

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

**Etablierung eines mRNA basierten Therapieansatzes  
für Aortenaneurysmen – Mikroinjektion von humaner  
TIMP-1 mRNA am ex vivo Aortenmodell**

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

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

**vorgelegt von**

**Doll, Isabelle Franziska**

**2022**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. M. Avci-Adali

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. I. Müller

Tag der Disputation: 29.11.2022

Meiner Familie –  
In Liebe und Dankbarkeit

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>IV</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>VI</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VII</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG..... 1</b>
1.1	Aufbau und Funktion der Aorta..... 1
1.2	Aneurysmen.....4
1.2.1	Thorakale Aortenaneurysmen.....5
1.2.2	Abdominelle Aortenaneurysmen .....6
1.2.3	Pathogenese .....7
1.2.3.1	Degenerativ/Inflammatorisch.....7
1.2.3.2	Genetisch-familiär.....8
1.2.3.2.1	Syndromale TAAs .....8
1.2.3.2.2	Bikuspide Aortenklappe .....10
1.2.3.3	Seltenere Ursachen.....11
1.2.4	Klinische Diagnostik und Therapie.....11
1.2.5	Komplikationen.....13
1.3	Die Interaktion zwischen TIMP-1 und MMPs sowie deren Rolle in der Entstehung von Aortenaneurysmen .....15
1.4	Messenger RNA (mRNA) basierte Therapieansätze und Applikationsmethoden .....18
1.5	Fragestellung und Ziele dieser Arbeit.....22
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....23</b>
2.1	Materialien .....23
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien .....23
2.1.2	Kits .....26
2.1.3	Verbrauchsmaterialien .....26
2.1.4	Geräte .....28
2.1.5	Plasmide und Primer.....30
2.1.6	Zellen und Gewebe .....30
2.1.7	Zell- und Gewebekulturmedien .....31
2.1.8	Puffer und Lösungen.....31
2.1.9	Software .....32

2.2	Methoden.....	32
2.2.1	Herstellung von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	32
2.2.2	Herstellung von mRNA mittels In-Vitro-Transkription (IVT).....	34
2.2.3	Markierung von hGLuc mRNA mit dem Fluorophor Cy3.....	36
2.2.4	Zellkultur.....	36
2.2.4.1	Zellen einfrieren und auftauen.....	37
2.2.4.2	Zellen kultivieren und splitten .....	37
2.2.4.3	mRNA Transfektion .....	37
2.2.4.4	Zellviabilitätsprüfung mittels PrestoBlue™ Assay .....	38
2.2.5	Ex vivo Analyse der TIMP-1 mRNA Expression in porciner und humaner Aorta .....	39
2.2.5.1	TIMP-1 mRNA Mikroinjektion in Aortengewebe .....	39
2.2.5.2	TIMP-1 Extraktion aus Aortengewebe .....	40
2.2.5.3	Nachweis des TIMP-1 Proteins mittels ELISA.....	41
2.2.5.4	Anfertigung von histologischen Schnitten.....	41
2.2.5.5	Nachweis der MMP Enzymaktivität mittels In-Situ-Zymographie.....	41
2.2.6	Statistik.....	42
2.3	Ethikvotum .....	43
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>44</b>
3.1	Analyse der PCR- und IVT-Produkte.....	44
3.2	Analyse der in vitro Transfektion von humaner TIMP-1 mRNA in NuFFs .....	45
3.3	Evaluation der Lokalisation und der Verteilung Cy3-markierter hGLuc mRNA nach Mikroinjektion in humane Aorta .....	47
3.4	Nachweis der TIMP-1 Expression nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA ex vivo in Aorta.....	49
3.4.1	Detektion des TIMP-1 Gehalts in Medien und Lysaten nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Intima in porcine Aorta .....	49
3.4.2	Detektion des TIMP-1 Gehalts in Medien und Lysaten nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA in humane Aorta .....	51
3.4.2.1	Mikroinjektion von Seite der Intima.....	51
3.4.2.2	Mikroinjektion von Seite der Adventitia.....	52
3.5	Histologischer in situ Nachweis der TIMP-1 Funktionalität durch Detektion der MMP-Aktivität in Aortengewebe nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA .....	54

3.5.1	Vergleich der Gewebefixierung mit Zink-Fixierlösung und 70 % Ethanol .....	55
3.5.1.1	Gewebefixierung mit Zink-Fixierlösung .....	56
3.5.1.1.1	Aufgelockertes Gewebe mit verminderter MMP-Aktivität nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA als Hinweis auf eine erfolgreiche Injektion .....	56
3.5.1.1.2	MMP-Aktivität in porciner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Intima oder Adventitia .....	58
3.5.1.1.3	MMP-Aktivität in humaner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Intima oder Adventitia .....	65
3.5.1.2	MMP-Aktivität in porciner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Intima und Fixierung mit 70 % Ethanol .....	72
3.5.1.3	Fazit .....	76
3.6	In vitro Evaluation der Expressionseffizienz von humaner TIMP-1 mRNA durch Nukleotidmodifikationen .....	77
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>79</b>
4.1	Die Entwicklung von MMP-Inhibitoren im Überblick .....	79
4.2	mRNA Therapeutika und ihre Anwendungsmöglichkeiten .....	80
4.3	Eignung der verwendeten humanen TIMP-1 mRNA und des Mikroinjektionsverfahrens .....	82
4.4	Evaluation des zeitlichen und örtlichen Verlaufs der TIMP-1 Expression nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA in porciner und humaner Aorta ex vivo .....	83
4.5	Etablierung der In-Situ-Zymographie an Aortengewebe nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA .....	85
4.6	Einfluss der Nukleotidmodifikation auf den Transfektionserfolg .....	87
4.7	Herausforderungen im therapeutischen Einsatz von TIMPs .....	87
4.8	Lokale Hemmung der MMP-Aktivität in Aneurysmen .....	88
4.9	Adaptierung der Ergebnisse zur in vivo Anwendung .....	90
4.10	Ausblick .....	91
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>95</b>
<b>7</b>	<b>ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL .....</b>	<b>108</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>109</b>

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Anatomie der Aorta: Lage im Körper und die verschiedenen Aortensegmente. ....	1
Abbildung 2: Schichtaufbau der Aortenwand. ....	3
Abbildung 3: Aortenaneurysmen. ....	5
Abbildung 4: Klassifikation der Aortendissektion nach Stanford und DeBakey. ....	14
Abbildung 5: Transfektion von humaner TIMP-1 mRNA. ....	20
Abbildung 6: MicronJet™ 600. ....	21
Abbildung 7: Analyse der PCR-Produkte mittels 1 % Agarose-Gelelektrophorese. ....	44
Abbildung 8: Analyse der IVT-Produkte mittels 1 % Agarose-Gelelektrophorese. ....	45
Abbildung 9: TIMP-1 Gehalt und Zellviabilität nach Transfektion von NuFFs mit humaner TIMP-1 mRNA. ....	46
Abbildung 10: Evaluation der Lokalisation und des Verteilungsmusters Cy3-markierter hGLuc mRNA nach Mikroinjektion in humane Aorta von Seite der Intima und der Adventitia. ....	48
Abbildung 11: Detektion des TIMP-1 Gehalts in Mediumsüberständen (A) und Gewebelysaten (B) nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA in porcine Aorta von Seite der Intima. ....	50
Abbildung 12: Detektion des TIMP-1 Gehalts in Mediumsüberständen (A und B) und Gewebelysaten (C und D) nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA in humane Aorta von Seite der Intima. ....	52
Abbildung 13: Detektion des TIMP-1 Gehalts in Mediumsüberständen (A) und Gewebelysaten (B) nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA in humane Aorta von Seite der Adventitia. ....	53
Abbildung 14: Aufgelockertes Gewebe mit verminderter MMP-Aktivität nach Mikroinjektion von 5 µg humaner TIMP-1 mRNA in porcine Aorta. ....	57
Abbildung 15: Analyse der MMP-Aktivität in porciner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Intima, Inkubation für 24 h und anschließender Fixierung mit Zink-Fixierlösung. ....	59
Abbildung 16: Analyse der MMP-Aktivität in porciner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Intima, Inkubation für 48 h und anschließender Fixierung mit Zink-Fixierlösung. ....	60
Abbildung 17: Analyse der MMP-Aktivität in porciner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Intima, Inkubation für 72 h und anschließender Fixierung mit Zink-Fixierlösung. ....	61

Abbildung 18: Analyse der MMP-Aktivität in porciner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Adventitia, Inkubation für 24 h und anschließender Fixierung mit Zink-Fixierlösung. ....	62
Abbildung 19: Analyse der MMP-Aktivität in porciner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Adventitia, Inkubation für 48 h und anschließender Fixierung mit Zink-Fixierlösung. ....	63
Abbildung 20: Analyse der MMP-Aktivität in porciner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Adventitia, Inkubation für 72 h und anschließender Fixierung mit Zink-Fixierlösung. ....	64
Abbildung 21: Analyse der MMP-Aktivität in humaner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Intima, Inkubation für 24 h und anschließender Fixierung mit Zink-Fixierlösung. ....	66
Abbildung 22: Analyse der MMP-Aktivität in humaner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Intima, Inkubation für 48 h und anschließender Fixierung mit Zink-Fixierlösung. ....	67
Abbildung 23: Analyse der MMP-Aktivität in humaner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Intima, Inkubation für 72 h und anschließender Fixierung mit Zink-Fixierlösung. ....	68
Abbildung 24: Analyse der MMP-Aktivität in humaner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Adventitia, Inkubation für 24 h und anschließender Fixierung mit Zink-Fixierlösung. ....	69
Abbildung 25: Analyse der MMP-Aktivität in humaner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Adventitia, Inkubation für 48 h und anschließender Fixierung mit Zink-Fixierlösung. ....	70
Abbildung 26: Analyse der MMP-Aktivität in humaner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Adventitia, Inkubation für 72 h und anschließender Fixierung mit Zink-Fixierlösung. ....	71
Abbildung 27: Analyse der MMP-Aktivität in porciner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Intima, Inkubation für 24 h und anschließender Fixierung mit 70 % Ethanol. ....	73
Abbildung 28: Analyse der MMP-Aktivität in porciner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Intima, Inkubation für 48 h und anschließender Fixierung mit 70 % Ethanol. ....	74
Abbildung 29: Analyse der MMP-Aktivität in porciner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Intima, Inkubation für 72 h und anschließender Fixierung mit 70 % Ethanol. ....	75
Abbildung 30: TIMP-1 Gehalt nach Transfektion von NuFFs mit 1,5 µg humaner TIMP-1 mRNA mit verschiedenen Nukleotidmodifikationen. ....	78

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	23
Tabelle 2: Verwendete Kits.....	26
Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	26
Tabelle 4: Verwendete Geräte.....	28
Tabelle 5: Verwendete Plasmide und Primer .....	30
Tabelle 6: Verwendete Zelllinie und Gewebe .....	30
Tabelle 7: Verwendete Zell- und Gewebekulturmedien.....	31
Tabelle 8: Verwendete Puffer und Lösungen .....	31
Tabelle 9: Verwendete Software .....	32
Tabelle 10: PCR-Ansatz .....	33
Tabelle 11: PCR-Amplifikationsprogramm .....	33
Tabelle 12: IVT-Ansatz .....	35

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
5mC	5-Methyl-CTP
AAA	Abdominelles Aortenaneurysma
ad	bis auf
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase
ADAMT	ADAM with thrombospondin motifs
ANOVA	Analysis of variance, Varianzanalyse
ARCA	Anti reverse cap analog
AT II	Angiotensin II
AT1	Angiotensin-Rezeptor-Typ 1
BAV	Bicuspid aortic valve, Bikuspidale Aortenklappe
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Cluster of differentiation
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COL3A1	Prokollagen Typ III Gen
CT	Computertomogramm
DBCO	Dibenzocyclooctyl
ddH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desocytiribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DQ-Gelatine	DQ™ Gelatin From Pig Skin, Fluorescein Conjugate
ECM	Extracellular matrix, Extrazellulärmatrix

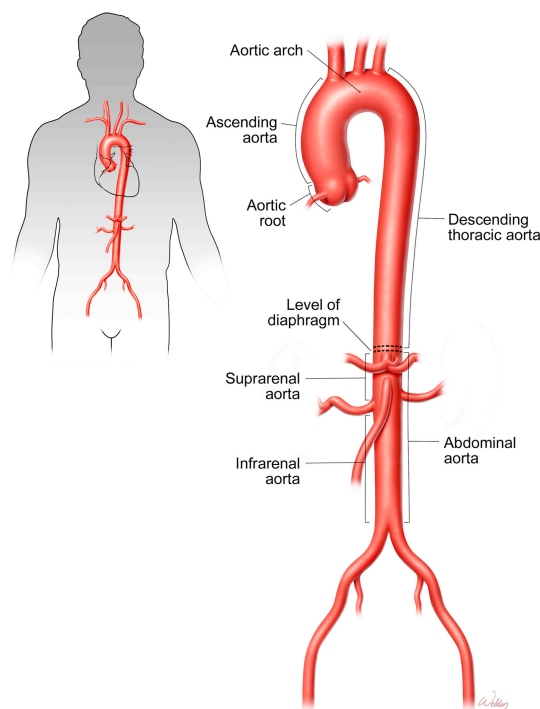
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EVAR	Endovascular aortic repair
E <sub>x</sub> /E <sub>m</sub>	Excitation/Emission
FBN1	Fibrillin-1
FBS	Fetales bovines Serum
FDA	Food and Drug Administration
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
hGLuc	Humanisierte Gaussia Luciferase
IVT	In-Vitro-Transkription
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L2000	Lipofectamine™ 2000
LNP	Lipid nanoparticle
LRP-1	Low-density lipoprotein receptor-related protein
LTBP	Latent TGF-β binding protein
MEN	MOPS-EDTA-Natriumacetat
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	Messenger ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomogramm
N	Normalität
N <sup>1</sup> mΨ	N <sup>1</sup> -Methyl-Pseudo-UTP
NaOH	Natronlauge

ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NuFF	Neonatal human foreskin fibroblast
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
PKR	Proteinkinase R
RFU	Relative Fluoreszenzeinheit
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene I
RNase	Ribonuklease
rpm	Revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
SEM	Standard error of the mean, Standardfehler des Mittelwerts
SMC	Smooth muscle cell, glatte Muskelzelle
TAA	Thorakales Aortenaneurysma
TAAA	Thorakoabdominelles Aortenaneurysma
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TEVAR	Thoracic endovascular aortic repair
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TLR	Toll-like-Rezeptor
U	Units, Einheiten
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Zn <sup>2+</sup>	Zweiwertiges Zinkion
$\mu$ l	Mikroliter
$\Psi$	Pseudo-UTP

# 1 EINLEITUNG

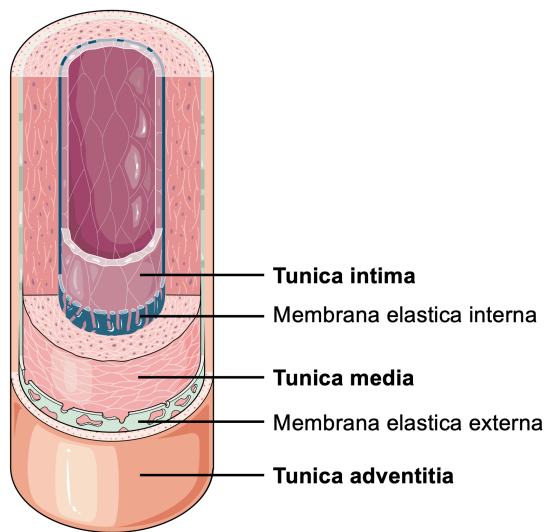
## 1.1 Aufbau und Funktion der Aorta

Als größtes arterielles Blutgefäß des menschlichen Körpers entspringt die Aorta, im Anschluss an die Aortenklappe, aus dem linken Ventrikel des Herzens. Beginnend mit der etwas breiteren Aortenwurzel, aus welcher die Koronargefäße abgehen, verjüngt sich der aufsteigende Teil, die Aorta ascendens, wieder. Daran schließt sich der Aortenbogen mit abgehenden Gefäßen für den Kopf und die obere Extremität an. Diesem folgt der absteigende Teil, die Aorta descendens. Diese lässt sich in einen thorakalen und einen abdominellen Teil untergliedern, welcher durch das Zwerchfell getrennt wird.<sup>1</sup> Die abdominelle Aorta wird durch den Abgang der Nierenarterien in einen suprarenalen und infrarenalen Teil untergliedert. Auf Höhe des vierten Lendenwirbelkörpers teilt sich die Aorta abdominalis schließlich in die Iliakalgefäße auf.<sup>2</sup> Abbildung 1 veranschaulicht diese anatomischen Zusammenhänge.



**Abbildung 1: Anatomie der Aorta: Lage im Körper und die verschiedenen Aortensegmente.** Vom Herzen abgehend befindet sich die Aortenwurzel mit den Koronargefäßen. Daran schließen sich die Pars ascendens, der Aortenbogen mit Gefäßen für Kopf und obere Extremität und die Pars descendens an. Dieser thorakale Teil wird durch das Zwerchfell vom abdominellen Teil getrennt. Letzterer wird durch Abgang der Nierenarterien in einen suprarenalen und infrarenalen Teil untergliedert und zweigt sich schließlich in die Iliakalgefäße auf.<sup>3</sup>

Die Aorta gehört zu den elastischen Arterien. Ihre Wand besteht aus drei Schichten (Abbildung 2). Die innerste Schicht, welche in Kontakt zum Blutstrom steht, ist die Tunica intima. Sie besteht aus einer Endothelzellschicht mit Basalmembran. Daran schließt sich die Tunica media an. Sie ist die dickste Schicht und gewährleistet sowohl Stabilität als auch Elastizität. Ihre Hauptbestandteile sind glatte Muskelzellen (smooth muscle cells, SMCs) und eine von diesen produzierte Extrazellulärmatrix (extracellular matrix, ECM). Die ECM umfasst elastische und kollagene Fasern sowie Proteoglykane. So sorgen elastische Fasern, v.a. Elastin, für eine gewisse Elastizität und Dehnbarkeit, während v.a. Kollagen Typ III die nötige Stabilität gegen Zugspannung liefert. Elastin kann auf das doppelte der Ursprungslänge gedehnt werden und wieder in seine ursprüngliche Form zurückkehren. Während der Elastogenese werden Lysin-Regionen des löslichen Vorläuferproteins Tropoelastin mit Hilfe der Lysyloxidase zu reifem Elastin vernetzt. Dieses ist unlöslich und robust. Elastin und Kollagen lagern sich zu Lamellen zusammen. In der thorakalen Aorta findet man ca. 50 dieser Lamellen, in der abdominellen ca. 28. Die SMCs adhären an diesen Lamellen und können durch Kontraktion die Spannung der elastischen Fasern variieren.<sup>4-6</sup> Die Tunica adventitia ist eine dünne äußere Schicht, welche aus stabilem Kollagen Typ I besteht. Sie verankert die Aorta in ihrer Umgebung und beherbergt wichtige Komponenten für die Versorgung und Reparatur der Gefäßwand. Dies umfasst die Vasa vasorum, Lymphbahnen und Nerven sowie Fibroblasten, Immun- und Stammzellen.<sup>6,7</sup>



**Abbildung 2: Schichtaufbau der Aortenwand.**

Dreischichtiger Wandaufbau mit einer dem Lumen zugewandten Intima, einer dicken Media und einer äußeren Adventitia. Die Media wird jeweils von einer Membrana elastica interna und externa begrenzt.<sup>8</sup>

Die einzelnen Aortenabschnitte unterscheiden sich in ihrem Wandaufbau. Dies spiegelt die unterschiedlichen Anforderungen an ihre Funktion wider. So hat die Aorta ascendens, wo der größte Druck herrscht, die dickste Media. Dort, sowie in der Aortenwurzel, findet man besonders viel Elastin und SMCs.<sup>9</sup> Dies ermöglicht eine Anpassung an die unterschiedlichen Druck- und Volumenverhältnisse während des Herzzyklus durch die Dehnbarkeit der Aorta.<sup>10</sup> In weiter abdominell gelegenen Abschnitten nimmt die Dicke der Media wieder ab.<sup>9</sup>

Obwohl das Blut im Herzen pulsatil während der Systole ausgeworfen wird, herrscht ein kontinuierlicher Blutfluss in den Gefäßen. Ermöglicht wird dies durch die elastischen Eigenschaften der Aorta. Das dahinterstehende Prinzip wird als Windkesselfunktion bezeichnet. In der Systole wird das Schlagvolumen nicht komplett weitergeleitet, sondern dehnt die elastischen Fasern in der Aorta und wird dort in Form von potenzieller Energie zwischengespeichert. Wenn sich die elastischen Fasern während der Diastole wieder gleichmäßig zusammenziehen, fließt das gespeicherte Blutvolumen weiter. Aufgrund der im Alter zunehmenden Versteifung der Gefäße steigt die Blutdruckamplitude.<sup>11</sup>

Eine weitere Funktion der Aorta liegt in der kurzfristigen Blutdruckregulation. Barorezeptoren messen den Druck und Chemorezeptoren im Glomus aorticum die Partialdrücke der Atemgase sowie den pH-Wert. Durch eine entsprechende Aktivierung des Sympathikus oder Parasympathikus kann auf Blutdruckänderungen reagiert werden.<sup>12</sup> Über elastische Fasern werden mechanische Reize, wie z.B. eine Änderung des transmuralen Drucks, direkt an die SMCs weitergeleitet. Diese können dann durch Kontraktion darauf reagieren.<sup>7</sup>

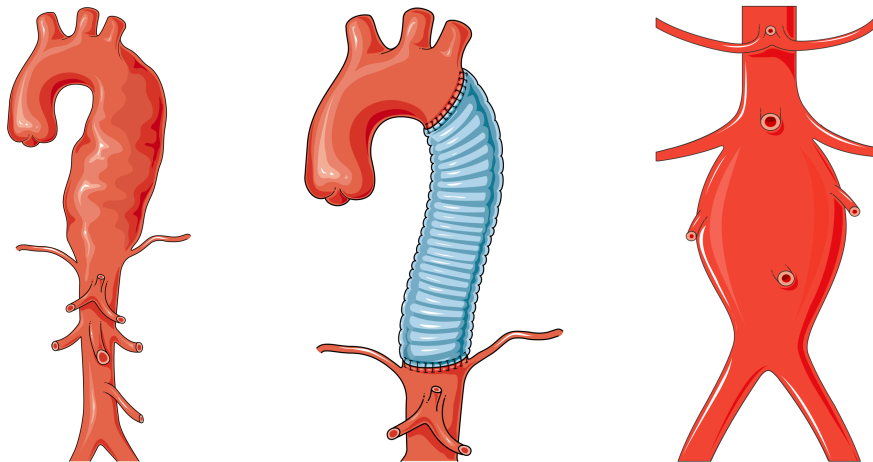
Wenn sich einzelne Komponenten in diesem gut aufeinander abgestimmten System verändern, kann es zu pathologischen Zuständen der Aorta kommen. Dies ist beispielsweise bei Aortenaneurysmen der Fall, deren Pathogenese durch defekte oder mangelnde Strukturbestandteile der Gefäßwand bedingt ist und zu einer Destabilisierung dieser führt.<sup>3</sup>

## **1.2 Aneurysmen**

Das Wort Aneurysma stammt aus dem Griechischen und bedeutet übersetzt Aufweitung oder Erweiterung. Im medizinischen Kontext wird damit eine lokalisierte irreversible Erweiterung eines Blutgefäßes bezeichnet, bei der die Erweiterung alle drei Wandschichten betrifft. Ist dies nicht der Fall, so handelt es sich um ein Pseudoaneurysma. Wenn der gesamte Umfang des Gefäßes gleichermaßen von der Aussackung betroffen ist, spricht man von einem fusiformen Aneurysma. Bei einer einseitigen Aufweitung der Gefäßwand handelt es sich um ein sakkuläres Aneurysma.<sup>13</sup>

Prinzipiell kann jedes Blutgefäß von einem Aneurysma betroffen sein, fast ausschließlich betrifft es jedoch Arterien. Fokus dieser Arbeit sind Aortenaneurysmen. Diese können je nach Lokalisation in thorakale (TAA), abdominelle (AAA) und thorakoabdominelle (TAAA) Aneurysmen unterteilt werden (Abbildung 3). In drei Viertel der Fälle ist die abdominelle Aorta betroffen, während die thorakale Aorta mit einem Viertel deutlich seltener Aneurysmen aufweist.<sup>13</sup> Aneurysmen sind das zweithäufigste Krankheitsbild der Aorta.<sup>14</sup> In der westlichen Welt stellen Aortenaneurysmen die 15. häufigste Todesursache dar.<sup>15</sup>

Per Definition handelt es sich bei einer Zunahme des Gefäßdurchmessers auf das 1,5-fache oder auf > 4 cm bei der thorakalen Aorta, bzw. auf > 3 cm bei der schmälere abdominalen Aorta, um ein Aneurysma. Aufgrund des eher kleineren Körperbaus bei Frauen können hier auch schon geringere Durchmesser als pathologisch betrachtet werden.<sup>4,16</sup>



**Abbildung 3: Aortenaneurysmen.**

Aneurysma der thorakalen Aorta descendens (links) sowie der abdominalen Aorta (rechts). In der Mitte ist die thorakale Aorta nach operativem Gefäßersatz der Pars descendens mit einer Prothese dargestellt.<sup>8</sup>

### 1.2.1 Thorakale Aortenaneurysmen

TAAAs treten mit einer Prävalenz von 0,16-0,34 % auf.<sup>17</sup> Ihre Inzidenz beträgt ungefähr 10 pro 100.000 Patientenjahren.<sup>18</sup> Tatsächlich ist diese wahrscheinlich häufiger, da 95 % der TAAAs asymptomatisch sind. Somit werden auch viele Todesfälle durch rupturierte Aneurysmen und Dissektionen als Myokardinfarkt fehldiagnostiziert.<sup>19</sup> Häufig haben TAAAs einen genetischen Aspekt und treten vermehrt bereits bei jüngeren Patienten beider Geschlechter auf.<sup>19</sup> Mindestens 19 % davon haben einen familiären nicht-syndromalen Hintergrund.<sup>20</sup>

TAAAs betreffen zu 60 % die Aortenwurzel oder die Pars ascendens, zu 40 % die Pars descendens, zu 10 % den Aortenbogen und zu 10 % den thorakoabdominellen Übergang. Dabei kann das Aneurysma auch mehrere Abschnitte gleichzeitig betreffen. Bis zu einem Viertel der Patienten mit TAA haben zusätzlich ein AAA. Dies deutet auf gemeinsame Zusammenhänge hin.<sup>21</sup> Durchschnittlich wachsen Ascendens-Aneurysmen 0,1 cm pro Jahr. Descendens-Aneurysmen wachsen mit einer durchschnittlichen Zunahme von

0,3 cm pro Jahr schneller.<sup>4</sup> Doch nicht nur die Zunahme des Aortendurchmessers stellt eine Gefahr dar. Insbesondere im Bereich der Aorta ascendens stellt eine Elongation ebenso einen Risikofaktor für schwere Komplikationen, wie Dissektion oder Ruptur, dar.<sup>22</sup> Ab 6 cm Durchmesser für Ascendens-Aneurysmen und ab 7 cm für Descendens-Aneurysmen kann ein rasanter Anstieg der Ruptur- und Dissektionsrate beobachtet werden. Die Dehnbarkeit nimmt ab und der Wandstress zu.<sup>23</sup> Das jährliche Risiko für Dissektion, Ruptur oder Tod beträgt bei TAAs ab 6 cm 15 %.<sup>24,25</sup> Die Aortendissektion ist die häufigste Todesursache, die im Zusammenhang zur Aorta steht.<sup>26</sup>

### **1.2.2 Abdominelle Aortenaneurysmen**

Die Prävalenz von AAAs liegt bei 5 % bei Männern über 65 Jahren und ist damit sechsmal höher als bei Frauen.<sup>27</sup> Die Inzidenz beträgt 55 pro 100.000 pro Jahr in der Altersklasse der 65 bis 74-jährigen.<sup>28</sup> Rauchen stellt den größten Risikofaktor in der Entstehung von AAAs dar. Daneben sind auch das männliche Geschlecht, Bluthochdruck, Hyperlipidämie, Atherosklerose, helle Hautfarbe und hohes Alter mit der AAA Entstehung assoziiert.<sup>16</sup> Interessanterweise konnte zwischen Diabetes mellitus und AAAs eine negative Korrelation gefunden werden. Die Inzidenz und die Wachstumsrate von AAAs waren unter Diabetikern geringer.<sup>29,30</sup> Auch wenn bisher noch keine Gendefekte identifiziert werden konnten, gibt es auch bei AAAs eine familiäre Prädisposition. Hierbei treten die Aneurysmen vermehrt bei jüngeren Patienten auf und haben ein höheres Rupturrisiko.<sup>21</sup> Eine Screeningstudie zeigte, dass 30 % der Geschwister von AAA Patienten ebenfalls betroffen sind.<sup>31</sup>

AAAs können je nach Bezug zu abgehenden Gefäßen oder deren Mitbeteiligung in infrarenal, juxtarenal, pararenal und paravisceral unterteilt werden. Thorakoabdominelle Aneurysmen werden nach der Crawford Klassifikation eingeteilt.<sup>32</sup> AAAs sind am häufigsten infrarenal lokalisiert. Dies ist zugleich der Aortenabschnitt, der neben der thorakalen Pars descendens am häufigsten von Atherosklerose betroffen ist.<sup>16</sup>

Im Lumen von AAAs bilden sich häufig Thromben. Diese sind entweder exzentrisch lokalisiert oder bedecken die Gefäßwand komplett. Bisher galt

hauptsächlich die Größe des Aneurysmas als Prädiktor für das Rupturrisiko. Es zeigte sich jedoch, dass auch die Größe und die Zunahme des Thrombus eine Rolle spielen.<sup>33</sup> Thromben beschleunigen das Wachstum von Aneurysmen einerseits, andererseits ist die Gefäßwand, welche in Kontakt zu Thromben steht, wesentlich dünner durch lokale Hypoxie.<sup>34,35</sup> Dort zeigte sich eine Degradation der Gefäßwandkomponenten, Apoptose von SMCs und vermehrt Inflammation.<sup>36</sup>

### **1.2.3 Pathogenese**

Die Pathogenese bei der Entstehung von Aneurysmen besteht aus einer Schwächung der Gefäßwand. Diese kann den mechanischen Anforderungen des Blutstroms nicht mehr standhalten, sodass es zu einer Zunahme des Gefäßdurchmessers kommt. Die Ursachen, die zu dieser Destabilisierung der Gefäßwand führen, sind dabei jedoch sehr vielfältig und unterschiedlicher Genese. Das Verhältnis aus Wanddicke und Lumendiameter ist in der gesamten Aorta konstant. Während jedoch die thorakale Aorta mehr elastische Lamellen enthält, finden sich in der abdominellen Aorta dickere Lagen aus SMCs zwischen den Lamellen. Durch den höheren Elastingehalt ist die thorakale Aorta anfälliger für Defekte in der ECM Synthese, während in der abdominellen Aorta eher ein exzessiver ECM Abbau Pathologien verursacht.<sup>37</sup>

#### **1.2.3.1 Degenerativ/Inflammatorisch**

Matrix-Metalloproteasen (MMPs) sind eine Enzymgruppe von 24 Endopeptidasen, welche am physiologischen Umsatz der ECM beteiligt sind, indem sie Strukturbestandteile, wie Elastin oder Kollagen, abbauen.<sup>38</sup> Insbesondere MMP-2, 9 und 12 spielen eine große Rolle im Abbau der ECM bei degenerativen AAAs. Die hohe Bindungsaffinität von MMP-12 an elastische Fasern der Media könnte für die starke elastolytische Aktivität dieser Matrixprotease verantwortlich sein. Durch den dadurch hervorgerufenen Verlust an Strukturproteinen nimmt die Wandstabilität ab und die Aorta kann dilatieren.<sup>39,40</sup> In Mausversuchen konnte gezeigt werden, dass ein Knockout von MMP-2 oder 9 eine Aneurysmabildung verhindert, bzw. bei Knockout von MMP-12 verlangsamt.<sup>41,42</sup>

Auch spielen Entzündungsvorgänge eine grundlegende Rolle. In AAA Gewebe findet sich in der Media und Adventitia entzündliches Infiltrat, welches hauptsächlich aus T-Lymphozyten und Makrophagen besteht.<sup>43</sup> Diese senden Zytokine aus, sodass es durch eine Immunreaktion zur Apoptose von SMCs, den elastin- und kollagenbildenden Zellen, kommt. Zudem sind im inflammatorischen Milieu vermehrt MMPs zu finden.<sup>44</sup>

Es gibt mehrere Annahmen, die zeigen, dass vor allem Elastin an der Pathogenese von Aneurysmen beteiligt ist. So treten Aneurysmen wesentlich häufiger in der abdominalen Aorta auf. Dort sind deutlich weniger elastische Lamellen als in der thorakalen Aorta zu finden. Der Elastingehalt in der Media von gesunden Aorten macht 35 % des Trockengewichts aus, in Aneurysmen finden sich lediglich 8 % Elastin. Die durchschnittliche Halbwertszeit von Elastin beträgt ca. 50-70 Jahre. Aufgrund der langen Halbwertszeit soll es ein Leben lang halten und wird beim Erwachsenen nicht mehr neu gebildet. Dies deckt sich mit einem eher späten Erkrankungsbeginn, welcher vom Grad des Elastinabbaus abhängt.<sup>5,7</sup> Neben dem deutlich verminderten Elastingehalt ist die Aortenwand deutlich dünner als in gesunden Aorten. Der Kollagengehalt ist dagegen leicht erhöht.<sup>45</sup> In AAAs war die mediale Neovaskularisation 15-mal höher als in gesunder Aorta und 3-mal höher als in arteriosklerotischer Aorta. Das Ausmaß der Neovaskularisation korreliert mit der Elastindegradation und der Entzündungsaktivität. Dies zeigt eventuelle Zusammenhänge von aneurysmatischen Veränderungen auf Grundlage eines arteriosklerotischen Plaques.<sup>46</sup> Die elastischen Eigenschaften des Elastins spielen außer in der Aorta auch in anderen Geweben, wie Lunge und Haut, eine wichtige Rolle.<sup>47,48</sup>

### **1.2.3.2 Genetisch-familiär**

#### **1.2.3.2.1 Syndromale TAAs**

Genetisch bedingte Aneurysmen entstehen häufig aufgrund von Mutationen verschiedener Strukturbestandteile. Hierbei können SMCs und deren kontraktile Einheit sowie Bestandteile elastischer und kollagener Fasern betroffen sein. Diese hereditären Aneurysmen betreffen insbesondere die thorakale Aorta und sind gehäuft schon bei jüngeren Patienten vorzufinden. Die typischen

kardiovaskulären Risikofaktoren sind hier oftmals nicht zu finden. Es sind bereits eine Vielzahl an Mutationen bekannt, nachfolgend wird jedoch nur eine Auswahl der wichtigsten genannt.<sup>3</sup>

Fibrillin-1 (FBN1) ist ein Glykoprotein, welches als Gerüst für Elastin dient.<sup>49</sup> Beim Marfan-Syndrom liegt eine autosomal-dominante Mutation im FBN1-Gen vor. Neben skelletalen und okulären Auffälligkeiten zeigen sich gehäuft Erweiterungen der Aortenwurzel, Aneurysmen im Bereich der Pars ascendens sowie Dissektionen, die unbehandelt häufig bereits bei Patienten im jungen Erwachsenenalter zum Tod führen.<sup>50,51</sup> In FBN1 Knockout Mäusen zeigten sich fragmentierte elastische Fasern und eine schlecht ausgebildete Media in der Aorta. Sie starben innerhalb von 2 Wochen gehäuft an Aortenaneurysmen.<sup>52</sup> Außerdem verbindet FBN1 elastische Fasern über Dense plaques mit der Zellmembran von SMCs. Mutationen führen hier zu einer verminderten Kontraktion der SMCs, sodass sich die Aorta schlechter an dynamische Veränderungen anpassen kann.<sup>53</sup> FBN1 spielt jedoch nicht nur als Strukturprotein, sondern auch als Signalwegprotein in Bezug auf das Zytokin transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), eine wichtige Rolle. Dieses ist an der Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen beteiligt. Außerdem stimuliert es die Kollagensynthese sowie den ECM Abbau durch vermehrte Aktivierung von MMPs. FBN1 bildet zusammen mit dem latent TGF- $\beta$  binding protein (LTBP) einen Komplex, wodurch TGF- $\beta$  als inaktive Form gebunden wird. FBN1 Mutationen führen zu einer unkontrollierten Freisetzung und Aktivierung von TGF- $\beta$ .<sup>54-56</sup>

Ein dem Marfan-Syndrom ähnliches Krankheitsbild ist das Loeys-Dietz-Syndrom. Auch hier kommt es vermehrt zu Aortenaneurysmen und -dissektionen. Ursächlich hierfür ist eine Mutation in TGF- $\beta$  Rezeptoren.<sup>57</sup>

Neuere Daten weisen darauf hin, dass die Interaktion von TGF- $\beta$  mit dem Hormon Angiotensin II (ATII) ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese von Aortenaneurysmen spielt. Dadurch kam die Idee auf, TGF- $\beta$  neutralisierende Antikörper und der Angiotensin-Rezeptor-Typ 1 (AT1) Inhibitor Losartan könnten therapeutisch eingesetzt werden. Losartan führt neben einer Blutdrucksenkung, welche sich ebenfalls protektiv auf die Aneurysmaentstehung auswirkt, auch zu

einer Senkung von TGF- $\beta$ . Die Studienlage hierzu ist jedoch widersprüchlich. Einerseits konnte die Aneurysmabildung im Marfan-Syndrom Mausmodell durch TGF- $\beta$  neutralisierende Antikörper, Losartan oder einer Kombinationstherapie verlangsamt oder sogar verhindert werden.<sup>58,59</sup> Auch in einer Patientenkohorte zeigte eine Anti-AT1 Therapie positive Effekte.<sup>60,61</sup> Andererseits konnte bei Mäusen, welche ATII Injektionen erhielten und mit TGF- $\beta$  neutralisierenden Antikörpern behandelt wurden eine erhöhte Rupturrate in der abdominalen Aorta sowie eine vermehrte Dilatation in der Aorta ascendens beobachtet werden. Hier hat TGF- $\beta$  somit eine protektive Funktion.<sup>62</sup> Letzteres war auch der Konsens weiterer Studien.<sup>63,64</sup>

Beim Williams-Beuren-Syndrom liegt eine heterozygote Mikrodeletion vor, bei der das Elastin-Gen komplett fehlt. Interessanterweise kommt es hier nicht vermehrt zu Aneurysmen, sondern die supraaortale Aortenstenose ist die häufigste kardiovaskuläre Manifestation.<sup>65</sup>

Eine Mutation im Prokollagen Typ III Gen (COL3A1) liegt beim Ehlers-Danlos-Syndrom Typ IV vor. Ein Mangel an Kollagen Typ III, welches maßgeblich für die Stabilität der Media verantwortlich ist, führt zu einer Schwächung der Aortenwand. Diese kann der mechanischen Beanspruchung nicht mehr standhalten und ist anfällig für Aneurysmen und Rupturen.<sup>66-68</sup>

Die Cutis laxa beschreibt ein Krankheitsbild, welches durch einen Mangel an Fibulin gekennzeichnet ist. Dies ist eine Proteingruppe in der ECM, welche normalerweise an der Zusammenlagerung von Tropoelastin beteiligt ist. Die dadurch gestörte Elastogenese führt zu schlaffer Haut und einer gewundenen Aorta. Interessanterweise treten Aneurysmen nur bei der Form auf, bei der Fibulin-4 betroffen ist, nicht aber bei Fibulin-5 Mutationen.<sup>69-71</sup>

#### **1.2.3.2 Bikuspidale Aortenklappe**

Die bikuspidale Aortenklappe (bicuspid aortic valve, BAV) ist der häufigste angeborene Herzfehler und tritt mit einer Prävalenz von 0,5-2 %, insbesondere bei Männern, auf.<sup>72</sup> Dieser Klappendefekt ist häufig mit weiteren kardiovaskulären Anomalien assoziiert. So haben Patienten mit BAV oft zusätzlich auch eine Aortenisthmusstenose.<sup>73</sup> Außerdem geht eine BAV gehäuft

mit Dilatationen, Aneurysmen und Dissektionen der thorakalen Aorta einher. Unter Patienten mit einer Aortendissektion finden sich 9 % mit einer BAV.<sup>74</sup> Ursprünglich wurde angenommen, dass eine geänderte Klappenmechanik zu unnatürlichen Flussmustern des Blutes und damit zu erhöhtem Wandstress in der Aorta führt. Histologisch konnte jedoch gezeigt werden, dass die Wanddegeneration eher dem Bild einer zystischen Medianekrose ähnelt. Diese ist gekennzeichnet durch nicht-inflammatorischen SMC Verlust, Abbau der elastischen Fasern und Ablagerung basophiler Substanzen.<sup>75,76</sup> Gestützt wird diese Annahme auch durch die Beobachtung, dass es bei Patienten mit BAV, welche sich einer Ross-Operation (autologer Aortenklappenersatz durch die Pulmonalklappe) unterzogen, im Verlauf zu einer Erweiterung des pulmonalen Autografts kam, obwohl wieder eine normale Hämodynamik hergestellt wurde.<sup>77</sup> Eine Erklärung hierfür kann der verminderte FBN1 Gehalt sein, der in Aorten von Patienten mit BAV, im Vergleich zu Patienten mit einer trikuspiden Aortenklappe, gefunden wurde. Außerdem wurde eine erhöhte MMP-Aktivität festgestellt. Diese Veränderungen konnten neben der Aorta auch in der Pulmonalarterie von BAV Patienten gefunden werden.<sup>78</sup>

### **1.2.3.3 Seltene Ursachen**

Die Spätfolge einer Syphilis zeigte sich früher häufig in Form von Ascendens-Aneurysmen. Aufgrund der guten Verfügbarkeit von antibiotischen Therapien tritt dies heutzutage nur noch sehr selten auf.<sup>21</sup> Mykotische Aneurysmen werden durch eine bakterielle Infektion der Aorta ausgelöst.<sup>79</sup>

Auch im Rahmen von Vaskulitiden können gehäuft Aneurysmen auftreten, ausgelöst durch die autoimmune Inflammation. Hier sind die Takayasu-Arteriitis und die Riesenzellarteriitis zu nennen. Besonders häufig sind hiervon Frauen betroffen.<sup>80,81</sup>

### **1.2.4 Klinische Diagnostik und Therapie**

Die meisten Aortenaneurysmen sind klinisch symptomlos und fallen erst im Rahmen von anderweitig durchgeführter Bildgebung als Zufallsbefund oder bei Auftreten von Komplikationen und Beschwerden auf. Symptome eines

Aneurysmas können beispielsweise Schmerzen, Luftnot, Heiserkeit, Paresen und Durchblutungsstörungen sein und entstehen durch Kompression benachbarter Strukturen. Goldstandard zur Diagnostik sind das Computertomogramm (CT) oder das Magnetresonanztomogramm (MRT) (ggf. mit Kontrastmittel). Die Echokardiographie zur Darstellung der Aortenwurzel und Pars ascendens bzw. die Sonographie bei der abdominalen Aorta stellen ebenfalls eine Diagnostikmöglichkeit dar. Abhängig von der Größe und Wachstumsrate des Aneurysmas werden unterschiedliche Kontrollintervalle empfohlen.<sup>21</sup>

Symptomatische Aneurysmen stellen immer eine Therapieindikation dar. Daneben wird bei AAAs ab einem Diameter von 5,5 cm bei Männern und 5 cm bei Frauen sowie einer Wachstumsrate von  $> 0,5$  cm in 6 Monaten ein elektiver Eingriff empfohlen.<sup>32</sup> Bei der thorakalen Aorta sollte die Pars ascendens ab einem Diameter von 5-5,5 cm sowie die Pars descendens ab 5,5-6 cm ersetzt werden, bei Patienten mit Marfan Syndrom oder BAV auch schon davor.<sup>82</sup> Je nach Größe und Lokalisation des Aneurysmas stehen unterschiedliche Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung. Bei allen Aneurysmen ist es essenziell, die kardiovaskulären Risikofaktoren gut einzustellen. Dazu gehört insbesondere die medikamentöse Senkung des Blutdrucks auf niedrig normale Werte, um eine Progression des Aneurysmas zu verlangsamen. Grundsätzlich wird vor Interventionen das Risiko des Eingriffs gegen das Risiko von Komplikationen abgewogen, welche möglicherweise während des Abwartens auftreten können. Die Mortalität beim elektiven Ascendens-Ersatz beträgt in spezialisierten Zentren 3-5 %, beim Descendens-Ersatz liegt sie zwischen 5-14 %.<sup>21</sup> Bei AAAs beträgt die Mortalität bei elektiven Operationen 2-6 %, während diese bei Ruptur bei über 80-jährigen Patienten bei 90 % liegt.<sup>83</sup>

Bei der thorakalen Aorta wird der aneurysmatische Abschnitt meist durch eine Gefäßprothese aus Dacron ersetzt. Hierfür ist immer der Einsatz der Herz-Lungen-Maschine notwendig. AAAs werden bevorzugt durch das Einbringen einer endovaskulären Stent-Prothese (endovascular aortic repair, EVAR) behandelt. Diese stabilisiert das Lumen und verhindert eine Perfusion des Aneurysmas, wodurch dessen Progression unterbunden wird. Zwischenzeitlich

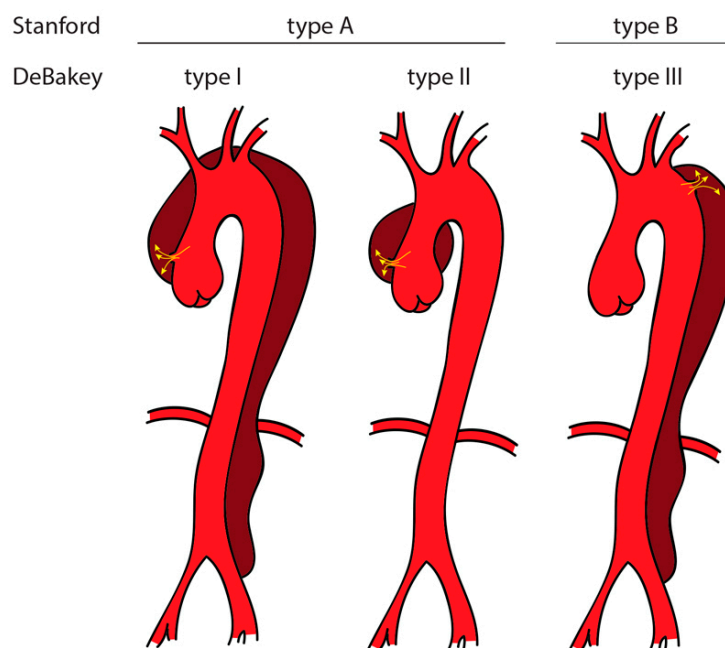
gibt es auch für thorakale Aneurysmen endovaskuläre Therapieoptionen (thoracic endovascular aortic repair, TEVAR) oder chirurgisch-interventionelle Hybrideingriffe (Frozen Elephant Trunk). Während chirurgische Verfahren durch die größere Invasivität höhere perioperative Risiken haben, sind TEVAR/EVAR bei komplizierten anatomischen Verhältnissen zum Teil gar nicht möglich bzw. führen durch das Auftreten von Endoleckagen zu keiner suffizienten Ausschaltung der Perfusion des Aneurysmas. Außerdem birgt die endovaskuläre Versorgung ein hohes Risiko für das Auftreten eines Schlaganfalls oder einer Spinalischämie. Andererseits kann sie auch eine Chance darstellen für multimorbide Patienten, welche als nicht operabel gelten.<sup>21</sup> Vergleicht man die chirurgische Therapie mit EVAR, so traten bei letzterer viermal häufiger Komplikationen auf, die einen Re-Eingriff notwendig machten. Die Mortalität war jedoch bei beiden Verfahren nach vier Jahren angeglichen.<sup>84</sup>

### **1.2.5 Komplikationen**

Die Aortendissektion ist eine gefürchtete Komplikation von Aneurysmen und zeigt sich durch plötzlich einsetzende stärkste Schmerzen in Brust oder Rücken. Weitere Symptome sind von den mitbetroffenen Aortenabschnitten und Gefäßabgängen abhängig und treten durch Minderperfusion auf. Dies können neurologische Symptome wie Schwindel oder Paresen sein, viszerale Organinfarkte, aber auch eine myokardiale Ischämie, Perikarderguss oder eine neu aufgetretene Aortenklappeninsuffizienz. Die meisten Dissektionen werden durch einen Blutdruckanstieg, entweder durch starke sportliche Aktivität oder emotionale Belastung, ausgelöst.<sup>4</sup>

Pathophysiologisch kommt es bei einer Dissektion zu einem Einriss in der Intima. Durch den Blutstrom breitet sich dieser weiter aus, sodass es zu einer Aufspaltung der Wandschichten der Media kommt. Es bildet sich ein wahres und ein falsches Lumen. Im Blut von Patienten mit einer Aortendissektion konnte ein erhöhter MMP-9 Level festgestellt werden. MMP-9 wird von neutrophilen Granulozyten in der Intima ausgeschüttet, wodurch die Dissektion getriggert wird.<sup>85</sup> Aortendissektionen werden nach Stanford und DeBakey, abhängig vom Ort des Intimaeinrisses und dessen Ausbreitung, eingeteilt (Abbildung 4). Bei

Stanford Typ A ist die Aorta ascendens mitbetroffen, bei Typ B nicht. Bei DeBakey wird noch eine genauere Unterteilung vorgenommen. Bei den Typen I und II liegt der Intimaeinriss im Bereich der Pars ascendens (entsprechend Stanford Typ A). Während Typ II auf die Pars ascendens beschränkt ist, ist bei Typ I die Pars descendens/abdominalis mitbetroffen. Typ III betrifft ausschließlich die Pars descendens/abdominalis (entspricht Stanford Typ B).<sup>86</sup>



**Abbildung 4: Klassifikation der Aortendissektion nach Stanford und DeBakey.<sup>87</sup>**

Die Risikofaktoren für eine Dissektion entsprechen denen von Aneurysmen, sodass es bei Aortenaneurysmen im Rahmen von Komplikationen häufig auch zu Dissektionen kommen kann. Andererseits können Dissektionen auch in nicht erweiterten Aortenabschnitten entstehen. Dadurch kommt es zu einer Schwächung der Aortenwand, sodass diese wiederum anfälliger für Aneurysmen ist.<sup>86</sup> Beträgt der Aortendurchmesser mehr als 5,5 cm, haben Patienten mit Dissektion eine 4-fach höhere Mortalität als Patienten mit geringerem Durchmesser.<sup>88</sup>

Während Typ A Dissektionen einen absoluten Notfall darstellen und einer unverzüglichen chirurgischen Therapie bedürfen, können komplikationslose Typ B Dissektionen medikamentös behandelt werden. Bei persistierender

Symptomatik oder Komplikationen von Typ B Dissektionen kann endovaskulär interveniert werden.<sup>86</sup>

Die Ruptur stellt das größte Risiko von Aneurysmen dar, da sie eine hohe Letalität aufweist. Dabei versterben 21 % der Patienten, bevor sie überhaupt eine Klinik erreichen können, weitere 51 % versterben, bevor sie überhaupt operiert werden können. Von denjenigen Patienten, die operiert werden, verstirbt fast die Hälfte intraoperativ.<sup>21</sup> Obwohl Frauen seltener von Aortenaneurysmen betroffen sind, ist bei ihnen die Rupturrate viermal höher.<sup>89</sup>

### **1.3 Die Interaktion zwischen TIMP-1 und MMPs sowie deren Rolle in der Entstehung von Aortenaneurysmen**

Die Familie der tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) stellt den endogenen Inhibitor der Enzymklasse der MMPs dar und spielt somit eine wichtige Rolle beim Umbau der ECM. Daneben inhibiert sie auch die verwandten Enzymklassen der a disintegrin and metalloproteinases (ADAMs) sowie ADAMs with thrombospondin motifs (ADAMTs). Bevor die hemmende Wirkung auf MMPs entdeckt wurde, wurde TIMP als Protein mit erythroid-potentiating activity bekannt, da es stimulierend auf das Wachstum der erythroiden Zellreihe wirkte.<sup>90,91</sup> Insgesamt umfasst die TIMP Familie die vier Subtypen 1-4. Diese unterscheiden sich in ihrer Bindungsaffinität zu den einzelnen MMPs, der Interaktion mit Proenzymen, dem Vorkommen in verschiedenen Gewebearten sowie in ihrer Löslichkeit.<sup>92</sup>

TIMP-1 ist ein 28 kDa großes lösliches Protein, welches von Zellen in die ECM sezerniert wird.<sup>93</sup> Darüber hinaus kann TIMP-1 auch in der Nähe der Zelloberfläche gefunden werden, wo es mit Oberflächenproteinen interagiert. Durch Interaktion mit CD63 (Cluster of differentiation) und  $\beta$ 1 Integrin kann es die Angiogenese modulieren. Als Wachstumsfaktor stimuliert es die Proliferation und hemmt die Apoptose.<sup>94,95</sup> Bei einigen Krebsarten, wie beispielsweise Brustkrebs oder kolorektalem Karzinom, liegen erhöhte TIMP-1 Level vor. Diese sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert.<sup>96</sup> Dies scheint jedoch vielmehr daran zu liegen, dass erhöhte MMP Level während der Tumorprogression durch erhöhte

TIMP Level ausgeglichen werden, sodass die Tumorprogression zwar durch erhöhte TIMP Level gekennzeichnet, jedoch nicht durch diese ausgelöst wird.<sup>97</sup> MMPs und TIMPs haben eine wichtige Rolle am dynamischen Umsatz der ECM und werden gemeinsam von Zellen sezerniert. Ein streng reguliertes Verhältnis aus Abbau und Neubildung ist essenziell für eine normale Gewebeentwicklung. MMP-2 und 9 sind die führenden MMPs in der Entstehung von Aneurysmen. Darüber hinaus sind sie in der Lage das Typ IV und V Kollagen der Basalmembran zu spalten und sind somit auch an der Tumorprogression und Metastasierung beteiligt.<sup>98</sup> MMP-9 wird von etlichen Zelltypen, wie Fibroblasten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, sekretiert. Beim Abbau der ECM aktiviert es proangiogene Wachstumsfaktoren, wie Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).<sup>99</sup> Jedes TIMP ist in der Lage jede MMP zu hemmen, die Effektivität ist jedoch unterschiedlich hoch. TIMP-1 hat eine hohe Affinität zu fast allen aktiven MMPs und kann an pro MMP-9 binden und so dessen Aktivierung verlangsamen.<sup>93</sup> MMPs liegen als Proenzym vor und haben ein  $Zn^{2+}$  Ion in ihrem katalytischen Zentrum.<sup>100</sup> Ihre Aktivierung erfolgt schrittweise durch Proteinasen, chemische Substanzen und durch die MMP selbst bzw. durch andere MMPs.<sup>101</sup> TIMPs bestehen aus einer N- und C-terminalen Domäne. Jede Domäne enthält drei Disulfidbrücken. Die N-terminale Domäne kann sich keilförmig falten, sodass sie das katalytische Zentrum der MMPs blockiert. Außerdem wird das  $Zn^{2+}$  Ion in einem Chelatkomplex gebunden.<sup>100</sup> Das stöchiometrische Verhältnis zwischen der nichtkovalenten Bindung von TIMP und MMP beträgt 1:1.<sup>102</sup> Bei pathologischen Veränderungen kommt es sowohl zu einem Anstieg der MMPs als auch reaktiv zu einem Anstieg der TIMPs. Daher ist nicht so sehr die Gesamtzahl von TIMPs oder MMPs entscheidend, viel wichtiger ist, dass das Verhältnis zueinander stimmt. Eine Dysbalance zwischen beiden bedingt die Pathogenese einiger Erkrankungen.<sup>103</sup>

TIMPs werden auf Transkriptionsebene durch Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert, sodass es zu gewebespezifischen Unterschieden im TIMP Gehalt kommt.<sup>104</sup> TIMP-1 ist insbesondere in den reproduktiven Organen vorzufinden.<sup>105</sup> Der Abbau von MMPs, TIMPs sowie MMP/TIMP-Komplexen erfolgt durch

Bindung an das Low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP-1). Dies bewirkt eine endozytotische Aufnahme und den Abbau dieser Proteine.<sup>106</sup>

Pathologische Veränderungen durch erhöhte TIMP-1 Level, die durch eine vermehrte ECM Ablagerung mit daraus resultierender Fibrose entstehen, sind beispielsweise hypertrophe Narben, Lungenfibrose und diabetische Nephropathie.<sup>107-109</sup>

Man könnte also annehmen, dass hohe TIMP Level zu einer Akkumulation der ECM mit daraus entstehender Fibrose führen, wohingegen ein Mangel in einem verstärkten ECM Abbau resultiert. Mausversuche zeigten jedoch, dass dies nicht der Fall ist und die Interaktion zwischen MMPs und TIMPs weitaus komplexer ist. TIMP-1 Knockout Mäuse zeigten einen erhöhten linksventrikulären Wandstress und eine Zunahme des Ventrikeldurchmessers durch einen Mangel an myokardialem Kollagen.<sup>110</sup> Kreuzte man diese noch mit Apolipoprotein E Knockout Mäusen, kam es unter einer atherogenen Diät vermehrt zur Degeneration der medialen elastischen Lamellen mit Ruptur. Durch Zugabe von rekombinantem TIMP-1 konnte die gelatinolytische Aktivität verringert werden.<sup>111</sup> Vorgenannte Beispiele zeigen den Einfluss von TIMP-1 auf den ECM Umsatz durch direkte Interaktion mit MMPs. Jedoch hat TIMP-1 auch einen indirekten Einfluss auf die ECM. Eine weitere Studie zur Lungenfibrose fand zwar keinen Unterschied im Fibroselevel zwischen Wildtyp und TIMP-1 Knockout Mäusen. Jedoch zeigte sich bei den Knockout Mäusen eine signifikant verstärkte Inflammation, was darauf schließen lässt, dass TIMP-1 eine wichtige Rolle in der Herunterregulierung von Entzündungsreaktionen spielt.<sup>112</sup> Diese Annahme wird in einer Studie zur Leberfibrose ebenfalls belegt. Hier zeigte sich bei TIMP-1 Knockout Mäusen ebenfalls eine erhöhte Entzündungsreaktion sowie eine verstärkte Fibrose.<sup>113</sup> Gewebeschädigung und die dadurch hervorgerufene Entzündungsreaktion sind wichtige Trigger, wodurch es zu Reparaturvorgängen und Fibrose kommt.<sup>114</sup>

Dies zeigt, dass TIMP-1 einerseits durch direkte Hemmung der MMP-Aktivität einem Abbau der ECM entgegenwirken kann. Andererseits kann es durch seinen

Einfluss auf die Entzündungsreaktion eine inflammatorisch bedingte Fibrose verhindern und so indirekt Einfluss auf die ECM nehmen.

Auch in Aneurysmen zeigt sich eine Gewebeschädigung sowie vermehrte Inflammation. Außerdem kann dort eine vermehrte MMP-Aktivität festgestellt werden. Misst man den TIMP Gehalt in AAA Gewebe ist dieser im Vergleich zu gesunder Aorta deutlich verringert.<sup>115</sup> TIMP-1 Knockout Mäuse sind anfälliger dafür AAAs zu entwickeln.<sup>116</sup> In Aorten von Patienten mit TAAs zeigt sich ein zu Gunsten von MMPs verschobenes Verhältnis zu TIMPs. So ist das MMP-9 Level erhöht, während TIMP-1 und 2 vermindert sind. Bei Patienten, welche zusätzlich eine BAV haben, ist MMP-2 erhöht und TIMP-1 vermindert.<sup>117</sup>

#### **1.4 Messenger RNA (mRNA) basierte Therapieansätze und Applikationsmethoden**

Die Notwendigkeit nach zielgerichteten und zugleich nebenwirkungsarmen Therapiemöglichkeiten ist groß. Zugleich ist es oftmals schwierig, vor allem große Proteine zu applizieren, sodass diese stabil an den Wirkungsort gelangen, ohne zuvor abgebaut zu werden.<sup>118</sup> Diese Problematik ebnete den Weg für eine neue Wirkstoffklasse der Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid, mRNA) Therapeutika, deren Einsatzmöglichkeiten vielfältig sind. Es gibt bereits zahlreiche erfolgsversprechende in vivo Studien zur Proteinersatztherapie, Immuntherapie und Impfstoffherstellung. Diese Wirkstoffe sollen beispielsweise bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs oder Viruserkrankungen zum Einsatz kommen. Der große Durchbruch gelang den mRNA basierten SARS-CoV-2 Impfstoffen während der Corona Pandemie als die ersten überhaupt zugelassenen mRNA Therapeutika.<sup>119</sup>

Der Weg von der Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid, DNA) zum Protein durchläuft in eukaryotischen Zellen zwei Kompartimente. Im Zellkern befindet sich die DNA, welche die Informationen für die Synthese von Proteinen enthält. Während der Transkription wird ein Teil dieser Informationen von der DNA in mRNA umgeschrieben. Durch posttranskriptionale Modifikationen wie Capping und Polyadenylierung wird die anschließende Translation der mRNA

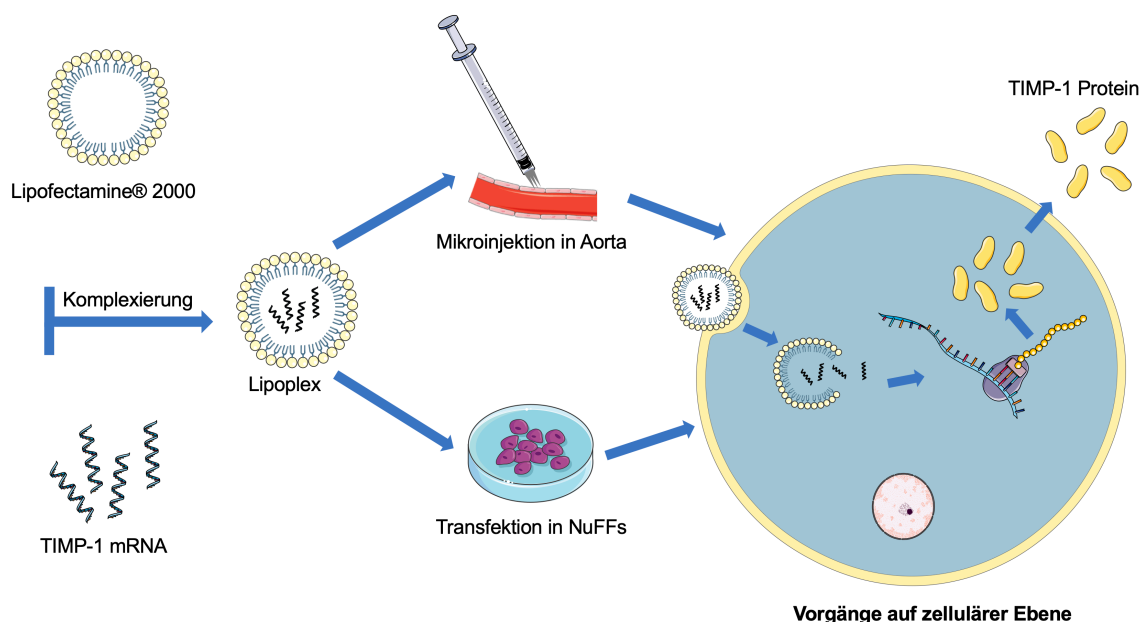
ermöglicht. Die mRNA kann den Zellkern verlassen und wird im Zytosol an den Ribosomen translatiert, wobei das Zielprotein exprimiert wird.

Dieses Verfahren macht man sich auch therapeutisch zunutze, indem anstelle von DNA oder rekombinanten Proteinen synthetische mRNA appliziert wird. Bei mRNA besteht jedoch kein mutagenes Risiko, da keine Erbinformationen in den Zellkern gelangen und sich in die DNA einlagern können. Zudem ist die Lebensdauer der mRNA zeitlich begrenzt, somit auch die der möglichen Nebenwirkungen. Dadurch sind dauerhafte Zellveränderungen nahezu ausgeschlossen. Für längerfristige therapeutische Effekte sind somit ggf. wiederholte Gaben nötig. Künstlich applizierte mRNA bewirkt selbst bei mitotisch inaktiven Zellen eine erfolgreiche Proteinexpression, da sie nicht bis in den Zellkern gelangen muss.<sup>118</sup>

Um die Translationseffizienz der künstlichen mRNA zu verbessern, werden verschiedene Modifikationen vorgenommen. Das am 5'-Ende angebrachte Anti reverse cap analog (ARCA) sorgt für eine effiziente Translation und verhindert einen frühzeitigen Abbau der mRNA. Als Vorteil zu herkömmlichen Cap-Strukturen kann das ARCA nicht verkehrt herum in die mRNA eingebaut werden. Der am 3'-Ende angebrachte Poly(A)-Schwanz, sowie die Integration von untranslatierten Regionen als regulatorische Sequenzen, erhöhen ebenfalls die Translationseffizienz und Stabilität der mRNA.<sup>118</sup>

Synthetische mRNA bewirkt eine Stimulation des Immunsystems. Rezeptoren des angeborenen Immunsystems wie Toll-like-Rezeptoren (TLR) und retinoic acid-inducible gene I (RIG-I), aber auch Proteinkinase R (PKR), werden durch RNA Strukturen aktiviert, was zu einem verstärkten Abbau der mRNA führt. Die ausgelöste Immunantwort kann durch die Verwendung von chemisch modifizierten Nukleotiden verringert werden. Außerdem wirkt sich dies positiv auf Translationseffizienz und Stabilität der mRNA gegen ubiquitär vorkommende Ribonukleasen (RNasen) aus.<sup>118</sup> In dieser Arbeit wurden anstelle von Cytidin 5-Methyl-Cytidin (5mC) verwendet sowie anstelle von Uridin Psudouridin ( $\Psi$ ) und N1-Methyl-Pseudouridin (N1m $\Psi$ ). Außerdem kann eine Dephosphorylierung der mRNA das immunogene Potenzial noch weiter vermindern und verhindert, dass die mRNA zirkulär oder gefaltet vorliegt.<sup>120</sup>

Es stehen verschiedene Transfektionsmethoden zur Verfügung. Dabei handelt es sich zum einen um physikalische Verfahren wie Mikroinjektion, Elektroporation oder die Genkanone. Andererseits gibt es auch chemische Verfahren, wie beispielsweise die häufig genutzte Lipofektion.<sup>118</sup> Hierbei wird die anionische mRNA in kationische Liposomen (lipid nanoparticles, LNPs) verpackt und bildet dabei sogenannte Lipoplexe. Diese können dann über Endozytose von Zellen aufgenommen werden und die mRNA wird im Zytosol freigesetzt, wo anschließend die Translation stattfindet.<sup>121</sup> Dies schützt die mRNA zudem vor RNasen.<sup>122</sup> Hierfür wurde für die Versuche dieser Arbeit Lipofectamine™ 2000 (L2000) verwendet. Abbildung 5 veranschaulicht diesen Vorgang.



**Abbildung 5: Transfektion von humaner TIMP-1 mRNA.**

Die TIMP-1 mRNA bildet zusammen mit L2000 durch Komplexbildung Lipoplexe. Diese werden entweder in Aortengewebe injiziert oder in NuFFs transfiziert. Dabei werden die Lipoplexe durch Endozytose von Zellen aufgenommen und die mRNA wird im Zytosol freigesetzt. Dort findet an den Ribosomen die Translation der mRNA statt und das gebildete TIMP-1 Protein wird anschließend sekretiert.<sup>8</sup>

Für die Applikation von mRNA in spezifische Gewebe sind zielgerichtete Verfahren notwendig, um die gewünschten Zielzellen sicher zu erreichen. Die in Lipoplexe verpackte mRNA kann dabei beispielsweise über Mikroinjektion in das Gewebe eingebracht werden und wird anschließend über Endozytose von den Zielzellen aufgenommen. Dabei können verschiedene Mikronadel-Typen unterschieden werden. Es gibt solide Nadeln, welche außen mit dem Wirkstoff

beschichtet sind, selbstauflösende Nadeln, in welchen der Wirkstoff enthalten ist und hohle Mikronadeln, durch welche man den Wirkstoff applizieren kann.<sup>123</sup> Die in dieser Arbeit verwendeten hohlen Mikronadeln MicronJet™ 600 (NanoPass Technologies) (Abbildung 6) bestehen aus kristallinem Silizium. Dabei sind drei pyramidenförmige Nadeln mit einer Länge von 600 µm nebeneinander angeordnet. Golombek et al. applizierten mit dem MicronJet™ 600 erfolgreich synthetische mRNA in die Dermis und erzielten damit eine gesteigerte Proteinexpression.<sup>124</sup> In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob sich dieses Injektionsverfahren analog dazu zur Injektion von humaner TIMP-1 mRNA in aortales Gewebe eignet und um die Funktionsfähigkeit von humaner TIMP-1 mRNA in Aortengewebe zu evaluieren. Durchschnittlich beträgt die Dicke der Intima 100-120 µm, die der Media 470-690 µm und die der Adventitia 240-300 µm.<sup>125</sup> Somit sollte die Zielschicht Tunica media durch eine Injektion von beiden Seiten erreicht werden können. Darüber hinaus wurden diese Mikronadeln bereits erfolgreich für eine intradermale Influenzaimpfung sowie Insulinapplikation in Studien eingesetzt. Hierbei war besonders das kleine Injektionsvolumen mit dadurch geringerem Wirkstoffanteil hervorzuheben, bei welchem dennoch mit herkömmlichen Injektionen vergleichbare Ergebnisse erzielt werden konnten.<sup>126-128</sup>



**Abbildung 6: MicronJet™ 600.**

Der Mikroinjektionsaufsatz besteht aus drei Mikronadeln aus kristallinem Silizium mit einer Länge von 600 µm und ist auf einer handelsüblichen 1 ml Spritze aufgebracht. Die blaue Markierung zeigt bei der Injektion nach oben.

## **1.5 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit**

Bisher mangelt es an Therapiemöglichkeiten, die Aneurysmen bereits in ihrer Entstehung verlangsamen oder sogar rückgängig machen können. TIMP-1 ist ein vielversprechendes Protein, welches durch Hemmung von MMP-2 und 9 diese Lücke eventuell füllen könnte und somit in Zukunft für die Therapie von Aortenaneurysmen eingesetzt werden könnte.

In dieser prospektiv experimentellen Arbeit soll untersucht werden, ob durch Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA in aortales Gewebe ex vivo eine Expression von enzymatisch aktivem TIMP-1 erzielt werden kann und dieses somit in der Lage ist die MMP-Aktivität in Aortengewebe zu reduzieren.

Zunächst soll in Zellversuchen die Transfektionsfähigkeit und Toxizität von humaner TIMP-1 mRNA untersucht werden. Anschließend soll evaluiert werden, inwiefern sich die verwendete Mikroinjektionsmethode zur Applikation von mRNA in Aortengewebe eignet und ob hier eventuell noch Anpassungen erfolgen müssen. Danach soll die Mikroinjektion humaner TIMP-1 mRNA in aortales Gewebe an einem ex vivo Aortenmodell folgen. Hier soll zunächst evaluiert werden, ob TIMP-1 im Gewebe überhaupt exprimiert wird. Anschließend soll der zeitliche Verlauf und die verschiedenen Kompartimente, in welchen TIMP-1 vorzufinden ist, analysiert werden. Um dies zu untersuchen, muss zunächst eine Extraktionsmethode von TIMP-1 aus aortalem Gewebe etabliert werden. Darüber hinaus muss die Eignung des verwendeten Aortenmodells zur Beantwortung der Fragestellung bewertet werden. Falls TIMP-1 nach Mikroinjektion der entsprechenden mRNA in Aorta exprimiert wird und nachgewiesen werden kann, soll untersucht werden, ob es dann auch eine funktionelle Aktivität zur Inhibierung von MMPs besitzt und wie dies nachgewiesen werden kann. Hierzu soll eine Nachweismethode etabliert werden. Des Weiteren soll eine Optimierung der eingesetzten TIMP-1 mRNA erfolgen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

In Tabelle 1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
10x Zinc Fixative (Formalin Free)	552658	BD Pharmingen™, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G RNA Cap Structure Analog (ARCA)	S1411S	New England Biolabs, Ipswich (USA)
5-Azido-C <sub>3</sub> -UTP	NU-157S	Jena Bioscience GmbH, Jena (Deutschland)
5-Methyl-CTP	NU-1138S	Jena Bioscience GmbH, Jena (Deutschland)
Agarose	BIO-41025	Bioline Reagents Limited, London (UK)
Amphotericin B (250 µg/ml)	C-42040	PromoCell GmbH, Heidelberg (Deutschland)
Ampuwa®	1088813	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg (Deutschland)
Borsäure (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	B7901-500G	Sigma-Aldrich, Merck KgaA, Darmstadt (Deutschland)
Bovine Serum Albumin (BSA)	A7906-100G	Sigma-Aldrich, Merck KgaA, Darmstadt (Deutschland)
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	C1016-100G	Sigma-Aldrich, Merck KgaA, Darmstadt (Deutschland)
CASYton	5651808	OLS OMNI Life Science GmbH & Co KG, Bremen (Deutschland)
DBCO-Sulfo-Cy3	CLK-A140-1	Jena Bioscience GmbH, Jena (Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	39757.02	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg (Deutschland)

<b>DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), high glucose</b>	41965039	Gibco®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
<b>DNA Gel Loading Dye (6x)</b>	R0611	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
<b>DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline), ohne CaCl<sub>2</sub>/MgCl<sub>2</sub></b>	14190094	Gibco®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
<b>DQ™ Gelatin From Pig Skin, Fluorescein Conjugate</b>	D12054	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
<b>Ethanol absolut, für die Molekularbiologie</b>	A3678,0250	AppliChem GmbH, Darmstadt (Deutschland)
<b>Ethanol absolut, zur Analyse</b>	A1613,2500	AppliChem GmbH, Darmstadt (Deutschland)
<b>Ethylendiamintetra-essigsäure (EDTA)</b>	E5134-250G	Sigma-Aldrich, Merck KgaA, Darmstadt (Deutschland)
<b>Fetal Bovine Serum (FBS)</b>	10270106	Gibco®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
<b>Formaldehydlösung, ca. 37 %</b>	1.04003.1000	Sigma-Aldrich, Merck KgaA, Darmstadt (Deutschland)
<b>Formamid</b>	1.09684.1000	EMSURE®, Merck KgaA, Darmstadt (Deutschland)
<b>GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (10.000x in Wasser)</b>	41003	Biotium, Inc., Fremont (USA)
<b>Gentamicin (50 mg/ml)</b>	G1397-10ML	Sigma-Aldrich, Merck KgaA, Darmstadt (Deutschland)
<b>Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100x)</b>	78430	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
<b>Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent</b>	11668019	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
<b>Lysis Buffer 1</b>	IS007	Cloud-Clone Corp., Wuhan (China)
<b>MOPS</b>	M1254-100G	Sigma-Aldrich, Merck KgaA, Darmstadt (Deutschland)
<b>Mounting Medium With DAPI – Aqueous, Fluoroshield</b>	ab104139	Abcam plc, Cambridge (UK)
<b>N<sup>1</sup>-Methylpseudo-UTP</b>	NU-890S	Jena Bioscience GmbH, Jena (Deutschland)
<b>NaCl 0,9% (Isotonische Kochsalzlösung)</b>	1312813	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg (Deutschland)
<b>Natriumacetat (CH<sub>3</sub>COONa)</b>	S2889-250G	Sigma-Aldrich, Merck KgaA, Darmstadt (Deutschland)

<b>Natriumazid (NaN<sub>3</sub>)</b>	438456-5G	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
<b>Natriumchlorid (NaCl)</b>	27810.295	NORMAPUR®, VWR International, LLC., Radnor (USA)
<b>Natronlauge (NaOH), 2 mol/l (2N)</b>	109136	Titripur®, Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
<b>Nuklease-Freies Wasser</b>	129114	QIAGEN GmbH, Hilden (Deutschland)
<b>Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium</b>	11058021	Gibco®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
<b>Paraformaldehyd (PFA)</b>	1.04005.1000	EMPROVE®, Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
<b>peqGOLD DNA-Leiter Mix</b>	25-2040	VWR International, LLC., Radnor (USA)
<b>PrestoBlue™ Cell Viability Reagent</b>	A13262	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
<b>Pseudo-UTP</b>	NU-1139S	Jena Bioscience GmbH, Jena (Deutschland)
<b>RiboLock Rnase Inhibitor (40 U/μl)</b>	EO0381	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
<b>RNA Millennium™ Markers</b>	AM7150	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
<b>RnaseZap™ Rnase Decontamination Solution</b>	AM9780	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
<b>Salzsäure (HCl), 6 mol/l (6N)</b>	0281.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (Deutschland)
<b>Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 2,5 mol/l (5N)</b>	480364	Titripur®, Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
<b>Trizma® Hydrochlorid</b>	T3253-1KG	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
<b>Trizma®-Base</b>	T1503-1KG	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
<b>Trypsin-EDTA (0.05 %), phenol red</b>	25300054	Gibco®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
<b>TWEEN® 20</b>	P1379-25ML	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
<b>Xylol, Isomerengemisch</b>	131769.1612	AppliChem GmbH, Darmstadt (Deutschland)

### 2.1.2 Kits

In Tabelle 2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Kits aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Kits

<b>Kit</b>	<b>Artikelnummer</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Antarctic Phosphatase Kit</b>	M0289S	New England Biolabs, Ipswich (USA)
<b>HotStar HiFidelity Polymerase Kit</b>	202602	QIAGEN GmbH, Hilden (Deutschland)
<b>Human TIMP-1 DuoSet ELISA</b>	DY970-05	R&D Systems Inc., Minneapolis (USA)
<b>MEGAscript™ T7 Transcription Kit</b>	AM1334	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
<b>MinElute PCR Purification Kit</b>	28004	QIAGEN GmbH, Hilden (Deutschland)
<b>Pierce™ BCA Protein Assay Kit</b>	23227	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
<b>RNeasy MinElute Cleanup Kit</b>	74204	QIAGEN GmbH, Hilden (Deutschland)
<b>Substrate Reagent Pack</b>	DY999	R&D Systems Inc., Minneapolis (USA)
<b>VascuLife® VEGF Endothelial Medium Complete Kit</b>	LL-0003	Lifeline® Cell Technology, Frederick (USA)

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 3 sind die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Artikelnummer</b>	<b>Hersteller</b>
<b>96-Well Platten durchsichtig</b>	442404	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
<b>96-Well Platten schwarz</b>	437111	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
<b>Abdeckfolie Easyseal™ Transparent 79x135mm</b>	676001	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster (Österreich)

<b>CASYcups</b>	5651794	OLS OMNI Life Science GmbH & Co KG, Bremen (Deutschland)
<b>CELLSTAR® Zellkulturflasche 175 cm<sup>2</sup></b>	660175	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster (Österreich)
<b>CELLSTAR® Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml</b>	188271 227261	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster (Österreich)
<b>Combitips advanced®, Biopur® 5,0 ml</b>	0030089669	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
<b>Costar® Zellkulturplatten 6-Well, 12-Well</b>	3516 3512	Corning Inc., New York (USA)
<b>Cryo.s™ 2 ml</b>	126263	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster (Österreich)
<b>Cutfix® Einmalskalpell 21</b>	5518075	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)
<b>Deckgläser 24 x 50 mm</b>	01-2450/0	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen (Deutschland)
<b>DNA LoBind Tubes 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml</b>	0030108035 0030108051 0030108078	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
<b>epT.I.P.S.® Reloads 2-200 µl</b>	0030073436	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
<b>Filterspitze PP, oberflächenoptimiert, 100-1.250 µl</b>	07-695-8300	nerbe plus GmbH & Co. KG, Winsen/Luhe (Deutschland)
<b>Luer-Lok™ 1 ml Einmalspritze</b>	309628	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
<b>MicronJet™ 600 Mikronadeln</b>		NanoPass Technologies Ltd, Nes Ziona (Israel)
<b>Mikrotomklingen R-35</b>		FEATHER Safety Razor Co., Ltd, Osaka (Japan)
<b>Pasteur Capillary Pipettes long size</b>		Wilhelm Ulbrich GdbR, Mainz (Deutschland)
<b>PETRISCHALE 94/16 mm</b>	633161	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster (Österreich)
<b>Precellys Lysing Kit Tissue grinding CKMix50-R - 2ml</b>	P000922- LYSK0-A	Bertin Technologies S.A.S., Montigny-le-Bretonneux (Frankreich)

<b>Protein LoBind Tubes 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml</b>	0030108094 0030108116 0030108132	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
<b>Serologische Pipetten 5ml, 10 ml, 25 ml</b>	606160 607160 760160	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster (Österreich)
<b>Sterican® 20 G Einmalkanülen</b>	4657519	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)
<b>SuperFrost® plus Objektträger</b>	03-0060	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen (Deutschland)
<b>TipOne® RPT- Filterpipettenspitzen (steril) 10/20 µl, 100 µl, 200µl</b>	S1120-3810 S1123-1840 S1120-8810	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg (Deutschland)
<b>Universal-Einbettkassetten mit Scharnierdeckel</b>	09-0203	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen (Deutschland)
<b>Wattestäbchen</b>	1031227	Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg (Deutschland)

#### 2.1.4 Geräte

In Tabelle 4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Geräte aufgeführt.

**Tabelle 4: Verwendete Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Modellbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Einfrierbehälter</b>	Mr. Frosty™	Nalgene®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
<b>Feuchtigkeitsskammer</b>	StainTray™ Slide Staining System	Simport Scientific Inc., Saint-Mathieu-de-Beloeil (Kanada)
<b>Geldokumentations- system</b>	iBright™ CL1000	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
<b>Gelsystem</b>	PerfectBlue™ Gelsystem Mini S	PEQLAB, VWR International, LLC., Radnor (USA)
<b>Gewebehomogenisator</b>	Mililys®	Bertin Technologies S.A.S., Montigny-le- Bretonneux (Frankreich)
<b>Inkubator</b>	Heraeus 6000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)

<b>Kamera</b>	Axiocam MRm	Carl Zeiss AG, Oberkochen (Deutschland)
<b>Magnetrührer</b>	MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach (Deutschland)
<b>Mikroplattenleser</b>	Eon™ Spektrophotometer	BioTek Instruments Inc., Winooski (USA); Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad (Deutschland)
	Mithras LB 940	
<b>Mikroskope</b>	Axiovert 40 CFL Axiovert 135	Carl Zeiss AG, Oberkochen (Deutschland)
<b>Mikrotiterplatte für photometrische Messungen</b>	Take3™ Micro-Volume Plate	BioTek Instruments Inc., Winooski (USA)
<b>Mikrotom</b>	Microm HM 355S	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
<b>Ofen</b>	ED 23	Fa. BINDER GmbH, Tuttlingen (Deutschland)
<b>PCR-Cycler</b>	Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
<b>pH-Meter</b>	inoLab pH 720	WTW, Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim (Deutschland)
<b>Pipetten</b>	Reference® Research® Research® plus Multipette® M4 Varipette®	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
<b>Pipettierhilfe</b>	pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt (Deutschland)
<b>Schüttelinkubator</b>	Plattformschüttler Polymax 1040 mit Inkubator 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach (Deutschland)
<b>Spannungsquelle</b>	Power Supply 200/2.0	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules (USA)
<b>Thermomixer</b>	Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)

<b>Vortexer</b>	Mixer Uzusio VTX-3000L	LMS CO., LTD., Tokio (Japan)
<b>Waage</b>	Excellence Plus XP105DR	Mettler Toledo Inc., Columbus (USA)
<b>Werkbank</b>	HERASafe® HS	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
<b>Zellzählsystem</b>	CASY®	Schärfe System GmbH, Reutlingen (Deutschland)
<b>Zentrifugen</b>	MiniSpin® plus Centrifuge 5415 R Centrifuge 5810	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)

### 2.1.5 Plasmide und Primer

In Tabelle 5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sowie die Primer für die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) aufgeführt.

**Tabelle 5: Verwendete Plasmide und Primer**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Humanes TIMP-1 Plasmid</b>	pEX-A128-TIMP1	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg (Deutschland)
<b>Humanisierte Gaussia Luciferase Plasmid</b>	pEX-A2-hGLuc	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg (Deutschland)
<b>Vorwärts Primer</b>	5'-TTGGACCCTCGTACA GAAGCTAATACG-3'	Ella Biotech GmbH, Martinsried (Deutschland)
<b>Rückwärts Primer</b>	5'-T <sub>120</sub> CTTCCTACTCAGGCT TTATTCAAAGACCA-3'	Ella Biotech GmbH, Martinsried (Deutschland)

### 2.1.6 Zellen und Gewebe

In Tabelle 6 sind die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie und Gewebe aufgeführt.

**Tabelle 6: Verwendete Zelllinie und Gewebe**

<b>Zelllinie / Gewebe</b>	<b>Herkunft</b>
<b>Neonatal human foreskin fibroblasts (NuFFs)</b>	AMS Biotechnology (Europe) Ltd., Abingdon (UK)
<b>Humane Aorta</b>	Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Tübingen
<b>Porcine Aorta</b>	Tier-OP der Experimentellen Chirurgie, Universitätsklinikum Tübingen

### 2.1.7 Zell- und Gewebekulturmedien

In Tabelle 7 sind die in dieser Arbeit verwendeten Medien zur Zell- und Gewebekultivierung aufgeführt.

**Tabelle 7: Verwendete Zell- und Gewebekulturmedien**

Medium	Zusammensetzung
<b>Antimikrobielle Lösung für Aorta</b>	50 ml DMEM 500 µl Gentamicin (50 mg/ml) 250 µl Amphotericin B (250 µg/ml)
<b>Gewebekulturmedium</b>	VascuLife® VEGF Endothelial Medium Complete Kit ohne Hydrocortisone Hemisuccinate LifeFactor
<b>Zellkulturmedium</b>	DMEM mit 10% FBS

### 2.1.8 Puffer und Lösungen

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Puffer und Lösungen mit destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) Ampuwa® angesetzt. Anschließend wurde der pH-Wert mit Salzsäure (HCl) und Natronlauge (NaOH) eingestellt.

In Tabelle 8 sind die in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen aufgeführt.

**Tabelle 8: Verwendete Puffer und Lösungen**

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
<b>4% Paraformaldehyd (PFA)</b>	4 g PFA ad 100 ml DPBS Bei 80 °C 3 h unter Rühren lösen pH 7,4
<b>ELISA Probenpuffer</b>	1 % BSA in DPBS
<b>ELISA Stopp-Lösung</b>	2 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<b>ELISA Waschpuffer</b>	0,05 % TWEEN® 20 in DPBS
<b>In-Situ-Zymographie-Puffer</b>	50 mM TRIS-HCl 150 mM Natriumchlorid 5 mM Calciumchlorid 0,2 mM Natriumacid pH 7,6
<b>Ladepuffer für RNA-Gele (pro Probe)</b>	3,3 µl Formamid 1 µl 37% Formaldehyd 1 µl 10x MEN-Puffer 1,7 µl 6x Loading-Dye

<b>MEN-Puffer 10x (MOPS-EDTA-Natriumacetat-Puffer)</b>	200 mM MOPS 10 mM EDTA 50 mM Natriumacetat pH 7,0
<b>TBE-Puffer (TRIS-Borat-EDTA-Puffer)</b>	89 mM TRIS-Base 89 mM Borsäure 2 mM EDTA pH 8,0

### 2.1.9 Software

In Tabelle 9 sind die in dieser Arbeit verwendeten Softwareprogramme aufgeführt.

**Tabelle 9: Verwendete Software**

<b>Programm</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Axiovision Rel. 4.8</b>	Carl Zeiss AG, Oberkochen (Deutschland)
<b>EndNote X9.3.3</b>	Clarivate, Philadelphia (USA)
<b>Excel für Mac 16.46</b>	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
<b>Gen5™ 2.09</b>	BioTek Instruments Inc., Winooski (USA)
<b>MikroWin 2000</b>	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad (Deutschland)
<b>Prism 9.0.1 für Mac</b>	GraphPad Software, LLC., San Diego (USA)
<b>Word für Mac 16.46</b>	Microsoft Corporation, Redmond (USA)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Herstellung von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Herstellung von synthetischer mRNA wird mittels PCR DNA in vitro vervielfältigt. Mittels des HotStar HiFidelity Polymerase Kits (QIAGEN) wurde die gewünschte TIMP-1 oder humanisierte Gaussia Luciferase (hGLuc) Zielsequenz aus den entsprechenden Plasmiden amplifiziert (siehe Tabelle 5). Zusätzlich wurde während der PCR ein Poly(T)-Schwanz mit einer Länge von 120 bp hinzugefügt. Hierzu wurde der in Tabelle 10 dargestellte Reaktionsansatz in einem 0,5 ml DNA LoBind Tube zusammengesetzt.

Tabelle 10: PCR-Ansatz

	Endkonzentration	Menge
<b>Vorwärts Primer</b>	0,7 µM	7 µl
<b>Rückwärts Primer</b>	0,7 µM	7 µl
<b>Q-Solution 5x</b>	1x	20 µl
<b>Puffer 5x</b>	1x	20 µl
<b>Template</b>	100 ng Plasmid	
<b>Polymerase (2,5 U/µl)</b>	5 U	2 µl
<b>Nuclease-freies Wasser</b>		Auffüllen des Ansatzes auf 100 µl

Es erfolgte die Amplifikation im PCR-Cycler nach dem in Tabelle 11 dargestellten Programm. Bei 94 °C denaturieren die Doppelstränge, sodass anschließend bei 55 °C die Primer mit den Einzelsträngen hybridisieren. Die Elongation erfolgt bei 72 °C. Durch herunterkühlen auf 4 °C wird die Reaktion schließlich beendet.

Tabelle 11: PCR-Amplifikationsprogramm

Schritt	Temperatur	Dauer
1.	94 °C	3 min
2.	94 °C	45 s
3.	55 °C	1 min
4.	72 °C	1 min
<b>30x Wiederholung ab Schritt 2</b>		
5.	72 °C	5 min
6.	4 °C	halten

Nachfolgend wurde die generierte DNA mit dem MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN) gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt und in 2 x 20 µl Nuclease-freiem Wasser eluiert.

Es folgte eine photometrische Messung der DNA-Konzentration bei 260/280 nm am Eon™ Spektrophotometer (BioTek Instruments). Anschließend wurde die Länge der DNA-Fragmente mittels einer Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Hierzu wurden 200 ng DNA von jeder Probe mit 2 µl 6x Loading-Dye vermischt und mit Nuclease-freiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Als Größenmarker dienten 5 µl des peqGOLD DNA-Leiter Mix (0,1-10 kb). Das 1 % Agarose Gel bestand aus 0,5 g Agarose in 50 ml TBE-Puffer, welches kurz erhitzt und mit 3 µl GelRed® (10.000x) vermischt wurde. Die Mischung wurde in die Elektrophorese-

Vorrichtung gegossen und ausgehärtet. Anschließend wurden der Marker und die Proben auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für eine Stunde. Dadurch wurde die Reinheit der hergestellten DNA überprüft. Dies war der Fall, wenn die Bande die korrekte Länge hatte und keine zusätzlichen Banden sichtbar waren. Die Länge beträgt 947 bp bei TIMP-1 und 881 bp bei hGLuc.

Die DNA wurde bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **2.2.2 Herstellung von mRNA mittels In-Vitro-Transkription (IVT)**

Die In-Vitro-Transkription (IVT) ist ein Verfahren, um aus der zuvor hergestellten DNA in vitro mRNA zu synthetisieren. Hierfür wurden das MEGAscript™ T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) sowie die modifizierten Nukleotide Pseudo-UTP ( $\Psi$ ), N<sup>1</sup>-Methyl-Pseudo-UTP (N1m $\Psi$ ), 5-Methyl-CTP (5mC) und 5-Azido-C<sub>3</sub>-UTP eingesetzt.

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurde TIMP-1 mRNA mit den Modifikationskombinationen 5mC/ $\Psi$ , 5mC/N1m $\Psi$ , N1m $\Psi$  sowie ausschließlich unmodifizierte Nukleotide verwendet. Für hGLuc mRNA, welche anschließend mit Cy3 markiert wurde (siehe folgendes Kapitel), wurde zusätzlich zu 5mC/ $\Psi$  noch 5-Azido-C<sub>3</sub>-UTP eingesetzt.

Der in Tabelle 12 dargestellte Ansatz wurde in einem 1,5 ml DNA LoBind Tube angesetzt und für vier Stunden bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 12: IVT-Ansatz

	Endkonzentration	Menge
<b>ATP * (75 mM)</b>	7,5 mM	4 µl
<b>GTP * (75 mM)</b>	1,875 mM	1 µl
<b>CTP * (75 mM)</b>	7,5 mM	4 µl
<b>UTP * (75 mM)</b>	7,5 mM	4 µl
<b>5mC * (100 mM)</b>	7,5 mM	3 µl
<b>N1mΨ * (100 mM)</b>	7,5 mM	3 µl
<b>Ψ * (100 mM)</b>	7,5 mM	3 µl
<b>5-Azido-C<sub>3</sub>-UTP ** (10 mM)</b>	1,875 mM	7,5 µl
<b>ARCA (10 mM)</b>	2,5 mM	10 µl
<b>Template</b>	1,5 µg	
<b>Reaktionspuffer 10x</b>	1x	4 µl
<b>T7-Enzym Mix</b>		4 µl
<b>RNase-Inhibitor (2500 U)</b>	62,5 U	1 µl
<b>Nuklease-freies Wasser</b>		Auffüllen des Ansatzes auf 40 µl

\* Von jedem Nukleotid wurde entweder die natürliche oder modifizierte Form eingesetzt.

\*\* Bei Einsatz von 5-Azido-C<sub>3</sub>-UTP wurden zusätzlich noch 2,25 µl (5,625 mM) Ψ verwendet.

Anschließend wurde zu jedem Ansatz 1 µl TURBO DNase (2 U/µl) hinzugefügt und für weitere 15 Minuten bei 37 °C inkubiert, um die verbliebene DNA zu entfernen. Die generierte mRNA wurde mittels des RNeasy MinElute Cleanup Kits (QIAGEN) gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt und in 2 x 20 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert.

Daraufhin folgte die Dephosphorylierung der mRNA mit dem Antarctic Phosphatase Kit (New England Biolabs). Dies minimiert eine Immunreaktion und verhindert, dass die mRNA durch eine mögliche Ligation zirkulär vorliegt. Hierzu wurden zu jedem Ansatz 1 µl Antarctic Phosphatase (5000 U/ml) und 4,5 µl 10x Puffer hinzugefügt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine erneute Aufreinigung der mRNA mit anschließender Elution in 2 x 30 µl Nuklease-freiem Wasser.

Analog zur DNA erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung sowie die Kontrolle des mRNA Produkts mittels 1 % Agarose-Gelelektrophorese. Als Marker wurden die RNA Millennium™ Markers verwendet. 200 ng der Proben sowie 1,5 µl des Markers wurden mit Nuklease-freiem Wasser auf 3 µl aufgefüllt und mit 7 µl Ladebuffer vermischt. Anschließend folgte eine Denaturierung für 10

Minuten bei 65 °C, bevor die Proben bei 100 V für eine Stunde im Gel elektrophoretisch aufgetrennt wurden.

Die mRNA wurde bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **2.2.3 Markierung von hGLuc mRNA mit dem Fluorophor Cy3**

Um mRNA unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen, kann diese mit dem Fluorophor Cy3 markiert werden. Dies ist ein Fluoreszenzfarbstoff aus der Gruppe der Cyanine. Zuerst wird während der IVT 5-Azido-C<sub>3</sub>-UTP in die mRNA eingebaut. Daran kann dann mittels kupferfreier Klick-Chemie DBCO-Sulfo-Cy3 gebunden werden. Dibenzocyclooctyl (DBCO)-Gruppen sind sehr reaktiv und binden an die Azido-Gruppen in der mRNA.

Laut Herstellerangaben wurde die Azido-mRNA im Verhältnis 1:5 von in der mRNA enthaltenen Azido-Gruppen zu DBCO-Sulfo-Cy3 eingesetzt und auf 30 µl mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wurde anschließend 10 Sekunden gevortext, abzentrifugiert und bei 37 °C und 300 rpm für eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte eine Aufreinigung mit dem RNeasy MinElute Cleanup Kit, photometrische Konzentrationsmessung und Kontrolle mittels 1 % Agarose-Gelelektrophorese. Hierbei wurde GelRed® nicht direkt ins Gel gegeben, sondern das Gel erst nachträglich für eine Stunde in 3 µl GelRed® (10.000x) in 50 ml TBE-Puffer inkubiert. Cy3 ist unter UV-Licht sichtbar. Dadurch kann durch Visualisierung einer Bande die erfolgreiche Kopplung von Cy3 an die mRNA bestätigt werden. Durch die anschließende Inkubation in GelRed® werden alle Nukleinsäuren sichtbar, sodass die korrekte Länge und Reinheit der Bande durch den Marker verifiziert werden kann.

### **2.2.4 Zellkultur**

Für die Versuche dieser Arbeit wurden Neonatal human foreskin fibroblasts (NuFFs) mit Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 10 % Fetalem Bovinen Serum (DMEM mit 10 % FBS) als Kulturmedium verwendet (siehe Tabelle 6 und Tabelle 7). Diese wurden bis Passage 19 eingesetzt.

#### **2.2.4.1 Zellen einfrieren und auftauen**

Zum Einfrieren wurden ca. zwei Millionen Zellen in 900 ml Medium (DMEM + 10 % FBS) in ein Cryo-Röhrchen gegeben. Es wurden 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugefügt, vorsichtig geschwenkt und sofort in einen Mr. Frosty™ gestellt und bei -80 °C eingefroren. Dadurch war eine schonende Temperatursenkung von 1 °C pro Minute gewährleistet.

Zum Auftauen wurde das Cryo-Röhrchen vorsichtig im Wasserbad erwärmt. Die Zellsuspension wurde in 9 ml Medium gegeben und bei 300 g für fünf Minuten zentrifugiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden in 20 ml frischem Medium in eine 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### **2.2.4.2 Zellen kultivieren und splitten**

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> so lange kultiviert, bis sie eine Konfluenz von 80-90 % erreichten. Das Medium wurde ca. alle 3 Tage gewechselt. Waren die Zellen konfluent, wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 10 ml Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) gewaschen. Danach wurden 10 ml Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (0,05 % mit Phenolrot) hinzugegeben und für wenige Minuten in den Inkubator gestellt, um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Anschließend wurden 10 ml Medium hinzugegeben und die Zellen wurden durch vorsichtiges Pipettieren gelöst und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 300 g für fünf Minuten. Das Medium wurde abgesaugt und durch 10 ml frisches Medium ersetzt. Danach wurde die Zellzahl mit CASY® bestimmt. Die Zellen wurden nun zur weiteren Kultivierung 1:10 in 20 ml Medium in eine frische 175 cm<sup>2</sup> Flasche ausgesät.

#### **2.2.4.3 mRNA Transfektion**

Für Transfektionsversuche wurden 3x10<sup>5</sup> NuFFs je Well einer 6-Well Platte ausgesät und für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in Zellkulturmedium kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 1 ml DPBS gewaschen und die Transfektionsansätze auf die Zellen gegeben. Diese

bestanden aus 1 ml Opti-MEM™ mit humaner TIMP-1 mRNA (0,5-2 µg) und L2000 in einem 1,5 ml DNA LoBind Tube. Zur Etablierung einer geeigneten mRNA Konzentration wurden zunächst die Nukleotidmodifikationen 5mC/Ψ eingesetzt. Anschließend wurden 1,5 µg mRNA in den Kombinationen 5mC/Ψ, 5mC/N1mΨ, N1mΨ sowie ausschließlich unmodifizierte Nukleotide getestet. Pro µg mRNA wurde 1 µl L2000 eingesetzt (Ausnahme: für 0,5 µg mRNA wurde ebenfalls 1 µl L2000 verwendet) und 20 Minuten bei Raumtemperatur komplexiert. Als Kontrollen wurden Opti-MEM™ und Opti-MEM™ mit 1 µl L2000 eingesetzt. Die Transfektionsansätze wurden auf die Zellen verteilt und die Zellen für vier Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden die Transfektionsansätze abgesaugt und 2 ml frisches Medium hinzugefügt. Nach einer weiteren 24-stündigen Inkubation wurden die Medien in einem 2 ml Protein LoBind Tube gesammelt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung zur Messung des TIMP-1 Gehalts gelagert. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen mittels PrestoBlue™ Assay überprüft.

#### **2.2.4.4 Zellviabilitätsprüfung mittels PrestoBlue™ Assay**

Zur Analyse der Zellviabilität von NuFFs nach einer TIMP-1 mRNA Transfektion wurde ein PrestoBlue™ Assay durchgeführt. Die Viabilitätsprüfung erfolgte durch eine Änderung der Fluoreszenz des PrestoBlue™ Cell Viability Reagents (Thermo Fisher Scientific) durch die reduzierenden Eigenschaften lebender Zellen. Zunächst wurden die Zellen mit 1 ml DPBS gewaschen. Danach wurden pro Well einer 6-Well Platte 500 µl PrestoBlue™ Cell Viability Reagent, 1:10 mit Zellkulturmedium verdünnt, hinzugegeben und für 90 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Leerwert diente ein Well ohne Zellen.

Nach der Inkubation wurden je 100 µl pro getestetem Well als Triplikat in eine schwarze 96-Well Platte überführt und die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) bei  $E_x/E_m=560/590$  nm am Mithras LB 940 (Berthold Technologies) gemessen.

## **2.2.5 Ex vivo Analyse der TIMP-1 mRNA Expression in porciner und humaner Aorta**

### **2.2.5.1 TIMP-1 mRNA Mikroinjektion in Aortengewebe**

Das Vorbereiten der Injektionsansätze sowie die Injektion selbst fanden unter sterilen Bedingungen statt. Die Aorta (porcin oder human) inkubierte für mindestens eine Stunde bei 4 °C in einer antimikrobiellen Lösung (siehe Tabelle 7). Anschließend wurde noch anhaftendes Gewebe bis zur Adventitia abpräpariert und die Aorta in ca. 0,7 x 0,7 cm große Stücke zerteilt. Diese lagerten bis zur Injektion in Zellkulturmedium.

Die Injektionsansätze wurden in 1,5 ml DNA LoBind Tubes vorbereitet. Hierfür wurden verschiedene humane TIMP-1 mRNA Mengen (2 µg, 3 µg, 5 µg, 10 µg) 1:1 mit L2000 komplexiert und mit Opti-MEM™ auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt. Die mRNA enthielt die modifizierten Nukleotide 5mC/Ψ. Als Kontrolle wurden 1,5 µl L2000 in 50 µl Opti-MEM™ verwendet. Für den Versuch mit hGLuc mRNA wurden 2 µg mRNA 1:1 mit L2000 in 50 µl Opti-MEM™ komplexiert. Nach der Zusammensetzung inkubierten die Ansätze für 20 Minuten bei Raumtemperatur.

Für die Injektion wurden die Ansätze mit einer Kanüle in eine 1 ml Luer-Lok™ Spritze aufgezogen und danach die Mikroinjektionsnadeln MicronJet™ 600 (NanoPass Technologies) aufgesetzt. Da Nadeln und Spritze ein Totraumvolumen von ca. 120 µl aufweisen, wurde für die erste Injektion ein Volumen von 170 µl verwendet.

Die Aortenstücke wurden mit einem Wattestäbchen trocken getupft. Danach wurde mit den Mikroinjektionsnadeln im 90° Winkel eingestochen und anschließend auf 45° abgeflacht, sodass die blaue Markierung nach oben zeigte und injiziert. Die Injektionen erfolgten entweder von Seite der Intima oder Adventitia. Nach erfolgter Injektion war am Gewebe eine leicht erhabene Aufhellung für kurze Zeit sichtbar. Es folgte eine Inkubation von 5 Minuten, bevor das Gewebe in DPBS gewaschen und anschließend in 1,5 ml Gewebekulturmedium in eine 12-Well Platte überführt wurde. Anschließend inkubierten die Aortenstücke bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24 h, 48 h oder 72 h.

Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Medien und ein Teil der Aortenstücke in 2 ml Protein LoBind Tubes überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung zur Proteinisolation und Messung des TIMP-1 Gehalts gelagert. Die restlichen Aortenstücke wurden in 2 ml Zink-Fixierlösung (BD Pharmingen™) oder 70 % Ethanol in eine 12-Well Platte überführt und für 48-72 h bei 4 °C fixiert. Hieraus wurden anschließend histologische Schnitte zur Analyse der MMP-Aktivität an der Injektionsstelle angefertigt.

#### **2.2.5.2 TIMP-1 Extraktion aus Aortengewebe**

Die Aorta besteht aus relativ zähem Gewebe, welches eine Proteinextraktion erschwert. Dafür wurden zunächst verschiedene Extraktionsverfahren und Lysepuffer getestet, welche nicht in dieser Arbeit aufgeführt sind. Das nachfolgend genannte Lyseverfahren wurde etabliert und erzielte die besten Resultate zur TIMP-1 Proteinextraktion.

Zunächst wurde jedes Aortenstück auf einer Glasplatte auf Eis mit einem Skalpell so klein wie möglich geschnitten. Während des gesamten Lysiervorgangs war darauf zu achten, die Proben so kühl wie möglich zu halten. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe des Precellys Lysing Kit Tissue grinding CKMix50-R mit dem Homogenisator Mililys® (beides Bertin Technologies), sowie des Lysis Buffer 1 (Cloud-Clone) lysiert. Das Lysing Kit bestand aus 2 ml Rührchen mit einer Mischung aus 2,8 mm und 5 mm großen Keramik-Beads. Der Lysepuffer wurde 100:1 mit Proteaseinhibitor gemischt und 750 µl davon pro Probe verwendet. Die zerkleinerte Aorta wurde hinzugegeben und es folgten insgesamt 15 Lyse-Zyklen zu je 20 Sekunden bei 5.000 rpm. Nach jedem Zyklus erfolgte eine halbe Minute Pause, in welcher die Proben auf Eis gekühlt wurden. Nach jeweils 5 Zyklen wurde eine 15-minütige Pause zum Kühlen der Proben auf Eis eingelegt. Zum Schluss wurde das Lysat in ein 1,5 ml Protein LoBind Tube überführt und für 15 Minuten bei 15.700 g und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden in ein frisches Tube überführt. Daraus wurde der extrahierte Gesamtproteingehalt mittels des Pierce™ BCA Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific) gemäß den Herstellerangaben bestimmt. Hierzu wurden die

Proben 1:10 verdünnt aufgetragen. Die restlichen Überstände wurden in Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### **2.2.5.3 Nachweis des TIMP-1 Proteins mittels ELISA**

Der TIMP-1 Gehalt in Zell- und Gewebemedien nach TIMP-1 mRNA Behandlung sowie Aortenlysaten wurde mittels Human TIMP-1 DuoSet ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) (R&D Systems) gemäß den Herstellerangaben bestimmt. Porcine Proben wurden unverdünnt aufgetragen. Bei humanen Proben wurden Medien 1:250 und Lysate 1:200 mit Probenpuffer verdünnt aufgetragen. Medien von TIMP-1 mRNA transfizierten Zellen wurden 1:150-1:200 mit Probenpuffer verdünnt aufgetragen. Zuvor wurden alle Proben bei 3.000 g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert und anschließend die Überstände für den ELISA eingesetzt.

#### **2.2.5.4 Anfertigung von histologischen Schnitten**

Nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA in porcine und humane Aorta wurden von einem Teil des Gewebes histologische Schnitte angefertigt, um die MMP Enzymaktivität an der Injektionsstelle darzustellen. Nachdem das Aortengewebe fixiert war, wurde die Dehydrierung und die Einbettung in Paraffin durch das Pathologische Institut des Universitätsklinikums Tübingen vorgenommen. Anschließend wurde das Gewebe in Paraffinblöcke gegossen und 5 µm dicke Schnitte mit dem Mikrotom Microm HM 355S (Thermo Fisher Scientific) angefertigt und auf SuperFrost® plus Objektträger (R. Langenbrinck GmbH) aufgebracht. Die Paraffinblöcke und Schnitte wurden zum Erhalt der Enzymaktivität bei 4 °C gelagert.

#### **2.2.5.5 Nachweis der MMP Enzymaktivität mittels In-Situ-Zymographie**

Über Nacht wurden die Schnitte bei 59 °C im Ofen erhitzt. Danach erfolgte die Deparaffinierung für je eine Minute in 2 x Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 80 %, 70 %, 60 % Ethanol). Zum Schluss wurden die Schnitte in Ampuwa® gewaschen und anschließend in einer Feuchtigkeitskammer ausgelegt. Je 250 µl Substratlösung bestehend aus

1 mg/ml der fluoreszenzmarkierten DQ™ Gelatin From Pig Skin, Fluorescein Conjugate (DQ-Gelatine) (Thermo Fisher Scientific) 1:50 verdünnt in In-Situ-Zymographie-Puffer (siehe Tabelle 8) wurde pro Schnitt verteilt. DQ-Gelatine ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein gekoppelt, welcher durch enzymatische Spaltung der Gelatine visualisiert wird (Dye Quenched). Dies ist der Fall, wenn MMPs im Gewebe vorhanden sind. Ist zusätzlich aktives TIMP-1 vorhanden, kann dieses die enzymatische Aktivität der MMPs inhibieren, sodass davon auszugehen ist, dass weniger Gelatine gespalten und dadurch weniger Fluorescein freigesetzt wird. Anschließend inkubierten die Schnitte zwei Stunden in der Feuchtigkeitskammer bei 37 °C.

Als Kontrolle dienten Schnitte, welche sofort nach Zugabe des Substrats für zwei Stunden bei -20 °C eingefroren wurden und Schnitte, die zuvor mit EDTA inhibiert wurden. Für letztere erfolgte zuerst eine einstündige Inkubation bei 37 °C mit 250 µl 20 mM EDTA pro Schnitt, bevor dann das Substrat, welches zusätzlich 20 mM EDTA enthielt, für zwei Stunden hinzugegeben wurde.

Anschließend wurden alle Schnitte für 3 x 1 Minute in jeweils frischem Ampuwa® gewaschen. Danach erfolgte eine 10-minütige Fixierung mit je 250 µl 4 % Paraformaldehyd (PFA) im Dunkeln. Daran schloss sich ein 2 x 5-minütiger Waschschrift in DPBS an. Schließlich wurden die Schnitte mit Fluoroshield Mounting Medium mit DAPI (Abcam) zur zusätzlichen Visualisierung der Zellkerne eingedeckt.

Die Auswertung der Schnitte und die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgten mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135 und der Kamera Axioacam MRm sowie dem dazugehörigen Programm Axiovision (alles Carl Zeiss AG).

### **2.2.6 Statistik**

Die statistische Analyse wurde mit GraphPad Prism (Version 9.0.1) durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Prüfung auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Es zeigte sich, dass alle Daten einer Gaußschen Normalverteilung entstammen. Eine nachfolgende Varianzanalyse untersuchte die Mittelwerte auf statistisch signifikante Unterschiede. Je nachdem, wie viele verschiedene Faktoren miteinander verglichen wurden, wurde eine One-way oder Two-way Analysis of

variance (ANOVA) für Messwiederholungen durchgeführt. Die anschließende Korrektur für multiples Testen erfolgte nach Bonferroni. Des Weiteren wurde der ungepaarte t-Test verwendet. P-Werte  $\leq 0,05$  wurden dabei als statistisch signifikant angesehen (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; ns  $p > 0,05$ ). Alle Daten wurden als Mittelwert + Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean, SEM) dargestellt.

### **2.3 Ethikvotum**

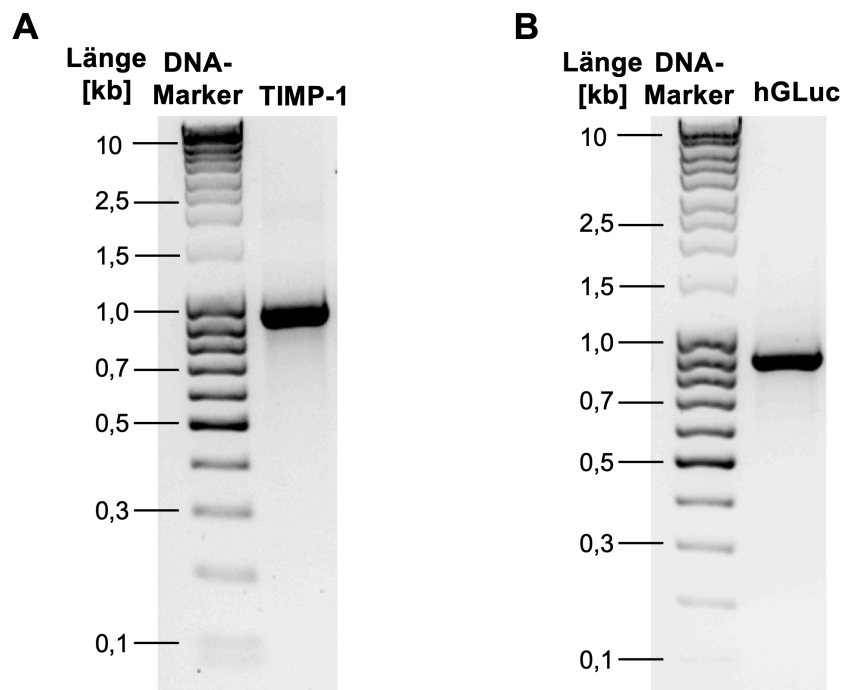
Die humanen Aortenproben stammen aus Aneurysmaexzidaten von Patienten, die in der Klinik für Thorax- Herz- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Tübingen operativ versorgt wurden. Im Rahmen des Behandlungsvertrages wurde die Zustimmung erteilt, Gewebeproben und Daten in der Biobank und Forschungsdatenbank des Universitätsklinikums und der Medizinischen Fakultät Tübingen zu verwenden. Die Ethik-Kommission des Universitätsklinikums und der medizinischen Fakultät Tübingen stimmte dem Vorhaben zu (Aktenzeichen 557/2013BO2).

Die in den Versuchen verwendeten porcinen Aorten wurden von bereits toten Schweinen aus dem Tier-OP der experimentellen Chirurgie des Universitätsklinikums Tübingen entnommen, die im Rahmen der Anzeige zur Organentnahme vom 22.12.2017 eingesetzt wurden.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Analyse der PCR- und IVT-Produkte

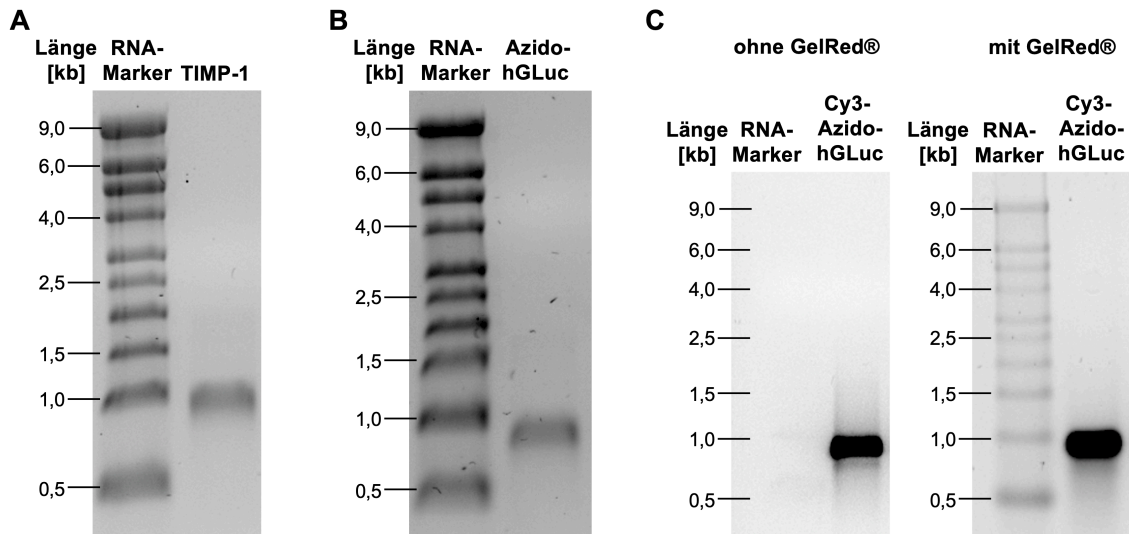
Nach Aufreinigung und photometrischer Konzentrationsbestimmung wurde die Länge der PCR und IVT-Produkte mittels 1% Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Hierzu wurden 200 ng DNA oder mRNA für eine Stunde bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Längenbestimmung dienten Marker mit definierten Fragmentlängen. Humane TIMP-1 DNA und mRNA sind ca. 1,0 kb, hGLuc DNA und mRNA sind ungefähr 0,9 kb lang. Abbildung 7 zeigt die erfolgreiche Herstellung der gewünschten DNA.



**Abbildung 7: Analyse der PCR-Produkte mittels 1% Agarose-Gelelektrophorese.**

200 ng DNA wurden mit 2  $\mu$ l 6x Loading-Dye vermischt. Als DNA-Marker wurden 5  $\mu$ l peqGold DNA-Leiter Mix (0,1-10 kb) verwendet. Durch Zugabe von 1x GelRed® in das Gel wurden die Banden anschließend sichtbar gemacht. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für eine Stunde bei 100 V. **A:** Humane TIMP-1 DNA ist ca. 1,0 kb lang. **B:** hGLuc DNA ist ca. 0,9 kb lang.

Aus der amplifizierten DNA wurde anschließend durch IVT mRNA synthetisiert. Zur Markierung von hGLuc mRNA mit dem Fluorophor Cy3, wurde diese während der Synthese zuerst mit Azido-Gruppen versehen, um anschließend den Fluoreszenzfarbstoff Cy3 daran zu koppeln. Abbildung 8 zeigt die erfolgreiche Herstellung der gewünschten mRNA.



**Abbildung 8: Analyse der IVT-Produkte mittels 1 % Agarose-Gelelektrophorese.**

200 ng mRNA wurden mit 7  $\mu$ l Ladepuffer vermischt. Es folgte eine Denaturierung für 10 Minuten bei 65 °C. Als RNA-Marker wurden 1,5  $\mu$ l RNA Millennium™ Markers (0,5-9 kb) verwendet und analog zu den Proben mit Ladepuffer vermischt. Durch Zugabe von 1x GelRed® in das Gel wurden die Banden anschließend sichtbar gemacht. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für eine Stunde bei 100 V. **A:** Humane TIMP-1 mRNA ist ca. 1,0 kb lang. **B:** Azido-hGLuc mRNA ist ca. 0,9 kb lang. **C:** Cy3-Azido-hGLuc mRNA ist ca. 0,9 kb lang. Vor Zugabe von GelRed® ist nur die Cy3-markierte Bande sichtbar. Nach Zugabe von GelRed® sind auch die Banden des RNA-Markers sichtbar.

### 3.2 Analyse der in vitro Transfektion von humaner TIMP-1 mRNA in NuFFs

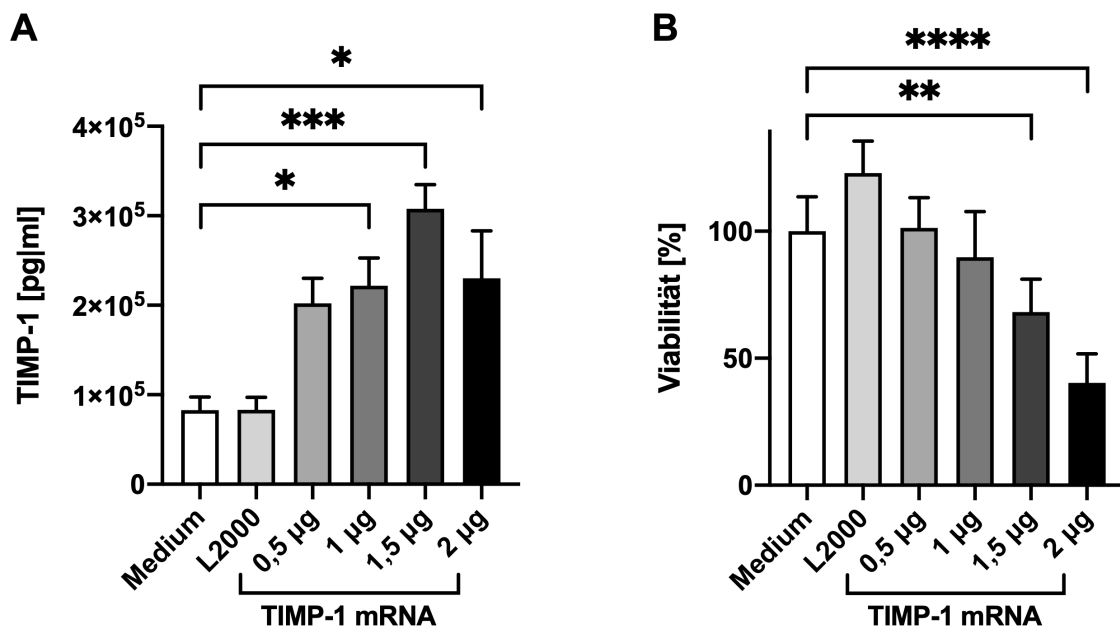
Vor dem Einsatz der TIMP-1 mRNA in ex vivo Experimenten in Aortengewebe wurde diese zuerst in vitro in Fibroblasten getestet. Hierbei wurden die Expressionseffizienz sowie die Zellverträglichkeit der mRNA untersucht.

NuFFs wurden mit humaner TIMP-1 mRNA, welche 1:1 mit L2000 (Ausnahme bei 0,5  $\mu$ g mRNA 1:2) in Opti-MEM™ komplexiert wurde, transfiziert. Als Kontrollen dienten Medium und Medium mit L2000. TIMP-1 wird von Zellen in die ECM sekretiert, sodass nach Transfektion von TIMP-1 mRNA eine Steigerung des TIMP-1 Proteingehalts in den Medien erwartet wurde. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde der TIMP-1 Gehalt in den Mediumsüberständen mittels humanem TIMP-1 ELISA ermittelt (Abbildung 9A).

Bereits bei Einsatz von 0,5  $\mu$ g mRNA konnte der TIMP-1 Gehalt auf über das Doppelte, im Vergleich zu den Kontrollen, gesteigert werden. Eine konzentrationsabhängige Steigerung des TIMP-1 Gehalts konnte bis zu 1,5  $\mu$ g mRNA detektiert werden. Hier wurde der höchste TIMP-1 Gehalt gemessen und

war signifikant um das 3,7-fache erhöht im Vergleich zu nicht mit mRNA transfizierten Zellen. Eine signifikante Erhöhung auf das 2,7- und 2,8-fache erreichte man mit 1 µg und 2 µg TIMP-1 mRNA.

Die Vitalität der Zellen wurde nach der Transfektion mittels PrestoBlue™ Assay ermittelt (Abbildung 9B). Die Viabilität der Mediumskontrolle wurde auf 100 % gesetzt. Mit zunehmender mRNA Menge sank die Viabilität. Jedoch erst ab einer mRNA Menge von 1,5 µg zeigte sich ein signifikanter Viabilitätsverlust. Hier waren noch 68 % der Zellen vital, bei Einsatz von 2 µg mRNA waren es noch 40 %. Die signifikant verminderte Zellviabilität nach einer Transfektion von 2 µg TIMP-1 mRNA ist eine mögliche Erklärung für den verminderten TIMP-1 Gehalt. Es konnte eine erfolgreiche Expression von TIMP-1 in NuFFs gezeigt werden. Diese wurde bereits nach der Transfektion mit niedrigen mRNA Konzentrationen, die gut zellverträglich waren, erreicht. Die höchste TIMP-1 Proteinmenge konnte nach einer Transfektion von 1,5 µg TIMP-1 mRNA ermittelt werden.



**Abbildung 9: TIMP-1 Gehalt und Zellviabilität nach Transfektion von NuFFs mit humaner TIMP-1 mRNA.**

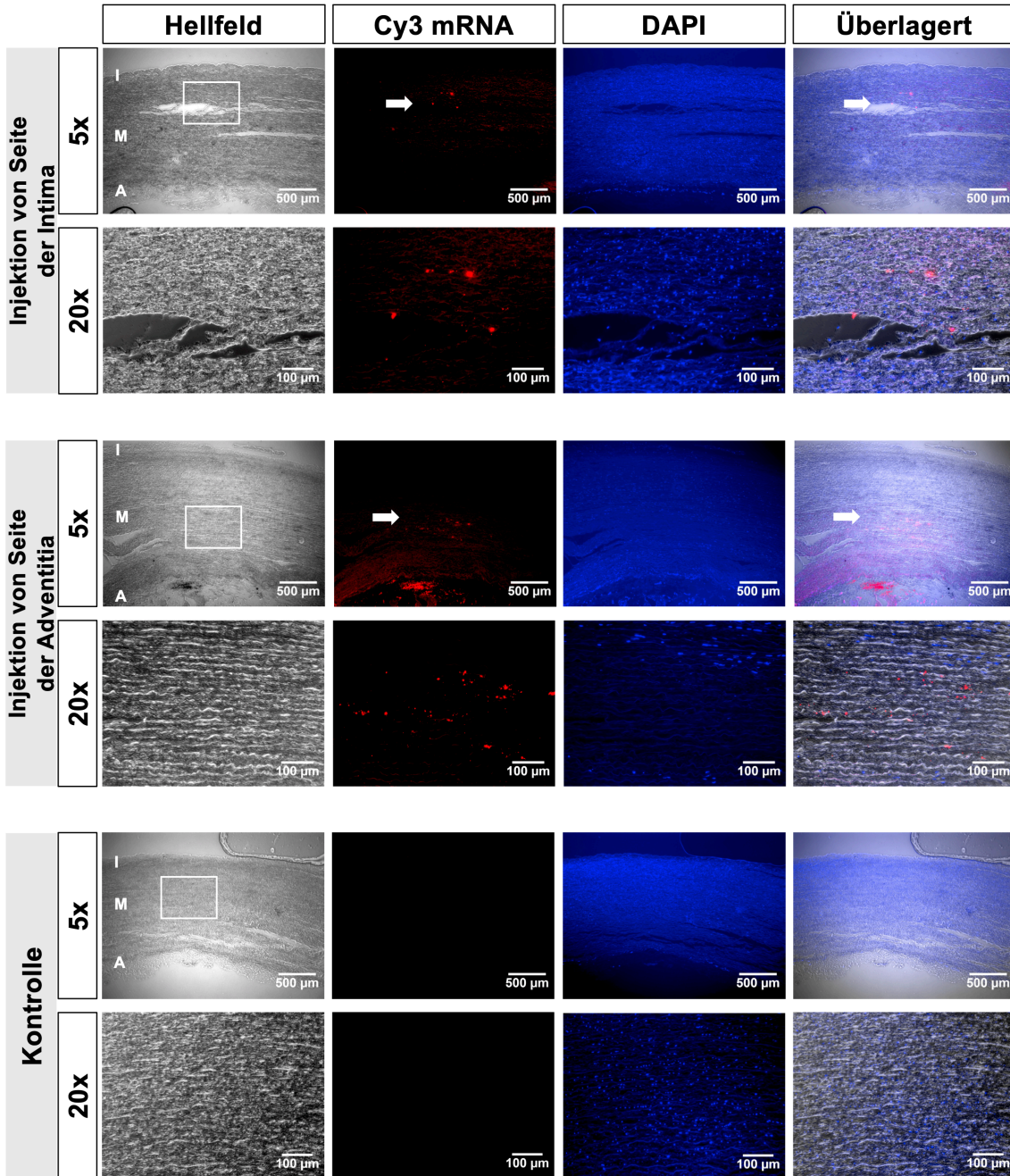
3x10<sup>5</sup> NuFFs wurden ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach 24 h wurden sie mit verschiedenen TIMP-1 mRNA Konzentrationen von 0,5-2 µg, komplexiert mit L2000 in Opti-MEM™, transfiziert und für 4 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Kontrollen dienten Medium und Medium mit L2000. Nach 4 h wurden die Transfektionsansätze durch Zellkulturmedium ersetzt und die Zellen für weitere 24 h inkubiert. **A:** Nach 24 h wurde der TIMP-1 Gehalt in den Mediumsüberständen mittels humanem TIMP-1 ELISA bestimmt. **B:** Die Viabilität der Zellen nach der Transfektion wurde mittels PrestoBlue™ Assay bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA mit anschließender Bonferroni Korrektur (n=5, Mittelwert + SEM, p-Werte: \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01; \*\*\* p ≤ 0,001; \*\*\*\* p ≤ 0,0001).

### **3.3 Evaluation der Lokalisation und der Verteilung Cy3-markierter hGLuc mRNA nach Mikroinjektion in humane Aorta**

Vor dem Einsatz der TIMP-1 mRNA in Aortengewebe wurde zunächst die Lokalisation und das Verteilungsmuster von mRNA nach Mikroinjektion in Aortengewebe untersucht. Hierfür wurde die mit dem Fluorophor Cy3 markierte hGLuc mRNA, kodierend für das Reporterprotein Luciferase, von Seite der Intima oder Adventitia in humane Aorta injiziert. Aus unserer Arbeitsgruppe existieren bereits Vorversuche hierzu. Dabei konnte die Mikroinjektion von Cy3-markierter hGLuc mRNA von Seite der Intima in humane Aorta erfolgreich etabliert werden. Dies konnte im nachfolgend dargestellten Versuch bestätigt werden. Darüber hinaus erfolgte hier erstmalig auch die Injektion von Seite der Adventitia sowie eine neue Gewebefixierung mittels Zink-Fixierlösung. Abbildung 10 zeigt die erfolgreiche Mikroinjektion von 2 µg Cy3-markierter und 1:1 mit L2000 komplexierter hGLuc mRNA in humane Aorta.

Sowohl nach Injektion von Seite der Intima als auch von Seite der Adventitia konnte die Cy3-markierte mRNA in der Media lokalisiert werden und verteilte sich dort gleichmäßig im Gewebe. Die Cy3-markierte mRNA ist rot dargestellt, Zellkerne sind nach Färbung mit DAPI blau. In der Kontrolle ohne Injektion ist kein Cy3-Signal sichtbar. Nach Injektion von Seite der Intima zeigte sich eine Gewebeaufspaltung am Applikationsort.

Durch die hier verwendete Mikroinjektionsmethode war es möglich sowohl von Seite der Intima als auch von Seite der Adventitia mRNA erfolgreich in aortales Gewebe zu applizieren.



**Abbildung 10: Evaluation der Lokalisation und des Verteilungsmusters Cy3-markierter hGLuc mRNA nach Mikroinjektion in humane Aorta von Seite der Intima und der Adventitia.**

Es erfolgte eine Injektion von 50 µl von Seite der Intima oder Adventitia in humane Aorta. Diese enthielt 2 µg Cy3-markierte hGLuc mRNA komplexiert mit L2000 in Opti-MEM™. Nach 48 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Fixierung mit Zink-Fixierlösung, Gießen in Paraffinblöcke und Erstellen von 5 µm dicken Schnitten. Die injizierte mRNA konnte sowohl bei Injektion von Seite der Intima als auch von Seite der Adventitia in der Media lokalisiert werden und verteilte sich dort gleichmäßig im Gewebe. Bei der im unteren Bildausschnitt verstärkten Fluoreszenz in der 5x Vergrößerung nach Injektion von Seite der Adventitia handelt es sich um ein Artefakt, welches auch im Hellfeld Bild sichtbar ist. In der Kontrolle ohne Injektion ist kein Cy3-Signal sichtbar. Die weißen Rechtecke zeigen den in der 20x Vergrößerung darunter vergrößerten Ausschnitt, weiße Pfeile deuten auf die Cy3-markierte mRNA. mRNA (rot), Nuklei (blau). Intima (I), Media (M), Adventitia (A). n=1.

### **3.4 Nachweis der TIMP-1 Expression nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA ex vivo in Aorta**

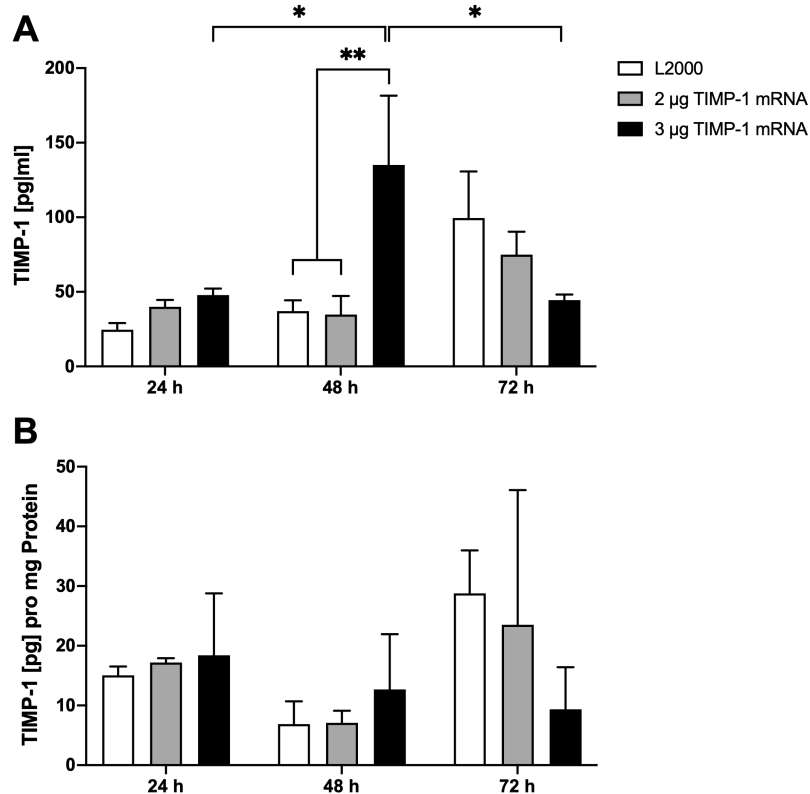
Zum Nachweis der TIMP-1 Expression ex vivo in aortalem Gewebe wurde die Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA in Aorta evaluiert, nachdem im vorherigen Kapitel gezeigt werden konnte, dass mRNA mittels Mikroinjektion erfolgreich in Aortengewebe appliziert werden kann.

Hierzu wurden verschiedene TIMP-1 mRNA Konzentrationen von 2-5 µg, 1:1 mit L2000 komplexiert, in porcine und humane Aorta injiziert. Die Injektion erfolgte entweder von Seite der Intima oder Adventitia. Als Kontrolle dienten Injektionen mit L2000 in Opti-MEM™ ohne mRNA. Danach wurden die Aortenstücke in Gewebekulturmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24 h, 48 h oder 72 h inkubiert. Im Anschluss wurde das aortale Gewebe in Lysepuffer lysiert und der TIMP-1 Proteingehalt mittels humanem TIMP-1 ELISA in den Medien sowie in den Lysaten bestimmt.

#### **3.4.1 Detektion des TIMP-1 Gehalts in Medien und Lysaten nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Intima in porcine Aorta**

In Abbildung 11 ist der TIMP-1 Gehalt in Mediumsüberständen (A) und Gewebelysaten (B) nach Mikroinjektion von 2 µg und 3 µg humaner TIMP-1 mRNA in porcine Aorta von Seite der Intima und einer Inkubation von 24-72 h dargestellt. In den Überständen wurde bereits nach 24 h im Vergleich zur L2000 Kontrolle eine Steigerung des TIMP-1 Gehalts um das 1,6-fache nach Injektion von 2 µg mRNA und auf das Doppelte nach Injektion von 3 µg mRNA detektiert. Diese Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant. Der höchste und signifikant erhöhte TIMP-1 Gehalt wurde 48 h nach Injektion von 3 µg TIMP-1 mRNA detektiert. Hierbei war der TIMP-1 Gehalt 3,6-fach höher im Vergleich zur L2000 Kontrolle und 3,9-fach höher als nach Injektion von 2 µg TIMP-1 mRNA. Nach 72 h wurde in der L2000 Kontrolle ein 4-fach höherer TIMP-1 Gehalt im Vergleich zu 24 h detektiert und keine signifikanten Unterschiede in der TIMP-1 Menge nach der TIMP-1 mRNA Applikation.

Bei den Gewebelysaten wurde der TIMP-1 Gehalt zur besseren Vergleichbarkeit auf die extrahierte Gesamtproteinmenge normiert. Nach 24 h zeigte sich keine nennenswerte Steigerung des TIMP-1 Gehalts nach Injektion von 2 oder 3 µg mRNA. Nach 48 h war der TIMP-1 Gehalt im Gewebe, im Vergleich zu 24 h, bei L2000 und 2 µg mRNA ungefähr um die Hälfte abgesunken, bei 3 µg mRNA ungefähr um ein Drittel. Zwischen der Kontrolle und dem TIMP-1 Gehalt nach Injektion von 2 und 3 µg mRNA konnte man nach 48 h keinen Unterschied feststellen. Wie auch schon in den Mediumsüberständen wurde nach 72 h in der Kontrolle der höchste TIMP-1 Gehalt gemessen. Dieser war im Vergleich zu 24 h um das 1,9-fache erhöht. Durch Injektion von mRNA konnte der TIMP-1 Gehalt nach 72 h jedoch nicht mehr weiter gesteigert werden.



**Abbildung 11: Detektion des TIMP-1 Gehalts in Mediumsüberständen (A) und Gewebelysaten (B) nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA in porcine Aorta von Seite der Intima.**

Es erfolgte eine Injektion von 50 µl von Seite der Intima in porcine Aorta. Diese enthielt 2 µg oder 3 µg TIMP-1 mRNA, komplexiert mit L2000 in Opti-MEM™. L2000 in Opti-MEM™ diente als Kontrolle ohne mRNA. Danach folgte eine Inkubation für 24 h, 48 h oder 72 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit darauffolgender Lyse der Aorta in Lysepuffer mittels Keramik-Beads. Anschließend wurde der TIMP-1 Gehalt in den Mediumsüberständen und Lysaten mittels humanem TIMP-1 ELISA bestimmt. Die gemessenen Werte wurden als Mittelwert + SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte für A mittels Two-way ANOVA mit anschließender Bonferroni Korrektur (n=3), p-Werte: \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01. B: n=3 aus einem Versuchstier.

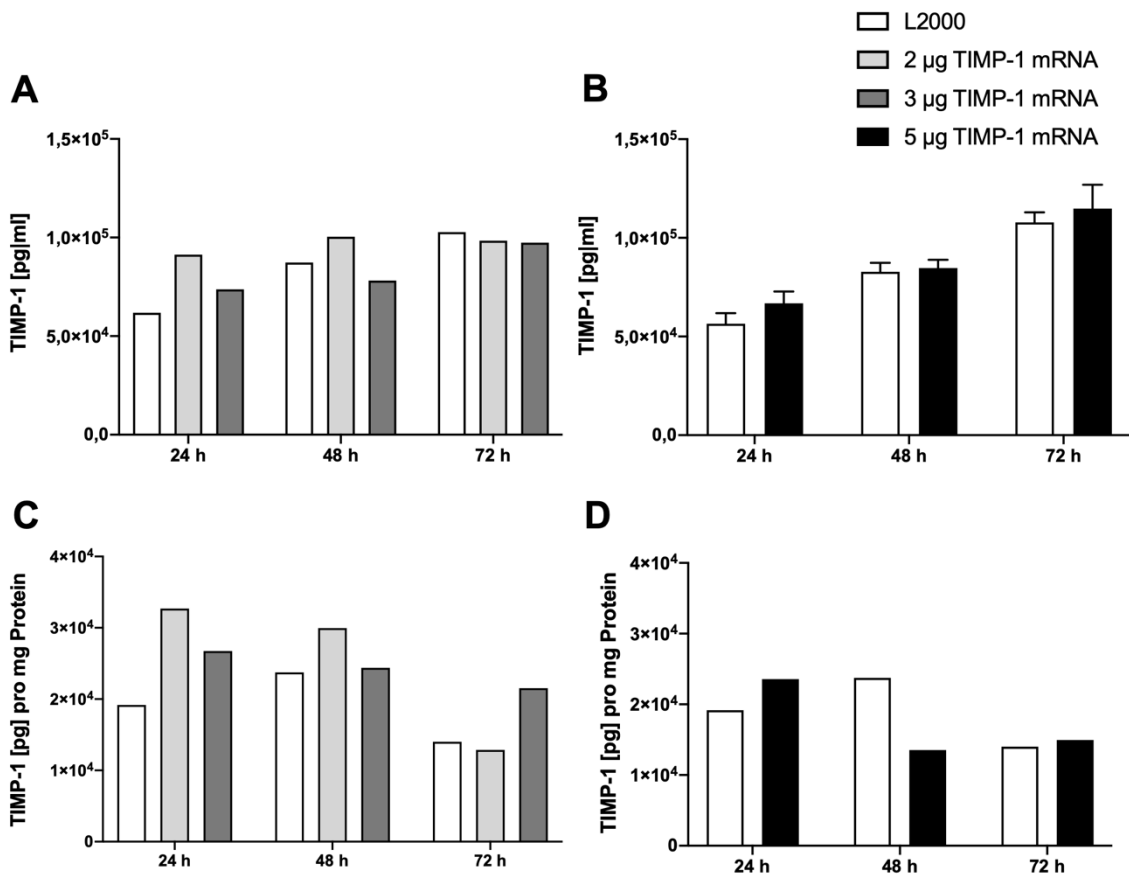
### **3.4.2 Detektion des TIMP-1 Gehalts in Medien und Lysaten nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA in humane Aorta**

#### **3.4.2.1 Mikroinjektion von Seite der Intima**

In Abbildung 12 ist der TIMP-1 Gehalt aus Mediumsüberständen (A und B) sowie aus Gewebelysaten (C und D) nach Mikroinjektion von 2 µg, 3 µg und 5 µg humaner TIMP-1 mRNA in humane Aorta von Seite der Intima dargestellt.

In den Mediumsüberständen stieg der TIMP-1 Gehalt nach Injektion von 2 µg TIMP-1 mRNA tendenziell nach 24 h um das 1,5-fache. Nach 48 h und 72 h zeigten sich keine nennenswerten Unterschiede mehr zwischen mRNA Injektion und Kontrolle.

Bei den Gewebelysaten wurde der TIMP-1 Gehalt zur besseren Vergleichbarkeit auf die extrahierte Gesamtproteinmenge normiert. Nach 24 h konnte der TIMP-1 Gehalt durch Injektion von 2 µg mRNA tendenziell auf das 1,7-fache, von 3 µg mRNA auf das 1,4-fache und von 5 µg auf das 1,2-fache gesteigert werden. Nach 48 h konnte nur noch bei 2 µg mRNA eine tendenzielle Steigerung des TIMP-1 Gehalts um das 1,3-fache im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Nach 72 h konnte bei 2 µg mRNA kein Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden. Lediglich 3 µg mRNA führten zu einem tendenziellen Anstieg des TIMP-1 Gehalts um das 1,5-fache. Um einen statistisch signifikanten Unterschied feststellen zu können, ist eine höhere Fallzahl notwendig.



**Abbildung 12: Detektion des TIMP-1 Gehalts in Mediumsüberständen (A und B) und Gewebelysaten (C und D) nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA in humane Aorta von Seite der Intima.**

Es erfolgte eine Injektion von 50 µl von Seite der Intima in humane Aorta. Diese enthielt 2 µg, 3 µg oder 5 µg TIMP-1 mRNA, komplexiert mit L2000 in Opti-MEM™. L2000 diente als Kontrolle ohne mRNA. Danach folgte eine Inkubation für 24 h, 48 h oder 72 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit darauffolgender Lyse der Aorta in Lysepuffer mittels Keramik-Beads. Anschließend wurde der TIMP-1 Gehalt in den Mediumsüberständen und Lysaten mittels humanem TIMP-1 ELISA bestimmt. (A, C und D: n=1, B: n=2, Mittelwert + SEM).

### 3.4.2.2 Mikroinjektion von Seite der Adventitia

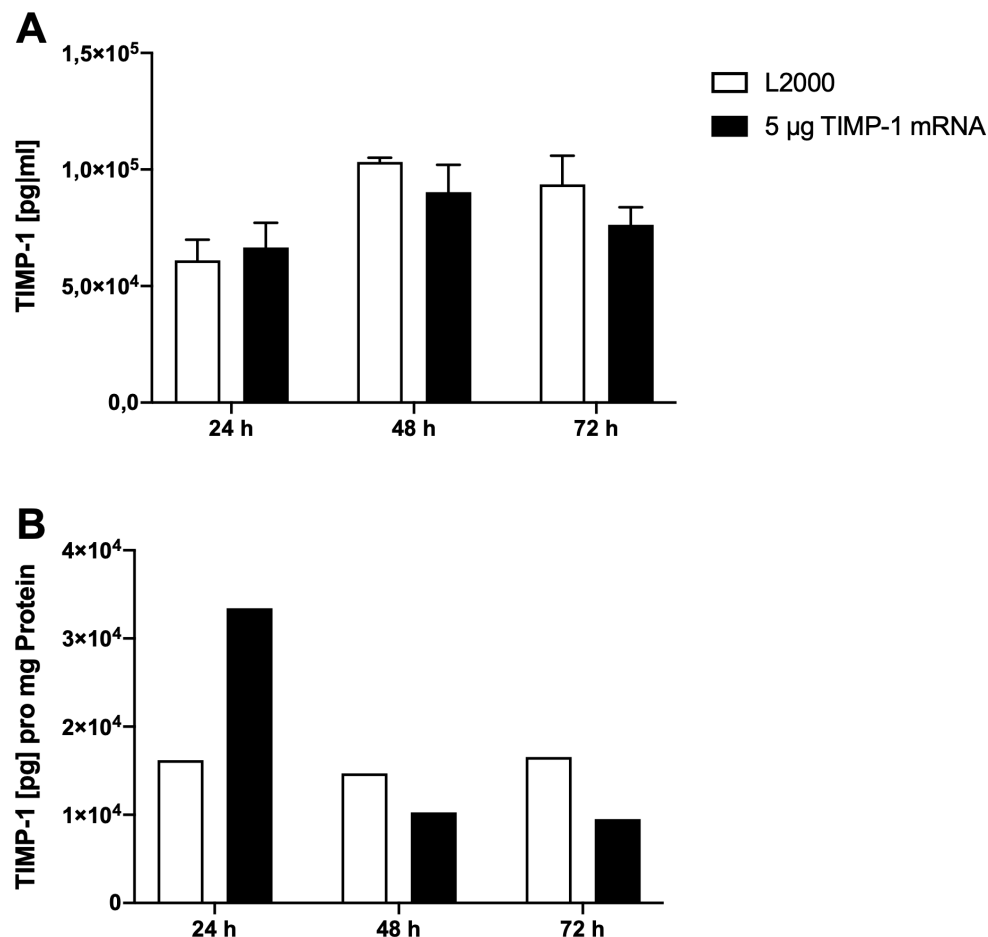
In Abbildung 13 ist der TIMP-1 Gehalt aus Mediumsüberständen (A) und Gewebelysaten (B) nach Mikroinjektion von 5 µg humaner TIMP-1 mRNA in humane Aorta von Seite der Adventitia dargestellt.

In den Mediumsüberständen konnte kein erhöhter TIMP-1 Gehalt im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden.

Bei den Gewebelysaten wurde der TIMP-1 Gehalt zur besseren Vergleichbarkeit auf die extrahierte Gesamtproteinmenge normiert. Der TIMP-1 Gehalt war nach 24 h nach Injektion von 5 µg mRNA tendenziell um das 2,1-fache im Vergleich

zur Kontrolle gesteigert. Nach 48 und 72 h konnten jedoch im Vergleich zu den Kontrollen keine gesteigerten TIMP-1 Mengen beobachtet werden.

Um einen statistisch signifikanten Unterschied bei diesen Experimenten feststellen zu können, ist eine höhere Fallzahl notwendig.



**Abbildung 13: Detektion des TIMP-1 Gehalts in Mediumsüberständen (A) und Gewebelysaten (B) nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA in humane Aorta von Seite der Adventitia.**

Es erfolgte eine Injektion von 50 µl von Seite der Adventitia in humane Aorta. Diese enthielt 5 µg TIMP-1 mRNA, komplexiert mit L2000 in Opti-MEM™. L2000 in Opti-MEM™ diente als Kontrolle ohne mRNA. Danach folgte eine Inkubation für 24 h, 48 h oder 72 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit darauffolgender Lyse der Aorta in Lysepuffer mittels Keramik-Beads. Anschließend wurde der TIMP-1 Gehalt aus den Mediumsüberständen und Lysaten mittels humanem TIMP-1 ELISA bestimmt. (A: n=2, B: n=1, Mittelwert + SEM).

Insgesamt zeigt sich die Tendenz, dass durch Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA der TIMP-1 Gehalt auch in Mediumsüberständen und Gewebelysaten von humanem Aortengewebe gesteigert werden kann. Hierbei ist eine Erhöhung bereits nach 24 h sichtbar. Zudem scheint die Injektion von Seite der Intima besser zu funktionieren.

### **3.5 Histologischer in situ Nachweis der TIMP-1 Funktionalität durch Detektion der MMP-Aktivität in Aortengewebe nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass mRNA erfolgreich in die Media von humaner Aorta mittels Mikroinjektion appliziert werden konnte sowie der TIMP-1 Gehalt in Mediumsüberständen und aortalem Gewebe nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA in porcine und humane Aorta gesteigert werden konnte, wurde die inhibitorische Funktionalität und Aktivität des exprimierten TIMP-1 Proteins gegenüber MMPs untersucht.

Mit Hilfe des Verfahrens der In-Situ-Zymographie kann die enzymatische MMP-Aktivität in histologischen Schnitten durch das fluoreszenzmarkierte MMP Substrat DQ-Gelatine visualisiert werden. Durch die enzymatische Spaltung der DQ-Gelatine durch MMPs wird der darin enthaltene Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt. Färbt man nun histologische Schnitte damit, kann das Maß der MMP-Aktivität sowie deren Wirkungsort im Gewebe bestimmt werden.

Die durch In-Situ-Zymographie visualisierte MMP-Aktivität in aortalem Gewebe soll indirekt zeigen, ob die applizierte TIMP-1 mRNA zu funktionellem TIMP-1 translatiert wird und inhibitorisch auf MMPs wirkt. Meist wird dieses Verfahren an Kryoschnitten mit unfixiertem Gewebe angewandt. Dies hat den Nachteil, dass die Gewebequalität dadurch gemindert wird. Außerdem verlangt dieses Verfahren eine rasche Bearbeitung der Proben. Die nachfolgenden Versuche zeigen die Etablierung der In-Situ-Zymographie an fixiertem Gewebe für die weitere Anfertigung von Paraffinschnitten. Hierfür wurden zwei verschiedene Fixierungsmethoden, Zink-Fixierlösung und 70 % Ethanol, getestet. Durch diese sollen die im Gewebe enthaltenen Enzyme nicht geschädigt und ihre Funktionalität beibehalten werden. Neben der Etablierung der Gewebefixierung und Färbung mit DQ-Gelatine soll in den nachfolgenden Versuchen untersucht werden, ob die durch Mikroinjektion eingebrachte TIMP-1 mRNA funktional ist, die applizierten Mengen schon zu einer sichtbaren Wirkung führen und wie der zeitliche Verlauf der MMP-Inhibition ist. Die enzymatische Funktionalität des exprimierten TIMP-1 Proteins nach Injektion der mRNA von Seite der Intima oder

Adventitia, sowohl in porcinem als auch in humanem Aortengewebe, wurde analysiert.

Nach der Injektion von TIMP-1 mRNA in das Gewebe inkubierten die Aortenstücke bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24 h, 48 h oder 72 h. Anschließend wurden sie fixiert, 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt und diese mit DQ-Gelatine gefärbt. Als Kontrollen dienen Schnitte, in die L2000 ohne mRNA injiziert wurde. Hierbei ist von keiner MMP-Inhibierung auszugehen. Um zu testen, ob eine Spaltung der DQ-Gelatine erfolgte, wurden Kontrollschnitte vor der Färbung mit EDTA inhibiert oder bei -20 °C eingefroren, sobald das Substrat hinzugegeben wurde. EDTA ist ein spezifischer MMP-Inhibitor, während durch das Einfrieren jegliche Enzymaktivität gehemmt wird. Diese Schnitte wurden als Negativkontrollen eingesetzt.

### **3.5.1 Vergleich der Gewebefixierung mit Zink-Fixierlösung und 70 % Ethanol**

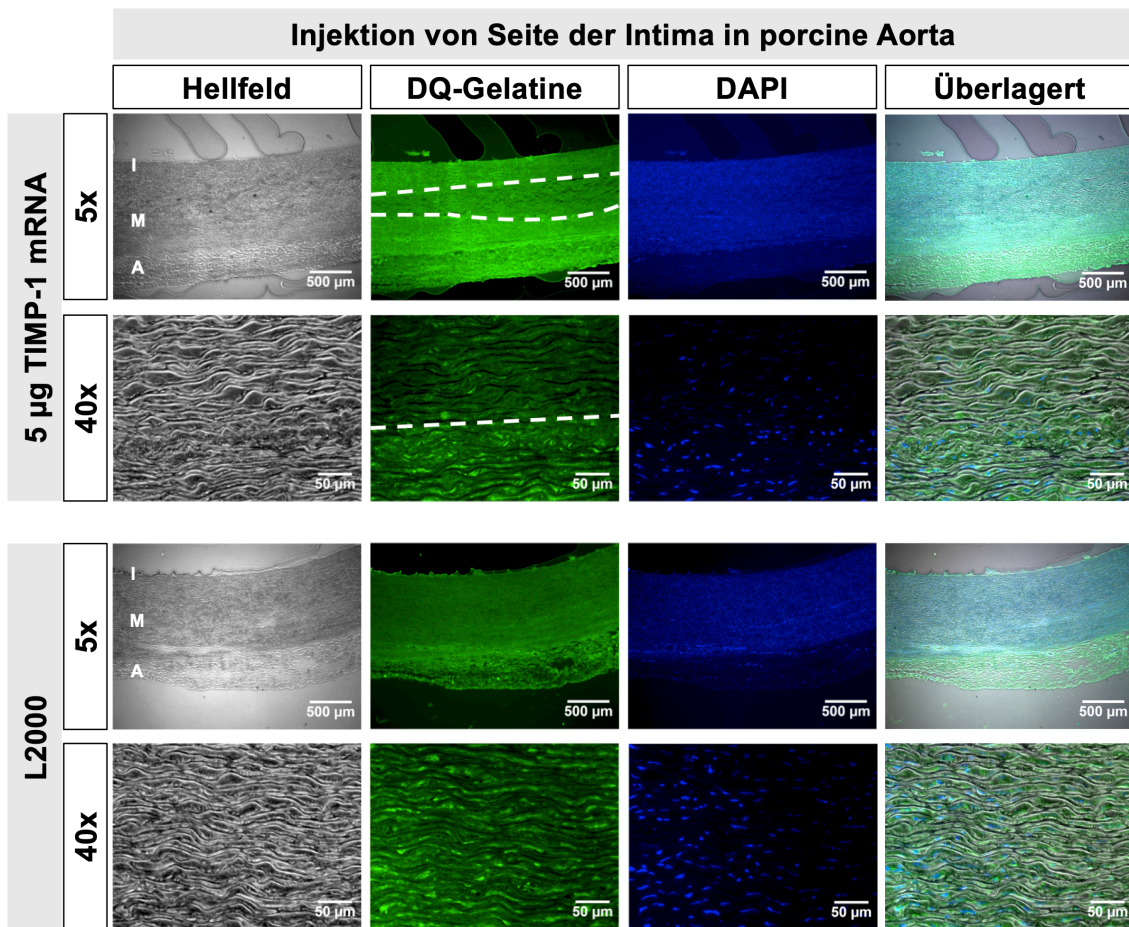
Durch die in der Histologie standardmäßig eingesetzte Fixierung mittels Formalin kann die Gewebemorphologie gut erhalten werden. Sie hat jedoch den Nachteil, dass hierdurch Proteine denaturiert und quervernetzt werden. Zum Nachweis aktiver Enzyme, wie beispielsweise MMPs in dieser Arbeit, ist sie somit nicht geeignet. Fixierungsmethoden auf Basis von Zink oder Ethanol führen nicht zu solchen Proteinveränderungen und sollen die Enzymaktivität bei einer gleichzeitig guten Gewebemorphologie erhalten. In den nachfolgenden Kapiteln wird die Eignung von Fixiermethoden auf Basis von Zink oder Ethanol zur Detektion der MMP-Aktivität miteinander verglichen. Außerdem soll analysiert werden, ob durch die Injektion von TIMP-1 mRNA eine Veränderung der MMP-Aktivität beobachtet werden kann. Zudem wird untersucht, ob die Injektionsseite einen Einfluss hat.

### **3.5.1.1 Gewebefixierung mit Zink-Fixierlösung**

#### **3.5.1.1.1 Aufgelockertes Gewebe mit verminderter MMP-Aktivität nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA als Hinweis auf eine erfolgreiche Injektion**

Histologisch konnte man die Injektionsstelle meist durch aufgelockertes Gewebe erkennen. Abbildung 14 zeigt die Injektion von 5 µg TIMP-1 mRNA in porcine Aorta von Seite der Intima. Diese wurde für 24 h inkubiert mit anschließender Fixierung mit Zink-Fixierlösung. Nach Färbung mit DQ-Gelatine konnte im Bereich des aufgelockerten Gewebes in der Media eine verminderte MMP-Aktivität beobachtet werden, während diese in den daran angrenzenden Bereichen vergleichbar mit der Kontrolle war. Die MMP-Aktivität war proportional zur grünen Fluoreszenzintensität. Auch nach Injektion von L2000 war das Gewebe aufgelockert. Hier zeigte sich jedoch trotzdem eine gleichmäßige MMP-Aktivität im gesamten Gewebeausschnitt.

Dies zeigt, dass die applizierte mRNA zu funktionellem TIMP-1 translatiert wurde und lokal eine inhibitorische Funktion gegen MMPs besitzt, da nur in TIMP-1 mRNA behandelten Gewebeproben eine verminderte MMP-Aktivität zu detektieren war.



**Abbildung 14: Aufgelockertes Gewebe mit verminderter MMP-Aktivität nach Mikroinjektion von 5 µg humaner TIMP-1 mRNA in porcine Aorta.**

Es erfolgte eine Injektion von 50 µl von Seite der Intima in porcine Aorta. Diese enthielt 5 µg TIMP-1 mRNA komplexiert mit L2000 in Opti-MEM™. Als Kontrolle diente L2000 in Opti-MEM™ ohne mRNA. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Fixierung mit Zink-Fixierlösung, Gießen in Paraffinblöcke und Erstellen von 5 µm dicken Schnitten. An der Injektionsstelle zeigt sich aufgelockertes Gewebe im Bereich der Media. Dort ist nach Injektion von TIMP-1 mRNA eine verminderde MMP-Aktivität sichtbar (weiß gestrichelte Linien). Nach Injektion von L2000 zeigt sich ebenfalls aufgelockertes Gewebe. Hier zeigt sich jedoch eine gleichmäßige MMP-Aktivität. MMP-Aktivität nach Färbung mit DQ-Gelatine (grün), Nuklei (blau). Intima (I), Media (M), Adventitia (A). n=3.

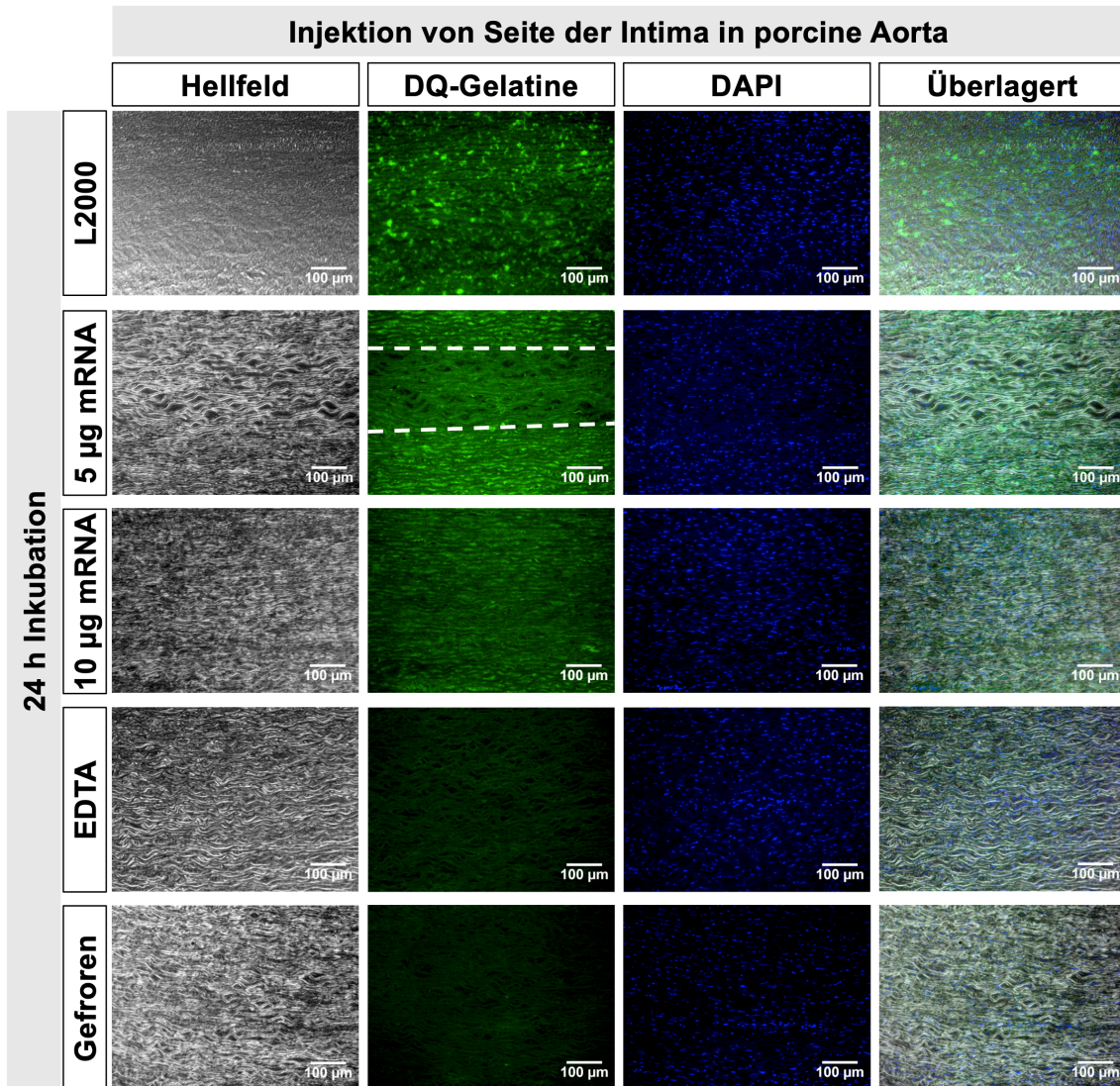
### **3.5.1.1.2 MMP-Aktivität in porciner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Intima oder Adventitia**

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Injektion von 5 µg oder 10 µg humaner TIMP-1 mRNA in porcine Aorta von Seite der Intima oder Adventitia. Die Aorta wurde für 24 h (Intima Abbildung 15, Adventitia Abbildung 18), 48 h (Intima Abbildung 16, Adventitia Abbildung 19) oder 72 h (Intima Abbildung 17, Adventitia Abbildung 20) nach der Injektion inkubiert, anschließend in Zink-Fixierlösung fixiert und die daraus angefertigten Paraffinschnitte mit DQ-Gelatine gefärbt.

Zu allen Zeitpunkten war in den L2000 Kontrollen eine deutliche MMP-Aktivität nachweisbar. Diese wurde durch Injektion von 5 µg oder 10 µg TIMP-1 mRNA erheblich abgeschwächt. Hervorzuheben sind die Schnitte von Seite der Intima nach Injektion von 5 µg mRNA und 24 h Inkubation sowie von Seite der Adventitia nach Injektion von 5 µg und 10 µg mRNA und 48 h Inkubation. Hier kann man das nach der Injektion aufgelockerte Gewebe mit verminderter MMP-Aktivität sehen. Dieses grenzt sich von danebenliegenden Bereichen mit MMP-Aktivität ab.

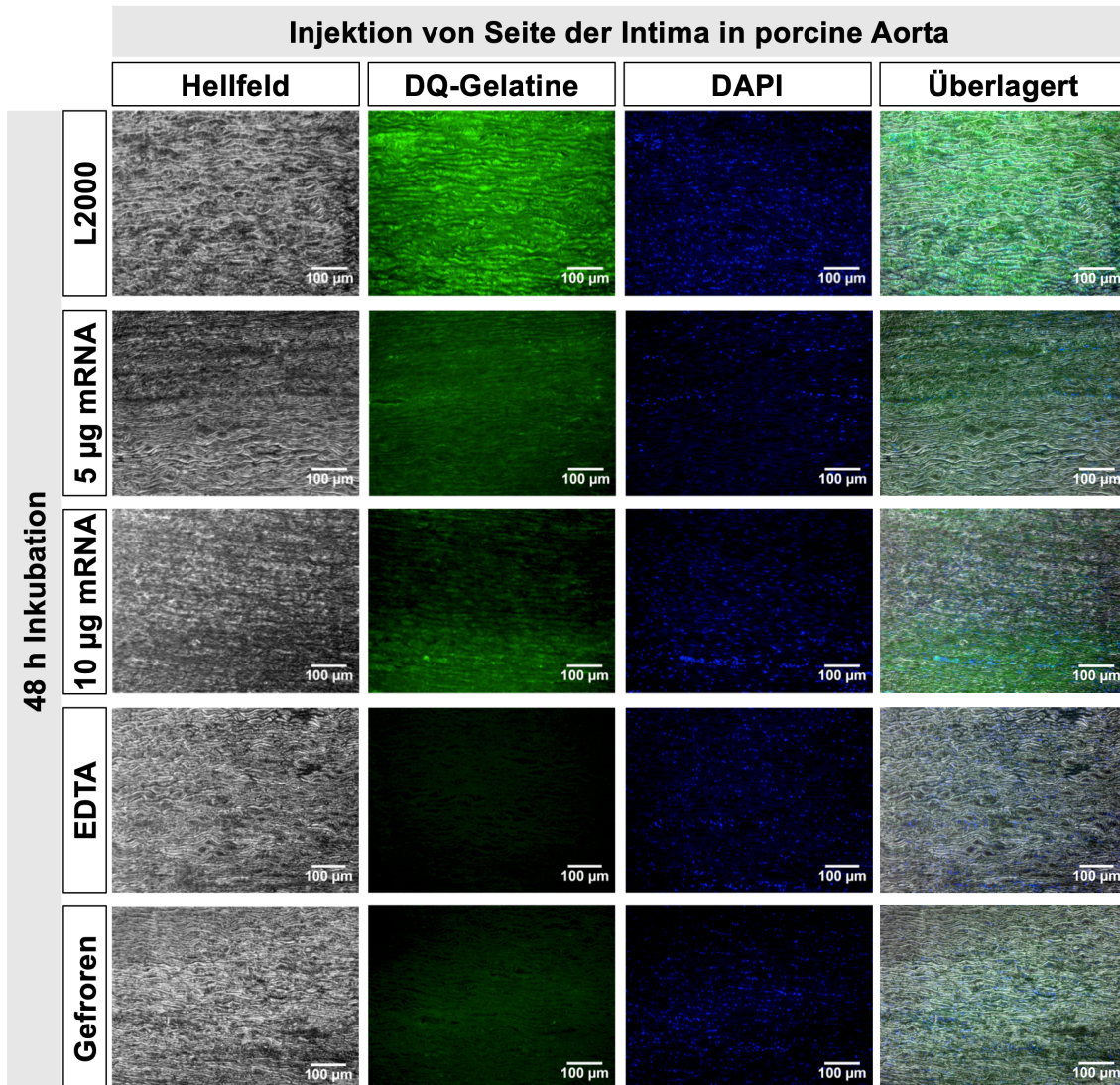
In den Negativkontrollen nach Behandlung der Schnitte mit EDTA bzw. nach Einfrieren dieser zeigt sich kein Fluoreszenzsignal. Somit kann in den restlichen Schnitten dieser Versuchsreihe die Gelatinespaltung der Enzymklasse der MMPs zugeschrieben werden.

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Injektion von 5 µg humaner TIMP-1 mRNA eine MMP-Aktivität in porciner Aorta bis zu 72 h erfolgreich vermindert werden kann. Die Seite, von welcher aus die Injektion durchgeführt wurde, spielte keine Rolle. Es konnten gleichwertige Ergebnisse durch Injektion von Seite der Intima und Adventitia erlangt werden. Jedoch ist eine weitere Wiederholung des Experiments mit 10 µg TIMP-1 mRNA erforderlich, um auch mit dieser mRNA Menge eine zuverlässige Aussage treffen zu können. Tendenziell zeigt sich jedoch auch hier eine verminderte MMP-Aktivität bis zu 72 h.



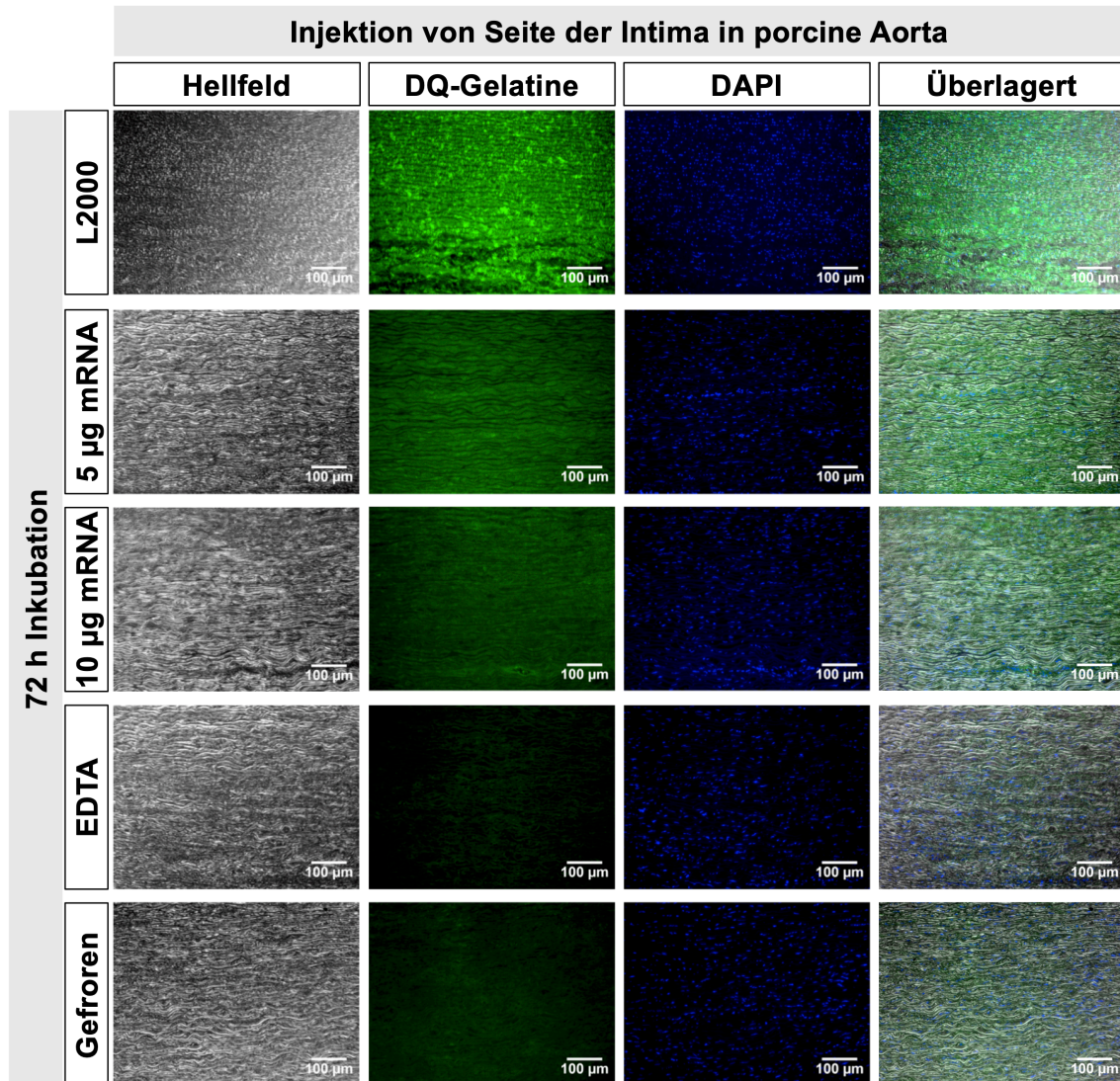
**Abbildung 15: Analyse der MMP-Aktivität in porciner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Intima, Inkubation für 24 h und anschließender Fixierung mit Zink-Fixierlösung.**

Es erfolgte eine Injektion von 50 µl von Seite der Intima in porcine Aorta. Diese enthielt 5 µg oder 10 µg TIMP-1 mRNA komplexiert mit L2000 in Opti-MEM™. L2000 in Opti-MEM™ diente als Kontrolle ohne mRNA. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Fixierung mit Zink-Fixierlösung, Gießen in Paraffinblöcke und Erstellen von 5 µm dicken Schnitten. Zur Verifizierung der enzymatischen Gelatinespaltung durch MMPs wurden Kontrollschnitte entweder vor Zugabe des Substrats mit EDTA inhibiert oder direkt nach Zugabe des Substrats bei -20 °C eingefroren. Weiß gestrichelte Linien grenzen aufgelockertes Gewebe mit verminderter MMP Aktivität nach Injektion von TIMP-1 mRNA vom umliegenden Gewebe ab. MMP-Aktivität nach Färbung mit DQ-Gelatine (grün), Nuklei (blau). 20x Vergrößerung. 5 µg mRNA n=3, 10 µg mRNA n=2.



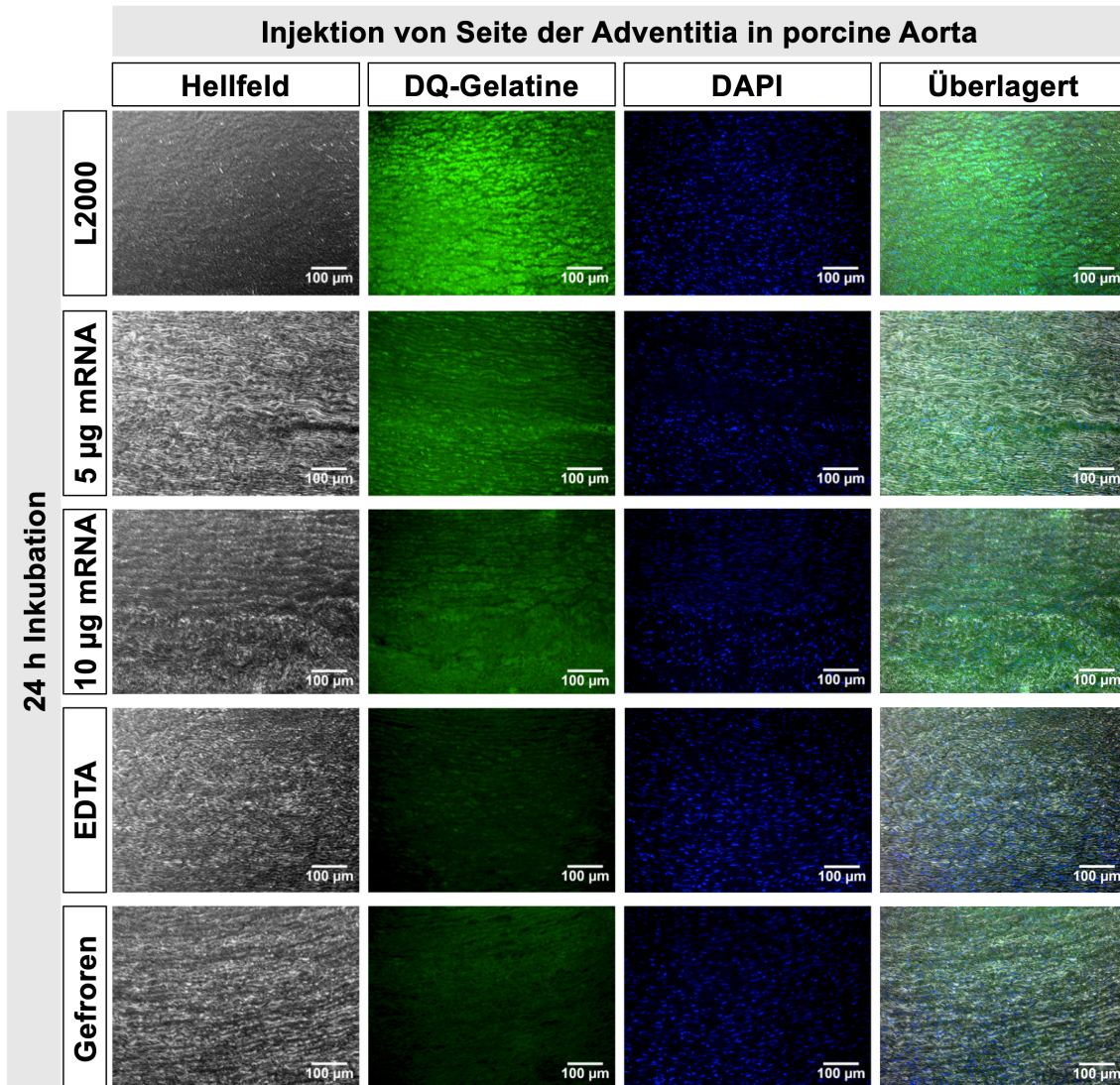
**Abbildung 16: Analyse der MMP-Aktivität in porciner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Intima, Inkubation für 48 h und anschließender Fixierung mit Zink-Fixierlösung.**

Es erfolgte eine Injektion von 50 µl von Seite der Intima in porcine Aorta. Diese enthielt 5 µg oder 10 µg TIMP-1 mRNA komplexiert mit L2000 in Opti-MEM™. L2000 in Opti-MEM™ diente als Kontrolle ohne mRNA. Nach 48 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Fixierung mit Zink-Fixierlösung, Gießen in Paraffinblöcke und Erstellen von 5 µm dicken Schnitten. Zur Verifizierung der enzymatischen Gelatinespaltung durch MMPs wurden Kontrollschnitte entweder vor Zugabe des Substrats mit EDTA inhibiert oder direkt nach Zugabe des Substrats bei -20 °C eingefroren. MMP-Aktivität nach Färbung mit DQ-Gelatine (grün), Nuklei (blau). 20x Vergrößerung. 5 µg mRNA n=3, 10 µg mRNA n=2.



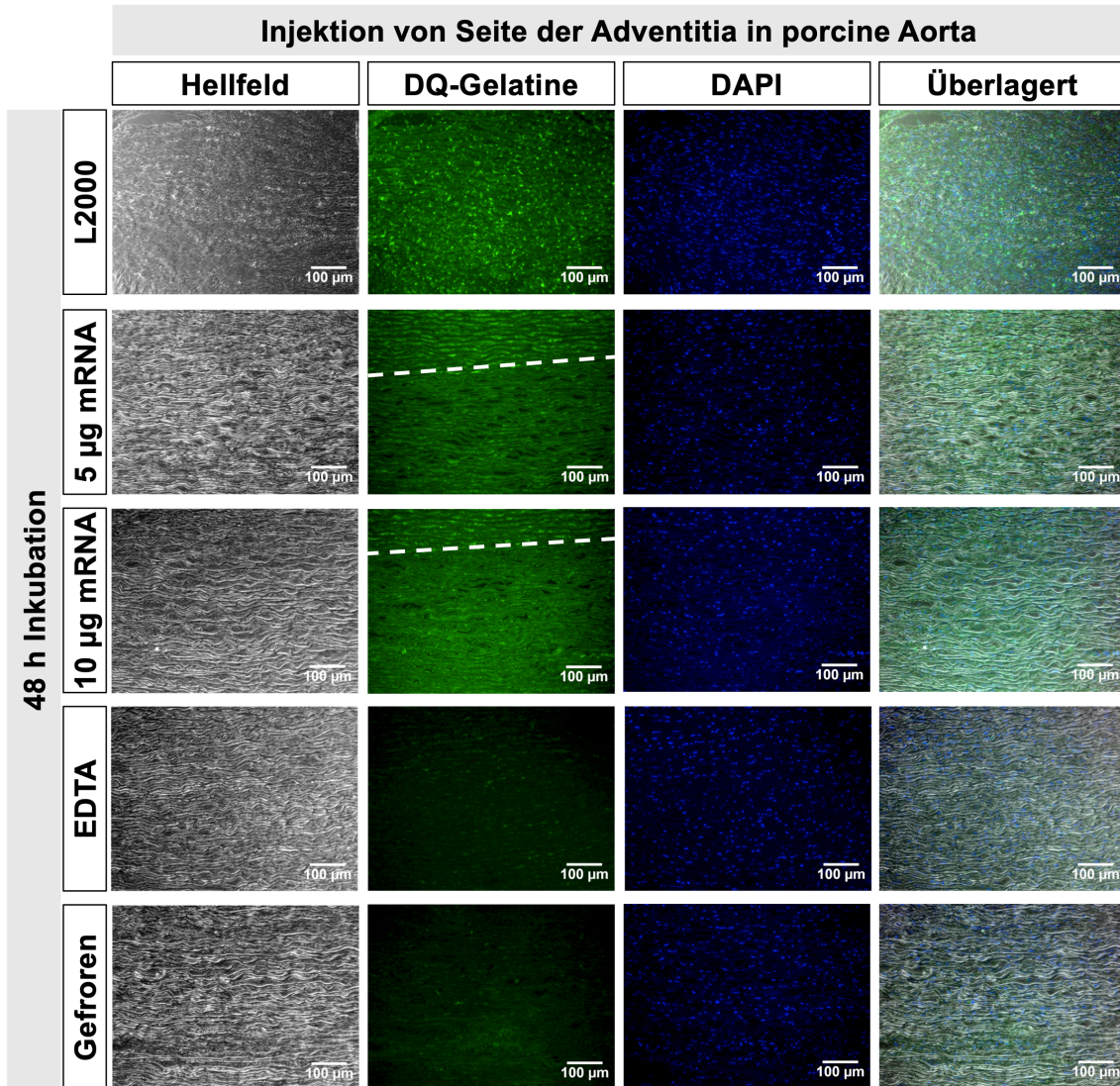
**Abbildung 17: Analyse der MMP-Aktivität in porciner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Intima, Inkubation für 72 h und anschließender Fixierung mit Zink-Fixierlösung.**

Es erfolgte eine Injektion von 50 µl von Seite der Intima in porcine Aorta. Diese enthielt 5 µg oder 10 µg TIMP-1 mRNA komplexiert mit L2000 in Opti-MEM™. L2000 in Opti-MEM™ diente als Kontrolle ohne mRNA. Nach 72 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Fixierung mit Zink-Fixierlösung, Gießen in Paraffinblöcke und Erstellen von 5 µm dicken Schnitten. Zur Verifizierung der enzymatischen Gelatinespaltung durch MMPs wurden Kontrollschnitte entweder vor Zugabe des Substrats mit EDTA inhibiert oder direkt nach Zugabe des Substrats bei -20 °C eingefroren. MMP-Aktivität nach Färbung mit DQ-Gelatine (grün), Nuklei (blau). 20x Vergrößerung. 5 µg mRNA n=3, 10 µg mRNA n=2.



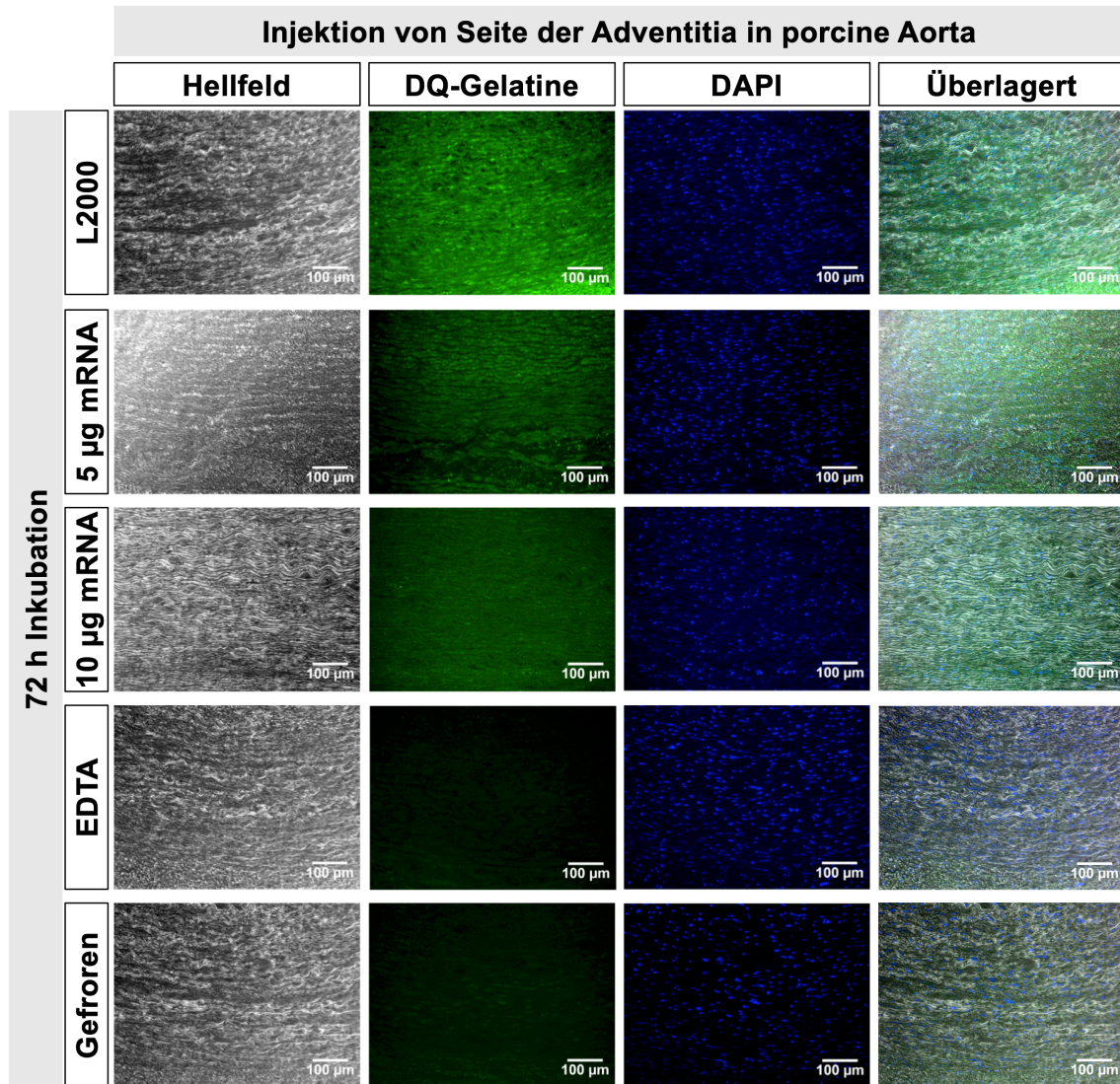
**Abbildung 18: Analyse der MMP-Aktivität in porciner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Adventitia, Inkubation für 24 h und anschließender Fixierung mit Zink-Fixierlösung.**

Es erfolgte eine Injektion von 50 µl von Seite der Adventitia in porcine Aorta. Diese enthielt 5 µg oder 10 µg TIMP-1 mRNA komplexiert mit L2000 in Opti-MEM™. L2000 in Opti-MEM™ diente als Kontrolle ohne mRNA. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Fixierung mit Zink-Fixierlösung, Gießen in Paraffinblöcke und Erstellen von 5 µm dicken Schnitten. Zur Verifizierung der enzymatischen Gelatinespaltung durch MMPs wurden Kontrollschnitte entweder vor Zugabe des Substrats mit EDTA inhibiert oder direkt nach Zugabe des Substrats bei -20 °C eingefroren. MMP-Aktivität nach Färbung mit DQ-Gelatine (grün), Nuklei (blau). 20x Vergrößerung. 5 µg mRNA n=3, 10 µg mRNA n=2.



**Abbildung 19: Analyse der MMP-Aktivität in porciner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Adventitia, Inkubation für 48 h und anschließender Fixierung mit Zink-Fixierlösung.**

Es erfolgte eine Injektion von 50 µl von Seite der Adventitia in porcine Aorta. Diese enthielt 5 µg oder 10 µg TIMP-1 mRNA komplexiert mit L2000 in Opti-MEM™. L2000 in Opti-MEM™ diente als Kontrolle ohne mRNA. Nach 48 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Fixierung mit Zink-Fixierlösung, Gießen in Paraffinblöcke und Erstellen von 5 µm dicken Schnitten. Zur Verifizierung der enzymatischen Gelatinespaltung durch MMPs wurden Kontrollschnitte entweder vor Zugabe des Substrats mit EDTA inhibiert oder direkt nach Zugabe des Substrats bei -20 °C eingefroren. Weiß gestrichelte Linien grenzen aufgelockertes Gewebe mit verminderter MMP Aktivität nach Injektion von TIMP-1 mRNA vom umliegenden Gewebe ab. MMP-Aktivität nach Färbung mit DQ-Gelatine (grün), Nuklei (blau). 20x Vergrößerung. 5 µg mRNA n=3, 10 µg mRNA n=2.



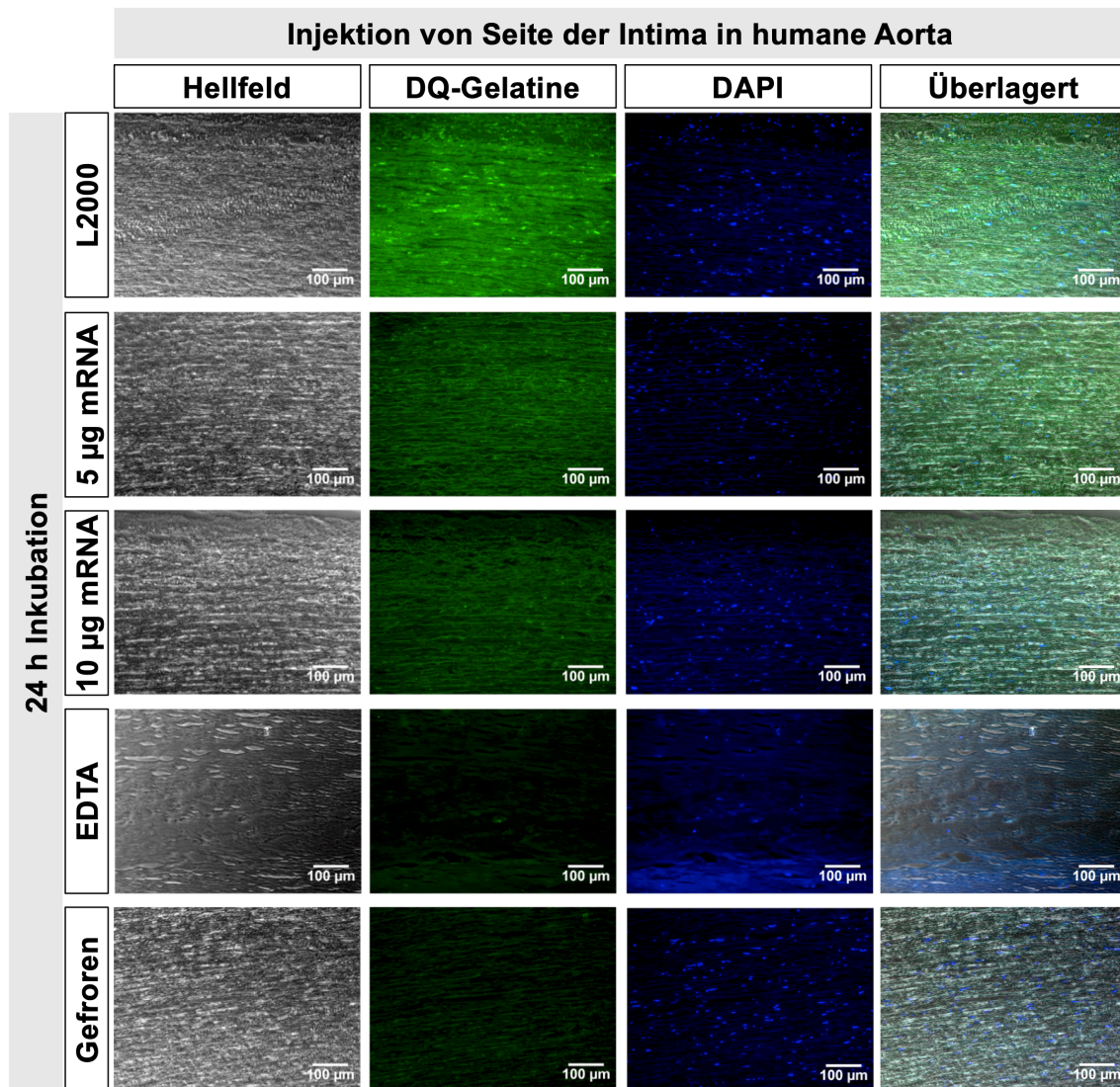
**Abbildung 20: Analyse der MMP-Aktivität in porciner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Adventitia, Inkubation für 72 h und anschließender Fixierung mit Zink-Fixierlösung.**

Es erfolgte eine Injektion von 50 µl von Seite der Adventitia in porcine Aorta. Diese enthielt 5 µg oder 10 µg TIMP-1 mRNA komplexiert mit L2000 in Opti-MEM™. L2000 in Opti-MEM™ diente als Kontrolle ohne mRNA. Nach 72 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Fixierung mit Zink-Fixierlösung, Gießen in Paraffinblöcke und Erstellen von 5 µm dicken Schnitten. Zur Verifizierung der enzymatischen Gelatinespaltung durch MMPs wurden Kontrollschnitte entweder vor Zugabe des Substrats mit EDTA inhibiert oder direkt nach Zugabe des Substrats bei -20 °C eingefroren. MMP-Aktivität nach Färbung mit DQ-Gelatine (grün), Nuklei (blau). 20x Vergrößerung. 5 µg mRNA n=3, 10 µg mRNA n=2.

### **3.5.1.1.3 MMP-Aktivität in humaner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Intima oder Adventitia**

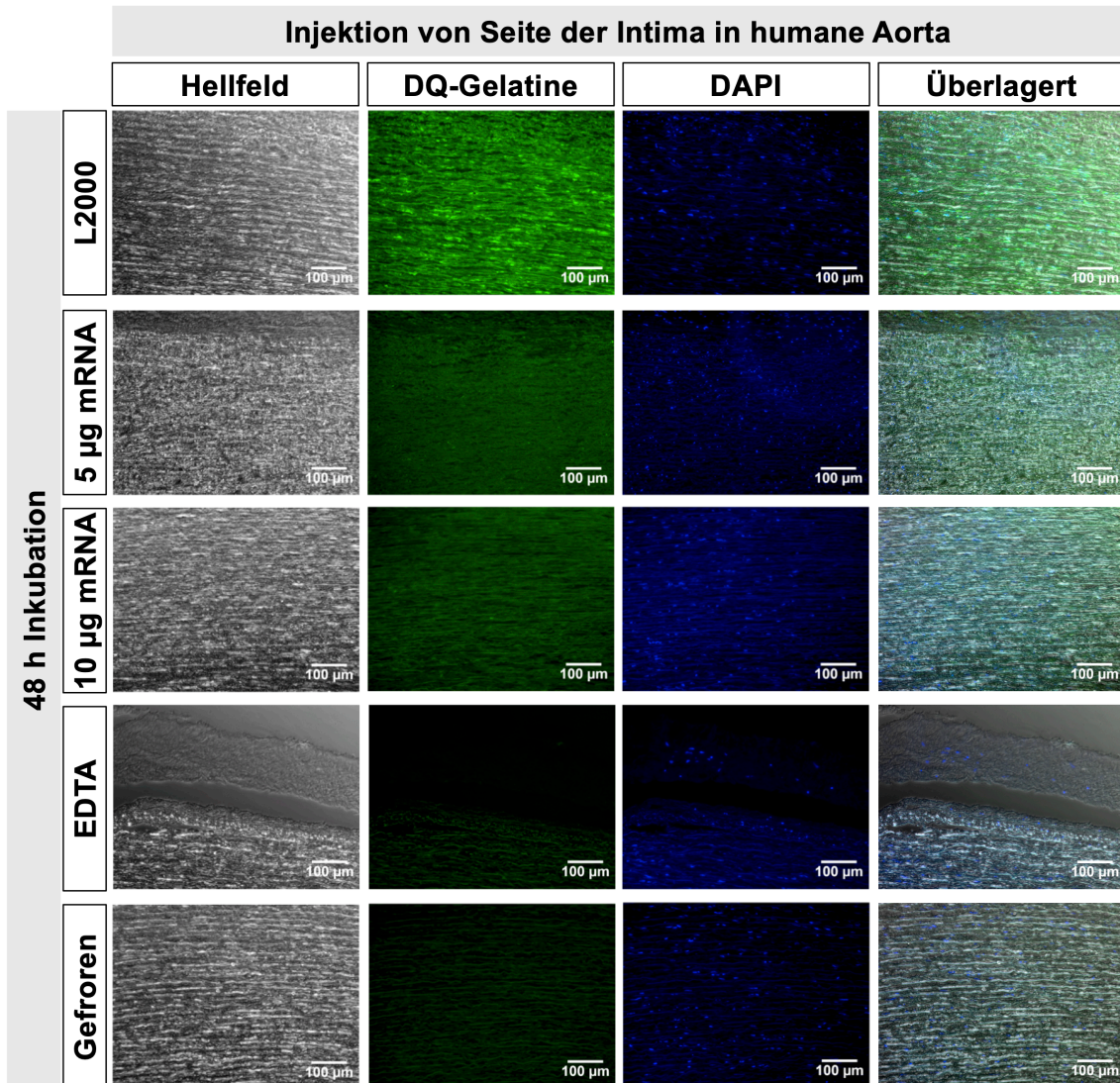
Nachdem erfolgreich gezeigt werden konnte, dass die MMP-Aktivität nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA in porciner Aorta ex vivo vermindert werden konnte, soll evaluiert werden, ob dies auch unter pathologischen Bedingungen möglich ist. Hierfür wurden Injektionen in humane Aneurysmaexzidate durchgeführt. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Injektion von 5 µg oder 10 µg humaner TIMP-1 mRNA in humane Aorta. Die Injektion erfolgte entweder von Seite der Intima oder von Seite der Adventitia. Anschließend wurde die Aorta für 24 h (Intima Abbildung 21, Adventitia Abbildung 24), 48 h (Intima Abbildung 22, Adventitia Abbildung 25) oder 72 h (Intima Abbildung 23, Adventitia Abbildung 26) nach der Injektion inkubiert, in Zink-Fixierlösung fixiert und die daraus angefertigten Paraffinschnitte mit DQ-Gelatine gefärbt.

Zu allen Zeitpunkten war in den L2000 Kontrollen, in welche keine mRNA injiziert wurde, eine MMP-Aktivität nachweisbar. Durch Injektion von 5 µg oder 10 µg TIMP-1 mRNA konnte eine verminderte MMP-Aktivität detektiert werden. In den Kontrollen mit EDTA bzw. nach Einfrieren zeigte sich kein Fluoreszenzsignal, sodass auch in dieser Versuchsreihe in den restlichen Schnitten die Gelatinespaltung der Enzymklasse der MMPs zugeschrieben werden kann. Tendenziell konnte gezeigt werden, dass durch die Injektion von 5 µg oder 10 µg humaner TIMP-1 mRNA eine MMP-Aktivität in humaner Aorta bis zu 72 h vermindert werden kann. Die Seite, von welcher aus die Injektion durchgeführt wurde, schien auch hier keine Rolle zu spielen. Es konnten gleichwertige Ergebnisse durch Injektion von Seite der Intima und Adventitia erlangt werden. Dies zeigt, dass selbst unter pathologischen Bedingungen das aus künstlich applizierter mRNA exprimierte TIMP-1 Protein einen inhibitorischen Effekt auf MMPs besitzt. In nachfolgenden Versuchen muss dies noch weiter untersucht werden. Dieser erfolgsversprechende Ansatz könnte somit eine bedeutende Rolle in der zukünftigen Therapie von Aortenaneurysmen spielen.



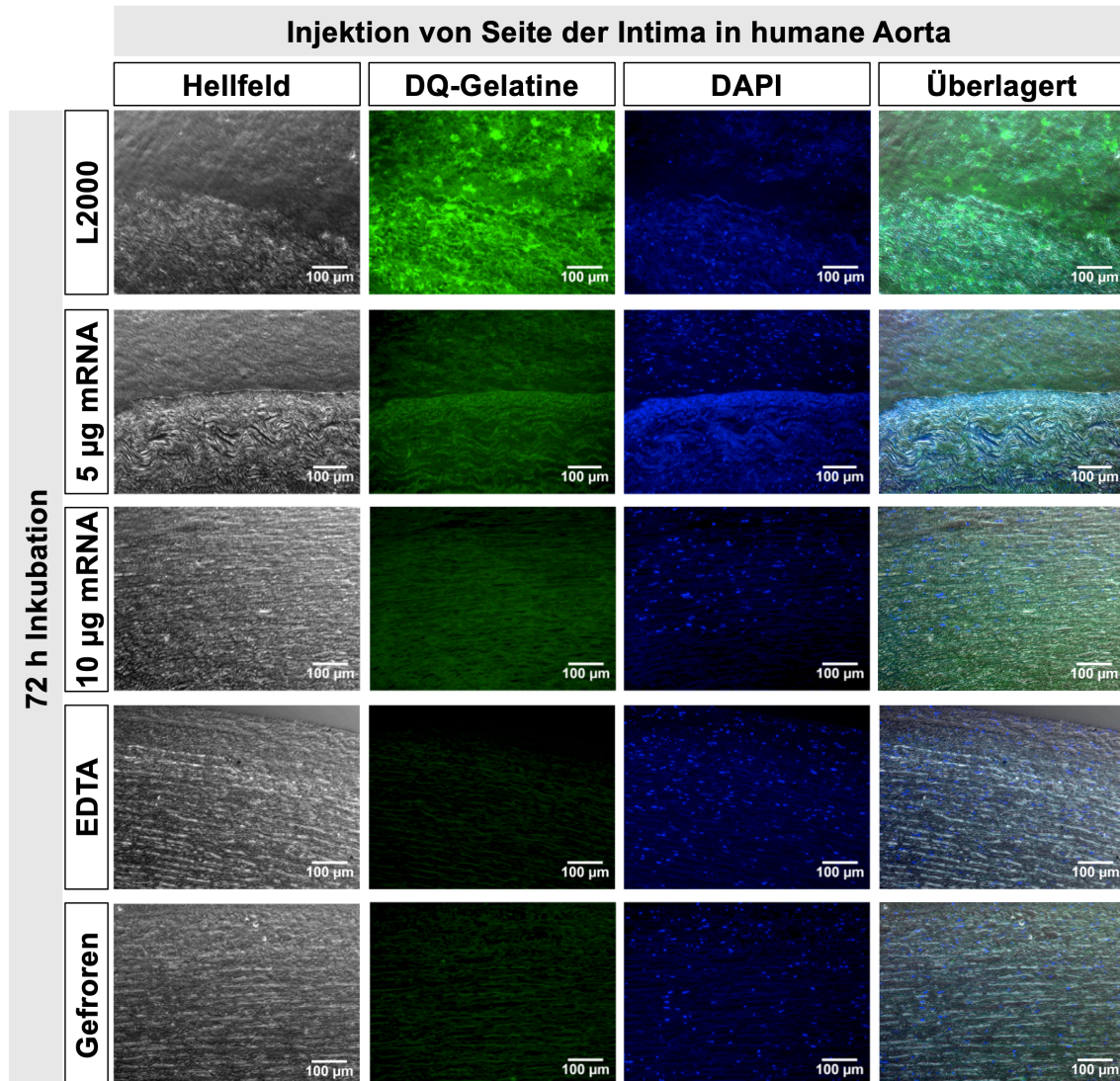
**Abbildung 21: Analyse der MMP-Aktivität in humaner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Intima, Inkubation für 24 h und anschließender Fixierung mit Zink-Fixierlösung.**

Es erfolgte eine Injektion von 50 µl von Seite der Intima in humane Aorta. Diese enthielt 5 µg oder 10 µg TIMP-1 mRNA komplexiert mit L2000 in Opti-MEM™. L2000 in Opti-MEM™ diente als Kontrolle ohne mRNA. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Fixierung mit Zink-Fixierlösung, Gießen in Paraffinblöcke und Erstellen von 5 µm dicken Schnitten. Zur Verifizierung der enzymatischen Gelatinespaltung durch MMPs wurden Kontrollschnitte entweder vor Zugabe des Substrats mit EDTA inhibiert oder direkt nach Zugabe des Substrats bei -20 °C eingefroren. MMP-Aktivität nach Färbung mit DQ-Gelatine (grün), Nuklei (blau). 20x Vergrößerung. 5 µg mRNA n=2, 10 µg mRNA n=1.



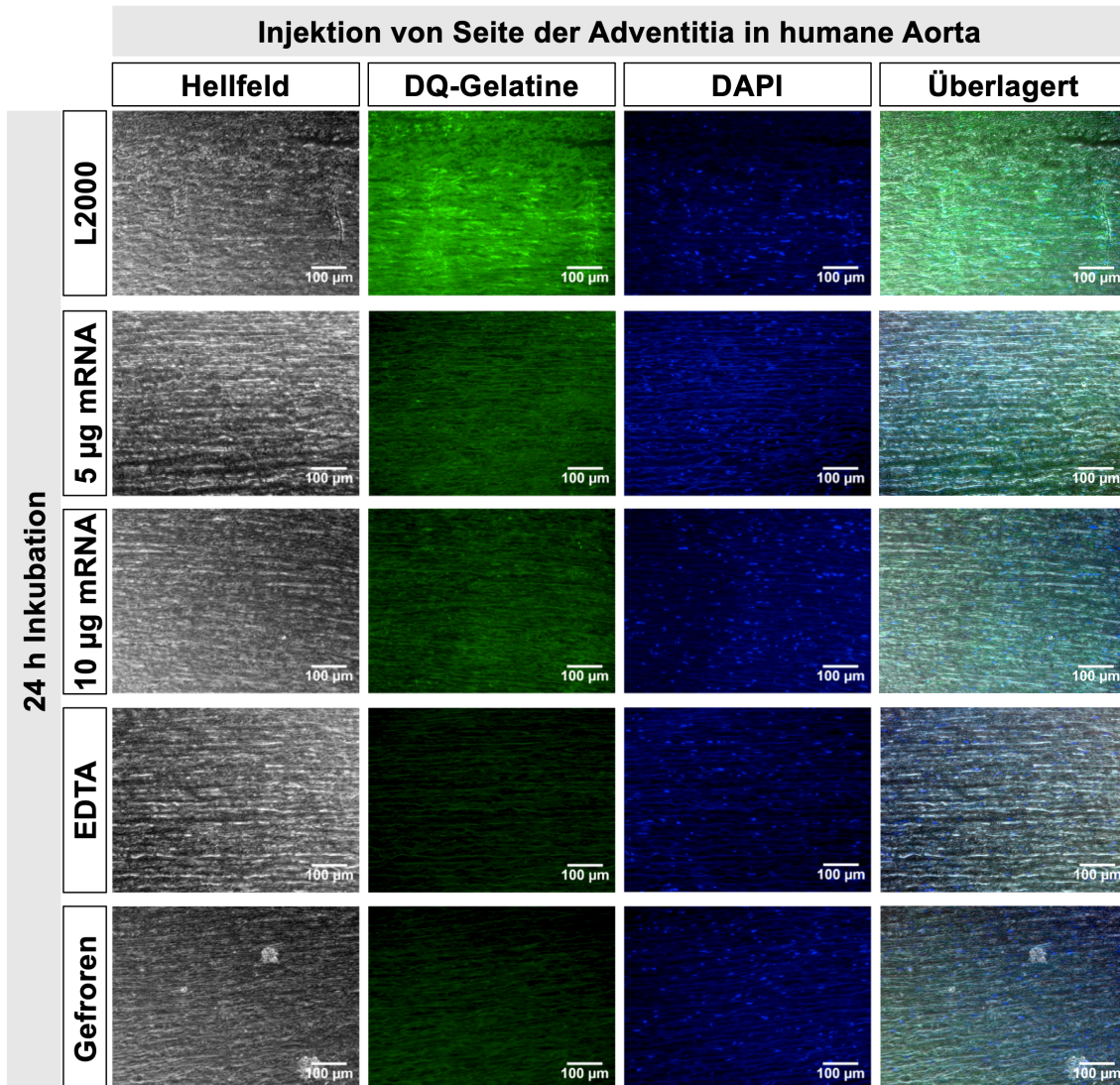
**Abbildung 22: Analyse der MMP-Aktivität in humaner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Intima, Inkubation für 48 h und anschließender Fixierung mit Zink-Fixierlösung.**

Es erfolgte eine Injektion von 50 µl von Seite der Intima in humane Aorta. Diese enthielt 5 µg oder 10 µg TIMP-1 mRNA komplexiert mit L2000 in Opti-MEM™. L2000 in Opti-MEM™ diente als Kontrolle ohne mRNA. Nach 48 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Fixierung mit Zink-Fixierlösung, Gießen in Paraffinblöcke und Erstellen von 5 µm dicken Schnitten. Zur Verifizierung der enzymatischen Gelatinespaltung durch MMPs wurden Kontrollschnitte entweder vor Zugabe des Substrats mit EDTA inhibiert oder direkt nach Zugabe des Substrats bei -20 °C eingefroren. MMP-Aktivität nach Färbung mit DQ-Gelatine (grün), Nuklei (blau). 20x Vergrößerung. 5 µg mRNA n=2, 10 µg mRNA n=1.



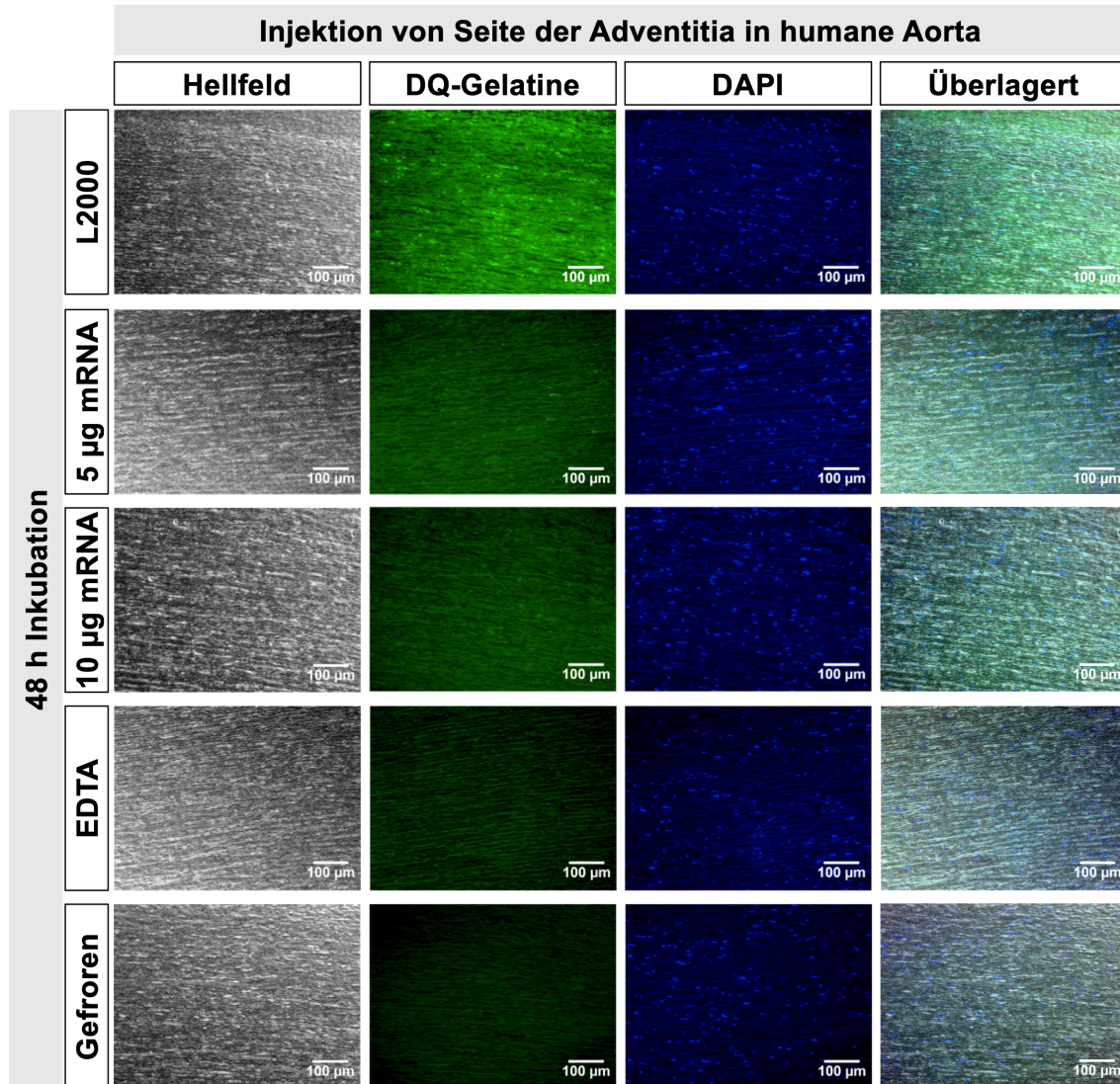
**Abbildung 23: Analyse der MMP-Aktivität in humaner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Intima, Inkubation für 72 h und anschließender Fixierung mit Zink-Fixierlösung.**

Es erfolgte eine Injektion von 50 µl von Seite der Intima in humane Aorta. Diese enthielt 5 µg oder 10 µg TIMP-1 mRNA komplexiert mit L2000 in Opti-MEM™. L2000 in Opti-MEM™ diente als Kontrolle ohne mRNA. Nach 72 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Fixierung mit Zink-Fixierlösung, Gießen in Paraffinblöcke und Erstellen von 5 µm dicken Schnitten. Zur Verifizierung der enzymatischen Gelatinespaltung durch MMPs wurden Kontrollschnitte entweder vor Zugabe des Substrats mit EDTA inhibiert oder direkt nach Zugabe des Substrats bei -20 °C eingefroren. Bei L2000 und 5 µg mRNA zeigt sich in der unteren Bildhälfte eine pathologische Gewebeunregelmäßigkeit. MMP-Aktivität nach Färbung mit DQ-Gelatine (grün), Nuklei (blau). 20x Vergrößerung. 5 µg mRNA n=2, 10 µg mRNA n=1.



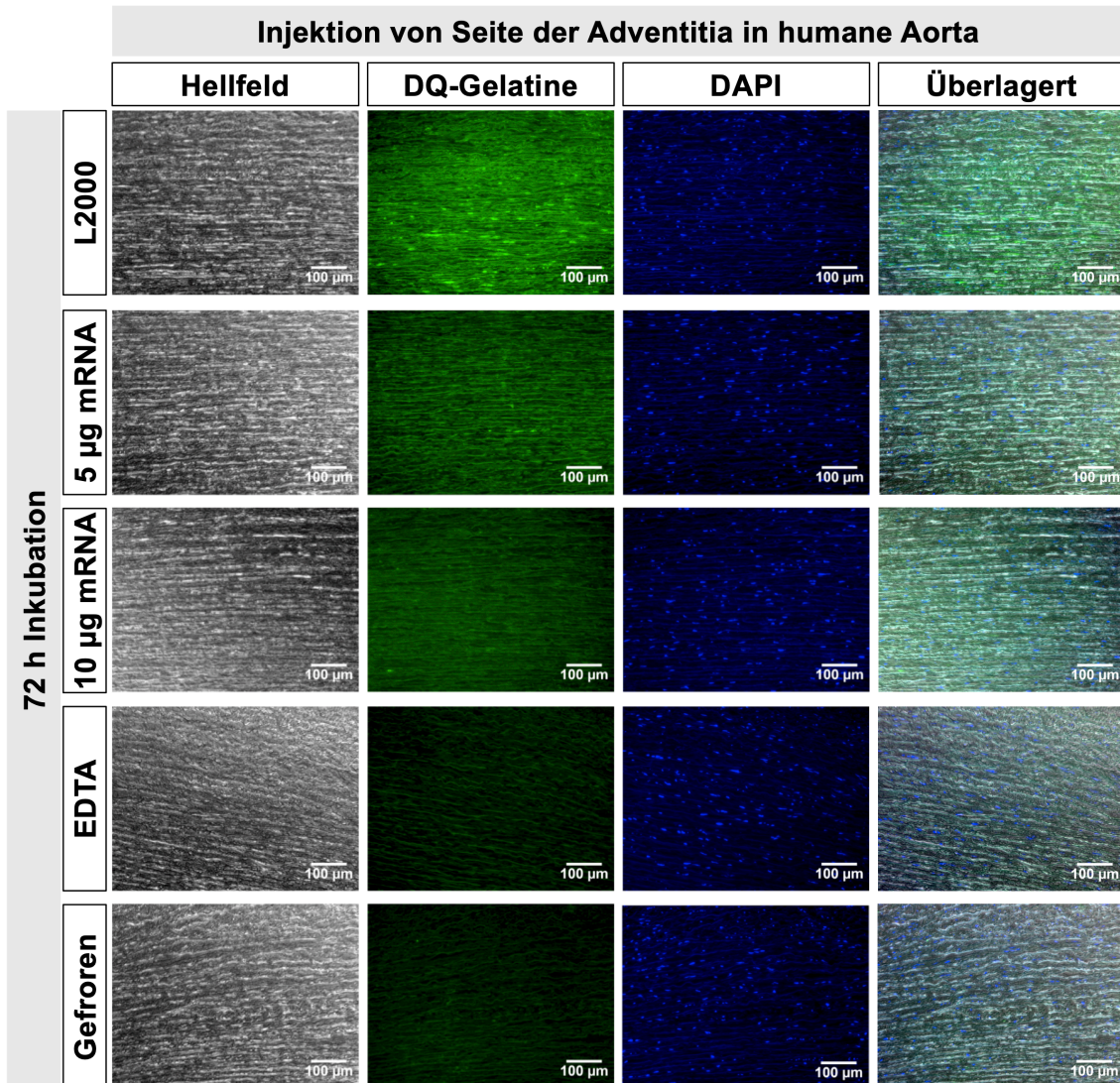
**Abbildung 24: Analyse der MMP-Aktivität in humaner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Adventitia, Inkubation für 24 h und anschließender Fixierung mit Zink-Fixierlösung.**

Es erfolgte eine Injektion von 50 µl von Seite der Adventitia in humane Aorta. Diese enthielt 5 µg oder 10 µg TIMP-1 mRNA komplexiert mit L2000 in Opti-MEM™. L2000 in Opti-MEM™ diente als Kontrolle ohne mRNA. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Fixierung mit Zink-Fixierlösung, Gießen in Paraffinblöcke und Erstellen von 5 µm dicken Schnitten. Zur Verifizierung der enzymatischen Gelatinespaltung durch MMPs wurden Kontrollschnitte entweder vor Zugabe des Substrats mit EDTA inhibiert oder direkt nach Zugabe des Substrats bei -20 °C eingefroren. MMP-Aktivität nach Färbung mit DQ-Gelatine (grün), Nuklei (blau). 20x Vergrößerung. n=1.



**Abbildung 25: Analyse der MMP-Aktivität in humaner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Adventitia, Inkubation für 48 h und anschließender Fixierung mit Zink-Fixierlösung.**

Es erfolgte eine Injektion von 50 µl von Seite der Adventitia in humane Aorta. Diese enthielt 5 µg oder 10 µg TIMP-1 mRNA komplexiert mit L2000 in Opti-MEM™. L2000 in Opti-MEM™ diente als Kontrolle ohne mRNA. Nach 48 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Fixierung mit Zink-Fixierlösung, Gießen in Paraffinblöcke und Erstellen von 5 µm dicken Schnitten. Zur Verifizierung der enzymatischen Gelatinespaltung durch MMPs wurden Kontrollschnitte entweder vor Zugabe des Substrats mit EDTA inhibiert oder direkt nach Zugabe des Substrats bei -20 °C eingefroren. MMP-Aktivität nach Färbung mit DQ-Gelatine (grün), Nuklei (blau). 20x Vergrößerung. n=1.



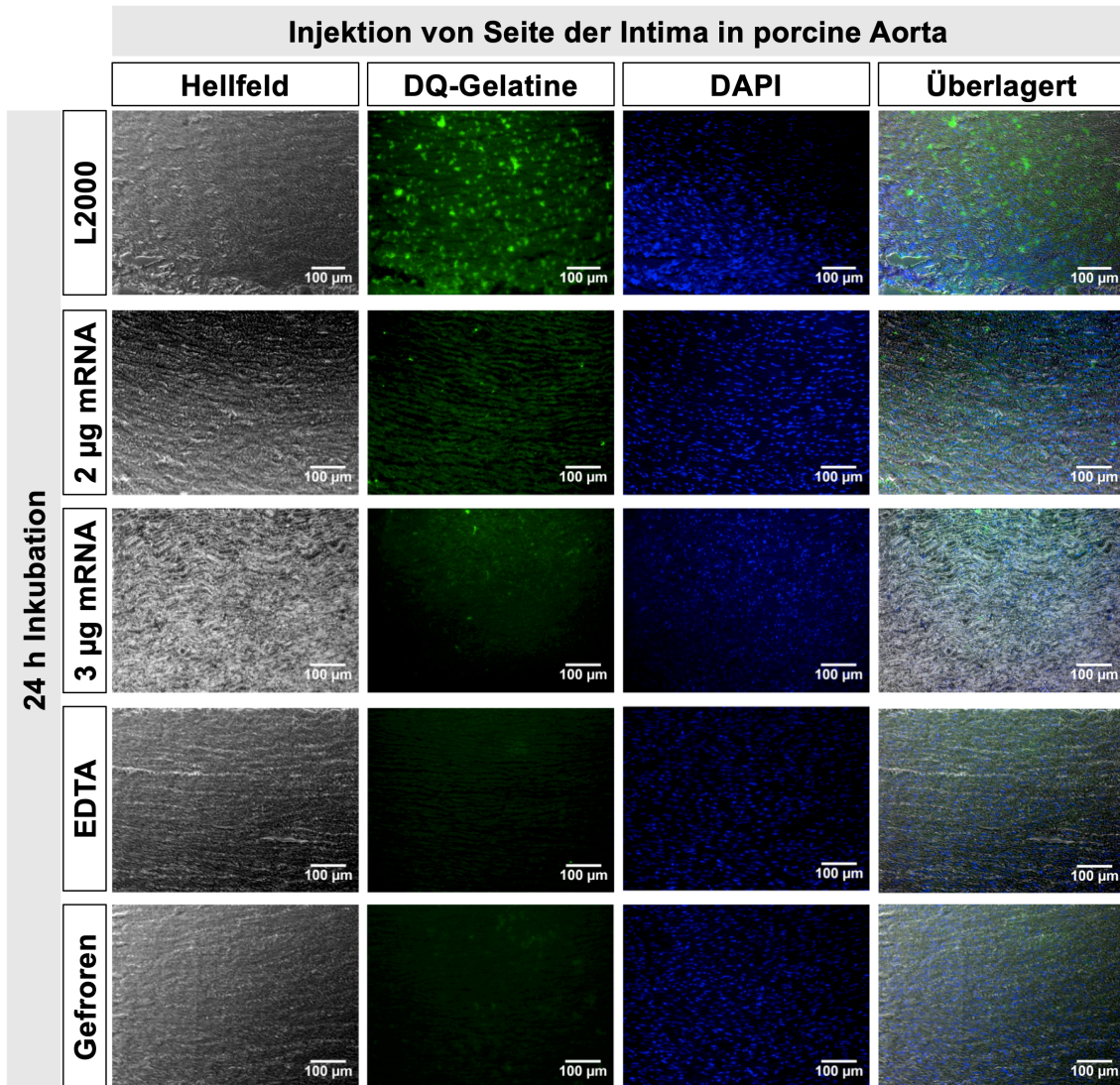
**Abbildung 26: Analyse der MMP-Aktivität in humaner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Adventitia, Inkubation für 72 h und anschließender Fixierung mit Zink-Fixierlösung.**

Es erfolgte eine Injektion von 50 µl von Seite der Adventitia in humane Aorta. Diese enthielt 5 µg oder 10 µg TIMP-1 mRNA komplexiert mit L2000 in Opti-MEM™. L2000 in Opti-MEM™ diente als Kontrolle ohne mRNA. Nach 72 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Fixierung mit Zink-Fixierlösung, Gießen in Paraffinblöcke und Erstellen von 5 µm dicken Schnitten. Zur Verifizierung der enzymatischen Gelatinespaltung durch MMPs wurden Kontrollschnitte entweder vor Zugabe des Substrats mit EDTA inhibiert oder direkt nach Zugabe des Substrats bei -20 °C eingefroren. MMP-Aktivität nach Färbung mit DQ-Gelatine (grün), Nuklei (blau). 20x Vergrößerung. n=1.

### **3.5.1.2 MMP-Aktivität in porciner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Intima und Fixierung mit 70 % Ethanol**

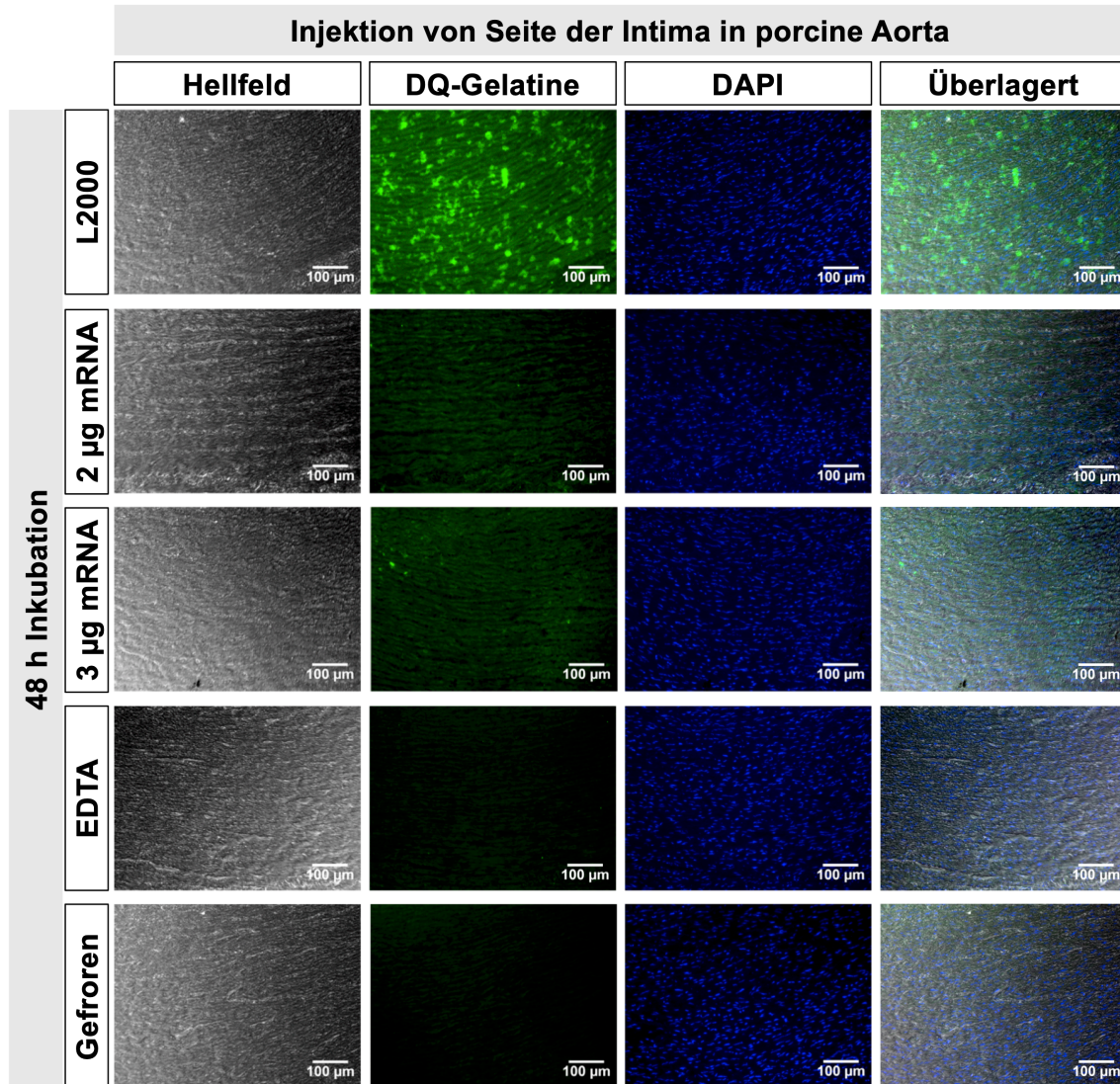
Nachdem in den vorherigen Kapiteln erfolgreich gezeigt werden konnte, dass durch die Fixierung mit Zink-Fixierlösung sowohl die Gewebequalität als auch die Enzymaktivität erhalten werden konnten, soll untersucht werden, ob dies durch Fixierung mit Ethanol ebenfalls möglich ist. Da in den vorherigen Versuchen keine nennenswerten Unterschiede zwischen der Injektion von 5 µg und 10 µg zu sehen waren, soll zusätzlich untersucht werden, ob bereits geringere mRNA Dosen einen sichtbaren Effekt auf die MMP-Aktivität haben. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Injektion von 2 µg oder 3 µg humaner TIMP-1 mRNA in porcine Aorta von Seite der Intima. Diese wurde für 24 h (Abbildung 27), 48 h (Abbildung 28) oder 72 h (Abbildung 29) nach der Injektion inkubiert, anschließend in 70 % Ethanol fixiert und die daraus angefertigten Paraffinschnitte mit DQ-Gelatine gefärbt.

Zu allen Zeitpunkten war in den L2000 Kontrollen eine deutliche MMP-Aktivität nachweisbar. Bereits nach Injektion von 2 µg TIMP-1 mRNA ist diese erheblich reduziert, ebenso nach Injektion von 3 µg mRNA. Sowohl in der Negativkontrolle mit EDTA, als auch durch Einfrieren, ist keine Fluoreszenz sichtbar. Dies zeigt, dass in den restlichen Schnitten die Spaltung der Gelatine durch MMPs erfolgt ist. Diese konnten durch den Verarbeitungsprozess der Aorta erhalten und bereits durch Injektion von 2 µg oder 3 µg humaner TIMP-1 mRNA bis zu 72 h erfolgreich inhibiert werden.



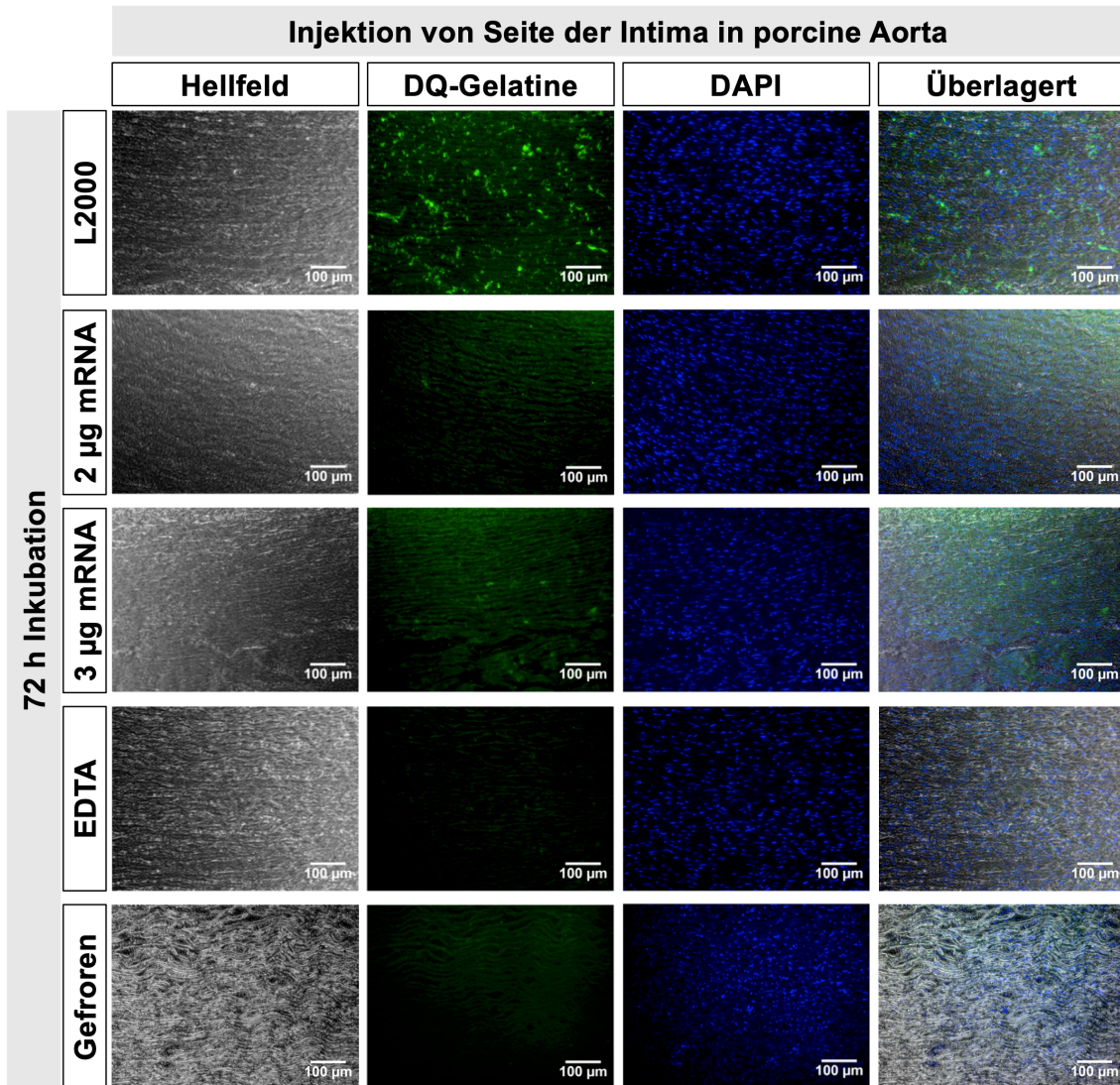
**Abbildung 27: Analyse der MMP-Aktivität in porciner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Intima, Inkubation für 24 h und anschließender Fixierung mit 70 % Ethanol.**

Es erfolgte eine Injektion von 50 µl von Seite der Intima in porcine Aorta. Diese enthielt 2 µg oder 3 µg TIMP-1 mRNA komplexiert mit L2000 in Opti-MEM™. L2000 in Opti-MEM diente als Kontrolle ohne mRNA. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Fixierung mit 70 % Ethanol, Gießen in Paraffinblöcke und Erstellen von 5 µm dicken Schnitten. Zur Verifizierung der enzymatischen Gelatinespaltung durch MMPs wurden Kontrollschnitte entweder vor Zugabe des Substrats mit EDTA inhibiert oder direkt nach Zugabe des Substrats bei -20 °C eingefroren. MMP-Aktivität nach Färbung mit DQ-Gelatine (grün), Nuklei (blau). 20x Vergrößerung. n=2.



**Abbildung 28: Analyse der MMP-Aktivität in porciner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Intima, Inkubation für 48 h und anschließender Fixierung mit 70 % Ethanol.**

Es erfolgte eine Injektion von 50 µl von Seite der Intima in porcine Aorta. Diese enthielt 2 µg oder 3 µg TIMP-1 mRNA komplexiert mit L2000 in Opti-MEM™. L2000 in Opti-MEM™ diente als Kontrolle ohne mRNA. Nach 48 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Fixierung mit 70 % Ethanol, Gießen in Paraffinblöcke und Erstellen von 5 µm dicken Schnitten. Zur Verifizierung der enzymatischen Gelatinespaltung durch MMPs wurden Kontrollschnitte entweder vor Zugabe des Substrats mit EDTA inhibiert oder direkt nach Zugabe des Substrats bei -20 °C eingefroren. MMP-Aktivität nach Färbung mit DQ-Gelatine (grün), Nuklei (blau). 20x Vergrößerung. n=2.



**Abbildung 29: Analyse der MMP-Aktivität in porciner Aorta nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Intima, Inkubation für 72 h und anschließender Fixierung mit 70 % Ethanol.**

Es erfolgte eine Injektion von 50 µl von Seite der Intima in porcine Aorta. Diese enthielt 2 µg oder 3 µg TIMP-1 mRNA komplexiert mit L2000 in Opti-MEM™. L2000 in Opti-MEM™ diente als Kontrolle ohne mRNA. Nach 72 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Fixierung mit 70 % Ethanol, Gießen in Paraffinblöcke und Erstellen von 5 µm dicken Schnitten. Zur Verifizierung der enzymatischen Gelatinespaltung durch MMPs wurden Kontrollschnitte entweder vor Zugabe des Substrats mit EDTA inhibiert oder direkt nach Zugabe des Substrats bei -20 °C eingefroren. MMP-Aktivität nach Färbung mit DQ-Gelatine (grün), Nuklei (blau). 20x Vergrößerung. n=2.

### 3.5.1.3 Fazit

Das Verfahren der In-Situ-Zymographie an Paraffinschnitten konnte erfolgreich etabliert werden. Zudem bewirkte die injizierte mRNA eine wirkungsvolle Verminderung der MMP-Aktivität. Hierfür wurden mRNA Dosen von 2-10 µg erfolgreich eingesetzt. Bereits bei niedrigen mRNA Mengen zeigte sich an der Injektionsstelle eine fast vollständige MMP-Hemmung, sodass im Vergleich zu höheren Dosen keine nennenswerte Verbesserung zu sehen war. Die Enzymaktivität, sowie die hemmende Wirkung des aus mRNA exprimierten TIMP-1 auf diese, konnten bis zu 72 h bei guter Gewebequalität erfolgreich durch beide eingesetzten Fixierungsmethoden erhalten werden. Dabei spielte es keine Rolle, ob die Injektion von Seite der Intima oder Adventitia durchgeführt wurde. In beiden Fällen zeigte sich eine lokale Hemmung der MMP-Aktivität im Bereich der Media. Selbst unter pathologischen Bedingungen in Aneurysmaexzidaten war dies möglich.

Durch die Fixierung mittels Zink-Fixierlösung konnte die MMP-Aktivität ebenso erhalten werden wie durch die Fixierung mit 70 % Ethanol. Dies zeigt, dass sich beide Fixiermethoden zur Detektion der MMP-Aktivität in aortalem Gewebe eignen. Jedoch zeigten sich auch Unterschiede zwischen den beiden Methoden. Nach der Fixierung mit Zink-Fixierlösung blieb die Gewebemorphologie besser erhalten, jedoch waren die Fluoreszenzunterschiede nicht so deutlich differenzierbar wie nach Fixierung mit Ethanol. Dies lag auch an einer verstärkt sichtbaren Hintergrundfluoreszenz. In der technischen Durchführung zeigen sich keine Unterschiede zwischen den beiden Fixiermethoden. Für zukünftige Versuche kann die Fixiermethode danach ausgewählt werden, ob die Qualität der Gewebemorphologie (Zink-Fixierlösung) oder die Differenzierung der Fluoreszenzunterschiede (Ethanol) von größerer Bedeutung ist.

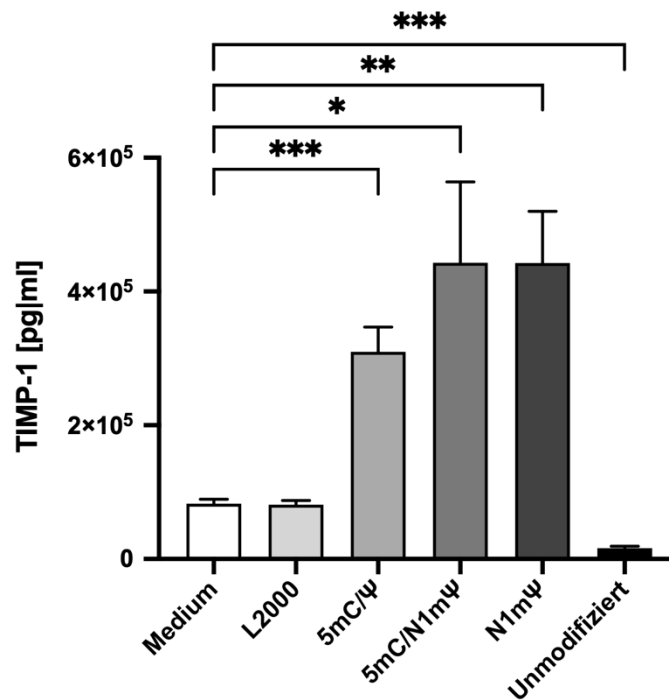
Die in vorliegender Etablierung gewonnenen Ergebnisse zeigen erstmalig in dieser Form den Nachweis von aktivem TIMP-1 nach künstlicher Applikation der entsprechenden mRNA in Aortengewebe. Dieser erfolgsversprechende Ansatz muss in weiteren Experimenten noch genauer untersucht werden.

### **3.6 In vitro Evaluation der Expressionseffizienz von humaner TIMP-1 mRNA durch Nukleotidmodifikationen**

Für alle bisher aufgeführten Versuche wurde humane TIMP-1 mRNA verwendet, welche die modifizierten Nukleotide 5mC und  $\Psi$  enthielt. Um zu untersuchen, welchen Einfluss modifizierte Nukleotide auf die Expressionseffizienz von TIMP-1 mRNA haben und um diese potenziell zu steigern, wurden verschiedene weitere Kombinationen aus modifizierten Nukleotiden getestet (5mC/N1m $\Psi$ , N1m $\Psi$ , unmodifiziert). 1,5  $\mu$ g der TIMP-1 mRNA, wurden 1:1 mit L2000 in Opti-MEM™ komplexiert in NuFFs transfiziert und die Expressionseffizienz mittels Detektion des TIMP-1 Gehalts evaluiert. Als Kontrollen dienten Zellen, die nur mit Medium und Medium mit L2000 behandelt wurden. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde der TIMP-1 Gehalt in den Mediumsüberständen mittels ELISA ermittelt (Abbildung 30).

Nach Transfektion der Zellen mit 5mC/ $\Psi$  modifizierter TIMP-1 mRNA wurde im Vergleich zur Mediumskontrolle ein um das 3,8-fache signifikant erhöhter TIMP-1 Gehalt erzielt. Bei Applikation von N1m $\Psi$  TIMP-1 modifizierter mRNA erzielte man einen um das 5,4-fache signifikant erhöhten TIMP-1 Gehalt im Vergleich zur Kontrolle. Dabei war es unerheblich, ob als Kombinationspartner dazu 5mC oder Cytosin verwendet wurde. TIMP-1 mRNA mit unmodifiziertem Cytosin und Uracil führte zu keiner Steigerung des TIMP-1 Gehalts.

Durch die Modifizierung der TIMP-1 mRNA mit N1m $\Psi$  konnte die Expressionseffizienz der mRNA weiter gesteigert werden. Für zukünftige Versuche könnte man somit Modifikationen mit N1m $\Psi$  verwenden.



**Abbildung 30: TIMP-1 Gehalt nach Transfektion von NuFFs mit 1,5 µg humaner TIMP-1 mRNA mit verschiedenen Nukleotidmodifikationen.**

3x10<sup>5</sup> NuFFs wurden ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach 24 h wurden sie mit 1,5 µg TIMP-1 mRNA mit verschiedenen Nukleotidmodifikationen, komplexiert mit L2000 in Opti-MEM™, transfiziert und für 4 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Kontrollen dienten Medium und Medium mit L2000. Nach 4 h wurden die Transfektionsansätze durch Zellkulturmedium ersetzt und die Zellen für weitere 24 h inkubiert. Nach 24 h wurde der TIMP-1 Gehalt in den Mediumsüberständen mittels humanem TIMP-1 ELISA bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test (n=4, Mittelwert + SEM, p-Werte: \* p ≤0,05; \*\* p ≤0,01; \*\*\* p ≤0,001).

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Die Entwicklung von MMP-Inhibitoren im Überblick

Bei der Pathogenese vieler Erkrankungen spielen MMPs eine wichtige Rolle. Die logische Schlussfolgerung der Pharmaindustrie war es daher, orale MMP-Inhibitoren auf den Markt zu bringen. Während diese in vitro sowie in Tierversuchen wirkten, zeigten sie in klinischen Studien jedoch keine wirklichen Erfolge.<sup>129</sup>

Die erste Gruppe der MMP-Inhibitoren war Hydroxamat basiert. Ziel war es, das katalytische Zink-Ion durch Chelatbildung zu inaktivieren. Durch eine kollagenähnliche Struktur sollte das von den MMPs favorisierte Substrat nachgeahmt werden.<sup>130</sup> Bereits bei Dosen, bei denen sich noch keine oder nur eine geringe Wirkung zeigte, hatten die Patienten jedoch bereits starke muskuloskelettale Nebenwirkungen.<sup>131,132</sup> Hydroxamat basierte Inhibitoren haben die stärkste inhibitorische Wirkung, jedoch sind sie metabolisch nicht sehr stabil. Auch durch weitere Modifikationen konnte hier bis jetzt noch kein wirklicher Erfolg erzielt werden.<sup>133</sup>

Die zweite Generation der MMP-Inhibitoren nutzte anstelle von Hydroxamat andere funktionelle zinkbindende Gruppen, um die Limitationen der ersten Generation zu umgehen. Zudem wurde zwischenzeitlich die Struktur der MMPs entschlüsselt, sodass die Inhibitoren keine substratähnliche Form mehr benötigten. Diese waren dadurch metabolisch stabiler und selektiver. Trotzdem kam es nicht zum großen Durchbruch. In klinischen Studien kam es zu Problemen in Bezug auf Dosis und Zeitpunkt der Applikation, sodass sich zum Teil gegensätzliche Wirkungen zeigten.<sup>133</sup>

Tetracycline haben neben ihrer antibiotischen Funktion auch noch eine inhibitorische Wirkung auf MMPs. Doxycyclin ist der einzige Kollagenaseinhibitor, der von der Food and Drug Administration (FDA) für die Anwendung am Menschen zugelassen ist und wird bei Parodontitis eingesetzt.<sup>134</sup>

Das katalytische Zentrum weist unter den MMPs eine große Homologie auf. Um das breite Wirkungsspektrum der Inhibitoren selektiver zu machen, wurden andere Bindungsstellen gesucht. Dadurch gelang es beispielsweise, einen

Inhibitor für MMP-13 zu generieren, welcher sehr selektiv und gleichzeitig stark inhibitorisch ist.<sup>135</sup>

Vielversprechend ist ein Ansatz für Inhibitoren auf der Basis von Antikörpern. Ein Antikörper gegen MMP-14 wurde sowohl in vitro als auch in vivo erfolgreich getestet.<sup>136,137</sup> Diese Antikörper sind sehr spezifisch, sodass es sogar möglich ist, nicht die komplette MMP, sondern nur einzelne Funktionen zu hemmen.<sup>138</sup> Eine weitere Strategie in der Entwicklung von antikörperbasierten Inhibitoren ist die Nachahmung endogener TIMPs, sodass nur aktive MMPs gehemmt werden.<sup>139</sup> Für MMP-13 konnte ein Antikörper entwickelt werden, welcher nur die aktive Form inhibiert.<sup>140</sup>

Dieser Überblick zeigt, dass der Bedarf zur Entwicklung selektiv und lokal wirksamer MMP-Inhibitoren bei gleichzeitig guter Verträglichkeit groß ist.

Der Einsatz von TIMPs als therapeutische Option bei kardiovaskulären Erkrankungen und Krebserkrankungen steht immer noch am Anfang der Entwicklung. Mögliche Applikationsarten hierbei sind entweder durch Gentherapie oder direkte Applikation des Proteins. Aufgrund der enttäuschenden Resultate bisheriger MMP-Inhibitoren wird in TIMPs als endogene MMP-Inhibitoren großes therapeutisches Potential gesehen. Jedoch bedarf es hierzu noch weiterer Forschung. Alpha-2-Makroglobulin, ein genereller Proteinaseinhibitor, ist ein weiterer endogener MMP-Inhibitor. Darüber hinaus gibt es noch weitere Proteine, welche selektiv einzelne MMPs hemmen können. Hierbei ist die genaue Wirkungsweise jedoch noch nicht bekannt.<sup>93</sup>

## **4.2 mRNA Therapeutika und ihre Anwendungsmöglichkeiten**

Vorheriges Kapitel zeigt die Herausforderungen in der Entwicklung selektiver und nebenwirkungsarmer Therapeutika. mRNA als eine innovative Wirkstoffklasse könnte hier für Fortschritte sorgen. Die Idee, mRNA therapeutisch zu nutzen, besteht bereits seit drei Jahrzehnten. Wolff et al. injizierten mRNA, welche für unterschiedliche Proteine kodierte, intramuskulär in Mäuse und konnten anschließend einen Anstieg des jeweiligen Proteins beobachten.<sup>141</sup> Durch intensive Forschung konnte die mRNA und ihre Wirkungsweise weiter entschlüsselt werden und so die Schwierigkeiten, wie eine kurze Halbwertszeit

und starke ungewollte Immunaktivierung, welche den Einsatz von mRNA ebenfalls herausfordernd machen, überwunden werden. IVT mRNA muss, anders als DNA, nicht erst den Zellkern überwinden und birgt so auch kein Risiko für Insertionsmutationen. Zudem ist ihre Herstellung schnell, einfach und kostengünstig durchzuführen. Außerdem ist sie nur vorübergehend aktiv und wird dann über physiologische Abbaewege eliminiert, was mögliche unerwünschte Wirkungen begrenzt. Des Weiteren kann ein bestehendes mRNA Therapeutikum schnell adaptiert werden, wie es beispielsweise bei Impfungen der Fall ist, um auf Änderungen des Virus zügig zu reagieren.<sup>122</sup>

Für mRNA basierte Therapeutika existiert ein breites Anwendungsspektrum. Die Immuntherapie bei Krebserkrankungen ist der Bereich, in welchem mRNA basierte Therapiemöglichkeiten bereits am längsten erforscht werden. 1995 konnte gezeigt werden, dass durch die Injektion von nackter mRNA, welche für das Carcinoembryonale Antigen kodiert, eine spezifische Antikörperreaktion in Mäusen hervorgerufen werden konnte.<sup>142</sup> Ein Jahr später gelang es das Tumorwachstum in Mäusen zu hemmen, indem dendritische Zellen mit mRNA von Tumorzellen in Kontakt gebracht wurden und diese dann subkutan appliziert wurden, was eine T-Zell-spezifische Immunantwort auslöste.<sup>143</sup> Da zellbasierte Therapieansätze jedoch sehr teuer und aufwändig sind, wurde nach Möglichkeiten gesucht, synthetische mRNA direkt zu applizieren. Ebenfalls im Mausmodell konnte eine intradermale mRNA Applikation bereits nach zwei Impfungen ebenso eine Immunaktivierung bewirken und zeigte einen positiven Effekt auf die Eindämmung des Tumorwachstums.<sup>144</sup> Die einfachste und potenteste Weise um eine T-Zell Aktivierung auszulösen ist die direkte Injektion von mRNA in Lymphknoten.<sup>145</sup> Durch Sequenzierung des Tumorgenoms sollen zukünftig personalisierte Immuntherapien verfügbar sein.<sup>146</sup>

Doch nicht nur in der Krebstherapie, sondern auch in der Bekämpfung von Infektionskrankheiten haben Impfungen einen festen Stellenwert. Bereits 1993 konnte im Mausmodell eine T-Zell Antwort durch mRNA, welche für ein Protein des Influenzavirus kodiert, ausgelöst werden.<sup>147</sup> Jedoch gelang hier der große Durchbruch erst kürzlich im Rahmen der Corona Pandemie. Die hierfür entwickelten mRNA Impfstoffe waren die ersten überhaupt zugelassenen mRNA

Therapeutika und waren durch das Zurückgreifen auf die Ergebnisse aus jahrzehntelanger Forschung schnell verfügbar.<sup>119</sup>

Der fast offensichtlichste Grund, um mRNA einzusetzen, ist in der Proteinersatztherapie. mRNA kodiert für Proteine, sodass bei Krankheiten, welche durch fehlende oder mangelhafte und funktionslose Proteine gekennzeichnet sind, diese durch Applikation der entsprechenden mRNA selbst im Körper gebildet werden können. Jirikowski et al. gelang es 1992 zum ersten Mal Diabetes insipidus durch die Applikation von Vasopressin mRNA in Ratten zu behandeln.<sup>148</sup> Nachdem es dann im Bereich der Proteinersatztherapie fast 20 Jahre still war, gelang es für weitere Proteine eine therapeutische mRNA zu generieren. Zangi et al. gelang es durch die intramyokardiale Injektion von VEGF-A nach einem Herzinfarkt die Stammzellendifferenzierung im Mausmodell anzuregen und somit die Herzfunktion und das Überleben zu verbessern.<sup>149</sup> Kormann et al. konnten durch ein Aerosol mit mRNA für Surfactant eine normale Lungenfunktion im Mausmodell mit letaler Lungenerkrankung durch Mangel an Surfactant wiederherstellen. Zudem konnten sie ebenfalls in Mäusen durch intramuskuläre Injektion von Erythropoetin mRNA den Hämatokrit steigern.<sup>150</sup> Letzteres gelang auch Karikó et al., sie konnten zudem auch eine Wirkung durch intraperitoneale Injektion der entsprechenden mRNA nachweisen.<sup>151</sup>

Immer noch technisch herausfordernd im Bereich der Proteinersatztherapie sind die posttranslationalen Modifikationen, welche nicht in der mRNA kodiert sind. Diese umfassen beispielsweise die Glykosylierung oder die proteolytische Prozessierung, welche für die Funktionalität des jeweiligen Proteins essenziell sind und je nach Organ oder Zelltyp unterschiedlich ausfallen.<sup>122</sup>

### **4.3 Eignung der verwendeten humanen TIMP-1 mRNA und des Mikroinjektionsverfahrens**

Zunächst konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch Transfektion von 1,5 µg humaner TIMP-1 mRNA in NuFFs der in den Medien detektierte TIMP-1 Gehalt bis auf das 3,7-fache gesteigert werden konnte. Die verwendete mRNA war somit funktionsfähig, führte zu einer erfolgreichen Expression des Zielproteins und konnte für die nachfolgenden Versuche eingesetzt werden.

Anschließend wurde das in unserer Arbeitsgruppe bereits etablierte Mikroinjektionsverfahren weiter verbessert. Insbesondere bei stark verkalkten Aorten war die Injektion von Seite der Intima oft nicht möglich, da die Mikronadeln hierbei häufig abgebrochen sind. Es zeigte sich, dass hier die Injektion von Seite der Adventitia deutlich einfacher durchzuführen ist und Cy3-markierte hGLuc mRNA nach Injektion ebenfalls in der Media nachgewiesen werden konnte. Somit spielt die Seite, von welcher aus die Injektion erfolgte, keine Rolle. Dies ist insbesondere im Hinblick auf spätere in vivo Anwendungen von Vorteil, da durch eine Applikation sowohl von intraluminal als auch von extraluminal die Zielschicht Tunica media erreicht werden kann.

#### **4.4 Evaluation des zeitlichen und örtlichen Verlaufs der TIMP-1 Expression nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA in porciner und humaner Aorta ex vivo**

Zur Evaluierung des zeitlichen Verlaufs der TIMP-1 Expression nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA in Aortengewebe wurde der TIMP-1 Gehalt in Medien und Gewebelysaten detektiert. Aorta besteht aus relativ festem Gewebe, sodass sich die Proteinextrahierung daraus als Herausforderung darstellte. In Vorversuchen, welche nicht in dieser Arbeit aufgeführt sind, wurde das hier verwendete Lyseverfahren etabliert. Es zeigte sich, dass die Lyse mittels Keramik-Beads in einem Schüttelhomogenisator die besten Resultate erzielte. Anders als in der Literatur häufig beschrieben, zeigte eine Lyse durch Gefriertrocknung in Stickstoff sowie die Verwendung eines rotierenden Homogenisators keine Erfolge zum TIMP-1 Nachweis aus Aortengewebe.<sup>152,153</sup> In porciner Aorta zeigte sich nach Injektion von humaner TIMP-1 mRNA von Seite der Intima nach 48 h der höchste Anstieg des TIMP-1 Gehalts in den Medien. In den Lysaten konnte zwar nach 24 h kein nennenswerter Anstieg des TIMP-1 Gehalts detektiert werden, jedoch war dieser nach 48 h im Vergleich zu 24 h deutlich abgesunken. Diese Ergebnisse entsprechen tendenziell dem natürlichen Verlauf des TIMP-1 Proteins, welches intrazellulär gebildet und anschließend in die ECM sekretiert wird. Bei Injektion in humane Aorta zeigte sich nach Injektion von Seite der Intima sowohl in den Mediumsüberständen als auch im Gewebe

vor allem nach 24 h ein leichter Anstieg des TIMP-1 Gehalts. Nach Injektion von Seite der Adventitia in humane Aorta konnte in den Mediumsüberständen kein erhöhter TIMP-1 Gehalt detektiert werden. Jedoch war der TIMP-1 Gehalt im Gewebe zu diesem Zeitpunkt auf über das doppelte angestiegen. Zudem fiel in humaner Aorta die Steigerung des TIMP-1 Gehalts im Vergleich zur Kontrolle wesentlich geringer aus als in porciner Aorta. Außerdem war hier eine Erhöhung des TIMP-1 Gehalts hauptsächlich nach 24 h nachweisbar. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass der verwendete ELISA humanes TIMP-1 detektierte und damit das in humaner Aorta natürlich gebildete TIMP-1 einen größeren Einfluss auf die gemessenen Werte hatte als in porciner Aorta. Somit waren die durch die Injektion gebildeten TIMP-1 Mengen oftmals nicht groß genug, um in humaner Aorta sichtbare Unterschiede darstellen zu können. Auch muss bedacht werden, dass es im inflammatorischen Milieu der Gefäßwand von Aneurysmen zu einem vermehrten Abbau der mRNA kommen kann und die Translationseffizienz dadurch abnimmt.<sup>118</sup> Zudem könnte hier durch die pathologischen Bedingungen die Zellviabilität insgesamt vermindert sein. Die Ergebnisse mit humaner Aorta zeigen einen Trend, dass der TIMP-1 Gehalt durch Injektion von TIMP-1 mRNA gesteigert werden kann. Um statistisch signifikante Unterschiede zu erkennen, sollte eine größere Fallzahl untersucht werden.

Ein interessanter Aspekt sind auch die Ergebnisse der Medien und Lysate nach 72 h. Sowohl in porciner als auch in humaner Aorta war der TIMP-1 Gehalt in den Kontrollen zu diesem Zeitpunkt meist höher als nach Injektion von TIMP-1 mRNA. Der Grund hierfür könnte in der Abnahme an vitalen Zellen nach 72 h liegen. Die Aortenstücke waren während der Inkubationszeit von Nährmedium umgeben. Anders als jedoch in der Zellkultur hatte man hier nicht einen Monolayer aus Zellen, sondern Gewebe, welches passiv ernährt wurde. Außerdem haben Lipoplexe einen gewissen zelltoxischen Effekt.<sup>154</sup> Dies würde auch erklären, weshalb nach 72 h der TIMP-1 Gehalt umgekehrt proportional zur injizierten mRNA Menge war. Um den zeitlichen Verlauf der TIMP-1 Expression weiter analysieren zu können, könnte man das Medium täglich erneuern bzw. in vivo Untersuchungen durchführen, wodurch die zelltoxischen Effekte der

Kulturbedingung verringert werden würden. Zudem sollten aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus der Aortenwand in thorakalen und abdominellen Abschnitten, sowie aufgrund der verschiedenen Entitäten der dortigen Aneurysmen, die Aortenproben getrennt nach Ursprungsort analysiert werden.

#### **4.5 Etablierung der In-Situ-Zymographie an Aortengewebe nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA**

Um den Effekt der injizierten TIMP-1 mRNA in situ zu analysieren, wurde das Verfahren der In-Situ-Zymographie angewandt. Dabei kann mittels der Fluorescein markierten DQ-Gelatine die MMP-Aktivität in histologischen Schnitten visualisiert werden. Standardmäßig wird dieses Verfahren an kryokonservierten Schnitten durchgeführt. Dies geht jedoch mit einer verminderten Gewebequalität einher und bedarf zudem einer zügigen Bearbeitung der Proben.<sup>155-159</sup>

Hadler-Olsen et al. führen dieses Verfahren standardmäßig an Paraffinschnitten durch. Dazu verwendeten sie für die Fixierung entweder eine zinkbasierte Fixierlösung oder 70 % Ethanol. Mit beiden Methoden konnten sie gleichwertige Ergebnisse erzielen. Sie visualisierten damit jedoch nur die natürliche MMP-Aktivität von verschiedenen Gewebetypen, zudem wurde Aortengewebe von ihnen noch nicht untersucht.<sup>160,161</sup>

In den Versuchen dieser Arbeit wurden zunächst beide Fixiermethoden an Aortengewebe verglichen. Mit beiden war es möglich, die MMP-Aktivität in porciner Aorta zu erhalten. Nach der Fixierung in 70 % Ethanol war die MMP-Aktivität sogar noch deutlicher zu erkennen und es zeigte sich weniger Hintergrundfluoreszenz als nach der Fixierung mit Zink-Fixierlösung. Jedoch blieb durch letztere die Gewebemorphologie besser erhalten. Als Negativkontrolle dienten Schnitte, welche in EDTA inkubierten oder eingefroren wurden. Bei beidem war ein ähnlich schwaches Signal zu erkennen, was als Autofluoreszenz zu werten war. Während EDTA ein spezifischer MMP-Inhibitor ist, werden durch das Einfrieren alle Enzyme gehemmt. Somit kann das Fluoreszenzsignal in den L2000 Kontrollen eindeutig einer Spaltung der DQ-Gelatine durch MMPs zugeschrieben werden. Die Injektion von Seite der Intima

und Adventitia in sowohl porcine als auch humane Aorta wurde über 72 h evaluiert. Dabei wurden 2-10 µg humane TIMP-1 mRNA injiziert. Es zeigte sich, dass bereits ab der Injektion von 2 µg TIMP-1 mRNA die MMP-Aktivität in Aortengewebe effektiv gehemmt werden konnte. Diese Hemmung wurde über 72 h aufrechterhalten. Dabei war es unerheblich von welcher Seite aus die Injektion erfolgte und funktionierte gleichermaßen in porciner und humaner Aorta. Trotz dessen, dass in den Mediumsüberständen und Gewebelysaten nicht immer ein erhöhter TIMP-1 Gehalt nach Injektion der mRNA nachgewiesen werden konnte, zeigte sich in situ dennoch eine stabile MMP-Hemmung über 72 h. Das gebildete TIMP-1 Protein war somit über diesen Zeitraum funktional. Eventuell könnte der erschwerte Nachweis des TIMP-1 Gehalts auch daran liegen, dass das an MMPs gebundene TIMP-1 vom ELISA nicht erfasst werden konnte.

Obwohl aneurysmatisches Gewebe vermehrt MMPs enthält, war hier in den Kontrollen eine geringere MMP-Aktivität als in porciner Aorta sichtbar. Dies könnte daran liegen, dass unter den pathologischen Bedingungen in Aneurysmen weniger vitale Zellen und damit auch weniger aktive MMPs über den Inkubationszeitraum überlebten. In der DAPI Färbung sind in humaner Aorta deutlich weniger Zellkerne als in porciner Aorta sichtbar. Dies passt zu der vermehrten Apoptose von SMCs in Aneurysmen.<sup>44</sup>

Das Verfahren der In-Situ-Zymographie mit Paraffinschnitten konnte etabliert werden und eignet sich bestens, um die MMP-Aktivität in Aortengewebe zu visualisieren. Bereits bei Einsatz geringer Mengen TIMP-1 mRNA konnte die MMP-Aktivität selbst unter pathologischen Bedingungen in Aortenaneurysmen effektiv über einen Zeitraum von 72 h gehemmt werden. Dabei blieb eine gute Gewebequalität bei dem verwendeten ex vivo Aortenmodell erhalten. In weiterführenden Versuchen könnte man den Beobachtungszeitraum erweitern, um den zeitlichen Verlauf der MMP-Hemmung nach Injektion von humaner TIMP-1 mRNA weiter zu evaluieren.

Zudem sollten die Unterschiede durch die Applikation verschiedener mRNA Mengen noch genauer analysiert werden.

## **4.6 Einfluss der Nukleotidmodifikation auf den Transfektionserfolg**

In den Versuchen dieser Arbeit mit Aortengewebe wurde humane TIMP-1 mRNA mit den modifizierten Nukleotiden 5mC und  $\Psi$  eingesetzt. Um zu untersuchen, wie sich die unterschiedlichen Modifikationen auf die Proteinexpressionseffizienz auswirken, wurden NuFFs mit TIMP-1 mRNA mit weiteren Nukleotidmodifikationen transfiziert. Während der TIMP-1 Gehalt mit der Kombination 5mC/ $\Psi$  um das 3,8-fache gesteigert werden konnte, konnte er durch mRNA mit N1m $\Psi$  sogar um das 5,4-fache gesteigert werden. Dabei spielte es keine Rolle, ob zusätzlich 5mC oder unmodifiziertes Cytosin enthalten war.

Andries et al. konnten ebenfalls die größte Proteinexpressionseffizienz mit mRNA mit N1m $\Psi$  erzielen. Im Vergleich zu 5mC/ $\Psi$  zeigte sich hier eine höhere Zellviabilität sowie eine geringere Immunaktivierung. Bei der in vivo Injektion von Firefly Luciferase mRNA in Mäuse war N1m $\Psi$  alleine 5mC/ $\Psi$  und 5mC/N1m $\Psi$  sogar deutlich überlegen.<sup>162</sup> Auch die Ergebnisse von Svitkin et al. zeigen die höchste Translationsrate bei alleiniger Verwendung von N1m $\Psi$ . Als Grund hierfür konnten sie zeigen, dass mRNA, welche N1m $\Psi$  enthält, eine höhere Ribosomendichte aufweist und eher translatiert wird.<sup>163</sup> In zukünftigen Versuchen könnte getestet werden, wie sich humane TIMP-1 mRNA mit N1m $\Psi$  auf die Proteinexpressionseffizienz in Aortengewebe auswirkt.

Durch die Applikation von unmodifizierter TIMP-1 mRNA konnte keine Steigerung des TIMP-1 Gehalts erreicht werden. Dies könnte auf eine verminderte Zellviabilität durch die toxischen Effekte unmodifizierter IVT mRNA zurückzuführen sein.<sup>122</sup>

## **4.7 Herausforderungen im therapeutischen Einsatz von TIMPs**

TIMPs haben oft widersprüchliche Funktionen, diese sind jedoch kontextabhängig. Die wachstumsfördernde Funktion von TIMPs zeigt sich beispielsweise nur bei freiem TIMP, welches nicht an MMPs gebunden ist. Auch durch Veränderungen, die es den TIMPs nicht mehr möglich machten an MMPs zu binden, blieb die Funktion als Wachstumsfaktor erhalten. Die Fähigkeit MMPs zu hemmen ist somit unabhängig von den proliferativen Eigenschaften der

TIMPs.<sup>164</sup> Jedoch spielt auch das jeweilig untersuchte Gewebe eine Rolle. In Brustgewebe zeigte sich in Mausversuchen eine antiproliferative Wirkung von TIMP-1.<sup>165</sup> Die antiapoptotische Funktion von TIMP-1 zeigt sich gleichermaßen in gesundem wie in pathologisch verändertem Gewebe. Während dies bei neoplastischen Erkrankungen eine zusätzliche schlechte Eigenschaft ist, kann sich dies bei Erkrankungen mit Gewebeschädigung jedoch positiv auswirken.<sup>164</sup> Implantiert man nach einem Myokardinfarkt Stammzellen, produzieren diese TIMP-1 und verhindern so eine Apoptose der Kardiomyozyten.<sup>166</sup> Es ist also denkbar, dass sich durch die Applikation von synthetischem TIMP-1 analog die Apoptose von SMCs in Aneurysmen verhindern lässt.

Eine einzelne MMP kann je nach Organ oder Gewebetyp unterschiedliche Funktionen haben. Daher ist es nicht sinnvoll ubiquitär alle MMPs zu hemmen. Vielmehr müssen spezifische MMP Inhibitoren für die einzelnen Krankheitsbilder und Organsysteme entwickelt werden. Durch lokale Applikation können zudem systemische Nebenwirkungen verringert werden.<sup>133</sup>

#### **4.8 Lokale Hemmung der MMP-Aktivität in Aneurysmen**

Bisherige Ansätze mit gleicher Zielsetzung arbeiten vornehmlich mit viralen Vektoren, mit welchen TIMP-1 DNA appliziert wird. Allaire et al. haben über retrovirale Vektoren TIMP-1 DNA in SMCs eingebracht, welche sie dann in das Aortenlumen von Ratten mit Aneurysmen injizierten. Bereits nach drei Tagen war dort eine TIMP-1 Überexpression nachweisbar, welche bis zu vier Wochen anhielt. Die Aneurysmen dilatierten und rupturierten dadurch deutlich seltener. Das meiste TIMP-1 akkumulierte in der Intima, gelangte von dort jedoch auch in die Media und Adventitia.<sup>167</sup> Dies ist insbesondere im Hinblick auf spätere in vivo Anwendungen mit einer intraluminalen Applikationsmethode von Bedeutung. Endothelzellen selbst spielen ebenfalls eine Rolle an der Reparatur der Aorta, indem sie durch parakrine Mechanismen und die Rekrutierung lokaler Gefäßzellen zu einer Wiederherstellung der Aortenwand führen, welche reich an ECM und SMCs ist. Außerdem reduzieren sie die Neovaskularisation und führen zu einem Abbau des Thrombus, welche beide an der Progression von AAAs beteiligt sind.<sup>168</sup>

MMPs führen jedoch nicht nur zur Wandinstabilität bei Aortenaneurysmen, sondern auch zu instabilen Plaques bei Atherosklerose. Daher verfolgten Rouis et al. einen ähnlichen Ansatz. Sie injizierten TIMP-1 DNA über einen adenoviralen Vektor venös in ein atherosklerotisches Mausmodell. Bereits nach vier Wochen waren 32 % weniger atherosklerotische Läsionen vorzufinden. In histologischen Schnitten zeigten sich mehr Elastin, Kollagen und SMCs. Dies konnte durch im Plasma zirkulierendes TIMP-1 erreicht werden, hier zeigten sich nach ca. 2 Wochen die höchsten Werte.<sup>169</sup> Es ist somit möglich, durch im Blut zirkulierendes TIMP-1 geschädigte Gefäßwände zu erreichen. Während dies eine einfache und unkomplizierte Applikationsmethode darstellt, müssten hierbei jedoch noch die weiteren Wirkungen von TIMP-1 auf den Organismus evaluiert werden.

Gingiva Fibroblasten sekretieren hohe Level an TIMP-1 und antiinflammatorischen Zytokinen. Giraud et al. brachten diese Fibroblasten von Seite der Adventitia auf die abdominalen Aorten von Mäusen mit induzierten AAAs auf. Dadurch konnte die Akkumulation von Leukozyten, der ECM Abbau sowie das Aneurysmawachstum verhindert werden. Zudem kam es zu weniger Dissektionen und Rupturen. Wurde das TIMP-1 Gen in den Fibroblasten zuvor ausgeknockt, zeigten sich diese positiven Effekte nicht. Dies bestätigt, dass TIMP-1 einen essenziellen Stellenwert in der Verhinderung von Aortenaneurysmen hat. Zudem beschränkte sich die Wirkung nur auf die abdominale Aorta und hatte keinen Einfluss auf den thorakalen Teil, was zeigt, dass TIMP-1 lokal über parakrine Mechanismen wirkt.<sup>170</sup>

Nosoudi et al. nutzten Nanopartikel mit dem MMP-Inhibitor Batimastat für eine lokale und zielgerichtete Aneurysmatherapie. Durch die Konjugation mit einem Elastin Antikörper gelangten diese nach venöser Injektion in ein aneurysmatisches Rattenmodell direkt zu den Bereichen mit fragmentiertem Elastin. Es zeigte sich, dass die Aufnahme in die Media der Aorta durch die Vasa vasorum erfolgte. MMPs konnten damit erfolgreich gehemmt werden und die Inflammation nahm ab. Über den Beobachtungszeitraum von vier Wochen zeigte sich eine verlangsamte Progression der Aneurysmen sowie ein Erhalt der elastischen Fasern.<sup>171</sup> Wang et al. erzielten mit Pentagalloyl Glucose beladenen

Nanopartikeln ähnliche Ergebnisse. Pentagalloyl Glucose stabilisiert und regeneriert die vaskuläre ECM.<sup>172</sup>

#### **4.9 Adaptierung der Ergebnisse zur in vivo Anwendung**

Um die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse in vivo zu übertragen, sind einige Modifikationen notwendig. Da sowohl eine Applikation von intraluminal als auch von extraluminal erfolgsversprechend zu sein scheint, sind mehrere potenzielle Anwendungsmöglichkeiten denkbar. Das Injektionsverfahren über die hohlen Mikronadeln des MicronJet™ 600 wurde für die Evaluation der Funktionalität der TIMP-1 mRNA ex vivo eingesetzt und muss hierfür adaptiert werden. Für eine endovaskuläre Applikation hat die Firma Mercator einen Ballonkatheter entwickelt, wo bei Inflation eine 900 µm lange hohle Mikronadel freigelegt wird (Bullfrog® Micro-Infusion Device). Dieses System hat von der FDA bereits eine Zulassung erhalten und ermöglicht die intraluminale Applikation von Medikamenten in die Gefäßwand. Owens et al. konnten damit erfolgreich Dexamethason in die Adventitia von Femoralarterien bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit injizieren.<sup>173</sup> Angelehnt an dieses Prinzip sind weitere Arbeitsgruppen dabei, ähnliche Systeme zu entwickeln. Durch Ballonkatheter mit mehreren Mikronadeln (hohl oder solide) sowie die Möglichkeit zur Auswahl verschiedener Nadellängen sollen Systeme geschaffen werden, welche den verschiedenen Anwendungsbedürfnissen gerecht werden.<sup>174,175</sup> Die Vorteile dieser Applikationsmethode sind eine geringe Invasivität und schnelle Durchführbarkeit. Zudem bleiben keine Fremdkörper im Gefäßlumen zurück. Nachdem TIMP-1 auch über die Intima zu wirken scheint,<sup>167</sup> wäre es denkbar Gefäßprothesen für die endovaskuläre Aneurysmatherapie (TEVAR/EVAR) mit TIMP-1 mRNA oder Protein zu beschichten und dadurch die Regeneration der Aortenwand zusätzlich zu verbessern.

Injektionen von Seite der Adventitia könnten im Rahmen von anderweitigen Herzoperationen, wie Bypass- oder Klappenoperationen, durchgeführt werden. Zudem sind gewisse Bereiche der Aorta thorakoskopisch oder über minimalinvasive Zugänge zu erreichen. Je nachdem, was nachfolgende in vivo Studien zeigen, wäre dies sowohl als prophylaktische Maßnahme, als auch als

Therapieoption bei Aortenektasien, wenn die Indikation zum Gefäßersatz noch nicht gegeben ist, denkbar. Für die Applikation von extraluminal könnten auch Patches mit resorbierbaren Mikronadeln in Frage kommen.<sup>176</sup>

Das verwendete Transfektionsreagenz L2000 ist bisher nur für experimentelle Zwecke zugelassen und müsste für in vivo Anwendungen ersetzt werden. Durch die SARS-CoV-2 Impfstoffe gibt es aber bereits LNPs, welche für die Verwendung am Menschen zugelassen sind.<sup>119</sup>

#### **4.10 Ausblick**

Die ex vivo Expression von TIMP-1 in Aortengewebe konnte erfolgreich durch Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA gesteigert werden. Dies führte zu einer verminderten MMP-Aktivität, sodass davon auszugehen ist, dass weniger strukturvermittelnde Proteine abgebaut werden. Ob dies tatsächlich zu einer Zunahme der Wandstabilität in Aneurysmen führt, muss in weiterführenden Versuchen aber erst noch getestet werden.

Zudem werden auch Aortendissektionen durch erhöhte MMP Level getriggert.<sup>85</sup> Es ist somit denkbar, dass durch eine Therapie mit TIMP-1 nicht nur die Entstehung von Aneurysmen verlangsamt oder gar umgekehrt werden kann, sondern zugleich auch die gefährliche Komplikation einer Dissektion seltener auftritt.

Neben Aneurysmen liegt auch bei vielen weiteren Erkrankungen eine Überexpression von MMPs vor. Im kardiovaskulären System sind dies Remodellingvorgänge nach Myokardinfarkt, die ein erhöhtes Risiko für eine linksventrikuläre Funktionsstörung und Ruptur darstellen.<sup>177,178</sup> Außerdem ist das Risiko erhöht für Atherosklerose, koronare Herzkrankheit, Schlaganfall sowie für die Restenoserate nach einer Intervention bei diesen Erkrankungen.<sup>179</sup> Auch bei Tumorerkrankungen spielen MMPs eine essenzielle Rolle. Indem sie Strukturbestandteile der Basalmembran spalten, machen sie den Weg frei für metastasierende Zellen.<sup>180</sup> Dies zeigt, wie vielfältig die potenziellen Einsatzmöglichkeiten von TIMPs als therapeutische Option sind. Aufgrund der zahlreichen unterschiedlichen Funktionen von MMPs und TIMPs bedarf es jedoch noch weiterführender Versuche, um zielgerichtete Therapiemöglichkeiten

zu entwickeln. Zudem stellt der therapeutische Einsatz von mRNA eine vielversprechende Wirkstoffklasse dar. Insbesondere sollten die in dieser Arbeit gewonnen ex vivo Ergebnisse in vivo in einem Aortenaneurysmmodell mit entsprechender Applikationsmethode evaluiert werden. Des Weiteren können die Methoden zur Extraktion des TIMP-1 Proteins aus Aortengewebe sowie dessen Nachweis weiter optimiert werden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Aorta ist das größte arterielle Blutgefäß des menschlichen Körpers und versorgt vom Herzen abgehend alle Organe mit sauerstoffreichem Blut. Aneurysmen der Aorta stellen ein bedeutsames Krankheitsbild dar und sind häufig symptomlos, jedoch zugleich lebensgefährlich durch Komplikationen wie Dissektion oder Ruptur. Bisherige chirurgische und endovaskuläre Therapieoptionen können Aneurysmen nicht in ihrer Entstehung aufhalten oder gar rückgängig machen und sind zudem selbst mit Risiken behaftet. In aneurysmatischem Gewebe lassen sich vermehrt Matrix-Metalloproteasen (MMPs) nachweisen. Diese führen durch einen exzessiven Abbau von Strukturproteinen wie Elastin und Kollagen der extrazellulären Matrix (ECM) zu einem Stabilitätsverlust der Gefäßwand. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) ist ein natürlicher Inhibitor dieser MMPs, der diesem Abbau entgegenwirken kann. Zudem stellt Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid, mRNA) eine vielversprechende Wirkstoffklasse bei der Entwicklung neuer Therapieoptionen dar.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob durch Mikroinjektion von synthetischer humaner TIMP-1 mRNA die TIMP-1 Expression in Aortengewebe ex vivo gesteigert werden kann sowie eine inhibitorische Funktion gegenüber MMPs nachweisbar ist. Dies könnte dazu beitragen, zukünftige Behandlungsstrategien von Aortenaneurysmen zu verbessern.

Hierfür wurde zunächst ein Lyseverfahren für Aortengewebe etabliert. Es zeigte sich, dass nach Injektion von humaner TIMP-1 mRNA in porcine Aorta TIMP-1 nach 48 h signifikant in Mediumsüberständen vermehrt exprimiert wird. Zu diesem Zeitpunkt war der TIMP-1 Gehalt im Gewebe abgesunken, was tendenziell dem natürlichen Verlauf der TIMP-1 Sekretion in die ECM entspricht. In humaner Aorta zeigte sich bereits nach 24 h der Trend für eine geringe Erhöhung des TIMP-1 Gehalts in Mediumsüberständen und Gewebelysaten. Dies muss in weiterführenden Experimenten noch genauer analysiert werden. Anschließend wurde das Verfahren der In-Situ-Zymographie, welches normalerweise an unfixierten Kryoschnitten angewandt wird, unter Verwendung

von zwei verschiedenen enzymeschonenden Fixiermethoden sowie Paraffineinbettung etabliert. Mit diesem Verfahren lässt sich die MMP-Aktivität visualisieren. Zudem konnte eine gute Gewebequalität erhalten werden. Es konnte gezeigt werden, dass durch die injizierte TIMP-1 mRNA die MMP-Aktivität in Aortengewebe bis zu 72 h erfolgreich gehemmt werden konnte. Dies war bereits ab Einsatz von 2 µg mRNA, sowohl bei Injektion von Seite der Intima als auch der Adventitia, möglich. Dabei wurde stets die Zielschicht Tunica media erreicht, welche bei Aneurysmen hauptsächlich vom Stabilitätsverlust betroffen ist. Zudem war dies gleichermaßen in porciner Aorta, wie auch unter dem inflammatorischen Milieu humaner Aneurysmaexzidate, zu beobachten. Durch Verwendung verschiedener Nukleotidmodifikationen konnte die Translationseffizienz der verwendeten TIMP-1 mRNA weiter gesteigert werden. Neben Aneurysmen liegt auch bei weiteren kardiovaskulären Erkrankungen sowie in Tumoren ein Ungleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs vor, sodass es zahlreiche potenzielle Einsatzmöglichkeiten von TIMPs als therapeutische Option gibt. Insbesondere die Applikation in Form von TIMP mRNA stellt hier einen vielversprechenden Ansatz dar.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Schmitz F. Leitungsbahnen und topografische Beziehungen im Mediastinum. In: Aumüller G, Aust G, Conrad A, et al., eds. *Duale Reihe Anatomie*. 5., korrigierte Auflage ed.: Georg Thieme Verlag; 2020.
2. Schulte E. Arterien des Bauchraums – Aorta abdominalis und ihre Äste. In: Aumüller G, Aust G, Conrad A, et al., eds. *Duale Reihe Anatomie*. 5., korrigierte Auflage ed.: Georg Thieme Verlag; 2020.
3. Shen YH, LeMaire SA. Molecular pathogenesis of genetic and sporadic aortic aneurysms and dissections. *Current Problems in Surgery*. 2017;54(3):95-155.
4. Elefteriades JA. Thoracic aortic aneurysm: reading the enemy's playbook. *Curr Probl Cardiol*. 2008;33(5):203-277.
5. MacSweeney ST, Powell JT, Greenhalgh RM. Pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg*. 1994;81(7):935-941.
6. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Blutgefäße. In: Lüllmann-Rauch R, Asan E, eds. *Taschenlehrbuch Histologie*. 6., vollständig überarbeitete Auflage ed.: Georg Thieme Verlag; 2019.
7. Humphrey JD, Schwartz MA, Tellides G, Milewicz DM. Role of Mechanotransduction in Vascular Biology. *Circulation Research*. 2015;116(8):1448-1461.
8. Die Abbildung wurde erstellt mit Hilfe von Grafikelementen von smart.servier.com.
9. Pfaltzgraff ER, Bader DM. Heterogeneity in vascular smooth muscle cell embryonic origin in relation to adult structure, physiology, and disease. *Developmental Dynamics*. 2015;244(3):410-416.
10. Shirwany NA, Zou M-H. Arterial stiffness: a brief review. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2010;31(10):1267-1276.
11. Grissmer S. Windkesselleffekt. In: Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann R, et al., eds. *Duale Reihe Physiologie*. 4., unveränderte Auflage ed.: Georg Thieme Verlag KG; 2021.
12. Huppelsberg J, Walter K. Die Kreislaufregulation und die Regulation der Organdurchblutung. In: Huppelsberg J, Walter K, eds. *Kurzlehrbuch Physiologie*. 4. aktualisierte Auflage ed.: Georg Thieme Verlag; 2013.
13. Sakalihasan N, Limet R, Defawe OD. Abdominal aortic aneurysm. *The Lancet*. 2005;365(9470):1577-1589.
14. Erbel R, Aboyans V, Boileau C, et al. 2014 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases: Document covering acute and chronic aortic diseases of the thoracic and abdominal aorta of the adult. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Aortic Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2014;35(41):2873-2926.
15. National Center for Injury Prevention and Control. WISQRS Leading Causes of Death Reports. 1999–2006. <http://webappa.cdc.gov/sasweb/ncipc/leadcaus10.html>.
16. Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, et al. Prevalence and associations of abdominal aortic aneurysm detected through screening. Aneurysm

- Detection and Management (ADAM) Veterans Affairs Cooperative Study Group. *Ann Intern Med.* 1997;126(6):441-449.
17. Quintana RA, Taylor WR. Introduction to the Compendium on Aortic Aneurysms. *Circulation Research.* 2019;124(4):470-471.
  18. Clouse WD, Hallett J, John W., Schaff HV, Gayari MM, Ilstrup DM, Melton III LJ. Improved Prognosis of Thoracic Aortic Aneurysms A Population-Based Study. *JAMA.* 1998;280(22):1926-1929.
  19. Kuzmik GA, Sang AX, Elefteriades JA. Natural history of thoracic aortic aneurysms. *Journal of Vascular Surgery.* 2012;56(2):565-571.
  20. Coady MA, Davies RR, Roberts M, et al. Familial Patterns of Thoracic Aortic Aneurysms. *Archives of Surgery.* 1999;134(4):361-367.
  21. Isselbacher EM. Thoracic and Abdominal Aortic Aneurysms. *Circulation.* 2005;111(6):816-828.
  22. Krüger T, Sandoval Boburg R, Lescan M, et al. Aortic elongation in aortic aneurysm and dissection: the Tübingen Aortic Pathoanatomy (TAIPAN) project. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2018;54(1):26-33.
  23. Coady MA, Rizzo JA, Hammond GL, et al. What is the appropriate size criterion for resection of thoracic aortic aneurysms? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1997;113(3):476-491; discussion 489-491.
  24. Elefteriades JA. Natural history of thoracic aortic aneurysms: indications for surgery, and surgical versus nonsurgical risks. *The Annals of Thoracic Surgery.* 2002;74(5):S1877-S1880.
  25. Davies RR, Goldstein LJ, Coady MA, et al. Yearly rupture or dissection rates for thoracic aortic aneurysms: simple prediction based on size. *The Annals of Thoracic Surgery.* 2002;73(1):17-28.
  26. Litchford B, Okies JE, Sugimura S, Starr A. Acute aortic dissection from cross-clamp injury. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.* 1976;72(5):709-713.
  27. Scott RAP. The Multicentre Aneurysm Screening Study (MASS) into the effect of abdominal aortic aneurysm screening on mortality in men: a randomised controlled trial. *The Lancet.* 2002;360(9345):1531-1539.
  28. Howard DPJ, Banerjee A, Fairhead JF, et al. Population-Based Study of Incidence of Acute Abdominal Aortic Aneurysms With Projected Impact of Screening Strategy. *J Am Heart Assoc.* 2015;4(8):e001926-e001926.
  29. De Rango P, Farchioni L, Fiorucci B, Lenti M. Diabetes and Abdominal Aortic Aneurysms. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery.* 2014;47(3):243-261.
  30. Takagi H, Umemoto T. Diabetes and Abdominal Aortic Aneurysm Growth. *Angiology.* 2016;67(6):513-525.
  31. Frydman G, Walker PJ, Summers K, et al. The Value of Screening in Siblings of Patients with Abdominal Aortic Aneurysm. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery.* 2003;26(4):396-400.
  32. Calero A, Illig KA. Overview of aortic aneurysm management in the endovascular era. *Seminars in Vascular Surgery.* 2016;29(1):3-17.
  33. Stenbaek J, Kalin B, Swedenborg J. Growth of Thrombus may be a Better Predictor of Rupture than Diameter in Patients with Abdominal Aortic Aneurysms. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery.* 2000;20(5):466-469.

34. Wolf YG, Thomas WS, Brennan FJ, Goff WG, Sise MJ, Bernstein EF. Computed tomography scanning findings associated with rapid expansion of abdominal aortic aneurysms. *Journal of Vascular Surgery*. 1994;20(4):529-538.
35. Vorp DA, Lee PC, Wang DHJ, et al. Association of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm with local hypoxia and wall weakening. *Journal of Vascular Surgery*. 2001;34(2):291-299.
36. Kazi M, Thyberg J, Religa P, et al. Influence of intraluminal thrombus on structural and cellular composition of abdominal aortic aneurysm wall. *Journal of Vascular Surgery*. 2003;38(6):1283-1292.
37. Shen M, Lee J, Basu R, et al. Divergent Roles of Matrix Metalloproteinase 2 in Pathogenesis of Thoracic Aortic Aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(4):888-898.
38. Winer A, Adams S, Mignatti P. Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy: Turning Past Failures Into Future Successes. *Mol Cancer Ther*. 2018;17(6):1147-1155.
39. Curci JA, Liao S, Huffman MD, Shapiro SD, Thompson RW. Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *The Journal of Clinical Investigation*. 1998;102(11):1900-1910.
40. Thompson RW, Holmes DR, Mertens RA, et al. Production and localization of 92-kilodalton gelatinase in abdominal aortic aneurysms. An elastolytic metalloproteinase expressed by aneurysm-infiltrating macrophages. *The Journal of Clinical Investigation*. 1995;96(1):318-326.
41. Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *The Journal of Clinical Investigation*. 2002;110(5):625-632.
42. Longo GM, Buda SJ, Fiotta N, et al. MMP-12 has a role in abdominal aortic aneurysms in mice. *Surgery*. 2005;137(4):457-462.
43. Pearce WH, Koch AE. Cellular Components and Features of Immune Response in Abdominal Aortic Aneurysms. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1996;800(1):175-185.
44. Henderson EL, Geng Y-J, Sukhova GK, Whittemore AD, Knox J, Libby P. Death of Smooth Muscle Cells and Expression of Mediators of Apoptosis by T Lymphocytes in Human Abdominal Aortic Aneurysms. *Circulation*. 1999;99(1):96-104.
45. Ghorpade A, Baxter BT. Biochemistry and Molecular Regulation of Matrix Macromolecules in Abdominal Aortic Aneurysms. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1996;800(1):138-150.
46. Holmes DR, Liao S, Parks WC, Hompson RW. Medial neovascularization in abdominal aortic aneurysms: A histopathologic marker of aneurysmal degeneration with pathophysiologic implications. *Journal of Vascular Surgery*. 1995;21(5):761-772.
47. Mecham RP. Elastin in lung development and disease pathogenesis. *Matrix Biol*. 2018;73:6-20.
48. O'Brien ME, Chandra D, Wilson RC, et al. Loss of skin elasticity is associated with pulmonary emphysema, biomarkers of inflammation, and

- matrix metalloproteinase activity in smokers. *Respiratory Research*. 2019;20(1):128.
49. Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics. *Physiological Reviews*. 2009;89(3):957-989.
  50. Judge DP, Dietz HC. Marfan's syndrome. *Lancet*. 2005;366(9501):1965-1976.
  51. Busnadiego O, Gorbenko del Blanco D, González-Santamaría J, et al. Elevated expression levels of lysyl oxidases protect against aortic aneurysm progression in Marfan syndrome. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015;85:48-57.
  52. Carta L, Pereira L, Arteaga-Solis E, et al. Fibrillins 1 and 2 perform partially overlapping functions during aortic development. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(12):8016-8023.
  53. Chung AWY, Yeung KA, Sandor GGS, Judge DP, Dietz HC, Breemen Cv. Loss of Elastic Fiber Integrity and Reduction of Vascular Smooth Muscle Contraction Resulting From the Upregulated Activities of Matrix Metalloproteinase-2 and -9 in the Thoracic Aortic Aneurysm in Marfan Syndrome. *Circulation Research*. 2007;101(5):512-522.
  54. Daugherty A, Chen Z, Sawada H, Rateri DL, Sheppard MB. Transforming Growth Factor- $\beta$  in Thoracic Aortic Aneurysms: Good, Bad, or Irrelevant? *J Am Heart Assoc*. 2017;6(1):e005221.
  55. Dallas SL, Miyazono K, Skerry TM, Mundy GR, Bonewald LF. Dual role for the latent transforming growth factor-beta binding protein in storage of latent TGF-beta in the extracellular matrix and as a structural matrix protein. *Journal of Cell Biology*. 1995;131(2):539-549.
  56. Jones JA, Spinale FG, Ikonomidis JS. Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling in Thoracic Aortic Aneurysm Development: A Paradox in Pathogenesis. *Journal of Vascular Research*. 2009;46(2):119-137.
  57. Loeys BL, Chen J, Neptune ER, et al. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet*. 2005;37(3):275-281.
  58. Habashi JP, Judge DP, Holm TM, et al. Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science*. 2006;312(5770):117-121.
  59. Cook JR, Clayton NP, Carta L, et al. Dimorphic effects of transforming growth factor- $\beta$  signaling during aortic aneurysm progression in mice suggest a combinatorial therapy for Marfan syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(4):911-917.
  60. Brooke BS, Habashi JP, Judge DP, Patel N, Loeys B, Dietz HC, 3rd. Angiotensin II blockade and aortic-root dilation in Marfan's syndrome. *N Engl J Med*. 2008;358(26):2787-2795.
  61. Groenink M, den Hartog AW, Franken R, et al. Losartan reduces aortic dilatation rate in adults with Marfan syndrome: a randomized controlled trial. *Eur Heart J*. 2013;34(45):3491-3500.
  62. Wang Y, Ait-Oufella H, Herbin O, et al. TGF-beta activity protects against inflammatory aortic aneurysm progression and complications in

- angiotensin II-infused mice. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(2):422-432.
63. Wei H, Hu JH, Angelov SN, et al. Aortopathy in a Mouse Model of Marfan Syndrome Is Not Mediated by Altered Transforming Growth Factor  $\beta$  Signaling. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(1):e004968.
  64. Dai J, Losy F, Guinault A-M, et al. Overexpression of Transforming Growth Factor-beta1 Stabilizes Already-Formed Aortic Aneurysms. *Circulation*. 2005;112(7):1008-1015.
  65. Pober BR, Johnson M, Urban Z. Mechanisms and treatment of cardiovascular disease in Williams-Beuren syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008;118(5):1606-1615.
  66. Superti-Furga A, Gugler E, Gitzelmann R, Steinmann B. Ehlers-Danlos syndrome type IV: a multi-exon deletion in one of the two COL3A1 alleles affecting structure, stability, and processing of type III procollagen. *Journal of Biological Chemistry*. 1988;263(13):6226-6232.
  67. Kontusaari S, Tromp G, Kuivaniemi H, Ladda RL, Prockop DJ. Inheritance of an RNA splicing mutation (G+ 1 IVS20) in the type III procollagen gene (COL3A1) in a family having aortic aneurysms and easy bruising: phenotypic overlap between familial arterial aneurysms and Ehlers-Danlos syndrome type IV. *Am J Hum Genet*. 1990;47(1):112-120.
  68. Boutouyrie P, Germain DP, Fiessinger J-N, Laloux B, Perdu J, Laurent S. Increased Carotid Wall Stress in Vascular Ehlers-Danlos Syndrome. *Circulation*. 2004;109(12):1530-1535.
  69. Dasouki M, Markova D, Garola R, et al. Compound heterozygous mutations in fibulin-4 causing neonatal lethal pulmonary artery occlusion, aortic aneurysm, arachnodactyly, and mild cutis laxa. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2007;143A(22):2635-2641.
  70. Huang J, Davis EC, Chapman SL, et al. Fibulin-4 deficiency results in ascending aortic aneurysms: a potential link between abnormal smooth muscle cell phenotype and aneurysm progression. *Circulation research*. 2010;106(3):583-592.
  71. Horiguchi M, Inoue T, Ohbayashi T, et al. Fibulin-4 conducts proper elastogenesis via interaction with cross-linking enzyme lysyl oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(45):19029-19034.
  72. Roberts WC. The congenitally bicuspid aortic valve: A study of 85 autopsy cases. *The American Journal of Cardiology*. 1970;26(1):72-83.
  73. Abbott ME. Coarctation of the aorta of the adult type: II. A statistical study and historical retrospect of 200 recorded cases with autopsy, of stenosis or obliteration of the descending arch in subjects above the age of two years. *American Heart Journal*. 1928;3(5):574-618.
  74. Edwards WD, Leaf DS, Edwards JE. Dissecting aortic aneurysm associated with congenital bicuspid aortic valve. *Circulation*. 1978;57(5):1022-1025.
  75. Bonderman D, Gharehbaghi-Schnell E, Wollenek G, Maurer G, Baumgartner H, Lang IM. Mechanisms Underlying Aortic Dilatation in Congenital Aortic Valve Malformation. *Circulation*. 1999;99(16):2138-2143.

76. McKusick V. Association of congenital bicuspid aortic valve and Erdheim's cystic medial necrosis. *The Lancet*. 1972;299(7758):1026-1027.
77. David TE, Omran A, Ivanov J, et al. Dilation of the pulmonary autograft after the ross procedure. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2000;119(2):210-220.
78. Fedak PWM, de Sa MPL, Verma S, et al. Vascular matrix remodeling in patients with bicuspid aortic valve malformations: implications for aortic dilatation. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2003;126(3):797-805.
79. Müller BT, Wegener OR, Grabitz K, Pillny M, Thomas L, Sandmann W. Mycotic aneurysms of the thoracic and abdominal aorta and iliac arteries: Experience with anatomic and extra-anatomic repair in 33 cases. *Journal of Vascular Surgery*. 2001;33(1):106-113.
80. Procter C, Hollier L. Takayasu's arteritis and temporal arteritis. *Annals of vascular surgery*. 1992;6(2):195-198.
81. Nuenninghoff DM, Hunder GG, Christianson TJH, McClelland RL, Matteson EL. Incidence and predictors of large-artery complication (aortic aneurysm, aortic dissection, and/or large-artery stenosis) in patients with giant cell arteritis: A population-based study over 50 years. *Arthritis & Rheumatism*. 2003;48(12):3522-3531.
82. Elefteriades JA. Indications for aortic replacement. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2010;140(6, Supplement):S5-S9.
83. Bengtsson H, Bergqvist D. Ruptured abdominal aortic aneurysm: A population-based study. *Journal of Vascular Surgery*. 1993;18(1):74-80.
84. Endovascular aneurysm repair versus open repair in patients with abdominal aortic aneurysm (EVAR trial 1): randomised controlled trial. *The Lancet*. 2005;365(9478):2179-2186.
85. Kurihara T, Shimizu-Hirota R, Shimoda M, et al. Neutrophil-Derived Matrix Metalloproteinase 9 Triggers Acute Aortic Dissection. *Circulation*. 2012;126(25):3070-3080.
86. Nienaber CA, Clough RE. Management of acute aortic dissection. *The Lancet*. 2015;385(9970):800-811.
87. Gawinecka J, Schönrrath F, von Eckardstein A. Acute aortic dissection: pathogenesis, risk factors and diagnosis. *Swiss Med Wkly*. 2017;147:w14489.
88. Trimarchi S, Jonker FHW, Hutchison S, et al. Descending aortic diameter of 5.5 cm or greater is not an accurate predictor of acute type B aortic dissection. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2011;142(3):e101-e107.
89. Mortality results for randomised controlled trial of early elective surgery or ultrasonographic surveillance for small abdominal aortic aneurysms. *The Lancet*. 1998;352(9141):1649-1655.
90. Gasson JC, Golde DW, Kaufman SE, et al. Molecular characterization and expression of the gene encoding human erythroid-potentiating activity. *Nature*. 1985;315(6022):768-771.
91. Docherty AJP, Lyons A, Smith BJ, et al. Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature*. 1985;318(6041):66-69.

92. Lambert E, Dassé E, Haye B, Petitfrère E. TIMPs as multifacial proteins. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2004;49(3):187-198.
93. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of Cell Science*. 2002;115(19):3719-3727.
94. Jung K-K, Liu X-W, Chirco R, Fridman R, Kim H-RC. Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *The EMBO Journal*. 2006;25(17):3934-3942.
95. Toricelli M, Melo FHM, Peres GB, Silva DCP, Jasiulionis MG. Timp1 interacts with beta-1 integrin and CD63 along melanoma genesis and confers anoikis resistance by activating PI3-K signaling pathway independently of Akt phosphorylation. *Molecular Cancer*. 2013;12(1):1095.
96. Murphy G. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biology*. 2011;12(11):233.
97. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(3):161-174.
98. Roderfeld M, Graf J, Giese B, et al. Latent MMP-9 is bound to TIMP-1 before secretion. 2007;388(11):1227-1234.
99. Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology (Bethesda)*. 2013;28(6):391-403.
100. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*. 2006;69(3):562-573.
101. Visse R, Nagase H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Circulation Research*. 2003;92(8):827-839.
102. Gomis-Rüth FX, Maskos K, Betz M, et al. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature*. 1997;389(6646):77-81.
103. Grünwald B, Schoeps B, Krüger A. Recognizing the Molecular Multifunctionality and Interactome of TIMP-1. *Trends Cell Biol*. 2019;29(1):6-19.
104. Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2008;40(6):1362-1378.
105. Nuttall RK, Sampieri CL, Pennington CJ, Gill SE, Schultz GA, Edwards DR. Expression analysis of the entire MMP and TIMP gene families during mouse tissue development. *FEBS Letters*. 2004;563(1):129-134.
106. Etique N, Verzeaux L, Dedieu S, Emonard H. LRP-1: a checkpoint for the extracellular matrix proteolysis. *Biomed Res Int*. 2013;2013:152163.
107. Simon F, Bergeron D, Larochelle S, et al. Enhanced secretion of TIMP-1 by human hypertrophic scar keratinocytes could contribute to fibrosis. *Burns*. 2012;38(3):421-427.
108. Swiderski RE, Dencoff JE, Floerchinger CS, Shapiro SD, Hunninghake GW. Differential expression of extracellular matrix remodeling genes in a murine model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. 1998;152(3):821-828.

109. McLennan SV, Wang XY, Moreno V, Yue DK, Twigg SM. Connective Tissue Growth Factor Mediates High Glucose Effects on Matrix Degradation through Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase Type 1: Implications for Diabetic Nephropathy. *Endocrinology*. 2004;145(12):5646-5655.
110. Roten L, Nemoto S, Simsic J, et al. Effects of Gene Deletion of the Tissue Inhibitor of the Matrix Metalloproteinase-type 1 (TIMP-1) on Left Ventricular Geometry and Function in Mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2000;32(1):109-120.
111. Lemaître V, Soloway PD, D'Armiento J. Increased medial degradation with pseudo-aneurysm formation in apolipoprotein E-knockout mice deficient in tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Circulation*. 2003;107(2):333-338.
112. Madtes DK, Elston AL, Kaback LA, Clark JG. Selective induction of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;24(5):599-607.
113. Wang H, Lafdil F, Wang L, Yin S, Feng D, Gao B. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) deficiency exacerbates carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in mice: involvement of hepatocyte STAT3 in TIMP-1 production. *Cell & Bioscience*. 2011;1(1):14.
114. Mack M. Inflammation and fibrosis. *Matrix Biology*. 2018;68-69:106-121.
115. Brophy CM, Marks WH, Reilly JM, David Tilson M. Decreased tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in abdominal aortic aneurysm tissue: A preliminary report. *Journal of Surgical Research*. 1991;50(6):653-657.
116. Eskandari MK, Vijungco JD, Flores A, Borensztajn J, Shively V, Pearce WH. Enhanced abdominal aortic aneurysm in TIMP-1-deficient mice. *J Surg Res*. 2005;123(2):289-293.
117. Rabkin SW. Differential expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP proteins in thoracic aortic aneurysm - comparison with and without bicuspid aortic valve: a meta-analysis. *Vasa*. 2014;43(6):433-442.
118. Schlake T, Thess A, Thran M, Jordan I. mRNA as novel technology for passive immunotherapy. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(2):301-328.
119. Verbeke R, Lentacker I, De Smedt SC, Dewitte H. The dawn of mRNA vaccines: The COVID-19 case. *J Control Release*. 2021;333:511-520.
120. Avci-Adali M, Behring A, Steinle H, et al. In vitro synthesis of modified mRNA for induction of protein expression in human cells. *J Vis Exp*. 2014(93):e51943-e51943.
121. Malone RW, Felgner PL, Verma IM. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(16):6077-6081.
122. Sahin U, Karikó K, Türeci Ö. mRNA-based therapeutics — developing a new class of drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2014;13(10):759-780.
123. Waghule T, Singhvi G, Dubey SK, et al. Microneedles: A smart approach and increasing potential for transdermal drug delivery system. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;109:1249-1258.
124. Golombek S, Pilz M, Steinle H, et al. Intradermal Delivery of Synthetic mRNA Using Hollow Microneedles for Efficient and Rapid Production of Exogenous Proteins in Skin. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2018;11:382-392.

125. Concannon J, Dockery P, Black A, et al. Quantification of the regional bioarchitecture in the human aorta. *Journal of Anatomy*. 2020;236(1):142-155.
126. Van Damme P, Oosterhuis-Kafeja F, Van der Wielen M, Almagor Y, Sharon O, Levin Y. Safety and efficacy of a novel microneedle device for dose sparing intradermal influenza vaccination in healthy adults. *Vaccine*. 2009;27(3):454-459.
127. Levin Y, Kochba E, Kenney R. Clinical evaluation of a novel microneedle device for intradermal delivery of an influenza vaccine: Are all delivery methods the same? *Vaccine*. 2014;32(34):4249-4252.
128. Kochba E, Levin Y, Raz I, Cahn A. Improved Insulin Pharmacokinetics Using a Novel Microneedle Device for Intradermal Delivery in Patients with Type 2 Diabetes. *Diabetes Technol Ther*. 2016;18(9):525-531.
129. Zucker S, Cao J, Chen W-T. Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene*. 2000;19(56):6642-6650.
130. Verma RP. Hydroxamic Acids as Matrix Metalloproteinase Inhibitors. In: Gupta SP, ed. *Matrix Metalloproteinase Inhibitors: Specificity of Binding and Structure-Activity Relationships*. Basel: Springer Basel; 2012:137-176.
131. Sparano JA, Bernardo P, Stephenson P, et al. Randomized Phase III Trial of Marimastat Versus Placebo in Patients With Metastatic Breast Cancer Who Have Responding or Stable Disease After First-Line Chemotherapy: Eastern Cooperative Oncology Group Trial E2196. *Journal of Clinical Oncology*. 2004;22(23):4683-4690.
132. Goffin JR, Anderson IC, Supko JG, et al. Phase I Trial of the Matrix Metalloproteinase Inhibitor Marimastat Combined with Carboplatin and Paclitaxel in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2005;11(9):3417-3424.
133. Vandenbroucke RE, Libert C. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nature Reviews Drug Discovery*. 2014;13(12):904-927.
134. Sorsa T, Tjäderhane L, Konttinen YT, et al. Matrix metalloproteinases: Contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Annals of Medicine*. 2006;38(5):306-321.
135. Chen JM, Nelson FC, Levin JI, et al. Structure-Based Design of a Novel, Potent, and Selective Inhibitor for MMP-13 Utilizing NMR Spectroscopy and Computer-Aided Molecular Design. *Journal of the American Chemical Society*. 2000;122(40):9648-9654.
136. Kaimal R, Aljumaily R, Tressel SL, et al. Selective Blockade of Matrix Metalloprotease-14 with a Monoclonal Antibody Abrogates Invasion, Angiogenesis, and Tumor Growth in Ovarian Cancer. *Cancer Research*. 2013;73(8):2457-2467.
137. Devy L, Huang L, Naa L, et al. Selective Inhibition of Matrix Metalloproteinase-14 Blocks Tumor Growth, Invasion, and Angiogenesis. *Cancer Research*. 2009;69(4):1517-1526.
138. Shiryayev SA, Remacle AG, Golubkov VS, et al. A monoclonal antibody interferes with TIMP-2 binding and incapacitates the MMP-2-activating

- function of multifunctional, pro-tumorigenic MMP-14/MT1–MMP. *Oncogenesis*. 2013;2(12):e80-e80.
139. Sela-Passwell N, Kikkeri R, Dym O, et al. Antibodies targeting the catalytic zinc complex of activated matrix metalloproteinases show therapeutic potential. *Nature Medicine*. 2012;18(1):143-147.
  140. Naito S, Takahashi T, Onoda J, et al. Development of a Neutralizing Antibody Specific for the Active Form of Matrix Metalloproteinase-13. *Biochemistry*. 2012;51(44):8877-8884.
  141. Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo. *Science*. 1990;247(4949):1465-1468.
  142. Conry RM, LoBuglio AF, Wright M, et al. Characterization of a Messenger RNA Polynucleotide Vaccine Vector. *Cancer Research*. 1995;55(7):1397-1400.
  143. Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. 1996;184(2):465-472.
  144. Fotin-Mleczek M, Zanzinger K, Heidenreich R, et al. Highly potent mRNA based cancer vaccines represent an attractive platform for combination therapies supporting an improved therapeutic effect. *The Journal of Gene Medicine*. 2012;14(6):428-439.
  145. Kreiter S, Selmi A, Diken M, et al. Intranodal Vaccination with Naked Antigen-Encoding RNA Elicits Potent Prophylactic and Therapeutic Antitumoral Immunity. *Cancer Research*. 2010;70(22):9031-9040.
  146. Britten CM, Singh-Jasuja H, Flamion B, et al. The regulatory landscape for actively personalized cancer immunotherapies. *Nature Biotechnology*. 2013;31(10):880-882.
  147. Martinon F, Krishnan S, Lenzen G, et al. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *European Journal of Immunology*. 1993;23(7):1719-1722.
  148. Jirikowski GF, Sanna PP, Maciejewski-Lenoir D, Bloom FE. Reversal of Diabetes Insipidus in Brattleboro Rats: Intrahypothalamic Injection of Vasopressin mRNA. *Science*. 1992;255(5047):996-998.
  149. Zangi L, Lui KO, von Gise A, et al. Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction. *Nature Biotechnology*. 2013;31(10):898-907.
  150. Kormann MSD, Hasenpusch G, Aneja MK, et al. Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nature Biotechnology*. 2011;29(2):154-157.
  151. Karikó K, Muramatsu H, Keller JM, Weissman D. Increased Erythropoiesis in Mice Injected With Submicrogram Quantities of Pseudouridine-containing mRNA Encoding Erythropoietin. *Molecular Therapy*. 2012;20(5):948-953.
  152. Ren Z, Chen J, Khalil RA. Zymography as a Research Tool in the Study of Matrix Metalloproteinase Inhibitors. *Methods Mol Biol*. 2017;1626:79-102.
  153. Schmitt R, Tscheuschler A, Laschinski P, et al. A potential key mechanism in ascending aortic aneurysm development: Detection of a linear

- relationship between MMP-14/TIMP-2 ratio and active MMP-2. *PLOS ONE*. 2019;14(2):e0212859.
154. Schlegel A, Bigey P, Dhotel H, Scherman D, Escriou V. Reduced in vitro and in vivo toxicity of siRNA-lipoplexes with addition of polyglutamate. *Journal of Controlled Release*. 2013;165(1):1-8.
  155. Snoek-van Beurden PAM, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques*. 2005;38(1):73-83.
  156. Sun J, Sukhova GK, Zhang J, et al. Cathepsin K Deficiency Reduces Elastase Perfusion-Induced Abdominal Aortic Aneurysms in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(1):15-23.
  157. Wang M, Zhao D, Spinetti G, et al. Matrix Metalloproteinase 2 Activation of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) and TGF- $\beta$ 1–Type II Receptor Signaling Within the Aged Arterial Wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(7):1503-1509.
  158. Arif R, Zaradzki M, Remes A, et al. AP-1 Oligodeoxynucleotides Reduce Aortic Elastolysis in a Murine Model of Marfan Syndrome. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017;9:69-79.
  159. Castro MM, Rizzi E, Ceron CS, et al. Doxycycline ameliorates 2K-1C hypertension-induced vascular dysfunction in rats by attenuating oxidative stress and improving nitric oxide bioavailability. *Nitric Oxide*. 2012;26(3):162-168.
  160. Hadler-Olsen E, Kanapathippillai P, Berg E, Svineng G, Winberg JO, Uhlin-Hansen L. Gelatin in situ zymography on fixed, paraffin-embedded tissue: zinc and ethanol fixation preserve enzyme activity. *J Histochem Cytochem*. 2010;58(1):29-39.
  161. Hadler-Olsen E, Winberg JO. Method for Determining Gelatinolytic Activity in Tissue: In Situ Gelatin Zymography. *Methods Mol Biol*. 2019;1952:193-199.
  162. Andries O, Mc Cafferty S, De Smedt SC, Weiss R, Sanders NN, Kitada T. N1-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice. *Journal of Controlled Release*. 2015;217:337-344.
  163. Svitkin YV, Cheng YM, Chakraborty T, Presnyak V, John M, Sonenberg N. N1-methyl-pseudouridine in mRNA enhances translation through eIF2 $\alpha$ -dependent and independent mechanisms by increasing ribosome density. *Nucleic Acids Research*. 2017;45(10):6023-6036.
  164. Stetler-Stevenson WG. Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Cell Signaling: Metalloproteinase-Independent Biological Activities. *Science Signaling*. 2008;1(27):re6-re6.
  165. Fata JE, Leco KJ, Moorehead RA, Martin DC, Khokha R. Timp-1 Is Important for Epithelial Proliferation and Branching Morphogenesis during Mouse Mammary Development. *Developmental Biology*. 1999;211(2):238-254.
  166. Singla DK, McDonald DE. Factors released from embryonic stem cells inhibit apoptosis of H9c2 cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2007;293(3):H1590-H1595.

167. Allaire E, Forough R, Clowes M, Starcher B, Clowes AW. Local overexpression of TIMP-1 prevents aortic aneurysm degeneration and rupture in a rat model. *The Journal of Clinical Investigation*. 1998;102(7):1413-1420.
168. Franck G, Dai J, Fife A, et al. Reestablishment of the Endothelial Lining by Endothelial Cell Therapy Stabilizes Experimental Abdominal Aortic Aneurysms. *Circulation*. 2013;127(18):1877-1887.
169. Rouis M, Adamy C, Duverger N, et al. Adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 reduces atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 1999;100(5):533-540.
170. Giraud A, Zeboudj L, Vandestienne M, et al. Gingival fibroblasts protect against experimental abdominal aortic aneurysm development and rupture through tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production. *Cardiovascular Research*. 2017;113(11):1364-1375.
171. Nosoudi N, Nahar-Gohad P, Sinha A, et al. Prevention of Abdominal Aortic Aneurysm Progression by Targeted Inhibition of Matrix Metalloproteinase Activity With Batimastat-Loaded Nanoparticles. *Circulation Research*. 2015;117(11):e80-e89.
172. Wang X, Parasaram V, Dhital S, et al. Systemic delivery of targeted nanotherapeutic reverses angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms in mice. *Scientific Reports*. 2021;11(1):8584.
173. Owens CD, Gasper WJ, Walker JP, Alley HF, Conte MS, Grenon SM. Safety and feasibility of adjunctive dexamethasone infusion into the adventitia of the femoropopliteal artery following endovascular revascularization. *Journal of Vascular Surgery*. 2014;59(4):1016-1024.
174. Moussi K, Haneef AA, Alsiary RA, et al. A Microneedles Balloon Catheter for Endovascular Drug Delivery. *Advanced Materials Technologies*. 2021;6(8):2100037.
175. Lee K, Lee J, Lee SG, et al. Microneedle drug eluting balloon for enhanced drug delivery to vascular tissue. *Journal of Controlled Release*. 2020;321:174-183.
176. Lee J, Kim D-H, Lee KJ, et al. Transfer-molded wrappable microneedle meshes for perivascular drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2017;268:237-246.
177. Hayashidani S, Tsutsui H, Ikeuchi M, et al. Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2003;285(3):H1229-H1235.
178. Matsumura S-I, Iwanaga S, Mochizuki S, Okamoto H, Ogawa S, Okada Y. Targeted deletion or pharmacological inhibition of MMP-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(3):599-609.
179. Ye S. Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome. *Cardiovascular Research*. 2006;69(3):636-645.

180. Fassina G, Ferrari N, Brigati C, et al. Tissue inhibitors of metalloproteases: Regulation and biological activities. *Clinical & Experimental Metastasis*. 2000;18(2):111-120.

## **7 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL**

Die vorliegende Arbeit wurde im klinischen Forschungslabor der Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Tübingen unter der Betreuung von Prof. Dr. Meltem Avci-Adali angefertigt.

Die Konzeption dieser Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Meltem Avci-Adali und Sonia Golombek.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Sonia Golombek und Ludmilla Hann eigenständig durch mich durchgeführt. Die Einbettung des Aortengewebes in Paraffin erfolgte durch das Pathologische Institut des Universitätsklinikums Tübingen. Die weitere Anfertigung der histologischen Schnitte sowie deren Auswertung erfolgten eigenständig durch mich. Die Etablierung der Methoden zur TIMP-1 Extraktion aus Aortengewebe sowie zur In-Situ Darstellung der MMP-Aktivität in Aortengewebe nach Mikroinjektion von humaner TIMP-1 mRNA erfolgten eigenständig durch mich.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Prof. Dr. Meltem Avci-Adali und Sonia Golombek eigenständig durch mich.

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

Tübingen, den 31.01.2022

Isabelle Franziska Doll

## 8 DANKSAGUNG

Aus eigener Erfahrung weiß ich, dass der Erfolg einer Doktorarbeit maßgeblich von der Unterstützung anderer abhängig ist. Daher möchte ich mich von ganzem Herzen bei allen Personen bedanken, die mich auf diesem Weg begleitet haben. Zunächst gilt mein Dank Prof. Dr. Dr. h.c. Christian Schlensak, ärztlicher Direktor der Universitätsklinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie Tübingen, für die Gelegenheit, meine Doktorarbeit im klinischen Forschungslabor anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. Meltem Avci-Adali für die Möglichkeit, als Teil ihrer Arbeitsgruppe dieses spannende Thema bearbeiten zu dürfen. Sie hatte stets ein offenes Ohr und hat mich mit Ihrer großen Erfahrung und Kompetenz unterstützt.

Ein großes Dankeschön geht an Sonia Golombek, die mir immer zur Seite stand. Durch ihre erstklassige Unterstützung in Form von hilfreichen Anregungen und konstruktiver Kritik hat sie maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Dem gesamten Team des klinischen Forschungslabors danke ich für die tolle und lehrreiche Zeit, die ich dort verbringen durfte. Ich war stets gerne bei Euch!

Ohne die Aortenproben wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Daher möchte ich mich bei den Ärzten und Patienten der Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie des Uniklinikums Tübingen für die Bereitstellung der humanen Proben sowie bei Bernd Neumann für die Bereitstellung der porcinen Proben bedanken.

Zuletzt gilt mein ganzer Dank meinen Eltern und meiner Schwester, die mich stets auf meinem bisherigen Weg unterstütz haben, für ihre Liebe und den unermüdlichen Glauben an mich.