dye* (30  $\mu\text{M}$ ), einem fluoreszierenden Referenzfarbstoff, versetzt. Dieser ermöglicht eine Abgleichung möglicher Fluoreszenzunterschiede, die aufgrund von unterschiedlichen Volumina in den einzelnen Reaktionsgefäßen entstehen. Für den Fall, dass im Voraus mehr als 100 ng RNA pro Probe in cDNA umgeschrieben wurden, musste das cDNA-Produkt mit RNase-freiem Wasser zunächst auf 5 ng/ $\mu\text{l}$  verdünnt werden. Außerdem wurde die Primer-Stocklösung (100 pmol/ $\mu\text{l}$ ) mit RNase-freiem Wasser auf eine 10 pmol-Arbeitslösung gebracht. Schließlich wurde ein *Master-Mix* entweder für jede cDNA-Probe oder für jeden Primer angesetzt (Volumen pro Well s. Tabelle 4). Die Kontrolle wurde analog zum *Master-Mix* hergestellt, wobei die fehlende cDNA durch 2  $\mu\text{l}$  RNase-freies Wasser ersetzt wurde. Jede Probe wurde in Doppelbestimmung auf 96-Well-Platten pipettiert, das Gesamtvolumen pro Well betrug am Ende 20  $\mu\text{l}$ . Abschließend wurde die Platte mit Folie abgedichtet und in das *StepOnePlus, Real Time PCR System*, eingelegt.

Reagenz	Volumen pro Well [ $\mu$ l]
cDNA (5 ng/ $\mu$ l)	2
<b>GoTaq<sup>R</sup> qPCR Master Mix</b> (versetzt mit 10 $\mu$ l CXR Reference Dye pro ml)	10
<b>RNase-freies Wasser</b>	7,4
<b>Primer forward</b> (10 pmol/ $\mu$ l)	0,3
<b>Primer reverse</b> (10 pmol/ $\mu$ l)	0,3
<b>Total</b>	20

Tabelle 4: Zusammenstellung der qRT-PCR-Proben. Volumen in  $\mu$ l pro Well.

Das Standard-Programm von *StepOnePlus* benötigt ca. zwei Stunden bis zur Fertigstellung (detaillierter Programmablauf s. Tabelle 5). Während der initialen Denaturierung bei 95 °C werden die cDNA-Doppelstränge aufgetrennt, die anschließende Primer-Hybridisierung bei 60 °C dient der Anlagerung der Oligonukleotidprimer an die Einzelstränge der cDNA (48). Während der darauffolgenden Elongation synthetisiert die thermostabile DNA-Polymerase ausgehend von den angelagerten Primern den Komplementärstrang der jeweiligen cDNA-Einzelstränge, sodass am Ende eines Elongationsschrittes nahezu die doppelte DNA-Menge vorliegt (48). Insgesamt wiederholt sich dieser Ablauf 40-mal, bevor die Reaktion schließlich auf 4 °C gekühlt wird (48).

	Zeit [s]	Temperatur [°C]
<b> Holding Stage:</b>		
<b>Initiale Denaturierung</b>	120	95
<b> Cycling Stage (40 Zyklen):</b>		
<b>Denaturierung</b>	15	95
<b>Hybridisierung/Elongation</b>	60	60
<b> Melt Curve Stage:</b>		
<b>Schmelzkurven-Analyse</b>	15	95
	60	60
	15	95
<b> Kühlung</b>	bis Entnahme	4

Tabelle 5: Übersicht des Programmablaufs von *StepOnePlus*. Zeit in Sekunden, Temperatur in Grad Celcius.

Zur Auswertung der qRT-PCR-Ergebnisse wurde die *Delta Delta Cycle Threshold*-( $\Delta\Delta C_T$ )-Methode angewandt, die eine relative Quantifizierung des amplifizierten Genproduktes vornimmt. Es wurde also die Menge an Amplifikat in einer behandelten Probe mit der Menge an Amplifikat in einer unbehandelten Probe ins Verhältnis gesetzt, nachdem von den  $C_T$ -Werten beider Proben der  $C_T$ -Wert der endogenen Kontrolle (Referenzgen) abgezogen wurde. Der  $C_T$ -Wert als Schnittpunkt zwischen der Fluoreszenz und

dem Schwellenwert gibt diejenige Zyklenanzahl an, ab dem die exponentielle Phase der Gen-Amplifikation beginnt. Als endogene Kontrolle diente das Referenzgen *RPL29* (s. 4.1), welches für jede Probe mitbestimmt wurde. Die mit spezifischen siRNA-Sequenzen behandelten Proben, die ausschließlich mit Transfektionsreagenz behandelten Proben (Kontrolle *Lipofectamine* bzw. Kontrolle *HiPerFect*), die Kontrolle „unbehandelt“ sowie die Negativkontrolle *AllStars* wurden im Rahmen der qRT-PCR-Analysen gegen den Primer des entsprechenden Gens aufgetragen und die  $C_T$ -Werte im Anschluss auf das Referenzgen normiert:

$$\Delta C_T = (M C_T \text{ Gen} - M C_T \text{ RPL29})$$

Die  $\Delta C_T$ -Werte aller Proben wurden wiederum vom  $\Delta C_T$ -Wert der internen Kontrolle „unbehandelt“ abgezogen ( $\Delta \Delta C_T$ -Wert) und schließlich der relative Expressionsunterschied bestimmt:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta \Delta C_T \text{-Wert}}$$

Der berechnete Wert gibt letztendlich eine Erhöhung bzw. Verminderung der Genexpression wieder, wobei Werte unter 1 eine verminderte Expression und Werte über 1 eine verstärkte Expression bedeuten.

#### 2.4 Kalzium-Assay

Das Kalzium-Assay wurde zur Messung der Konzentration freier Kalziumionen in mg/dl eingesetzt. Dabei wurden zunächst VICs auf 6-Well-Platten ausgesät und 24 Stunden später gemäß dem entsprechenden Protokoll mit siRNA-Sequenzen für *BGN* bzw. *OPN* transfiziert (s. 2.2.2). Sechs Stunden nach siRNA-Transfektion wurde die Hälfte der Wells mit  $\beta$ -Glycerolphosphat (10 mM) und Kalziumchlorid (1,5 mM) behandelt, um *in vitro* kalzifizierende Bedingungen nachzuahmen (s. 2.1.7). Abb. 6 zeigt beispielhaft eine Plattenbelegung mit den unterschiedlichen Behandlungsbedingungen.

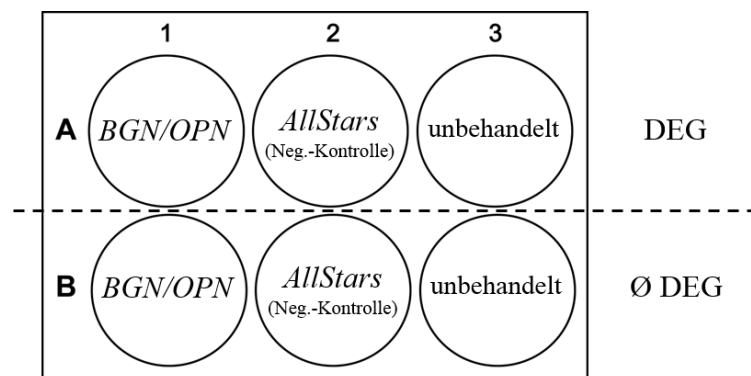


Abb. 6: Schematische Darstellung der Plattenbelegung bei einer Transfektion mit siRNA-Sequenzen für *BGN* bzw. *OPN* und *in vitro* kalzifizierenden Bedingungen. *BGN*: Biglykan, *OPN*: Osteopontin, *AllStars*: *AllStars* Negative Control siRNA, *DEG*: degenerierendes Zellkulturmedium angereichert mit  $\beta$ -Glycerolphosphat und Kalziumchlorid.

72 Stunden nach siRNA-Transfektion wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit DPBS gewaschen sowie mit 80  $\mu$ l TRIS-HCl-Puffer pro Well lysiert und abgekratzt. Nach Lagerung bei  $-80^\circ\text{C}$  erfolgte die Zelllyse bei  $4^\circ\text{C}$  unter Rotation für zwei Stunden sowie eine anschließende Zentrifugation bei 17.949 *ref* und  $4^\circ\text{C}$  für 15 min. Mithilfe des *Calcium Assay Kits* von *Abnova<sup>R</sup> Corporation* wurde

aus den Überständen eine Messung der Kalziumkonzentration durchgeführt. Hierfür wurde eine Standardreihe aus dem Kalzium-Standard (20 mg/dl  $\text{Ca}^{2+}$ ) und TRIS-HCl-Puffer in entsprechenden Verhältnissen angefertigt (s. Tabelle 6). Die Arbeitslösung wurde aus Reagenz A und Reagenz B im Verhältnis 1:1 hergestellt, anschließend wurden 200  $\mu\text{l}$  dieser Lösung pro Well in eine 96-Well-Platte überführt. Sowohl die Standardlösungen (5  $\mu\text{l}$  pro Well) als auch die Proben (10  $\mu\text{l}$  pro Well, Verdünnungsfaktor 0,5) wurden jeweils in Doppelbestimmung zur Arbeitslösung pipettiert. Der fertige Ansatz wurde für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und im *Tecan Reader* bei einer maximalen Extinktion von 612 nm gemessen. Der im Kit enthaltene Phenolsulphonephthalein-Farbstoff bildet einen stabilen Komplex mit freien Kalziumionen, sodass die gemessene Farbintensität direkt proportional zur Kalziumkonzentration in der Probe ist.

$\text{Ca}^{2+}$ [mg/dl]	Kalzium-Standard [ $\mu\text{l}$ ]	TRIS-HCl [ $\mu\text{l}$ ]
0	0	25
2	2,5	22,5
4	5	20
6	7,5	17,5
8	10	15
12	15	10
16	20	5
20	25	0

Tabelle 6: Mengenangaben von Kalzium-Standard und TRIS-HCl-Puffer zur Herstellung einer Standardreihe für ein Kalzium-Assay. Kalziumkonzentration in mg/dl, Volumen in  $\mu\text{l}$ .

## 2.5 Bicinchoninsäure-Protein-Assay

Für die quantitative Proteinbestimmung aus Zelllysaten wurde das Bicinchoninsäure-(BCA-)Assay von *Sigma-Aldrich*<sup>R</sup> (*Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination*) bzw. *ThermoFisher Scientific Inc.* (*Pierce*<sup>TM</sup> *BCA Protein Assay Kit*) jeweils entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Auf diese Weise wurde die mittels Kalzium-Assay gemessene Kalziumkonzentration normalisiert, d. h. mit der jeweiligen Proteinkonzentration ins Verhältnis gesetzt. Zur Herstellung einer Standardreihe mit 0/0,125/0,25/0,5/1/2 mg Protein pro ml wurde die entsprechende Menge an bovinem Serumalbumin in TRIS-HCl-Puffer gelöst. Die Arbeitslösung wurde aus Kupfer(II)-sulfat-Lösung und Bicinchoninsäure-Lösung im Verhältnis 1:40 (*Sigma-Aldrich*<sup>R</sup>) bzw. 1:51 (*ThermoFisher Scientific Inc.*) hergestellt, anschließend wurden 100  $\mu\text{l}$  dieser Lösung pro Well in eine 96-Well-Platte überführt. Die Standardlösungen (4  $\mu\text{l}$  pro Well) und die Proben (2  $\mu\text{l}$  pro Well, Verdünnungsfaktor 2) wurden jeweils in Doppelbestimmung zur Arbeitslösung pipettiert. Der fertige Ansatz wurde für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und im *Tecan Reader* bei einer maximalen Extinktion von 562 nm gemessen. Das Prinzip des Assays beruht auf einer Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{+}$ , welches mit Bicinchoninsäure einen photometrisch messbaren Farbkomplex bildet.

## 2.6 Statistische Auswertung

Alle Berechnungen und statistischen Auswertungen sowie die Erstellung der Diagramme erfolgten mit *Microsoft Excel 2016* und *GraphPad Prism 6*. Die erhobenen Daten wurden nicht-parametrisch mittels *Kruskal-Wallis-Test*, *One-way analysis of variance (one-way ANOVA) on ranks*, *Dunn's multiple comparisons test*, ausgewertet und als Vielfaches der unbehandelten Kontrolle mit dem festgelegten Wert 1 angegeben. Sämtliche Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler ( $M \pm SEM$ ) aufgeführt. Ab einem alpha-Fehler von kleiner 0,05 (p-Wert  $< 0,05$ ) wurde die Null-Hypothese verworfen und von einem signifikanten Unterschied zwischen verschiedenen Bedingungen ausgegangen.

### 3 Material

#### 3.1 Laborgeräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller mit Typenbezeichnung</b>
Centrifuge 5804R	Eppendorf AG (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
HERAcell 240i CO2 Incubator, Serial-Nr.: 41379403 (55 °C und 90 °C, 50/60 Hz, IP20, 1 NIPE, 230 V, 2,8 A, 0,64 kW)	ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Heraeus™ Labofuge™ 300, Fabr.-Nr.: 40248728, Bestell-Nr.: 75003230 (kin. Energie: 427 Nm, max. Drehzahl: 4.000 U/min, Span- nung: 230 V, Frequenz: 50/60 Hz, Strom: 1,25 A, Leistung: 180 W)	ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
HERASAFE KS, Type: KS 18, Order Code: 51022712, Serial No.: 41172502 (1/PE AC, 8,7 A, 230 V, 50/60 Hz, 2,0 kW, IP 20, EN 12469: 2000, Class II, Safety Cabinet, Working Volume: 1800×780×627 mm)	ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Systec VX-95, Serial Nr.: 4713 (Volume: 99 l, Design Temp.: -10/150 °C, Design Pres.: - 1/+4 °C, Voltage 3 × 400 V/50/60 Hz, Current: 15,5 A, Pro- tection class 1)	Systec GmbH, the autoclave company (Nürnberg, Deutschland)
Tecan Reader, infinite M1000 PRO	Tecan Deutschland GmbH
T3000 Thermocycler	Biometra <sup>R</sup> (Göttingen, Deutschland)
Zählkammer Neubauer, Tiefe, 0,0025 mm <sup>2</sup> , Bestell- Nr.: 40441001	Assistant <sup>R</sup> (Sondheim v. d. Rhön, Deutschland)

Tabelle 7: Material – Laborgeräte

#### 3.2 Verbrauchsmaterial

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalog-Nr.</b>
Cell Scraper 16 cm, sterile	Sarstedt, Inc. (Newton, USA)	83.1832
Cellstar <sup>R</sup> Cell Culture Flasks, 550 ml, 175 cm <sup>2</sup> , PS, red standard screw cap, sterile	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)	660 160
Cellstar <sup>R</sup> Tubes, 15 ml, PP, graduated, conical bottom, blue screw cap, sterile	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)	188 271
Cellstar <sup>R</sup> Tubes, 50 ml, PP, graduated, conical bottom, blue screw cap, sterile	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)	277 261
Cellstar <sup>R</sup> Tubes, 50 ml, PP, graduated, conical bottom with support skirt, blue screw cap, sterile	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)	210 261

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalog-Nr.</b>
Cellstar <sup>R</sup> 6 Well Cell Culture Plate, sterile, with lid	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)	657 160
ClearLine PP microtube 2 ml, round bottom, snap cap, non-sterile	ClearLine <sup>R</sup> Biosigma (Venedig, Italien)	390691
Low Temperature Freezer Vials (Self-Standing, 2 ml, Silicone O-Ring Seal)	VWR <sup>R</sup> (Radnor, PA, USA)	497-1262 (European Article No.)
MicroAmp <sup>R</sup> , Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (0,1 ml), PCR Compatible DNA/RNA/RNase Free	Applied Biosystems Inc (Foster City, CA, USA)	4346906
MicroAmp <sup>TM</sup> Optical Adhesive Film, PCR/Real-time PCR Compatible	Applied Biosystems, by ThermoFisher Scientific (Carlsbad, CA, USA)	4311971
Microplatte, 96 Well, PP, F-Boden (Kaminform), Natur, 10 St./Btl.	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)	655201
Micro tube/Reagiergefäß, 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)	72.690.001
Pasteurpipetten aus Glas, für den Einmalgebrauch, ca. 150 mm	BRAND GMBH & CO KG (Wertheim, Deutschland)	7477 15
Pasteurpipetten aus Glas, für den Einmalgebrauch, ca. 230 mm	BRAND GMBH & CO KG (Wertheim, Deutschland)	7477 20
QIAshredder (250)	Qiagen <sup>R</sup> (Hilden, Deutschland)	79656
Stericup <sup>R</sup> 500 ml, Millipore Express <sup>R</sup> PLUS, 0,22 µm PES	EMD Millipore Corporation (Darmstadt, Deutschland)	SCGPU05RE
Tip One <sup>R</sup> 10 µl Graduated, Filter Tip, 10x96 Tips, Racked (Sterile), Free of detectable RNase, DNase, DNA & pyrogens	Starlab GmbH (Hamburg, Deutschland)	S1121-3810
Tip One <sup>R</sup> 10/20 µl XL Graduated, Filter Tip, 10x96 Tips, Racked (Sterile), Free of detectable RNase, DNase, DNA & pyrogens	Starlab GmbH (Hamburg, Deutschland)	S1120-3810
Tip One <sup>R</sup> 20 µl Bevelled, Filter Tip, 10x96 Tips, Racked (Sterile), Free of detectable RNase, DNase, DNA & pyrogens	Starlab GmbH (Hamburg, Deutschland)	S1120-1810
Tip One <sup>R</sup> 200 µl Graduated, Filter Tip, 10x96 Tips, Racked (Sterile), Free of detectable RNase, DNase, DNA & pyrogens	Starlab GmbH (Hamburg, Deutschland)	S1120-8810
Tissue Culture Flask, 25 cm <sup>2</sup> , treated, vented cap, sterile	VWR <sup>R</sup> International (Löwen, Belgien)	734-2311
Tissue Culture Flask, 75 cm <sup>2</sup> , treated, vented cap, sterile	VWR <sup>R</sup> International (Löwen, Belgien)	734-2313



<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalog-Nr.</b>
Tissue Culture Flasks, Vented Cap, 225 cm <sup>2</sup> , sterile	FALCON <sup>R</sup> , Corning Incorporated (Corning, NY, USA)	353138
µltraAmp PCR Products, Certified RNase/DNase Free, 0,2 ml, Natural	Sorenson <sup>TM</sup> (West Salt Lake City, USA)	16950A
5 mL Stripette <sup>R</sup> , Disposable Serological Pipette, Individually Wrapped, Sterile	costar <sup>R</sup> , Corning Incorporated (Corning, NY, USA)	4487
10 mL Stripette <sup>R</sup> , Disposable Serological Pipette, Individually Wrapped, Sterile	costar <sup>R</sup> , Corning Incorporated (Corning, NY, USA)	4488
25 mL Stripette <sup>R</sup> , Disposable Serological Pipette, Individually Wrapped, Sterile	costar <sup>R</sup> , Corning Incorporated (Corning, NY, USA)	4489

Tabelle 8: Material – Verbrauchsmaterial

### 3.3 Chemikalien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalog-Nr.</b>	<b>Lagerung</b>
Ampuwa <sup>R</sup> Spüllösung 1.000 ml Plastipur <sup>R</sup> , steril und endotoxinfrei	Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Bad Homburg, Deutschland)	13LAP061	RT
β-Glycerol phosphate disodium salt pentahydrate, ≥ 98,0 % (NT)	Sigma-Aldrich <sup>R</sup> (St. Louis, MO, USA)	50020-100G	2-8 °C
Bicinchoninic Acid solution	Sigma-Aldrich <sup>R</sup> (St. Louis, MO, USA)	B9643-1L	RT
Bovine Serum Albumin (lyophilized powder, BioReagent, suitable for cell culture, ≥ 96 % (agarose gel electrophoresis))	Sigma-Aldrich <sup>R</sup> (St. Louis, MO, USA)	A9418-10G	2-8 °C
Calciumchlorid ≥ 98 %, getrocknet, Pulver (CaCl <sub>2</sub> – M 110,99 g/mol)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	CN93.1	RT
cOmplete Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack (Protease Inhibitor Cocktail Tablets)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)	04 693 159 001, LOT 17756800	2-8 °C
Copper (II) sulfate solution, 4 % (w/v)	Sigma-Aldrich <sup>R</sup> (St. Louis, MO, USA)	C2284-25ML	RT
Dimethyl sulfoxide	Sigma-Aldrich <sup>R</sup> (St. Louis, MO, USA)	D8418-100ML	RT
DL-Dithiothreitol, ≥ 99,0 % (RT)	Sigma-Aldrich <sup>R</sup> (St. Louis, MO, USA)	43819-25G	2-8 °C
DMEM (1X) + GlutaMAX <sup>TM</sup> - i, [+] 4,5 g/L D-Glucose, [+] Pyruvate	gibco <sup>R</sup> (Grand Island, NY, USA)	31966-021	4 °C

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalog-Nr.</b>	<b>Lagerung</b>
DPBS w/o Calcium and Magnesium	BioFroxx GmbH (Pfungstadt, Deutschland)	1445ML500	RT
Ethanol, CHROMASOLV <sup>R</sup> , for HPLC, absolute, ≥ 99,8 %	Sigma-Aldrich <sup>R</sup> (St. Louis, MO, USA)	34852-1L	RT
Fetal Bovine Serum, Sterile Filtered, Cell Culture Tested	Sigma-Aldrich <sup>R</sup> (St. Louis, MO, USA)	F7524, LOT 025M3302	-20 °C
Gelatin from bovine skin	Sigma-Aldrich <sup>R</sup> (St. Louis, MO, USA)	G9391-500G	RT
HEPES, Sodium Salt, ULTROL <sup>R</sup> Grade, MW: 260,3 g/mol	CALBIOCHEM <sup>R</sup> , Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)	391333, LOT B52066	20°C
HiPerFect Transfection Reagent (1 ml)	Qiagen <sup>R</sup> (Hilden, Deutschland)	301704	4 °C
Lipofectamine <sup>R</sup> 2000 Transfection Reagent	ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)	11668019	4 °C
MEM Non-Essential Amino Acid Solution 100x	Sigma-Aldrich <sup>R</sup> (St. Louis, MO, USA)	M7145	4 °C
Nuclease-Free Water	Promega Corporation (Madison, WI, USA)	P119E	30 °C
Pen Strep	gibco <sup>R</sup> (Grand Island, NY, USA)	15140-122	-20 °C
PhosSTOP EASYpack (Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)	04 906 837 001, LOT 18738300	2-8 °C
RNase-Free DNase Set (50), for use with RNeasy <sup>R</sup> /QIAamp <sup>R</sup> Columns	Qiagen <sup>R</sup> (Hilden, Deutschland)	79254	-20 °C
TRIS-hydrochlorid, PUFFERAN <sup>R</sup> ≥ 99 %, p.a., C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> – HCL – M 157,60 g/mol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	9090.3	RT
Triton <sup>TM</sup> , X-100	Sigma-Aldrich <sup>R</sup> (St. Louis, MO, USA)	T9284- 500ML, LOT SLBM1897V	20-25 °C
Trypan Blue Solution, 0,4 %	AMRESCO <sup>R</sup> (Solon, OH, USA)	K940-100ML	2-8 °C
0,25 % Trypsin-EDTA (1X)	gibco <sup>R</sup> (Grand Island, NY, USA)	25200-056	-20 °C

Tabelle 9: Material – Chemikalien

## 3.4 Puffer, Lösungen, Medien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Komponenten/Herstellung</b>
Buffer RDD, DNA Digest Buffer	Qiagen <sup>R</sup> (Hilden, Deutschland), Katalog-Nr. 1010397, Lagerung bei 4 °C
TRIS-HCl-Puffer (100 mM) (Lagerung bei 4 °C)	0,7875 g TRIS-hydrochlorid 50 ml ddH <sub>2</sub> O pH = 7,0 500 µl Triton X-100
Zellkulturmedium	500 ml DMEM 50 ml FBS 5 ml Penicillin/Streptomycin 5 ml <i>Non-Essential Amino Acid</i>
Degenerierendes Zellkulturmedium	49 ml Zellkulturmedium (s.o.) 1.000 µl β-Glycerolphosphat (1 M; 3,061 g in 10 ml ddH <sub>2</sub> O) 100 µl Calciumchlorid (1,5 M; 1,665 g in 10 ml ddH <sub>2</sub> O)
Einfriermedium	10 % Dimethylsulfoxid in FBS

Tabelle 10: Material – Puffer, Lösungen, Medien

## 3.5 Kits

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalog-Nr.</b>	<b>Lagerung</b>
Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination	Sigma-Aldrich <sup>R</sup> (St. Louis, MO, USA)	BCA-1	RT
Calcium Assay Kit	Abnova <sup>R</sup> Corporation (Taipei City, Taiwan)	KA1644	2-8 °C
GoTaq <sup>R</sup> qPCR Master Mix	Promega (Madison, WI, USA)	A6002	-20 °C
Pierce <sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)	23225	RT
QuantiTect <sup>R</sup> Reverse Transcription Kit	Qiagen <sup>R</sup> (Hilden, Deutschland)	205313	-20 °C
RNeasy <sup>R</sup> Mini Kit (250)	Qiagen <sup>R</sup> (Hilden, Deutschland)	74106	RT

Tabelle 11: Material – Kits

## 3.6 siRNA

Sämtliche siRNA-Sequenzen wurden von *Qiagen*<sup>R</sup> (Hilden, Deutschland) bezogen.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Leitstrang (engl. <i>sense strand</i>) (5'–3')</b>	<b>Folgestrang (engl. <i>antisense strand</i>) (5'–3')</b>
bovHAS2 dXdY overhang, Purity: HPP, 20 nmol	GUAUCGGUUUGGUUACAATT	UUGUAAACCAAACCGAUACGG
XM_004011666 (ovHAS2), HP Custom siRNA, Purity: HPP, 20 nmol	CACCUAGGCUGUUAGUUUATT	UAAACUACAGCCUAGGUGGA
ovCD73 dXdY overhang, Purity: HPP, 20 nmol	GGAGAUUGACCAUAAAUGATT	UCAUUUAUGGUCAAUCUCCAT
ovBGN dXdY overhang, Purity: HPP, 20 nmol	GGAGAACAGCGGCUUUGAATT	UUCAAAGCCGCGUUCUCCAG
ovOPN dXdY overhang, Purity: HPP, 20 nmol	CCUAGAUCAUAAAGAGUGAATT	UUCACUCUUAUGAUCUAGGTC
NM_001009224 (ovOPN), HP Custom siRNA, Purity: HPP, 20 nmol	CCCGAGUAAGUCCAAUGAATT	UUCAUUGGACUUACUCGGGAG
ovMAPK1 dXdY overhang, Purity: HPP, 20 nmol	AGCAGAUGAAAGACGUAUATT	UAUACGUCUUUCAUCUGCUCG
AllStars Negative Control siRNA (5 nmol) (Katalog-Nr./ID: 1027280, Thoroughly tested and validated nonsilencing siRNA)		

Tabelle 12: Material – siRNA

## 3.7 Primer

Sämtliche Primersequenzen wurden von *Eurofins Genomics* (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (forward 5'–3')</b>	<b>Sequenz (reverse 5'–3')</b>
ACTA2 2.0 ov ( <i>actin alpha 2, smooth muscle, aorta</i> )	TAGAACACGGCATCATCACC	TGAGAAGGGTTGGATGCTCT
ALAS1 ov ( <i>5'-aminolevulinate synthase 1</i> )	CTCGACCCTCTTCACTCTGG	GTACTTTGGCACTCCGCTGT
BGLAP 3.0 ov ( <i>bone gamma-carboxyglutamate protein</i> )	GAAGAGACTCAGGCGTACC	GCTCATCACAGTCAGGGTTG
BGN ov ( <i>biglycan</i> )	TCTGCTCCGCTACTCCAAGT	TTGTTGTCCAAGTGCAGCTC
DCN ov ( <i>decorin</i> )	ATGCAGCTAGCCTGAAAGGA	GAGGAGTGTTGGCCAAAGAG

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (forward 5'– 3')</b>	<b>Sequenz (reverse 5'– 3')</b>
EEF1A1 ov ( <i>eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1</i> )	GCAAGCCTATGTGTGTCGAG	TCCAAGGAG-GAGAGAGACTCC
HAS2 bov ( <i>hyaluronan synthase 2</i> )	TCACCCAGTTGGTCTTGTCC	GGTCAAGCATGGTGTCTGAA
HAS2 ov ( <i>hyaluronan synthase 2</i> )	CACAGACAGGCTGAGGACAA	TCCAAGGAG-GAGAGAGACTCC
HPRT1 ov ( <i>hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1</i> )	GCTACTGTAACGACCAG-TCAACA	GCATTGTCTTCCCAGTGTCA
H2AFZ ov ( <i>H2A histone family member Z</i> )	GGTAAGGCTGGGAAGGACTC	TGAGGTGTCGATGAATACGG
MAPK1 ov ( <i>mitogen-activated protein kinase 1</i> )	GACCTCAAGCCTTCCAACCT	CACGTACTCGGTCAGGAACC
MMP2 2.0 ov ( <i>matrix metalloproteinase 2</i> )	TGACAAGGACGGCAAGTATG	GTAAGATGTGCCCTGGAAGC
MMP9 3.0 ov ( <i>matrix metalloproteinase 9</i> )	TAGCACGCACGACATCTTTC	GCCCACATAGTCCACCTGAT
NT5E 4.0 ov ( <i>5'-Nucleotidase ecto</i> )	TCCCATTCTCAACAGCA	CCAATTCCTGGGTCTGAATAG
OPN ov ( <i>osteopontin</i> )	GATGGCCGAGGTGATAGTGT	TCGTCTTCTTAGGGTGCCTCA
PPIA ov ( <i>peptidylprolyl isomerase A</i> )	GACAAAGTCCCGAAGACAGC	CACCACCCTGGCACATAAAT
RPL13A 3.0 ov ( <i>ribosomal protein L13</i> )	GATCCCACCACCCTATGACA	CTTCAGACGCACAACCTTGA
RPL29 ov ( <i>ribosomal protein L29</i> )	CCAAGTCCAAGAACCACACC	TATCGTTGTGATCGGGGTTT
RPLP0 ov ( <i>ribosomal protein lateral stalk subunit P0</i> )	TTCCAGGCTTTAGGCATCAC	CCACCTTGTCTCCGGTCTTA
SDHA ov ( <i>succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A</i> )	CGCTGCTACCCACCTTGTAT	GGAGGTCCAGGGCAAAGTA
TGF- $\beta$ ov ( <i>transforming growth factor beta</i> )	CTGAACCCGTGTTGCTCTC	GAGGTATCGCCAGGAATTGT
TLR2 ov ( <i>toll like receptor 2</i> )	GGCTGTAATCAGCGTGTTC	AGACCAGAGGGGATGGAGTT
TLR4 2.0 ov	CCTCTCCTGCCTGAGAACC	TCAGCTCCATGCATTGGTAA

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (forward 5'–3')</b>	<b>Sequenz (reverse 5'–3')</b>
<i>(toll like receptor 4)</i>		
TUBB ov <i>(tubulin beta class I)</i>	CCTACAACCTGGACCGCATCT	AAAGGACCTGAGCGAACAGA
YWHAE ov <i>(tyrosine 3-monooxygenase/ tryptophan 5-monooxygenase acti- vation protein epsilon)</i>	TCGCTTAGGTCTTGCTCTCAA	AGCGTGTCCAGTTCTGCAAT
YWHAZ ov <i>(tyrosine 3-monooxygenase/ tryptophan 5-monooxygenase acti- vation protein zeta)</i>	CGAGATCCAGGGACAGAGTC	CCAGCTCGTTTTTATCCATGA

Tabelle 13: Material – Primer

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Etablierung eines ovinen Referenzgens für qRT-PCR-Analysen

Die erste Aufgabe im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestand in der Etablierung eines geeigneten Referenzgens für ovine VICs, um die mittels qRT-PCR-Analysen erhobenen Daten zu normalisieren und schließlich eine verlässliche Aussage bezüglich der mRNA-Expression der Zielgene treffen zu können.

Die Auswahl von potenziellen Referenzgenen erfolgte auf Grundlage einer ausführlichen Literaturrecherche. Xie *et al.* untersuchten die Expressionslevel von 14 Genen, darunter *ALAS1*, *HPRT1*, *PPIA*, *RPLP0* und *RPL29* (vollständige Bezeichnung s. Tabelle 14), um ein geeignetes Referenzgen für RNA-Analysen von humanen retinalen Endothelzellen unter hypoxischen und hyperglykämischen Bedingungen zu ermitteln (49). Interessanterweise zeigten die in Publikationen am häufigsten verwendeten Referenzgene *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) und *ACTB* (*actin beta*) große Schwankungen zwischen den verschiedenen experimentellen Bedingungen, sodass von einer Regulierung der Genexpression durch die o. g. Behandlungsbedingungen auszugehen war (49). Ohnehin ist mittlerweile bekannt, dass die mRNA-Expression von *GAPDH* und *ACTB* durch Umwelt- und Entwicklungsfaktoren beeinflusst zu sein scheint (50). Dies stimmt mit bisherigen laborinternen Erfahrungen überein, sodass man sich von vornerein gegen *GAPDH* und *ACTB* als endogene Kontrolle für den experimentellen Ansatz der vorliegenden Arbeit entschied. Gentile *et al.* analysierten die Stabilität der potenziellen Referenzgene *GAPDH*, *RPL13A*, *EEF1A1* (s. Tabelle 14), *CYC* (*cyclophilin A*) und *18S rRNA* (*eukaryotic 18S ribosomal rRNA*), um den *in vitro*-Prozess der Adipogenese von humanen vaskulären Stromazellen aus viszeralem und subkutanem Fettgewebe mithilfe von Genexpressionsanalysen zuverlässig untersuchen zu können (50). Dabei zeigten *RPL13A* und *EEF1A1* die höchste Stabilität hinsichtlich ihrer Genexpressionslevel und schienen durch die adipogene Differenzierung weitgehend unbeeinflusst zu bleiben (50). In einem ähnlichen experimentellen Ansatz verwendeten Diesel *et al.* 15 gängige Referenzgene (u. a. *EEF1A1*, *H2AFZ*, *HPRT1*, *SDHA* und *TUBB*, s. Tabelle 14) zur Normalisierung der qRT-PCR-Daten von adipo-, chondro- und osteogenen Markern in humanen Stromazellen, wobei die Gene *H2AFZ* und *HPRT1* die stabilsten Expressionslevel aufwiesen (51). Die Arbeitsgruppe um Mamo *et al.* konnte nach ausführlicher Analyse von zwölf herkömmlichen Referenzgenen (darunter *ACTB*, *GAPDH* und *TUBB*) eine Empfehlung für die Gene *H2AFZ*, *HPRT1* und *PPIA* zur Normalisierung der qRT-PCR-Daten von Mausoozyten und -embryonen in verschiedenen Entwicklungsstadien aussprechen (52). Ein ebenfalls aufschlussreiches Ergebnis lieferte die von Mossberg *et al.* durchgeführte Stabilitätsanalyse von verschiedenen Referenzgenen, wobei sich *YWHAE* (s. Tabelle 14) als stabilstes Gen im interindividuellen Vergleich erwies (53). Darüber hinaus wurden dieselben Referenzgene auf eine mögliche Regulierung durch den miRNA-vermittelten Gen-*knockdown* des *dicer1*-Gens überprüft, mit dem Fazit eines unverändert stabilen Expressionslevels des Referenzgens *YWHAE* (53).

Nach umfangreicher Recherche der gängigen Literatur zu Analysen von verschiedenen Referenzgenen wurden zwölf Gene ausgewählt (s. Tabelle 14), die im weiteren Verlauf hinsichtlich ihrer Eignung als

endogene Kontrolle für den geplanten experimentellen Ansatz untersucht wurden. Dabei galt es zunächst eine stabile Genexpression zwischen verschiedenen biologischen Replikaten nachzuweisen. In einem zweiten Schritt wurden Schwankungen zwischen unterschiedlichen Behandlungsbedingungen, die für die anschließenden RNAi-Experimente von Bedeutung waren, ausgeschlossen.

ALAS1 ( <i>5'-aminolevulinate synthase 1</i> )
EEF1A1 ( <i>eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1</i> )
HPRT1 ( <i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i> )
H2AFZ ( <i>H2A histone family member Z</i> )
PPIA ( <i>peptidylprolyl isomerase A</i> )
RPLP0 ( <i>ribosomal protein lateral stalk subunit P0</i> )
RPL13A ( <i>ribosomal protein L13A</i> )
RPL29 ( <i>ribosomal protein L29</i> )
SDHA ( <i>succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A</i> )
TUBB ( <i>tubulin beta class I</i> )
YWHAE ( <i>tyrosine 3-monooxygenase/ tryptophan 5-monooxygenase activation protein epsilon</i> )
YWHAZ ( <i>tyrosine 3-monooxygenase/ tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta</i> )

**Tabelle 14: Auflistung der potenziellen Referenzgene, die hinsichtlich der Stabilität ihrer Genexpressionslevel untersucht wurden.**

Um einen ersten Eindruck von der Qualität und den Eigenschaften, insbesondere der Spezifität, der ausgewählten Primer zu gewinnen, wurde anhand der cDNA von unbehandelten ovinen VICs eine Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR durchgeführt. Der mittlere  $C_T$ -Wert von *SDHA* lag mit 36,92 deutlich zu hoch, demnach befand sich zu wenig für *SDHA* codierende cDNA in der Probe und die exponentielle Phase der Gen-Amplifikation setzte verhältnismäßig spät ein. *YWHAE* fiel durch einen asymmetrischen Verlauf, *YWHAZ* durch einen flachen Anstieg bzw. zweiten Hochpunkt der Schmelzkurve auf, sodass für beide Gene eine unspezifische Bindung und Amplifikation angenommen werden musste. Die Primerpaare der übrigen neun Referenzgene zeigten  $C_T$ -Werte in einem akzeptablen Bereich zwischen 13,75 und 25,89 sowie symmetrische Schmelzkurven mit einem singulären Hochpunkt und dementsprechend einer spezifischen Gen-Amplifikation. Nach dieser ersten Test-qRT-PCR wurden somit bereits drei potenzielle Referenzgene aussortiert und nicht weiter auf ihre Tauglichkeit als endogene Kontrolle überprüft.

In einem nächsten Schritt wurde die interindividuelle Stabilität der Genexpression zwischen mehreren biologischen Replikaten überprüft. Dazu wurde die cDNA von unbehandelten ovinen VICs verwendet, die zu Beginn der experimentellen Arbeit aus den Aortenklappen von Schafen isoliert (s. 2.1.1) und im weiteren Verlauf für die Etablierungsarbeiten zu einem siRNA-basierten Gen-*knockdown* von *BGN*, *OPN*, *HAS2* und *CD73* verwendet wurde. Wie in Abb. 7 erkennbar, zeigte sich eine große Streubreite



der reinen  $C_T$ -Werte von *PPIA* mit einer Spannweite von 8,7 (Min. 13,21, Max. 21,91) und einem mittleren  $C_T$ -Wert von  $17,48 \pm 1,724$ . Da jeweils drei biologische Replikate auf eine 96-Well-Platte aufgetragen wurden, wäre ein technischer Fehler in diesem Zusammenhang durchaus möglich; trotzdem schied das Gen *PPIA* als endogene Kontrolle aus. *RPLP0* lag mit einem mittleren  $C_T$ -Wert von  $11,67 \pm 0,1781$  in einem für ein optimales Referenzgen deutlich zu niedrigen Bereich, sodass auch dieses Gen nicht weiter untersucht wurde.

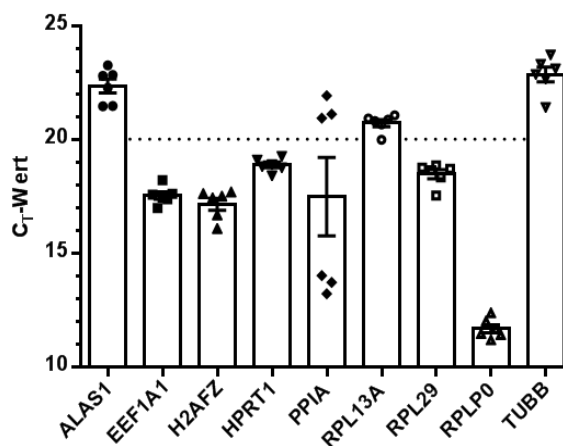


Abb. 7: **Auftragung der  $C_T$ -Werte von neun potenziellen Referenzgenen.** Analyse der interindividuellen Stabilität der Genexpressionslevel anhand der *cDNA* von unbehandelten ovinen VICs.  $n=6$ ; *ALAS1*: 5'-aminolevulinat synthase 1, *EEF1A1*: eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1, *H2AFZ*: H2A histone family member Z, *HPRT1*: hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1, *PPIA*: peptidylprolyl isomerase A, *RPL13A*: ribosomal protein L13A, *RPL29*: ribosomal protein L29, *RPLP0*: ribosomal protein lateral stalk subunit P0, *TUBB*: tubulin beta class I.

Weiterhin galt es eine maximale Stabilität der Genexpression zwischen verschiedenen Behandlungsbedingungen innerhalb eines biologischen Replikates nachzuweisen. Dazu wurden ovine VICs von drei biologischen Replikaten gemäß dem ersten Protokoll zur siRNA-Transfektion (s. Tabelle 1, 1. Protokoll) mit  $0,375 \mu\text{g}$  der entsprechenden siRNA-Sequenzen und  $6 \mu\text{l}$  *Lipofectamine* pro Well behandelt, wobei stellvertretend die vier Konditionen „unbehandelt“, *Lipofectamine*, *AllStars* und *MAPK1* ausgewählt wurden (s. 2.2.2.). Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass das Ergebnis der Stabilitätsanalyse eine direkte Relevanz für den geplanten experimentellen Ansatz aufwies. Nach Auftragung der reinen  $C_T$ -Werte für jedes potenzielle Referenzgen (s. Abb. 8) ergaben sich mehr oder weniger große Streubreiten der Genexpression mit folgenden maximalen  $C_T$ -Wert-Differenzen: *ALAS1* 1,2, *EEF1A1* 1,35, *H2AFZ* 1,18, *HPRT1* 1,18, *RPL13A* 0,97, *RPL29* 0,82, *TUBB* 1,74. Dabei zeigte das Gen *RPL29* mit einem mittleren  $C_T$ -Wert von  $20,3 \pm 0,193$  und einer Spannweite der  $C_T$ -Werte von 0,82 (Min. 19,92, Max. 20,74) die höchste Stabilität zwischen den unterschiedlichen Behandlungsbedingungen und wurde somit als endogene Kontrolle für die nachfolgenden RNAi-Experimente ausgewählt.

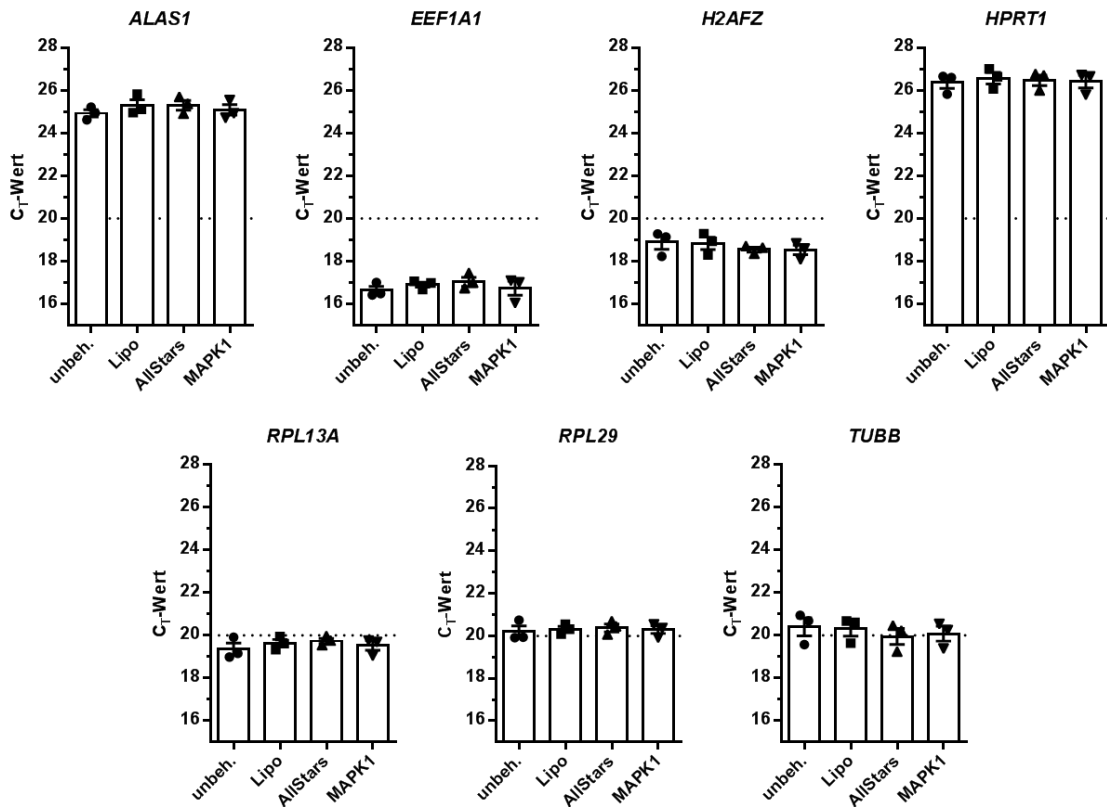


Abb. 8: Auftragung der  $C_T$ -Werte von sieben potenziellen Referenzgenen. Stabilitätsanalyse der Genexpressionslevel bezüglich verschiedener Behandlungsbedingungen innerhalb eines biologischen Replikates.  $n=3$ ; ALAS1: 5'-aminolevulinate synthase 1, EEF1A1: eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1, H2AFZ: H2A histone family member Z, HPRT1: hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1, RPL13A: ribosomal protein L13A, RPL29: ribosomal protein L29, TUBB: tubulin beta class I, unbeh.: Kontrolle „unbehandelt“, Lipo: Kontrolle Lipofectamine, AllStars: AllStars Negative Control siRNA, MAPK1: mitogen-activated protein kinase 1.

Im Rahmen des ersten RNAi-Experiments, bei dem ovine VICs mit  $0,375 \mu\text{g}$  der entsprechenden siRNA-Sequenzen und  $6 \mu\text{l}$  Lipofectamine pro Well behandelt wurden (s. Tabelle 1, 1. Protokoll), diente RPL29 als Referenzgen zur Normalisierung der mittels qRT-PCR erhobenen Daten. In Abb. 9 ist die Auftragung der reinen  $C_T$ -Werte von RPL29 bei sechs biologischen und vier technischen Replikaten mit jeweils acht verschiedenen Behandlungsbedingungen dargestellt. Dabei zeigte sich ein mittlerer  $C_T$ -Wert von  $18,79 \pm 0,11$  sowie eine geringe Streubreite der  $C_T$ -Werte mit einer Spannweite von 2,37 (Min. 17,9, Max. 20,27). Insgesamt ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den  $C_T$ -Werten von RPL29 für  $n=192$ .

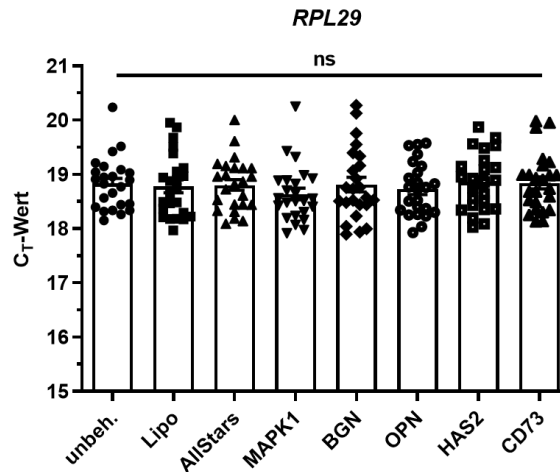


Abb. 9: **Auftragung der  $C_T$ -Werte von RPL29.** Stabilitätsanalyse der Genexpression von RPL29 anhand der cDNA von transfizierten ovinen VICs.  $n=192$ ;  $p>0,9999$ ; ns: nicht signifikant, RPL29: ribosomal protein L29, unbeh.: Kontrolle „unbehandelt“, Lipo: Kontrolle Lipofectamine, AllStars: AllStars Negative Control siRNA, MAPK1: mitogen-activated protein kinase 1, BGN: Biglykan, OPN: Osteopontin, HAS2: Hyaluronsäure-Synthase-2, CD73: Ekto-5'-Nukleotidase.

#### 4.2 Etablierungsarbeiten zu einem siRNA-basierten Gen-*knockdown* von BGN, OPN, HAS2 und CD73 in ovinen VICs

Der erste Versuchsdurchlauf, bei dem ovine VICs mit chemisch synthetisierten siRNA-Sequenzen (s. 3.6) transfiziert wurden, erfolgte mit dem Transfektionsreagenz *Lipofectamine*. Dabei wurden die einzelnen Arbeitsschritte in Orientierung an das „*Lipofectamine<sup>R</sup> 2000 DNA Transfection Reagent Protocol*“ des Herstellers ausgeführt (s. 2.2.2). Die verwendete siRNA-Menge lag mit 0,375  $\mu\text{g}$  pro Well weit unter der vom Hersteller empfohlenen Menge von 2,5-3  $\mu\text{g}$  pro Well; die verwendete Menge an *Lipofectamine* lag mit 6  $\mu\text{l}$  pro Well an der unteren Grenze der empfohlenen Menge von 5-12,5  $\mu\text{l}$  pro Well (s. Tabelle 1, 1. Protokoll). Zur ersten Orientierung bezüglich der Funktionalität der siRNA-Sequenzen und der Effektivität des ausgewählten Transfektionsreagenzes wurden ovine VICs von sechs biologischen Replikaten in jeweils vier Durchgängen entsprechend transfiziert ( $n=24$ ) und anschließend die Daten pro biologisches Replikat zusammengefasst ( $n=6$ ).

Abb. 10 zeigt die lichtmikroskopische Darstellung von ovinen VICs unter den entsprechenden Behandlungsbedingungen nach 72 Stunden Inkubation. Während bei den unbehandelten VICs eine 100 %ige Konfluenz und nahezu keine toten Zellen auszumachen waren, stellte sich der Zellrasen der mit *Lipofectamine* behandelten VICs der anderen Bedingungen sichtlich lückenhaft dar. Außerdem war die Anzahl der abgestorbenen Zellen sowie die Menge an Zellfragmenten deutlich erhöht. Zwischen den Bedingungen *Lipofectamine*, *AllStars* und den mit spezifischen siRNA-Sequenzen behandelten Zellen zeigte sich kein wesentlicher Unterschied in der Zellmorphologie, sodass am ehesten das Transfektionsreagenz und nicht die siRNA-Sequenzen für die zytotoxischen Effekte verantwortlich zu sein schien.

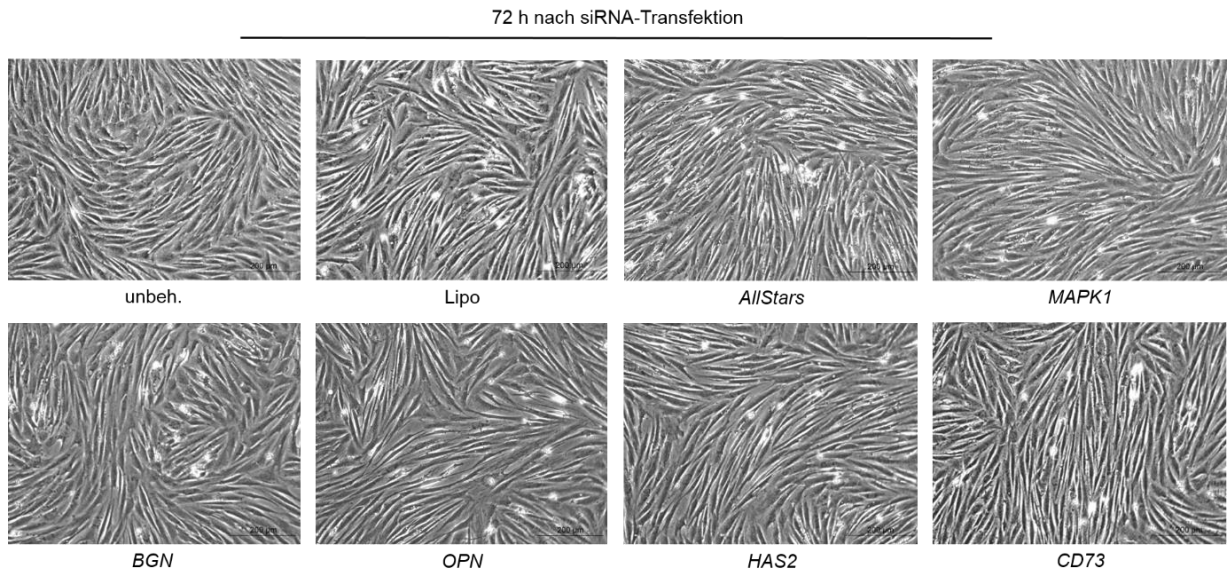


Abb. 10: **Lichtmikroskopische Darstellung von ovinen VICs.** Aufnahme 72 Stunden nach siRNA-Transfektion mit 0,375  $\mu\text{g}$  siRNA und 6  $\mu\text{l}$  Lipofectamine pro Well unmittelbar vor RNA-Isolation für qRT-PCR-Analysen, 10-fache Vergrößerung. unbeh.: Kontrolle „unbehandelt“, Lipo: Kontrolle Lipofectamine, AllStars: AllStars Negative Control siRNA, MAPK1: mitogen-activated protein kinase 1, BGN: Biglykan, OPN: Osteopontin, HAS2: Hyaluron-säure-Synthase-2, CD73: Ekto-5'-Nukleotidase.

In Abb. 11 A ist die Auftragung der relativen mRNA-Expression von *MAPK1* dargestellt. Es wurde eine signifikante Herunterregulierung der relativen Genexpression bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, die Kontrolle *Lipofectamine* und die Negativkontrolle *AllStars* erreicht ( $p < 0,0001$ ), während die Kontrollen untereinander keine Signifikanzen zeigten. Der Mittelwert der relativen mRNA-Expression reduzierte sich durch siRNA-Transfektion auf  $0,3076 \pm 0,0273$ , sodass die durchschnittliche Herunterregulierung von *MAPK1*, der sog. Gen-*knockdown*, 69,24 % betrug. Dementsprechend konnte von einem in sich korrekten Experiment mit validen Ergebnissen ausgegangen werden. In Abb. 11 B wurden die jeweiligen Daten der vier Transfektionsdurchgänge eines biologischen Replikates gemittelt, wobei der signifikante Unterschied zwischen den mit siRNA transfizierten VICs und der unbehandelten Kontrolle nicht bestehen blieb ( $p = 0,0816$ ).

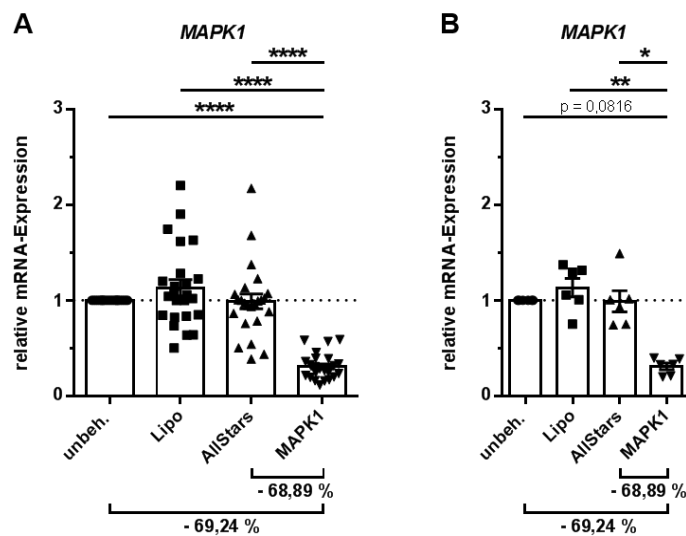


Abb. 11: **Relative mRNA-Expression von MAPK1.** Ovine VICs wurden mit 0,375  $\mu\text{g}$  siRNA und 6  $\mu\text{l}$  Lipofectamine pro Well behandelt. (A)  $n = 24$ , (B)  $n = 6$  (Mittelwert pro biologisches Replikat); \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*\*:

$p < 0,0001$ ; *MAPK1*: mitogen-activated protein kinase 1, unbeh.: Kontrolle „unbehandelt“, Lipo: Kontrolle Lipofectamine, AllStars: AllStars Negative Control siRNA.

Bei der Auftragung der relativen mRNA-Expression von *BGN* zeigte sich eine signifikante Senkung durch siRNA-Transfektion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, *Lipofectamine* und *AllStars* ( $p < 0,0001$ , s. Abb. 12 A). Bei den gemittelten Werten pro biologisches Replikat erwies sich hingegen der Unterschied zur Negativkontrolle *AllStars* als nicht mehr signifikant ( $p = 0,0915$ , s. Abb. 12 B). Die mittlere relative mRNA-Expression reduzierte sich auf  $0,413 \pm 0,0445$ , sodass *BGN* bezogen auf die unbehandelte Kontrolle um durchschnittlich 58,7 % herunterreguliert wurde. Die drei Kontrollen wiesen untereinander keinen signifikanten Unterschied in der relativen Genexpression von *BGN* auf.

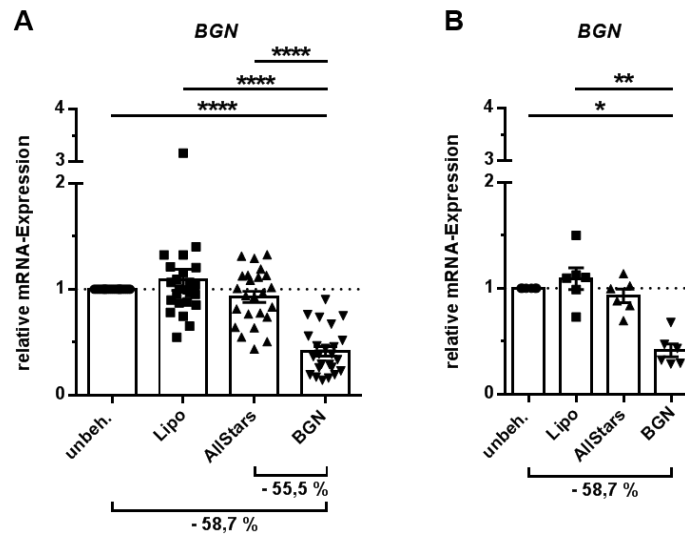


Abb. 12: **Relative mRNA-Expression von *BGN***. Ovine VICs wurden mit  $0,375 \mu\text{g}$  siRNA und  $6 \mu\text{l}$  Lipofectamine pro Well behandelt. (A)  $n=24$ , (B)  $n=6$  (Mittelwert pro biologisches Replikat); \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ; *BGN*: Biglykan, unbeh.: Kontrolle „unbehandelt“, Lipo: Kontrolle Lipofectamine, AllStars: AllStars Negative Control siRNA.

Der experimentelle Gen-*knockdown* von *OPN* erwies sich in diesem Versuchsdurchlauf als wenig effizient. Durch siRNA-Transfektion konnte lediglich bezogen auf die Kontrolle *Lipofectamine* ein signifikanter Unterschied in der relativen Genexpression von *OPN* erreicht werden ( $p < 0,05$ , s. Abb. 13 A), bei der Bildung des Mittelwertes pro biologisches Replikat zeigten sich keine Signifikanzen (s. Abb. 13 B). Darüber hinaus fiel eine mäßige Streubreite der relativen mRNA-Expression von *OPN* auf, sowohl innerhalb der Behandlungsbedingung *Lipofectamine* mit einer Spannweite der Daten von 1,7628 (Min. 0,6662, Max. 2,429) als auch innerhalb der Negativkontrolle *AllStars* mit einer Spannweite von 2,7012 (Min. 0,2618, Max. 2,963) (für  $n=24$ , s. Abb. 13 A).

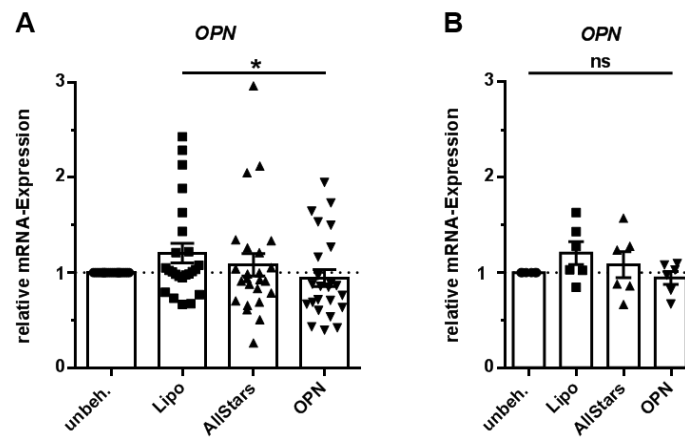


Abb. 13: **Relative mRNA-Expression von OPN.** Ovine VICs wurden mit  $0,375 \mu\text{g}$  siRNA und  $6 \mu\text{l}$  Lipofectamine pro Well behandelt. (A)  $n=24$ , (B)  $n=6$  (Mittelwert pro biologisches Replikat); \*:  $p<0,05$ ; ns: nicht signifikant, OPN: Osteopontin, unbeh.: Kontrolle „unbehandelt“, Lipo: Kontrolle Lipofectamine, AllStars: AllStars Negative Control siRNA.

Wie in Abb. 14 dargestellt, konnte ebenfalls keine signifikante Senkung der relativen Genexpression von *HAS2* bezogen auf die unbehandelte Kontrolle erreicht werden. Unter den Behandlungsbedingungen Lipofectamine ( $1,908 \pm 0,164$ ) und AllStars ( $1,973 \pm 0,2626$ ) zeigte sich sogar eine signifikante Erhöhung der relativen mRNA-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ( $p<0,001$  bzw.  $p<0,01$ , s. Abb. 14 A). Bezogen auf diese beiden Kontrollen wurde *HAS2* wiederum signifikant, im Verhältnis zur Negativkontrolle AllStars um durchschnittlich 56,23 % ( $p<0,0001$ ), herunterreguliert. Insgesamt wiesen die erhobenen Daten eine große Streubreite auf; innerhalb der Kontrolle Lipofectamine mit einer Spannweite von 2,928 (Min. 0,652, Max. 3,58) und innerhalb der Negativkontrolle AllStars mit einer Spannweite von 4,488 (Min. 0,6364, Max. 5,124) (s. Abb. 14 A). Diese verringerte sich in ihrem Ausmaß durch Bildung des Mittelwertes pro biologisches Replikat (s. Abb. 14 B). Dabei ist anzumerken, dass zu diesem Zeitpunkt keine ovine siRNA-Sequenz für *HAS2* zur Verfügung stand, sodass auf eine bovine Sequenz ausgewichen werden musste (s. 3.6).

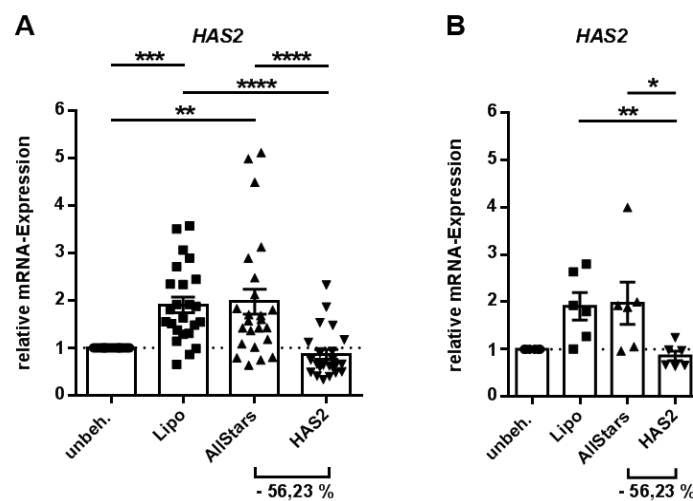


Abb. 14: **Relative mRNA-Expression von HAS2.** Ovine VICs wurden mit  $0,375 \mu\text{g}$  siRNA und  $6 \mu\text{l}$  Lipofectamine pro Well behandelt. (A)  $n=24$ , (B)  $n=6$  (Mittelwert pro biologisches Replikat); \*:  $p<0,05$ , \*\*:  $p<0,01$ , \*\*\*:  $p<0,001$ , \*\*\*\*:  $p<0,0001$ ; HAS2: Hyaluronsäure-Synthase-2, unbeh.: Kontrolle „unbehandelt“, Lipo: Kontrolle Lipofectamine; AllStars: AllStars Negative Control siRNA.

Der erste Versuchsdurchlauf einer siRNA-Transfektion von ovinen VICs führte zu einer signifikanten Herunterregulierung der relativen Genexpression von *CD73* bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, die Kontrolle *Lipofectamine* und die Negativkontrolle *AllStars* (s. Abb. 15 A). Die mittlere relative mRNA-Expression nach siRNA-Transfektion betrug  $0,6993 \pm 0,0517$ , dementsprechend wurde ein durchschnittlicher Gen-*knockdown* um 30,07 % (bezogen auf die unbehandelte Kontrolle,  $p < 0,05$ ) bzw. um 59,25 % (bezogen auf die Negativkontrolle *AllStars*,  $p < 0,0001$ ) erreicht. Abb. 15 A dokumentiert jedoch auch eine signifikante Erhöhung der relativen Genexpression unter den Bedingungen *Lipofectamine* ( $1,495 \pm 0,0743$ ) und *AllStars* ( $1,716 \pm 0,1962$ ) bezogen auf die unbehandelte Kontrolle ( $p < 0,01$ ). Um den Erfolg des *knockdowns* zu verifizieren, wurde dasselbe Protokoll mit ovinen VICs von zwei weiteren biologischen Replikaten wiederholt und die Daten zusammen mit den Mittelwerten pro biologisches Replikat ausgewertet (s. Abb. 15 B). Dabei konnte der signifikante Unterschied zur unbehandelten Kontrolle nicht reproduziert werden ( $p = 0,361$ ). Im Vergleich zur Negativkontrolle *AllStars* zeigte sich ein durchschnittlicher Gen-*knockdown* von *CD73* um 54,87 % ( $p < 0,0001$ ).

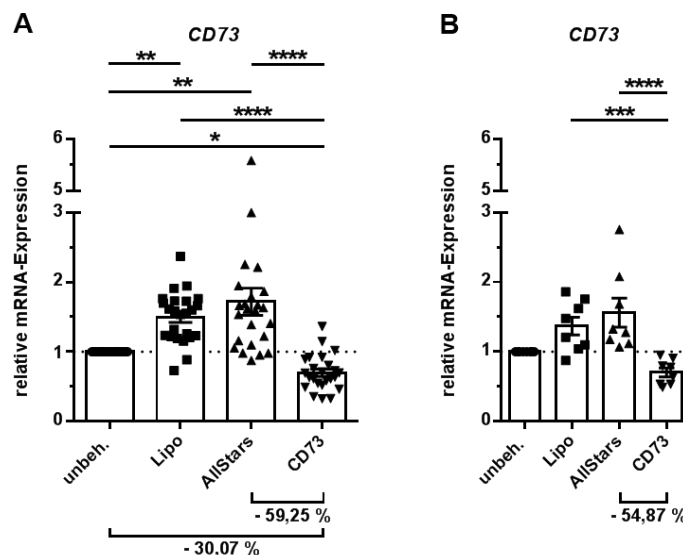


Abb. 15: **Relative mRNA-Expression von CD73.** Ovine VICs wurden mit  $0,375 \mu\text{g}$  siRNA und  $6 \mu\text{l}$  *Lipofectamine* pro Well behandelt. (A)  $n=24$ , (B)  $n=8$  (Mittelwert pro biologisches Replikat); \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ; CD73: Ekto-5'-Nukleotidase, unbeh.: Kontrolle „unbehandelt“, Lipo: Kontrolle *Lipofectamine*; AllStars: *AllStars* Negative Control siRNA.

#### 4.2.1 Einfluss der Menge an siRNA auf den Gen-*knockdown*

Im Rahmen des zweiten Protokolls wurde die siRNA-Menge auf  $1,5 \mu\text{g}$  pro Well erhöht, während die Menge an *Lipofectamine* mit  $6 \mu\text{l}$  pro Well zunächst konstant gehalten wurde (s. Tabelle 1, 2. Protokoll). Auf diese Weise konnten Änderungen in der Effizienz des Gen-*knockdowns* ausschließlich auf die veränderte Menge an hinzugegebener siRNA-Sequenz zurückgeführt werden. Abb. 16 dokumentiert die Ergebnisse zu diesem Versuchsdurchlauf. Analog zu Protokoll 1 konnte eine signifikante Senkung der relativen Genexpression von *MAPK1* bezogen auf alle Kontrollen erreicht werden ( $p < 0,05$ , s. Abb. 16 A). Der durchschnittliche Gen-*knockdown* bezogen auf die unbehandelte Kontrolle betrug 69 %. Die mittlere relative mRNA-Expression von *BGN* wurde im Vergleich zu Protokoll 1 nochmals von  $0,413 \pm 0,0445$  auf  $0,3601 \pm 0,0197$  gesenkt, sodass zwei weitere biologische Replikate mit der Frage

nach Reproduzierbarkeit nachgezogen wurden (s. Abb. 16 B). Für  $n=8$  wurde eine hochsignifikante Herunterregulierung der relativen Genexpression um durchschnittlich 64,84 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erzielt ( $p<0,01$ ), während die Kontrollen untereinander keine signifikanten Unterschiede aufwiesen. Die erhobenen Daten zur relativen mRNA-Expression von *OPN* (s. Abb. 16 C) und *HAS2* (s. Abb. 16 D) wiesen eine große Streubreite innerhalb der Behandlungsbedingungen *Lipofectamine* und *AllStars* auf. Weder bei *OPN* noch bei *HAS2* führte die Transfektion mit den entsprechenden siRNA-Sequenzen zu signifikanten Unterschieden in der relativen mRNA-Expression zwischen den einzelnen Bedingungen. Ebenso konnte kein signifikanter Gen-*knockdown* von *CD73* bezogen auf eine der Kontrollen erreicht werden (s. Abb. 16 E).

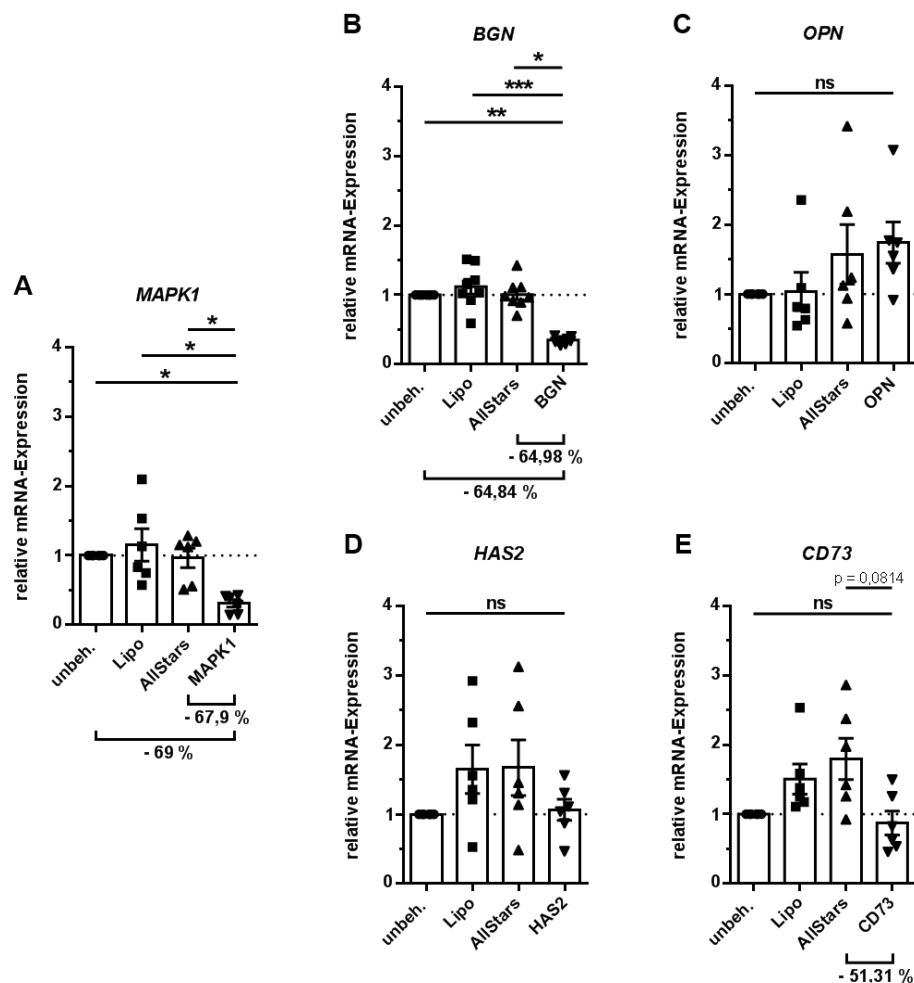


Abb. 16: Einfluss einer erhöhten Menge an siRNA auf den Gen-*knockdown* von *MAPK1*, *BGN*, *OPN*, *HAS2* und *CD73*. Ovine VICs wurden mit 1,5  $\mu\text{g}$  siRNA und 6  $\mu\text{l}$  Lipofectamine pro Well behandelt. Auftragung der relativen mRNA-Expression.  $n=6$  (A, C, D, E),  $n=8$  (B); \*:  $p<0,05$ , \*\*:  $p<0,01$ , \*\*\*:  $p<0,001$ ; ns: nicht signifikant, MAPK1: mitogen-activated protein kinase 1, BGN: Biglykan, OPN: Osteopontin, HAS2: Hyaluronsäure-Synthase-2, CD73: Ekto-5'-Nukleotidase, unbeh.: Kontrolle „unbehandelt“, Lipo: Kontrolle Lipofectamine, AllStars: AllStars Negative Control siRNA.

Im Anschluss wurde bei weiterhin gleichbleibender Menge an *Lipofectamine* die siRNA-Menge nochmals von 1,5  $\mu\text{g}$  auf 3  $\mu\text{g}$  pro Well erhöht (s. Tabelle 1, 3. Protokoll), was laut Herstellerprotokoll der maximal empfohlenen Menge an siRNA entsprach. In Abb. 17 sind die entsprechenden Ergebnisse nach Auswertung der erhobenen qRT-PCR-Daten dargestellt. Im Gegensatz zu Protokoll 2, bei der die halbe



Menge an siRNA verwendet wurde, führte dieser Versuchsdurchlauf zu einer nahezu signifikanten Herunterregulierung der relativen Genexpression von *MAPK1* bezogen auf die unbehandelte Kontrolle ( $p=0,0575$ ) sowie zu einer signifikanten Herunterregulierung bezogen auf die Kontrollen *Lipofectamine* und *AllStars* ( $p<0,05$ ). Der mittlere Gen-*knockdown* im Verhältnis zur Negativkontrolle *AllStars* betrug 57,35 % (s. Abb. 17 A). Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich für *BGN* mit einer signifikanten Senkung der relativen mRNA-Expression um durchschnittlich 46,28 % bezogen auf die Negativkontrolle *AllStars* ( $p<0,01$ , s. Abb. 17 B). Vergleichbar mit den vorherigen Versuchsdurchläufen fielen die erhobenen Daten zur relativen Genexpression von *OPN* erneut durch eine große Streubreite innerhalb der Behandlungsbedingungen *Lipofectamine*, *AllStars* sowie *OPN* auf. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Bedingungen (s. Abb. 17 C). Der Mittelwert der relativen mRNA-Expression von *OPN* nach siRNA-Transfektion betrug  $1,905 \pm 0,3863$ , was bei einem p-Wert von 0,0575 eine annähernd signifikante Hochregulierung der Genexpression bedeutete. Die relative mRNA-Expression von *HAS2* wurde bezogen auf die Negativkontrolle *AllStars* um durchschnittlich 50,84 % gesenkt ( $p<0,001$ , s. Abb. 17 D). Analog zu *OPN* konnte kein signifikanter Gen-*knockdown* von *CD73* erreicht werden (s. Abb. 17 E).

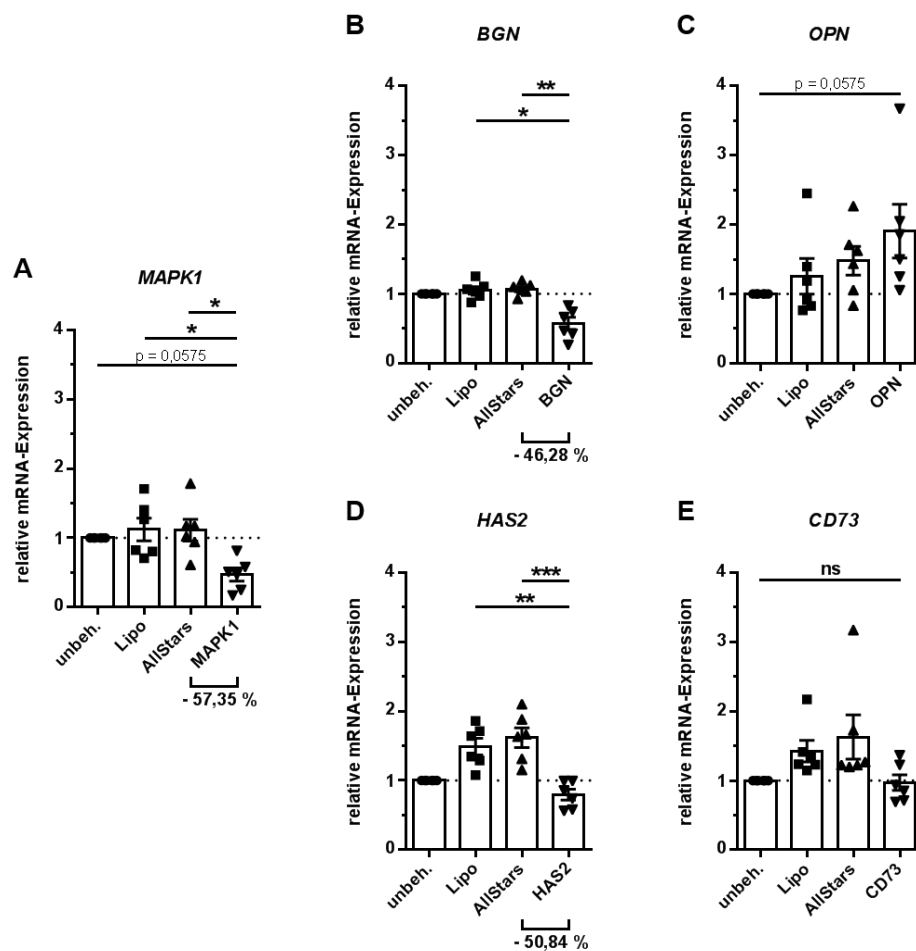


Abb. 17: Einfluss einer erhöhten Menge an siRNA auf den Gen-*knockdown* von *MAPK1*, *BGN*, *OPN*, *HAS2* und *CD73*. Ovine VICs wurden mit 3  $\mu\text{g}$  siRNA und 6  $\mu\text{l}$  Lipofectamine pro Well behandelt. Auftragung der relativen mRNA-Expression.  $n=6$ ; \*:  $p<0,05$ , \*\*:  $p<0,01$ , \*\*\*:  $p<0,001$ ; ns: nicht signifikant, MAPK1: mitogen-activated protein kinase 1, BGN: Biglykan, OPN: Osteopontin, HAS2: Hyaluronsäure-Synthase-2, CD73: Ekto-5'

*Nukleotidase, unbeh.: Kontrolle „unbehandelt“, Lipo: Kontrolle Lipofectamine, AllStars: AllStars Negative Control siRNA.*

#### 4.2.2 Einfluss der Menge an *Lipofectamine* auf den Gen-*knockdown*

Um der Frage nach der optimalen Menge an Transfektionsreagenz für einen maximal effizienten Gen-*knockdown* von *BGN*, *OPN*, *HAS2* und *CD73* nachzugehen, wurde die Menge an *Lipofectamine* von den bisher verwendeten 6  $\mu$ l auf 12  $\mu$ l pro Well erhöht (s. Tabelle 1, 4. Protokoll). Die zuletzt im Rahmen des dritten Protokolls verwendeten 3  $\mu$ l siRNA pro Well wurden beibehalten, da dies laut Herstellerprotokoll bereits der maximal empfohlenen Menge entsprach. Darüber hinaus wurde infolge der vorherigen Ergebnisse (s. Abb. 16 und Abb. 17) ein optimales Verhältnis zwischen Transfektionsreagenz und siRNA als mitbestimmender Faktor für einen effizienten Gen-*knockdown* vermutet. Abb. 18 bringt die Ergebnisse dieses RNAi-Experiments zur Darstellung. Analog zum vorherigen Versuchsdurchlauf (s. Abb. 17) gelang es auch diesmal nicht, die relative Genexpression von *MAPK1* bezogen auf die unbehandelte Kontrolle signifikant zu senken ( $p=0,1754$ , s. Abb. 18 A). Im Vergleich zu den Kontrollen *Lipofectamine* ( $p<0,01$ ) und *AllStars* ( $p<0,05$ ) wurde die relative mRNA-Expression von *MAPK1* ( $0,3584 \pm 0,0578$ ) wiederum signifikant herunterreguliert. Vergleichbar mit dem Ergebnis von Protokoll 2 (s. Abb. 16) konnte eine signifikante Herunterregulierung der relativen Genexpression von *BGN* bezogen auf alle Kontrollen erreicht werden ( $p<0,05$ , s. Abb. 18 B). Die mittlere relative mRNA-Expression von *BGN* nach siRNA-Transfektion betrug  $0,3653 \pm 0,0389$ , der mittlere Gen-*knockdown* im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle 63,47 %. Wie bereits in den vorherigen Versuchsdurchläufen konnten erneut keine signifikanten Unterschiede in der relativen Genexpression von *OPN* erzielt werden (s. Abb. 18 C). Die nach oben streuenden Einzeldaten innerhalb der Behandlungsbedingungen *Lipofectamine* (5,58) und *AllStars* (5,88) ließen sich demselben biologischen Replikat zuordnen. Ferner konnte keine signifikante Herunterregulierung der relativen mRNA-Expression von *HAS2* bezogen auf eine der Kontrollen erreicht werden (s. Abb. 18 D). Es zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied in der relativen Genexpression zwischen der unbehandelten Kontrolle und der Kontrolle *Lipofectamine* ( $p<0,05$ ). Auffällig war zudem die große Streubreite der relativen Genexpression von *HAS2* innerhalb der Behandlungsbedingung *Lipofectamine* mit einem Mittelwert von  $3,092 \pm 0,9292$  und einer Spannweite von 5,79 (Min. 1,113, Max. 6,903). Die relative mRNA-Expression von *CD73* wurde durch siRNA-Transfektion lediglich bezogen auf die Kontrolle *Lipofectamine* signifikant gesenkt ( $p<0,05$ , s. Abb. 18 E). Analog zu *HAS2* ergab sich auch für *CD73* ein unerwünschter signifikanter Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrolle und der Kontrolle *Lipofectamine* ( $p<0,05$ ).

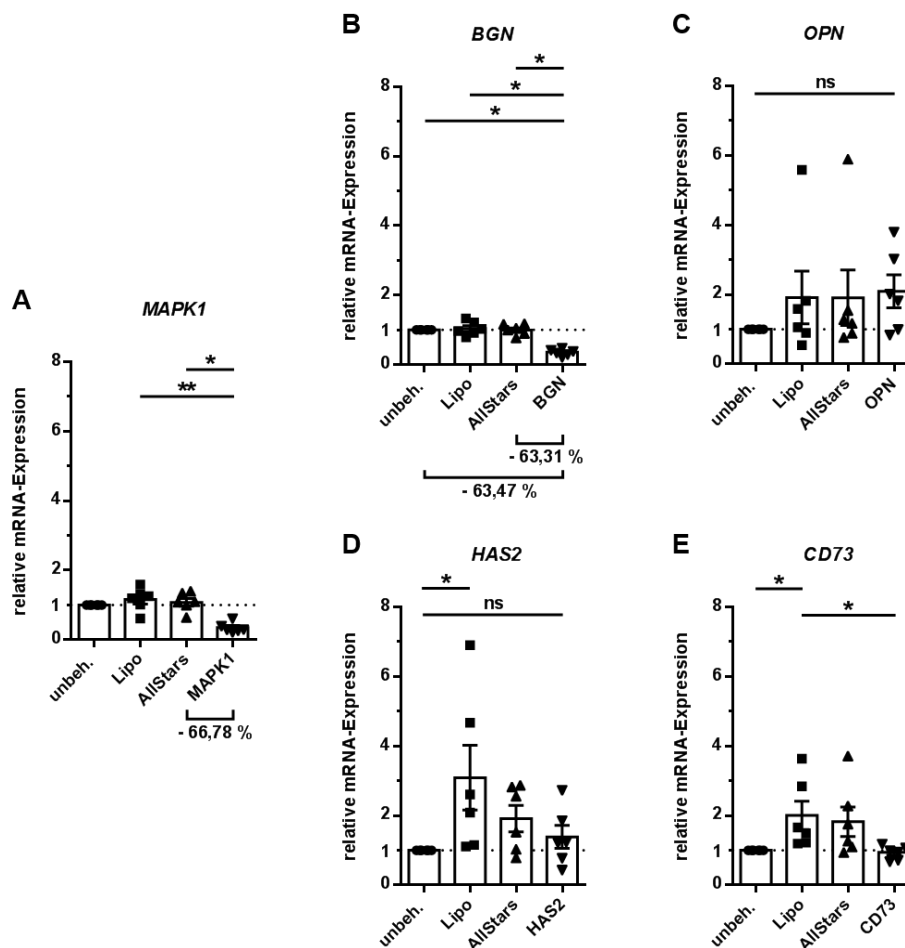


Abb. 18: Einfluss einer erhöhten Menge an Lipofectamine auf den Gen-knockdown von MAPK1, BGN, OPN, HAS2 und CD73. Ovine VICs wurden mit 3 µg siRNA und 12 µl Lipofectamine pro Well behandelt. Auftragung der relativen mRNA-Expression. n=6; \*: p<0,05, \*\*: p<0,01; ns: nicht signifikant, MAPK1: mitogen-activated protein kinase 1, BGN: Biglykan, OPN: Osteopontin, HAS2: Hyaluronsäure-Synthase-2, CD73: Ekto-5'-Nukleotidase, unbeh.: Kontrolle „unbehandelt“, Lipo: Kontrolle Lipofectamine, AllStars: AllStars Negative Control siRNA.

#### 4.2.3 Einfluss des Transfektionsreagenzes *HiPerFect* auf den Gen-knockdown

Die mit dem Transfektionsreagenz *Lipofectamine* durchgeführten Protokolle 1-4 konnten nicht bei allen Genen, insbesondere nicht bei *OPN* und *HAS2*, zu einer signifikanten Herunterregulierung der relativen mRNA-Expression führen. Aus diesem Grund kam für weitere Versuchsdurchläufe das Transfektionsreagenz *HiPerFect* zum Einsatz, welches ebenso wie die *custom*-designten siRNA-Sequenzen von *Qiagen*<sup>R</sup> bezogen wurde. Der experimentelle Ablauf wurde in Anlehnung an das „*HiPerFect Transfection Reagent Handbook*“ des Herstellers durchgeführt (s. 2.2.2). Basierend auf der Tatsache, dass ovine VICs als spezielle Fibroblasten für die *in vitro*-Kultivierung auf eine Gelatinebeschichtung angewiesen sind, wurde dabei sowohl das Protokoll für adhärente Zellen als auch das Protokoll für primäre Zellen berücksichtigt. Laut Hersteller kann die siRNA-Menge für optimale RNAi-Resultate zwischen 0,03 µg (1 nM) und 0,9 µg (30 nM) pro Well sowie die Menge an *HiPerFect* zwischen 6 µl und 18 µl pro Well variieren.

Im Rahmen des ersten RNAi-Experiments mit *HiPerFect* wurde die für Fibroblasten empfohlene Menge von 0,3 µg siRNA (10 nM) und 12 µl *HiPerFect* pro Well verwendet (s. Tabelle 2, 5. Protokoll). In

Abb. 19 sind die entsprechenden Ergebnisse dargestellt. Für die Positivkontrolle *MAPK1* zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der relativen mRNA-Expression zwischen den einzelnen Behandlungsbedingungen (s. Abb. 19 A). Damit war dies der erste Versuchsdurchlauf, bei dem nicht mindestens bezogen auf die Negativkontrolle *AllStars* eine signifikante Senkung der relativen Genexpression von *MAPK1* erreicht wurde. Wie bereits in 2.2.1 erläutert, diente die Mitbestimmung einer Positivkontrolle der internen Absicherung innerhalb eines jeden RNAi-Experiments. Auch bei den Genen *BGN*, *OPN* und *HAS2* führte die Transfektion mit den entsprechenden siRNA-Sequenzen zu keiner signifikanten Senkung der relativen mRNA-Expression verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, der Kontrolle *HiPerFect* oder der Negativkontrolle *AllStars* (s. Abb. 19 B, C, D). Die relative mRNA-Expression von *CD73* konnte hingegen bezogen auf die unbehandelte Kontrolle um durchschnittlich 34,89 % herunterreguliert werden, sodass die mittlere relative Genexpression durch siRNA-Transfektion auf  $0,6511 \pm 0,0471$  gesenkt wurde ( $p < 0,05$ , s. Abb. 19 E).

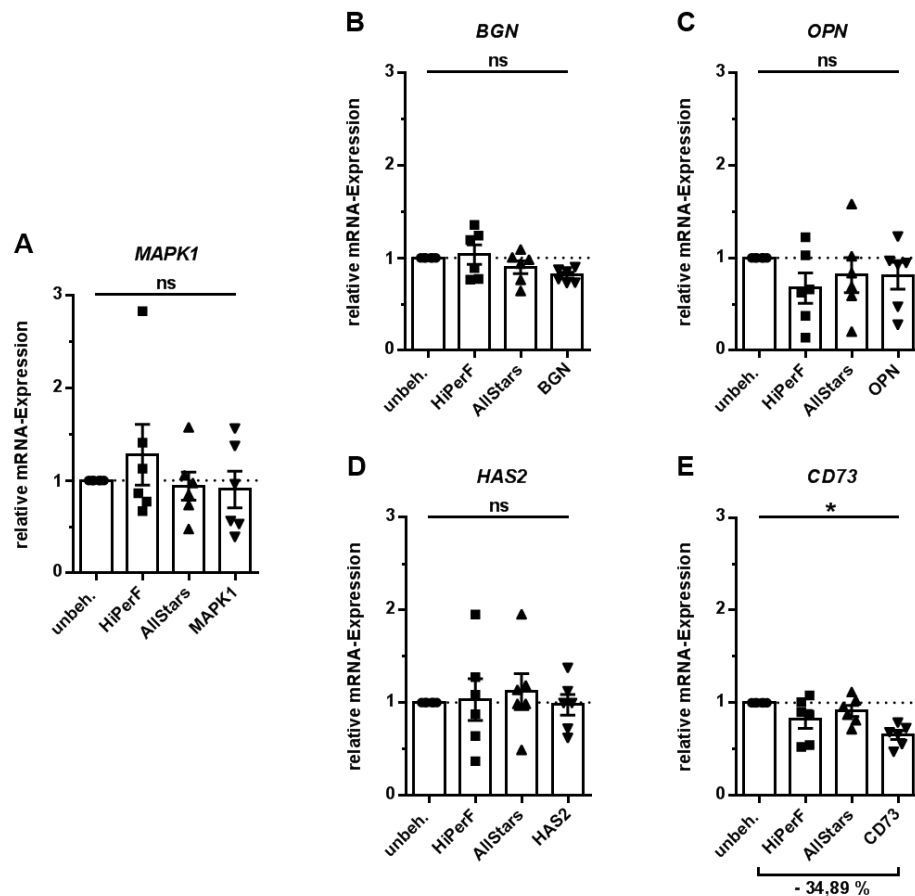


Abb. 19: Einfluss des Transfektionsreagenzes *HiPerFect* auf den Gen-knockdown von *MAPK1*, *BGN*, *OPN*, *HAS2* und *CD73*. Ovine VICs wurden mit 0,3  $\mu\text{g}$  siRNA und 12  $\mu\text{l}$  *HiPerFect* pro Well behandelt. Auftragung der relativen mRNA-Expression.  $n=6$ ; \*:  $p < 0,05$ ; ns: nicht signifikant, *MAPK1*: mitogen-activated protein kinase 1, *BGN*: Biglykan, *OPN*: Osteopontin, *HAS2*: Hyaluronsäure-Synthase-2, *CD73*: Ekto-5'-Nukleotidase, unbeh.: Kontrolle „unbehandelt“, *HiPerF*: Kontrolle *HiPerFect*, *AllStars*: *AllStars* Negative Control siRNA.

Im Rahmen des folgenden Experiments wurde die siRNA-Menge auf 0,9  $\mu\text{g}$  (30 nM) pro Well erhöht und die für Fibroblasten empfohlene Menge von 12  $\mu\text{l}$  *HiPerFect* pro Well beibehalten (s. Tabelle 2, 6. Protokoll), um eventuelle Veränderungen in der Genexpression auf die erhöhte Menge an siRNA zurückführen zu können. Die Auswertungen zu diesem Versuchsdurchlauf sind in der untenstehenden

Abb. 20 aufgeführt. In Analogie zu den Ergebnissen von Protokoll 5 ergaben sich erneut keine signifikanten Unterschiede in der relativen mRNA-Expression von *MAPK1* (s. Abb. 20 A). In der Tendenz zeigte sich jedoch immerhin eine Senkung der relativen Genexpression durch siRNA-Transfektion ( $0,7249 \pm 0,0835$ ) bezogen auf die unbehandelte Kontrolle ( $p=0,1945$ ). Die Behandlung von ovinen VICs mit der oben genannten Menge an *HiPerFect* und entsprechenden siRNA-Sequenzen für *BGN*, *OPN* bzw. *HAS2* erzielte ein vergleichbares Ergebnis wie der vorherige Versuchsansatz (s. Abb. 19). Von keinem der drei Zielgene konnte ein relativer Gen-*knockdown* bezogen auf eine der Kontrollen erreicht werden (s. Abb. 20 B, C, D). Lediglich die relative mRNA-Expression von *CD73* wurde im Vergleich zur Negativkontrolle *AllStars* um durchschnittlich 29,85 % herunterreguliert ( $p<0,05$ , s. Abb. 20 E).

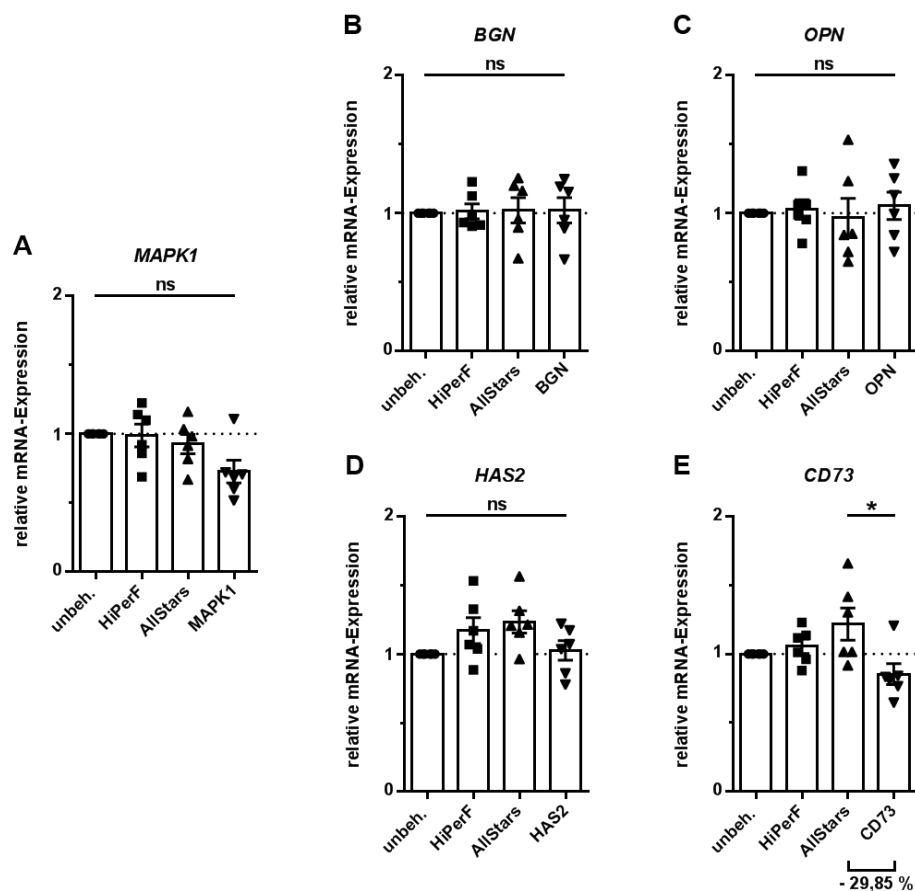


Abb. 20: Einfluss des Transfektionsreagenzes *HiPerFect* auf den Gen-*knockdown* von *MAPK1*, *BGN*, *OPN*, *HAS2* und *CD73*. Ovine VICs wurden mit  $0,9 \mu\text{g}$  siRNA und  $12 \mu\text{l}$  *HiPerFect* pro Well behandelt. Auftragung der relativen mRNA-Expression.  $n=6$ ; \*:  $p<0,05$ ; ns: nicht signifikant, *MAPK1*: mitogen-activated protein kinase 1, *BGN*: Biglykan, *OPN*: Osteopontin, *HAS2*: Hyaluronsäure-Synthase-2, *CD73*: Ekto-5'-Nukleotidase, unbeh.: Kontrolle „unbehandelt“, *HiPerF*: Kontrolle *HiPerFect*, *AllStars*: *AllStars* Negative Control siRNA.

Ab diesem Zeitpunkt der Etablierungsarbeiten wurden keine weiteren RNAi-Experimente mit den siRNA-Sequenzen für *BGN* und *CD73* durchgeführt, da der bis dahin erreichte *knockdown* beider Gene für ausreichend befunden wurde. Im Rahmen von Protokoll 1 gelang eine hochsignifikante Herunterregulierung der relativen mRNA-Expression von *CD73* um 54,87 % bezogen auf die Negativkontrolle *AllStars* ( $p<0,0001$ ,  $n=8$ , s. Abb. 15 B). Das zweite Protokoll erzielte einen durchschnittlichen Gen-*knockdown* von *BGN* um 64,84 % bezogen auf die unbehandelte Kontrolle ( $p<0,01$ ,  $n=8$ , s. Abb. 16 B).

Durch die Behandlung von ovinen VICs mit spezifischen, *custom*-designten siRNA-Sequenzen und dem Transfektionsreagenz *Lipofectamine* konnte die mittlere relative Genexpression von *CD73* auf  $0,7045 \pm 0,0629$  und von *BGN* auf  $0,3516 \pm 0,0179$  gesenkt werden.

Dementsprechend lag der Schwerpunkt weiterer Versuche auf dem Erreichen eines vergleichbar effizienten *knockdowns* der Gene *OPN* und *HAS2*. Da die bisherigen RNAi-Experimente mit *HiPerFect* keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielen konnten (s. Abb. 19 und Abb. 20), wurde die siRNA-Menge nochmals von  $0,9 \mu\text{g}$  (30 nM) auf  $2,5 \mu\text{g}$  (83,3 nM) pro Well erhöht und die Menge an *HiPerFect* mit  $12 \mu\text{l}$  pro Well konstant gehalten (s. Tabelle 2, 7. Protokoll). Die entsprechenden Auswertungen kommen in Abb. 21 zur Darstellung. Analog zu den vorherigen Versuchsdurchläufen mit *HiPerFect* wurden erneut keine signifikanten Unterschiede in der relativen Genexpression von *MAPK1* erreicht (s. Abb. 21 A). Die mittlere relative mRNA-Expression von *OPN* wurde durch siRNA-Transfektion annähernd signifikant auf  $0,6728 \pm 0,1279$  gesenkt, was einem durchschnittlichen Gen-*knockdown* von *OPN* um 32,72 % bezogen auf die unbehandelte Kontrolle entsprachen hätte ( $p=0,0645$ , s. Abb. 21 B). Die relative Genexpression von *HAS2* zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsbedingungen (s. Abb. 21 C).

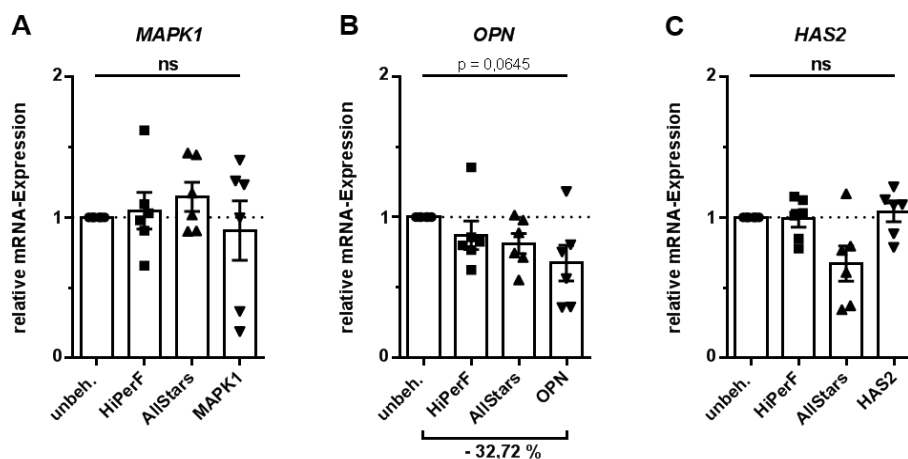


Abb. 21: Einfluss des Transfektionsreagenzes *HiPerFect* auf den Gen-*knockdown* von *MAPK1*, *OPN* und *HAS2*. Ovine VICs wurden mit  $2,5 \mu\text{g}$  siRNA und  $12 \mu\text{l}$  *HiPerFect* pro Well behandelt. Auftragung der relativen mRNA-Expression.  $n=6$ ; ns: nicht signifikant, *MAPK1*: mitogen-activated protein kinase 1, *OPN*: Osteopontin, *HAS2*: Hyaluronsäure-Synthase-2, unbeh.: Kontrolle „unbehandelt“, *HiPerF*: Kontrolle *HiPerFect*, *AllStars*: *AllStars Negative Control siRNA*.

#### 4.2.4 Einfluss neu designter siRNA-Sequenzen auf den Gen-*knockdown*

Nachdem die bisherigen RNAi-Experimente allesamt keine suffiziente Herunterregulierung der Genexpression von *OPN* und *HAS2* erreichen konnten, wurden analog zu dem in 2.2.1 beschriebenen Vorgehen für beide Gene neue siRNA-Sequenzen designt (NM\_001009224 (ovOPN), XM\_004011666 (ovHAS2), s. 3.6). In diesem Zusammenhang gilt es nochmals zu betonen, dass bis dato keine ovinen Sequenzen für *HAS2* zur Verfügung standen, sodass sowohl eine bovine siRNA-Sequenz als auch eine bovine Primersequenz verwendet werden mussten. In den folgenden Experimenten konnte nun mit ovinen Sequenzen für *HAS2* gearbeitet werden.

Die mit dem Transfektionsreagenz *HiPerFect* durchgeführten RNAi-Experimente (s. 4.2.3) konnten bis dato nicht zu dem gewünschten Ergebnis führen, die relative mRNA-Expression von *OPN* bzw. *HAS2* bezogen auf eine der Kontrollen signifikant zu senken und damit einen ausreichenden siRNA-basierten *knockdown* von einem der beiden Gene zu bewirken (s. Abb. 19, Abb. 20, Abb. 21). Darüber hinaus konnte kein mit *HiPerFect* durchgeführtes Protokoll einen signifikanten Unterschied in der relativen Genexpression von *MAPK1* erzielen, deren verlässlicher und spezifischer Gen-*knockdown* der internen Absicherung im Sinne einer Positivkontrolle dienen sollte. Im Gegensatz dazu erreichten die Versuche mit *Lipofectamine* stets einen ausreichenden Gen-*knockdown* von *MAPK1*, mindestens bezogen auf die Negativkontrolle *AllStars*, zumeist sogar bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Versuchsdurchläufe erneut das Transfektionsreagenz *Lipofectamine* verwendet.

Im Rahmen von Protokoll 2 wurde ein durchschnittlicher Gen-*knockdown* von *BGN* um 64,84 % bezogen auf die unbehandelte Kontrolle erzielt ( $p < 0,01$ ,  $n=8$ , s. Abb. 16 B). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die Transfektion mit neu *custom*-designten siRNA-Sequenzen analog zum zweiten Protokoll ebenfalls mit 1,5  $\mu\text{g}$  siRNA und 6  $\mu\text{l}$  *Lipofectamine* pro Well durchgeführt (s. Tabelle 1, 2. Protokoll). In Abb. 22 kommen die Ergebnisse dieses Versuchsdurchlaufs zur Darstellung. Wie nach den bisherigen RNAi-Experimenten mit *Lipofectamine* zu erwarten, konnte ein signifikanter Gen-*knockdown* von *MAPK1* im Vergleich zu allen Kontrollen erzielt werden (s. Abb. 22 A). Die relative mRNA-Expression wurde um durchschnittlich 72 % (bezogen auf die unbehandelte Kontrolle,  $p < 0,05$ ) bzw. 76,17 % (bezogen auf die Negativkontrolle *AllStars*,  $p < 0,05$ ) gesenkt, sodass die mittlere relative mRNA-Expression nach siRNA-Transfektion  $0,28 \pm 0,0617$  betrug. Die Behandlung von ovinen VICs mit einer neu designten siRNA-Sequenz für *OPN* führte zu keinem signifikanten Unterschied in der relativen Genexpression bezogen auf eine der Kontrollen (s. Abb. 22 B). In der Tendenz zeigte sich jedoch eine Senkung der relativen mRNA-Expression von *OPN* im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ( $p=0,0913$ ) und zur Kontrolle *Lipofectamine* ( $p=0,0508$ ) auf einen Mittelwert von  $0,4015 \pm 0,1427$ . Trotz der Verwendung von ovinen siRNA- und Primersequenzen für *HAS2* konnte keine signifikante Herunterregulierung der relativen mRNA-Expression erreicht werden (s. Abb. 22 C). Bemerkenswerterweise führte jedoch die alleinige Behandlung der Zellen mit *Lipofectamine* zu einer signifikanten Erhöhung der relativen Genexpression von *HAS2* ( $2,261 \pm 0,2851$ ) bezogen auf die unbehandelte Kontrolle ( $p < 0,05$ ). Ähnlich wie in vorherigen Versuchsdurchläufen kam es erneut zu einer großen Streubreite der relativen mRNA-Expression von *HAS2* innerhalb der Behandlungsbedingungen *AllStars* und *HAS2* mit einer Spannweite der Daten von 4,298 bzw. 3,5388.

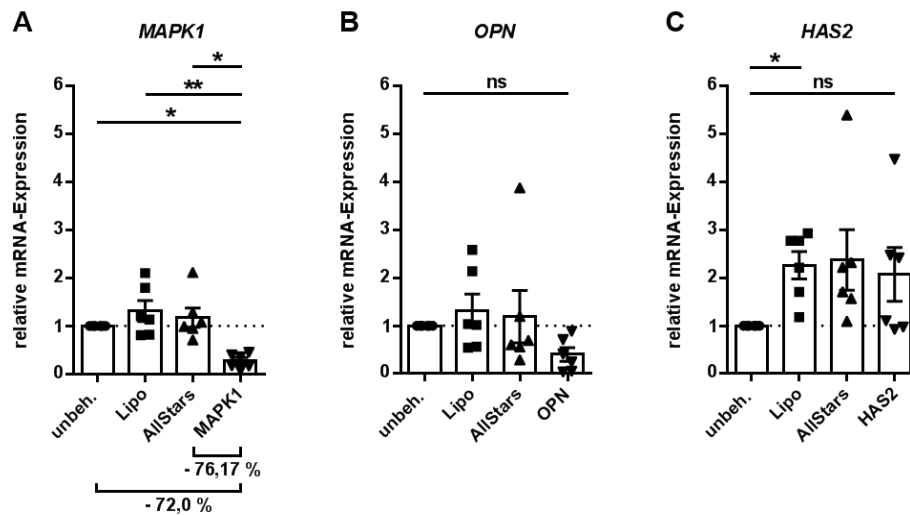


Abb. 22: Einfluss neu designter siRNA-Sequenzen auf den Gen-knockdown von *MAPK1*, *OPN* und *HAS2*. Ovine VICs wurden mit 1,5  $\mu\text{g}$  siRNA und 6  $\mu\text{l}$  Lipofectamine pro Well behandelt. Auftragung der relativen mRNA-Expression.  $n=6$ ; \*:  $p<0,05$ , \*\*:  $p<0,01$ ; ns: nicht signifikant, *MAPK1*: mitogen-activated protein kinase 1, *OPN*: Osteopontin, *HAS2*: Hyaluronsäure-Synthase-2, unbeh.: Kontrolle „unbehandelt“, Lipo: Kontrolle Lipofectamine, AllStars: AllStars Negative Control siRNA.

Im folgenden RNAi-Experiment wurde analog zum vierten Protokoll die siRNA-Menge auf 3  $\mu\text{g}$  pro Well und die Menge an *Lipofectamine* auf 12  $\mu\text{l}$  pro Well erhöht (s. Tabelle 1, 4. Protokoll), in der Hoffnung, dass sich dies positiv auf den *knockdown*-Effekt der neu designter siRNA-Sequenzen auswirken würde. In Abb. 23 sind die entsprechenden Ergebnisse dargestellt. Es zeigte sich eine hochsignifikante Herunterregulierung der relativen Genexpression von *MAPK1* um durchschnittlich 73,51 % bezogen auf die unbehandelte Kontrolle ( $p<0,01$ , s. Abb. 23 A). Dementsprechend reduzierte sich die relative mRNA-Expression durch siRNA-Transfektion auf einen Mittelwert von  $0,2649 \pm 0,0722$ . Im Rahmen dieses Versuchsdurchlaufes konnte erstmals eine signifikante Senkung der relativen Genexpression von *OPN* im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erzielt werden ( $p<0,01$ ), sodass wie bereits zuvor für *CD73* (s. Abb. 15 B) und *BGN* (s. Abb. 16 B) zwei weitere biologische Replikate mit der Frage nach Reproduzierbarkeit nachgezogen wurden (s. Abb. 23 B). Dabei ist anzumerken, dass die ovinen VICs von einem der beiden Replikate von Beginn an schwierig zu kultivieren waren. Nach dem Auftauen der kryokonservierten Zellen war bereits eine hohe Anzahl abgestorbener VICs zu verzeichnen und auch die Proliferationsrate sowie das damit verbundene Erreichen einer für die Aussat auf 6-Well-Platten ausreichenden Konfluenz gestaltete sich auffallend langsam. Aufgrund dieser mikroskopisch sichtbaren Beeinträchtigung des physiologischen Zustandes der Zellen wurden, wie in Abb. 23 B ersichtlich, die Daten des betroffenen Replikates aus der statistischen Auswertung ausgeschlossen (Kennzeichnung der exkludierten Datenwerte durch Klammern). Für  $n=7$  zeigte sich ein signifikanter Gen-*knockdown* von *OPN* um durchschnittlich 72,37 % bezogen auf die unbehandelte Kontrolle ( $p<0,01$ ) und damit eine durch siRNA-Transfektion erreichte Senkung der mittleren relativen mRNA-Expression auf  $0,2763 \pm 0,049$ . Im Verhältnis zur Negativkontrolle *AllStars* wurde kein signifikanter Unterschied in der relativen Genexpression von *OPN* erzielt, gleichzeitig zeigten auch die Kontrollen untereinander keine Signifikanzen. Ein signifikanter Gen-*knockdown* von *HAS2* bezogen auf eine der Kontrollen wurde auch in diesem Versuchsdurchlauf nicht erreicht (s. Abb. 23 C). Die Behandlung der



VICs mit der Negativkontrolle *AllStars* führte hingegen zu einer signifikanten Hochregulierung der relativen Genexpression von *HAS2* ( $3,776 \pm 1,269$ ) bezogen auf die unbehandelte Kontrolle ( $p < 0,01$ ).

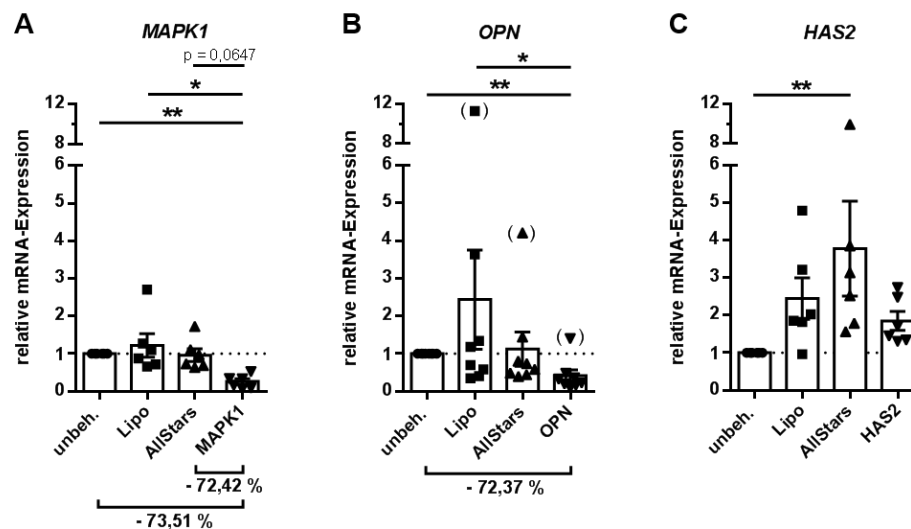


Abb. 23.: Einfluss neu designter siRNA-Sequenzen auf den Gen-knockdown von *MAPK1*, *OPN* und *HAS2*. Ovine VICs wurden mit 3  $\mu\text{g}$  siRNA und 12  $\mu\text{l}$  Lipofectamine pro Well behandelt. Auftragung der relativen mRNA-Expression.  $n=6$  (A, C),  $n=7$  (B); \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ ; *MAPK1*: mitogen-activated protein kinase 1, *OPN*: Osteopontin, *HAS2*: Hyaluronsäure-Synthase-2, unbeh.: Kontrolle „unbehandelt“, Lipo: Kontrolle Lipofectamine, AllStars: AllStars Negative Control siRNA.

#### 4.3 Auswirkung des Gen-knockdowns von *BGN* bzw. *OPN* auf die mRNA-Expression von weiteren, mit der DAVD assoziierten Genen

Der vorangegangene Abschnitt 4.2. befasst sich mit den Etablierungsarbeiten zu Protokollen, die einen signifikanten und suffizienten siRNA-basierten Gen-knockdown von *BGN*, *OPN*, *HAS2* und *CD73* in ovinen VICs erzielen sollten. Wie bereits geschildert, konnte eine signifikante Herunterregulierung der relativen mRNA-Expression von den Genen *BGN* und *OPN* um 64,84 % bzw. 72,37 % bezogen auf die unbehandelte Kontrolle erreicht werden (s. 4.2.1, Abb. 16 B und 4.2.4, Abb. 23 B). Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde im Folgenden untersucht, ob und inwiefern ein Gen-knockdown von *BGN* bzw. *OPN* die mRNA-Expression ausgewählter Gene beeinflusst, die ebenfalls an den Signalwegen und Mechanismen im Rahmen der DAVD beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurden ovine VICs gemäß dem zuvor etablierten Protokoll mit den jeweiligen Mengen an spezifischer siRNA und Transfektionsreagenz behandelt. Darüber hinaus erfolgte sechs Stunden nach siRNA-Transfektion eine zusätzliche Stimulation mit  $\beta$ -Glycerolphosphat und Kalziumchlorid zur Simulierung von degenerierenden (deg.) Bedingungen *in vitro* (s. 2.1.7). Als Kontrollen dienten unbehandelte und mit *AllStars* behandelte Zellen.

Zunächst wurde der potenzielle Einfluss des siRNA-basierten Gen-knockdowns von *BGN* unter deg. und nicht-deg. Bedingungen *in vitro* auf die mRNA-Expression der Gene *TLR2*, *TLR4*, *TGF- $\beta$*  und *DCN* (vollständige Bezeichnung s. 3.7) untersucht. In Analogie zu Kapitel 4.2.1 wurden ovine VICs mit 1,5  $\mu\text{g}$  siRNA und 6  $\mu\text{l}$  *Lipofectamine* pro Well behandelt (s. Tabelle 1, 2. Protokoll) und die relative mRNA-Expression der o. g. Gene mittels qRT-PCR-Analysen ermittelt. Wie in Abb. 24 ersichtlich, zeigten sich von keinem der vier untersuchten Gene signifikante Unterschiede in der relativen mRNA-Expression

zwischen den verschiedenen Behandlungsbedingungen ( $n=4$ , s. Abb. 24 A, B, C, D). Der Gen-*knockdown* von *BGN* unter deg. Bedingungen (*BGN* DEG) führte zu einer immerhin annähernd signifikanten Erhöhung der relativen mRNA-Expression von *TGF- $\beta$*  bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (unbeh. DEG) ( $p=0,0755$ , s. Abb. 24 C). Sowohl bei den mit spezifischer siRNA (*BGN*) als auch bei den mit *AllStars* behandelten VICs unter nicht-deg. Bedingungen (*AllStars*) fiel eine extreme Streubreite der relativen Genexpression der vier o. g. Gene auf. Aus diesem Grund ergab sich in der Tendenz eine Erhöhung der relativen mRNA-Expression durch den Gen-*knockdown* von *BGN* unter nicht-deg. Bedingungen. Ein ähnliches, ebenfalls nicht signifikantes Ergebnis deutete sich durch die Behandlung der VICs mit der Negativkontrolle *AllStars* an.

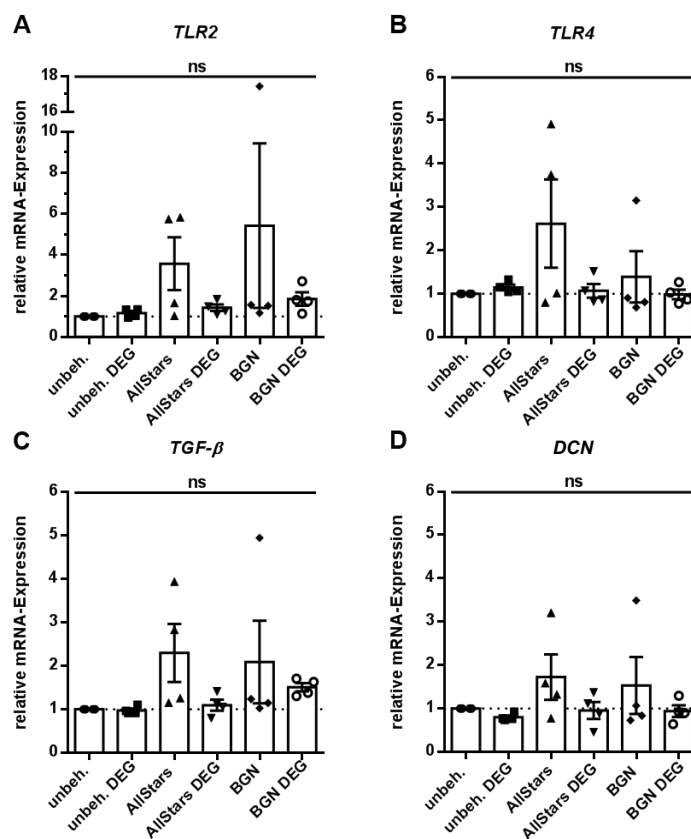


Abb. 24: Auswirkung des Gen-*knockdowns* von *BGN* auf die relative mRNA-Expression von *TLR2*, *TLR4*, *TGF- $\beta$*  und *DCN*. Ovine VICs wurden mit 1,5  $\mu$ g siRNA und 6  $\mu$ l Lipofectamine pro Well behandelt. Sechs Stunden nach siRNA-Transfektion erfolgte die Stimulation mit 10 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat und 1,5 mM Kalziumchlorid.  $n=4$ ; ns: nicht signifikant, *TLR2*: toll like receptor 2, *TLR4*: toll like receptor 4, *TGF- $\beta$* : transforming growth factor beta, *DCN*: decorin, unbeh.: Kontrolle „unbehandelt“, *AllStars*: *AllStars* Negative Control siRNA, *BGN*: Biglykan, *DEG*: Behandlung mit degenerierendem Zellkulturmedium, angereichert mit  $\beta$ -Glycerolphosphat und Kalziumchlorid.

Weiterhin wurde untersucht, ob der siRNA-basierte Gen-*knockdown* von *OPN* die mRNA-Expression der Gene *MMP2*, *MMP9*, *BGLAP* und *ACTA2* (vollständige Bezeichnung s. 3.7) unter deg. und nicht-deg. Bedingungen *in vitro* beeinflusst. Entsprechend Kapitel 4.2.4 wurden ovine VICs mit 3  $\mu$ g siRNA und 12  $\mu$ l *Lipofectamine* pro Well behandelt (s. Tabelle 1, 4. Protokoll). Abb. 25 dokumentiert die mittels qRT-PCR-Analysen ermittelte relative mRNA-Expression der o. g. Gene unter den verschiedenen Behandlungsbedingungen. Vergleichbar mit den Ergebnissen des vorherigen Versuches bewirkte der Gen-*knockdown* von *OPN* keinen signifikanten Unterschied in der relativen mRNA-Expression von

*MMP2*, *MMP9*, *BGLAP* und *ACTA2* bezogen auf eine der Kontrollen (n=4, s. Abb. 25 A, B, C, D). Einzig durch die Negativkontrolle *AllStars* unter deg. Bedingungen (*AllStars* DEG) wurde eine signifikante Erhöhung der relativen Genexpression von *BGLAP* bezogen auf die unbehandelte Kontrolle erreicht (p<0,05, s Abb. 25 C). Bei den mit spezifischer siRNA und deg. Zellkulturmedium behandelten VICs (*OPN* DEG) zeigte sich eine auffallend große Streubreite der relativen mRNA-Expression aller vier Gene, wobei der am stärksten nach oben streuende Datenwert von *MMP2*, *BGLAP* und *ACTA2* demselben biologischen Replikat zugeordnet werden konnte. Die Spannweite der relativen mRNA-Expression von *MMP9* betrug 33,009 (Min. 1,491, Max. 34,5), mit einem Mittelwert von  $19,74 \pm 7,572$  (s. Abb. 25 B).

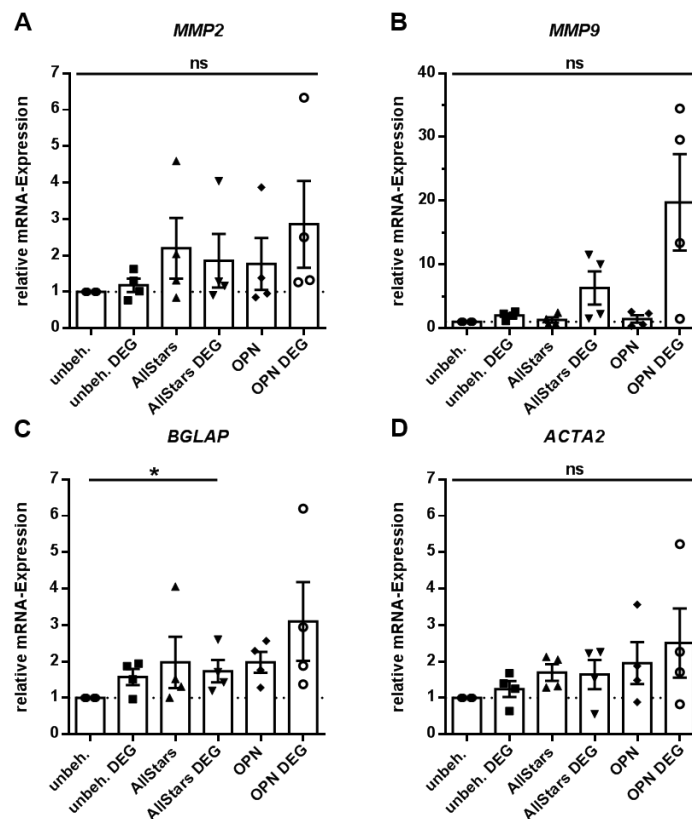


Abb. 25: Auswirkung des Gen-knockdowns von *OPN* auf die relative mRNA-Expression von *MMP2*, *MMP9*, *BGLAP* und *ACTA2*. Ovine VICs wurden mit 3  $\mu$ g siRNA und 12  $\mu$ l Lipofectamine pro Well behandelt. Sechs Stunden nach siRNA-Transfektion erfolgte die Stimulation mit 10 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat und 1,5 mM Kalziumchlorid. n=4; \*: p<0,05; ns: nicht signifikant, *MMP2*: matrix metalloproteinase 2, *MMP9*: matrix metalloproteinase 9, *BGLAP*: bone gamma-carboxyglutamate protein, *ACTA2*: actin alpha 2, smooth muscle, aorta, unbeh.: Kontrolle „unbehandelt“, *AllStars*: *AllStars* Negative Control siRNA, *OPN*: *Osteopontin*, DEG: Behandlung mit degenerierendem Zellkulturmedium, angereichert mit  $\beta$ -Glycerolphosphat und Kalziumchlorid.

#### 4.4 Auswirkung des Gen-knockdowns von *BGN* bzw. *OPN* auf die Kalziumakkumulation in ovinen VICs

Im Anschluss an eine erfolgreiche siRNA-basierte Herunterregulierung der relativen mRNA-Expression von *BGN* und *OPN* (s. 4.2.1, Abb. 16 B und 4.2.4, Abb. 23 B) wurde in weiteren Experimenten untersucht, ob und inwiefern sich dieser Gen-knockdown auf die Kalziumakkumulation in ovinen VICs auswirkt. In diesem Zusammenhang wurden ovine VICs gemäß dem zuvor etablierten Protokoll mit den

jeweiligen Mengen an spezifischer siRNA und Transfektionsreagenz behandelt. In Analogie zu 4.3 erfolgte sechs Stunden nach siRNA-Transfektion eine Stimulation mit  $\beta$ -Glycerolphosphat und Kalziumchlorid, um *in vitro* deg. Bedingungen nachzuahmen (s. 2.1.7). Anhand von Kalzium-Assay-Analysen wurde die Kalziumkonzentration als Indikator für den degenerierten Zustand der Zellen bestimmt und auf die mittels BCA-Assay gemessene Proteinkonzentration normiert (s. 2.4 und 2.5). Als Kontrollen dienten unbehandelte und mit *AllStars* behandelte VICs.

Zunächst wurde untersucht, wie sich der siRNA-basierte Gen-*knockdown* von *BGN* unter deg. und nicht-deg. Bedingungen *in vitro* auf die Kalziumkonzentration in ovinen VICs auswirkt. Entsprechend Kapitel 4.2.1 wurden ovine VICs mit 1,5  $\mu$ g siRNA und 6  $\mu$ l *Lipofectamine* pro Well behandelt (s. Tabelle 1, 2. Protokoll). In Abb. 26 ist die Kalziumkonzentration der lysierten VICs unter den verschiedenen Behandlungsbedingungen in  $\mu$ g pro mg Protein aufgetragen. Wie zu erwarten führte die Behandlung der Zellen mit deg. Zellkulturmedium (unbeh. DEG, *AllStars* DEG, *BGN* DEG) zu einer signifikanten Erhöhung der Kalziumkonzentration im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ( $p < 0,01$ ). Auch bei der Negativkontrolle *AllStars* wurde durch die Stimulation mit  $\beta$ -Glycerolphosphat und Kalziumchlorid ein signifikanter Anstieg der Kalziumkonzentration in den VICs bezogen auf die Behandlung mit normalem Zellkulturmedium erreicht ( $p < 0,01$ ). Bei den mit spezifischer siRNA transfizierten Zellen bewirkte die Behandlung mit deg. Zellkulturmedium hingegen keinen signifikanten Unterschied in der Kalziumkonzentration ( $p = 0,094$ ). Deutlich erkennbar war zudem eine große Streubreite der Kalziumkonzentration innerhalb der Behandlungsbedingungen *AllStars* DEG (Spannweite 28,752) und *BGN* DEG (Spannweite 28,29). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Gen-*knockdown* von *BGN* weder unter deg. ( $13,03 \pm 3,473$ ) noch unter nicht-deg. Bedingungen ( $1,175 \pm 0,2024$ ) *in vitro* zu einem signifikanten Unterschied in der Kalziumkonzentration bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle führen konnte.

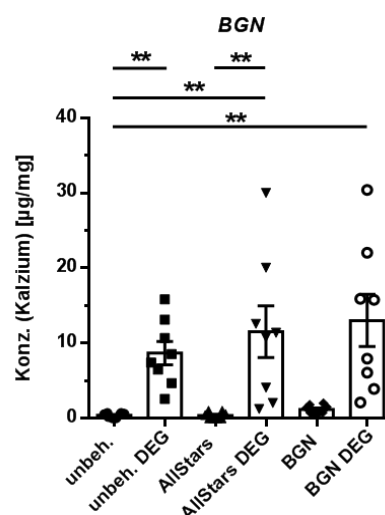


Abb. 26: **Auswirkung des Gen-*knockdowns* von *BGN* auf die Kalziumkonzentration in ovinen VICs.** Ovine VICs wurden mit 1,5  $\mu$ g siRNA und 6  $\mu$ l *Lipofectamine* pro Well behandelt. Sechs Stunden später erfolgte die Stimulation mit 10 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat und 1,5 mM Kalziumchlorid. Auftragung der Kalziumkonzentration in  $\mu$ g/mg, nach Normierung auf die mittels BCA-Assay gemessene Proteinkonzentration.  $n=8$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; unbeh.: Kontrolle

„unbehandelt“, *AllStars*: *AllStars Negative Control siRNA*, *BGN*: *Biglykan*, *DEG*: *Behandlung mit degenerierendem Zellkulturmedium, angereichert mit  $\beta$ -Glycerolphosphat und Kalziumchlorid*.

Des Weiteren wurde der Einfluss eines siRNA-basierten Gen-*knockdowns* von *OPN* unter deg. und nicht-deg. Bedingungen *in vitro* auf die Kalziumkonzentration in ovinen VICs untersucht. Zu diesem Zweck wurden ovine VICs analog zu Kapitel 4.2.4 mit 3  $\mu$ g siRNA und 12  $\mu$ l *Lipofectamine* pro Well behandelt (s. Tabelle 1, 4. Protokoll) und die Kalziumkonzentration in  $\mu$ g pro mg Protein bestimmt. In Abb. 27 sind die entsprechenden Ergebnisse zu diesem Experiment dargestellt. Die Stimulation mit deg. Zellkulturmedium unter dem Einfluss der Negativkontrolle (*AllStars* DEG) und des Gen-*knockdowns* von *OPN* (*OPN* DEG) führte zu einem signifikanten Anstieg der Kalziumkonzentration bezogen auf die unbehandelte Kontrolle ( $p < 0,001$  bzw.  $p < 0,0001$ ), während die alleinige Zellstimulation (unbeh. DEG) keinen signifikanten Unterschied bewirken konnte ( $p = 0,0804$ ). Innerhalb der Behandlung mit *AllStars* bzw. mit spezifischer siRNA-Sequenz für *OPN* führte die Stimulation mit  $\beta$ -Glycerolphosphat und Kalziumchlorid zu einer signifikanten Erhöhung der Kalziumkonzentration ( $p < 0,01$ ). Bei den mit siRNA transfizierten VICs unter deg. Bedingungen (*OPN* DEG) zeigte sich eine extreme Streubreite der Kalziumkonzentration mit einer Spannweite von 198,32 (Min. 33,28, Max. 231,6) und einem Mittelwert von  $101,8 \pm 21,29$ . Insgesamt führte der siRNA-basierte Gen-*knockdown* von *OPN* weder unter deg. ( $101,8 \pm 21,29$ ) noch unter nicht-deg. Bedingungen ( $2,89 \pm 0,6422$ ) *in vitro* zu einem signifikanten Unterschied in der Kalziumkonzentration bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle. Als Trend erkennbar zeigte sich hier jedoch unter *OPN* DEG die höchste Kalziumkonzentration im Vergleich zur eigenen Kontrolle (*OPN*) und im Vergleich zu den nicht-transfizierten Gruppen unter deg. Bedingungen.

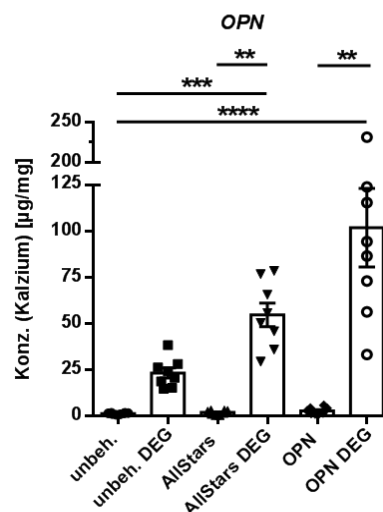


Abb. 27: **Auswirkung des Gen-*knockdowns* von *OPN* auf die Kalziumkonzentration in ovinen VICs.** Ovine VICs wurden mit 3  $\mu$ g siRNA und 12  $\mu$ l *Lipofectamine* pro Well behandelt. Sechs Stunden später erfolgte die Stimulation mit 10 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat und 1,5 mM Kalziumchlorid. Auftragung der Kalziumkonzentration in  $\mu$ g/mg, nach Normierung auf die mittels BCA-Assay gemessene Proteinkonzentration.  $n=8$ ; \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ; unbeh.: Kontrolle „unbehandelt“, *AllStars*: *AllStars Negative Control siRNA*, *OPN*: *Osteopontin*, *DEG*: *Behandlung mit degenerierendem Zellkulturmedium, angereichert mit  $\beta$ -Glycerolphosphat und Kalziumchlorid*.

## 5 Diskussion

### 5.1 Bewertung der angewandten Methoden

#### 5.1.1 Zellen und Probenanzahl

Sämtliche zellkulturelle und molekularbiologische Experimente wurden mit ovinen VICs durchgeführt. Die langjährige und umfangreiche laborinterne Erfahrung, die einfache und nahezu unbegrenzte Verfügbarkeit sowie die geringen Beschaffungskosten stellten erhebliche Vorteile bei der Arbeit mit diesen Zellen dar. Zudem besaßen die Schafsherzen eine für die unkomplizierte und exakte Abtrennung der aortalen Klappentaschen ausreichende Organgröße. Allerdings sind die genetischen Kenntnisse der Spezies *Ovis aries* verglichen mit dem humanen oder murinen Genom noch immer limitiert und die molekularbiologischen Werkzeuge dementsprechend stärker begrenzt (54). Für die vorliegende Arbeit ergab sich dadurch die Herausforderung, dass entsprechende ovine siRNA- und Primersequenzen zunächst designt werden mussten, da nicht auf kommerziell verfügbare und validierte Produkte zurückgegriffen werden konnte. Nichtsdestotrotz hat sich das juvenile Schaf als standardmäßiges Tiermodell zur präklinischen Prüfung von biologischen Klappenprothesen etabliert, da sich die ovine und die humane Physiologie bezüglich Herzfrequenz, Herzzeitvolumen und intrakardialer Druckverhältnisse stark ähneln (55). Solche Modelle dienen der Analyse von Haltbarkeit und degenerativ-kalzifizierenden Veränderungen nach biologischem Herzklappenersatz (55). Dies unterstreicht die Relevanz der Spenderspezies Schaf in der kardiovaskulären Forschung und stellt ein weiteres Argument für die Arbeit mit ovinen Zellen dar. Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Etablierung einer Methodik für weiterführende *in vitro*-Analysen und bewegt sich im Bereich der Grundlagenforschung. Die Frage nach einer Übertragbarkeit der Ergebnisse vom ovinen auf den menschlichen Organismus könnte daher Gegenstand von nachfolgenden Forschungsprojekten sein.

Im Rahmen der Etablierungsarbeiten zu einem siRNA-basierten *knockdown* der genannten Gene wurde eine konstante Probenanzahl von  $n=6$  ausgewählt. Dies sollte einerseits den materiellen und zeitlichen Aufwand des repetitiven experimentellen Ansatzes begrenzen und andererseits möglichst valide statistische Aussagen erlauben. Trotzdem ist davon auszugehen, dass eine größere Probenanzahl bei einigen Versuchsdurchläufen zu einer Verbesserung der Ergebnisse und einer Erhöhung der statistischen Signifikanz geführt hätte. An dieser Stelle sei jedoch noch einmal darauf hingewiesen, dass es sich bei den Proben um echte biologische Replikate von unabhängigen Individuen handelte.

#### 5.1.2 Custom-Design von chemisch synthetisierten siRNA-Sequenzen

Eine der größten Herausforderungen im Zusammenhang mit RNAi-Experimenten ist die Auswahl einer effizienten, zur Ziel-mRNA des zu regulierenden Gens komplementären siRNA-Sequenz, von deren Funktionalität der Erfolg des Gen-*knockdowns* wesentlich abhängt (1). Wie bereits in 5.1.1 erwähnt, bringt die Arbeit mit Zellen der Spezies *Ovis aries* den Nachteil mit sich, dass vorkonfigurierte und validierte siRNA-Sequenzen nicht kommerziell zur Verfügung stehen. In Anbetracht der fehlenden laborinternen Erfahrung sowie der zahlreichen sich teilweise überlappenden, teilweise widersprechenden

Algorithmen für optimales siRNA-Design (8) wurde entschieden, die benötigten siRNA-Sequenzen nicht selbstständig zu designen. Stattdessen wurde das Online-Programm „*Configure & Order HP Custom siRNA*“ von *Qiagen*<sup>R</sup> mit dem Design der entsprechenden siRNAs beauftragt. Laut Anbieter wurde der zugrundeliegende Algorithmus umfassend evaluiert und zeigte dabei eine signifikante Leistungsverbesserung im Vergleich zu anderen Design-Programmen. Trotzdem weist *Qiagen*<sup>R</sup> darauf hin, dass keine Garantie für die Funktionalität der von ihnen *custom*-designten siRNA-Sequenzen besteht. Vorteile dieses spezialisierten Design-Programmes waren zum einen das bereits erprobte, standardisierte Auswahlverfahren für effiziente siRNAs und zum anderen die diesbezügliche Erfahrung und Expertise. Dadurch erhoffte man sich eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für maximale siRNA-Funktionalität und einen dementsprechend größeren *knockdown*-Erfolg. Nachteile waren die fehlende Kontrolle bei der Auswahl von geeigneten Parametern und beim eigentlichen Designprozess sowie der daraus resultierende Mangel an Nachvollziehbarkeit und Reproduzierbarkeit. In den vergangenen Jahren wurden unzählige Algorithmen und Software-Tools für das Designen von siRNA-Sequenzen entwickelt; alle mit dem gleichen Ziel, die siRNA-Spezifität und -Effizienz zu maximieren sowie gleichzeitig unspezifische Effekte zu minimieren (8). Allerdings gestaltet sich die Wahl einer optimalen Design-Software schwierig, da jedes dieser Programme (z. B. „*siDESIGN Center*“ von *Dharmacon*, „*BLOCK-iT RNAi designer*“ von *ThermoFisher Scientific* oder „*RNAi explorer*“ von *Gene Link Inc.*) auf einem anderen Algorithmus basiert, welcher wiederum unterschiedliche Parameter berücksichtigt (8). Gleichzeitig gibt es nur wenige vergleichende Daten darüber, welcher dieser Ansätze die größte Vorhersagekraft bezüglich der Effizienz einer siRNA-Sequenz besitzt und welche siRNA-Kriterien am stärksten mit einem erfolgreichen Gen-*knockdown* korrelieren (56). Im Hinblick auf diese Fragestellung analysierten *Matveeva et al.* zehn publizierte Algorithmen für siRNA-Design hinsichtlich ihrer Fähigkeit, zwischen effizienten und ineffizienten siRNA-Sequenzen zu unterscheiden (56). Dabei errechnete sich für alle untersuchten Algorithmen ein signifikanter Korrelationskoeffizient zwischen der theoretisch vorhergesagten und der experimentell bestimmten siRNA-Effizienz, sodass jeder dieser methodischen Ansätze prinzipiell als geeignet bewertet wurde (56). Nach Analyse der gängigsten Parameter, Algorithmen und Design-Softwares konnten *Fakhr et al.* zeigen, dass deren kombinierte Anwendung die Wahrscheinlichkeit für eine funktionale siRNA nochmals deutlich erhöhen kann (8, 57, 58). Dennoch existiert keine hundertprozentige Garantie für eine effiziente siRNA-Sequenz, trotz Berücksichtigung diverser Kriterien, Nutzung verschiedener Online-Programme und abschließender Spezifitätskontrolle via „*NCBI BLAST*“ (8). Ob eine *custom*-designte siRNA-Sequenz im Rahmen eines RNAi-Experiments einen erfolgreichen *knockdown* des Zielgens bewirkt, bleibt letztlich unabhängig von der verwendeten Design-Methode nicht sicher vorhersehbar (59).

Aufgrund des hohen zeitlichen und finanziellen Aufwands wurde zunächst jeweils ein siRNA-Doppelstrang pro Zielgen von *Qiagen*<sup>R</sup> *custom*-design und im experimentellen Ansatz auf Funktionalität und Effizienz getestet. Im Laufe der Etablierungsarbeiten wurde entschieden, eine zweite Sequenz für die Zielgene *OPN* und *HAS2* zu kreieren, da sich bis dato keine Herunterregulierung der relativen mRNA-Expression beider Gene angedeutet hatte. Dennoch stellt sich die berechtigte Frage, ob durch weitere,

neu designte siRNA-Sequenzen eventuell bessere Ergebnisse hätten erzielt werden können. Dies gilt ebenfalls im Hinblick auf die Gene *BGN*, *OPN* und *CD73*, für die ein signifikanter Gen-*knockdown* erreicht werden konnte. Darüber hinaus wird die Wahrscheinlichkeit als sehr gering eingeschätzt, dass eine einzige, anhand von Algorithmen designte siRNA-Sequenz zu einer signifikanten Herunterregulierung des gewünschten Zielgens führt (8). Dies liegt zum einen an der extremen Effizienzvariabilität von siRNAs und zum anderen an unspezifischen Bindungen, deren ungewollte Genregulierungen durch den Einsatz von mehreren Sequenzen detektiert werden können (8, 59). Aus diesem Grund wird nach allgemeinem Konsens empfohlen, mindestens drei gegen verschiedene Regionen desselben Zielgens gerichtete siRNA-Sequenzen entweder nacheinander oder gleichzeitig zu analysieren (8, 59). Für humane oder murine Zielgene besteht sogar die Möglichkeit, bei den gängigen Herstellern ein fertiges Gemisch aus vier unabhängigen siRNA-Doppelsträngen, sog. siRNA-Pools, zu erwerben. (1). Parsons *et al.* führten einen direkten Vergleich dieser beiden Verfahren, d. h. dem Einsatz von mehreren, einzelnen siRNA-Sequenzen und dem Einsatz von siRNA-Pools, hinsichtlich ihrer Effektivität durch (59). Dabei zeigte sich, dass der durch einen siRNA-Pool erreichte effektive Gen-*knockdown* am ehesten dem kumulativen *knockdown*-Effekt durch die entsprechenden individuellen siRNA-Sequenzen entspricht (59). Neben den offensichtlichen Vorteilen, z. B. erhöhte Durchsatzrate und Materialersparnis, führt der Einsatz von siRNA-Pools mit größerer Wahrscheinlichkeit zu einer signifikanten Gensuppression, da die Effekte der einzelnen siRNAs für sich genommen häufig keine messbare Verminderung der Genexpression bewirken (59). In Anbetracht dieser Studienergebnisse ist es bemerkenswert, dass im Rahmen der durchgeführten RNAi-Experimente mit jeweils einem *custom*-designten siRNA-Doppelstrang eine signifikante Herunterregulierung der relativen mRNA-Expression von *BGN*, *OPN* und *CD73* erzielt werden konnte. Ausgehend von den beiden üblichen Vorgehensweisen, entweder chemisch synthetisierte siRNAs oder vektoriell exprimierte shRNAs einzusetzen, wurde im vorliegenden Fall die erste Variante angewandt. Ein großer Vorteil dieses Verfahrens war der vergleichsweise geringe experimentelle Aufwand. Die synthetischen siRNA-Sequenzen waren ohne weitere Aufbereitung direkt einsatzbereit und mussten lediglich mithilfe eines Transfektionsreagenzes in die Zielzellen eingeschleust werden. Der potenzielle *knockdown*-Erfolg konnte bereits nach 72 Stunden überprüft werden. Studien haben allerdings gezeigt, dass Stammzellen und primäre Zellen, zu denen die VICs als spezielle Fibroblasten zählen, häufig schwer zu transfizieren sind, sodass hier die Virus-basierte Transfektion von Expressionsvektoren tendenziell erfolgreicher ist (60, 61). Dieses deutlich aufwendigere Verfahren setzt jedoch eine Laborzulassung für gentechnische Arbeiten der Sicherheitsstufe 2 voraus und war aus diesem Grund nicht ohne Weiteres umsetzbar. Ein weiterer, entscheidender Nachteil von synthetischer siRNA ist die zeitliche Begrenzung des Gen-*knockdowns*, dessen Dauer direkt von der Proliferationsrate der Versuchszellen abhängt. Da die lipidvermittelte siRNA-Transfektion zu keiner Genomveränderung führt, wird die erzielte Gensuppression nicht auf die Tochterzellen vererbt. Aus diesem Grund mussten die siRNA-Sequenzen bei jedem Experiment neu in die Zellen eingebracht werden, was einen zeitlichen und finanziellen Mehraufwand zur Folge hatte (1). Im Gegensatz dazu ermöglicht der Einsatz eines Expressionsvektors, der nach Integration in das zelluläre Genom permanent shRNA-Sequenzen exprimiert, einen



konstitutiven, also dauerhaften *Gen-knockdown* (1, 8). Die meisten Experimente, die von der Methode eines siRNA-basierten *Gen-knockdowns* profitieren würden, besitzen eine Laufzeit von mehreren Tagen. Daher ist es fraglich, ob und inwiefern die transiente Herunterregulierung eines Zielgens für länger andauernde Experimente genutzt werden kann. Techniken zur zeitlichen Verlängerung der Gensuppression, beispielsweise der Einsatz von chemisch stabilisierter siRNA oder eine wiederholte siRNA-Transfektion der Zellen (1), wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht angewandt, stellen aber eine Möglichkeit zur künftigen Lösung dieses Problems dar.

### 5.1.3 Auswahl des Transfektionsreagenzes

Im Rahmen der durchgeführten RNAi-Experimente wurden die chemisch synthetisierten siRNA-Sequenzen lipidvermittelt in die Zielzellen eingeschleust. Hierbei handelt es sich um eine chemische Transfektionstechnik, die auf der Verwendung eines sog. Lipid-basierten Transfektionsreagenzes beruht (60). Das Prinzip dieser Methode ist die Komplexierung der negativ geladenen siRNA-Moleküle durch kationische Lipide und die anschließende Passage der positiv geladenen Lipid-Nukleinsäure-Komplexe durch die Zellmembran (62). Vorteile der lipidvermittelten Transfektion sind die hohe siRNA-Transportkapazität, das breite kommerzielle Angebot von Reagenzien sowie deren einfache Anwendung im Experiment (60). Die Transfektionseffizienz ist allerdings im Vergleich zu anderen Verfahren deutlich geringer, da sie von zahlreichen Faktoren wie dem verwendeten Zelltyp abhängt und zudem durch die Zytotoxizität der Lipid-Polymere begrenzt wird (62).

Die Auswahl an kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenzien hat in den letzten Jahren stetig zugenommen, was die Entscheidung für das optimale Produkt entsprechend erschwert. Die ersten RNAi-Experimente wurden mit dem Transfektionsreagenz *Lipofectamine* von *ThermoFisher Scientific Inc. Invitrogen* durchgeführt, da hiermit bereits positive Erfahrungen in der Arbeitsgruppe gesammelt wurden. Die verschiedenen *Lipofectamine*-Reagenzien sind die mit Abstand meistverwendeten Lipid-basierten Transfektionsreagenzien und gelten mit über 50.000 Referenzen als Goldstandard (63). Mehrere Studien belegen, dass mit *Lipofectamine* ein erfolgreicher *Gen-knockdown* in Stammzellen (60) und primären Zellen (64) möglich ist, obwohl die lipidvermittelte siRNA-Transfektion dieser Zellen im Allgemeinen eine geringe Effizienz aufweist (75). In der vorliegenden Arbeit konnten diese Beobachtungen bestätigt und ein signifikanter *Gen-knockdown* von *BGN*, *OPN* und *CD73* in ovinen VICs erreicht werden.

Darüber hinaus wurden Versuchsdurchläufe mit dem Transfektionsreagenz *HiPerFect* von *Qiagen*<sup>R</sup> durchgeführt. Da sämtliche siRNA-Sequenzen ebenfalls von *Qiagen*<sup>R</sup> *custom*-designt und hergestellt wurden, war von einer hohen Kompatibilität der verwendeten Produkte auszugehen. Ein weiterer Vorteil bestand in der geringen Zytotoxizität, die laut Hersteller sogar eine mehrfache Transfektion und somit eine anhaltende Gensuppression von bis zu zwei Wochen ermöglicht. Dennoch wurden keine signifikanten *knockdown*-Effekte beobachtet, obwohl die eingesetzten siRNA- und *HiPerFect*-Konzentrationen den Herstellerempfehlungen entsprachen. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass die im Handbuch aufgeführten Transfektionsprotokolle mit humanen Zellen entwickelt wurden und möglicherweise nur

begrenzt auf ovine Zellen übertragbar sind. Zudem empfiehlt *Qiagen*<sup>R</sup> verschiedene siRNA-Mengen für adhärenzte Zellen ( $0,15 \mu\text{g} \hat{=} 5 \text{ nM}$ ) und für primäre Zellen bzw. Fibroblasten ( $0,3 \mu\text{g} \hat{=} 10 \text{ nM}$ ) als Ausgangspunkt für Optimierungen. Da ovine VICs in beide Kategorien fallen, erscheinen diese Angaben widersprüchlich. Letztlich dienten die Angaben für Fibroblasten als Orientierung, der Einfluss von geringeren siRNA-Mengen auf den *knockdown*-Erfolg wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

Interessanterweise stimmen die hier aufgeführten, eigenen Erfahrungen mit den Ergebnissen von Nabzdyk *et al.* überein. In RNAi-Analysen mit glatten Gefäßmuskelzellen der Aorta erzielte *Lipofectamine*<sup>R</sup> *RNAiMax* die 2,5-fache Transfektionsrate von *HiPerFect* und erwies sich damit im direkten Vergleich als das weitaus potentere und effizientere Transfektionsreagenz (65).

#### 5.1.4 Klassische Transfektion vs. *Fast-Forward*- und *Reverse*-Transfektion

Ein erfolgreiches RNAi-Experiment erfordert eine effiziente Methode zur Einschleusung der siRNA-Sequenzen in die Zielzellen (1). Zurzeit existieren drei verschiedene Möglichkeiten, um eine siRNA-Transfektion mithilfe eines Lipid-basierten Transfektionsreagenzes durchzuführen: Die klassische Vorwärts- (*Forward*-) Transfektion, die schnelle Vorwärts- (*Fast-Forward*-) Transfektion und die Rückwärts- (*Reverse*-) Transfektion. Bei der klassischen Transfektion werden die Versuchszellen zunächst für 24 Stunden unter normalen Wachstumsbedingungen ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $5 \text{ } \%$   $\text{CO}_2$ ) inkubiert, bevor tags darauf die entsprechenden siRNA-Sequenzen und das Transfektionsreagenz komplexiert und hinzugefügt werden. Hierbei handelt es sich um das älteste und geläufigste Verfahren, sodass in diesem Zusammenhang auch von den meisten Erfahrungsberichten auszugehen war. Aus diesem Grund wurde zu Beginn der Etablierungsarbeiten entschieden, die geplanten Experimente vorerst in Anlehnung an das klassische Protokoll durchzuführen und dieses mithilfe von Anpassungen und Variationen zu optimieren. Die klare zeitliche Trennung der einzelnen Arbeitsschritte erwies sich als vorteilhaft, da hierdurch das Risiko methodischer Fehler deutlich reduziert wurde. Ein Nachteil dieses Verfahrens war hingegen, dass pro Versuchsdurchlauf nur jeweils eine Parameterveränderung, beispielsweise eine definierte Erhöhung der siRNA-Menge, untersucht werden konnte. Der dementsprechend hohe experimentelle Aufwand führte dazu, dass im Verlauf der Etablierungsarbeiten nicht alle denkbaren Einflussgrößen und „Stellschrauben“ hinsichtlich ihres Einflusses auf den *knockdown*-Erfolg analysiert wurden. Im Gegensatz zur klassischen Transfektion erfolgen Zell-Aussat, Komplexbildung und siRNA-Transfektion bei den beiden alternativen Vorgehensweisen am selben Tag, allerdings in unterschiedlicher Reihenfolge. Während bei der *Fast-Forward*-Transfektion die Versuchszellen ausgesät und kurz darauf mit den siRNA-Lipid-Komplexen transfiziert werden, findet bei der *Reverse*-Transfektion die Komplexbildung in den Wells bereits vor Hinzugabe der Zellen statt. In beiden Fällen reduziert sich die Zellkulturzeit und dadurch der zeitliche Aufwand um einen Tag. Da jedoch die Proliferationszeit entfällt, wird pro Experiment eine höhere Zellzahl benötigt. Die *Reverse*-Transfektion wird üblicherweise für sog. Hochdurchsatz- (*High-Throughput*-) Experimente mit 96- oder 384-Well-Platten eingesetzt. Diese haben den Vorteil, dass in einem Versuchsdurchlauf mehrere Variationen eines Parameters, beispielsweise verschiedene siRNA-

Konzentrationen, gleichzeitig analysiert werden können. Nichtsdestotrotz erfordert dieses Vorgehen sowohl fortgeschrittene Laborkenntnisse als auch spezielle Labor- und Computerausrüstungen (66), so dass eine erfolgreiche Umsetzung fraglich erschwert gewesen wäre. Zudem konnte in den meisten primären Zellen bisher nur mithilfe von vektoriiell exprimierten shRNAs ein erfolgreiches *High-Throughput*-RNAi-Experiment erreicht werden (66). Die entscheidende Gemeinsamkeit der verschiedenen Verfahren zur lipidvermittelten siRNA-Transfektion ist das Fehlen eines standardisierten Protokolls für alle Zelllinien bzw. alle Zielgene. Bezogen auf die vorliegende Arbeit bedeutet dies, dass unabhängig von der gewählten Vorgehensweise in jedem Fall Optimierungen und Anpassungen der Einflussgrößen nötig gewesen wären, um letztlich einen zufriedenstellenden *knockdown*-Effekt in ovinen VICs zu erzielen.

### 5.1.5 Methoden zum Nachweis des Gen-*knockdowns*

Im Rahmen von RNAi-Experimenten ist es essenziell, das Ausmaß des erreichten *knockdown*-Effekts durch eine geeignete Nachweismethode zu erfassen. Das Kernziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Etablierung von Protokollen, die zu einer ausreichenden, siRNA-basierten Herunterregulierung der Gene *BGN*, *OPN*, *HAS2* und *CD73* auf mRNA-Ebene führen. Folgerichtig stellte eine mRNA-Quantifizierung anhand von qRT-PCR-Analysen die Methode der Wahl dar, um den potenziellen *knockdown*-Erfolg wie gefordert auf Genebene zu überprüfen. Auf diese Weise wurde gezielt evaluiert, ob das jeweilige methodische Vorgehen den gewünschten Effekt einer siRNA-vermittelten Spaltung der Ziel-mRNA bewirken konnte. Vorteile dieser Nachweismethode waren der geringe zeitliche und materielle Aufwand sowie die schnelle Verfügbarkeit von statistischen Ergebnissen zur Einschätzung des erreichten *knockdown*-Erfolges. Basierend auf den kontinuierlichen Auswertungen wurde das weitere experimentelle Vorgehen bzw. die Anpassung von Einflussgrößen stets flexibel und neu geplant. Analog zu ovinen siRNA-Sequenzen sind auch ovine Primerpaare nicht kommerziell erhältlich und mussten daher anhand eines laboreigenen Protokolls selbstständig designt werden. Trotz eines gewissenhaften Designprozesses existierte jedoch auch in diesem Fall keine Garantie für die Funktionalität und Spezifität der ausgewählten Primersequenzen. Daher wurde die effektive Bindungsqualität zunächst in einem Testdurchlauf beurteilt, bevor die designten Primer zum Nachweis des Gen-*knockdowns* eingesetzt wurden. Untersuchungen von Holmes *et al.* konnten erstmals zeigen, dass die Bindungsstelle des Primers innerhalb des zu quantifizierenden DNA-Abschnitts (Amplicon) eine entscheidende Rolle für die erfolgreiche Detektion des Gen-*knockdowns* mittels qRT-PCR zu spielen scheint (67). Während Primer mit Anlagerung nahe des 5'-Endes den *knockdown* zuverlässig nachweisen konnten, waren in der Nähe des 3'-Endes bindende Primer dazu nicht in der Lage (67). Es wird vermutet, dass RNA-Bindungsproteine die siRNA-vermittelte Spaltung der 3'-Region blockieren und dadurch intakt bleibende mRNA-Fragmente als Amplifikationsvorlagen dienen (67). Alles in allem deutet dies darauf hin, dass das Designen von geeigneten Primerpaaren als weiterer kritischer Schritt bei der Durchführung von RNAi-Experimenten zu berücksichtigen ist.

Im Sinne der Zielsetzung, einen siRNA-basierten Gen-*knockdown* auf mRNA-Ebene zu etablieren, stellte die qRT-PCR-Reaktion die Nachweismethode der Wahl dar. Allerdings besteht trotz einer nachgewiesenen Herunterregulierung der Genexpression die Möglichkeit, dass eine Verminderung der Proteinmenge erst nach einer gewissen Latenzzeit oder überhaupt nicht eintritt (1). Gründe hierfür können eine lange Halbwertszeit oder anderweitige intrazelluläre Stabilisierungsmechanismen des codierten Proteins sein (1). Der Nachweis des Gen-*knockdowns* auf mRNA-Ebene dient somit zwar dem Beweis für eine funktionierende Methodik, erlaubt jedoch keine Aussagen bezüglich Proteinlevel oder Funktionalität des Proteins. Aus diesem Grund sind zukünftige Analysen zu empfehlen, die den auf Genebene erreichten *knockdown*-Erfolg zusätzlich auf Proteinebene überprüfen. Eine Proteinquantifizierung anhand von Western Blot-Analysen könnte zum einen die erhobenen qRT-PCR-Daten verifizieren und zum anderen den Einfluss der Gensuppression auf die effektive Proteinmenge beleuchten. Dies ist besonders für weiterführende Experimente von Bedeutung, um auf Basis eines Gen-*knockdowns* die Funktion des codierten Proteins bzw. mögliche Veränderungen der zellulären Eigenschaften näher zu untersuchen. Einige Arbeitsgruppen, beispielsweise Elbashir *et al.*, bevorzugen als Nachweismethode von vornherein Western Blot- oder Immunfluoreszenz-Analysen und greifen erst auf qRT-PCR-Analysen zurück, falls keine entsprechenden Antikörper zur Verfügung stehen (46). Allerdings wird der künftige Nachweis des Gen-*knockdowns* von *BGN*, *OPN* und *CD73* auf Proteinebene durch einige Faktoren erschwert. Beispielsweise stellen verfügbare Erst- und Zweitantikörper eine zwingende Voraussetzung für die Durchführung von Western Blot-Analysen dar. Während jedoch gegen *HAS2* gerichtete ovine Antikörper bis dato nicht erhältlich sind, erfordert die Arbeit mit ovinen *OPN*- und *CD73*-Antikörpern deren vorherige Etablierung. Darüber hinaus muss das glykolysierte Makromolekül *BGN* zunächst in einem aufwendigen Prozess von seinen Kohlenhydratketten befreit und aufgereinigt werden, bevor eine Quantifizierung des Kernproteins möglich ist.

## 5.2 Bewertung der erzielten Ergebnisse

### 5.2.1 Etablierung eines ovinen Referenzgens für qRT-PCR-Analysen

Bezugnehmend auf die aktuelle Studienlage scheint kein universelles endogenes Referenzgen zu existieren, dessen Genexpressionslevel zwischen Zellen verschiedenen Gewebes sowie zwischen verschiedenen experimentellen Bedingungen eine ausreichende Stabilität aufweist (12-15). Vielmehr hat sich herausgestellt, dass jeder neue experimentelle Ansatz zunächst die Etablierung eines optimalen, stabil exprimierten und hochspezifischen Referenzgens erfordert (12, 14). Nach bestem Wissen gibt es derzeit kein validiertes Referenzgen für Genexpressionsanalysen mit ovinen VICs. Daher wurde vor Beginn der Etablierungsarbeiten zu einem siRNA-basierten Gen-*knockdown* von *BGN*, *OPN*, *HAS2* und *CD73* ein geeignetes ovines Referenzgen für die im Rahmen der geplanten RNAi-Experimente erforderlichen qRT-PCR-Analysen ermittelt.

Im Hinblick auf die Fragestellung war es essenziell, dass die mittels qRT-PCR gemessenen Veränderungen in der Genexpression so zuverlässig wie möglich auf die gezielte Variation von Parametern und nicht auf Probenunterschiede oder andere technische Fehler zurückzuführen waren. Die Identifizierung

eines geeigneten Referenzgens zur Normalisierung der erhobenen PCR-Daten stellte demnach eine grundlegende Voraussetzung dar, um die Korrektheit sowie die Reproduzierbarkeit der erzielten Ergebnisse zu gewährleisten. Letztendlich sollten auf diese Weise valide statistische Aussagen über den potenziellen *knockdown* eines Zielgens ermöglicht werden. Mit dem Ziel, eine möglichst konstante Genexpression bei maximaler Spezifität für den geplanten experimentellen Ansatz sicherzustellen, wurden systematische qRT-PCR-Analysen anhand der cDNA von ovinen VICs sowohl in unbehandeltem Zustand als auch nach siRNA-Transfektion durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Genexpression von *RPL29* durch die interindividuellen Unterschiede zwischen verschiedenen biologischen Replikaten sowie durch die speziellen Behandlungsbedingungen eines RNAi-Experiments im Vergleich zu den anderen untersuchten Genen am geringsten beeinflusst wurde. Die statistische Auswertung der reinen  $C_T$ -Werte von *RPL29* deutete auf eine ausreichend stabile Genexpression hin, sodass dieses als Referenzgen für die anstehenden RNAi-Analysen mit ovinen VICs ausgewählt wurde. Im Vergleich dazu identifizierten Gentile *et al.* *RPL13A* und *EEF1A1* als stabil exprimierte und für qRT-PCR-Analysen mit humanen vaskulären Stromazellen geeignete Referenzgene, trotz einer deutlich größeren Variabilität der reinen  $C_T$ -Werte (50). Während einige Arbeitsgruppen ebenfalls *RPL29* als Referenzgen empfehlen (68-70), stellt dieses gemäß Xie *et al.* hingegen kein geeignetes endogenes Referenzgen für Genexpressionsanalysen mit humanen retinalen Endothelzellen dar (49). Diese unterschiedlichen Beobachtungen könnten einmal mehr darauf hinweisen, dass Referenzgene hinsichtlich ihrer Genexpression zwischen verschiedenen Zelllinien bzw. experimentellen Bedingungen variieren und nicht ohne vorherige Validierung für einen anderen experimentellen Ansatz übernommen werden dürfen. Die durchgeführten systematischen Stabilitätsanalysen waren zwar mit einem hohen experimentellen und zeitlichen Aufwand verbunden, dieser relativierte sich jedoch in Anbetracht der zu normalisierenden Datenmenge. Im Endeffekt erwies sich die kontinuierliche Mitbestimmung der Genexpression von *RPL29* als praktische und zeitsparende Methode, um die im Rahmen der Etablierungsarbeiten erhobenen qRT-PCR-Daten einfach und effektiv zu normalisieren.

### 5.2.2 Etablierungsarbeiten zu einem siRNA-basierten Gen-*knockdown* von *BGN*, *OPN*, *HAS2* und *CD73* in ovinen VICs

Im Rahmen der mit ovinen VICs durchgeführten RNAi-Experimente ist es durch Anpassung verschiedener Parameter gelungen, eine signifikante Herunterregulierung der relativen mRNA-Expression von *BGN*, *OPN* und *CD73* bezogen auf die unbehandelte Kontrolle sowie von *HAS2* bezogen auf die Negativkontrolle zu erreichen.

Die lipidvermittelte Transfektion von humanen adhären Zellen mit synthetischen, anhand standardisierter Algorithmen designten und validierten siRNA-Sequenzen erreicht üblicherweise eine Reduktion des mRNA-Niveaus um etwa 70 % (66). Dieser Schwellenwert dient zumeist als Toleranzgrenze, ab der von einer effizienten siRNA und damit einem suffizienten siRNA-basierten Gen-*knockdown* ausgegangen wird (56). Die Standardbedingungen, unter deren Voraussetzung dieser Schwellenwert Gültigkeit besitzt, sind allerdings nur begrenzt auf die in dieser Arbeit durchgeführten RNAi-Experimente

übertragbar. Zum einen ist die *in vitro*-Methode der siRNA-Transfektion vorwiegend auf eine Herunterregulierung von humanen oder murinen Genen ausgerichtet (66). Dies zeigt sich unter anderem daran, dass vorkonfigurierte und bereits validierte siRNA-Sequenzen für ovine Gene nicht kommerziell zur Verfügung stehen. Zum anderen weisen primäre Zellen, zu denen ovine VICs als Fibroblasten zählen, generell eine geringe Transfektionseffizienz auf (61). Vor diesem Hintergrund ist das Ausmaß des in der vorliegenden Arbeit erstmals erreichten Gen-*knockdowns* von *BGN*, *OPN* und *CD73* in ovinen VICs durchaus bemerkenswert. Während die relative Genexpression der drei letztgenannten Gene bezogen auf die unbehandelte Kontrolle signifikant herunterreguliert werden konnte, ergab sich im Fall von *HAS2* lediglich eine signifikante Herunterregulierung im Vergleich zur Negativkontrolle *AllStars*. Obwohl eine unbehandelte Kontrollbedingung als wissenschaftlich korrekter gilt, verwenden einige Arbeitsgruppen, u. a. El Husseini *et al.*, ebenfalls die Behandlung mit unspezifisch bindenden siRNA-Sequenzen als Bezugsgröße für den *knockdown*-Erfolg in ovinen VICs (71-73). Dies bestätigt einmal mehr die Annahme, dass es sich bei einem siRNA-basierten Gen-*knockdown* in ovinen VICs um ein anspruchsvolles Forschungsvorhaben handelt.

Die Transfektionseffizienz und damit der *knockdown*-Erfolg einer lipidvermittelten siRNA-Transfektion von adhärennten Zellen wird durch zahlreiche experimentelle Parameter beeinflusst. Die Optimierung solcher „Stellschrauben“ mit dem Ziel eines erfolgreichen Gen-*knockdowns* stellt vermutlich die größte Herausforderung eines RNAi-Experiments dar. In der vorliegenden Arbeit wurden auf Grundlage der von *ThermoFisher* bzw. *Qiagen*<sup>R</sup> empfohlenen Standardprotokolle die Menge an siRNA und Transfektionsreagenz sowie die gegen *OPN* und *HAS2* gerichteten siRNA-Sequenzen variiert. Weitere Parameter mit nachgewiesenem Einfluss auf den *knockdown*-Erfolg, beispielsweise Zellpassage, Zellzahl pro Well und Zelldichte (Konfluenz) zum Zeitpunkt der Transfektion (74), wurden zu Beginn gemäß laborinternen Erfahrungswerten festgelegt und im Verlauf der Etablierungsarbeiten bewusst konstant gehalten. Dalby *et al.* konnten zeigen, dass die Verdünnungszeit von *Lipofectamine* in Serum-freiem Medium, die Inkubationszeit zur siRNA-Liposom-Komplexbildung sowie die Transfektionszeit bis zur RNA-Isolation ebenfalls eine messbare Auswirkung auf die Transfektionseffizienz haben (74). Die Variation und eventuelle Optimierung dieser Parameter könnte demnach in zukünftigen RNAi-Experimenten Anwendung finden, um das Ausmaß des bis dato erreichten *knockdown*-Erfolges von *HAS2* und *CD73* zu erhöhen.

Trotz der oben beschriebenen Modifizierungen zeigte das erreichte Ausmaß des relativen Gen-*knockdowns* eine hohe Variabilität zwischen den verschiedenen Zielgenen sowie auch zwischen den einzelnen biologischen Replikaten. Dies lässt vermuten, dass der *knockdown*-Erfolg in ovinen VICs sowohl von dem zu regulierenden Gen als auch von interindividuellen zellulären Faktoren abzuhängen scheint. Echeverri *et al.* weisen in diesem Zusammenhang darauf hin, dass sich die Genexpression von Enzymen häufig nur schwer supprimieren lässt, da diese in der Regel eine hohe Genexpressionsrate sowie lange mRNA- und Protein-Halbwertszeiten besitzen (66). Übersteigt die mRNA-Halbwertszeit des Zielgens die Transfektionszeit der Zellen, in diesem Fall 72 Stunden, kann trotz siRNA-vermitteltem Abbau unter Umständen keine ausreichende Abnahme des zellulären mRNA-Levels detektiert werden. Dies könnte

eine Erklärung dafür sein, warum die Herunterregulierung der Enzym-codierenden Gene *HAS2* und *CD73* im Vergleich zu *BGN* und *OPN* deutlich geringer ausfiel. Die Tatsache, dass für jedes der vier o. g. Zielgene ein individuelles Transfektionsprotokoll entwickelt wurde, dessen *knockdown*-Erfolg dennoch Replikat-abhängige Schwankungen aufweist, deutet auf einen hochspezifischen Prozess hin. Folgerichtig existiert kein universell gültiges Protokoll, das einen einheitlichen *knockdown* sämtlicher oviner Zielgene und eine konstante Effizienz für VICs sämtlicher oviner Aortenklappen garantiert.

### 5.2.3 Auswirkung des Gen-*knockdowns* von *BGN* bzw. *OPN* auf die mRNA-Expression von weiteren, mit der DAVD assoziierten Genen

Neuen Studien zufolge vermittelt BGN seinen pro-inflammatorischen Effekt durch Bindung an TLR2 und TLR4, woraufhin Makrophagen und VICs zur Ausschüttung zahlreicher Zytokine angeregt werden (75, 76). In humanen VICs bewirkt BGN zudem eine verstärkte Synthese von osteogenen Biomarkern wie dem Knochenmorphogenetischen Protein (BMP) 2 via TLR2 sowie TGF- $\beta$ 1 via TLR4 (28, 77). Die BGN-induzierte osteogene Transformation von VICs scheint bei der Pathophysiologie der DAVD eine zentrale Rolle zu spielen (77, 78). Das Proteoglykan Decorin ist strukturell eng mit BGN verwandt und ebenfalls an der pathologischen Umstrukturierung des Aortenklappengewebes beteiligt (79). Aufgrund dieser Zusammenhänge wurde anhand von qRT-PCR-Analysen untersucht, ob und inwiefern ein siRNA-basierter Gen-*knockdown* von *BGN* die Genexpression von *TLR2*, *TLR4*, *TGF- $\beta$*  und *DCN* beeinflusst. Dabei ergab sich weder unter deg. noch unter nicht-deg. Bedingungen *in vitro* ein signifikanter Unterschied in der relativen mRNA-Expression der vier o. g. Gene. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass *BGN* zwar auf Genebene, nicht jedoch auf Proteinebene herunterreguliert wurde und somit keine funktionellen Auswirkungen des Gen-*knockdowns* zu beobachten waren. Wie bereits in 5.1.5 erläutert, wird ein zukünftiger Nachweis des *knockdown*-Erfolges auf Proteinebene empfohlen, um u. a. diesem Sachverhalt nachzugehen. Denkbar ist zudem, dass sich eine Veränderung der Genexpression erst nach einer Versuchsdauer von mehr als 72 Stunden gezeigt hätte. *In vitro*-Studien von Song *et al.* konnten nachweisen, dass humane VICs nach Stimulation mit rekombinantem BGN verstärkt *TGF- $\beta$ 1* exprimieren und sezernieren (77). Im Umkehrschluss wäre demnach zu erwarten, dass der *knockdown* von *BGN* zu einer verminderten Genexpression von *TGF- $\beta$*  führt. Diese Annahme konnte nicht bestätigt werden, sodass am ehesten von einer der oben genannten methodischen Ursachen auszugehen ist. Im Fall von *TLR2*, *TLR4* und *DCN* besteht hingegen die Möglichkeit, dass die Gen- bzw. Proteinexpression von *BGN* grundsätzlich keinen regulatorischen Einfluss auf die mRNA-Expression dieser Gene hat. Nach bestem Wissen wurden bisher keine Analysen zu einer ähnlichen Fragestellung durchgeführt, sodass diesbezüglich keine vergleichenden Aussagen möglich sind.

Das pro-inflammatorische Glykoprotein OPN ist ein Substrat der MMP, allen voran MMP2 und MMP9, die durch den Abbau extrazellulärer Matrixproteine entscheidend am Gewebeumbau im Rahmen von kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt sind (80). Einige der OPN-Spaltprodukte besitzen sogar eine höhere Aktivität als das intakte OPN-Molekül, sodass man von einer MMP-abhängigen Verstärkung des Entzündungsprozesses ausgeht (31). Neben OPN konnte auch das Kalzium-bindende Knochenmatrixprotein BGLAP in atherosklerotischen Plaques und kalzifizierten Aortenklappen nachgewiesen

werden (81, 82). ACTA2 (auch bekannt als  *$\alpha$ -smooth muscle actin*,  $\alpha$ -SMA) ist ein spezifischer Differenzierungsmarker von glatten Gefäßmuskelzellen, deren Proliferation und Differenzierung mit der Pathogenese der DAVD zu korrelieren sowie einer Regulierung durch OPN zu unterliegen scheinen (83, 84). In Anbetracht dieser Zusammenhänge erfolgten weiterführende qRT-PCR-Analysen, um die Auswirkung eines siRNA-basierten Gen-*knockdowns* von OPN auf die Genexpression von MMP2, MMP9, BGLAP und ACTA2 zu untersuchen. Vergleichbar mit den Ergebnissen zu BGN konnte kein signifikanter Unterschied in der relativen mRNA-Expression der vier o. g. Gene erreicht werden, weder unter deg. noch unter nicht-deg. Bedingungen *in vitro*. Mögliche, vor allem methodische Erklärungsversuche für dieses Ergebnis entsprechen daher den Ausführungen im Zusammenhang mit BGN (s. o.). Darüber hinaus muss ebenfalls in Betracht gezogen werden, dass der Gen-*knockdown* von OPN die mRNA-Expression der vier o. g. Gene grundsätzlich nicht beeinflusst. Verschiedenen Studien zufolge scheint OPN jedoch in der Lage zu sein, sowohl die Genexpression von MMP2/9 als auch ihre proteolytische Aktivität signifikant zu steigern (80, 85-87). Damit übereinstimmend konnten *in vitro*-Studien von Liu *et al.* nachweisen, dass der shRNA-basierte Gen-*knockdown* von OPN in Prostatakarzinomzellen eine Herunterregulierung von MMP2/9 auf Gen- und Proteinebene bewirkt (88). Weiterhin zeigten Gao *et al.*, dass die Plasmid-vermittelte Überexpression von OPN zu einer verminderten Proteinexpression von ACTA2 in glatten Gefäßmuskelzellen der Aorta führt (89). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten keine mit diesen Beobachtungen übereinstimmenden Ergebnisse erzielt werden, sodass entweder von einer methodischen Ursache oder einer fehlenden Gültigkeit dieser Effekte für ovine VICs ausgegangen werden muss.

#### 5.2.4 Auswirkung des Gen-*knockdowns* von BGN bzw. OPN auf die Kalziumakkumulation in ovinen VICs

Anhand von Kalzium-Assay-Analysen wurde weiterhin überprüft, wie ein siRNA-basierter Gen-*knockdown* von BGN bzw. OPN die Kalziumakkumulation in ovinen VICs beeinflusst und ob auf diese Weise eine funktionelle Darstellung des *knockdown*-Erfolges möglich ist. Die gemessene Kalziumkonzentration diente hierbei als Indikator für den degenerierten Zustand der Zellen.

Die Stimulation der ovinen VICs mit  $\beta$ -Glycerolphosphat und Calciumchlorid führte bei allen Behandlungsbedingungen zu einer signifikanten Erhöhung der Kalziumkonzentration bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. Dies lässt darauf schließen, dass zum einen die Methode der Zellstimulation mit deg. Medium und zum anderen der Nachweis mittels Kalzium-Assay im Hinblick auf die Fragestellung geeignet waren. Bemerkenswerterweise führte der Gen-*knockdown* von BGN zu keiner signifikanten Veränderung der Kalziumkonzentration, weder unter deg. noch unter nicht-deg. Bedingungen *in vitro*. Analog zu 5.2.3 könnte dies darin begründet liegen, dass BGN zwar auf Genebene erfolgreich herunterreguliert wurde, aber aufgrund eines unveränderten Proteinlevels letztlich keine Auswirkungen auf die Kalziumakkumulation zu beobachten waren. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass BGN die Kalziumkonzentration in ovinen VICs grundsätzlich nicht beeinflusst. Interessanterweise konnte die Arbeitsgruppe um Song *et al.* jedoch nachweisen, dass eine *in vitro*-Stimulation mit rekombinantem BGN sowohl die Kalziumablagerung in humanen VICs als auch die Bildung von Kalzifizierungsherden



fördert (28). Diese Beobachtung stimmt mit der verbreiteten Annahme überein, dass BGN im Rahmen der DAVD pro-inflammatorische und pro-degenerative Eigenschaften besitzt (25, 26, 28). Vor diesem Hintergrund ist sogar davon auszugehen, dass der *Gen-knockdown* von *BGN* zu einer verringerten Kalziumakkumulation in ovinen VICs führt, also hinsichtlich der zellulären Degeneration protektiv wirkt. Die Tatsache, dass hingegen kein signifikanter Unterschied in der Kalziumkonzentration beobachtet wurde, könnte darauf hinweisen, dass BGN im Zusammenhang mit der Pathogenese der DAVD eine weitaus komplexere Rolle einnimmt und differenzierter zu betrachten ist als bisher.

In Analogie zu *BGN* führte auch der *Gen-knockdown* von *OPN* zu keinem signifikanten Unterschied in der Kalziumkonzentration, weder unter deg. noch unter nicht-deg. Bedingungen *in vitro*. Allerdings bewirkte die Stimulation mit deg. Zellkulturmedium unter dem Einfluss des *Gen-knockdowns* von *OPN* einen hochsignifikanten Anstieg der Kalziumkonzentration bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, während die alleinige Zellstimulation zu keinem signifikanten Unterschied führte. Außerdem zeigte sich bei den transfizierten VICs unter deg. Bedingungen eine extreme Streubreite der Kalziumkonzentration und eine im Trend erkennbar höhere Kalziumkonzentration im Vergleich zu den nicht transfizierten Gruppen unter nicht-deg. Bedingungen. Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass der *Gen-knockdown* von *OPN* einen Einfluss auf die Kalziumakkumulation in ovinen VICs zu haben scheint. Dies führt wiederum zu der Annahme, dass *OPN* nicht nur auf Genebene, sondern auch auf Proteinebene erfolgreich herunterreguliert wurde, da sonst keine funktionellen Auswirkungen des *Gen-knockdowns* zu beobachten wären. In Anbetracht der Tatsache, dass eine verminderte *OPN*-Expression mit einer erhöhten Kalziumkonzentration einhergeht, scheint *OPN* die Kalziumakkumulation in ovinen VICs unter deg. Bedingungen *in vitro* zu hemmen und somit der zellulären Degeneration entgegenzuwirken. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnten Wada *et al.* anhand von *in vitro*-Studien nachweisen, dass exogenes *OPN* den mit  $\beta$ -Glycerolphosphat induzierten Kalzifizierungsprozess in glatten Gefäßmuskulzellen der Aorta nachweislich inhibiert (90). Darüber hinaus zeigten subkutan implantierte Aortenklappensegel in *OPN*-defizienten *Knockout*-Mäusen eine beschleunigte und bis zu fünffach stärkere Kalzifizierung als in Wildtyp-Mäusen (91). Demnach scheint *OPN* im Rahmen von kardiovaskulären Erkrankungen nicht nur pro-inflammatorisch aktiv zu sein (31), sondern ebenfalls anti-kalzifizierende Eigenschaften zu besitzen, indem es die Entstehung und das Wachstum von vaskulären Kalzifizierungsherden hemmt sowie deren Resorption fördert (91, 92). Aus diesem Grund wird *OPN* bereits als mögliches Therapeutikum zur Prävention und Behandlung von ektopter Kalzifizierung, beispielsweise nach Aortenklappenersatz, diskutiert (91).

### 5.3 Schlussfolgerungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es erstmals gelungen, in ovinen VICs einen signifikanten siRNA-basierten *Gen-knockdown* von *BGN*, *OPN* und *CD73* bezogen auf die unbehandelte Kontrolle sowie von *HAS2* bezogen auf die Negativkontrolle zu erreichen. Es wurde eine chemische Transfektionstechnik angewandt, bei der synthetische, *custom*-designte siRNA-Sequenzen mithilfe des Lipid-basierten Transfektionsreagenzes *Lipofectamine* in die Zielzellen eingeschleust wurden. Die etablierten

Gen-spezifischen Protokolle stehen nun für weiterführende *in vitro*-Analysen mit primären ovinen Fibroblasten zur Verfügung. Das Gen *RPL29* zeigte ein hochstabiles Expressionslevel und stellt somit ein spezifisches Referenzgen für zukünftige Genexpressionsanalysen und RNAi-Experimente mit ovinen VICs dar.

In Zukunft könnten sich Experimente mit dem Ziel einer zeitlichen Verlängerung der Gensuppression anschließen, um die etablierte Methodik auch im Zusammenhang mit länger andauernden *in vitro*-Studien anwenden zu können. Ebenso empfehlen sich Methoden zur Proteinquantifizierung, um den auf Genebene erreichten *knockdown*-Erfolg zusätzlich auf Proteinebene nachzuweisen. Auf diese Weise ließe sich die Funktion des codierten Proteins sowie mögliche Veränderungen der zellulären Eigenschaften näher untersuchen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Schmitz S. *Der Experimentator: Zellkultur*. 3. Auflage ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 2011. 272 p.
2. Graw J. *Genetik*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2010.
3. Tijsterman M, Ketting RF, Plasterk RH. The genetics of RNA silencing. *Annu Rev Genet*. 2002;36:489-519.
4. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-11.
5. Fischer SE. RNA Interference and MicroRNA-Mediated Silencing. *Curr Protoc Mol Biol*. 2015;112:26 1 1-5.
6. Schmid RD. *Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik*. Weinheim: Wiley-VCH; 2016.
7. Fellmann C, Lowe SW. Stable RNA interference rules for silencing. *Nat Cell Biol*. 2014;16(1):10-8.
8. Fakhr E, Zare F, Teimoori-Toolabi L. Precise and efficient siRNA design: a key point in competent gene silencing. *Cancer Gene Ther*. 2016;23(4):73-82.
9. Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorovova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol*. 2004;22(3):326-30.
10. Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J*. 2001;20(23):6877-88.
11. Yoshinari K, Miyagishi M, Taira K. Effects on RNAi of the tight structure, sequence and position of the targeted region. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(2):691-9.
12. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3(7):RESEARCH0034.
13. Klie M, Debener T. Identification of superior reference genes for data normalisation of expression studies via quantitative PCR in hybrid roses (*Rosa hybrida*). *BMC Res Notes*. 2011;4:518.
14. Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*. 2004;37(1):112-4, 6, 8-9.
15. Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods*. 2000;46(1-2):69-81.
16. Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, et al. Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation*. 2011;124(16):1783-91.
17. Hinton RB, Yutzey KE. Heart valve structure and function in development and disease. *Annu Rev Physiol*. 2011;73:29-46.
18. Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *Am J Pathol*. 2007;171(5):1407-18.
19. Aikawa E, Whittaker P, Farber M, Mendelson K, Padera RF, Aikawa M, et al. Human semilunar cardiac valve remodeling by activated cells from fetus to adult: implications for postnatal adaptation, pathology, and tissue engineering. *Circulation*. 2006;113(10):1344-52.
20. O'Brien KD. Pathogenesis of calcific aortic valve disease: a disease process comes of age (and a good deal more). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(8):1721-8.
21. Daniel WG, Baumgartner H, Gohlke-Barwolf C, Hanrath P, Horstkotte D, Koch KC, et al. Aortic stenosis. *Clin Res Cardiol*. 2006;95(11):620-41.
22. Osnabrugge RL, Mylotte D, Head SJ, Van Mieghem NM, Nkomo VT, LeReun CM, et al. Aortic stenosis in the elderly: disease prevalence and number of candidates for transcatheter aortic valve replacement: a meta-analysis and modeling study. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(11):1002-12.
23. Faggiano P, Antonini-Canterin F, Baldessin F, Lorusso R, D'Aloia A, Cas LD. Epidemiology and cardiovascular risk factors of aortic stenosis. *Cardiovasc Ultrasound*. 2006;4:27.
24. Vahanian A, Alfieri O, Andreotti F, Antunes MJ, Baron-Esquivias G, Baumgartner H, et al. Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012): the Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the

- European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur J Cardiothorac Surg*. 2012;42(4):S1-44.
25. Schaefer L, Iozzo RV. Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J Biol Chem*. 2008;283(31):21305-9.
  26. Derbali H, Bosse Y, Cote N, Pibarot P, Audet A, Pepin A, et al. Increased biglycan in aortic valve stenosis leads to the overexpression of phospholipid transfer protein via Toll-like receptor 2. *Am J Pathol*. 2010;176(6):2638-45.
  27. Barth M, Selig JI, Klose S, Schomakers A, Kiene LS, Raschke S, et al. Degenerative aortic valve disease and diabetes: Implications for a link between proteoglycans and diabetic disorders in the aortic valve. *Diab Vasc Dis Res*. 2019;16(3):254-69.
  28. Song R, Zeng Q, Ao L, Yu JA, Cleveland JC, Zhao KS, et al. Biglycan induces the expression of osteogenic factors in human aortic valve interstitial cells via Toll-like receptor-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(11):2711-20.
  29. Fisher LW, Jain A, Tayback M, Fedarko NS. Small integrin binding ligand N-linked glycoprotein gene family expression in different cancers. *Clin Cancer Res*. 2004;10(24):8501-11.
  30. Mohler ER, 3rd, Adam LP, McClelland P, Graham L, Hathaway DR. Detection of osteopontin in calcified human aortic valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(3):547-52.
  31. Scatena M, Liaw L, Giachelli CM. Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(11):2302-9.
  32. Fitzpatrick LA, Severson A, Edwards WD, Ingram RT. Diffuse calcification in human coronary arteries. Association of osteopontin with atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1994;94(4):1597-604.
  33. Yu PJ, Skolnick A, Ferrari G, Heretis K, Mignatti P, Pintucci G, et al. Correlation between plasma osteopontin levels and aortic valve calcification: potential insights into the pathogenesis of aortic valve calcification and stenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2009;138(1):196-9.
  34. Harmey D, Hessle L, Narisawa S, Johnson KA, Terkeltaub R, Millan JL. Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by *akp2*, *enpp1*, and *ank*: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders. *Am J Pathol*. 2004;164(4):1199-209.
  35. Johnson K, Goding J, Van Etten D, Sali A, Hu SI, Farley D, et al. Linked deficiencies in extracellular PP(i) and osteopontin mediate pathologic calcification associated with defective PC-1 and ANK expression. *J Bone Miner Res*. 2003;18(6):994-1004.
  36. Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. Hyaluronan synthases. *J Biol Chem*. 1997;272(22):13997-4000.
  37. Krishnamurthy VK, Stout AJ, Sapp MC, Matuska B, Lauer ME, Grande-Allen KJ. Dysregulation of hyaluronan homeostasis during aortic valve disease. *Matrix Biol*. 2017;62:40-57.
  38. Rodriguez KJ, Piechura LM, Masters KS. Regulation of valvular interstitial cell phenotype and function by hyaluronic acid in 2-D and 3-D culture environments. *Matrix Biol*. 2011;30(1):70-82.
  39. Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1783(5):673-94.
  40. Gallagher JA, Buckley KA. Expression and function of P2 receptors in bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2002;2(5):432-9.
  41. Osman L, Chester AH, Amrani M, Yacoub MH, Smolenski RT. A novel role of extracellular nucleotides in valve calcification: a potential target for atorvastatin. *Circulation*. 2006;114(1 Suppl):I566-72.
  42. Weber A, Barth M, Selig JI, Raschke S, Dakaras K, Hof A, et al. Enzymes of the purinergic signaling system exhibit diverse effects on the degeneration of valvular interstitial cells in a 3-D microenvironment. *FASEB J*. 2018;32(8):4356-69.
  43. Zerneck A, Bidzhekov K, Ozuyaman B, Fraemohs L, Liehn EA, Luscher-Firzlaff JM, et al. CD73/ecto-5'-nucleotidase protects against vascular inflammation and neointima formation. *Circulation*. 2006;113(17):2120-7.
  44. Zukowska P, Kutryb-Zajac B, Jaszal A, Toczek M, Zabielska M, Borkowski T, et al. Deletion of CD73 in mice leads to aortic valve dysfunction. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1863(6):1464-72.
  45. Hilaire CS, Ziegler SG, Markello TC, Brusco A, Groden C, Gill F, et al. NT5E Mutations and Arterial Calcifications. *N Engl J Med* 2011;364:432-42.
  46. Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*. 2002;26(2):199-213.
  47. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001;411(6836):494-8.

48. Rehm HL, Thomas Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. 6. Auflage ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2010.
49. Xie J, Liu X, Li Y, Liu Y, Su G. Validation of RT-qPCR reference genes and determination of Robo4 expression levels in human retinal endothelial cells under hypoxia and/or hyperglycemia. *Gene*. 2016;585(1):135-42.
50. Gentile AM, Lhamyani S, Coin-Araguez L, Oliva-Olivera W, Zayed H, Vega-Rioja A, et al. RPL13A and EEF1A1 Are Suitable Reference Genes for qPCR during Adipocyte Differentiation of Vascular Stromal Cells from Patients with Different BMI and HOMA-IR. *PLoS One*. 2016;11(6):e0157002.
51. Diesel LF, dos Santos BP, Bellagamba BC, Pretto Neto AS, Ely PB, Meirelles Lda S, et al. Stability of Reference Genes during Tri-Lineage Differentiation of Human Adipose-Derived Stromal Cells. *J Stem Cells*. 2015;10(4):225-42.
52. Mamo S, Gal AB, Bodo S, Dinnyes A. Quantitative evaluation and selection of reference genes in mouse oocytes and embryos cultured in vivo and in vitro. *BMC Dev Biol*. 2007;7:14.
53. Mossberg K, Svensson PA, Gidlof O, Erlinge D, Jern S, Brogren H. Normalization of qPCR in platelets - YWHAE a potential generic reference gene. *Platelets*. 2016;27(8):729-34.
54. Yperman J, De Visscher G, Holvoet P, Flameng W. Molecular and functional characterization of ovine cardiac valve-derived interstitial cells in primary isolates and cultures. *Tissue Eng*. 2004;10(9-10):1368-75.
55. Herijgers P, Ozaki S, Verbeken E, Van Lommel A, Racz R, Zietkiewicz M, et al. Calcification characteristics of porcine stentless valves in juvenile sheep. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1999;15(2):134-42.
56. Matveeva O, Nechipurenko Y, Rossi L, Moore B, Saetrom P, Ogurtsov AY, et al. Comparison of approaches for rational siRNA design leading to a new efficient and transparent method. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(8):e63.
57. Moazeni M, Khoramizadeh MR, Teimoori-Toolabi L, Noorbakhsh F, Rezaie S. The effect of EFG1 gene silencing on down-regulation of SAP5 gene, by use of RNAi technology. *Acta Med Iran*. 2014;52(1):9-14.
58. Moazeni M, Khorramizadeh MR, Teimoori-Toolabi L, Noorbakhsh F, Fallahi AA, Rezaie S. Down-regulation of the ALS3 gene as a consequent effect of RNA-mediated silencing of the EFG1 gene in *Candida albicans*. *Iran Biomed J*. 2012;16(4):172-8.
59. Parsons BD, Schindler A, Evans DH, Foley E. A direct phenotypic comparison of siRNA pools and multiple individual duplexes in a functional assay. *PLoS One*. 2009;4(12):e8471.
60. Tamm C, Kadekar S, Pijuan-Galito S, Anneren C. Fast and Efficient Transfection of Mouse Embryonic Stem Cells Using Non-Viral Reagents. *Stem Cell Rev*. 2016;12(5):584-91.
61. Ambesajir A, Kaushik A, Kaushik JJ, Petros ST. RNA interference: A futuristic tool and its therapeutic applications. *Saudi J Biol Sci*. 2012;19(4):395-403.
62. Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem*. 2010;397(8):3173-8.
63. Cardarelli F, Digiacoio L, Marchini C, Amici A, Salomone F, Fiume G, et al. The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery. *Sci Rep*. 2016;6:25879.
64. Ohki EC, Tilkins ML, Ciccarone VC, Price PJ. Improving the transfection efficiency of post-mitotic neurons. *J Neurosci Methods*. 2001;112(2):95-9.
65. Nabzdyk CS, Chun M, Pradhan L, LoGerfo FW. High throughput RNAi assay optimization using adherent cell cytometry. *J Transl Med*. 2011;9.
66. Echeverri CJ, Perrimon N. High-throughput RNAi screening in cultured cells: a user's guide. *Nat Rev Genet*. 2006;7(5):373-84.
67. Holmes K, Williams CM, Chapman EA, Cross MJ. Detection of siRNA induced mRNA silencing by RT-qPCR: considerations for experimental design. *BMC Res Notes*. 2010;3:53.
68. Rho HW, Lee BC, Choi ES, Choi IJ, Lee YS, Goh SH. Identification of valid reference genes for gene expression studies of human stomach cancer by reverse transcription-qPCR. *BMC Cancer*. 2010;10:240.
69. Li R, Xie W, Wang S, Wu Q, Yang N, Yang X, et al. Reference gene selection for qRT-PCR analysis in the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *PLoS One*. 2013;8(1):e53006.

70. Wan G, Yang K, Lim Q, Zhou L, He BP, Wong HK, et al. Identification and validation of reference genes for expression studies in a rat model of neuropathic pain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;400(4):575-80.
71. El Husseini D, Boulanger MC, Fournier D, Mahmut A, Bosse Y, Pibarot P, et al. High expression of the Pi-transporter SLC20A1/Pit1 in calcific aortic valve disease promotes mineralization through regulation of Akt-1. *PLoS One.* 2013;8(1):e53393.
72. Hulin A, Deroanne CF, Lambert CA, Dumont B, Castronovo V, Defraigne JO, et al. Metallothionein-dependent up-regulation of TGF-beta2 participates in the remodelling of the myxomatous mitral valve. *Cardiovasc Res.* 2012;93(3):480-9.
73. El Husseini D, Boulanger MC, Mahmut A, Bouchareb R, Laflamme MH, Fournier D, et al. P2Y2 receptor represses IL-6 expression by valve interstitial cells through Akt: implication for calcific aortic valve disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;72:146-56.
74. Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, et al. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods.* 2004;33(2):95-103.
75. Schaefer L, Babelova A, Kiss E, Hausser HJ, Baliova M, Krzyzankova M, et al. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest.* 2005;115(8):2223-33.
76. Meng X, Ao L, Song Y, Babu A, Yang X, Wang M, et al. Expression of functional Toll-like receptors 2 and 4 in human aortic valve interstitial cells: potential roles in aortic valve inflammation and stenosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008;294(1):C29-35.
77. Song R, Fullerton DA, Ao L, Zheng D, Zhao KS, Meng X. BMP-2 and TGF-beta1 mediate biglycan-induced pro-osteogenic reprogramming in aortic valve interstitial cells. *J Mol Med (Berl).* 2015;93(4):403-12.
78. Wirrig EE, Hinton RB, Yutzey KE. Differential expression of cartilage and bone-related proteins in pediatric and adult diseased aortic valves. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;50(3):561-9.
79. Stephens EH, Saltarrelli JG, Baggett LS, Nandi I, Kuo JJ, Davis AR, et al. Differential proteoglycan and hyaluronan distribution in calcified aortic valves. *Cardiovasc Pathol.* 2011;20(6):334-42.
80. Huusko T, Salonurmi T, Taskinen P, Liinamaa J, Juvonen T, Paakko P, et al. Elevated messenger RNA expression and plasma protein levels of osteopontin and matrix metalloproteinase types 2 and 9 in patients with ascending aortic aneurysms. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2013;145(4):1117-23.
81. Levy RJ, Gundberg C, Scheinman R. The identification of the vitamin K-dependent bone protein osteocalcin as one of the gamma-carboxyglutamic acid containing proteins present in calcified atherosclerotic plaque and mineralized heart valves. *Atherosclerosis.* 1983;46(1):49-56.
82. Levy RJ, Schoen FJ, Levy JT, Nelson AC, Howard SL, Oshry LJ. Biologic determinants of dystrophic calcification and osteocalcin deposition in glutaraldehyde-preserved porcine aortic valve leaflets implanted subcutaneously in rats. *Am J Pathol.* 1983;113(2):143-55.
83. Parrish AR, Ramos KS. Differential processing of osteopontin characterizes the proliferative vascular smooth muscle cell phenotype induced by allylamine. *J Cell Biochem.* 1997;65(2):267-75.
84. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* 2004;84(3):767-801.
85. Chen YJ, Wei YY, Chen HT, Fong YC, Hsu CJ, Tsai CH, et al. Osteopontin increases migration and MMP-9 up-regulation via alphavbeta3 integrin, FAK, ERK, and NF-kappaB-dependent pathway in human chondrosarcoma cells. *J Cell Physiol.* 2009;221(1):98-108.
86. Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Nuclear factor-inducing kinase plays a crucial role in osteopontin-induced MAPK/IkappaBalpha kinase-dependent nuclear factor kappaB-mediated promatrix metalloproteinase-9 activation. *J Biol Chem.* 2004;279(37):38921-35.
87. Philip S, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin stimulates tumor growth and activation of promatrix metalloproteinase-2 through nuclear factor-kappa B-mediated induction of membrane type 1 matrix metalloproteinase in murine melanoma cells. *J Biol Chem.* 2001;276(48):44926-35.
88. Liu H, Chen A, Guo F, Yuan L. A short-hairpin RNA targeting osteopontin downregulates MMP-2 and MMP-9 expressions in prostate cancer PC-3 cells. *Cancer Lett.* 2010;295(1):27-37.
89. Gao H, Steffen MC, Ramos KS. Osteopontin regulates alpha-smooth muscle actin and calponin in vascular smooth muscle cells. *Cell Biol Int.* 2012;36(2):155-61.
90. Wada T, McKee MD, Steitz S, Giachelli CM. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin. *Circ Res.* 1999;84(2):166-78.

91. Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H, et al. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol.* 2002;161(6):2035-46.
92. Speer MY, McKee MD, Guldberg RE, Liaw L, Yang HY, Tung E, et al. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *J Exp Med.* 2002;196(8):1047-55.

## 7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Versuchsansätze mit <i>Lipofectamine</i> . Alle Mengenangaben pro Well. ....	13
Tabelle 2: Versuchsansätze mit <i>HiPerFect</i> . Alle Mengenangaben pro Well. ....	14
Tabelle 3: Zusammenstellung der Volumina zur Synthese von cDNA. Volumen in $\mu\text{l}$ pro Probe. ....	17
Tabelle 4: Zusammenstellung der qRT-PCR-Proben. Volumen in $\mu\text{l}$ pro Well. ....	18
Tabelle 5: Übersicht des Programmablaufs von <i>StepOnePlus</i> . Zeit in Sekunden, Temperatur in Grad Celcius. ....	18
Tabelle 6: Mengenangaben von Kalzium-Standard und TRIS-HCl-Puffer zur Herstellung einer Standardreihe für ein Kalzium-Assay. Kalziumkonzentration in mg/dl, Volumen in $\mu\text{l}$ . ....	20
Tabelle 7: Material – Laborgeräte .....	22
Tabelle 8: Material – Verbrauchsmaterial .....	22
Tabelle 9: Material – Chemikalien .....	24
Tabelle 10: Material – Puffer, Lösungen, Medien .....	26
Tabelle 11: Material – Kits .....	26
Tabelle 12: Material – siRNA .....	27
Tabelle 13: Material – Primer .....	27
Tabelle 14: Auflistung der potenziellen Referenzgene, die hinsichtlich der Stabilität ihrer Genexpressionslevel untersucht wurden .....	31



## 8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Prinzip der RNAi <i>in vivo</i> , in Anlehnung an Graw J. (2). .....	1
Abb. 2:	Zellulärer und molekularer Aufbau einer gesunden Aortenklappe, in Anlehnung an Rajamannan NM <i>et al.</i> (16). .....	4
Abb. 3:	Präparation der Schafsherzen mit Entnahme der Aortenklappen. ....	8
Abb. 4:	Schematische Darstellung eines Versuchsablaufs zur siRNA-Transfektion von ovinen VICs. ....	12
Abb. 5:	Schematische Darstellung der unterschiedlichen Behandlungsbedingungen bei einer siRNA-Transfektion mit <i>Lipofectamine</i> in 6-Well-Platten. ....	13
Abb. 6:	Schematische Darstellung der Plattenbelegung bei einer Transfektion mit siRNA-Sequenzen für <i>BGN</i> bzw. <i>OPN</i> und <i>in vitro</i> kalzifizierenden Bedingungen. ....	19
Abb. 7:	Auftragung der C <sub>T</sub> -Werte von neun potenziellen Referenzgenen. Analyse der interindividuellen Stabilität der Genexpressionslevel anhand der cDNA von unbehandelten ovinen VICs. ....	32
Abb. 8:	Auftragung der C <sub>T</sub> -Werte von sieben potenziellen Referenzgenen. Stabilitätsanalyse der Genexpressionslevel bezüglich verschiedener Behandlungsbedingungen innerhalb eines biologischen Replikates. ....	33
Abb. 9:	Auftragung der C <sub>T</sub> -Werte von <i>RPL29</i> . Stabilitätsanalyse der Genexpression von <i>RPL29</i> anhand der cDNA von transfizierten ovinen VICs. ....	34
Abb. 10:	Lichtmikroskopische Darstellung von ovinen VICs. Aufnahme 72 Stunden nach siRNA-Transfektion mit 0,375 µg siRNA und 6 µl <i>Lipofectamine</i> pro Well unmittelbar vor RNA-Isolation für qRT-PCR-Analysen, 10-fache Vergrößerung. ....	35
Abb. 11:	Relative mRNA-Expression von <i>MAPK1</i> . Ovine VICs wurden mit 0,375 µg siRNA und 6 µl <i>Lipofectamine</i> pro Well behandelt. ....	35
Abb. 12:	Relative mRNA-Expression von <i>BGN</i> . Ovine VICs wurden mit 0,375 µg siRNA und 6 µl <i>Lipofectamine</i> pro Well behandelt. ....	36
Abb. 13:	Relative mRNA-Expression von <i>OPN</i> . Ovine VICs wurden mit 0,375 µg siRNA und 6 µl <i>Lipofectamine</i> pro Well behandelt. ....	37
Abb. 14:	Relative mRNA-Expression von <i>HAS2</i> . Ovine VICs wurden mit 0,375 µg siRNA und 6 µl <i>Lipofectamine</i> pro Well behandelt. ....	37
Abb. 15:	Relative mRNA-Expression von <i>CD73</i> . Ovine VICs wurden mit 0,375 µg siRNA und 6 µl <i>Lipofectamine</i> pro Well behandelt. ....	38
Abb. 16:	Einfluss einer erhöhten Menge an siRNA auf den Gen- <i>knockdown</i> von <i>MAPK1</i> , <i>BGN</i> , <i>OPN</i> , <i>HAS2</i> und <i>CD73</i> . Ovine VICs wurden mit 1,5 µg siRNA und 6 µl <i>Lipofectamine</i> pro Well behandelt. Auftragung der relativen mRNA-Expression. ....	39
Abb. 17:	Einfluss einer erhöhten Menge an siRNA auf den Gen- <i>knockdown</i> von <i>MAPK1</i> , <i>BGN</i> , <i>OPN</i> , <i>HAS2</i> und <i>CD73</i> . Ovine VICs wurden mit 3 µg siRNA und 6 µl <i>Lipofectamine</i> pro Well behandelt. Auftragung der relativen mRNA-Expression. ....	40

Abb. 18:	Einfluss einer erhöhten Menge an <i>Lipofectamine</i> auf den Gen- <i>knockdown</i> von <i>MAPK1</i> , <i>BGN</i> , <i>OPN</i> , <i>HAS2</i> und <i>CD73</i> . Ovine VICs wurden mit 3 µg siRNA und 12 µl <i>Lipofectamine</i> pro Well behandelt. Auftragung der relativen mRNA-Expression. ....	42
Abb. 19:	Einfluss des Transfektionsreagenzes <i>HiPerFect</i> auf den Gen- <i>knockdown</i> von <i>MAPK1</i> , <i>BGN</i> , <i>OPN</i> , <i>HAS2</i> und <i>CD73</i> . Ovine VICs wurden mit 0,3 µg siRNA und 12 µl <i>HiPerFect</i> pro Well behandelt. Auftragung der relativen mRNA-Expression. ....	43
Abb. 20:	Einfluss des Transfektionsreagenzes <i>HiPerFect</i> auf den Gen- <i>knockdown</i> von <i>MAPK1</i> , <i>BGN</i> , <i>OPN</i> , <i>HAS2</i> und <i>CD73</i> . Ovine VICs wurden mit 0,9 µg siRNA und 12 µl <i>HiPerFect</i> pro Well behandelt. Auftragung der relativen mRNA-Expression. ....	44
Abb. 21:	Einfluss des Transfektionsreagenzes <i>HiPerFect</i> auf den Gen- <i>knockdown</i> von <i>MAPK1</i> , <i>OPN</i> und <i>HAS2</i> . Ovine VICs wurden mit 2,5 µg siRNA und 12 µl <i>HiPerFect</i> pro Well behandelt. Auftragung der relativen mRNA-Expression. ....	45
Abb. 22:	Einfluss neu designter siRNA-Sequenzen auf den Gen- <i>knockdown</i> von <i>MAPK1</i> , <i>OPN</i> und <i>HAS2</i> . Ovine VICs wurden mit 1,5 µg siRNA und 6 µl <i>Lipofectamine</i> pro Well behandelt. Auftragung der relativen mRNA-Expression. ....	47
Abb. 23:	Einfluss neu designter siRNA-Sequenzen auf den Gen- <i>knockdown</i> von <i>MAPK1</i> , <i>OPN</i> und <i>HAS2</i> . Ovine VICs wurden mit 3 µg siRNA und 12 µl <i>Lipofectamine</i> pro Well behandelt. Auftragung der relativen mRNA-Expression. ....	48
Abb. 24:	Auswirkung des Gen- <i>knockdowns</i> von <i>BGN</i> auf die relative mRNA-Expression von <i>TLR2</i> , <i>TLR4</i> , <i>TGF-β</i> und <i>DCN</i> . ....	49
Abb. 25:	Auswirkung des Gen- <i>knockdowns</i> von <i>OPN</i> auf die relative mRNA-Expression von <i>MMP2</i> , <i>MMP9</i> , <i>BGLAP</i> und <i>ACTA2</i> . ....	50
Abb. 26:	Auswirkung des Gen- <i>knockdowns</i> von <i>BGN</i> auf die Kalziumkonzentration in ovinen VICs. ....	51
Abb. 27:	Auswirkung des Gen- <i>knockdowns</i> von <i>OPN</i> auf die Kalziumkonzentration in ovinen VICs. ....	52

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg, unter dessen professioneller und zugleich kollegialer Leitung ich meine Doktorarbeit anfertigen durfte. Ich bedanke mich für das Vertrauen, mir dieses Dissertationsthema zu überlassen, sowie für sein fortwährendes Engagement als Doktorvater. An zweiter Stelle möchte ich herzlich Herrn Prof. Dr. med. Payam Akhyari, dem Leiter der Forschungsgruppe Experimentelle Chirurgie, für die produktiven Diskussionen und wegweisenden Ratschläge sowie sein großes Interesse an meinen Forschungsfortschritten danken.

Des Weiteren danke ich von Herzen meiner wissenschaftlichen Betreuerin Dr. rer. nat. Mareike Barth, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand, mich stets unterstützt, gefördert und ermutigt hat. Ohne ihre fachliche Kompetenz, ihr experimentelles Know-how, ihre organisatorischen sowie psychologischen Fähigkeiten wäre diese Arbeit in ihrer letztendlichen Form niemals zustande gekommen. Du bist ein großartiger Mensch und ich danke dir für alles.

Ebenfalls danken möchte ich dem gesamten Team der Experimentellen Chirurgie für die Beantwortung meiner unzähligen Fragen, die tatkräftige Unterstützung und Hilfestellung bei der Umsetzung meiner Experimente sowie die freundschaftliche Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle Frau Dr. rer. nat. Jessica Selig, die sich als eine der wichtigsten Ansprechpartnerinnen für mich erwiesen hat – ihr großes Engagement auf allen Ebenen, ihre Geduld und Hilfsbereitschaft sind unvergessen. Außerdem danke ich meinen lieben Kolleginnen Julia Kistner und Mariam Yazdanyar für ihre Loyalität, die vielen gemeinsamen Stunden im Labor und die wertvolle Freundschaft, die sich daraus entwickelt hat.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern, denen diese Arbeit gewidmet ist, für ihre bedingungslose Liebe und Unterstützung, ohne die nichts von alledem möglich gewesen wäre. Ihr gebt mir die Kraft und den Mut, einfach alles zu schaffen. Worte können nicht ausdrücken, wie sehr ich euch liebe.